



Neue Therapieansätze für das cisplatinresistente triple-negative Mammakarzinom

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Katharina Gohr geb. Hüppe

aus Dortmund

Düsseldorf, Mai 2019

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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Matthias U. Kassack
2. Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung:

11.07.2019

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 wurde freundlicherweise vom Arbeitskreis von Prof. Kurz vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie zur Verfügung gestellt.

Der Naturstoff Torrubellin B wurde freundlicherweise aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Proksch vom Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie zur Verfügung gestellt.

Die Daten an der Zelllinie MDA-MB-231 wurden von Dr. Alexandra Hamacher generiert.

Die IC₅₀-Werte von Torrubellin B wurden von allen Mitgliedern des Arbeitskreis Kassack generiert.

Die Zelllinie HCC38CisR wurde von Laura Engelke generiert.

Die HSP90-Assays wurden von Dr. Ana Rodrigues Moita durchgeführt.

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

Düsseldorf, den

(Katharina Gohr)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Abstract	1
2.	Zusammenfassung.....	3
3.	Einleitung.....	5
3.1	Tumorentstehung.....	5
3.2	Brustkrebs.....	5
3.3	Cisplatin und Cisplatinresistenz	7
3.4	Wachstumsfaktorrezeptoren	11
3.4.1	Die Familie der EGF-Rezeptoren	11
3.4.2	Der <i>Insulin-like growth factor 1</i> Rezeptor (IGF1R)	13
3.4.3	Zusammenspiel der EGF-Rezeptorfamilie mit IGF1R	16
3.4.4	Der PI3K/Akt-Signalweg	17
3.5	Histon-Deacetylasen.....	20
3.6	Naturstoffe in der Tumorthherapie.....	24
4.	Zielsetzung.....	26
5.	Materialien und Methoden.....	27
5.1	Materialien	27
5.1.1	Reagenzien, Chemikalien und Nährmedien.....	27
5.1.2	Kits	30
5.1.3	Antikörper	31
5.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	32
5.1.5	Geräte.....	32
5.1.6	Software	34
5.2	Puffer und Lösungen.....	35
5.2.1	Zellkultur.....	35
5.2.2	RNA Isolation	35

Inhaltsverzeichnis

5.2.3	BCA Protein Assay	36
5.2.4	SDS-PAGE.....	36
5.2.5	Western Blot	37
5.2.6	MTT Assay	38
5.2.7	Neutralrot Assay.....	38
5.2.8	Apoptose Assay	39
5.2.9	Zellzyklusanalyse	40
5.2.10	Membranintegrität.....	40
5.2.11	HSP90-Luciferase-Refaltungs-Assay	40
5.3	Zelllinien.....	42
5.4	Methoden	44
5.4.1	Zellkultivierung.....	44
5.4.2	Zellzählung.....	45
5.4.3	Generierung cisplatinresistenter Zelllinien	46
5.4.4	MTT Zellviabilitätsassay.....	46
5.4.5	Neutralrot Zellviabilitätsassay.....	48
5.4.6	Isolierung von RNA	48
5.4.7	Genexpressionsanalyse mit Microarrays	49
5.4.8	Isolierung von Proteinen	50
5.4.9	BCA Protein Assay	51
5.4.10	Analyse von Signaltransduktionswegen.....	51
5.4.11	SDS-PAGE.....	51
5.4.12	Western Blot	53
5.4.13	Verdopplungszeit	54
5.4.14	Apoptose Assay	55
5.4.15	Zellzyklusanalyse	57

5.4.16	Analyse des Mitochondrienpotentials	59
5.4.17	Membranintegrität.....	62
5.4.18	Migration	64
5.4.19	HSP90-Luciferase-Refaltungs-Assay	64
5.4.20	Statistik.....	65
6.	Ergebnisse	67
6.1	Wachstumsfaktorrezeptoren	67
6.2	HDAC-Inhibitoren	96
6.2.1	Panobinostat	96
6.2.2	LMK235.....	102
6.2.3	Effekt von HDACi auf die Ausbildung einer Cisplatinresistenz.....	118
6.3	Einfluss auf die Sensitivität von Paclitaxel.....	122
6.4	Der Naturstoff Torrubellin B.....	127
7.	Diskussion.....	140
7.1	Beeinflussung der Cisplatinsensitivität von HCC38 und HCC38CisR	140
7.2	Der Naturstoff Torrubellin B.....	145
	Literaturverzeichnis.....	150
	Abkürzungen	162
	Danksagung	166

1. Abstract

Widely established targeted therapies directed at triple negative breast cancer (TNBC) are missing. Classical chemotherapy remains the systemic treatment option. Cisplatin has been tested in TNBC but bears the well-known disadvantage of resistance development. The aim of this study was to identify resistance mechanisms in a cisplatin-resistant TNBC cell line and select targeted therapies based on these findings. For this purpose the TNBC cell line HCC38 was subjected to intermittent cisplatin treatment resulting in the 3.5-fold cisplatin-resistant subclone HCC38CisR. Activation of pro-survival pathways in HCC38CisR was explored by immunostaining of phospho-receptor tyrosine kinases and revealed increased phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R). Based on these findings, targeted therapies (NVP-AEW541, lapatinib and NVP-BE2235) against activated pathways were investigated regarding cancer cell growth and cisplatin sensitivity. Simultaneous inhibition of EGFR and IGF1R in the cisplatin resistant TNBC cell line HCC38CisR was synergistic with respect to inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. Notably, treatment with NVP-AEW541 increased potency of lapatinib almost seven-fold. However, both compounds could not restore cisplatin sensitivity completely. In contrast, the dual phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibitor NVP-BE2235 acted synergistically with cisplatin in HCC38CisR and fully restored cisplatin sensitivity.

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors have already shown their potential to sensitize cancer cells to chemotherapeutic drugs like cisplatin. For this reason HCC38 and HCC38CisR were subjected to treatment with the newly established HDAC inhibitor LMK235. Its effect on short-term and long-term intermittent cisplatin treatment was evaluated. LMK235 acted synergistically with cisplatin in HCC38 and HCC38CisR. Effectiveness was time- and concentration-dependent and showed that pretreatment with LMK235 is favorable in both TNBC cell lines subsequently treated with cisplatin. Incubating HCC38 in permanent presence of LMK235 could partly prevent development of cisplatin resistance in the course of long-term intermittent cisplatin treatment. Microarray data elicited negative regulation of ErbB-signaling pathway as one potential target of LMK235 that influenced cisplatin sensitivity in HCC38CisR. Consequently a combination with PI3K/mTOR inhibitor NVP-BE2235

enhanced efficacy of LMK235 on cisplatin sensitivity in HCC38CisR. Increased activation, detected as phosphorylation, of EGFR and IGF1R accompanied by Akt activation might therefore contribute to the development of cisplatin resistance and may serve as a potential biomarker for the suggested targeted therapies in cisplatin resistant TNBC.

Another approach in overcoming cisplatin resistance is the discovery of new cytostatic drugs out of naturally occurring compounds that act independently of a possible cisplatin resistance. Cytotoxicity of Torrubellin B, a dimeric anthracene derivative, was evaluated at different cisplatin sensitive and –resistant cell lines. It showed a strong cytotoxic activity that was independent of cisplatin sensitivity in the cell lines. In different assays potential mode of action of Torrubellin B was evaluated. The compound could uncouple mitochondrial membrane potential, influence membrane integrity, induced G₁-phase arrest and inhibited HSP90 machinery. Induction of apoptosis which presumably relied on interplay of all these effects of Torrubellin B showed that this natural compound might serve as a hit compound for the development of new cytostatic drugs.

2. Zusammenfassung

Für triple-negative Mammakarzinome (TNBC) sind keine individualisierten Therapien, die über die klassischen Zytostatika hinausgehen, etabliert. Aus diesem Grund bleibt die klassische Chemotherapie die pharmakologische Behandlungsoption. Cisplatin wurde insbesondere an TNBCs wieder in klinischen Studien untersucht, besitzt aber den bekannten Nachteil der Entwicklung von Resistenzen. Ziel dieser Arbeit war es, die Resistenzmechanismen in einer cisplatinresistenten TNBC-Zelllinie zu identifizieren und basierend darauf zielgerichtete Therapien auszuwählen. Dafür wurde die TNBC-Zelllinie HCC38 wöchentlichen Behandlungen mit Cisplatin ausgesetzt. Dies führte zur Generierung der neuen Zelllinie HCC38CisR, die einen Resistenzfaktor von 3,5 gegenüber der Ursprungszelllinie zeigte. Die Analyse der Aktivierung von Signalwegen, die das Überleben der Zellen fördern, mittels Immunfärbung von phosphorylierten Rezeptortyrosinkinasen zeigte, dass der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und der *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R) in der cisplatinresistenten Zelllinie deutlich stärker aktiviert waren. Daraufhin wurden die Inhibitoren der beiden Rezeptoren Lapatinib und NVP-AEW541 hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zellproliferation und Cisplatinsensitivität untersucht. Die Kombination von Lapatinib und NVP-AEW541 wirkte an der Zelllinie HCC38CisR hinsichtlich der Zellproliferation und der Induktion von Apoptose synergistisch. Dabei war insbesondere die fast 7-fache Steigerung der Zytotoxizität von Lapatinib durch die gleichzeitige Behandlung mit NVP-AEW541 beachtenswert. Nichtsdestotrotz konnten beide Inhibitoren die Cisplatinsensitivität nicht wiederherstellen. Im Gegensatz dazu wirkte der Inhibitor der beiden den RTKs nachgeschalteten Kinasen Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR), NVP-BEZ235, synergistisch mit Cisplatin und revertierte die Cisplatinresistenz vollständig.

Auch Histon-Deacetylase (HDAC) Inhibitoren haben bereits ihre Fähigkeit gezeigt, Tumorzellen für die Behandlung mit anderen Zytostatika, wie beispielsweise Cisplatin, zu sensitivieren. Deshalb wurden die Effekte des neuen HDAC Inhibitors LMK235 auf die kurzzeitige und langfristige Behandlung mit Cisplatin an den Zelllinien HCC38 und HCC38CisR untersucht. LMK235 wirkte in einer zeit- und konzentrationsabhängigen Weise in beiden Zelllinien synergistisch mit Cisplatin. Dabei zeigte sich ein Vorteil für die Präinkubation der Zelllinien mit dem HDAC Inhibitor vor der Behandlung mit Cisplatin. Die Ausbildung einer Cisplatinresistenz der Zelllinie HCC38 konnte durch dauerhafte Inkubation mit LMK235

partiell verhindert werden. Genexpressions-Daten, die mittels Microarray-Analyse erhoben wurden, zeigten, dass die negative Regulation des ErbB-Signalwegs durch LMK235 in der Zelllinie HCC38CisR einen potentiellen Wirkmechanismus darstellte. Infolgedessen wurde LMK235 mit NVP-BEZ235 kombiniert, wodurch der Effekt auf die Cisplatinsensitivität von HCC38CisR weiter gesteigert werden konnte. Die verstärkte Aktivität des EGFR und des IGF1R, detektiert als Phosphorylierung, bei gleichzeitiger Aktivierung von Akt trug somit zur Cisplatinresistenz der TNBC-Zelllinie bei und könnte einen potentiellen Biomarker für die vorgeschlagenen zielgerichteten Therapien darstellen.

Ein weiterer Ansatz zur Überwindung der Cisplatinresistenz stellt die Entwicklung neuer Zytostatika dar, deren Wirkung unabhängig vom Resistenzstatus gegenüber Cisplatin ist. Der Naturstoff Torrubellin B, ein dimeres Anthracen-Derivat, wurde an verschiedenen cisplatinsensitiven und – resistenten Zelllinien getestet und zeigte eine schnell einsetzende zytotoxische Wirkung, die unabhängig von der Cisplatinsensitivität war. Torrubellin B wurde in verschiedenen Assays hinsichtlich eines potentiellen Wirkmechanismus charakterisiert. Der Naturstoff konnte das mitochondriale Membranpotential deutlich absenken, die Integrität der Zellmembran stören, einen G₁-Zellzyklusarrest verursachen und die HSP90-Maschinerie inhibieren. Die vermutlich durch ein Zusammenspiel all dieser Mechanismen induzierte Apoptose in den Tumorzelllinien, zeigte, dass Torrubellin B ein potentielle Hitstruktur für die Entwicklung neuer Zytostatika darstellt.

3. Einleitung

3.1 Tumorentstehung

Tumorzellen stellen entartete Zellen dar, die sich unkontrolliert teilen und zunehmend die Fähigkeit verlieren in die Apoptose zu gehen. Neben epigenetischen Faktoren tragen Veränderungen auf genomischer Ebene zur Entstehung eines Tumors bei. Dabei sind besonders diejenigen Gene von Bedeutung, die den Zellzyklus, die DNA-Reparatur und die genomische Stabilität regulieren. Protoonkogene wie z.B. Wachstumsfaktoren spielen in gesunden Zellen eine Rolle im Rahmen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Durch Mutationen im Bereich dieser Gene kann die Aktivität der Genprodukte oder deren Expression verstärkt werden, sodass aus den Protoonkogenen Onkogene werden, die für eine verstärkte Zellproliferation der entarteten Zellen sorgen. Gleichzeitig spielt der Verlust oder die gestörte Funktion von Tumorsuppressorgenen eine Rolle in der Tumorentstehung. Deren Genprodukte hemmen die Zellproliferation bzw. kontrollieren sie. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist p53, das auch als „Hüter des Genoms“ bezeichnet wird. Bei DNA-Schäden hält es den Zellzyklus bis zur erfolgreichen Reparatur an oder leitet bei einem zu großen Ausmaß des Schadens die Apoptose ein. In vielen Tumorarten ist seine Funktion gestört, was zu einem unkontrollierten Zellwachstum führt. Für eine Tumorentstehung ist nicht eine einzige Mutation im Bereich der genannten Gene ausreichend. Erst wenn mehrere Schäden entstanden sind, die von den DNA-Reparaturmechanismen nicht mehr behoben werden können, kommt es zur ersten Phase der Tumorentstehung, der Initiierung. Zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich die Zellen phänotypisch noch nicht von gesunden Körperzellen, weisen aber bereits irreparable genomische Schäden auf. Im weiteren Verlauf, der Promotion, entstehen aus diesen Zellen morphologisch erkennbare präneoplastische Zellen, die sich weiter zu Tumoren entwickeln. [Hiddemann *et al*, 2010]

3.2 Brustkrebs

Brustkrebs ist die dritthäufigste Krebserkrankung weltweit und die Inzidenz innerhalb der Frauen ist in den letzten Jahren weiter angestiegen. Im Jahr 2016 wurden 1,7 Millionen Fälle von Brustkrebs diagnostiziert und 545.000 Todesfälle verzeichnet [Fitzmaurice *et al*, 2018]. Als Risikofaktoren gelten das Alter, eine westliche Lebensweise, eine frühe Menarche und

3 Einleitung

eine späte Menopause. Genetische Prädisposition besteht bei einer Mutation im Bereich der Gene breast cancer gene 1 und 2 (BRCA1/2) und p53. Histologisch wird beim Mammakarzinom nach WHO zwischen einem invasiven und nicht-invasiven Typ unterschieden, wobei das invasive Mammakarzinom je nach Gewebeteilung unter anderem in ein duktales, lobuläres, tubuläres, medulläres und papilläres Karzinom eingeteilt wird. Den am häufigsten vorkommenden Typ stellt das invasive duktales Mammakarzinom dar [Hiddemann *et al*, 2010].

Allgemein werden die Tumore nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Dabei steht T für die Tumorgroße, N für den Befall regionärer Lymphknoten und M für Fernmetastasen. Der Tumor wird weiterhin durch das Grading klassifiziert, das ihn nach seiner Differenzierung einstuft. Bei dem von Blässler überarbeiteten System nach Bloom und Richardson werden hierfür die Tubulusbildung [%], die Kernpolymorphie und die Mitoserate betrachtet. Des Weiteren wird der Tumor bei Brustkrebspatientinnen routinemäßig auf den Hormonrezeptorstatus (Estrogen- und Progesteronrezeptor) und den ErbB2-Status untersucht [Hiddemann *et al*, 2010]. Über 80% aller Fälle sind durch die übermäßige Aktivität eines oder mehrerer dieser Rezeptoren bedingt. Die restlichen Karzinome werden als triple-negativ klassifiziert [Papa *et al*, 2015].

Neben der chirurgischen Tumorentfernung und der Radiotherapie hat sich der Einsatz einer Polychemotherapie bei der Behandlung des Mammakarzinoms bewährt. Bei mittlerem bis hohem Rückfallrisiko ist für 3-6 Monate nach der operativen Tumorentfernung eine Polychemotherapie Standard. Dabei kommen insbesondere anthrazyklin- und taxanhaltige Regime zum Einsatz. Hormonrezeptorpositive Tumore werden zusätzlich mit einer antiestrogenen Therapie behandelt. Tumore, die eine ErbB2-Überexpression zeigen, werden für ein Jahr mit Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen diesen Rezeptor, behandelt [Hiddemann *et al*, 2010].

Die triple-negativen Mammakarzinome (TNBCs) kommen durch die fehlende Rezeptorexpression nicht für die Therapieoptionen außerhalb der klassischen Zytostatika in Frage [Foulkes *et al*, 2010]. Da TNBCs häufig Mutationen im BRCA1-Gen aufweisen und somit in ihrer DNA-Reparaturkapazität eingeschränkt sind, ist es wahrscheinlich, dass diese Tumore auf Zytostatika, die DNA-Strangverknüpfungen induzieren, ansprechen. Aus diesem Grund befinden sich Cisplatin bzw. Carboplatin wieder in klinischen Studien [Isakoff *et al*, 2015], [Poggio *et al*, 2018] und zumindest für die neoadjuvante Therapie konnte ein positiver

3.3 Cisplatin und Cisplatinresistenz

Effekt bereits gezeigt werden [von Minckwitz *et al*, 2014]. Die Studien zeigten, dass vor allem Patienten mit einer BRCA-Genmutation von der Therapie mit Platinderivaten profitierten. Deshalb werden zurzeit vorrangig diese Patienten zusätzlich zur Standard-Chemotherapie mit Platinderivaten behandelt [Bianchini *et al*, 2016]. Für die Behandlung von triple-negativen Mammakarzinomen mit Cisplatin werden aktuell 51 verschiedene klinische Studien gelistet
(<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Triple+Negative+Breast+Cancer&term=cisplatin&cntry=&state=&city=&dist=>, Stand: 09.05.2019), wobei es sich bei der Mehrzahl um die Kombination von Cisplatin mit anderen zielgerichteten Therapiemöglichkeiten handelt. Aufgrund des bekannten Potentials von Cisplatin Resistenzen auszubilden und den nicht unerheblichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist die Suche nach weiteren Therapieoptionen essentiell.

Durch die Möglichkeit, Tumorgewebe im großen Stil zu sequenzieren und deren Proteinexpression zu analysieren, wurde deutlich, dass die Tumore, die unter dem Begriff triple-negativ zusammengefasst werden, keineswegs eine homogene Gruppe darstellen [Bianchini *et al*, 2016]. Als Beispiel sei der PD-L1-Hemmer Atezolizumab genannt. Innerhalb der triple-negativen Mammakarzinome profitierten hauptsächlich diejenigen Frauen von der Therapie, deren Tumorgewebe PD-L1 exprimierte [Schmid *et al*, 2018]. Ziel der Forschung ist somit nicht nur die Suche nach weiteren Therapieoptionen, sondern auch die Festlegung von Biomarkern für deren zielgerichteten Einsatz.

3.3 Cisplatin und Cisplatinresistenz

Cisplatin ist der erste zur Tumorthherapie zugelassene Platinkomplex und wurde zum ersten Mal 1845 als „Peyrone`s chloride“ beschrieben. Die biologische Wirkung wurde 1965 durch Zufall vom Physiker Barnett Rosenberg entdeckt. Nach ersten klinischen Testungen wurde Cisplatin 1978 durch die FDA zugelassen [Kauffmann *et al*, 2010].

Cisplatin ist ein quadratisch-planarer Komplex, der in der Lage ist, mit Nukleophilen im Sinne einer SN-Reaktion zu reagieren. In wässriger Lösung werden die beiden Chlorid-Ionen sukzessive durch Wasser-Moleküle ausgetauscht. Die entstehenden Komplexe, Diamminaquachloroplatin(II) und Diamminodiaquaplatin(II), sind einfach bzw. zweifach positiv geladene Moleküle mit einer im Vergleich zu Cisplatin erhöhten Reaktivität gegenüber Nukleophilen. Durch die intrazellulär verminderte Chloridkonzentration (4 mM im Gegensatz

3 Einleitung

zu 100 mM extrazellulär) ist die Bildung der Aquo-Komplexe intrazellulär begünstigt, was zu einer Reaktivitätssteigerung führt. Als Nukleophile reagieren intrazellulär vor allem Proteine und Nukleinsäuren [Ott & Gust, 2006].

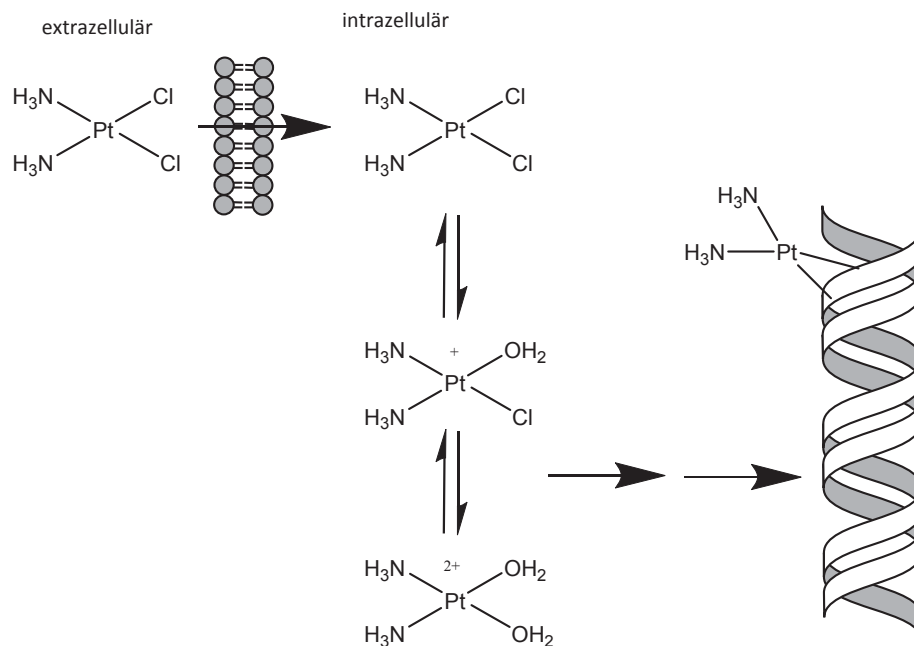


Abbildung 1 schematische Darstellung der intrazellulären Aktivierung von Cisplatin nach [Ott & Gust, 2006]

Cisplatin wird nach intravenöser Applikation sowohl durch passive Diffusion als auch durch aktiven Transport vermittelt in die Zellen aufgenommen. Die zytotoxische Wirkung entsteht vornehmlich durch die Bildung von Platin-DNA-Addukten, wobei das N7 des Imidazolrings der Purinbasen und hier insbesondere des Guanins der bevorzugte Bindungspartner ist. Da der Komplex zwei Abgangsgruppen aufweist, kann eine Vernetzung zwischen zwei DNA-Basen stattfinden. Die Bildung von Vernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrang-Addukte) ist dabei die Regel. Die Platin-DNA-Addukte stören die DNA-Replikation und DNA-Transkription der Zellen und führen somit zum Zellzyklusarrest und schließlich zur Apoptose [Wang & Lippard, 2005].

Cisplatinresistenz

Ein großes Problem der Behandlung mit Cisplatin stellt die Resistenz gegenüber der Therapie dar, die sich in eine primäre und eine sekundäre, d.h. im Laufe der Therapie erworbene Resistenz einteilen lässt. Die meisten Patienten sprechen initial sehr gut auf eine Therapie mit Cisplatin an, entwickeln dann aber im Laufe der Behandlung eine Resistenz. Auslöser für eine Platinresistenz können vor dem Angriff an der DNA (*pre-target*), am Target selbst (*on-*

3.3 Cisplatin und Cisplatinresistenz

target), nach dem Target (*post-target*) oder abseits des Targets (*off-target*) gefunden werden [Galluzzi *et al*, 2012].

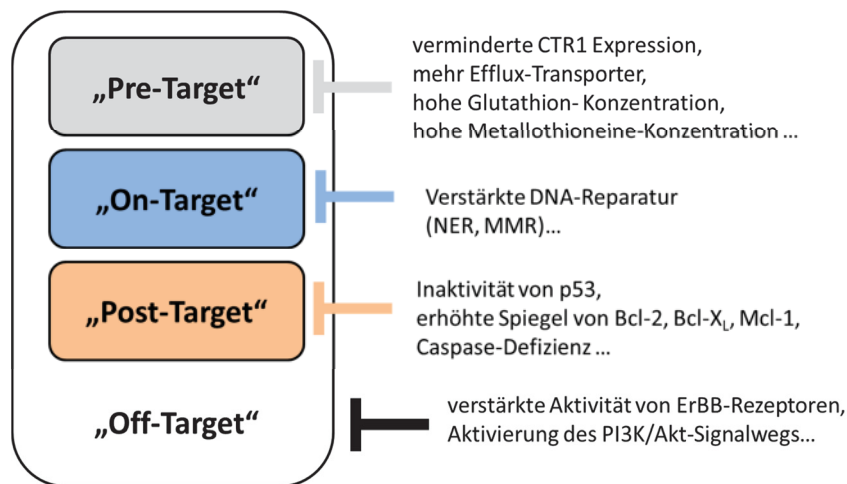


Abbildung 2 schematische Darstellung der Angriffspunkte für die Ausbildung einer Cisplatinresistenz nach [Galluzzi *et al*, 2012]

pre-target

Um die Wirksamkeit von Cisplatin vor seiner Bindung an die DNA zu vermindern, wird die intrazellulär zur Bildung von DNA-Addukten zur Verfügung stehende Menge an Cisplatin reduziert. Dies kann durch verminderte Aufnahme oder vermehrten Efflux geschehen. An der Aufnahme von Cisplatin in die Zelle sind unter anderem Kupfertransporter beteiligt. Insbesondere die Expression von CTR1 wurde mit einer Sensitivität gegenüber dem Platinkomplex in Verbindung gebracht [Burger *et al*, 2011]. Von der Gruppe der SLC (*solute carriers*) konnte bisher die Beteiligung von OCT2 (organischer Kationen-Transporter 2) an der Aufnahme von Cisplatin und Carboplatin gezeigt werden. Die Familie der ABC-Efflux-Transporter oder auch *multidrug-resistance proteine* (MRPs) werden mit einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber Cisplatin in Verbindung gebracht. ABCC1 (*multidrug-resistance protein 1*) kann zusammen mit einer erhöhten intrazellulären Glutathion (GSH)-Konzentration die intrazelluläre Cisplatinkonzentration verringern, indem GSH-Platin-Addukte vermehrt aus der Zelle geschleust werden. Auch ABCC2 (MRP2) wird in cisplatinresistenten Zellen häufig verstärkt exprimiert [Burger *et al*, 2011].

Neben den Transportern kann die übermäßige Bindung von Cisplatin an andere Nukleophile, außer der DNA, zu einer Verminderung der Konzentration an aktivem Cisplatin in der Zelle beitragen. Hierbei ist insbesondere das reichlich vorhandene Glutathion zu nennen, an dessen Thiolgruppe Cisplatin binden kann. Eine erhöhte intrazelluläre Glutathion (GSH)-

3 Einleitung

Konzentration, die z.B. durch eine erhöhte Expression der γ -Glutamylcystein-Synthetase zu Stande kommen kann, vermindert die effektiv in der Zelle vorhandene Cisplatin-Konzentration und somit die Wirkung des Zytostatikums [Siddik, 2003]. Metallothioneine sind kleine cytoplasmatische Proteine, die Schwermetalle binden können. Sie sind reich an thiolhaltigen Cysteinresten, die ebenfalls als Nukleophil an Platinkomplexe binden und diese inaktivieren können. In resistenten Tumorzellen wurde eine bis zu fünffach erhöhte Metallothionein-Konzentration beobachtet [Siddik, 2003].

on-target

Von den 4 hauptsächlichen DNA-Reparaturmechanismen NER (*nucleotide-excision-repair*), BER (*base-excision-repair*), MMR (*mismatch-repair*) und *double-strand-break-repair* wurden bisher vor allem NER und MMR in Zusammenhang mit einer Resistenz gegenüber Cisplatin gebracht.

NER scheint der Hauptweg zu sein, auf dem cisplatininduzierte DNA-Schäden repariert werden. Der NER-Komplex besteht aus 17 Proteinen, von denen ERCC1 (*excision repair cross-complementing 1*) und XPF (*xeroderma pigmentosum complementation group F*) diejenigen sind, die mit einer Cisplatinresistenz assoziiert werden konnten. Die beiden bilden ein Heterodimer mit Endonukleaseaktivität, das vor und nach der Läsion die Basenpaare irreversibel entfernt. In Ovarialkarzinomzelllinien konnte eine Cisplatinresistenz mit einer erhöhten NER-Aktivität assoziiert werden. Dabei waren insbesondere die ERCC1- und XPF-Expression erhöht [Kelland, 2007]. Der MMR-Komplex spielt nicht bei der Reparatur, sondern bei der Detektion cisplatininduzierter DNA-Schäden eine Rolle. Vermutlich führen erfolglose Reparaturversuche des MMR-Komplexes zur Einleitung der Apoptose. Somit ist im Gegensatz zum NER-Komplex nicht eine Überexpression, sondern ein Verlust des MMR-Systems mit der Cisplatinresistenz assoziiert [Galluzzi *et al*, 2012].

post-target

Ein wichtiges Beispiel für den Verursacher einer *post-target*-Cisplatinresistenz ist das p53-Tumorsuppressorprotein, das als Antwort auf zellulären Stress und DNA-Schäden die Zellproliferation durch Zellzyklusarrest oder Apoptose hemmt. Die Inaktivierung von p53 kann häufig in Tumoren beobachtet werden und ist mit einer Cisplatinresistenz assoziiert [Vousden & Lane, 2007]. Insgesamt haben alle Faktoren, die an der Induktion und Ausführung des Vorgangs der Apoptose beteiligt sind, das Potential das Ansprechen auf

3.4 Wachstumsfaktorrezeptoren

Cisplatin zu modulieren. Beispielsweise konnten erhöhte Spiegel der antiapoptotischen Protein Bcl-2, Bcl-X_L, und Mcl-1 mit einer Cisplatinresistenz assoziiert werden [Michaud *et al*, 2009]. Ebenso konnte für MCF-7 Brustkrebszelllinien, denen Caspase 3 als ausführendes Enzym der Apoptose fehlt, gezeigt werden, dass sie nicht in der Lage waren, als Antwort auf die Behandlung mit Cisplatin Apoptose zu induzieren [Wang & Lippard, 2005].

off-target

Es gibt Hinweise darauf, dass eine Cisplatinresistenz durch Veränderungen in Signalwegen, die nicht unmittelbar mit der Wirkung von Cisplatin zusammenhängen, aufrechterhalten werden kann [Galluzzi *et al*, 2012]. Dazu gehören beispielsweise der *Epidermal growth factor* (EGF)- und der ErbB2-Rezeptor und dessen nachgeschalteter Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg, der dem cisplatininduzierten apoptotischen Signal seine antiapoptotische Wirkung entgegensetzt. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Naturstoffe Resveratrol und Ellagsäure die Ausbildung einer Platinresistenz verhindern konnten. Dieser Effekt beruhte zumindest teilweise auf der verminderten Aktivierung von ErbB2 und ErbB3 im Verlauf der langfristigen Cisplatinbehandlung [Engelke *et al*, 2016]. Außerdem wurde die Aktivierung des *Insulin-like growth factor 1* (IGF1)-Rezeptors als möglicher entscheidender Faktor bei der Entwicklung der Cisplatinresistenz in einer Ovarialkarzinomzelllinie identifiziert [Eckstein *et al*, 2009].

3.4 Wachstumsfaktorrezeptoren

Diese Rezeptoren stellen, wie oben dargestellt, die Ursache für eine mögliche *off-target*-Cisplatinresistenz dar. Durch ihren Einfluss auf Zellproliferation, Apoptose und Metastasierung stellen sie außerdem einen potentiellen Angriffspunkt für Tumorthapien dar, die über die klassischen Zytostatika hinausgehen.

3.4.1 Die Familie der EGF-Rezeptoren

Die Familie der EGF-Rezeptoren (EGFR) oder auch ErbB-Rezeptoren besteht aus vier Mitgliedern: EGFR/ErbB1, Her2/ErbB2, Her3/ErbB3 und Her4/ErbB4. Alle besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne, die jedoch im Fall von ErbB3 nicht aktiv ist. Unter physiologischen Bedingungen wird ihre Aktivität durch die Expression ihrer Liganden kontrolliert. Die Bindung dieser Liganden führt zu einer Konformationsänderung der Rezeptormonomere, die eine Homo- oder

Heterodimerisierung erlaubt. Die Dimerisierung führt zu einer Transaktivierung des Bindungspartners durch Phosphorylierung. An die phosphorylierten Bindungsstellen werden Proteine rekrutiert, die die intrazellulären Signalkaskaden auslösen [Yarden & Sliwkowski, 2001]. Da der ErbB3-Rezeptor keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzt, kann er nur Aktivität als Teil eines Heterodimers entfalten. Die Liganden können je nach Rezeptorspezifität unterschieden werden. EGF, *transforming growth factor α* (TGF-α) und Amphiregulin binden spezifisch an EGFR. Betacellulin, *heparin-binding EGF* (HB-EGF) und Epiregulin binden sowohl an den EGFR als auch an ErbB4. Die Neureguline 1 und 2 binden an ErbB3 und ErbB4, die Neureguline 3 und 4 nur an ErbB4 [Hynes & Lane, 2005]. Für ErbB2 konnte bisher kein direkter Ligand identifiziert werden. Dieser wird jedoch auch nicht für die Konformationsänderung benötigt. Für eine Aktivierung wird trotzdem ein Heterodimer mit einem durch einen Liganden aktivierbaren Rezeptor benötigt [Jin & Esteva, 2008]. In ErbB2 überexprimierenden Tumoren finden sich auch spontan aktive Homo-Dimere [Yarden & Sliwkowski, 2001].

Die zwei wichtigsten durch ErbB-Rezeptoren aktivierten Signalkaskaden sind der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)- und der PI3K/Akt-Signalweg. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt letztendlich zur Transkription von Genen, die die Zellproliferation, -migration, -differenzierung und die Angiogenese steigern. Der PI3K/Akt-Signalweg vermittelt antiapoptotische Signale (vgl. Kapitel 3.4.4).

Die ErbB-Rezeptoren wurden bereits früh mit der Entwicklung von Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht. Insbesondere die ErbB2 Überexpression war in Studien mit einem Tumorfortschritt und einer schlechten Prognose bei einer Reihe von Krebserkrankungen assoziiert [Baselga & Swain, 2009]. Dabei wurde für das Heterodimer aus ErbB2 und ErbB3 ein besonders starker Einfluss auf nachgeschalteten Signalkaskaden berichtet. Als weitere Ursache für eine Überaktivität der Rezeptoren wurde eine vermehrte Produktion von Liganden der ErbB-Rezeptorfamilie entweder durch den Tumor selbst oder das umgebende Gewebe beschrieben [Salomon *et al*, 1995]. Für den EGFR wurde eine Steigerung der Kopienanzahl der Gene, aktivierende Mutationen oder eine verstärkte Proteinexpression des Rezeptors als Gründe für eine Überaktivierung des Rezeptors berichtet [Gazdar, 2009].

Durch den Einfluss auf onkogene Signalwege und die häufig gefundene Überaktivität von ErbB-Rezeptoren, stellten diese ein attraktives Target für die Entwicklung neuer Substanzklassen dar. Die Aktivität der ErbB-Rezeptoren sollte durch zwei Wirkstoffklassen

insbesondere in neoplastischem Gewebe, exprimiert. Dies wird durch gewebespezifische Faktoren stimuliert. IGF kommt also sowohl die Rolle eines im Körper zirkulierenden Hormons als auch eines lokalen Wachstumsfaktors zu [Pollak *et al*, 2004]. Die Aktivität der IGFs wird durch sechs *Insulin-like growth factor binding proteine* (IGFBPs) moduliert. Generell vermindern sie die Aktivität der Liganden, weil sie diese mit hoher Affinität binden und so deren Möglichkeiten zur Interaktion mit dem Rezeptor verringern. IGF1 ist normalerweise in einem trimeren Komplex mit IGFBP3 und einer säurelabilen Untereinheit gebunden und wird bei Zellstress (chirurgische Eingriffe, Verbrennungen, Schwangerschaft, etc.) proteolytisch freigesetzt. Unter bestimmten Umständen konnte eine Überexpression von IGFBPs, insbesondere von IGFBP2 und 5, mit einer verstärkten IGF-Wirkung assoziiert werden [Pollak, 2008]. Dieser Widerspruch liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die IGFs, die an die IGFBPs gebunden sind, eine verlängerte Halbwertszeit aufweisen [Pollak *et al*, 2004]. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass IGFBPs Wirkungen außerhalb des IGF-Signalweges besitzen.

Der Zusammenhang zwischen den Insulin/IGF-Signalwegen und Tumorerkrankungen wurde zunächst in epidemiologischen Studien beschrieben. Für postmenopausale Frauen, deren IGF1-Spiegel im oberen Drittel liegt, wurde ein 4,6-fach erhöhtes Risiko für Brustkrebs gezeigt. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass auch eine Assoziation zwischen den IGF1 Spiegeln und der Entwicklung von Prostata- oder Kolorektalkarzinomen besteht [Werner, 2012]. Die Autoren geben zwei mögliche Erklärungen an: Das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Überleben von geschädigten Zellen könnte in einem Umfeld mit erhöhtem IGF1 leicht hin zum Überleben verschoben sein. Alternativ könnte die höhere Menge an IGF1 dazu führen, dass die Tumore insgesamt schneller wachsen und dadurch klinisch detektierbar werden. Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang ist, dass eine congenitale IGF1 Defizienz vor der Entwicklung von Tumoren schützt [Pollak, 2008]. Hierbei ist wichtig, dass die Aktivierung des IGF1R durch IGF1 an sich kein onkogenes Ereignis darstellt. Nach einem solchen Ereignis („first-hit“) kann eine transformierte Zelle jedoch stark auf die Wachstumsstimulation durch IGF1 angewiesen sein.

Der IGF1R ist häufig in menschlichen Tumoren exprimiert. Eine ligandenunabhängige Aktivierung, wie sie z.B. bei ErbB2 beobachtet werden kann, ist jedoch selten der Fall [Pollak, 2008]. Selbst unter experimentell induzierter Überexpression wurde keine konstitutive Aktivität beobachtet. Auch aktivierende Mutationen sind nicht die Regel. Es wurde gezeigt,

3.4 Wachstumsfaktorrezeptoren

dass die IGF1R-Aktivierung unabhängig vom Tumorwachstum einen metastasierenden Phänotyp begünstigen kann [Sachdev et al, 2010].

Ebenso wie die EGF-Rezeptorfamilie stellt der IGF1R ein potentes Target für antineoplastische Therapien dar. Strategien, um den Signalweg zu beeinflussen, bestehen in der Reduzierung der Menge des verfügbaren Liganden oder dessen Bioaktivität oder in der Blockade der Rezeptorfunktion. Der IGF1R-Antikörper Figitumumab zeigte 2008 in einer Phase II Studie eine signifikante Erhöhung des Ansprechens bei SCLC (*small cell lung cancer*) in Kombination mit Paclitaxel und Carboplatin. Dieses Ergebnis konnte jedoch in einer Phase III Studie nicht bestätigt werden [Yee, 2012]. Kleine Moleküle, die die Rezeptortyrosinkinase inhibieren, sind bisher nicht spezifisch für den IGF1R, sondern tendieren dazu, alle Mitglieder der Insulinrezeptorfamilie zu inhibieren. Es wurde befürchtet, dass diese Substanzen durch gleichzeitige Blockade der Funktion des Insulinrezeptors schwerwiegende metabolische Nebenwirkungen nach sich ziehen. Die bisherigen klinischen Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Substanzen sicherer sind als ursprünglich angenommen. Dies könnte daran liegen, dass in der genutzten Dosierung der Insulinrezeptor nicht vollständig blockiert ist. Eine andere Möglichkeit könnte eine komplexe Pharmakokinetik sein. Die im Muskel erreichten Konzentrationen scheinen sehr gering zu sein. Nichtsdestotrotz kann ein Anstieg des Insulinlevels beobachtet werden, der wahrscheinlich ausreicht, den Blutglucosespiegel zu kontrollieren [Pollak, 2012]. Ein Beispiel ist die Substanz NVP-AEW541. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor das Wachstum von verschiedenen soliden und hämatologischen Tumoren *in vitro* und *in vivo* hemmt. Das gilt sowohl für die Substanz alleine als auch in der Kombination mit anderen Chemotherapeutika [Hartog et al, 2012].

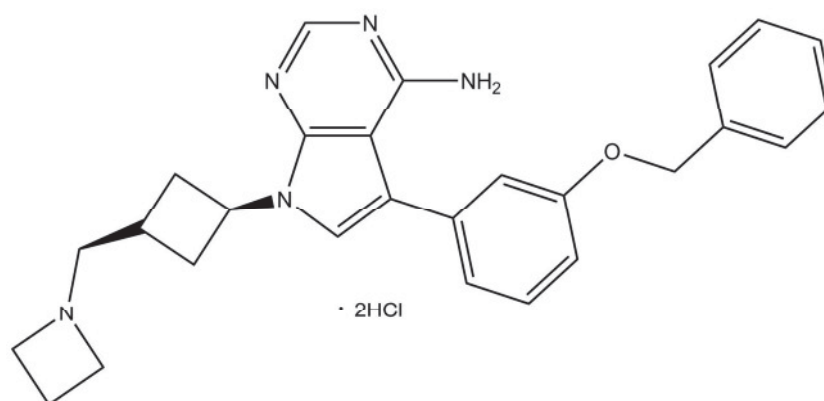


Abbildung 4 Strukturformel von NVP-AEW541

Bisher gibt es keine positiven Daten aus Phase III Studien für Substanzen, die als Target den IGF1R Signalweg haben [Yee, 2018]. Wie bei anderen Targets könnte dies jedoch daran liegen, dass nicht die gesamte Patientenpopulation von dieser Therapie profitiert, sondern nur bestimmte Untergruppen. Der mangelnde Erfolg der klinischen Studien somit also am Studiendesign [Yee, 2018]. Um dies zu verbessern, wäre es nötig, Biomarker zu definieren, die ein Ansprechen auf eine gegen den IGF1R gerichtete Therapie vorhersagen können. Dies könnten beispielsweise die IGF1-Spiegel vor Behandlungsbeginn oder die Rezeptorexpression bzw. dessen Aktivität sein. Zu beachten ist jedoch, dass ein Tumor nicht nur von systemischem IGF1, sondern auch von autokrin oder parakrin synthetisiertem IGF1 stimuliert werden kann. Interessanterweise konnte bei einer Studie an über 400 primären Tumorgewebsproben nicht die Expression des IGF1R, sondern nur dessen Phosphorylierungsstatus mit einer schlechteren Prognose korreliert werden [Law *et al*, 2008]. Aufgrund dessen wurde von den Autoren der IGF1R-Phosphorylierungsstatus als potentieller Biomarker vorgeschlagen. Bisher konnte jedoch kein Biomarker klinisch validiert werden. Durch die ausbleibenden Erfolge in der klinischen Testung ist die Forschung am IGF1R deutlich zurückgegangen. Zurzeit befinden sich lediglich zwei Wirkstoffe in klinischen Studien (https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=IGF1&cond=Cancer&Search=Apply&recrs=a&age_v=&gndr=&type=&rslt=, Stand: 09.05.2019)

3.4.3 Zusammenspiel der EGF-Rezeptorfamilie mit IGF1R

Ein weiterer Grund für die fehlenden positiven klinischen Ergebnisse für IGF1R Inhibitoren könnte in einer kompensatorischen Aktivität von Wachstumsfaktorrezeptoren oder Insulinrezeptoren liegen [Pollak, 2012]. Insbesondere wird ein „Cross-talk“ zwischen der Familie der ErbB-Rezeptoren und dem IGF1R diskutiert (vgl. Abbildung 5). Zum einen aktivieren beide Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) ähnliche Signalwege. Zum anderen konnte eine vermehrte Aktivität der IGF1-Rezeptoren als ein Resistenzmechanismus gegen den EGFR-Inhibitor Gefitinib beobachtet werden. Zudem wurde eine direkte Assoziation der Aktivität des IGF1-Rezeptors mit dem EGFR, der zu einer Resistenz gegen Erlotinib führt, gezeigt. Ebenso scheint der IGF1R an der Regulation der Produktion bzw. Verfügbarkeit von EGFR Liganden beteiligt zu sein [Jin & Esteva, 2008].

3.4 Wachstumsfaktorrezeptoren

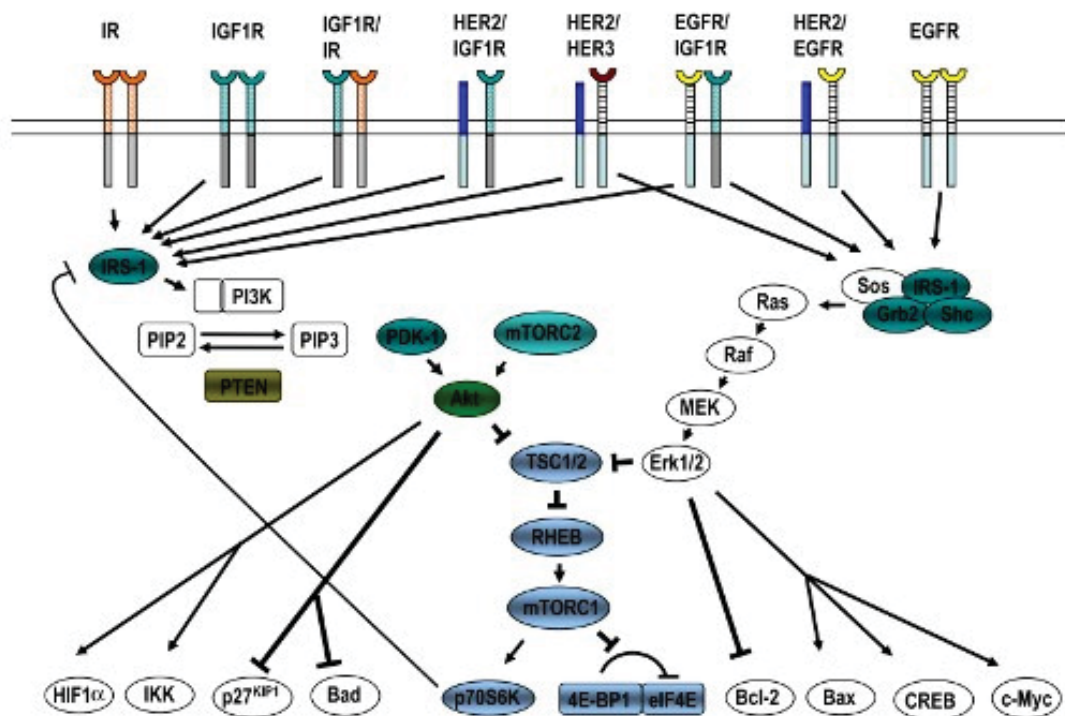


Abbildung 5 „Cross-talk“ zwischen dem IGF1R und der EGF-Rezeptorfamilie modifiziert nach [Jin & Esteva, 2008]. Beide Rezeptortyrosinkinasen beeinflussen den PI3K-Akt- und den MAPK-Signalweg. Ebenso sind Heterodimere zwischen dem IGF1R und ErbB2 beschrieben. Als Resultat der Signalkaskaden kommt es zur Verminderung der Apoptose und zur Steigerung der Zellproliferation, -migration, -invasion und Angiogenese.

Dies spricht dafür, dass die Tumorzellen in der Lage sind, bei Wegfall eines der antiapoptotischen Signalwege, die Aktivität des übrig gebliebenen Signalweges zu steigern. Deshalb erscheint der Versuch einer Kombinationstherapie mit Inhibitoren beider Rezeptorklassen sinnvoll. In vitro Studien konnten für einen niedermolekularen IGF1R Inhibitor einen synergistischen Effekt in Kombination mit Gefitinib zeigen [Huang *et al*, 2009c]. Bisher konnte jedoch in größeren klinischen Studien, die IGF1R Inhibitoren mit Erlotinib oder Gefitinib kombinierten, kein Vorteil für die Patienten gezeigt werden [Beckwith & Yee, 2015]. Da in diesen Studien keine Biomarker zur Vorhersage des Ansprechens auf die Therapie genutzt wurden, könnte es insbesondere für die IGF1R Inhibitoren wichtig sein, ebensolche zu definieren.

3.4.4 Der PI3K/Akt-Signalweg

Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit liegt auf dem PI3K-Signalweg, als Teil des intrazellulären Signalweges, der durch die Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert wird.

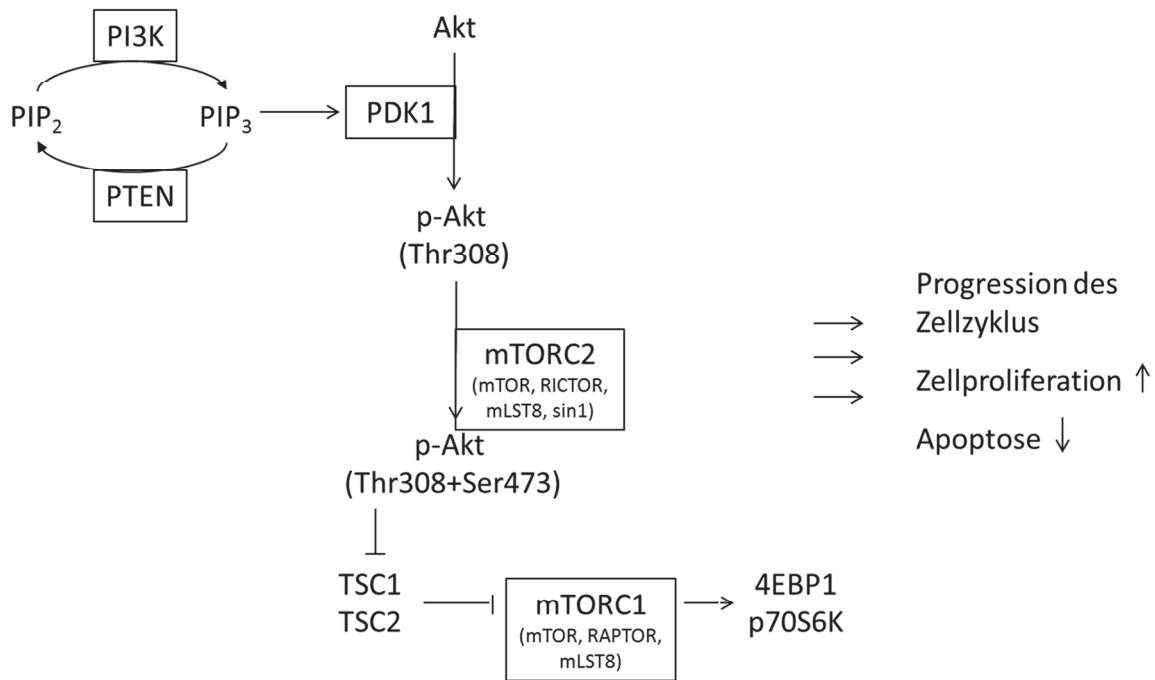


Abbildung 6 vereinfachte Übersicht über den PI3K/Akt Signalweg.

PI3Ks sind Heterodimere, die aus einer regulatorischen p85 und einer katalytischen p110 Untereinheit bestehen. Sie können direkt mit der intrazellulären Domäne der Wachstumsfaktorrezeptoren oder über Adaptorproteine reagieren. Dadurch wird der inhibitorische Effekt der p85 Untereinheit ausgeschaltet und die Lipidkinaseaktivität der p110 Untereinheit aktiviert. Die p110 Untereinheit phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃), was wiederum die Phosphorylierung von Akt an Thr308 durch die Phosphoinositide-dependent Kinase-1 (PDK1) erleichtert, indem es Akt an die Zellmembran transloziert. Für maximale Akt-Aktivität wird eine zweite Phosphorylierung an Ser473 durch mTORC2 (*mTOR-rictor complex*) benötigt. Somit ist Akt der zentrale Effektor dieses Signalweges [Serra *et al*, 2008].

mTOR entfaltet seine Wirkung in zwei Komplexen: mTORC1 und mTORC2. mTORC1 besteht aus mTOR, RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*) und mLST8 (*mTOR-associated protein LST8 homolog*). mTORC1 reguliert die Proteinsynthese, das Zellwachstum, die Proliferation, den Zellmetabolismus und die Angiogenese. mTORC2 besteht aus mTOR, RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mLST8 und sin1. Dieser Komplex phosphoryliert Akt [Rosner & Hengstschlaeger, 2008]. Der TSC 1/2-Komplex hemmt mTOR. Akt inaktiviert den TSC 1/2-Komplex, sodass mTOR aktiviert wird. Als Teil des mTOR-raptor-Komplexes (mTORC1) phosphoryliert mTOR somit 4EBP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein*) und die ribosomale protein S6 kinase (p70S6K) und aktiviert diese. Diese

3.4 Wachstumsfaktorrezeptoren

Proteine sorgen für eine verstärkte Translation von mRNAs, die wichtig für die Kontrolle und Progression des Zellzyklus sind. Über diesen Weg verstärkt Akt die Proteinsynthese und das Zellwachstum. Akt reduziert die Zellzyklusinhibitoren p27 und p21 und verstärkt die Zellzyklusproteine c-Myc und cyclin D1 und führt so zu verstärkter Zellproliferation [Jiang & Ji, 2019]. Der Einfluss erstreckt sich auf viele pro- und antiapoptotische Proteine wie Bad (Bcl-2 Familie) und limitiert den programmierten Zelltod, um das Zellüberleben zu stärken. Einige dieser Phänomene werden durch Akt-getriebene Ausschleusung von FOXO aus dem Zellkern vermittelt. FOXO verstärkt die Transkription von Genen, die Apoptose und Zellzyklusarrest induzieren. Wird FOXO aus dem Zellkern ausgeschleust und dadurch inaktiviert, werden somit weniger proapoptotische Gene transkribiert [Farhan *et al*, 2017].

Die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges kann aus vielen Gründen in Tumoren gestört sein. Dies kann zum einen an einer Überaktivität der oben beschriebenen Rezeptortyrosinkinasen liegen, zum anderen sind vor allem für PI3K aber auch für Akt aktivierende Mutationen bekannt [Koboldt *et al*, 2012]. Des Weiteren sind für das Protein PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), das die Aktivität von Akt negativ reguliert, Mutationen mit Funktionsverlust bekannt [Yuan & Cantley, 2008]. Dies alles führt dazu, dass der PI3K/Akt-Signalweg zu den am häufigsten dysregulierten Signalwegen in Tumoren gehört und deshalb ein lohnenswertes Angriffsziel für neue Wirkstoffe darstellt.

Ein Wirkstoff, der in diesen Signalweg eingreift, stellt NVP-BEZ235 dar, das sowohl an PI3K als auch an mTOR in der ATP-Bindetasche bindet [Maira *et al*, 2008].

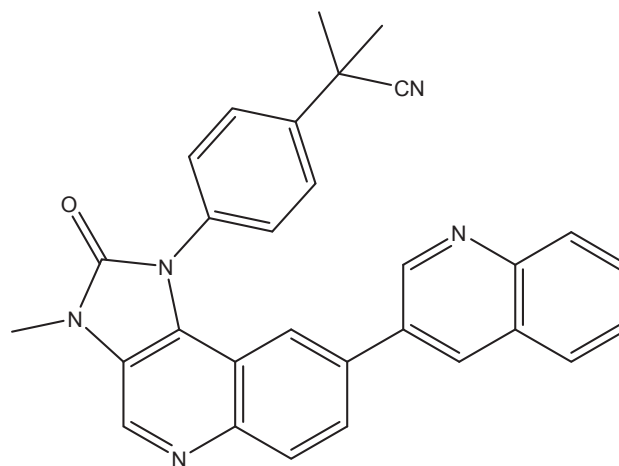


Abbildung 7 Strukturformel von NVP-BEZ235

Serra et al. zeigten, dass bei niedrigen Konzentrationen (<100 nM) an NVP-BEZ235 die mTOR Inhibition überwog, während erst bei relativ hohen Konzentrationen die duale Blockade beobachtet werden konnte [Serra *et al*, 2008]. Dadurch kam es je nach Konzentration und Inkubationszeit zu verschiedenen Effekten. Dabei könnte der negative Feedback-Loop von p70S6K und IRS-1,2 eine Rolle spielen. mTORC1 phosphoryliert und aktiviert p70S6K. Bei vorwiegender mTOR-Hemmung ist also p70S6K weniger aktiv und kann somit IRS-1,2 weniger hemmen. Dies wiederum macht ein verstärktes Insulin-/IGF Signal möglich, was wiederum die Aktivität von Akt steigern kann. Dies ist bei höheren NVP-BEZ235-Konzentrationen (zusätzliche PI3K Hemmung) nicht der Fall. Es konnte gezeigt werden, dass NVP-BEZ235 die PI3K Signalwege unabhängig von dessen Mutationsstatus reduziert [Serra *et al*, 2008].

Allgemein inhibiert NVP-BEZ235 die Aktivität von Akt, p70S6K, 4EBP1 und induziert die Translokation von FOXO3a in den Nukleus [Lin *et al*, 2014]. Somit waren phospho-Akt (p-Akt), phospho-P70S6K und phospho-4E-BP-1 nach NVP-BEZ235-Inkubation (>100 nM) signifikant reduziert, während die nicht-phosphorylierten Proteine unverändert blieben [Baumann *et al*, 2009].

Für NVP-BEZ235 konnte in cisplatinresistenten Blasenkrebszelllinien ein synergistischer Effekt mit Cisplatin gezeigt werden [Moon du *et al*, 2014]. Ebenso wurde ein positiver Effekt für die Kombination mit Trastuzumab in Trastuzumab-resistenten Mammakarzinomen berichtet [O'Brien *et al*, 2014].

3.5 Histon-Deacetylasen

Ein weiterer Faktor, der zur Tumorgenese und zur Ausbildung von Zytostatikaresistenzen beitragen kann, sind epigenetische Veränderungen. Die DNA eukaryotischer Zellen ist in Form von Chromatin organisiert. Innerhalb des Chromatins bilden Nukleosomen sich wiederholende Einheiten, die kettenförmig aneinandergereiht sind. Nukleosomen bestehen aus einem Histonoktamer, um das die DNA in einer Länge von 146 Basenpaaren gewunden ist. Histone sind basische Proteine, deren flexible Enden unter anderem durch Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung posttranslational modifiziert werden können. Durch die Anlagerung des Linker Histons H1 zwischen zwei Nukleosomen kann die DNA weiter aufspiralisiert werden. Die posttranslationalen Modifikationen an den Histon-Proteinen können Einfluss auf die Chromatinstruktur und damit auch auf die Gentranskription an den

3.5 Histon-Deacetylasen

entsprechenden Stellen nehmen. Diese Veränderungen der Genexpression finden nicht auf der Ebene der Nukleotid-Sequenz statt und werden epigenetisch genannt. Eine zweite wichtige epigenetische Modifikation ist die Methylierung der DNA selber. Beide Mechanismen sind unter anderem für zell- und gewebespezifische Expressionsmuster verantwortlich. Diese epigenetischen Muster können mitotisch vererbt werden.

Die Enzymklassen Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC) katalysieren in einem dynamischen Prozess die Acetylierung und Deacetylierung von Histon- und Nicht-Histon-Proteinen. Dabei wird durch Acetylierung von Lysinresten die ehemals positive Ladung der Histon-Proteine neutralisiert und somit die Interaktion mit den negativ geladenen Phosphatresten der DNA vermindert. Dies führt zu einer Lockerung der Chromatinstruktur, die im Allgemeinen eine Gentranskription erleichtert (vgl. Abbildung 8). Umgekehrt kann die Abspaltung eines Acetylrestes durch HDAC zur Unterdrückung der Transkription durch Chromatin-Verdichtung führen. Die vermehrte Acetylierung von z.B. Transkriptionsfaktoren als nicht-Histon-Proteine kann ebenso zu einer verminderten Bindung an die DNA und in diesem Fall zu einer verminderten Genexpression führen.

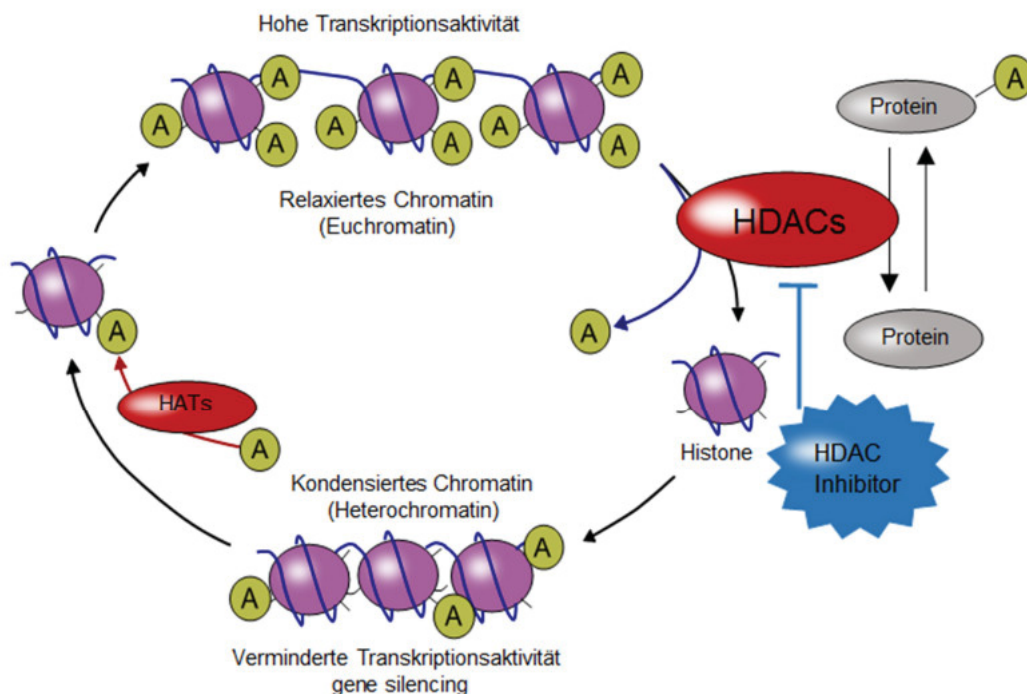


Abbildung 8 Zusammenspiel von Histon-Acetylasen (HAT) und –Deacetylasen (HDAC) [Moita, 2017] Die Acetylierung führt zu einer Lockerung der Chromatinstruktur und nachfolgend zu einer erleichterten Gentranskription.

In Säugetieren wurden 18 HDAC identifiziert. Sie werden in 4 Klassen eingeteilt. Die Klassen I (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8), IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9), IIb (HDAC6, HDAC10) und IV (HDAC11) gehören zu den „klassischen“ Zink-abhängigen HDAC. Die Enzyme der Klasse III (Sirtuine 1-7) sind NAD⁺-abhängig und stellen Homologe eines aus Hefen stammenden Enzyms (SIR2) dar. Die HDAC unterscheiden sich in ihrer Struktur, in ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle, im Expressionsmuster und in der enzymatischen Funktion [Haberland *et al*, 2009]. Alle HDAC, bis auf die Isoform 8, findet man fast ausschließlich in Komplexen mit anderen Proteinen, zu denen auch andere HDAC-Isoformen zählen können. HDAC haben neben den Histon-Proteinen eine Reihe weiterer zellulärer Substrate, deren Acetylierungsstatus sie beeinflussen. Insbesondere die Klasse IIa hat eine eher geringe Aktivität gegenüber Histon-Proteinen. Zu den Nicht-Histon-Proteinen, deren Acetylierungsstatus durch HDAC beeinflusst wird, gehören unter anderem das Tumorsuppressor-Protein p53, α -Tubulin und das Protoonkogen BCL6 [Marks, 2010]. Strukturelle Mutationen in HDAC scheinen eher selten mit Tumorerkrankungen assoziiert zu sein. Ein veränderter Expressionsstatus wurde jedoch bereits für viele menschliche Tumorarten gezeigt. Eine systematische Analyse der Expression der Zink-abhängigen HDAC zeigte häufig erhöhte Expressionslevel im Vergleich zum gesunden Gewebe. Deshalb wird die pharmakologische Inhibition der HDAC als mögliche Zusatztherapie bei Krebserkrankungen untersucht [Connolly & Stearns, 2012], [Sun *et al*, 2018].

HDAC-Inhibitoren

HDAC-Inhibitoren (HDACi), insbesondere die der Klasse der Hydroxamsäurederivate, haben einige strukturelle Gemeinsamkeiten. In die katalytische Tasche der HDAC bindet eine Zink-bindende Domäne. Diese ist über eine gerade Alkylkette mit der „capping group“ verbunden. Somit inhibieren diese Wirkstoffe nur die sogenannten klassischen, Zink-abhängigen HDAC. Die Zink-bindende Domäne trägt maßgeblich zur Bindungsaffinität bei, wohingegen die „capping group“ für die Selektivität verantwortlich ist. Eine Linker-Länge von 6 Methylenheiten scheint optimal für die Wirksamkeit zu sein.

3.5 Histon-Deacetylasen

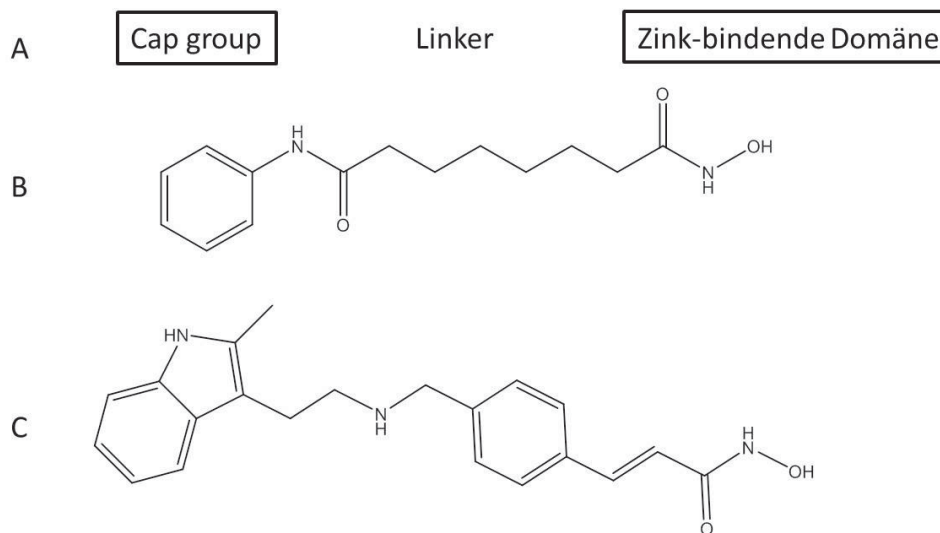


Abbildung 9 Schema der Struktur von HDACi (A) veranschaulicht an den beiden bereits zugelassenen Wirkstoffen Vorinostat (B) und Panobinostat (C).

Außer den Hydroxamsäurederivaten werden cyclische Peptide, elektrophile Ketone, kurzkettige Fettsäuren, Benzamide, Boronsäure-Derivate, Benzofuranone und Sulfonamide als HDACi getestet [Marks, 2010].

HDACi können die Transkription von Genen durch vermehrte Acetylierung von Histonen, Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen, die in die Genexpression eingreifen, beeinflussen. Obwohl der theoretische Hintergrund der Acetylierungseffekte von Histonen vor allem eine Steigerung der Genexpression durch HDACi erwarten lässt, werden Herauf- und Herunterregulation *in vitro* in gleichem Maße beobachtet [Dickinson *et al*, 2010]. Dies liegt vermutlich auch an Einflüssen auf Nicht-Histon-Proteine. Die Aussagen über den Anteil der Gene, deren Expression verändert wird, reichen von 4% bis 20%. Die Anzahl der Gene, deren Expression verändert wird, steigt mit der Zeit und der Konzentration des eingesetzten HDAC-Inhibitors. Eines der am häufigsten induzierten Gene, ist der cyclin dependent kinase inhibitor p21 [Marks, 2010].

HDACi können das Zellwachstum sowohl in normalen als auch in transformierten Zellen stoppen. Der durch fast alle zurzeit erhältlichen HDACi induzierte G₁-Zellzyklusarrest kann vor allem mit einer Induktion von p21 assoziiert werden. [Dickinson *et al*, 2010].

HDACi können den Zelltod transformierter Zellen durch die Aktivierung extrinsischer und intrinsischer apoptotischer Signalwege induzieren. Beim extrinsischen Signalweg kann die Expression von Todesrezeptoren und deren Liganden aufreguliert werden. Im intrinsischen Signalweg werden die proapoptotischen Mitglieder der Bcl2-Familie (Bim, Bax, Bak, Bik) auf- und die antiapoptotischen Proteine (Bcl-2, Bcl-X_L) herunterreguliert. Eine Überexpression

von Bcl-2 und Bcl-X_L scheint ein wichtiger Mechanismus bei Resistenzen gegenüber HDACi zu sein [Dickinson *et al*, 2010]. Der Einfluss der HDACi auf eine Acetylierung von p53 wird kontrovers diskutiert. Viele Studien zeigen eine Aktivierung von p53 nach HDAC-Inhibition. Dennoch scheint die eingeleitete Apoptose und vermehrte p21-Expression in den meisten Berichten eine p53 unabhängige Wirkung der HDAC-Inhibition zu sein [Dickinson *et al*, 2010]. Die Hydroxamsäurederivate Vorinostat und Panobinostat, sowie das cyclische Peptid Romidepsin, sind von der FDA für die Behandlung des fortgeschrittenen kutanen T-Zell Lymphoms (CTCL) zugelassen. Die klinischen Studien bezüglich der Behandlung solider Tumore sind noch nicht abgeschlossen. Für Panobinostat konnte an TNBC-Zelllinien zytotoxische Effekte gezeigt werden [Tate *et al*, 2012]. In-vitro Studien zeigten neben dieser Wirkung das Potential von HDACi, Tumorzellen für die Behandlung mit anderen Zytostatika [Budman *et al*, 2011] oder endokrinen Therapien [Huang *et al*, 2011] zu sensitivieren. Durch die HDACi induzierte, gelockerte Chromatinstruktur können DNA-schädigende Wirkstoffe leichter an ihren Wirkort gelangen, sodass eine Kombination von Cisplatin mit einem HDACi sinnvoll erscheint [Kim *et al*, 2003]. Für Brustkrebszelllinien konnte bereits ein mindestens additiver Effekt der Kombination von Vorinostat und Cisplatin gezeigt werden [Wawruszak *et al*, 2015]. In unserer Arbeitsgruppe konnte für den von Linda Marek im Arbeitskreis von Prof. Kurz synthetisierten HDACi LMK235 bereits Synergismus mit Cisplatin gezeigt werden, der der Kombination von Vorinostat mit Cisplatin überlegen war [Marek *et al*, 2013].

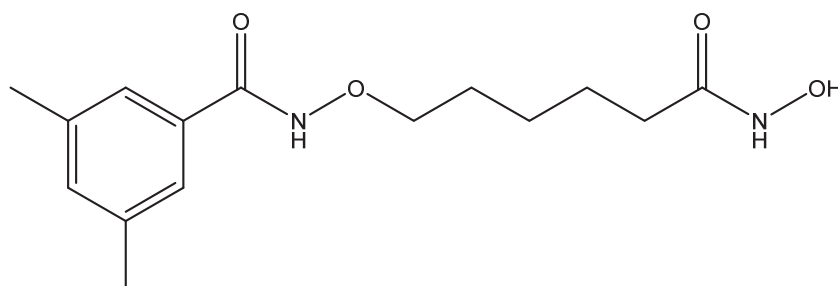


Abbildung 10 Strukturformel von LMK235

Auch für andere HDACi wurde ein Synergismus mit Cisplatin an verschiedenen Tumorzelllinien gezeigt [Stenzel *et al*, 2017], [Krieger *et al*, 2017].

3.6 Naturstoffe in der Tumorthherapie

Die Untersuchung von Naturstoffen hinsichtlich ihres Einsatzpotentials in der Tumorthherapie ist ein weiterer Ansatz, neue Optionen in der Behandlung von Krebspatienten z

3.6 Naturstoffe in der Tumorthherapie

u entwickeln [Nambiar *et al*, 2011]. Diese Naturstoffe werden aus Pflanzenteilen oder auch aus endophytischen Mikroorganismen isoliert. Beispielsweise konnte in unserer Arbeitsgruppe zusammen mit dem Arbeitskreis von Prof. Proksch für die Naturstoffe Phomoxanthon A und Embellicin A und B eine starke Zytotoxizität auf Tumorzellen, unabhängig von ihrem Resistenzstatus gegenüber Cisplatin, gezeigt werden [Engelke, 2015]. Die Naturstoffe Resveratrol und Ellagsäure konnten die Ausbildung eines cisplatinresistenten Phänotyps in einer Ovarialkarzinomzelllinie verhindern [Engelke *et al*, 2016].

Der Naturstoff Torrubiellin B (vgl. Abbildung 11) wurde erstmals 2012 aus dem Pilz *Torrubiella sp.* isoliert [Isaka *et al*, 2012]. Die erneute Isolation des asymmetrischen Anthracenderivats, diesmal aus dem endophytischen Pilz *Acremonium spec.* der Mangrovenpflanze *Sonneratia caseolaris*, und Aufklärung der absoluten Konfiguration wurde im Arbeitskreis von Prof. Proksch beschrieben [Hemphill *et al*, 2015]. Im Zuge dessen wurde eine hohe Zytotoxizität von Torrubiellin B gegenüber Tumorzelllinien beobachtet. Dabei war insbesondere die äquipotente Zytotoxizität an cisplatin sensitiven und –resistenten Zelllinien beachtenswert.

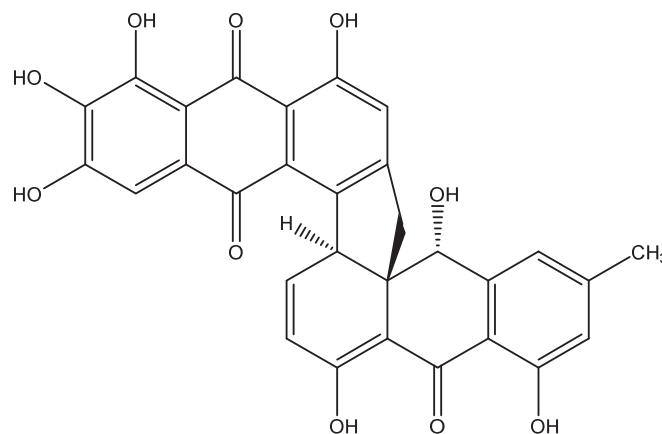


Abbildung 11 Torrubiellin B aus dem endophytischen Pilz *Acremonium spec.*

4. Zielsetzung

Triple-negative Mammakarzinome (TNBC) besitzen aufgrund fehlender Angriffspunkte für Wirkstoffe außerhalb der klassischen Zytostatika eine schlechte Prognose. Auch Cisplatin, das zurzeit an dieser Tumorentität untersucht wird, besitzt den Nachteil einer möglichen Resistenzentwicklung. Um die Cisplatinresistenz beim TNBC zu untersuchen, wurde aus der TNBC-Zelllinie HCC38 ein cisplatinresistenter Subklon HCC38CisR generiert. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die intrazelluläre Signaltransduktion, die zur Ausbildung und Aufrechterhaltung einer Cisplatinresistenz beitragen kann, untersucht werden. Durch den Vergleich der Aktivierung von RTKs in HCC38 und HCC38CisR sollten mögliche Therapieansätze für das cisplatinresistente triple-negative Mammakarzinom generiert werden. Im zweiten Teil sollte die Rolle der Epigenetik in der Cisplatinresistenz untersucht werden. Dafür sollte der bereits bekannte Synergismus zwischen den HDACi und Cisplatin in der Zelllinie HCC38 und ihrem cisplatinresistenten Subklon HCC38CisR untersucht werden. Neben dem Synergismus sollte insbesondere auch das Potential der HDACi, die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Cisplatin zu verhindern, untersucht werden. Dafür wurde die Wirksamkeit des bereits zugelassenen HDACi Panobinostat mit dem neuen HDACi LMK235 verglichen.

Im dritten, kleineren Teil der Arbeit wurde die zytotoxische Wirkung des Naturstoffs Torrubellin B, die unabhängig vom Resistenzstatus von Cisplatin ist, eingehender untersucht.

Ziel war es also, neue Therapieansätze, auch für die Kombination mit Cisplatin, für die Tumorthherapie, insbesondere die des cisplatinresistenten triple-negativen Mammakarzinoms, vorzuschlagen.

5. Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Reagenzien, Chemikalien und Nährmedien

Im Folgenden sind die in der Arbeit verwendeten Reagenzien, Chemikalien und Nährmedien aufgelistet.

Tabelle 1: verwendete Chemikalien und Reagenzien

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
Acetyl Coenzym A Trilithiumsalz	AppliChem, Darmstadt
Adenosintriphosphat-Dinatriumsalz Hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin, acetyliert aus Rinderserum, für molekularbiologisches Arbeiten, lyophilisiert (BSA, für HSP90-Assay)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin Fraktion V (pH 7,0) für Western Blotting	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Aprotinin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau-Natriumsalz	ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt a. M.
Buffer RLT	QIAGEN, Hilden
Calciumchlorid-Dihydrat	KMF Laborchemie, Leipzig
Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP)	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
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO), p.a.	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

5 Materialien und Methoden

D-Luciferin-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
DNase-freie RNase A	Thermo Scientific, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Eosin B (C.I. 45400)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure p.a.	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Ethanol AnalaR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Natrium-EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Formaldehydlösung 37%, p.a. stabilisiert mit ca. 10% Methanol	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Glycerol wasserfrei, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Helipur®	B Braun Melsungen AG, Melsungen
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), freie Säure	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol, techn.	Abfüllung Zentrales Chemikalienlager HHU
Kaliumchlorid AnalaR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
KU0063794	Cayman Chemical, USA
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lapatinib	Cayman Chemical, USA
Leupeptin Hemisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
LMK235	Synthese im AK Kurz analog zu [Marek <i>et al</i> , 2013]
Luciferase aus Photinus pyralis (L9506)	Sigma-Aldrich, Steinheim
LY294002	Cayman Chemical, USA
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

5.1 Materialien

Methanol, techn.	Abfüllung Zentrales Chemikalienlager HHU
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	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Natriumchlorid-Lösung 0,9% (isotonisch)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Natriumcitrat tribasisch-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat AnalAR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat NORMAPUR analytical reagent	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Natriumhydroxid	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neutralrot	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NVP-AEW541	Novartis Pharma GmbH, Basel, Schweiz
NVP-AUY922	Novartis Pharma GmbH, Basel, Schweiz
NVP-BEZ235	Novartis Pharma GmbH, Basel, Schweiz
NVP-HSP990	Novartis Pharma GmbH, Basel, Schweiz
Paclitaxel	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
PageRuler™, vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Scientific, Rockford, USA
Panobinostat	Selleckchem, Eching
Penicillin-Streptomycin-Lösung [10.000 U/ml; 10 mg/ml]	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Pepstatin A	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pierce® BCA Protein Assay Reagents	Thermo Scientific, Rockford, USA
Propidiumiodid (PI)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
QVD-Oph Hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reinstwasser (Aqua destillata)	eigene Herstellung

5 Materialien und Methoden

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	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Steriles Reinstwasser	destilliertes Wasser, autoklaviert
Tetramethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetramethylrhodaminethylesterperchlorat (TMRE)	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
Torrubiellin B	Isolation im AK Proksch, wie beschrieben in [Hemphill <i>et al</i> , 2015]
N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-glycin (Tricin)	AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	AppliChem, Darmstadt
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 nach publizierten Methoden [Gediya <i>et al</i> , 2005]
Western Blotting Luminol Reagents	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

5.1.2 Kits

Die Tabelle enthält die verwendeten Reagenzienkits bzw. die daraus verwendeten Bestandteile.

Tabelle 2 Verwendete Kits bzw. deren verwendete Bestandteile

Kit/Kit-Bestandteil	Hersteller
Human GE 4x44K v2 Microarray Kit	Agilent Technologies, USA
Low Input Quick Amp Labeling Kit, Two-Color	Agilent Technologies, USA
Lysispuffer No. 6 aus Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden

5.1 Materialien

Proteome Profiler™ Antibody Array Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Proteome Profiler™ Array Human Phospho-RTK Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden
RNA 6000 NanoKit	Agilent Technologies, USA
RNase-free DNase Set	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAshredder	QIAGEN, Hilden

5.1.3 Antikörper

Nachfolgend sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet

Tabelle 3: verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat Anti-EGFR	R&D Systems, Wiesbaden	1:250
Goat Anti-ErbB2	R&D Systems, Wiesbaden	1:500
Goat Anti-ErbB3	R&D Systems, Wiesbaden	1:100
Goat Anti-IGF1R	R&D Systems, Wiesbaden	1:100
Goat Anti-PARP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2500
Mouse Anti-β-Actin (C4)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2000
Rabbit Anti-Akt 1/2/3	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:200
Rabbit Anti-phospho-EGFR	R&D Systems, Wiesbaden	1:250
Rabbit Anti-phospho-ErbB2	R&D Systems, Wiesbaden	1:100
Rabbit Anti-phospho ErbB3	R&D Systems, Wiesbaden	1:200
Rabbit Anti-phospho-IGF1R	R&D Systems, Wiesbaden	1:100
Rabbit Anti-phospho-Akt	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	R&D Systems, Wiesbaden	1:3000

5 Materialien und Methoden

5.1.4 Verbrauchsmaterialien

Folgende Materialien wurden für diese Arbeit benutzt.

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Biosphere® Pipettenspitzen mit Aerosolfilter 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Chromatographie Papier	Whatman® International Ltd, Maldstone, UK
Entsorgungsbeutel PP, Plastibrand®	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Gewebekulturflaschen T25, T75, T175	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Immobilon®-P Transfer Membran; Porengröße 0,45 µm	Millipore Corporation, Billerica, USA
Kryoröhrchen Cryo Pure	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp Tubes 0,2 ml	Applied Biosystems/Applera, Darmstadt
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Pipettenspitzen mit Kapillare für Gelbeladung	VWR, Darmstadt
PP-Röhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Röhren 3,5 ml, 55 x 12 mm, PS	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Sterile Einmalpipetten 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
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., Nürmbrecht
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht

5.1.5 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Experimente verwendet.

Tabelle 5 verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Heizblock AccuBlock TM Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Edison, USA
Autoclav Systec V-65	Systec GmbH, Wettenberg

5.1 Materialien

2100 Bioanalyzer	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
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
Microarray Scanner G4900DA	Agilent Technologies, USA
Microplate-Reader FLUOstar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Microplate-Reader 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-Cycler Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Werkbank	BIO-FLOW Technik, Meckenheim
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

5 Materialien und Methoden

Ultraschallbad Sonorex Super RK514BH	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
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

5.1.6 Software

Folgende Software wurde für die Erhebung der Daten und die nachfolgende Auswertung verwendet.

Software	Hersteller
CalcuSyn 2.1	Biosoft, Cambridge, UK
Feature Extraction 11.0.1.1	Agilent Technologies, USA
FloMax 2.7 und 2.82	Partec GmbH, Münster
GraphPad Prism® 4.03	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ V1.47h	Wayne Rasband, National Institute 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
Microsoft Picture it!® Foto Premium V10.0.612.0	Microsoft Corporation, USA
Motic Images Plus 2.0	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar

5.2 Puffer und Lösungen

5.2.1 Zellkultur

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

60 mg Eosin wurden in 15 ml autoklavierter 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 Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst, ein pH von 7,4 eingestellt und bei Bedarf 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und autoklaviert. Die Lagerung des 10-fach konzentrierten Puffers erfolgte bei -20°C und die des einfach konzentrierten bei 2-8°C.

Nährmedien

DMEM bzw. RPMI 1640 wurden mit 10% FKS versetzt, welches vorher bei 56°C für eine Stunde inaktiviert wurde. Weitere Zusätze waren 120 U/ml Penicillin und 120 µg/ml Streptomycin. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

5.2.2 RNA Isolation

Lysispuffer

Der RLT-Puffer der Firma Qiagen wurde mit 1% (V/V) 2-Mercaptoethanol versetzt und bei 2-8°C gelagert.

DEPC-Wasser

Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde Aqua bidest. 2h mit 0,1% (V/V) DEPC im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung von DEPC wurde die Lösung autoklaviert und anschließend bei 2-8°C gelagert.

5.2.3 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: 1500, 1000, 700, 500, 250, 125 und 25 µg/ml. Standards und Verdünnungsreihe wurden bei -20°C gelagert und bei Verwendung jederzeit auf Eis gelagert.

Kupfersulfatlösung 4%

Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat wurde zu 4% (m/V) in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde bei 2-8°C gelagert.

BCA-working reagent

Das BCA Protein Assay Reagenz (enthält Bicinchoninsäure) wurde 50:1 mit Kupfersulfatlösung 4% (m/V) gemischt. Die Lösung wurde für jeden Assay frisch hergestellt.

5.2.4 SDS-PAGE

Laemmli-Puffer 2X mit 2-Mercaptoethanol

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

SDS wurde in destilliertem Wasser gelöst und TRIS zugegeben. Der pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt und die anderen Bestandteile zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

APS-Lösung

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

5.2 Puffer und Lösungen

Sammelgelpuffer 4X

Tris 0,5 M

SDS 0,4% (m/V)

Die Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst und mit 6 N HCl ein pH-Wert von 6,8 eingestellt.

Trenngelpuffer 4X

Tris 1,5 M

SDS 0,4% (m/V)

Die Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst und mit 6 N HCl ein pH-Wert von 8,8 eingestellt.

SDS-Laufpuffer 10X

Tris 25 mM

Glycin 192 mM

SDS 1% (m/V)

Die Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde bei 2-8°C gelagert. Vor Gebrauch wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und die gebrauchsfertige Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

5.2.5 Western Blot

Semi-Dry Puffer

SDS-Laufpuffer 1X wurde mit 10% Methanol versetzt. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Blocking Puffer

3% (m/V) Milchpulver bzw. BSA wurden in TBST gelöst.

TBS 10X

Tris 200 mM

Natriumchlorid 9% (m/V)

Die Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst und mit 6 N HCl ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde bei 2-8°C gelagert. Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und ebenfalls bei 2-8°C gelagert.

TBST 1X

TBS 1X wurde 0,1% (V/V) Tween 20 zugesetzt und der Puffer bei 2-8°C gelagert.

5.2.6 MTT Assay

Natriumchloridlösung 0,9% (m/V), autoklaviert

9 g Natriumchlorid wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Aliquotierung wurde die Lösung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Cisplatin-Stammlösung und Verdünnungsreihe

Cisplatin wurde in 0,9% Natriumchloridlösung (autoklaviert) zu 5 mM gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Aus der Stammlösung wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit 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 in 0,9% Natriumchloridlösung (autoklaviert) hergestellt. Diese wurde ebenfalls bei -20°C gelagert. 0,9%ige NaCl-Lösung wurde im MTT Assay für die Cisplatinverdünnungsreihe als Lösemittelkontrolle eingesetzt.

Stammlösungen und Verdünnungsreihen anderer Stoffe

Alle Stammlösungen wurden in der Konzentration 10^{-2} M in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert. Aus dieser Stammlösung wurden Verdünnungsreihen im jeweiligen Nährmedium hergestellt. Diese Verdünnungsreihen wurden nur für den einmaligen Gebrauch hergestellt und nicht gelagert. Die finale Konzentration an DMSO auf den Zellen überschritt dabei 1% nie und zeigte in dieser Konzentration keine Effekte auf die Zellen. Im MTT-Assay wurde als Lösemittelkontrolle das Nährmedium verwendet.

MTT-Lösung

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

5.2.7 Neutralrot Assay

Neutralrot-Stammlösung

Neutralrot 0,1 % (m/V)

wurden in 50 ml Aqua dest. gelöst und mit 3 Tropfen Eisessig versetzt. Die Lösung wurde bei 2-8°C gelagert

5.2 Puffer und Lösungen

HEPES-Pufferlösung 1M

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) 1 M

wurden in Aqua dest. gelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde bei 2-8°C gelagert.

Neutralrot-Inkubationslösung

Neutralrot-Stammlösung 10% (V/V)

HEPES 1 M 10% (V/V)

wurden in Zellkulturmedium verdünnt. Die Lösung wurde stets frisch hergestellt und vor Zugabe zu den Zellen auf 37°C erwärmt.

Fixierlösung

Formaldehyd 1% (V/V)

CaCl₂ x 2 H₂O 1% (m/V)

wurden in Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde bei 2-8°C gelagert.

Extraktionslösung

Ethanol 50% (V/V)

Essigsäure 1% (V/V)

wurden mit Aqua dest. gemischt und bei 2-8°C gelagert.

5.2.8 Apoptose Assay

Propidiumiodid-Stammlösung

Propidiumiodid wurde in einer Konzentration von 500 µg/ml in steril filtriertem Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde 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 (entspricht 20% (V/V) der Propidiumiodid-Stammlösung)

Die Substanzen wurden in steril filtriertem Aqua dest. gelöst. Der Puffer wurde bei 2-8°C im Dunkeln gelagert

5 Materialien und Methoden

sheath fluid zur Benutzung des Durchflusszytometers

Kommerziell erhältliche sterile 0,9%ige Natriumchloridlösung wurde mit 0,01% Natriumazid zur Konservierung versetzt. Die Lösung wurde vor Benutzung mindestens 30min im Ultraschallbad entgast und nicht länger als 3 Tage verwendet.

5.2.9 Zellzyklusanalyse

Ethanol 70%

35 ml absoluter Ethanol und 15 ml Aqua dest. wurden gemischt und bei -20°C gelagert.

Färbelösung

Pro Probe wurden

Triton X-100	0,5 µl
DNase freie RNase 10 mg/ml	10 µl
Propidiumiodid	20 µg/ml

in 500 µl kommerziell erhältlicher steriler Natriumchlorid-Lösung 0,9% gelöst und bis zur Verwendung im Dunkeln auf Eis gelagert.

5.2.10 Membranintegrität

Färbelösung

Pro Probe wurden

20 µl Propidiumiodid-Stammlösung 500 µg/ml

auf 500 µl mit kommerziell erhältlicher steriler Natriumchlorid-Lösung 0,9% aufgefüllt. Die Lösung wurde stets frisch hergestellt und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

5.2.11 HSP90-Luciferase-Refaltungs-Assay

Stabilitätspuffer

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

5.2 Puffer und Lösungen

wurden in steril filtriertem Aqua dest. ad 10 ml gelöst und bei -20°C gelagert. 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

wurden in steril filtriertem Aqua dest. gelöst und ein pH von 7,4 eingestellt. Der Puffer 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

wurden in steril filtriertem Aqua dest. gelöst und bei -20°C gelagert. Von diesem Puffer wurden maximal 1,5 ml hergestellt, um häufiges Auftauen und Einfrieren zu vermeiden.

Master Mix

Pro zu belegendem Well wurden

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 neu gemischt und auf Eis gelagert. Die denaturierte Luciferase wurde erst kurz vor Gebrauch hinzugegeben. Es wurde jeweils ein 10%iger Überschuss hergestellt, um den Pipettierverlust auszugleichen.

Assay Puffer

Tricin	25 mM
MgSO ₄	8 mM
Na-EDTA	0,1 mM
DTT	33 µM

5 Materialien und Methoden

wurden in Aqua dest. gelöst und ein pH von 7,8 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Für jeden Assay wurde die benötigte Menge an Assay Puffer mit

D-Luciferin 50 µM

Coenzym A 240 µM

versetzt und direkt verwendet.

5.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 6 In dieser Arbeit verwendete Zelllinien sowie deren Herkunft

Zelllinie	Gewebetyp	Nährmedium	Herkunft
A2780	Ovarialkarzinom	RPMI 1640	ECACC, Salisbury, Whiteshire, UK
A2780CisR			
Cal27	Zungenkarzinom	DMEM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
Cal27CisR			
HCC38	triple-negatives Mammakarzinom	RPMI 1640	ECACC, Salisbury, UK
HCC38CisR			
HCC38-Panobinostat			
HCC38-LMK235			
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
J82	Blasenkarzinom	DMEM	Prof. Wolfgang Schulz, Urologie, HHU, Düsseldorf
J82CisR			
Kyse510	Ösophaguskarzinom	RPMI 1640	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
Kyse510CisR			
MDA-MB-231	triple-negatives	DMEM (15% FKS)	ECACC, Salisbury, UK
MDA-MB-231	Mammakarzinom		

5.3 Zelllinien

RT-112	Blasenkarzinom	DMEM	Prof. Wolfgang Schulz, Urologie, HHU, Düsseldorf
T47D	Mammakarzinom	RPMI	ECACC, Salisbury, UK

Im Rahmen dieser Arbeit war die Zelllinie HCC38 das bevorzugte Testsystem. Daher wurde die Authentizität dieser Zelllinie durch die Analyse der short tandem repeats der DNA am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf analysiert. Es zeigte sich durch den Abgleich mit der Datenbank der European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), dass es sich bei den verwendeten Zelllinien HCC38, HCC38CisR, HCC38-Panobinostat und HCC38-LMK235 um HCC38-Zellen bzw. aus dieser Zelllinie generierte Zellen handelt (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8).

Tabelle 7 Ergebnisse der STR-Analyse von HCC38 und HCC38CisR

Loci	HCC38	HCC38 (ECACC)	HCC38CisR	HCC38 (ECACC)
D5S818	9	9	9	9
D16S539	10,14	10,14	10,14	10,14
vWA	16,17	16,17	16,17	16,17
D13S317	12,14	12,14	12,14	12,14
CSF1PO	12	12	12	12
TPOX	9,12	9,12	9,12	9,12
TH01	9.3	9.3	9.3	9.3
D21S11	27,28		27,28	
D7S820	10	10	10	10
AMEL	X	X	X	X

Tabelle 8 Ergebnisse der STR-Analyse von HCC38-Panobinostat und HCC38-LMK

Loci	HCC38- Panobinostat	HCC38 (ECACC)	HCC38- LMK235	HCC38 (ECACC)
D5S818	9	9	9	9
D16S539	10,14	10,14	10,14	10,14
vWA	16,17	16,17	16,17	16,17
D13S317	12,14	12,14	12,14	12,14
CSF1PO	12	12	12	12
TPOX	9,12	9,12	9,12	9,12
TH01	9.3	9.3	9.3	9.3
D21S11	27,28		27,28	
D7S820	10	10	10	10
AMEL	X	X	X	X

5.4 Methoden

5.4.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden im entsprechenden Nährmedium im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Der CO₂-Gehalt gewährleistete im Zusammenhang mit dem im Nährmedium enthaltenen Hydrogencarbonat-Puffersystem die Einstellung eines physiologischen pH-Wertes von 7,2 - 7,4. Neben dem Antibiotikazusatz wurde eine Kontamination der Zellkultur durch das Arbeiten unter Laminar-Airflow-Sterilbänken und die Desinfektion aller Arbeitsmaterialien mit Isopropanol 70% (V/V) oder Helipur® 1,5% (V/V) vermieden.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 90% in den Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Ernten wurde das Nährmedium komplett entfernt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin 0,02%-EDTA abhängig von der verwendeten Zelllinie für 2-5min im Inkubator inkubiert. Trypsin spaltet die extrazellulären Glykoproteine, die für die Anheftung verantwortlich sind, sodass sich die Zellen nach Zugabe von 7 ml Nährmedium komplett ablösen ließen. Die Zellsuspension wurde in eine 50 ml PP-Röhre überführt und bei 266 rcf und 4°C für 4min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde in eine neue

5.4 Methoden

Zellkulturflasche als Backup überführt und der restliche Teil für die weiteren Experimente verwendet.

5.4.2 Zellzählung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden nach dem Ernten je nach Konfluenz der Zellen 10-20 µl der frisch resuspendierten Zellsuspension in 90 bzw. 80 µl Eosin-Lösung verdünnt (Verdünnungsfaktor 5 bzw. 10). Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop in einer Neubauerzählkammer gezählt. Eosin kann die Zellmembran nicht intakter Zellen passieren und diese dadurch anfärben. Somit erschienen intakte, ungefärbte Zellen als heller Punkt und konnten von abgestorbenen Zellen unterschieden werden. Die Zählkammer umfasste vier Quadranten (n 1-4) die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Die Zellen, die sich in den 16 Kleinquadraten befanden, wurden mäanderförmig gezählt. Dabei wurden nur Zellen, die sich innerhalb der Kleinquadrate oder auf der oberen bzw. linken Grenze befanden, berücksichtigt. Die Formel zur Bestimmung der Zellzahl ist abhängig von der verwendeten Neubauerkammer und vom Verdünnungsfaktor (VF). Nach der Zellzählung mit der in dieser Arbeit verwendeten Neubauerkammer wird mit der folgenden Formel die Anzahl der Zellen pro µl Zellsuspension errechnet:

Formel 1

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

5.4.3 Generierung cisplatinresistenter Zelllinien

Um cisplatinresistente Subklone der einzelnen Zelllinien zu erhalten, wurden die Zellen analog zu [Engelke *et al*, 2016] wöchentlich für 6h mit Cisplatin behandelt. Die verwendete Konzentration entsprach dem IC_{50} der Ursprungszelllinie, der zuvor in mindestens drei MTT Experimenten ermittelt wurde. Bei ausreichender Konfluenz (50-60%) der entsprechenden Zelllinie wurde diese mit Cisplatin für 6h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und frisches Nährmedium zugegeben. Drei Tage nach der Behandlung wurde die Zelllinie geerntet, auf zwei neue Zellkulturflaschen ausgesät und eine 96-well Platte zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes im MTT Assay vorbereitet. Eine Zellkulturflasche wurde bei entsprechender Konfluenz erneut mit Cisplatin behandelt. Die andere wurde bei einer Konfluenz von 90% geerntet und das resuspendierte Zellpellet nach Zusatz von 10% DMSO bei $-80^{\circ}C$ in Kryovials gelagert. Der im MTT Assay ermittelte IC_{50} -Wert wurde zur Beobachtung des Verlaufs des Resistenzfaktors verwendet. Dieser wurde durch Division des IC_{50} -Wertes der behandelten Zelllinie durch den IC_{50} -Wert der ursprünglichen Zelllinie berechnet. Um Auswirkungen von Schwankungen des IC_{50} -Wertes der Ursprungszelllinie zu minimieren, wurde deren IC_{50} -Wert ebenfalls alle vier Wochen bestimmt. Nach Abschluss des Experiments wurde daraus ein Durchschnittswert gebildet, auf dessen Grundlage die Resistenzfaktoren berechnet wurden.

Nach mindestens 26 Wochen bzw. sobald der ermittelte Resistenzfaktor konstant blieb, wurden die Behandlungen beendet. Die neu generierte Zelllinie erhielt den Zusatz „CisR“ als Zeichen der Cisplatinresistenz.

Das oben beschriebene Vorgehen wurde für die Zelllinie HCC38 in permanenter Anwesenheit von 3 nM Panobinostat bzw. 200 nM LMK235 wiederholt. Die Anzahl der Behandlungen wurden dabei an die der ursprünglichen Behandlung zur Generierung von HCC38CisR angepasst, sodass das Experiment nach 37 Behandlungen beendet wurde.

5.4.4 MTT Zellviabilitätsassay

Der Assay wurde analog zu [Gosepath *et al*, 2008] und [Engelke *et al*, 2016] durchgeführt. Die Zellen wurden auf 96-well Platten ausgesät und 24h anwachsen gelassen. Dabei wurden 2000 Zellen/well für das Zellpärchen HCC38/HCC38CisR und 8000 Zellen/well für das Zellpärchen A2780/A2780CisR verwendet. Nach 24h wurde das Nährmedium gewechselt und die Testsubstanzen zu den Zellen gegeben. Nach 72h Inkubationszeit wurde die

5.4 Methoden

Zellviabilität durch Zugabe von 25 µl der MTT-Lösung zu jedem Well bestimmt. In intakten Zellen mit funktionierendem Stoffwechsel kann das gelbe, wasserlösliche MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen unter Verbrauch von NADH zu violetter, wasserunlöslichem Formazan umgesetzt werden. Die Inkubationszeit variierte dabei je nach verwendeter Zelllinie (10-30min). Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen und das in ihnen gebildete Formazan in 75 µl DMSO lysiert. Die Absorption wurde bei 544 und 690 nm im FLUOstar Mikroplatten-Reader vermessen. Bei 544 nm wird die Absorption des gebildeten Formazans vermessen. Bei 690 nm wird der Hintergrund, wie z.B. Zelltrümmer, erfasst, sodass diese Absorptionswerte von denen bei 544 nm subtrahiert wurden. Die Absorptionsdifferenz wurde gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Substanzkonzentration aufgetragen. Daraus wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism durch nicht-lineare Regression mit der 4-Parameter-Hill-analogen Gleichung mit variabler Steigung (vgl. Formel 2) eine Konzentrations-Effekt-Kurve erstellt.

Formel 2

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

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

Anhand der berechneten Konzentrations-Effekt-Kurve wurde der IC₅₀, der derjenigen Substanzkonzentration entspricht, bei der noch 50% des Kontrollsignals vorhanden war, ermittelt. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Inkubationszeit der Substanzen 72h.

Um den Einfluss von Testsubstanzen auf die Cisplatinempfindlichkeit zu untersuchen, wurden die Substanzen für 48h vor der Zugabe von Cisplatin zu den Zellen gegeben. Nach diesen 48h wurden die Zellen erneut gefüttert und frische Substanzlösung und Cisplatin zugegeben. Für diese Experimente wurde die Zellzahl entsprechend verringert.

Um den Synergismus zwischen Inhibitoren und Cisplatin zu detektieren, wurden Kombinationsindices (CIs) nach der Chou-Talalay-Methode [Chou, 2010] mit Hilfe des Programms Calcsyn 2.1 berechnet. Hierfür wurden die Zellen, wie oben beschrieben, für 48h mit den Inhibitoren präinkubiert und anschließend für 72h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cisplatin behandelt. Für die Ermittlung der CIs von NVP-AEW541 und Lapatinib an der Zelllinie HCC38CisR wurden beide Substanzen gleichzeitig für 120h zu den Zellen gegeben. Die resultierenden CIs geben an, ob die Kombination der Substanzen einen additiven ($CI = 1$), synergistischen ($CI < 1$) oder antagonistischen ($CI > 1$) Effekt aufweist.

5.4.5 Neutralrot Zellviabilitätsassay

Dieser Versuch wurde zusätzlich zum MTT Assay durchgeführt, wenn ausgeschlossen werden sollte, dass die Testsubstanzen die mitochondriale Aktivität beeinflussen und so das Ergebnis des MTT Assays verändern. Er wurde durchgeführt wie in [Borenfreund & Shopsis, 1985] beschrieben. Der Assay beruht darauf, dass das lipophile Neutralrot die Zellmembran passieren kann und in den Lysosomen lebender Zellen protoniert wird. Dadurch geht die Lipophilie verloren und das Neutralrot kann die Zellen nicht mehr verlassen. Die Durchführung erfolgte zunächst analog zum MTT Assay. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 2h mit 200 μ l der Neutralrot-Inkubationslösung versetzt. Nach diesen 2h wurde die Inkubationslösung abgesaugt und 100 μ l der Fixierlösung zugegeben. Diese wurde zeitnah wieder abgesaugt und die Zellen wurden mit 150 μ l PBS gewaschen. 100 μ l der Extraktionslösung wurden zugegeben und die Absorption bei 544 und 690 nm im FLUOstar Mikroplatten-Reader ermittelt. Die Auswertung erfolgte analog zum MTT Assay.

5.4.6 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der RNA, die für die Genexpressionsanalysen im Microarray verwendet wurde, wurde eine T25 Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 200 μ l Lysispuffer wurde der Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde in einer QIAshredder Zentrifugationssäule 2min bei Raumtemperatur und voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Zu dem homogenisierten Lysat wurde dasselbe Volumen an 70%igem Ethanol (hergestellt mit DEPC-

Wasser) gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die RNA wurde analog zum Handbuch des RNeasy Kits isoliert. Dafür wurde die Probe in einer RNeasy Zentrifugationssäule bei Raumtemperatur für 15s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und der Zentrifugationsschritt nach Zugabe von 350 µl RW1 Puffer wiederholt. Pro Probe wurden 10 µl DNase I Stammlösung zu 70 µl RDD Puffer (beides Bestandteile des RNase-Free DNase Sets) gegeben. Diese 80 µl wurden direkt auf die Membran der Säule pipettiert und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut mit 350 µl RW1 Puffer und zweimal mit je 500 µl RPE Puffer gewaschen. Die RNA wurde durch Zentrifugation nach Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und auf Eis gelagert. Die Konzentration an RNA wurde mit dem Implen NanoPhotometer P300 ermittelt.

5.4.7 Genexpressionsanalyse mit Microarrays

Der Versuch wurde mit dem Low Input Quick Amp Labeling Kit, Two-Colour und dem Human GE 2x44K v2 Microarray Kit durchgeführt. Um eine ausreichende Qualität der verwendeten RNA-Proben zu gewährleisten, wurden diese mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits und des Bioanalyzers analysiert. Die Qualitätsanalyse wurde mit Proben der Konzentration 200 ng/µl im BMFZ der Universität Düsseldorf durchgeführt. Als Ergebnis der Qualitätsanalyse wurde die RNA integrity number (RIN) ermittelt. Diese wurde von der Firma Agilent als Maß für die Intaktheit von RNA-Proben entwickelt und kann maximal 10 betragen. Für den Microarray wurden nur Proben verwendet, die mindestens eine RIN von 9,5 aufwiesen.

75 ng RNA wurden eingesetzt um, analog zum Protokoll des Handbuchs, mit Cy-3 bzw. Cy-5 gefärbte cRNA zu erhalten. Diese wurde anschließend unter Verwendung der RNeasy Zentrifugationssäulen aufgereinigt und quantifiziert. Aus der Quantifizierung wurde der Yield als die absolute Menge an aufgereinigter cRNA und die spezifische Aktivität als der Quotient aus der Farbstoffkonzentration und der Konzentration an cRNA berechnet. Wenn mindestens 825 ng cRNA vorhanden waren und die spezifische Aktivität größer als 6 war, wurden die Proben weiter verwendet. Jeweils 825 ng mit Cy-3 bzw. Cy-5 gefärbte cRNA wurden zusammen für mindestens 17h auf einem Array hybridisiert. Nachdem der Array gewaschen wurde, wurde er mit dem Microarray Scanner G4900DA vermessen. Das erhaltene Bild wurde mit Hilfe des Programms Feature Extraction 11.0.1.1 ausgewertet.

Die so erhaltenen Dateien wurden analog zu [Tran *et al*, 2013] aufbereitet. Der erste Array der vier zusammen gescannten diente als Referenz. Für die anderen drei Arrays wurde ein „scaling factor“ berechnet, indem die 75te Perzentile des greenProcessedSignals (gPS) des ersten Arrays durch die 75te Perzentile des gPS des jeweiligen Arrays geteilt wurde. Mit diesem Faktor wurden die prozessierten Fluoreszenzintensitäten (gPS bzw. rPS) multipliziert um normalisierte Fluoreszenzintensitäten (nPS) zu erhalten. Mit Hilfe dieser nPS konnten nicht nur die beiden zusammen hybridisierten Proben, sondern alle 8 auf einem Array vorhandenen Proben miteinander verglichen werden. Der Vergleich zweier Proben führte zu je einer Genliste mit mindestens zweifach über- bzw. unterexprimierten Genen. Aus diesen Listen wurden alle Gene gestrichen, deren Fluoreszenzintensität in den beiden verglichenen Arrays nicht mindestens zweifach höher als die Hintergrundfluoreszenz war. Die so erhaltenen Genlisten wurden mit Hilfe der „DAVID pathway analysis“ [Huang *et al*, 2009a; Huang *et al*, 2009b] ausgewertet. Dieses Werkzeug ermittelt die Anreicherung von Genen bestimmter Signalwege im Vergleich zur Gesamtheit aller Gene. In dieser Arbeit wurden nur KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) gelistete Signalwege berücksichtigt.

5.4.8 Isolierung von Proteinen

Proteine wurden aus dem Zellmaterial wie in [Engelke, 2015] beschrieben isoliert. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% wachsen gelassen. Das Nährmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und die vorhandene Flüssigkeit möglichst vollständig entfernt. Ab diesem Schritt wurde auf Eis gearbeitet. Zu den Zellen wurde eine entsprechende Menge „Lysis Buffer 6“ (50 µl zu T25, 150 µl zu T75) gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Für Fragestellungen bei denen phosphorylierte Proteine untersucht wurden, wurde zum Lysispuffer 1 mM Natriumorthovanadat zugegeben. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur vollständigen Lyse 30min bei 4°C gerollt. Das Lysat wurde bei 14000 rpm und 4°C für 10 bis 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Ein Teil des Überstands wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Der restliche Überstand wurde 1:1 mit 2X Laemmli Puffer versetzt und bei 95°C für 3min erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

5.4 Methoden

5.4.9 BCA Protein Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde der BCA Assay wie in [Engelke, 2015] beschrieben durchgeführt. 10 µl des Proteinlysats wurden mit 90 µl steril filtriertem Aqua dest. verdünnt. In eine 96-well Mikrotiterplatte wurden je 25 µl der BSA-Standardreihe und der Proben gegeben. Es wurde unter Eiskühlung und in Duplikaten gearbeitet. Zu jeder Probe wurden 200 µl des frisch hergestellten BCA working reagent gegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Cu^{2+} wird proportional zur anwesenden Menge an Proteinen zu Cu^+ reduziert. Zwei Moleküle Bicinchonsäure (BCA) bilden mit einem Cu^+ -Ion einen violetten Chelatkomplex [Smith *et al*, 1985]. Die Absorption bei 544 nm wurde im FLUOstar Mikroplatten-Reader ermittelt. Die Konzentration der BSA-Standardreihe wurde gegen deren Absorption aufgetragen und durch lineare Regression die Geradengleichung einer Standardgeraden ermittelt. Nach Umformung der Geradengleichung ließ sich aus dem Mittelwert der Absorption der Duplikate jeder Probe die entsprechende Proteinkonzentration errechnen.

5.4.10 Analyse von Signaltransduktionswegen

Um einen Überblick über den Phosphorylierungsstatus wichtiger Rezeptortyrosinkinasen und Kinasen zu erhalten, wurde analog zum Handbuch das Proteome Profiler™ Antibody Array Human Phospho-Kinase Array Kit und das Proteome Profiler™ Array Human Phospho-RTK Array Kit verwendet. In beiden Fällen wurden 500 µg Protein eingesetzt. Die Lumineszenz der Arrays wurde im Intas Imager für 8min aufgenommen.

5.4.11 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde wie in [Engelke *et al*, 2016] beschrieben durchgeführt. In dieser Arbeit wurden 1 mm dicke Gele mit einem Acrylamidgehalt von 10% im Trenngel (vgl. Tabelle 9) und 5% im Sammelgel (vgl. Tabelle 10) verwendet.

Tabelle 9 Zusammensetzung des Trenngels

Komponente	Volumen
Rotiphorese® Gel 30	2,0 ml
Aqua dest.	2,5 ml
Trenngelpuffer 4X	1,5 ml
APS-Lösung 10%	60 µl
TEMED	6 µl

Die Bestandteile wurden in einer 50 ml PP-Röhre vorsichtig durch Schwenken gemischt und mit einer Pipette ca. 4,5 ml der Mischung zwischen die Glasplatten der Gelgießapparatur gegeben. Um eine glatte Grenzschicht zu erhalten, wurde mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach Aushärtung des Trenngels wurde der Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegeben, bis der Spalt zwischen beiden Glasplatten vollkommen gefüllt war.

Tabelle 10 Zusammensetzung des Sammelgels

Komponente	Volumen
Rotiphorese® Gel 30	0,5 ml
Aqua dest.	1,75 ml
Sammelgelpuffer 4X	0,75 ml
APS-Lösung 10%	30 µl
TEMED	3 µl

Der Kamm wurde unmittelbar nach Zugabe der Lösung für das Sammelgel eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel erstarrt war, wurden die Glasplatten zur vollständigen Polymerisation über Nacht in feuchten Tüchern im Kühlschrank gelagert.

Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer 1X befüllt. Der Kamm wurde entfernt und mindestens eine Tasche mit 10 µl der Proteinleiter und die übrigen Taschen mit den Proben befüllt. Bei einer Spannung von 80 V wurden die Proben im Sammelgel konzentriert. Die Trennung der beiden größten Markerproteine der Leiter zeigte den Übergang der Proben in das Trenngel an (nach ca. 20min), woraufhin die Spannung auf 160 V erhöht wurde. Nachdem die gewünschte Trennung erreicht wurde (nach ca. 1 Stunde), wurde das Trenngel aus den Glasplatten gelöst und für Western Blot Experimente weiterverwendet.

5.4.12 Western Blot

Der Western Blot wurde wie in [Engelke, 2015] beschrieben durchgeführt. Um die Proteine besser handhaben und sichtbarmachen zu können, wurden diese aus dem Trenngel mit der Semi-Dry-Methode auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran überführt. Dafür wurde die Membran 10 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend für mindestens 15min in Semi-Dry Puffer äquilibriert. Auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur wurden nacheinander drei in Semi-Dry Puffer getränkte Filterpapiere, die Membran, das Trenngel und weitere drei in Semi-Dry Puffer getränkte Filterpapiere geschichtet. Für eine Stunde wurde eine Stromstärke von 40 mA pro Membran angelegt. Dadurch wanderten die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode und wurden auf die Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocking-Puffer geschwenkt, um nicht besetzte Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

Die Membran wurde unter Zuhilfenahme der Markerproteine zerschnitten, sodass nur der Teil, der das entsprechende Zielprotein enthielt, mit dem Primärantikörper inkubiert wurde. Die Primärantikörper-Lösungen (in Blocking-Puffer) wurden durch Zusatz von 0,01% Natriumazid konserviert und bei Nicht-Verwendung bei -20°C gelagert. Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C in der Primärantikörper-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde zweimal für 30min mit TBST und einmal für 30min mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (in Blocking-Puffer) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schwenker. Wegen der Empfindlichkeit der Meerrettichperoxidase (HRP) wurde die Sekundärantikörper-Lösung stets frisch hergestellt und nach Verwendung verworfen. Nach den Waschschritten analog zur Primärantikörper-Inkubation wurden die Membranteile zwischen die Seiten eines ultraklaren PP-Entsorgungsbeutels zusammengefügt und überschüssiger Waschpuffer entfernt. Die beiden Western Blotting Luminol Reagenzien wurden 1:1 vermischt. Auf jede Membran wurde 1 ml der Mischung gegeben und für 2min inkubiert. Durch erneutes Ausstreichen wurde überschüssiges Reagenz entfernt. Die HRP der Sekundärantikörper setzt das Luminol zu einem Phthalat im angeregten Triplettzustand um. Bei dessen Übergang in den Singulettzustand werden Photonen freigesetzt, die mit dem Intas Imager erfasst werden. Dafür wurde der 1x1-Binningmode/Single genutzt. Die Belichtungszeit variierte zwischen 8min und 45min je nach Intensität der zu untersuchenden Banden.

Die Beladung der einzelnen Taschen mit der gleichen Proteinmenge wurde über die Bande des Housekeepers β -Actin kontrolliert. Die korrekte Größe der detektierten Banden wurde über die Aufnahme der Proteinmarker gewährleistet.

5.4.13 Verdopplungszeit

Um das Wachstumsverhalten der Zelllinien zu charakterisieren wurde deren Verdopplungszeit, ähnlich wie in [Engelke, 2015] beschrieben, ermittelt. Dafür wurden für die Zelllinien HCC38 und HCC38CisR je 10.000 Zellen in 4 wells einer 6-well Platte ausgesät. Nach 24h, 48h, 72h und 96h wurde je ein well geerntet. Die Zellen wurden adäquat auf 1 ml sheath fluid verdünnt und diese Probe vollständig im Durchflusszytometer gezählt. Die absolute Zellzahl aufgetragen gegen die Zeit ergab eine Exponentialkurve, deren Funktionsgleichung (vgl. Formel 3) mit Hilfe von GraphPad Prism ermittelt wurde.

Formel 3

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

y = Zellzahl zum Zeitpunkt x

Start = Zellzahl zum Zeitpunkt 0

k = Geschwindigkeitskonstante

x = Zeit [h]

Aus der Gleichung lässt sich die Verdopplungszeit berechnen (vgl. Formel 4).

Formel 4

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

VZ = Verdopplungszeit [h]

k = Geschwindigkeitskonstante [1/h]

Wenn der Einfluss von Testsubstanzen auf die Verdopplungszeit ermittelt wurde, wurden diese nach 24-stündigem Anwachsen zu den Zellen gegeben.

5.4.14 Apoptose Assay

Apoptotische Zellkerne wurden durch Propidiumiodidfärbung in hypotonem Puffer und anschließender Analyse im Durchflusszytometer, wie in [Engelke, 2015] beschrieben, angelehnt an [Nicoletti *et al*, 1991] analysiert. Die Zellen wurden in einer 24-well Platte ausplattiert und 24h anwachsen gelassen. Das Nährmedium wurde erneuert und die Testsubstanzen wurden zu den Zellen gegeben. 24h vor Ablauf der Inkubationszeit wurde 10% DMSO als Positivkontrolle zu den Zellen gegeben, da diese Substanz verlässlich Apoptose auslöst. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte bei 1200 rpm und 4°C für 5min zentrifugiert, sodass sich möglichst alle Zellen am Boden absetzen. Die Bremse der Zentrifuge wurde in der kleinstmöglichen Einstellung gewählt. Der Überstand wurde Vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit 500 µl hypotonem Lysispuffer versetzt und über Nacht bei 2-8°C lysiert. Der hypotone Puffer lysiert die Zellen, sodass die Zellkerne, deren Membran mit Triton X-100 permeabel gemacht wurden, mit Propidiumiodid angefärbt werden konnten. Propidiumiodid interkaliert in die DNA des Zellkerns. Daraufhin wird die Fluoreszenzintensität deutlich gesteigert und das Emissionsmaximum in den längerwelligen Bereich verschoben [Riccardi & Nicoletti, 2006]. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellkerne kann also mit deren DNA-Gehalt korreliert werden. Im Verlauf der Apoptose werden DNasen aktiv, die die DNA im Zellkern spalten. Diese degradierte DNA wird anschließend aus dem Zellkern ausgeschleust und der DNA-Gehalt im Zellkern verringert. Apoptotische Zellkerne erscheinen somit als breiter hypodiploider Peak im Durchflusszytometer.

Die 24-well Platte mit den lysierten Zellen wurde bis zur endgültigen Messung auf Eis gelagert und die Proben je nach Zelllinie und Konfluenz mit sheath fluid verdünnt. Um Zelldebris von der Analyse auszuschließen wurden zwei Ansätze verwendet. Zum einen wurde der Trigger auf den FL2 Kanal gesetzt, sodass nur Partikel, die eine Mindestfluoreszenz in diesen Kanal strahlten, erfasst wurden. Zum anderen wurde im Dotplot des Forwardscatters (FSC) und des Sidewardscatters (SSC) ein Polygon gesetzt, das intakte Zellkerne von Zelltrümmern trennt (Abbildung 12).

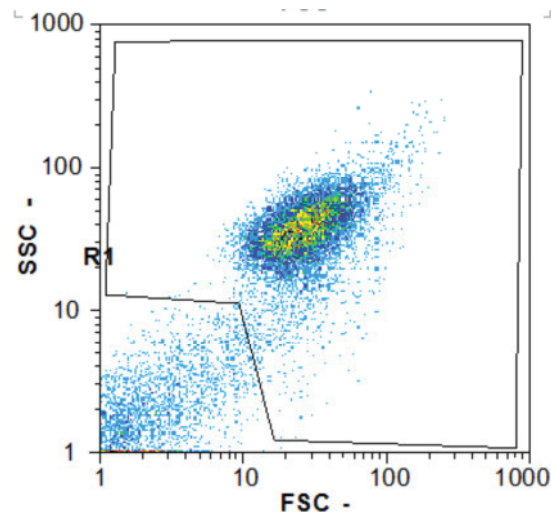


Abbildung 12: Trennung der isolierten Zellkerne von den Zelltrümmern. In diesem Beispiel wurden unbehandelte HCC38CisR Zellen lysiert. Die Signale im Bereich <10 entsprechen Zelltrümmern und werden von der Analyse ausgeschlossen.

Dieses Polygon wurde auch dazu verwendet, um in jeder Probe die gleiche Anzahl an Zellkernen zu erfassen. Die Einstellung wurde so gewählt, dass für jede Probe 11.000 Signale innerhalb dieses Polygons gemessen wurden.

Im Histogramm, in dem die Anzahl der Signale („counts“) gegen die Fluoreszenzintensität im FL2 Kanal (FL2 PI) aufgetragen wird, wurde anhand der Kontrollprobe ein Grenzwert festgelegt, unterhalb dessen die Zellkerne als hypodiploid und somit apoptotisch galten (Abbildung 13).

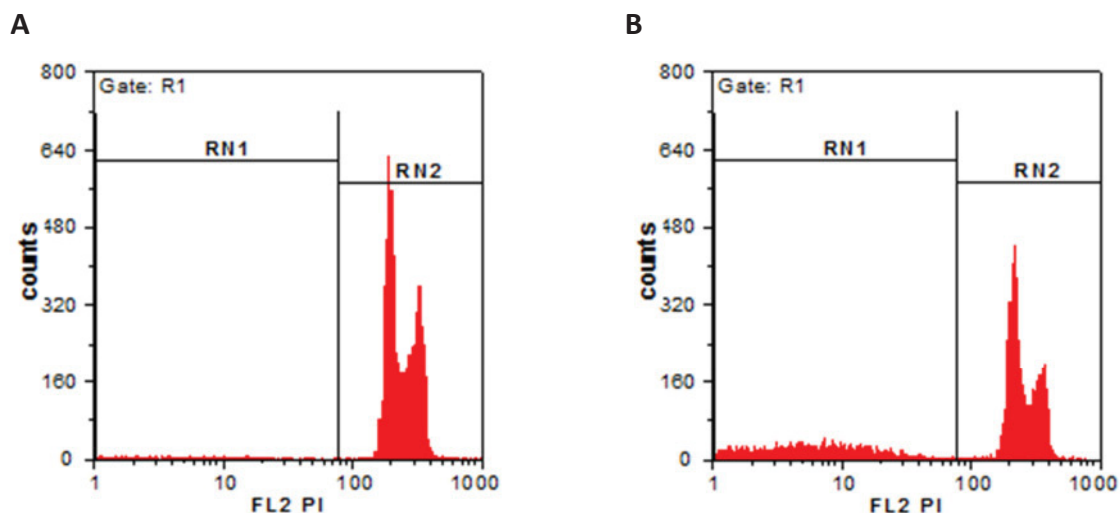


Abbildung 13 Auswertung des Apoptose Assays anhand der Fluoreszenzintensität im FL2 Kanal. Gezeigt sind die unbehandelte Kontrolle (**A**) und die mit NVP-AEW541 und Lapatinib behandelte Probe (**B**) von HCC38CisR. Im Bereich RN1 befinden sich die Zellkerne, die weniger DNA enthalten und somit apoptotisch sind.

5.4 Methoden

Entweder wurde der Anteil an apoptotischen Zellkernen für die Auswertung herangezogen oder von dem Anteil apoptotischer Zellkerne jeder Probe wurde der Anteil apoptotischer Zellkerne der Kontrolle subtrahiert und somit die Steigerung an apoptotischen Zellkernen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle für die Auswertung verwendet.

5.4.15 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse wurde analog zu Standardprotokollen [Darzynkiewicz & Juan, 2001] wie in [Engelke, 2015] beschrieben durchgeführt. Im Unterschied zum Apoptose Assay wurde hier mit fixierten, intakten Zellen gearbeitet. Deren DNA wurde ebenfalls mit Propidiumiodid angefärbt. Da der Farbstoff ebenfalls bei Interkalation in RNA fluoresziert, wurde den Proben DNase freie RNase zugesetzt. Der DNA-Gehalt der Zelle verdoppelt sich während der Synthese-Phase, sodass anhand der Fluoreszenzintensität der Zellen zwischen der G₁-, S- und G₂/M-Phase unterschieden werden konnte. Die Zellen, die eine Fluoreszenz unterhalb derer der G₁-Phase zeigten (subG₁), befanden sich in der Apoptose (vgl. Abbildung 13).

Die Zelllinien wurden in 6-well Platten ausplattiert und 24h anwachsen gelassen. Nach Erneuerung des Nährmediums wurden die Testsubstanzen zugegeben. 24h (A2780 Zelllinie) bzw. 10h (HCC38 Zelllinie) vor Ablauf deren Inkubationszeit wurde jeweils eine Probe mit 50 nM Paclitaxel inkubiert. Dieses Zytostatikum induziert einen G₂/M-Phasenarrest und diente als Kontrolle.

Der Überstand und die geernteten Zellen wurden vereinigt und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Bei jeder Zelllinie wurde zu Beginn der Experimente untersucht, wie viele Zellen sich zu diesem Zeitpunkt in der Suspension befanden. Lag dieser Wert konstant unter zwei Millionen Zellen, wurde bei allen weiteren Experimenten das komplette Zellpellet in 1 ml eiskaltem PBS suspendiert und langsam in kalten 70%igen Ethanol getropft. Die so fixierten Zellen wurden für mindestens 24h bei -20°C gelagert. Die Proben wurden bei 266 rcf und 4°C für 30min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 1,5 ml vorsichtig abgesaugt, 5 ml kaltes PBS zugegeben und durch Vortexen homogenisiert. Die Proben wurden erneut für 30min zentrifugiert und der eben beschriebene Schritt wiederholt. Der Zellrückstand wurde mit 500 µl Färbelösung für 15min bei 37°C inkubiert. Die gefärbten Proben wurden im Dunkeln auf Eis gelagert und im Durchflusszytometer vermessen. Zunächst wurde die mit Paclitaxel behandelte Probe analysiert anhand derer die Verstärkung des Fluoreszenzsignals

eingestellt wurde. Mit Hilfe des bereits für den Apoptose Assay beschriebenen Polygons im Dotplot SSC vs. FSC wurden nur intakte Zellen in die Analyse eingeschlossen (vgl. Abbildung 12). Aus dem Dotplot, der die Signalhöhe der Fluoreszenz (FL2 PI) gegen die Signalfäche (FL2-A PI) aufträgt, wurden Zelldoubletten oder –cluster diskriminiert. Beispielsweise zeigt eine Zelle mit verdoppeltem DNA-Gehalt (G_2/M -Phase) die gleiche Höhe des Fluoreszenzsignals wie zwei aneinanderheftende Zellen, die sich in der G_1 -Phase befinden. Die Fläche des Signals ist jedoch bei zwei aneinandergehefteten Zellen größer. Indem nur die Zellen, die innerhalb eines linearen Bereichs lagen, in die Analyse eingeschlossen wurden, wurden Zelldoubletten oder –cluster ausgeschlossen (Abbildung 14).

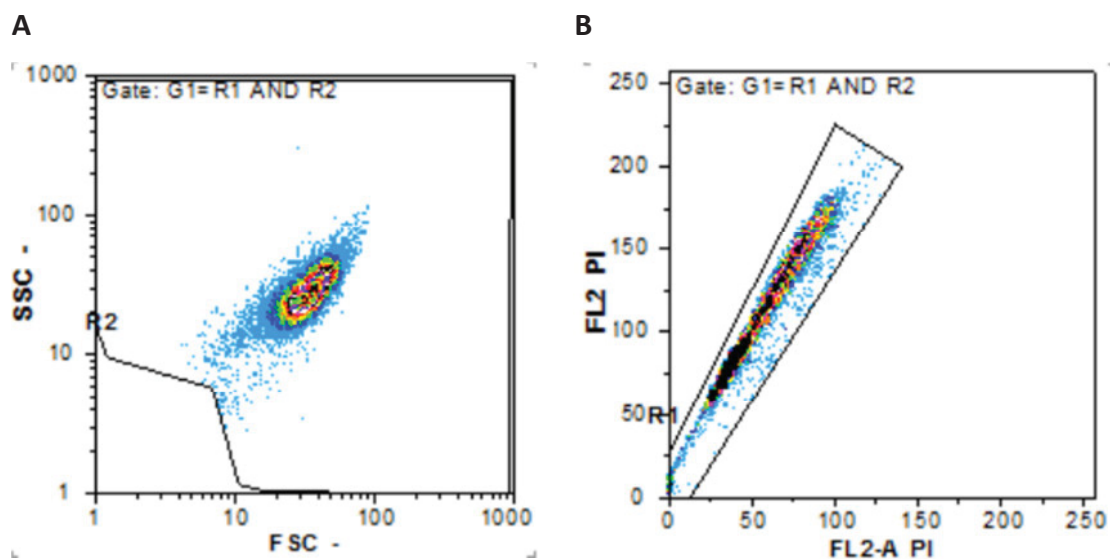


Abbildung 14 Auswahl der in die Zellzyklusanalyse eingeschlossenen Zellen am Beispiel einer Kontrolle der Zelllinie HCC38CisR. Es wurden sowohl Zelltrümmer (**A**) als auch Zelldoubletten oder –cluster (**B**) ausgeschlossen.

Von allen Proben wurden 11.000 Signale innerhalb der beiden Polygone vermessen. Nach der Paclitaxel-Kontrolle wurden die unbehandelten Zellen untersucht. Aus dem Histogramm „counts“ gegen FL2 PI wurde die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus ermittelt (Abbildung 15). Die Kontrolle zeigte die übliche Zellzyklusverteilung mit einem hohen Peak für die G_1 -Phase. Anhand dieses Peaks wurde RN2 als der Bereich der Fluoreszenzintensität, der der G_1 -Phase entspricht, festgelegt. Der Bereich unterhalb von RN2 (RN1) wurde als sub G_1 -Phase charakterisiert und enthielt somit apoptotische Zellen. Anhand des Peaks für die G_2/M -Phase, der in der Paclitaxel-behandelten Probe sichtbar wurde, wurde RN4 als der Bereich, der Zellen in dieser Phase des Zellzyklus beinhaltet,

5.4 Methoden

definiert. Der Bereich zwischen RN2 und RN4 (RN3) enthält somit automatisch Zellen, die sich in der S-Phase befinden.

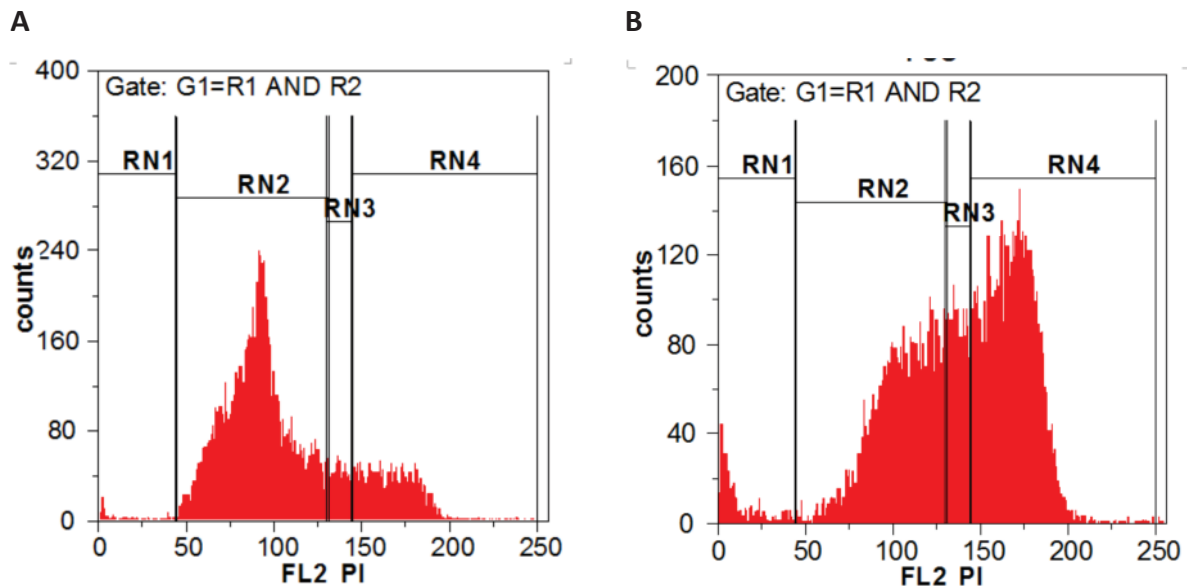


Abbildung 15 Auswertung der Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus am Beispiel der HCC38CisR Zelllinie. Dargestellt sind die unbehandelten Zellen (A) und die Paclitaxel-behandelte Probe (B). Anhand der Kontrolle konnte RN2 als G_1 -Phase und anhand der mit Paclitaxel behandelten Probe RN4 als G_2/M -Phase definiert werden.

Die so festgelegten Bereiche wurden auf alle weiteren Proben übertragen. Für die Auswertung wurden nur Zellen berücksichtigt, die sich nicht in der sub G_1 -Phase befanden. Dafür wurden die Anteile an Zellen in der G_1 -, S- und G_2/M -Phase addiert und dieser Wert als 100% definiert. Der prozentuale Anteil der Zellen in diesen Phasen wurde dann auf diesen Wert bezogen.

5.4.16 Analyse des Mitochondrienpotentials

Ein Einfluss auf die Integrität des Mitochondrienpotentials kann ein möglicher Wirkmechanismus sein, der schlussendlich zur Auslösung von Apoptose führt. Mitochondrien besitzen eine äußere und eine innere Membran, die stark gefaltet ist und sogenannte Cristae bildet. An der inneren Membran sind unter anderem die Atmungskette und die ATP-Synthase lokalisiert. Über diese Membran (also zwischen der Matrix und dem Intermembranraum) wird ein Protonen- und Spannungsgradient aufgebaut, der die ATP-Bildung antreibt. Aufgrund dessen ist die Innenseite der inneren Membran negativ geladen. Der Nutzen kationischer Farbstoffe, die sich durch die negative Ladung an der inneren

5 Materialien und Methoden

Mitochondrienmembran anreichern, zur Ermittlung des mitochondrialen Membranpotentials wurde bereits früh beschrieben [Ehrenberg *et al*, 1988]. Dabei muss der Farbstoff schnell und reversibel in die Zelle diffundieren. Wenn die Konzentration zudem so gewählt wird, dass Quenching bei der Anreicherung an der Mitochondrienmembran vermieden wird, beruht die gemessene Fluoreszenz einer Zelle zu 75% auf dem Mitochondrienpotential [Nicholls & Ward, 2000]. Für die Analyse des Mitochondrienpotentials wurde in dieser Arbeit Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) verwendet (vgl. Abbildung 16).

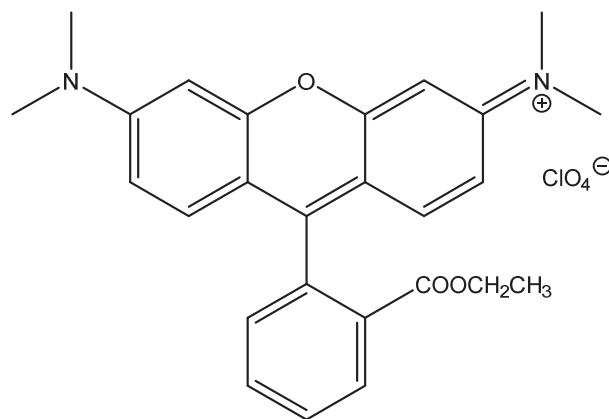


Abbildung 16 Strukturformel von TMRE. In dieser Arbeit wurde es als Perchlorat eingesetzt.

Das Maximum der Exzitation des Farbstoffs liegt bei 549 nm, das Maximum der Emission bei 575 nm. Daher wird der Farbstoff, ebenso wie Propidiumiodid, im FL2-Kanal des Durchflusszytometer detektiert. Da der Filter nicht im Emissionsmaximum detektiert, muss das Signal in größerem Ausmaß verstärkt werden, als bei der Verwendung von Propidiumiodid. Da dadurch die Hintergrundsignale stark anstiegen, konnte nicht mehr auf diesen Kanal getriggert werden. Es wurde der Trigger auf FSC gesetzt und so nur Partikel mit einer Mindestgröße von der Analyse erfasst. Als Positivkontrolle wurde in diesem Assay die Substanz Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) verwendet (Abbildung 17). Dabei dient die Substanz als sogenannter Entkoppler. Die lipophile schwache Säure kann sowohl in geladenem als auch in ungeladenem Zustand die Mitochondrienmembran passieren. Dadurch kann sie Protonen über die innere Mitochondrienmembran transportieren und so den Protonengradienten aufheben.

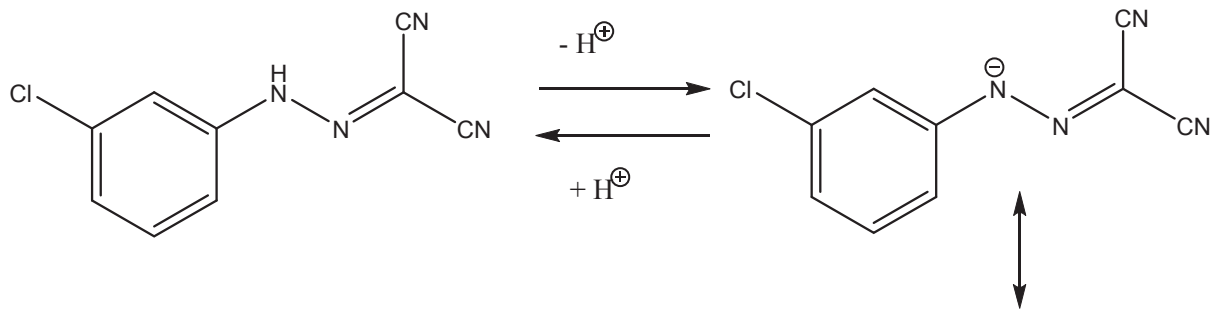


Abbildung 17 Strukturformel von CCCP (links). Die Substanz wird als Protonophor eingesetzt, da das Anion die negative Ladung so gut über π -Orbitale verteilen kann, dass es immer noch Membranen passieren kann.

Für den Assay wurden die Zellen in 24-well Platten mindestens 24h anwachsen gelassen, bevor das Nährmedium erneuert und die Testsubstanzen zu den Zellen gegeben wurden. Vor dem Ernten der Zellen mussten diese mindestens 48h in der Platte gewachsen sein, d.h. bei Inkubationszeiten unter 24h musste die Zeit des Anwachsens entsprechend verlängert werden. Beim Austausch des Nährmediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit FKS-freiem Medium gefüttert. Dadurch sollte eine mögliche Spaltung des Esters im Farbstoff vermieden werden. Dieser Austausch fand maximal 6h vor dem Ernten der Zellen statt, d.h. bei einer längeren Inkubationszeit wurde das Nährmedium zweimal getauscht.

50min vor Ablauf der Inkubationszeit wurde ein well mit 10 μM CCCP inkubiert. 20min vor Ablauf der Inkubationszeit wurde zu jedem well, außer der ungefärbten Kontrolle zum Ausschluss der Eigenfluoreszenz der Zellen, 200 nM TMRE gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 300 μl Trypsin-EDTA für 2-3min im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 700 μl FKS-haltigem Nährmedium wurden die Zellen abgelöst und die Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es wurde bei 4°C und 8000 rpm für 4min zentrifugiert und nach Absaugen des Überstands das Zellpellet bis zur Vermessung im Dunkeln und auf Eis gelagert. Für die Messung wurde das Pellet je nach Zelllinie in sheath fluid verdünnt.

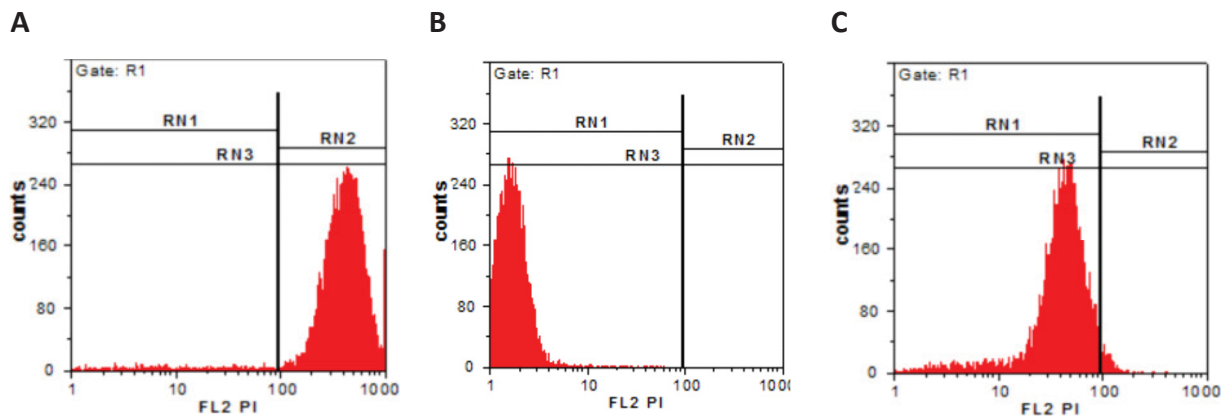


Abbildung 18 Auswertung des Mitochondrienassays am Beispiel der Zelllinie A2780. (A) Die mit TMRE gefärbten Kontrollzellen zeigten erwartungsgemäß eine hohe Fluoreszenzintensität. **(B)** Die ungefärbten Kontrollzellen zeigten kaum Eigenfluoreszenz. **(C)** Die mit CCCP behandelten und mit TMRE gefärbten Zellen zeigten eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität. Zur Veranschaulichung wurde RN2 als der Bereich von Zellen mit intaktem Mitochondrienpotential und RN1 als Bereich von Zellen mit zusammengebrochenem Mitochondrienpotential markiert. Für die Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität im Bereich RN3, der alle Zellen beinhaltete, verwendet.

Wie bereits beschrieben wurden die intakten Zellen durch ein Polygon im Dotplot SSC gegen FSC (vgl. Abbildung 12) ausgewählt. Innerhalb dieses Bereichs wurden 11.000 Signale für jede Probe detektiert. Zunächst wurde die unbehandelte mit TMRE gefärbte Probe vermessen und anhand dieser die Verstärkung des Fluoreszenzsignals eingestellt. Anschließend wurden die ungefärbte Kontrolle und die mit CCCP behandelte Kontrolle vermessen (Abbildung 18). Als letzte Probe wurde erneut eine mit TMRE gefärbte Kontrolle vermessen, um eine Degradation des Farbstoffs während der Messdauer im Durchflusszytometer auszuschließen.

Die Auswertung dieses Assays geschah über den Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität aller Partikel, die im Polygon eingeschlossen waren (RN3 in Abbildung 18). Der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität der beiden mit TMRE gefärbten Kontrollen wurde als 100% definiert und alle gemessenen Proben auf diesen Wert bezogen.

5.4.17 Membranintegrität

Um eine potentiell schädigende Wirkung von Testsubstanzen auf die Integrität der Zellmembran zu testen, wurde dieser Assay verwendet. Als Farbstoff diente wiederum Propidiumiodid. In diesem Fall wurde jedoch der Färbelösung kein Tensid zugesetzt, sodass

5.4 Methoden

der Farbstoff die Zellmembran nur passieren und die DNA im Zellkern anfärben konnte, wenn diese nicht mehr intakt war.

Für den Assay wurden die Zelllinien in 6-well Platten ausplattiert und mindestens 24h anwachsen gelassen. Das Nährmedium wurde erneuert und die Zellen mit Testsubstanzen beladen. 20min vor Ablauf der Inkubationszeit wurde in ein well 0,4% Triton X-100 gegeben. Dieses well diente als Positivkontrolle, da das Tensid die Zellmembran sicher so schädigte, dass das Propidiumiodid in den Zellkern gelangen konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und mit dem zuvor gesammelten Überstand vereinigt. Das nach der Zentrifugation (4min, 4°C, 266 rcf) vorhandene Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Farbelösung resuspendiert. Für 20min wurden die Zellen mit dem Farbstoff im Brutschrank inkubiert und anschließend bis zur Vermessung im Durchflusszytometer auf Eis gelagert.

Es wurden 11.000 Ereignisse intakter Zellen detektiert, die anhand des oben beschriebenen Polygons im Dotplot von SSC gegen FSC (vgl. Abbildung 12) ausgewählt wurden. Die Auswertung erfolgte, indem mit Hilfe der Kontrolle und der mit Triton X-100 behandelten Probe ein Grenzwert der Fluoreszenzintensität festgelegt wurde, unterhalb dessen die Membran als intakt definiert wurde.

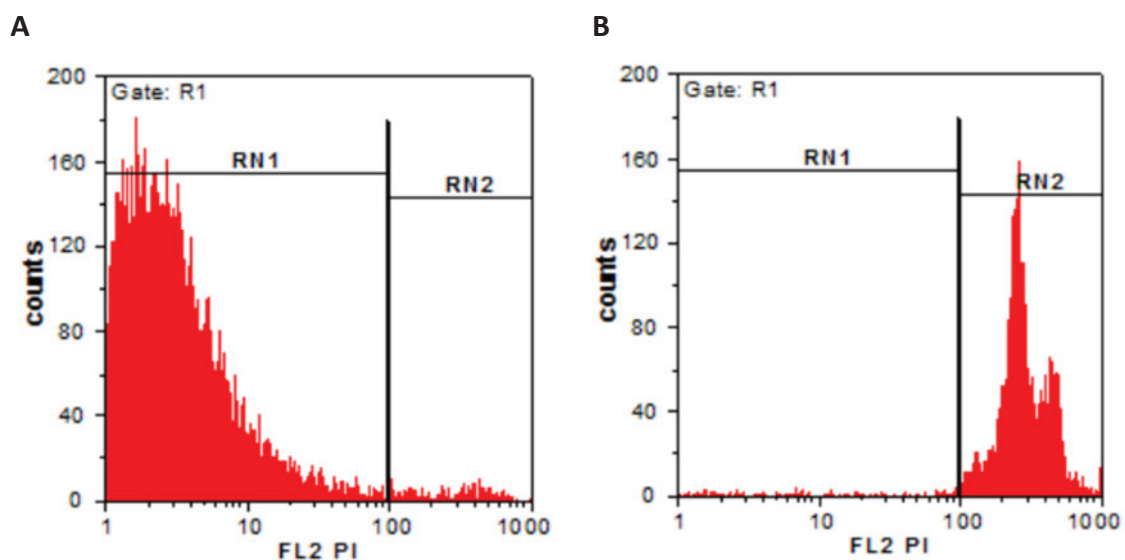


Abbildung 19 Auswertung des Assays zur Analyse der Membranintegrität am Beispiel der Zelllinie A2780. In der unbehandelten Kontrolle (A) befinden sich nur wenige Signale über dem Grenzwert. In der mit Triton X-100 behandelten Kontrolle (B) wurde die Membranintegrität so stark beeinträchtigt, dass nahezu alle Zellen mit Propidiumiodid angefärbt werden konnten.

Von dem prozentualen Anteil an gefärbten Zellen der jeweiligen Probe wurde der prozentuale Anteil gefärbter Zellen in der unbehandelten Kontrolle abgezogen. Dementsprechend erfolgte die Auswertung, analog zum Apoptose Assay, über die Steigerung des Anteils der Zellen mit geschädigter Membran.

5.4.18 Migration

Das Migrationsverhalten der Zelllinien wurde mit Hilfe eines Scratch Assays angelehnt an [Liang *et al*, 2007] ähnlich wie in [Engelke, 2015] beschrieben, untersucht. Die Zellen wurden in einer 6-well Platte so ausplattiert, dass sie nach 24-stündigem Anwachsen eine ca. 95%ige Konfluenz zeigten. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit einer 10 µl Pipettenspitze ein Kratzer in den Zellrasen gezogen und das Nährmedium gegen FKS-freies Nährmedium ausgetauscht. Sollte der Einfluss von Testsubstanzen auf die Zellmigration abgeschätzt werden, wurden diese unmittelbar nach Einbringen des Kratzers in den Zellrasen zugegeben. Von außen wurden drei verschiedene Stellen des Kratzers markiert. Diese Positionen wurden unmittelbar nach Einbringen des Kratzers sowie nach 24h mit der Motic Kamera mit der 10-fachen Vergrößerung fotografiert. Die Fläche, die frei von Zellen war, wurde mit Hilfe des Programms ImageJ markiert und quantifiziert. Aus diesen Werten wurde der prozentuale Anteil der Fläche berechnet, die nach 24h wieder mit Zellen bewachsen war. Wenn der Einfluss von Testsubstanzen auf das Migrationspotential der Zelllinien abgeschätzt werden sollte, wurde gleichzeitig deren Einfluss auf das Wachstumsverhalten untersucht. Dafür wurden der MTT-Assay, der Neutralrot-Assay und eine Zellzählung im Durchflusszytometer parallel zum Scratch Assay durchgeführt. Ziel dieser Experimente war es auszuschließen, dass beobachtete Veränderungen im Migrationsverhalten lediglich auf Veränderungen im Wachstumsverhalten beruhten.

5.4.19 HSP90-Luciferase-Refaltungs-Assay

Der Assay wurde nach [Galam *et al*, 2007] in unserem Arbeitskreis von Ana Moita etabliert und durchgeführt [Moita, 2017]. Zur Ermittlung der Aktivität von HSP90 in einem Zelllysats, wurde dessen Fähigkeit, denaturierte Luciferase wieder in seine intakte Quartärstruktur zurückzufalten, ausgenutzt. Da in jeder Zelle 1-2% der Gesamtproteinmenge aus HSP90 bestehen, kann das Zelllysats ohne weitere Kontrollen als HSP90 Quelle verwendet werden. Ebenso enthält das Zelllysats alle für die HSP90-Faltungs-Reaktion nötigen Proteine und

5.4 Methoden

Cochaperone. Zur Gewinnung des Zelllysats wurde eine T175-Zellkultuflasche mit der Zelllinie Kyse510 bis zu einer Konfluenz von 90-100% wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers geerntet, in 7 ml PBS aufgenommen und das durch Zentrifugation (4°C, 266 rpm, 8min) erhaltene Zellpellet in sterilfiltriertem Aqua dest. (zweifaches Pelletvolumen) resuspendiert. Die Zellen wurden für 1h bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Vortexen lysiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Denaturierung wurde die aktive Luciferase in Stabilitypuffer zu einer Konzentration von 0,5 mg/ml gelöst und für 10min bei 41°C im Thermocycler denaturiert. Die denaturierte Luciferase wurde bei -20°C gelagert.

Das Zelllysate wurde auf Eis aufgetaut und in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 20min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen des Tris-Puffers verdünnt. Für jede zu vermessene Konzentration der potentiellen HSP90-Inhibitoren wurden 3,6 µl der Inhibitor-Verdünnung mit 36 µl des Zelllysats in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Die Reaktionsgefäße der Positivkontrolle (DMSO mit Lysat) und der Negativkontrolle (DMSO ohne Lysat, nur Tris-Puffer) enthielten jeweils 48 µl Zelllysate bzw. TRIS-Puffer und 4,8 µl DMSO, da diese in vierfacher Bestimmung vermessen wurden. Das Zelllysate wurde mit den Inhibitoren für 30min auf Eis stehen gelassen. In die 1,5 ml Reaktionsgefäße wurde nach Ablauf der 30min der Master-Mix, der die denaturierte Luciferase enthielt, gegeben (Triplikate: 36 µl, Positiv- und Negativkontrolle: 48 µl) und durch Vortexen gemischt. In eine 96-well Platte wurden pro well 21 µl der entsprechenden Lösungen ausplattiert und für 2h bei 25 °C im LumiStar inkubiert. Durch den LumiStar wurden 100 µl des Assay-Puffers, der das Luciferin zum Start der Reaktion enthält, zugegeben und die Lumineszenz-Zeit-Kurven für 30 s aufgezeichnet. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Lumineszenzintensität der Negativkontrollen von der aller anderen Proben abgezogen. Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism wurde die Differenzen der Lumineszenzintensitäten gegen den negativen dekadischen Logarithmus der Substanzkonzentration aufgetragen und aus den so erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven der IC₅₀ abgelesen.

5.4.20 Statistik

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

5 Materialien und Methoden

Für die Auswertung der Daten der MTT-Assays wurden die auf den Mittelwert der Kontrollen prozentualisierten Absorptionswerte der einzelnen Experimente zur Mittelung gepoolt und daraus eine nicht-lineare Regression erstellt (vgl. Formel 2). Für die statistische Auswertung wurden die als normalverteilt geltenden pIC_{50} -Werte und deren Standardfehler herangezogen.

Die statistische Signifikanz wurde mit dem two-tailed student's t-test mittels Graph Pad Prism berechnet und ein signifikantes Ergebnis unterhalb eines p-Wertes von 0,05 angenommen. * Kennzeichnet einen $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

6. Ergebnisse

6.1 Wachstumsfaktorrezeptoren

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der intrazellulären Signaltransduktion auf die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Cisplatinresistenz in der triple-negativen Brustkrebszelllinie HCC38 untersucht. Die hierbei gefundene Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs wurde zusätzlich auf die ebenfalls triple negative Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 übertragen. Die Ergebnisse wurden bereits publiziert [Gohr *et al*, 2017].

Inhibition of PI3K/Akt/mTOR overcomes cisplatin resistance in the triple negative breast cancer cell line HCC38

Katharina Gohr, Alexandra Hamacher, Laura H. Engelke and Matthias U. Kassack

BMC Cancer 2017 **17**:711

<https://doi.org/10.1186/s12885-017-3695-5>

© The Author(s). 2017

Received: 20 September 2016

Accepted: 19 October 2017

Published: 3 November 2017

Abstract

Background

Widely established targeted therapies directed at triple negative breast cancer (TNBC) are missing. Classical chemotherapy remains the systemic treatment option. Cisplatin has been tested in TNBC but bears the disadvantage of resistance development. The purpose of this study was to identify resistance mechanisms in cisplatin-resistant TNBC cell lines and select targeted therapies based on these findings.

Methods

The TNBC cell lines HCC38 and MDA-MB231 were subjected to intermittent cisplatin treatment resulting in the 3.5-fold cisplatin-resistant subclone HCC38CisR and the 2.1-fold more resistant MDA-MB231CisR. Activation of pro-survival pathways was explored by

immunostaining of phospho-receptor tyrosine kinases. Targeted therapies (NVP-AEW541, lapatinib and NVP-BEZ235) against activated pathways were investigated regarding cancer cell growth and cisplatin sensitivity.

Results

In HCC38CisR and MDA-MB231CisR, phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) was observed. In HCC38CisR, treatment with NVP-AEW541 increased potency of lapatinib almost seven-fold, but both compounds could not restore cisplatin sensitivity. However, the dual phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor NVP-BEZ235 acted synergistically with cisplatin in HCC38CisR and fully restored cisplatin sensitivity. Similarly, NVP-BEZ235 increased cisplatin potency in MDA-MB231CisR. Furthermore, NVP-AEW541 in combination with lapatinib restored cisplatin sensitivity in MDA-MB231CisR.

Conclusion

Simultaneous inhibition of EGFR and IGF1R in cisplatin-resistant TNBC cell lines was synergistic regarding inhibition of proliferation and induction of apoptosis. Co-treatment with NVP-BEZ235 or with a combination of NVP-AEW541 and lapatinib restored cisplatin sensitivity and may constitute a targeted treatment option for cisplatin-resistant TNBC.

Keywords

Triple negative breast cancer, HCC38, MDA-MB231, EGFR, IGF1R, NVP-AEW541, NVP-BEZ235, Lapatinib, Cisplatin resistance

Background

Breast cancer is the second most common cancer in the world and the incidence of female breast cancer has continuously increased [Global Burden of Disease Cancer *et al*, 2015]. In 2013, 1.8 million incident cases of breast cancer occurred, and the disease caused 464,000 deaths [Global Burden of Disease Cancer *et al*, 2015]. Triple negative breast cancer (TNBC) accounts for 10–20% of these breast cancer cases [Papa *et al*, 2015]. This type of breast cancer is defined by lacking protein expression of progesterone (PR) and estrogen receptors (ER) as well as by low ErbB2 expression. For this reason, TNBCs cannot benefit from endocrine therapies or trastuzumab [Foulkes *et al*, 2010]. Therefore, chemotherapy is the systemic treatment option. The use of cisplatin and carboplatin in treatment of TNBCs is

currently investigated in clinical trials and initial results indicate a beneficial effect for cisplatin in neoadjuvant chemotherapy [von Minckwitz *et al*, 2014], [Isakoff *et al*, 2015]. One major challenge in cisplatin therapy is drug resistance which can be intrinsic or occur after several cycles of therapy. Trigger for cisplatin resistance can be found pre-target (e.g. reduced uptake), on-target (e.g. increased DNA-repair), post-target (e.g. inactivation of TP53) or off-target [Galluzzi *et al*, 2012]. Off-target mechanisms include activation of pro-survival pathways mediated for example via growth factor receptors.

We have previously shown that resveratrol or ellagic acid prevented the development of cisplatin resistance in the ovarian cancer cell line A2780. This effect is at least in part based on the prevention of activation of ErbB2 and ErbB3 in the course of long-term cisplatin treatment [Engelke *et al*, 2016]. IGF1R activation has also been shown to be a crucial step in the development of cisplatin resistance [Eckstein *et al*, 2009]. Activation of growth factor receptors may also play a role in the development of cisplatin resistance in TNBC and due to their involvement in cell proliferation, apoptosis and metastasis they are considered attractive targets for therapies beyond classical chemotherapeutic drugs [Jin & Esteva, 2008]. In 1998, a link between elevated insulin-like growth factor 1 (IGF1) blood levels and breast cancer risk in premenopausal women has been published [Hankinson *et al*, 1998]. In this context the IGF1R emerged as a promising target in cancer therapy. Binding of its ligands to IGF1R results in the activation of mainly two downstream signaling networks: PI3K-Akt-mTOR and RAF-MAPK, both linked to cell survival and inhibition of apoptosis. Interestingly, not high expression but high phosphorylation of IGF1R was predictive for poor prognosis in breast cancer [Law *et al*, 2008]. Extensive research in this area was done but after initially promising results, phase III clinical trials using anti-IGF1R-targeted therapies were mainly disappointing [Pollak, 2012]. These findings might be due to resistance mechanisms like compensatory signaling via growth hormone receptors, insulin receptors or epidermal growth factor receptors. Therefore, combination therapies were suggested. In vitro studies showed a synergistic effect of a small molecule IGF1R inhibitor with gefitinib as EGFR/ErbB2 inhibitor [Huang *et al*, 2009c]. However, as has been seen for IGF1R inhibitors alone, larger clinical trials combining IGF1R inhibitors with either gefitinib or erlotinib failed [Beckwith & Yee, 2015]. Taking into account that no biomarkers were used to predict response, predictive tools for the use of IGF1R inhibitors might be necessary.

The purpose of our study was to identify resistance mechanisms in a cisplatin-resistant TNBC cell line leading to targeted therapies as treatment options in this cancer type. Evaluation of the phosphorylation status of receptor tyrosine kinases revealed activation of IGF1R and EGFR as a result of cisplatin resistance. Therefore, inhibitors of these two receptors (NVP-AEW541 and lapatinib) and an inhibitor of downstream acting PI3K/Akt/mTOR (NVP-BEZ235) were evaluated regarding their effects on cancer cell growth and cisplatin sensitivity. Indeed, co-treatment of NVP-AEW541 with lapatinib increased potency of lapatinib in the cisplatin-resistant TNBC cell line HCC38CisR but did not increase cisplatin sensitivity. On the other hand, NVP-BEZ235 acted synergistically with cisplatin and fully restored cisplatin sensitivity in HCC38CisR. Furthermore, in the highly cisplatin-resistant TNBC cell line MDA-MB231CisR, treatment with NVP-BEZ235 or co-treatment of NVP-AEW541 with lapatinib increased potency of cisplatin up to 4.8-fold.

Methods

Materials

NVP-AEW541 and NVP-BEZ235 were gifts from Novartis (Basel, Switzerland). Lapatinib, KU0063794 and LY294002 were from Cayman Chemical (Michigan, USA). Cisplatin was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Serva (Heidelberg, Germany). Propidium iodide was from PromoCell (Heidelberg, Germany). Roswell Park Memorial Institute (RPMI) media 1640, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin [10,000 U/ml; 10 mg/ml] and trypsin-EDTA (0.05% trypsin, 0.02% EDTA in PBS) were purchased from PAN Biotech (Aidenbach, Germany). Primary antibodies were purchased from R&D Systems (Wiesbaden, Germany) (pIGF1R, IGF1R, p-EGFR, EGFR, p-ErbB2, ErbB2, p-ErbB3, ErbB3) or Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany) (p-Akt, Akt, β -Actin, PARP). HRP-conjugated secondary antibodies were from R&D Systems. All other reagents and chemicals were from VWR BDH PROLABO (Darmstadt, Germany).

Cell lines and cell culture

The triple negative breast cancer cell line HCC38 was obtained from ATCC (Manassas, USA, ATCC order number: ATCC® CRL-2314™) and cultivated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 120 μ g/ml streptomycin and 120 U/ml penicillin. The TNBC cell line MDA-

6.1 Wachstumsfaktorrezeptoren

MB231 (ATCC, Manassas, USA, ATCC order number: ATCC® HTB-26™) was cultivated in DMEM supplemented with 15% FBS, 120 µg/ml streptomycin and 120 U/ml penicillin. Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. HCC38CisR and MDA-MB231CisR, the cisplatin resistant subclones of HCC38 and MDA-MB231, respectively, were generated by intermittent treatment of HCC38 or MDA-MB231 with cisplatin for 40 cycles according to methods previously published [Engelke *et al*, 2016], [Eckstein *et al*, 2009], [Gosepath *et al*, 2008]. Cells were grown to 80–90% confluency before using them for assays.

MTT cell viability assay

Cell viability was determined using the MTT assay as previously described [Engelke *et al*, 2016]. Resistance factor was calculated as ratio of IC₅₀ of the resistant cell line and IC₅₀ of the sensitive cell line. To investigate the effect of the small molecule inhibitors on cisplatin cytotoxicity, compounds were added 48h prior to 72h cisplatin treatment. For combination index analysis, cell viability was determined from each well relative to the average absorbance of control wells. The combination indices (CIs) were calculated using CalcuSyn 2.1 software (Biosoft, Cambridge, U.K.) based on the Chou – Talalay method [Chou, 2010]. CI > 1 indicates antagonism. CI = 1 indicates an additive effect and CI < 0.9 indicates synergism.

Neutral red cell viability assay

To exclude compound effects potentially influencing mitochondrial activity, neutral red cell viability assay instead of MTT assay was performed as previously described [Borenfreund & Shopsis, 1985]. Briefly, after incubation time, medium was removed and 200 µl neutral red incubation solution (medium containing FBS, 0.1 M HEPES buffer pH 7.4 and 0.01% neutral red) was added. After 2h, incubation solution was removed and cells were quickly washed with 1% CaCl₂ × 2 H₂O in 1% formaldehyde solution. After a second washing step, cells were lysed with a 1:1 mixture of ethanol and 1% acetic acid. Absorbance was measured at 544 and 690 nm in a FLUOstar microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

Doubling time

The assay was performed as previously described [Engelke *et al*, 2016]. Cells were seeded in 6-well plates (Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany). After 24, 48, 72, and 96h, cells were trypsinized and washed with PBS. Total number of cells in 1 ml buffer was counted in a

CyFlow® space (Partec, Muenster, Germany). Doubling time was calculated using GraphPad Prism (version 4, GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Western blotting

For western blotting, standard procedures were used as previously described [Engelke *et al*, 2016].

RTK signal pathway analysis

The tyrosine-kinase phospho-proteom was investigated by a human phospho-receptor tyrosine kinase antibody array (Cat# ARY001) from R&D Systems according to the manufacturer's protocol. Cell lysate containing 300 µg protein was used.

Cell cycle analysis

Distribution of cell cycle phases of the different cell lines was analyzed by flow cytometry using standard procedures as previously described [Engelke *et al*, 2016].

Apoptosis analysis

Apoptotic cells were determined by propidium iodide staining as previously described [Engelke *et al*, 2016].

Scratch assay

Scratch assay was performed according to standard procedures as previously described [Engelke *et al*, 2016]. Cell-free area was determined using ImageJ [Schneider *et al*, 2012]. Percentage of space that was occupied with cells after 24h was calculated.

Statistical analysis

Assays were performed at least in three independent experiments. Concentration effect curves were then generated by nonlinear regression curve fitting using the 4-parameter logistic equation with variable hill slope (GraphPad Prism version 4, GraphPad Software Inc.). Data presented are mean ± SEM if not otherwise stated. Statistical significance was assessed by two-tailed Student's t-test or ANOVA and considered significant if $p < 0.05$. $pIC_{50} \pm SEM$ leading to the reported IC_{50} values are shown in Additional file 1.

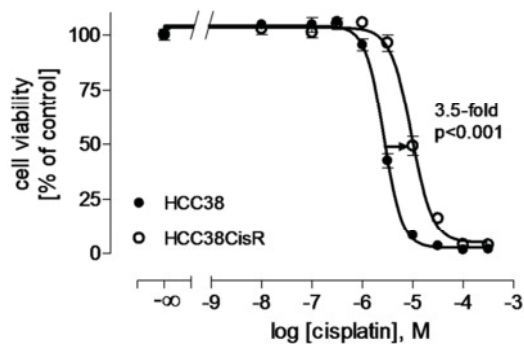
Results

The cisplatin resistant cell line HCC38CisR was generated by weekly exposure to the IC_{50} of cisplatin for 6h. After 40 cycles, the IC_{50} (determined by MTT) has shifted from 2.7 µM to 9.4 µM corresponding to a resistance factor of 3.5 (Fig. 1a). This resistance factor is in the range of previously reported resistance factors of cell lines established from cancer patients

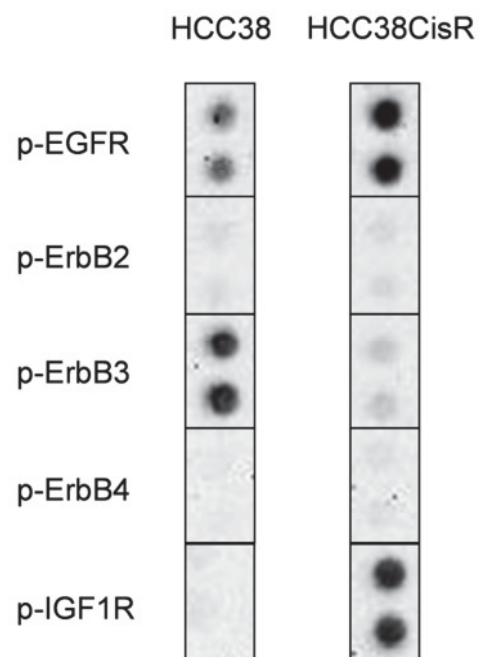
6.1 Wachstumsfaktorrezeptoren

before and after chemotherapy [McDermott *et al*, 2014]. Resistance could be maintained without further cisplatin treatment. IC_{50} of cisplatin varied throughout the duration of these studies between 7 and 12 μ M for HCC38CisR. HCC38CisR was characterized in comparison to the parental cell line HCC38. Phospho-receptor tyrosine kinase antibody array was used to determine receptor activation. Other receptors than those shown in Fig. 1b (EGFR-family, IGF1R) were not differentially phosphorylated. HCC38 showed – as expected – no activation of ErbB2 but activation of EGFR and ErbB3. Cisplatin resistance (HCC38CisR) did not generate ErbB2 activation, while EGFR and IGF1R showed a markedly enhanced activation in HCC38CisR (Fig. 1b). In contrast, ErbB3 activation was diminished in HCC38CisR. These results could be confirmed by western blotting (Fig. 1c and d). In this assay, expression and activation of receptor tyrosine kinases (RTKs) was estimated in HCC38, HCC38CisR (long-term cisplatin stress, 40 $\times$ intermittent 6h cisplatin treatment), and HCC38 exposed to short-term cisplatin stress (6h IC_{50} of cisplatin with 24h or 1 week recovery). IGF1R and EGFR phosphorylation was increased after 6h cisplatin stress and 24h recovery, and in HCC38CisR. If HCC38 treated 6h with cisplatin could recover from cisplatin stress for one week, receptor phosphorylation decreased nearly to the initial state. Evaluating the expression of growth factor receptors, there was hardly any difference between untreated HCC38 and HCC38CisR. Akt expression and phosphorylation was enhanced in HCC38CisR compared to HCC38 either untreated or short-term treated with cisplatin. Long-term cisplatin treatment resulting in HCC38CisR further increased proliferation rate and decreased doubling time significantly from 24h to 17h as displayed in Fig. 1e.

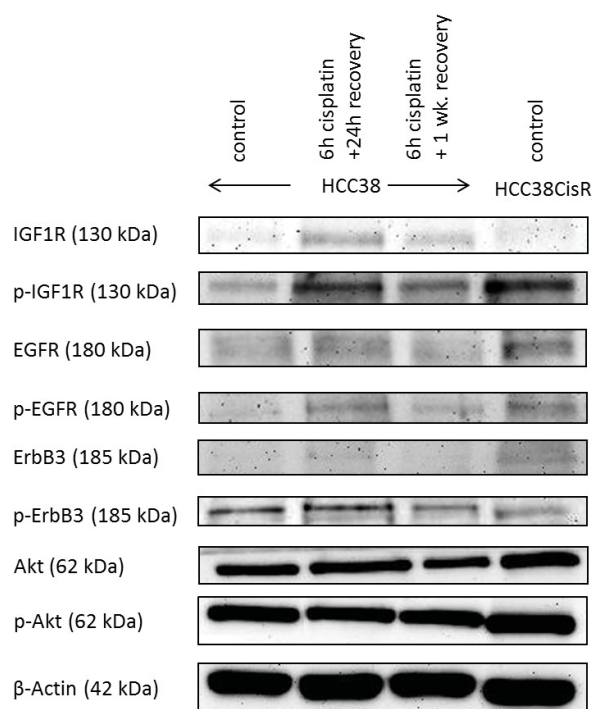
A



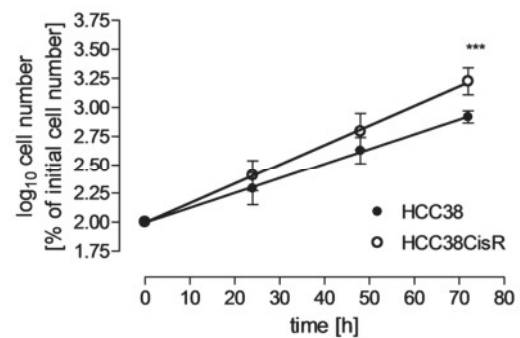
B



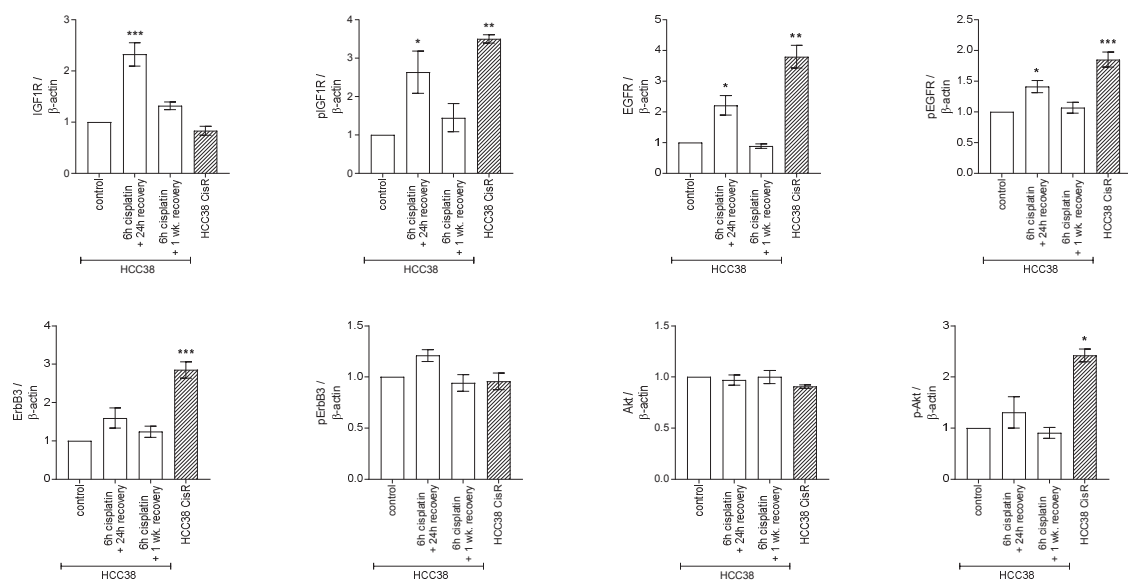
C



E



D

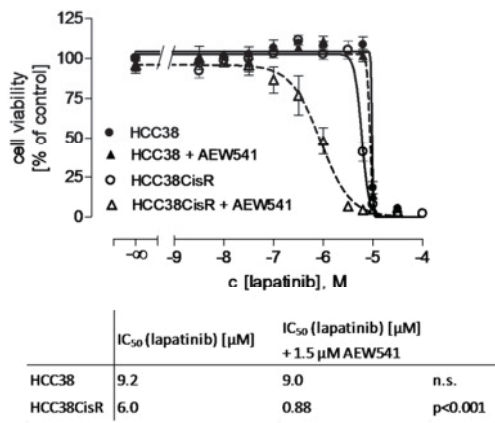


6.1 Wachstumsfaktorrezeptoren

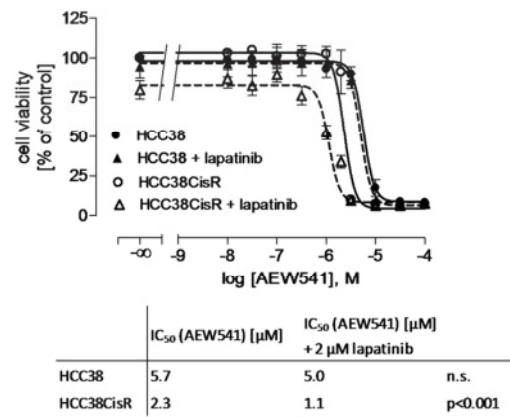
Fig. 1 Characterization of HCC38 and cisplatin-resistant HCC38CisR. **(A)** Weekly exposure of HCC38 with the IC_{50} of cisplatin for 6h resulted in the cisplatin resistant subclone HCC38CisR with a resistance factor of at least 3.5 ($p < 0.001$). IC_{50} cisplatin HCC38: 2.7 μ M; IC_{50} cisplatin HCC38CisR: 9.4 μ M. Shown are mean $\pm$ SEM, $n = 3$. **(b)** Detail of phospho-RTK-array displays phosphorylation status of EGFR-family and IGF1R in HCC38 and HCC38CisR. **(c)** Immunostaining of expression and activation of signaling kinases. Shown is a representative experiment out of 3. HCC38 cells were treated with 2.5 μ M cisplatin for 6h followed by a recovery of 24 h or 1 week. Untreated HCC38 and HCC38CisR served as controls. **(d)** Densitometric analysis of the protein bands of HCC38 and HCC38CisR were performed using ImageJ software (NIH). Data are means $\pm$ SD, $n = 3$. All values have been normalized to HCC38 control. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$). **(e)** Cell proliferation measured by flow cytometry-based cell counting. Doubling times were 23.6h in HCC38 and 16.9 h in HCC38CisR and were significantly different (*** $p < 0.001$). Shown are mean $\pm$ SEM, $n = 3$

Based on activation of EGFR and IGF1R in HCC38CisR (Fig. 1), the dual EGFR/ErbB2 inhibitor lapatinib and the IGF1R inhibitor NVP-AEW541 were chosen for further experiments. The IC_{50} of both inhibitors was lower in HCC38CisR than in HCC38 (Fig. 2a/b). The effect was more pronounced for NVP-AEW541 (5.7 μ M vs. 2.3 μ M) than for lapatinib (9.2 μ M vs. 6.0 μ M) (Fig. 2a/b). Next, we tested the combination of both inhibitors. In HCC38, co-incubation of NVP-AEW541 had no effect on the IC_{50} of lapatinib, and vice versa, co-incubation of lapatinib had no effect on the IC_{50} of NVP-AEW541 (Fig. 2a/b). However, co-incubation of NVP-AEW541 caused a significant increase in potency of lapatinib in HCC38CisR (almost 7-fold from 6.0 to 0.88 μ M, Fig. 2a). Vice-versa, co-incubation of lapatinib resulted in a significantly decreased IC_{50} for NVP-AEW541 in HCC38CisR (2-fold from 2.3 to 1.1 μ M, Fig. 2b). To confirm the observed effects, synergism studies were performed (Table 1). Analysis based on the Chou-Talalay method [Chou, 2010] suggested a synergistic interaction between lapatinib and NVP-AEW541 (combination indexes $CI < 0.9$) in HCC38CisR.

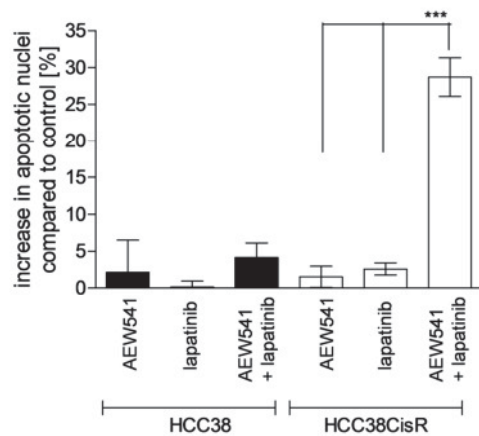
A



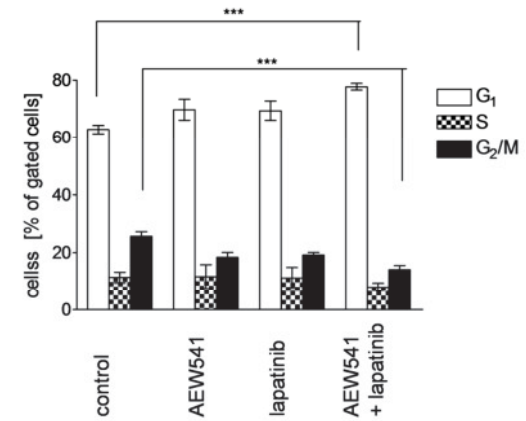
B



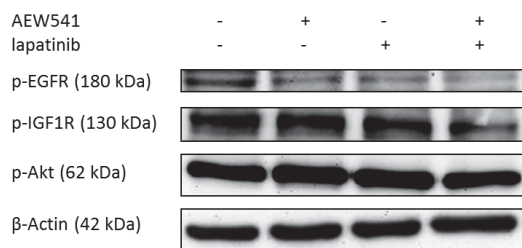
C



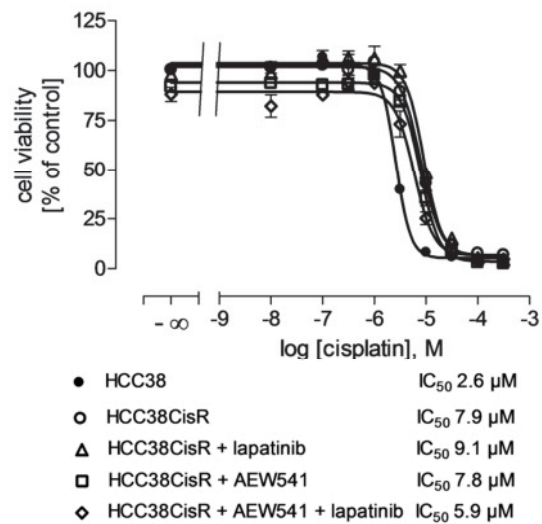
D



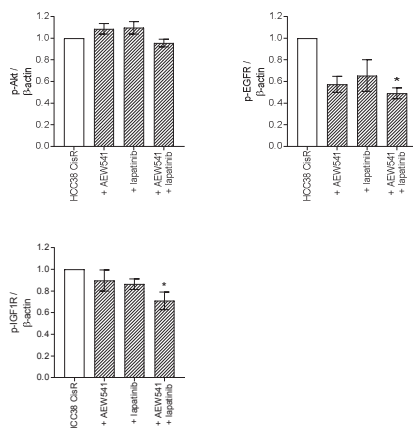
E



G



F



6.1 Wachstumsfaktorrezeptoren

Fig. 2 Combination of lapatinib and NVP-AEW541 is hyper-additive but not reversing cisplatin resistance in HCC38CisR. **a** Coincubation with 1.5 μ M NVP-AEW541 significantly decreased IC_{50} of lapatinib in HCC38CisR, whereas this treatment had no effect in HCC38. **b** Coincubation with 2 μ M lapatinib significantly decreased IC_{50} of NVP-AEW541 in HCC38CisR but had no effect in HCC38. **c** In HCC38CisR (but not in HCC38), the combination of NVP-AEW541 and lapatinib significantly induced apoptosis in a hyper-additive manner ($***p < 0.001$). NVP-AEW541 and lapatinib were used at 2 μ M. Cells were treated for 48h and the amount of apoptotic nuclei in the control was subtracted from treated samples. **d** Effect of NVP-AEW541 or lapatinib (2 μ M, respectively) on cell cycle in HCC38CisR. Combination of 2 μ M NVP-AEW541 and 2 μ M lapatinib significantly ($***p < 0.001$) increased cell population in G_1 ($77.7 \pm 1.2\%$ vs. $67.3 \pm 1.4\%$) while reducing cell population in G_2/M phase ($14.2 \pm 1.5\%$ vs. $25.7 \pm 1.6\%$). Incubation time was 48h. **e** Western blot analysis of p-EGFR, p-IGF1R, and p-Akt upon treatment of HCC38CisR with an IC_{50} of lapatinib or NVP-AEW541 or both compounds for 6h. **f** Densitometric analysis of the protein bands for p-AKT, p-EGFR, and p-IGF1R of HCC38CisR were performed using ImageJ software (NIH). Data are means $\pm$ SD, $n = 3$. All values have been normalized to untreated HCC38 CisR. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test ($* p < 0.05$). **g** Effect of 1 μ M lapatinib and 1.5 μ M NVP-AEW541 on cisplatin sensitivity either alone or in combination. Lapatinib and/or NVP-AEW541 were added 48h prior to cisplatin treatment. IC_{50} of cisplatin did not significantly differ. All data shown are mean $\pm$ SEM, $n = 3$, except (e) showing a representative experiment out of 3.

Table 1 Synergism studies between NVP-AEW541 and lapatinib

Lapatinib [μ M]					
AEW541 [μ M]	1	2	2.5	3	3.5
0.5	^a	^a	0.76	0.52	0.46
1	^a	0.58	0.51	0.44	0.42
1.5	0.96	0.59	0.58	0.51	0.49
2	0.46	0.42	0.46	0.49	0.52
3	0.69	0.57	0.56	0.68	0.64

^a fraction affected < 0.2

Since MTT assay cannot distinguish between inhibition of proliferation and induction of apoptosis, we examined induction of apoptosis using propidium iodide nuclear staining (Fig. 2c). Both inhibitors were added alone or in combination for 48h in a concentration of 2 μ M. In HCC38 the treatment induced nearly no apoptotic cells (Fig. 2c). In HCC38CisR, NVP-AEW541 ($1.53 \pm 1.42\%$) and lapatinib ($2.59 \pm 0.83\%$) showed similarly nearly no induction of apoptosis whereas the combination of both compounds could heavily induce apoptosis ($28.7 \pm 2.62\%$, Fig. 2c). The effect of this combination on cell cycle distribution in HCC38CisR was then determined using propidium iodide staining (Fig. 2d). Again, NVP-AEW541 and lapatinib alone or in combination were added in a concentration of 2 μ M for 48h prior to

ethanol fixation. NVP-AEW541 and lapatinib alone had no significant effects. In contrast, the combination of both compounds could reduce the fraction of cells in the G2/M phase from 25.7% to 14.2% while increasing the fraction of cells in G1 phase from 62.8% to 77.7% ($p < 0.001$; Fig. 2d). Treatment with lapatinib, NVP-AEW541 or their combination had no effect on cell cycle distribution in HCC38 (see Additional file 2). Next, the effect on phosphorylation of Akt, EGFR and IGF1R after 6h treatment of HCC38CisR with an IC_{50} of lapatinib or NVP-AEW541 alone or in combination was determined by western blotting (Fig. 2e/f). Whereas both compounds alone had only moderate effects on receptor phosphorylation, their combination reduced EGFR and IGF1R phosphorylation to a greater extent. Interestingly, Akt phosphorylation was unaffected by either treatment.

Since EGFR and IGF1R were activated in cisplatin-resistant HCC38CisR, we examined if the combination of lapatinib and NVP-AEW541 could restore cisplatin sensitivity in HCC38CisR (Fig. 2g). HCC38CisR was pretreated with the inhibitors 48h prior to cisplatin treatment. The inhibitors alone and in combination had no significant effect on cisplatin sensitivity. In HCC38, the same was observed: neither lapatinib nor NVP-AEW541 alone nor their combination had an effect on cisplatin sensitivity (see Additional file 3).

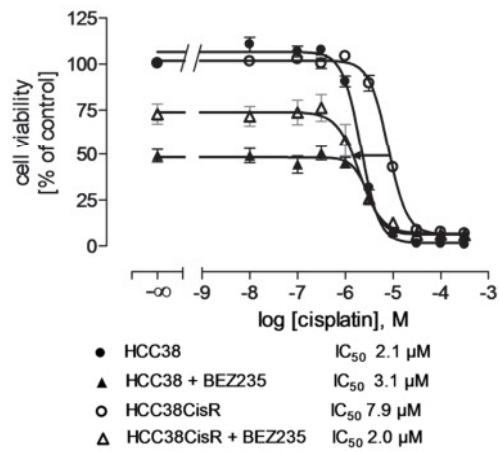
It has been shown that cancer cells can easily switch membrane-bound RTK pathways upon inhibition of a particular RTK and still use the same downstream signaling pathways [Jones *et al*, 2006]. Further, since neither lapatinib nor NVP-AEW541 had an effect on cisplatin sensitivity and both compounds did not alter Akt phosphorylation increased in HCC38CisR (Fig. 2e/f), we tested whether NVP-BEZ235, a dual inhibitor of PI3K and mTOR, had an effect on cisplatin sensitivity. Evaluating the cytotoxicity of NVP-BEZ235 in HCC38 and HCC38CisR revealed that the IC_{50} was lower in HCC38 (9.1 nM) than in HCC38CisR (69.3 nM) (See Additional file 4). 48h pretreatment with 20 nM NVP-BEZ235 increased potency of cisplatin in HCC38CisR by a factor of 4 into the range of the non-resistant cell line HCC38 (IC_{50} HCC38CisR: 7.9 μ M; IC_{50} HCC38CisR pretreated with 20 nM NVP-BEZ235: 2.0 μ M; Fig. 3a). In HCC38, 20 nM NVP-BEZ235 had no effect on cisplatin sensitivity (Fig. 3a). However, NVP-BEZ235 had a more pronounced effect on cell viability in HCC38 as observed by a reduction of the top plateau of the concentration effect curve to 48% in HCC38 versus 74% in HCC38CisR (Fig. 3a). To corroborate the observed effect in HCC38CisR, synergism studies were performed. The calculated CIs indicated synergism between cisplatin and NVP-BEZ235 in HCC38CisR (Table 2). Because NVP-BEZ235 inhibits PI3K as well as mTOR, we examined

6.1 Wachstumsfaktorrezeptoren

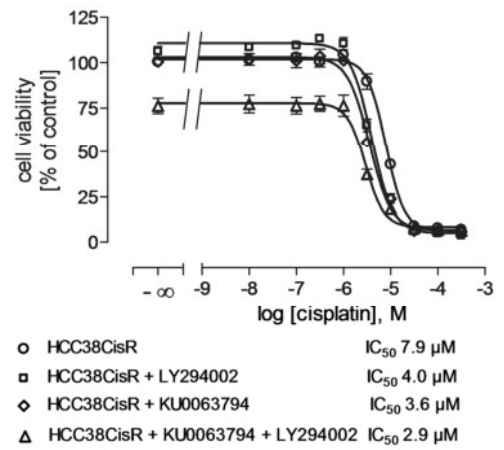
the effect on cisplatin sensitivity of compounds inhibiting only one of these targets: LY294002 was chosen as PI3K inhibitor, KU0063794 as mTOR inhibitor (Fig. 3b). 48h preincubation with either compound prior to cisplatin treatment could significantly ($p < 0.001$) sensitize HCC38CisR for cisplatin treatment by a factor of approximately 2. If both inhibitors LY294002 and KU0063794 were combined in 48h preincubation prior to cisplatin treatment in HCC38CisR, the cisplatin IC_{50} of the parental cell line HCC38 was nearly restored (2.9 μ M, Fig. 3b). The effect of NVP-BEZ235 on cisplatin sensitivity was slightly, but significantly ($p < 0.05$) stronger than the effect of the combination of KU0063794 and LY294002.

6 Ergebnisse

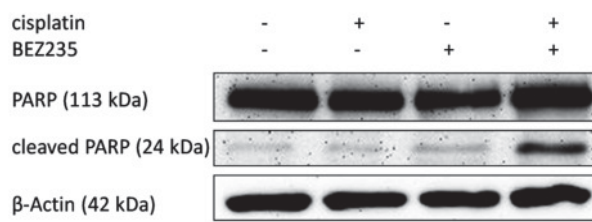
A



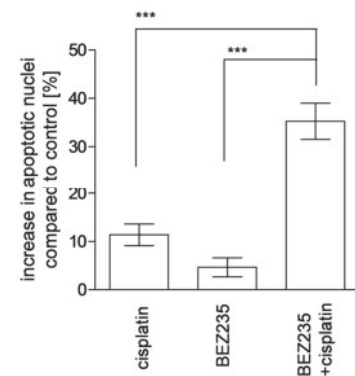
B



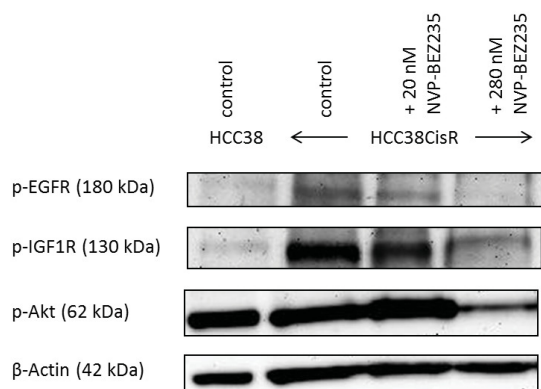
C



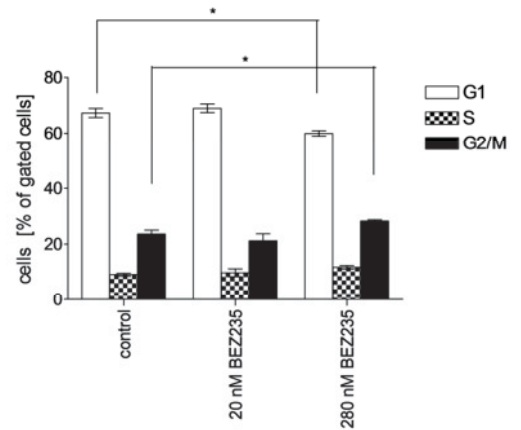
D



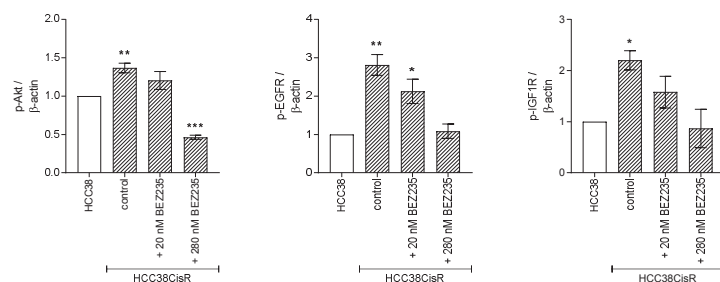
E



G



F



6.1 Wachstumsfaktorrezeptoren

Fig. 3 NVP-BEZ235 treatment fully restores cisplatin sensitivity in HCC38CisR. **a** 20 nM NVP-BEZ235 added 48h prior to cisplatin treatment significantly reduced IC_{50} of cisplatin in HCC38CisR ($p < 0.001$) but not in HCC38. **b** 1 μ M KU0063794 or 5 μ M LY294002 or their combination significantly reduced IC_{50} of cisplatin in HCC38CisR ($p < 0.001$). **c** Western blot analysis of PARP and cleaved PARP in HCC38CisR used as an indicator of active Caspase 3. For combination of NVP-BEZ235 and cisplatin, 20 nM NVP-BEZ235 was incubated 48h prior to addition of 3 μ M cisplatin for 6h. **d** Induction of apoptosis by NVP-BEZ235 and cisplatin. 20 nM NVP-BEZ235 was incubated 24h prior to addition of 5 μ M cisplatin for 6h followed by 24h of recovery. Combination of NVP-BEZ235 with cisplatin increased apoptotic nuclei ($35.3 \pm 3.7\%$) compared to cisplatin alone ($11.4 \pm 2.3\%$) and NVP-BEZ235 alone ($4.6 \pm 2.0\%$) ($***p < 0.001$). **e** Western blot analysis of p-EGFR, p-IGF1R, and p-Akt in HCC38CisR upon 48h treatment with 20 nM or 280 nM NVP-BEZ235. **f** Densitometric analysis of the protein bands of p-EGFR, p-IGF1R, and p-Akt in HCC38 and HCC38CisR were performed using ImageJ software (NIH). Data are means $\pm$ SD, $n = 3$. All values have been normalized to HCC38 control. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$). **g** Effect of 20 nM or 280 nM NVP-BEZ235 on cell cycle in HCC38CisR. 280 nM NVP-BEZ235 gave a slight but significant (* $p < 0.5$) reduction of cells in G_1 phase ($67.3 \pm 1.6\%$ vs. $60.0 \pm 0.9\%$ in control) accompanied by an increase in cells in G_2/M phase ($23.6 \pm 1.4\%$ vs. $28.3 \pm 0.5\%$ in control). All data shown are mean $\pm$ SEM, $n = 3$, except (C/E) showing a representative experiment out of 3.

Table 2 Synergism studies between cisplatin and NVP-BEZ235

BEZ235 [nM]					
cisplatin [μ M]	30	40	50	60	70
1	^a	^a	0.74	0.69	0.76
2	0.76	0.70	0.71	0.60	0.66
3	0.76	0.59	0.61	0.60	0.64
5	0.71	0.63	0.62	0.61	0.67
7	0.70	0.59	0.61	0.60	0.67

^a fraction affected < 0.2

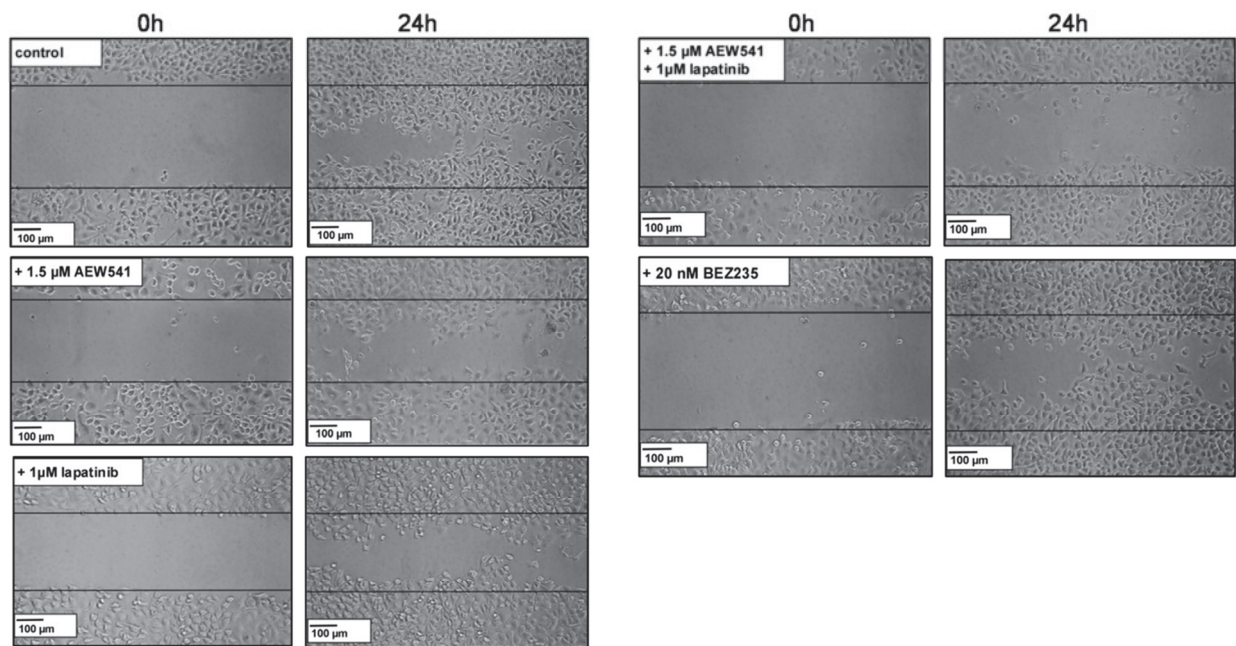
Synergism between NVP-BEZ235 and cisplatin was observed in MTT (Table 2) and further verified by western blotting (Fig. 3c) and apoptosis assay (Fig. 3d). 48h preincubation with 20 nM NVP-BEZ235 followed by a 6h treatment with 3 μ M cisplatin led to a markedly enhanced accumulation of cleaved poly ADP-ribose polymerase (PARP) in HCC38CisR serving as an indicator of caspase 3 activation. Whereas either compound alone could not induce PARP cleavage, the combination of NVP-BEZ235 and cisplatin markedly induced PARP cleavage. This effect was not observed in HCC38 (see Additional file 5). Similarly NVP-BEZ235 could enhance the number of cisplatin-induced apoptotic nuclei significantly (hyper-additive) without having an own pronounced apoptotic effect. Whereas cisplatin alone caused 11.4%

apoptotic nuclei, addition of NVP-BEZ235 tripled this effect (35.3%). Again, this effect could not be observed in HCC38 (see Additional file 6).

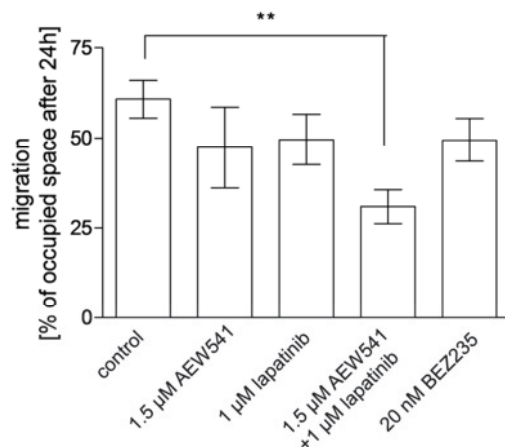
Since the effect of NVP-BEZ235 on its different targets is concentration-dependent [Serra *et al*, 2008], we tested a low (20 nM) and a high (280 nM) concentration of NVP-BEZ235 on EGFR, IGF1R and Akt phosphorylation (Fig. 3e/f) in HCC38CisR. 280 nM NVP-BEZ235 reduced Akt phosphorylation whereas 20 nM had no effect. Further, phosphorylation of IGF1R and EGFR was diminished, particularly at 280 nM NVP-BEZ235. Cell cycle was only affected by 280 nM (but not 20 nM) NVP-BEZ235 in HCC38CisR (Fig. 3g): cells in G₂/M phase slightly increased compared to control (28.3% versus 23.6%) accompanied by a slight decrease of cells in G₁ phase (60.0% versus 67.3%; $p < 0.05$; Fig. 3g).

Eventually, we studied effects of the examined kinase inhibitors NVP-AEW541, lapatinib and NVP-BEZ235 on the migratory potential of HCC38CisR by a scratch assay (Fig. 4). 24h after applying a scratch to untreated cells, 61% of the scratch was covered by cells (Fig. 4a/b). Treatment with any of the kinase inhibitors reduced migration, however only the combination of 1.5 μ M NVP-AEW541 and 1 μ M lapatinib showed a significant inhibition of migration (Fig. 4a/b). To exclude that inhibition of migration was only due to reduced proliferation, three different assays evaluating cell viability were performed using the same conditions as applied in the scratch assay: MTT assay, neutral red assay, cell count by flow cytometry. Treatment with NVP-AEW541 or lapatinib or their combination did not affect proliferation (Fig. 4c). Only NVP-BEZ235 significantly reduced cell proliferation compared to untreated control (MTT: 82%, neutral red: 87%, cell count: 81%). However, NVP-BEZ235 did not significantly inhibit migration.

A



B



C

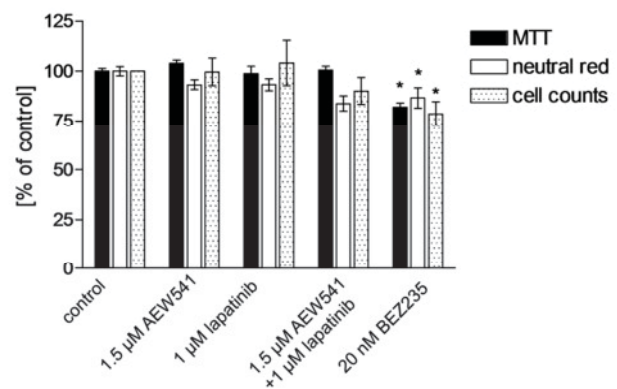


Fig. 4 Combination of lapatinib and NVP-AEW541 – but not NVP-BEZ235 inhibits cell migration in HCC38CisR measured by scratch assay. **a** Microscopic images were obtained before (0h) and 24h after applying a pipet tip-induced scratch in a nearly confluent cell monolayer. Data shown are one typical experiment out of three independent experiments. **b** Average migration, estimated as space occupied after 24h, showed that only the combination of 1.5 µM NVP-AEW541 and 1 µM lapatinib significantly reduced cell migration (**p < 0.01). **c** Cell proliferation assays applied under the conditions of (**b**) (24h incubation). Only 20 nM NVP-BEZ235 significantly reduced cellular proliferation (n = 3, *p < 0.05)

Lastly, we extended the study of NVP-AEW541, lapatinib, NVP-BEZ235 in HCC38 and HCC38CisR to the TNBC cell line MDA-MB231. Similarly to the generation of cisplatin-resistant HCC38CisR, we have generated a 2.1-fold more resistant sub-line named MDA-MB231CisR (Additional file 7A, Table 3). Similar to HCC38CisR, MDA-MB231CisR displayed activated EGFR and IGR1R (Additional file 7B). We then tested combinations of dual and triple combinations of kinase inhibitors and cisplatin by MTT assay (Table 3). In accordance with the results obtained in HCC38 and HCC38CisR (Fig. 3a), NVP-BEZ235 had no effect on cisplatin potency in MDA-MB231 but reversed the 2.1-fold cisplatin resistance of MDA-MB231CisR (Table 3). Furthermore, NVP-BEZ235 increased apoptosis induction in combination with cisplatin compared to either compound alone (Additional file 7C). Whereas the combination of NVP-AEW541 plus lapatinib only partially reversed cisplatin resistance in HCC38CisR (Fig. 2g), this combination not only reversed the 2.1-fold resistance of MDA-MB231CisR but shifted cisplatin potency by a factor of 4.8 beyond the sensitivity of MDA-MB231 (Table 3). Notably, similar to the results in HCC38CisR (Fig. 2c), the combination of NVP-AEW541 and lapatinib showed a highly hyper-additive effect in the induction of apoptosis in both MDA-MB231 and MDA-MB231CisR (Additional file 7D).

Table 3 IC₅₀ values (μM) from MTT assays and corresponding shift factors (SF) of cisplatin alone and after 48h pretreatment with 1.5 μM NVP-AEW541, 2 μM lapatinib, 20 nM NVP-BEZ235, or 1.5 μM NVP-AEW541 plus 2 μM lapatinib, respectively, in MDA-MB231 and MDA-MB231CisR cells

Compound	MDA-MB231		MDA-MB231 CisR	
	IC ₅₀	SF	IC ₅₀	SF
cisplatin	20.9	---	44.0	---
cisplatin + AEW541	22.8	0.9	23.3	1.9
cisplatin + lapatinib	24.1	0.9	24.7	1.8
cisplatin + BEZ235	22.8	0.9	21.8	2.0*
cisplatin + AEW541 + lapatinib	10.1	2.1*	9.16	4.8*

* $p < 0.05$

Data are mean of 3 experiments

Discussion

Among breast cancer, TNBC has a poor prognosis due to the lack of targeted hormone or HER2-directed therapy and resistance development against classical cytostatics including cisplatin currently under clinical investigation for TNBC [Isakoff *et al*, 2015]. We have established a cellular model of cisplatin resistance in the TNBC cell line HCC38 to study resistance mechanisms and identify targets for overcoming resistance. The cisplatin resistant cell line labeled HCC38CisR exhibited increased activation observed as phosphorylation of EGFR and IGF1R (Fig. 1). Increased RTK phosphorylation in HCC38CisR was accompanied by faster proliferation (Fig. 1d) and higher susceptibility to EGFR and IGF1R inhibition (Fig. 2a/b) compared to the parental cell line HCC38. By immunostaining, we could demonstrate that an increase in RTK phosphorylation also occurred in HCC38 after short-term (6h) cisplatin exposure. However, in contrast to HCC38CisR showing a stable cisplatin resistance with permanent EGFR and IGF1R activation, the short-term cisplatin-induced receptor phosphorylation in HCC38 nearly vanished after 1 week of recovery (Fig. 1c). Crosstalk between RTKs as well as the ability of cancer cells to switch between different growth factor receptor pathways is well described [Jin & Esteva, 2008]. Therefore, lapatinib and NVP-AEW541 were selected to inhibit both activated RTKs in HCC38CisR simultaneously. According to the Cancer Cell Line Encyclopedia [Barretina *et al*, 2012], EGFR mutations possibly impairing the effect of lapatinib are not described for HCC38. Activation of EGFR and IGF1R was observed in HCC38CisR, but RTK activation is rather associated with than a cause of cisplatin resistance in HCC38CisR as we could not restore cisplatin sensitivity by inhibition of these RTKs with lapatinib and NVP-AEW541 (Fig. 2g) even though both compounds were shown to successfully inhibit EGFR and IGF1R phosphorylation (Fig. 2e/f). Notably, in the highly cisplatin-resistant cell line MDA-MB231CisR (IC_{50} 44.0 μ M), we found a 4.8-fold resensitization for cisplatin upon pretreatment with NVP-AEW541 and lapatinib (IC_{50} 9.16 μ M, Table 3). We could demonstrate synergy of lapatinib and NVP-AEW541 with respect to inhibition of cell viability (Table 1) and apoptosis induction (Fig. 2c, Additional file 7D). Coincubation with NVP-AEW541 reduced IC_{50} of lapatinib nearly 7-fold (Fig. 1a). This effect may be of clinical importance as the resulting IC_{50} of 0.88 μ M is lower than the reported c_{max} of lapatinib (1.7–4 μ M) [Burris *et al*, 2005], [LoRusso *et al*, 2008]. In cell cycle analysis we could show that the combination of EGFR and IGF1R inhibition resulted in an increase in cells in G₁ phase. This might be one possible mechanism leading to reduced

cell proliferation. These results are in accordance with studies performed on adrenocortical carcinomas applying EGFR and IGF1R inhibitors [Xu *et al*, 2016]. Another effect of the combination of lapatinib and NVP-AEW541 in HCC38CisR is the reduction of cell migration (Fig. 4a/b) which was not due to decreased proliferation as shown by simultaneously performed proliferation assays (Fig. 4c). Migration of cancer cells serves as a marker for invasion and the potential to form metastases. As TNBC has a high risk for metastases [Bosch *et al*, 2010], drugs reducing migration may be valuable in treating TNBC. Although the advantages of combining RTK inhibitors have been shown several years ago [Camirand *et al*, 2005], the in vitro results have not yet been transferred into clinical benefits [Beckwith & Yee, 2015]. Taking into account that the approach of combining NVP-AEW541 and lapatinib showed only synergy in HCC38CisR but not in HCC38, it might be of value to select tumors according to their RTK activation. Our study demonstrates that the phosphorylation status of RTKs predicts response to the combination of lapatinib and NVP-AEW541 (in HCC38CisR and MDA-MB231CisR) whereas receptor expression showed only marginal differences between non-responding HCC38 and responding HCC38CisR. Therefore, the selection of targeted therapies by receptor phosphorylation rather than receptor expression might be an approach for further studies.

Lapatinib and NVP-AEW541 were ineffective to restore cisplatin sensitivity in HCC38CisR (Fig. 2g). However, Akt was stronger phosphorylated in HCC38CisR than in untreated or short-term (6h) cisplatin-treated HCC38 (Fig. 1c), assuming an increased activation in the course of cisplatin resistance development. Lapatinib and NVP-AEW541 did not influence downstream Akt phosphorylation (Fig. 2e) suggesting further mechanisms conserving Akt activation [Altomare & Testa, 2005]. It has been shown that dual inhibition of two kinases in IGF1R signaling pathway is superior to applying only single agents in the TNBC cell line MDA-MB-231 [Ayub *et al*, 2015]. Therefore, we chose the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 to address increased Akt activation in HCC38CisR. Synergy of NVP-BEZ235 has already been demonstrated for paclitaxel in colon cancer cells [Zou *et al*, 2016] and carboplatin in a triple negative breast cancer cell line [Montero *et al*, 2014]. Additionally, NVP-BEZ235 has already proven its ability to enhance cisplatin sensitivity in cisplatin resistant bladder cancer cell lines [Moon du *et al*, 2014].

6.1 Wachstumsfaktorrezeptoren

In our study, NVP-BEZ235 could fully restore cisplatin sensitivity in the cisplatin-resistant TNBC cell line HCC38CisR and acted synergistically with cisplatin (Fig. 3a/d, Table 2). Using KU0063794 and LY2940002, we could demonstrate that it was not sufficient to inhibit mTOR or PI3K alone, respectively, to obtain the NVP-BEZ235-induced effect on cisplatin sensitivity (Fig. 3b). Combining KU0063794 and LY294002 and thereby mimicking the dual inhibition of NVP-BEZ235 increased the effect of each compound alone on cisplatin sensitivity (Fig. 3b). Nevertheless, NVP-BEZ235 was slightly more effective than the combination of KU0063794 and LY294002. Other studies have shown that mTOR inhibition might result in only transient decrease or even increase of phospho-Akt (p-Akt) caused by feedback activation [Montero *et al*, 2014], [Rodrik-Outmezguine *et al*, 2011]. Thus, these and our results allow the conclusion that the combination of PI3K and mTOR inhibition is preferred over mTOR inhibition alone for cisplatin sensitization. Lastly, synergy between NVP-BEZ235 and cisplatin was not observed in HCC38 even though Akt showed some activation, however lower than in HCC38CisR. This indicates that NVP-BEZ235 enhances cisplatin sensitivity if – next to Akt activation – upstream RTKs such as EGFR and IGF1R are activated. Activated RTKs plus activated Akt may thus serve as potential biomarkers for the use of NVP-BEZ235 in combination with cisplatin in TNBC. These results in HCC38CisR were corroborated by data obtained with MDA-MB231CisR (Table 3, Additional file 7).

Conclusions

Taken together, activation of EGFR and IGF1R and their downstream signaling pathway kinase Akt is associated with resistance induced by long-term treatment with cisplatin in the TNBC cell line HCC38 and in MDA-MB231. Based on these results, two approaches for treating cisplatin resistant cell lines are presented: 1) Simultaneous inhibition of EGFR and IGF1R by lapatinib and NVP-AEW541 is highly synergistic and results in the induction of apoptosis. Furthermore, co-treatment with lapatinib and NVP-AEW541 may increase cisplatin sensitivity as seen in MDA-MB231CisR. 2) Co-treatment of cisplatin-resistant TNBC cell lines with the PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 and cisplatin is synergistic, fully reversed acquired cisplatin resistance, and may thus constitute a targeted treatment option for cisplatin-resistant TNBC.

6 Ergebnisse

Abbreviations

Akt: Protein kinase B

CI: Combination index

C_{max}: Maximum serum concentration

EGFR: Human epidermal growth factor receptor

ER: Estrogen receptor

ErbB2: Human epidermal growth factor receptor 2

ErbB3: Human epidermal growth factor receptor 3

ErbB4: Human epidermal growth factor receptor 4

HRP: Horseradish peroxidase

IC₅₀: Half-maximum inhibitory concentration

IGF1: Insulin-like growth factor 1

IGF1R: Insulin-like growth factor 1 receptor

mTOR: mechanistic target of rapamycin

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

p-Akt: phospho-Akt

PARP: Poly ADP ribose polymerase

p-EGFR: phospho-EGFR

p-ErbB2: phospho-ErbB2

p-ErbB3: phospho-ErbB3

p-ErbB4: phospho-ErbB4

PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase

p-IGF1R: phospho-IGF1R

PR: Progesterone receptor

RTK: Receptor tyrosine kinase

TNBC: Triple negative breast cancer

Declarations

Acknowledgements

Not applicable.

Funding

This work was funded by grants from the Bundesministerium für Wirtschaft (BMWi) AiF/ZIM project KF2388801UL9 to MUK. The funding body did not interfere nor had any objections regarding the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files. In addition, raw datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

KG conceived the study, designed the experiments, collected and analyzed the data, interpreted the results and wrote the manuscript. AH made substantial contributions to the conception of the study, performed experiments, analyzed data, and was substantially involved in writing and revising the manuscript. LHE was involved in data acquisition and data analysis. MUK conceived the study, designed the experiments, analyzed the data, interpreted the results, wrote the manuscript and revision of the manuscript, and provided financial support. All authors read and approved the final manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative

6 Ergebnisse

Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Additional file 1

pIC₅₀ ± SEM

Figure 1B

	pIC ₅₀ (cisplatin)	IC ₅₀ (cisplatin)
HCC38	5.58 ± 0.02	2.7 µM
HCC38CisR	5.03 ± 0.02	9.4 µM

Figure 2 A

	pIC ₅₀ (lapatinib)	IC ₅₀ (lapatinib)	pIC ₅₀ (lapatinib) + 1.5 µM AEW541	IC ₅₀ (lapatinib) + 1.5 µM AEW541
HCC38	5.04 ± 0.11	9.2 µM	5.05 ± 0.13	9.0 µM
HCC38CisR	5.22 ± 0.01	6.0 µM	6.06 ± 0.06	0.88 µM

Figure 2 B

	pIC ₅₀ (AEW541)	IC ₅₀ (AEW541)	pIC ₅₀ (AEW541) + 2 µM lapatinib	IC ₅₀ (AEW541) + 2 µM lapatinib
HCC38	5.24 ± 0.04	5.7 µM	5.30 ± 0.06	5.0 µM
HCC38CisR	5.64 ± 0.03	2.3 µM	5.95 ± 0.03	1.1 µM

Figure 2 F

	pIC ₅₀ (cisplatin)	IC ₅₀ (cisplatin)
HCC38	5.59 ± 0.02	2.6 µM
HCC38CisR	5.10 ± 0.02	7.9 µM
HCC38CisR + 1 µM lapatinib	5.04 ± 0.02	9.1 µM
HCC38CisR + 1.5 µM AEW541	5.11 ± 0.02	7.8 µM
HCC38CisR + 1.5 µM AEW541 + 1 µM lapatinib	5.23 ± 0.04	5.9 µM

6.1 Wachstumsfaktorrezeptoren

Figure 3 A

	pIC ₅₀ (cisplatin)	IC ₅₀ (cisplatin)
HCC38	5.67 ± 0.02	2.1 µM
HCC38 + 20 nM BEZ235	5.51 ± 0.05	3.1 µM
HCC38CisR	5.10 ± 0.02	7.9 µM
HCC38CisR + 20 nM BEZ235	5.71 ± 0.07	2.0 µM

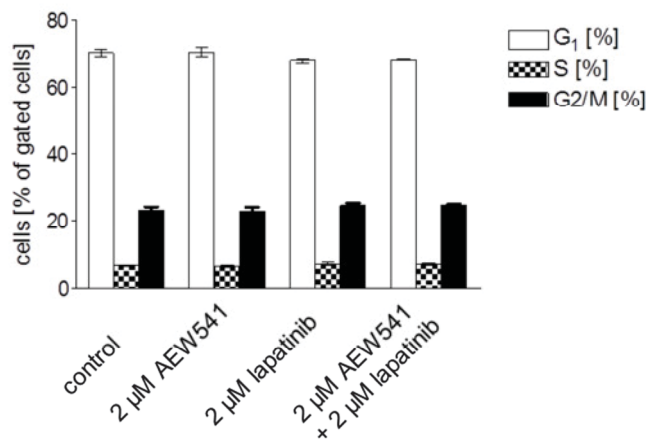
Figure 3 B

	pIC ₅₀ (cisplatin)	IC ₅₀ (cisplatin)
HCC38CisR	5.10 ± 0.02	7.9 µM
HCC38CisR + 5 µM LY294002	5.40 ± 0.02	4.0 µM
HCC38CisR + 1 µM KU00063794	5.45 ± 0.03	3.6 µM
HCC38CisR + 1 µM KU00063794 + 5 µM LY294002	5.53 ± 0.04	2.9 µM

Table 3

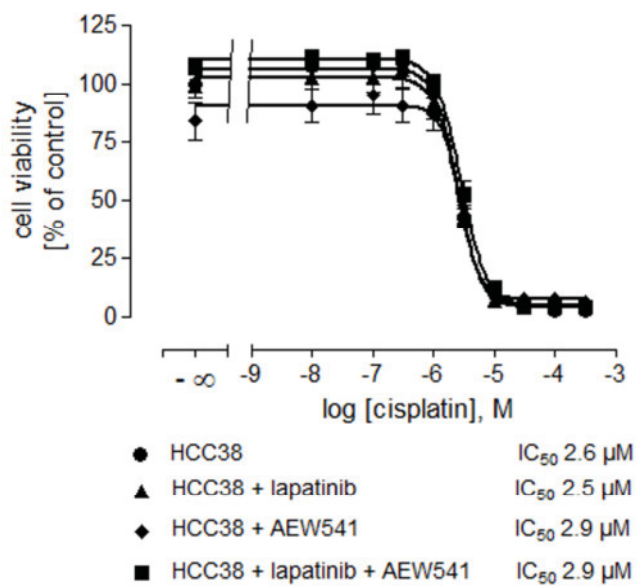
	MDA-MB231		MDA-MB231 CisR	
	pIC ₅₀ (cisplatin)	IC ₅₀ (cisplatin)	pIC ₅₀ (cisplatin)	IC ₅₀ (cisplatin)
cisplatin	4.68 ± 0.02	20.9 µM	4.37 ± 0.03	44.0 µM
+ AEW541 1.5 µM	4.64 ± 0.11	22.8 µM	4.63 ± 0.08	23.3 µM
+ BEZ235 20 nM	4.64 ± 0.09	22.8 µM	4.66 ± 0.10	21.8 µM
+ lapatinib 2 µM	4.62 ± 0.08	24.1 µM	4.61 ± 0.06	24.7 µM
+ 1.5 µM AEW541 + 2 µM lapatinib	5.00 ± 0.10	10.1 µM	5.04 ± 0.13	9.16 µM

Additional file 2



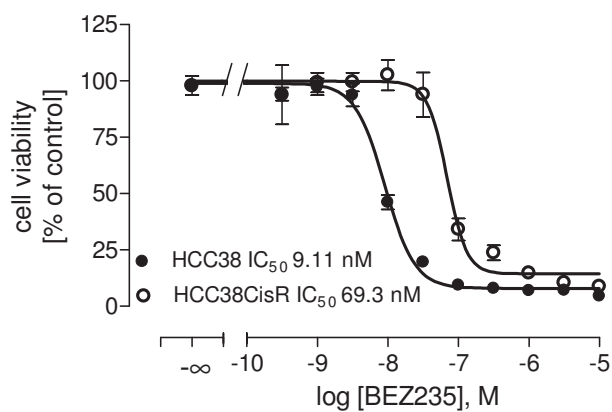
Cell cycle distribution in HCC38 after treatment with NVP-AEW541, lapatinib or both compounds.

Additional file 3



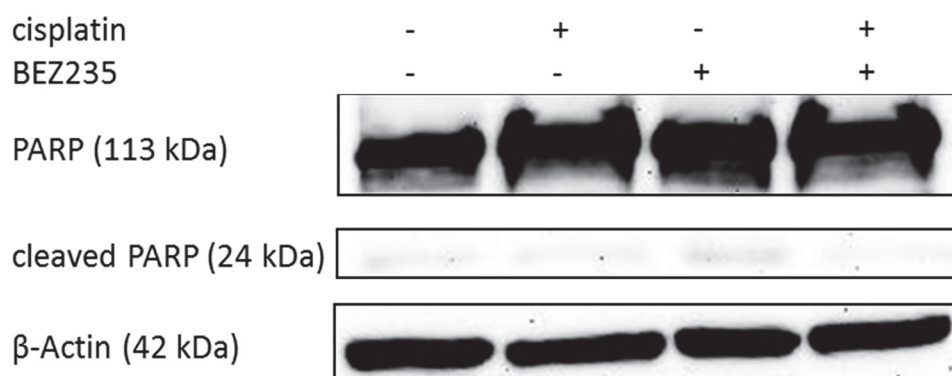
Influence of 48h preincubation with 1.5 μM NVP-AEW541, 1 μM lapatinib or a combination of both compounds on cisplatin sensitivity in HCC38.

Additional file 4



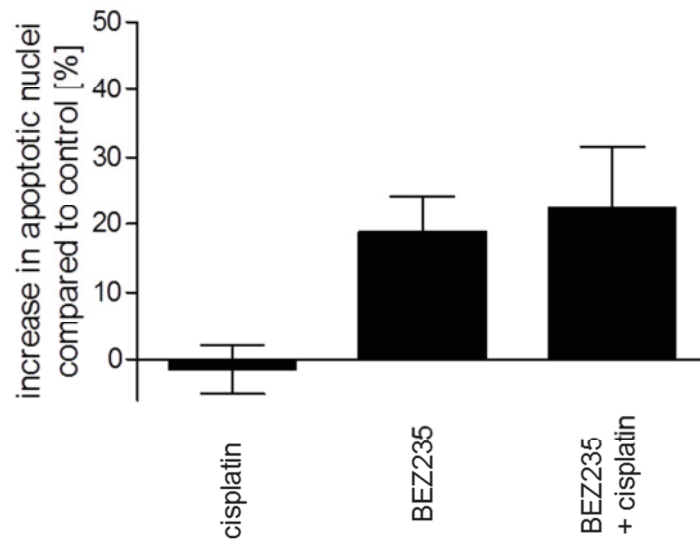
Effect of NVP-BEZ235 on cell viability determined by MTT assay.

Additional file 5



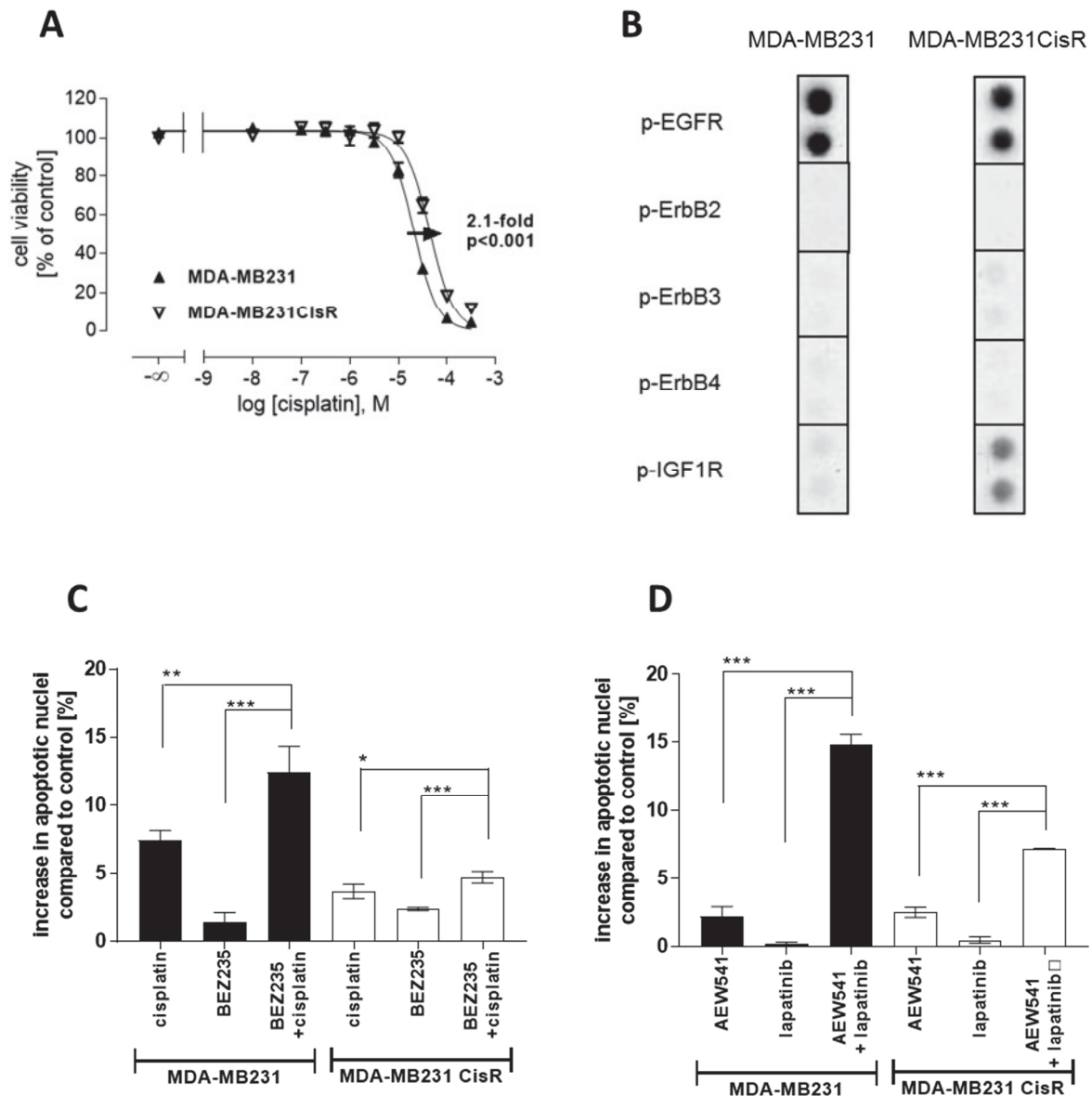
Western Blot on cleaved PARP after treatment of HCC38 with 20 nM NVP-BEZ235 or 2 μ M cisplatin or a combination of both compounds.

Additional file 6



Induction of apoptotic nuclei in HCC38 after treatment with 2 μ M cisplatin, 20 nM NVP-BEZ235 or a combination of both compounds.

Additional file 7



Characterization of MDA-MB231 and cisplatin-resistant MDA-MB231CisR. (A) Weekly exposure of MDA-MB231 with the IC_{50} of cisplatin for 6h resulted in the cisplatin resistant subclone MDA-MB231CisR with a resistance factor of 2.1 ($p < 0.001$). IC_{50} cisplatin MDA-MB-231: 20.9 μ M; IC_{50} cisplatin MDA-MB231CisR: 44.0 μ M. Shown are mean $\pm$ SEM, $n = 3$. (B) Detail of phospho-RTK-array displays phosphorylation status of EGFR-family and IGF1R in MDA-MB231 and MDA-MB231CisR. (C) Induction of apoptosis by NVP-BEZ235 and cisplatin. 20 nM NVP-BEZ235 was incubated 24h prior to addition of 20 μ M (MDA-MB231) or 50 μ M cisplatin (MDA-MB231CisR) for 6h followed by 24h of recovery. Combination of NVP-BEZ235 with cisplatin increased apoptotic nuclei compared to cisplatin alone or NVP-BEZ235 alone ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$). (D) In MDA-MB231 and MDA-MB231 CisR, the combination of NVP-AEW541 and lapatinib significantly induced apoptosis in a hyper-additive manner ($***p < 0.001$). NVP-AEW541 and lapatinib were used at 2 μ M. Cells were treated for 48h and the amount of apoptotic nuclei in the control was subtracted from treated samples ($***p < 0.001$).

6.2 HDAC-Inhibitoren

Ein weiterer Ansatz zur Beeinflussung der Cisplatinsensitivität von HCC38 und HCC38CisR bestand in dem Einsatz von HDACi.

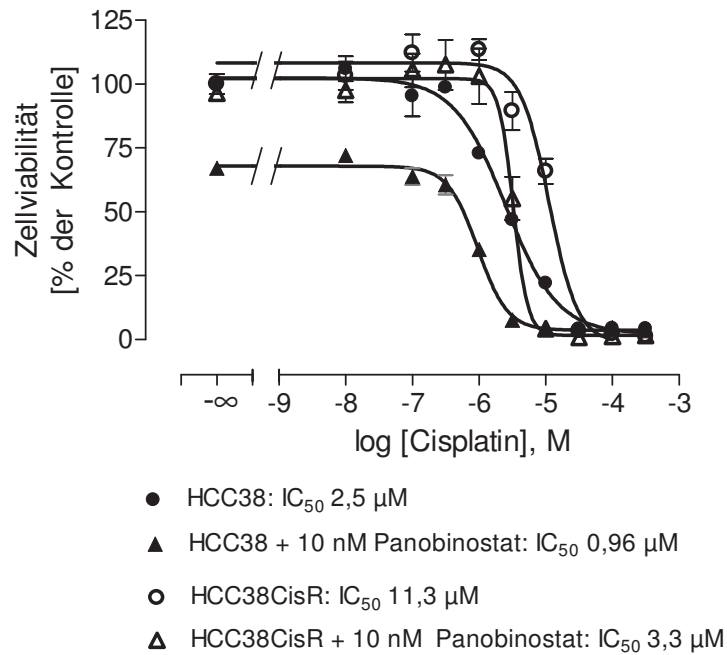
6.2.1 Panobinostat

Zunächst wurde der bereits zugelassene Wirkstoff Panobinostat (vgl. Abbildung 9) untersucht. Der Wirkstoff gehört zur Klasse der Hydroxamsäure-Derivate und inhibiert unselektiv, ebenso wie der ebenfalls untersuchte HDACi Vorinostat (vgl. Abbildung 9), die verschiedenen HDAC-Klassen. Er war, wie der zum Vergleich getestete HDACi Vorinostat, in der Lage, den IC_{50} für Cisplatin sowohl in der cisplatinsensitiven als auch in der cisplatinresistenten Zelllinie signifikant ($p < 0,001$) zu verringern (vgl. Abbildung 20). Dabei konnte der IC_{50} der Ursprungszelllinie HCC38 unter $1 \mu M$ abgesenkt werden. Der IC_{50} der cisplatinresistenten Zelllinie lag jedoch, trotz Sensitivierung für Cisplatin, leicht, aber signifikant, über dem Wert der Ursprungszelllinie ($3,3 \mu M$ für Panobinostat, $4,1 \mu M$ für Vorinostat).

Die Wirkung des HDAC-Inhibitors Panobinostat wurde ausführlicher untersucht. Dazu wurde zunächst ein Apoptose Assay durchgeführt, um die im MTT Assay beobachtete Sensitivierung für Cisplatin zu verifizieren. Dafür wurden die Zellen 24h mit dem HDAC-Inhibitor in der im MTT Assay verwendeten Konzentration (10 nM) alleine oder in der Kombination mit Cisplatin in einer Konzentration, die dem doppelten IC_{50} (HCC38: $5 \mu M$; HCC38CisR: $20 \mu M$) entspricht, behandelt. Während in der Zelllinie HCC38 10 nM Panobinostat $12,8 \pm 6,5\%$ und $5 \mu M$ Cisplatin $9,9 \pm 4,7\%$ apoptotische Zellkerne induzierten, wurde durch ihre Kombination der Anteil auf $39,4 \pm 4,3\%$ signifikant gesteigert. Der Effekt kann somit als hyperadditiv bezeichnet werden (vgl. Abbildung 21 A). QVD-OPh wurde als unspezifischer Caspaseinhibitor 2h vor den übrigen Substanzen zu den Zellen gegeben. Dies diente der Kontrolle, dass in diesem Assay tatsächlich Caspase-vermittelte Apoptose ausgelöst wurde. Die Inkubation mit QVD-OPh konnte die Induktion der Apoptose auf Kontrollniveau senken. Für die Zelllinie HCC38CisR wurde der hyperadditive Effekt der Kombination von Panobinostat und Cisplatin noch klarer. Unter der Kombinationsbehandlung waren deutlich mehr apoptotische Zellkerne ($38,7 \pm 2,2\%$) zu beobachten, als mit Panobinostat ($2,45 \pm 2,9\%$) oder Cisplatin ($11,3 \pm 3,0\%$) alleine. Analog zur Zelllinie HCC38 konnte der Caspaseinhibitor QVD-OPh den Anteil apoptotischer Zellkerne auf Kontrollniveau reduzieren (vgl. Abbildung

21 B). Um die Interaktion zwischen Cisplatin und dem HDACi Panobinostat weiter zu charakterisieren, wurden Synergismus Studien an der Zelllinie HCC38 durchgeführt. Die Analyse nach der Chou-Talalay Methode wies auf einen Synergismus zwischen den beiden Substanzen hin, da $CI_s < 0,9$ berechnet wurden (vgl. Tabelle 11). Zur weiteren Charakterisierung von Panobinostat wurde dessen Einfluss auf den Zellzyklus in der in den vorherigen Assays verwendeten Konzentration (10 nM) untersucht. Dabei wurden Inkubationszeiten von 6h bis 72h abgedeckt. Sowohl in der Zelllinie HCC38 (vgl. Abbildung 22 A) als auch in der Zelllinie HCC38CisR (vgl. Abbildung 22 B) konnte kein signifikanter Effekt auf die Zellzyklusverteilung ermittelt werden.

A



B

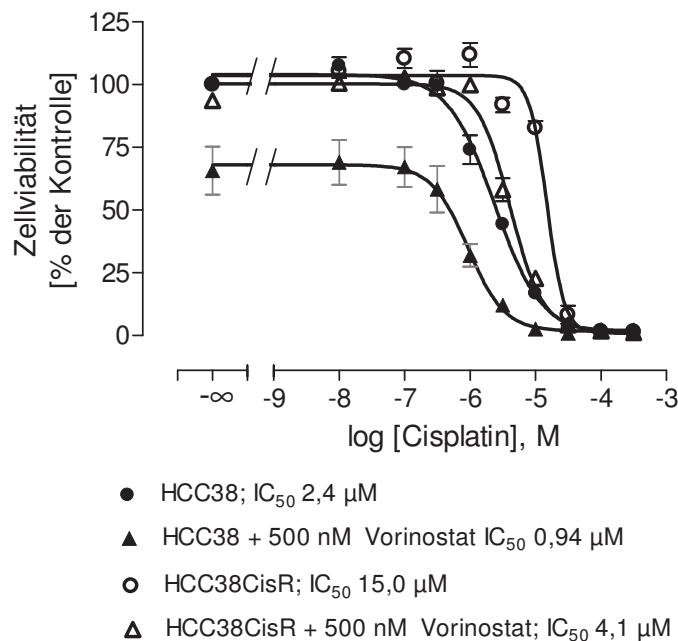
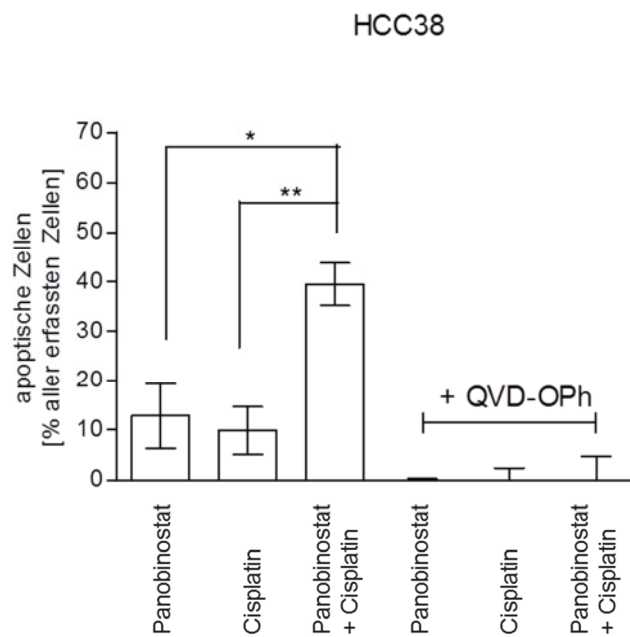


Abbildung 20 Einfluss von Panobinostat bzw. Vorinostat auf die Cisplatinsensitivität von HCC38 und HCC38CisR. 48h vor der Zugabe von Cisplatin für 72h wurden die Zelllinien mit 10 nM Panobinostat **(A)** bzw. 500 nM Vorinostat **(B)** präinkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM einer Dreifachbestimmung dar.

A



B

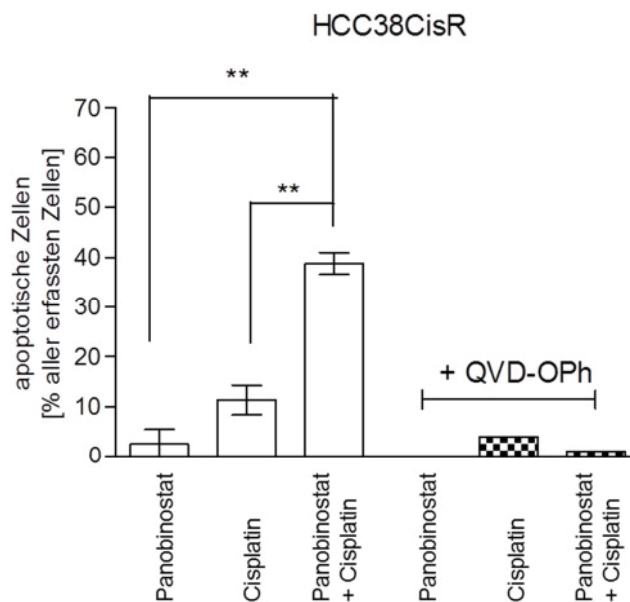


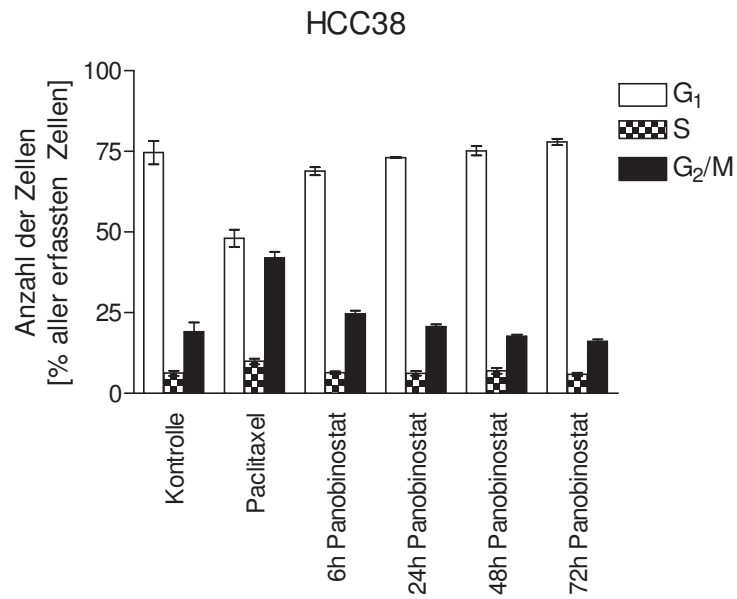
Abbildung 21 Induktion von Apoptose durch die Kombination von Panobinostat und Cisplatin in HCC38 und HCC38CisR. 20 μ M QVD-OPh wurde 2h vor der 24-stündigen Inkubationszeit der anderen Testsubstanzen zu den Zellen gegeben. Zur Auswertung wurde der Anteil apoptotischer Zellkerne an allen erfassten Zellkernen herangezogen. Von allen Datenpunkten wurde der Mittelwert der Kontrollen im jeweiligen Experiment subtrahiert. HCC38 **(A)** und HCC38CisR **(B)** wurden mit 10 nM Panobinostat, 5 μ M Cisplatin (HCC38), 20 μ M Cisplatin (HCC38CisR) oder einer Kombination von Cisplatin und Panobinostat behandelt. *p < 0,05; **p 0,01. Daten zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten (für die Präinkubation mit QVD-OPh nur 1-2 Experimente).

Tabelle 11 Synergismus Studien an der Zelllinie HCC38 zwischen Panobinostat und Cisplatin

Cisplatin [μ M]	Panobinostat [nM]				
	2,5	5	10	15	20
0,1	*	*	1,10	1,16	0,98
0,5	*	*	0,89	0,76	0,76
1	*	*	0,47	0,41	0,35
1,5	1,08	0,37	0,23	0,30	0,21
2	0,39	0,19	0,12	0,20	0,19

HCC38 wurde gleichzeitig mit verschiedenen Kombinationen von Panobinostat und Cisplatin behandelt. Die CIs (combination indices) wurden mit Hilfe des Programms CalcuSyn 2.1 basierend auf der Chou-Talaly Methode berechnet. $CI > 1$ weist auf einen Antagonismus, $CI = 1$ auf einen additive Effekt und $CI < 0.9$ auf eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen hin. * heißt, dass die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle weniger als 20% vermindert war. Die Werte entsprechen dem Mittelwert von 2 unabhängigen Experimenten, die je in Triplikaten durchgeführt wurden.

A



B

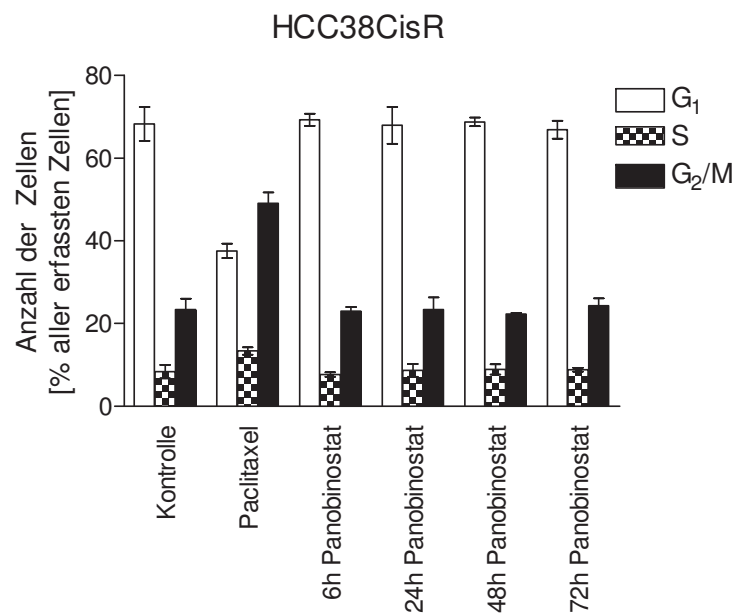


Abbildung 22 Zellzyklusverteilung in HCC38 und HCC38CisR nach Behandlung mit Panobinostat. HCC38 (**A**) und HCC38CisR (**B**) wurden mit 10 nM Panobinostat für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Die Behandlung mit 50 nM Paclitaxel für 10h diente als Kontrolle eines G₂/M-Arrests. Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

6.2.2 LMK235

Basierend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen bezüglich der Sensitivierung für die Behandlung mit Cisplatin durch HDACi, wurde ein weiterer HDACi in die Untersuchungen eingeschlossen. Für LMK235 (vgl. Abbildung 10), das am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie im Arbeitskreis von Prof. Kurz von Linda Marek synthetisiert wurde, konnte bereits ein positiver Effekt bezüglich der Erhöhung der Cisplatinsensitivität für eine Reihe von Zelllinien demonstriert werden [Marek *et al*, 2013]. Die Substanz gehört ebenso wie Panobinostat zu den Hydroxamsäurederivaten. Das ursprünglich als Klasse IIA-spezifischer HDAC-Inhibitor charakterisierte LMK235 konnte dank neuerer Methoden mittlerweile als HDAC-Inhibitor mit deutlicher Präferenz für die Inhibition von HDACs der Klasse I und IIB klassifiziert werden [Kaletsch *et al*, 2018].

Tabelle 12 Aktivitätsprofile (IC₅₀ [μM] der HDACi an den einzelnen HDAC-Isoformen)

HDACi	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5	HDAC6	HDAC7	HDAC8	HDAC9	HDAC10	HDAC11
LMK235	0.315	0.402	0.236	> 100	45.6	0.032	131	2.84	198	0.491	109
TSA	0.020	0.048	0.032	n.d.	n.d.	0.006	n.d.	0.423	n.d.	0.073	5.30
TMP269	n.d.	n.d.	n.d.	0.282	0.101	n.d.	0.101	n.d.	0.032	n.d.	n.d.

n.d. nicht durchgeführt

Die Aktivitätsprofile wurden von der Reaction Biology Corp. (Malvern, PA) mit fluoreszenzbasierten Assays bestimmt. TMP269 diente als Kontrolle für einen Klasse IIA-spezifischen HDACi, TSA (Trichostatin A) als Kontrolle für alle anderen HDAC-Isoformen (entnommen aus: [Kaletsch *et al*, 2018]).

An der Zelllinie HCC38 und dessen cisplatinresistentem Subklon HCC38CisR war LMK235 in der Konzentration von 500 nM in der Lage, den IC₅₀ für Cisplatin deutlich zu reduzieren (vgl. Abbildung 23). Analog zu den vorherigen Experimenten wurde der HDACi dafür 48h vor der Behandlung mit Cisplatin zu den Zellen gegeben. An beiden Zelllinien wurde eine signifikante ($p < 0,001$) Verminderung des IC₅₀ für Cisplatin nach Präinkubation mit LMK235 beobachtet. Im Gegensatz zu Panobinostat konnte durch LMK235 der IC₅₀ für Cisplatin von HCC38CisR auf 1,6 μM ($pIC_{50} = 5,81 \pm 0,03$) und somit in den Bereich der Ursprungszelllinie gesenkt werden. Auch der IC₅₀ für Cisplatin der Zelllinie HCC38 war stärker reduziert als dies nach der Behandlung mit Panobinostat der Fall war (0,39 μM, $pIC_{50} = 6,40 \pm 0,04$ vs. 0,96 μM, $pIC_{50} = 6,02 \pm 0,03$ nach Panobinostat). In beiden Zelllinien war der IC₅₀ nach Behandlung mit LMK235 signifikant ($p < 0,001$) niedriger als nach Behandlung mit Panobinostat.

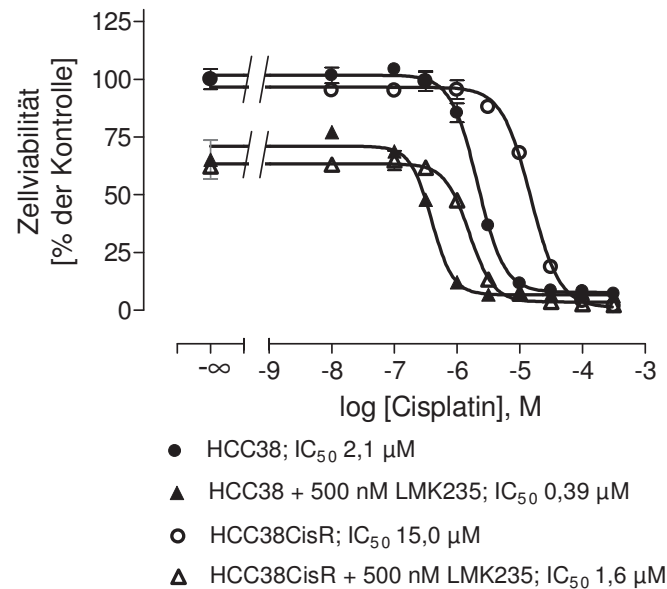
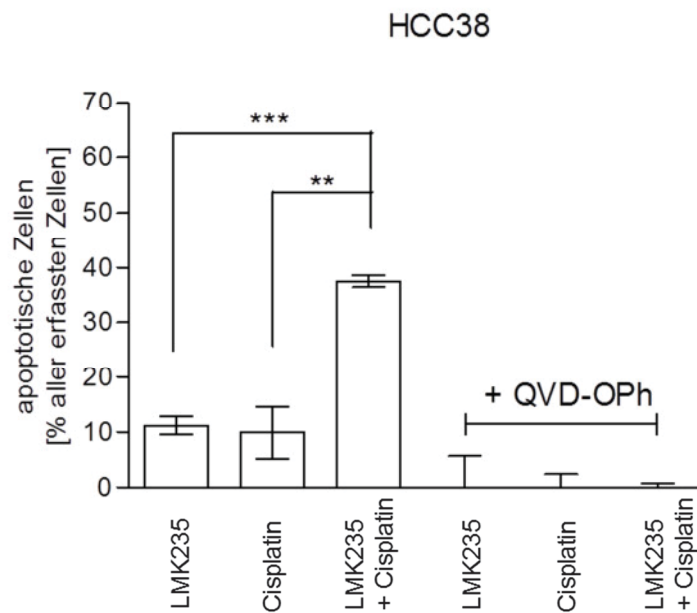


Abbildung 23 Einfluss von LMK235 auf die Cisplatinempfindlichkeit von HCC38 und HCC38CisR. 500 nM LMK235 wurden 48h vor Zugabe von Cisplatin für 72h zu den Zellen gegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM einer Dreifachbestimmung dar.

Die im MTT Assay gezeigten Effekte wurden, wie bereits für Panobinostat, im Apoptose Assay bestätigt. Dafür wurden die Zelllinien HCC38 und HCC38CisR für 24h mit 500 nM LMK235 und Cisplatin in einer dem doppelten IC₅₀ entsprechenden Konzentration behandelt. In der Zelllinie HCC38 konnte die Kombination aus LMK235 und Cisplatin $37,5 \pm 1,1\%$ apoptotische Zellkerne induzieren. Dies war signifikant mehr als der Effekt von LMK235 ($11,2 \pm 1,6\%$) oder Cisplatin allein ($9,9 \pm 4,7\%$; vgl. Abbildung 24 A). Ebenso konnte in der Zelllinie HCC38CisR ein signifikanter Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellkernen beobachtet werden, wenn LMK235 ($0,2 \pm 2,1\%$) oder Cisplatin ($8,9 \pm 3,0\%$) nicht allein sondern in Kombination ($45,4 \pm 10,4\%$) eingesetzt wurden (vgl. Abbildung 24 B). Für beide Zelllinien zeigte sich somit ein hyperadditiver Effekt der Kombination von LMK235 und Cisplatin bezüglich der Induktion apoptotischer Zellkerne. Bei beiden Zelllinien konnte eine 2-stündige Präinkubation mit dem Caspaseinhibitor QVD-OPh den Anteil der apoptotischen Zellkerne fast auf Kontrollniveau absenken. Der Synergismus zwischen LMK235 und Cisplatin, auf den die vorherigen Experimente hinwiesen, wurde durch die Analyse der CIs bestätigt. Da CIs $< 0,9$ berechnet wurden, konnte, ebenso wie für Panobinostat, von einem Synergismus zwischen den beiden Substanzen an der Zelllinie HCC38 ausgegangen werden (vgl. Tabelle 13). Zusätzlich wurde der Einfluss von 500 nM LMK235 auf die Zellzyklusverteilung in HCC38

und HCC38CisR untersucht. Dazu wurden die Zellen nach Inkubationszeiten von 6h bis 72h fixiert und anschließend im Durchflusszytometer vermessen. In diesem Assay zeigten sich unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelllinien HCC38 und HCC38CisR, obwohl in beiden Fällen nur geringfügige Änderungen erkennbar waren. In der Zelllinie HCC38 war der Anteil der Zellen in der G₁-Phase nach 24-stündiger Inkubation mit 500 nM LMK235 signifikant reduziert (von $75,1 \pm 0,98\%$ auf $64,5 \pm 1,8\%$), während der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase erhöht war (von $18,8 \pm 0,54\%$ auf $27,7 \pm 2,1\%$). Dieser Effekt konnte nach 48h nicht mehr beobachtet werden und nach 72h war lediglich eine Tendenz in diese Richtung erkennbar (vgl. Abbildung 25 A). Im Gegensatz dazu konnte in der Zelllinie HCC38CisR nach 24-stündiger Inkubation mit LMK235 eine signifikante Erhöhung des Anteils der Zellen in der G₁-Phase (von $67,4 \pm 3,6\%$ auf $81,3 \pm 2,2\%$), die von einer Erniedrigung des Anteils der Zellen in der S-Phase ($7,5 \pm 1,1\%$ vs. $3,5 \pm 0,17\%$) und der G₂/M-Phase (von $25,1 \pm 4,1\%$ auf $15,2 \pm 2,3\%$) begleitet war, beobachtet werden (vgl. Abbildung 25 B). Dieser Effekt war nur für die G₁- und die S-Phase signifikant und zu den anderen Zeitpunkten nicht mehr sichtbar.

A



B

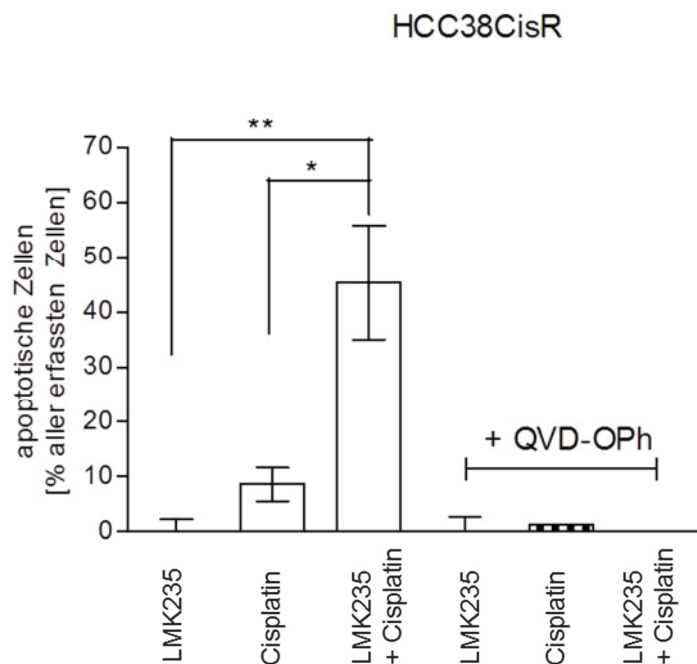


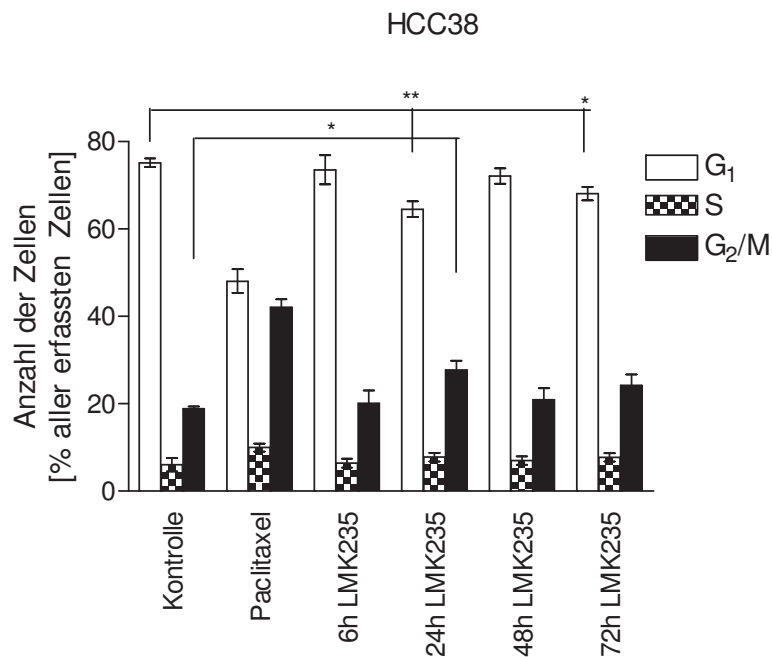
Abbildung 24 Induktion von Apoptose durch die Kombination von LMK235 und Cisplatin in HCC38 und HCC38CisR. 20 μ M QVD-OPh wurde 2h vor der 24-stündigen Inkubationszeit der anderen Testsubstanzen zu den Zellen gegeben. Zur Auswertung wurde der Anteil apoptotischer Zellkerne an allen erfassten Zellkernen herangezogen. Von allen Datenpunkten wurde der Mittelwert der Kontrollen im jeweiligen Experiment subtrahiert. HCC38 **(A)** und HCC38CisR **(B)** wurden mit 500 nM LMK235, 5 μ M Cisplatin (HCC38), 20 μ M Cisplatin (HCC38CisR) oder einer Kombination von Cisplatin und LMK235 behandelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten (für die Präinkubation mit QVD-OPh nur 1-2 Experimente).

Tabelle 13 Synergismus Studien an der Zelllinie HCC38 zwischen LMK235 und Cisplatin

Cisplatin [μM]	LMK235 [nM]				
	200	300	400	500	600
0,1	*	*	*	0,73	0,68
0,5	*	0,98	1,02	0,46	0,50
1	0,69	0,60	0,72	0,26	0,31
1,5	0,40	0,36	0,33	0,21	0,26
2	0,24	0,26	0,25	0,17	0,21

HCC38 wurde mit verschiedenen Kombinationen von LMK235 und Cisplatin behandelt. Die CIs (combination indices) wurden mit Hilfe des Programms CalcuSyn 2.1 basierend auf der Chou-Talaly Methode berechnet. $CI > 1$ weist auf einen Antagonismus, $CI = 1$ auf einen additive Effekt und $CI < 0.9$ auf eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen hin. * heißt, dass die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle weniger als 20% vermindert war. Die Werte entsprechen dem Mittelwert von 2 unabhängigen Experimenten, die je in Triplikaten durchgeführt wurden.

A



B

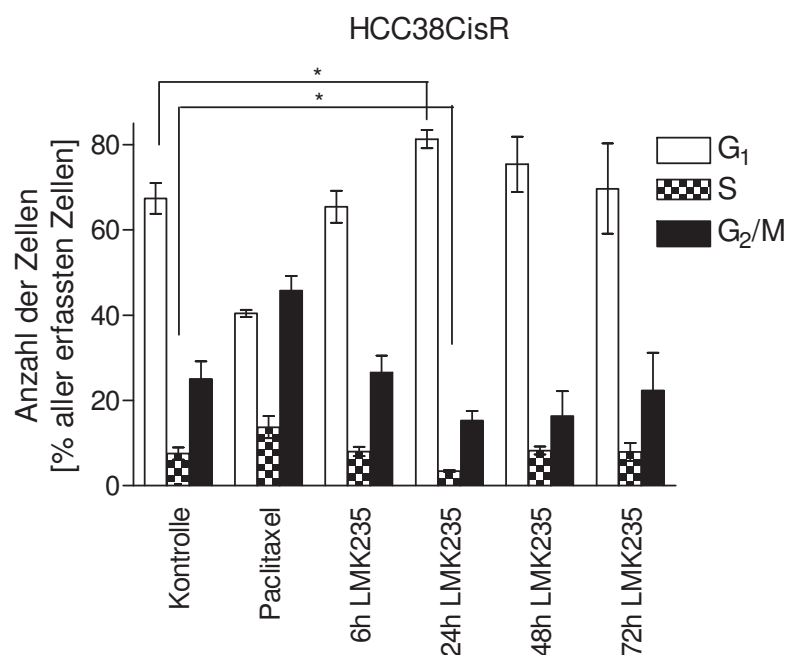
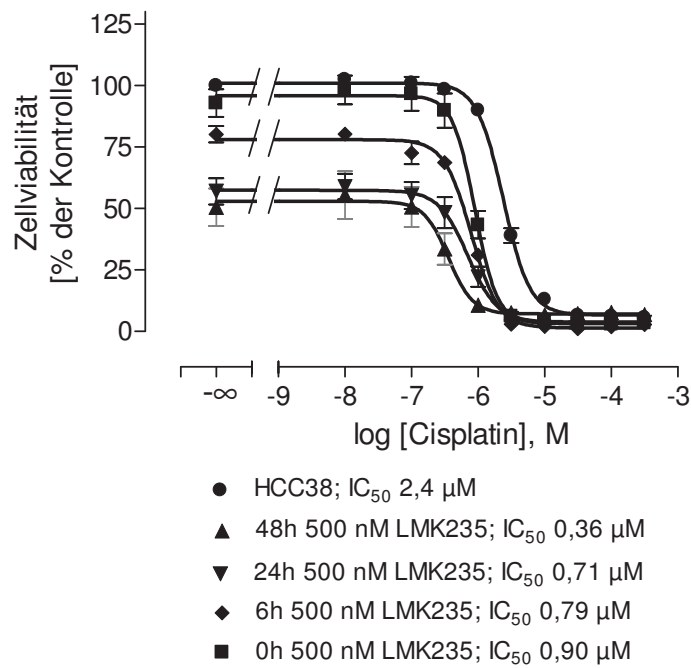


Abbildung 25 Zellzyklusverteilung in HCC38 und HCC38CisR nach Behandlung mit LMK235. HCC38 (A) und HCC38CisR (B) wurden mit 500 nM LMK235 für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Die Behandlung mit 50 nM Paclitaxel für 10h diente als Kontrolle eines G₂/M-Arrests. In der Zelllinie HCC38 war nach 24h eine signifikante (**p < 0,01) Abnahme von Zellen in der G₁-Phase bei gleichzeitigem Anstieg des Anteils von Zellen in der G₂/M-Phase (*p < 0,05) zu beobachten. In der Zelllinie HCC38CisR trat nach 24h ein signifikanter (*p < 0,05) Anstieg an Zellen in der G₁-Phase auf, wobei der Anteil an Zellen in der G₂/M- und S-Phase abnahm (dieser Effekt war nur für die S-Phase signifikant; *p < 0,05). Daten zeigen den Mittelwert ± SEM von 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Um die Auswirkung von LMK235 auf die Erhöhung der Cisplatinsensitivität der Zelllinien HCC38 und HCC38CisR weiter zu charakterisieren, wurde die Zeitabhängigkeit dieses Effekts untersucht. Dafür wurden 500 nM LMK235, die maximal tolerierbare Konzentration für eine 48-stündige Präinkubation, 48h, 24h, 6h oder 0h vor Cisplatin zu den Zellen gegeben. Der resultierende IC_{50} für Cisplatin war signifikant ($p < 0,001$) niedriger, wenn die Zellen für 48h mit dem HDACi präinkubiert wurden, als bei einer reinen Koinkubation (0h) (vgl. Abbildung 26). Dies galt sowohl für HCC38 (48h: $0,36 \mu M$, $pIC_{50} = 6,40 \pm 0,04$; 0h: $0,9 \mu M$, $pIC_{50} = 6,05 \pm 0,03$) als auch für HCC38CisR (48h: $1,6 \mu M$, $pIC_{50} = 5,80 \pm 0,03$; 0h: $2,8 \mu M$, $pIC_{50} = 5,55 \pm 0,04$). Da dieser Versuch für den Vorteil einer Präinkubation sprach, wurde aufbauend darauf die Konzentrationsabhängigkeit des Effekts einer 48-stündigen Präinkubation mit LMK235 auf die Erhöhung der Cisplatinsensitivität untersucht. Dafür wurde die ursprünglich verwendete Konzentration von 500 nM LMK235 schrittweise auf 100 nM reduziert. Jede der Konzentrationen, außer 100 nM LMK235 an der Zelllinie HCC38, war in der Lage den IC_{50} für Cisplatin sowohl an der Zelllinie HCC38 als auch an der Zelllinie HCC38CisR signifikant ($p < 0,05$) zu reduzieren (vgl. Abbildung 27). Nichtsdestotrotz war LMK235 erst ab einer Konzentration von 300 nM in der Lage, den IC_{50} für Cisplatin an der Zelllinie HCC38 unter die Grenze von $1 \mu M$ abzusenken ($IC_{50} = 0,50 \mu M$; $pIC_{50} = 6,30 \pm 0,05$; vgl. Abbildung 27 A). Analog war LMK235 auch erst ab dieser Konzentration in der Lage, den IC_{50} für Cisplatin an der Zelllinie HCC38CisR in den Bereich der Ursprungszelllinie zu reduzieren ($IC_{50} = 2,6 \mu M$; $pIC_{50} = 5,59 \pm 0,07$; vgl. Abbildung 27 B). Trägt man den resultierenden IC_{50} für Cisplatin gegen die verwendete Konzentration von LMK235 auf, deutet sich ein exponentieller Verlauf der Kurve an (vgl. Abbildung 27 C/D).

A



B

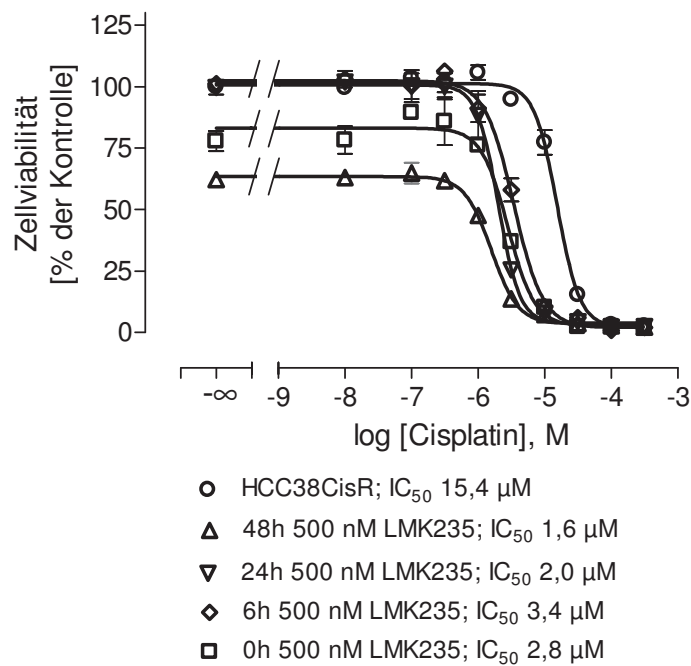


Abbildung 26 Zeitabhängigkeit des Effekts LMK235 auf die Cisplatinsensitivität von HCC38 und HCC38CisR. Die Zelllinie HCC38 (**A**) und HCC38CisR (**B**) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor der 72-stündigen Behandlung mit Cisplatin mit 500 nM LMK235 inkubiert. Dabei war die Gesamtinkubationszeit der Zellen immer gleich. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Datenpunkt stellen Mittelwerte $\pm$ SEM einer Dreifachbestimmung dar.

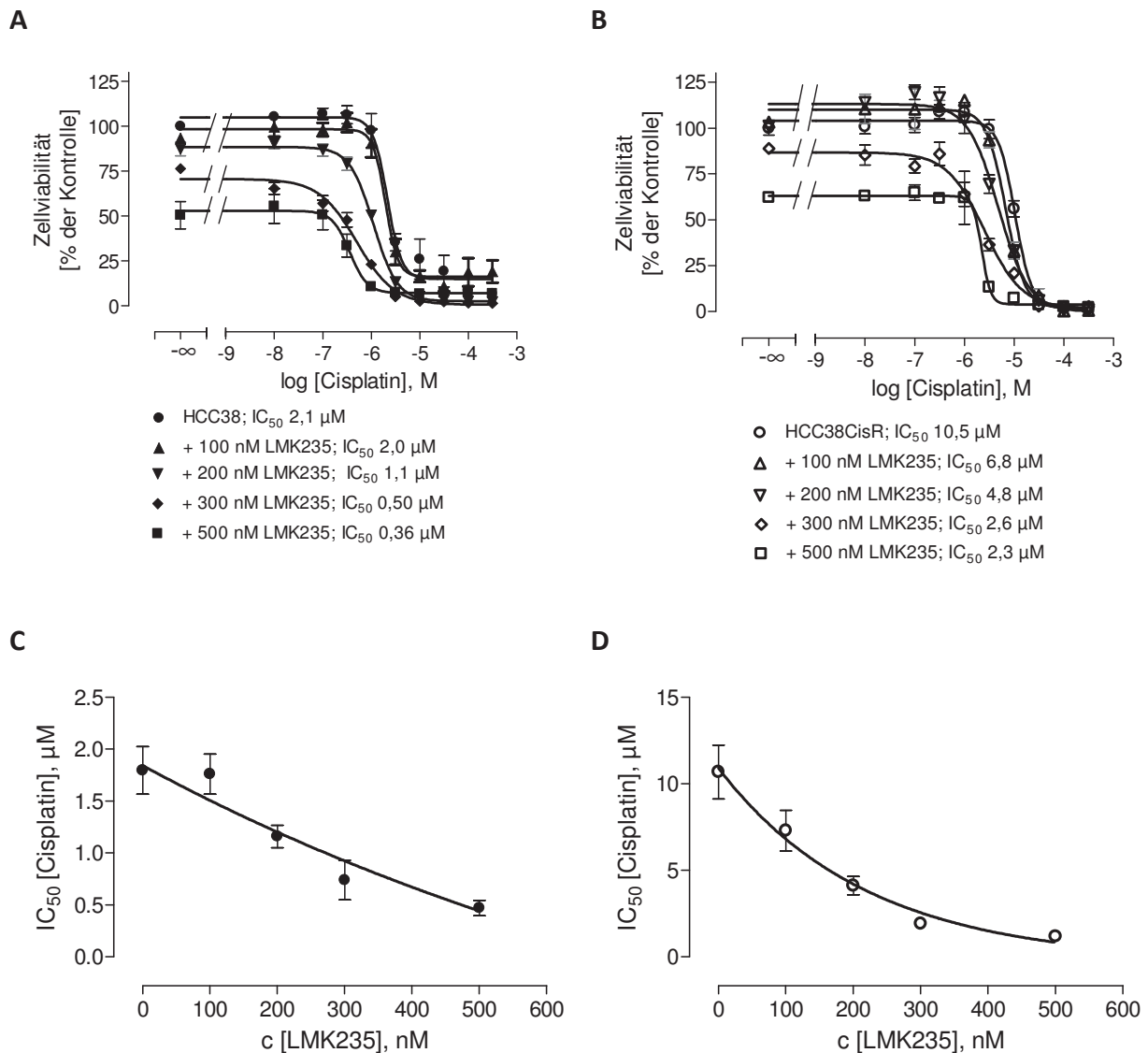


Abbildung 27 Konzentrationsabhängigkeit des Effekts der 48-stündigen Präinkubation mit LMK235 auf die Cisplatinempfindlichkeit von HCC38 und HCC38CisR. Die Zelllinien HCC38 (**A**) und der Zelllinie HCC38CisR (**B**) wurden mit Konzentrationen von 100 nM bis 500 nM 48h vor Cisplatin präinkubiert. Zur Veranschaulichung wurden die resultierenden IC_{50} der Zelllinie HCC38 (**C**) und HCC38CisR (**D**) gegen die verwendete Konzentration von LMK235 aufgetragen. A/B zeigen ein repräsentatives Experiment von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten; Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM einer Dreifachbestimmung dar. C/D zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Der Einfluss der HDAC Inhibitoren auf die Genexpression der Zelllinien HCC38 und HCC38CisR wurde durch Microarray Daten analysiert. Die Auswertung mittels DAVID [Huang *et al*, 2009a; Huang *et al*, 2009b] lenkte die Aufmerksamkeit auf die Beeinflussung des ErbB-Signalwegs in der Zelllinie HCC38CisR. Zum einen sind Mitglieder dieses Signalwegs, die in HCC38CisR verglichen mit der Ursprungszelllinie HCC38 mindestens zweifach überexprimiert

sind, überrepräsentiert (EASE Score: 0,048). Zum anderen konnte bei der Betrachtung der Gene, die nach 48-stündiger Inkubation mit 500 nM LMK235 oder mit 10 nM Panobinostat in der Zelllinie HCC38CisR mindestens 2-fach weniger exprimiert wurden, ebenfalls eine Anreicherung von Genen dieses Signalwegs festgestellt werden (vgl. Tabelle 14). Obwohl die in Tabelle 14 gelisteten, mindestens 2-fach regulierten Gene, nicht in allen Fällen die gleichen waren, wurde der Einfluss von LMK235 auf diesen Signalweg in der Zelllinie HCC38CisR weiter untersucht.

Es wurde untersucht, ob die Hinzunahme der beiden Inhibitoren NVP-AEW541 oder Lapatinib als weitere negative Regulation des ErbB-Signalwegs dazu führte, dass der IC_{50} für Cisplatin der Zelllinie HCC38CisR noch weiter erniedrigt werden konnte, als durch LMK235 allein. Wie Abbildung 28 zeigt, wurde die Zytotoxizität von LMK235 durch die Hinzunahme des zweiten Inhibitors erhöht. Dies führte jedoch nicht zu einer Steigerung des Effekts auf die Cisplatinsensitivität. Für NVP-BEZ235 wurde bereits gezeigt, dass die Substanz in der Lage ist, die Cisplatinsensitivität an HCC38CisR zu erhöhen (vgl. Fig 3a). Da sie zudem als PI3K- und mTOR-Inhibitor mit den den RTKs nachgeschalteten Signalwegen interferiert, lag eine Kombination mit LMK235 nahe. Um die Zytotoxizität der beiden Inhibitoren allein in akzeptablem Rahmen zu halten, musste die Konzentration von LMK235 auf 300 nM reduziert werden. Nichtsdestotrotz erniedrigte die Kombination von 20 nM NVP-BEZ235 und 300 nM LMK235 die Zellviabilität innerhalb von 120h signifikant mehr ($40,2 \pm 4,2\%$) als 20 nM NVP-BEZ235 ($86,2 \pm 7,8\%$) oder 300 nM LMK235 ($87,4 \pm 2,9\%$, vgl. Abbildung 29 B). Die Kombination aus 300 nM LMK235 und 20 nM NVP-BEZ235 konnte den IC_{50} für Cisplatin von HCC38CisR auf $0,89 \mu M$ ($pIC_{50} = 6,05 \pm 0,11$) senken. Verglichen mit dem Effekt von LMK235 allein, ist dieser Wert signifikant ($p < 0,05$) niedriger (vgl. Abbildung 29 A). Die im MTT Assay beobachtete Sensitivierung für Cisplatin konnte im Apoptose Assay bestätigt werden (vgl. Abbildung 30). Dafür wurden die Substanzen in den im MTT Assay verwendeten Konzentration (300 nM LMK235 bzw. 20 nM NVP-BEZ235) und Cisplatin in einer Konzentration, die dem doppelten IC_{50} entsprach, für 24h an der Zelllinie HCC38CisR inkubiert. Die Kombination von LMK235 und NVP-BEZ235 induzierte $8,3 \pm 2,9\%$ apoptotische Zellkerne. Dies war nicht signifikant mehr als der Effekt der einzelnen Substanzen. Während Cisplatin allein $21,7 \pm 1,6\%$ apoptotische Zellkerne induzierte, wurde durch die Kombination aller drei Substanzen der Anteil signifikant auf $60,5 \pm 2,8\%$ gesteigert. Dies war ebenfalls

6 Ergebnisse

signifikant mehr als der Anteil an apoptotischen Zellkernen, der durch die Kombination von NVP-BEZ235 und Cisplatin induziert wurde ($28,6 \pm 1,5\%$).

6.2 HDAC-Inhibitoren

Tabelle 14 Ergebnisse der DAVID Analyse der Überrepräsentation des ErbB-Signalwegs:

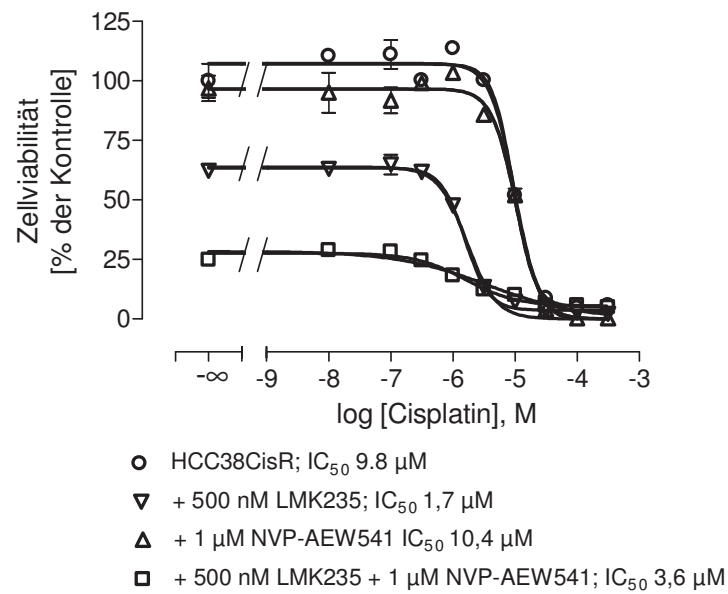
	modifizierter Fisher Exact P-Value, EASE Score	mindestens zweifach regulierte Gene, die Mitglieder des ErbB-Signalwegs sind		
		RefSeq	Gen- symbol	Gen-Name
Über- expression in HCC38CisR verglichen mit HCC38 (insgesamt 0,9% involvierte Gene)	0,048	NM_170662	CBLB	Cbl proto-oncogene B
		NM_003029	SHC1	SHC adaptor protein 1
		NM_183001		
		NM_001657	AREG	amphiregulin
		NM_001221	CAMK2D	calcium/calmodulin dependent protein kinase II delta
		NM_201283, NM_005228	EGFR	epidermal growth facor receptor
		NM_001432	EREG	epireulin
		NM_002093	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta
		NM_001945	HBEGF	heparin binding EGF like growth factor
		NM_002228	JUN	Jun proto-oncogene
		NM_002755	MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1
		NM_003010	MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4
		NM_013982	NRG2	neuregulin 2
		NM_138573	NRG4	neuregulin 4
		NM_00112862 0	RAC1	
verminderte Expression in HCC38CisR nach 48h 500 nM LMK235 (insgesamt 1,1% involvierte Gene)	0,038	NM_003236	TGFA	transforming growth factor alpha
		NM_001626	AKT2	AKT serine/threonine kinase 2
		NM_005188	CBL	Cbl proto-oncogene
		NM_003581	NCK2	NCK adaptor protein 2
		NM_003029	SHC1	SHC adaptor protein 1
		NM_001657	AREG	amphiregulin
		NM_078467	CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A
		NM_013982	NRG2	neuregulin 2
		NM_005026	PIK3CD	phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta

6 Ergebnisse

verminderte Expression in HCC38CisR nach 48h 10 nM Panobinostat (insgesamt 0,9% involvierte Gene)	0,014	NM_002660	PLCG1	phospholipase C gamma 1
		NM_002661	PLCG2	phospholipase C gamma
		NM_004985	KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase
		NM_170662	CBLB	Cbl proto-oncogene B
		NM_012116	CBLC	Cbl proto-oncogene C
		NM_203349	SHC4	SHC adaptor protein 4
		NM_003029	SHC1	SHC adaptor protein 1
		NM_001657	AREG	amphiregulin
		NM_001729	BTC	betacellulin
		NM_001221	CAMK2D	calcium/calmodulin dependent protein kinase II delta
		NM_078467	CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A
		NM_201283, NM_005228	EGFR	epidermal growth factor receptor
		NM_001432	EREG	epiregulin
		NM_001945	HBEGF	heparin binding EGF like growth factor
		NM_002228	JUN	Jun proto-oncogene
		NM_002755	MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1
		NM_003010	MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4
		NM_013982	NRG2	neuregulin 2
		NM_020168	PAK6	p21 (RAC1) activated kinase 6
		NM_003629	PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3
		NM_002737	PRKCA	protein kinase C alpha
		NM_001626	AKT2	AKT serine/threonine kinase 2
		NM_005207	CRKL	CRK like proto-oncogene, adaptor protein
		NM_001982, NM_00100591	ERBB3	erb-b2 receptor tyrosine kinase 3
		5		

Spalte 1: Datensätze, die miteinander verglichen wurden inkl. dem Anteil von regulierten Genen, die am ErbB-Signalweg beteiligt sind, in Bezug auf alle Gene, die in die Analyse eingeschlossen wurden; Spalte 2: Der modifizierte Fisher Exact P-Value, EASE Score ist ein Maß für die Überrepräsentation eines Signalwegs (in diesem Fall der ErbB-Signalweg) in einer Liste von Genen in Bezug auf dessen Vorkommen in der Gesamtheit aller menschlichen Gene; Spalte 3: Liste von den Genen, die mindestens zweifach reguliert waren und Mitglieder des ErbB-Signalwegs sind

A



B

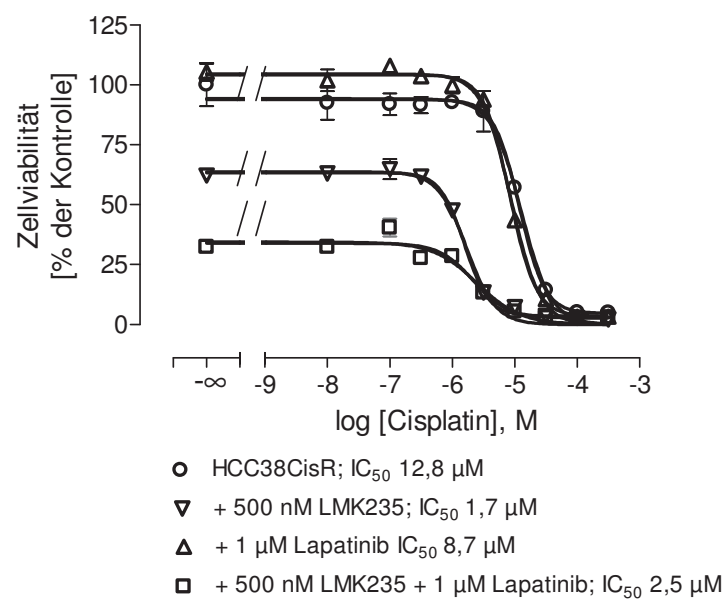
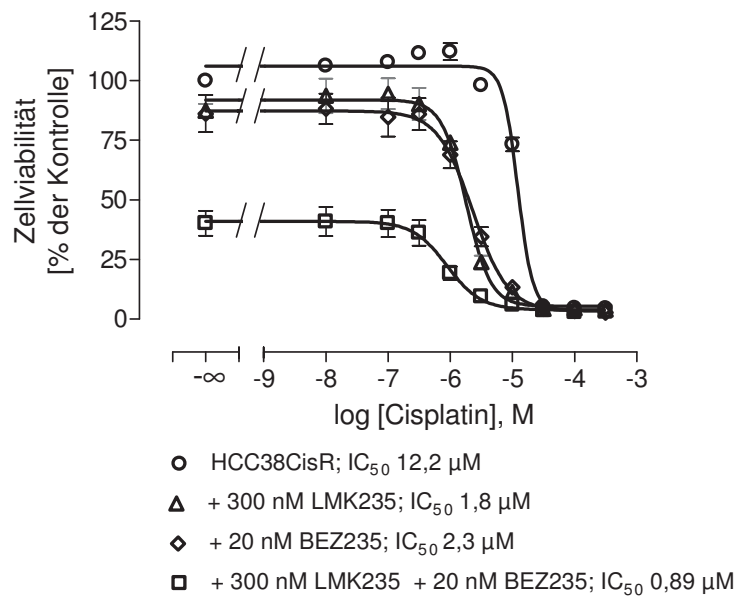


Abbildung 28 Einfluss der Kombination von LMK235 mit Lapatinib oder NVP-AEW541 auf die Cisplatin sensitivität von HCC38CisR. Die Kombination von 1 μ M NVP-AEW541 (**A**) bzw. 1 μ M Lapatinib (**B**) mit 500 nM LMK235 wurde 48h vor der 72-stündigen Cisplatinbehandlung zu der Zelllinie HCC38CisR inkubiert und der resultierende IC_{50} mit dem nach Präinkubation mit den Substanzen allein verglichen. Graphen zeigen ein repräsentatives Experiment von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten; Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM einer Dreifachbestimmung dar

A



B

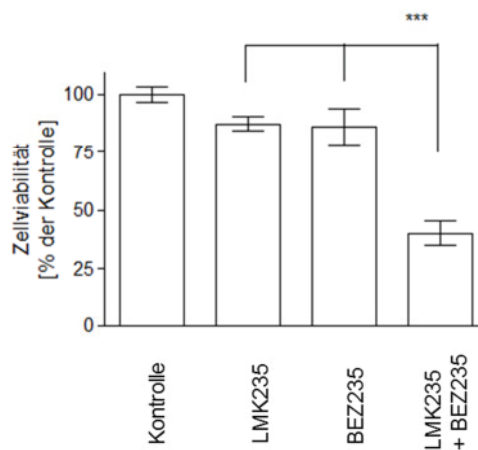


Abbildung 29 Einfluss der Kombination von LMK235 mit NVP-BEZ235 auf die Zelllinie HCC38CisR.

A Einfluss auf die Cisplatinempfindlichkeit: Die Inhibitoren wurden 48h vor Cisplatin für 72h zu den Zellen gegeben. **B** Einfluss der Inkubation (120h) von 300 nM LMK235, 20 nM NVP-BEZ235 oder deren Kombination auf die Zellviabilität von HCC38CisR (ermittelt im MTT Assay). *** $p < 0,001$. Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung dar.

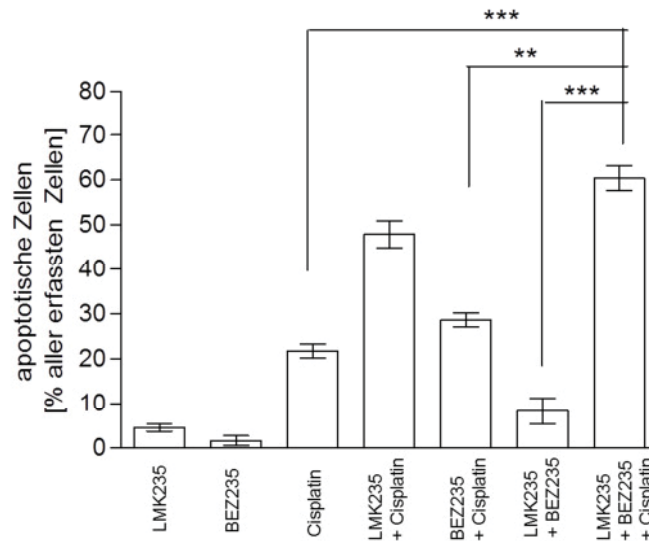


Abbildung 30 Induktion von Apoptose durch die Kombination von LMK235, NVP-BEZ235 und Cisplatin in HCC38CisR. Die Zelllinie wurde für 24h mit 300 nM LMK235, 20 nM NVP-BEZ235, 20 μ M Cisplatin oder deren Kombinationen inkubiert und der Anteil der apoptotischen Zellkerne im Durchflusszytometer detektiert. Von allen Datenpunkten wurde der Mittelwert der Kontrollen im jeweiligen Experiment subtrahiert. **p < 0,01. Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

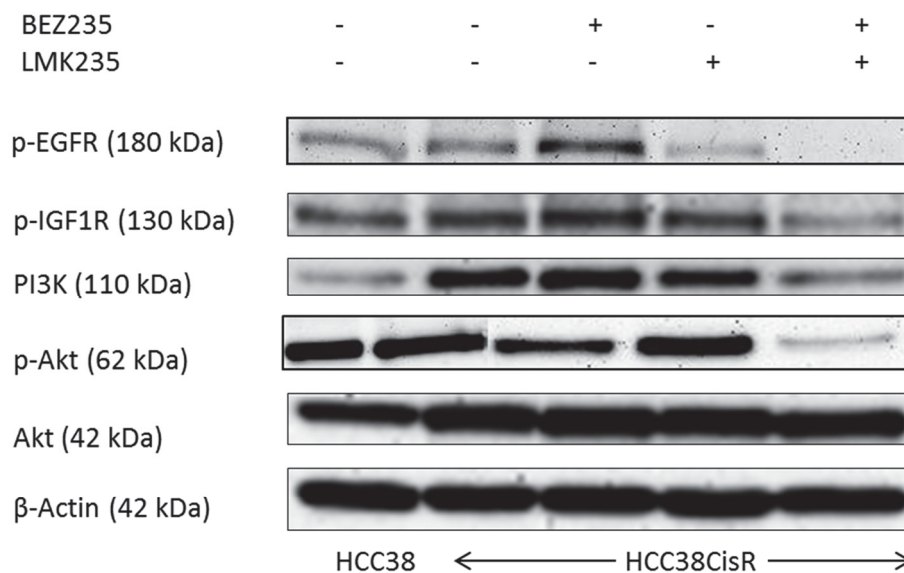


Abbildung 31 Effekt der Kombination von LMK235 und NVP-BEZ235 auf die Phosphorylierung von IGF1R, und Akt sowie auf die Expression von PI3K und Akt in HCC38CisR. Die Zelllinie wurde für 48h mit 1 μ M LMK235, 80 nM NVP-BEZ235 oder deren Kombinationen behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 3 voneinander unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils 30 μ g/Bande eingesetzt wurden.

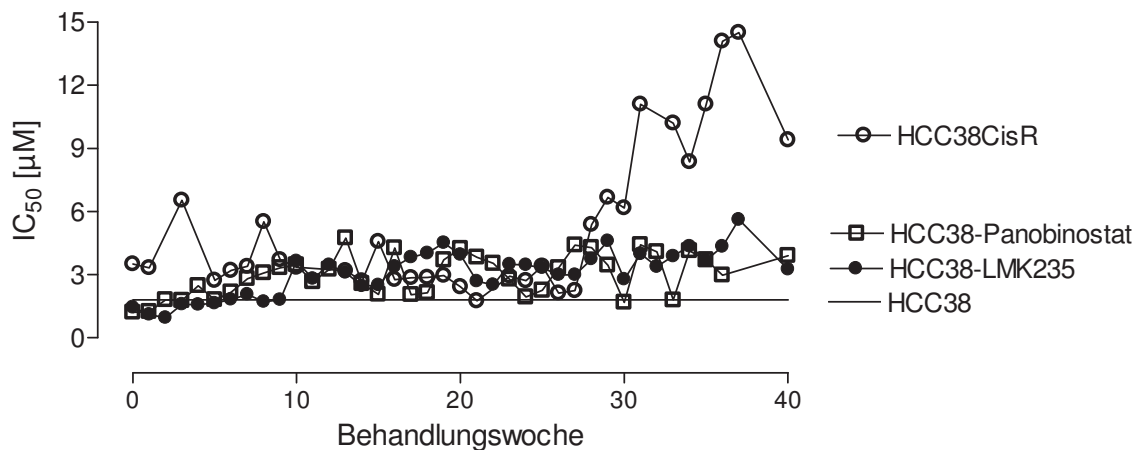
Die Entwicklung der Cisplatinresistenz der Zelllinie HCC38CisR ging mit einer verstärkten Phosphorylierung von EGFR, IGF1R und Akt einher (vgl. Fig 1b). Deshalb wurde der Effekt der Kombination von NVP-BEZ235 und LMK235 auf deren Aktivität und zusätzlich auf die Expression von PI3K und Akt im Western Blot untersucht. Der Vergleich der Zelllinien HCC38 und HCC38CisR zeigte eine verstärkte PI3K-Expression, als ein Resultat der Cisplatinresistenz. HCC38CisR wurde mit LMK235 und NVP-BEZ235 in Konzentrationen, die ihrem IC_{50} entsprachen, für 48h behandelt. Die Expression von PI3K blieb unter NVP-BEZ235-Behandlung gleich, sank leicht nach LMK235-Behandlung und war nach der gleichzeitigen Behandlung mit beiden Substanzen deutlich reduziert. Die Phosphorylierung von Akt war nach der Behandlung mit NVP-BEZ235 leicht und nach der Behandlung mit beiden Substanzen deutlich reduziert. Dabei blieb die Expression von Akt unverändert. Die Phosphorylierung des EGFR und IGF1R war nach der Behandlung mit LMK235 leicht und nach der Behandlung mit beiden Substanzen deutlich vermindert (vgl. Abbildung 31).

6.2.3 Effekt von HDACi auf die Ausbildung einer Cisplatinresistenz

Nachdem der sensitivierende Effekt von HDACi auf eine bereits bestehende Cisplatinresistenz untersucht wurde, wurde ihr Effekt auf die Ausbildung der Cisplatinresistenz untersucht. Dafür wurde der IC_{50} für Cisplatin im Verlauf einer wöchentlichen Cisplatinbehandlung, analog zur Etablierung von HCC38CisR, in permanenter Gegenwart von 200 nM LMK235 oder 3 nM Panobinostat ermittelt. Die Konzentration der beiden HDACi musste dafür im Vergleich zu den vorherigen Experimenten vermindert werden, da das zytotoxische Potential unter Dauerbehandlung andernfalls zu hoch war. Die Anwesenheit von LMK235 führte zu einer Hypersensitivierung der Zelllinie HCC38 für die Behandlung mit Cisplatin in den ersten 5 Wochen der Cisplatinbehandlung. Über 9 Wochen konnte kein Anstieg des IC_{50} über den der Ursprungszelllinie beobachtet werden. Mit Panobinostat konnte der hypersensitive Phänotyp für 2 Wochen aufrechterhalten werden, nach 7 Wochen war der IC_{50} für Cisplatin konstant über dem der Ursprungszelllinie. Die nach 37-maliger Behandlung mit Cisplatin neu generierten Zelllinien wurden HCC38-LMK235 und HCC38-Panobinostat genannt. Der IC_{50} für Cisplatin wurde nach Beendigung des Cisplatinstress für 3 weitere Wochen ermittelt und änderte sich während dieser Zeit in den 3 Zelllinien (HCC38CisR, HCC38-LMK235, HCC38-Panobinostat) nicht (vgl. Abbildung 32). Die Anwesenheit von LMK235 oder Panobinostat konnte nicht verhindern, dass der IC_{50} für

Cisplatin im Verlauf der Behandlungen anstieg. Nichtsdestotrotz waren die am Ende resultierenden IC_{50} -Werte signifikant unter dem der Zelllinie HCC38CisR. Während für HCC38CisR ein Resistenzfaktor von 6,5 berechnet wurde, zeigte die Zelllinie HCC38-LMK einen Resistenzfaktor von 2,6 und die Zelllinie HCC38-Panobinostat einen Resistenzfaktor von 2,1. Die Genexpressionsdaten der beiden Zelllinien HCC38-LMK235 und HCC38-Panobinostat zeigten, dass in der Zelllinie HCC38-Panobinostat die fold changes für die Überexpression von Mitgliedern des ErbB-Signalwegs deutlich niedriger sind, als in der Zelllinie HCC38CisR (vgl. Tabelle 15). Die Zelllinie HCC38-LMK235 ist der Zelllinie HCC38CisR bezüglich der Genexpression ähnlicher. Nichtsdestotrotz zeigt sich bei Betrachtung des EASE Scores für die beiden Zelllinien HCC38-Panobinostat und HCC38-LMK235 keine signifikante Aktivierung des ErbB-Signalwegs.

A



B

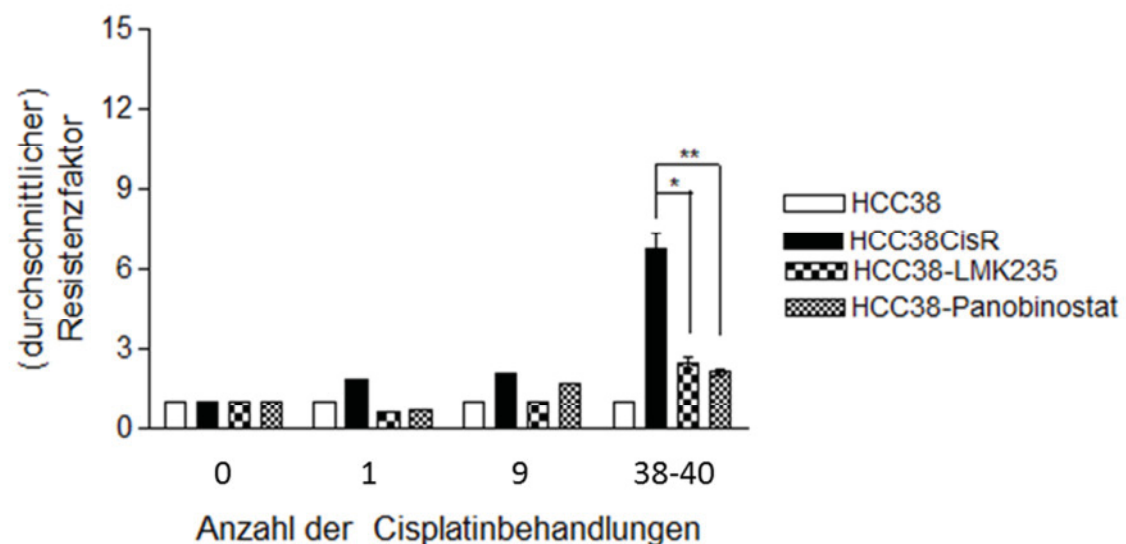


Abbildung 32 Effekt von LMK235 bzw. Panobinostat auf die Ausbildung der Cisplatinresistenz von HCC38.

HCC38 wurde in permanenter Anwesenheit von 200 nM LMK235, 3 nM Panobinostat oder ohne Anwesenheit eines HDACi wöchentlich mit Cisplatin in einer der IC_{50} entsprechenden Konzentration behandelt. **(A)** Nach 37 Behandlungen wurden die Zelllinien HCC38-LMK235, HCC38-Panobinostat und HCC38CisR erhalten. Der 40-Wochen Wert repräsentiert den Mittelwert von 3 voneinander unabhängigen Experimenten 3 Wochen nach Ende des Cisplatinstress. HCC38: Durchschnittswert des IC_{50} während der Durchführung des Experiments. **(B)** Zusammenfassung der unter A gezeigten Werte als Resistenzfaktoren (IC_{50} behandelte Zelllinie / Mittelwert des IC_{50} der Zelllinie HCC38) für ausgewählte Zeitpunkte. Die Daten bei 38-40 Wochen zeigen den mittleren Resistenzfaktor $\pm$ SEM dieses Zeitraums (keine Behandlung mit Cisplatin mehr während dieses Zeitraums).

6.2 HDAC-Inhibitoren

Tabelle 15 Übersicht über die Veränderung der Expression von Genen im ErbB-Signalweg

Gen-Name	fold change HCC38CisR/HCC38	fold change HCC38-Panobinostat/HCC38	fold change HCC38-LMK235/HCC38
CBLB	59,53	114,48	59,5
SHC1	2,76	1,28	1,23
AREG	59,96	- *	48,14
CAMK2D	6,55	0,6	4,3
EGFR	2,5	0,45	2,7
EREG	10,1	- *	14,96
GSK3B	2,39	0,78	1,81
HBEGF	4,44	0,85	5,08
JUN	2,48	1,24	1,45
MAP2K1	2,68	0,82	2,33
MAP2K4	2,13	1,02	1,90
NRG2	2,5	- *	7,85
NRG4	2,88	3,03	3,39
RAC1	2,17	0,67	1,75
TGFA	2,06	1	1,99
AKT2	2,92	1,48	2,85
EASE Score (ErbB Pathway)	0,048	0,66	0,13

In die Analyse wurden alle Gene des ErbB-Signalwegs, die in der cisplatinresistenten Zelllinie mindestens zweifach überexprimiert waren (vgl. Tabelle 14), eingeschlossen.

Der fold change errechnet sich aus: $nPS(\text{behandelte Zelllinie})/nPS(\text{HCC38})$

* nicht in die Auswertung aufgenommen, da das Signal nicht mindestens zweifach über dem Background-Signal lag.

Die letzte Zeile zeigt den von DAVID errechneten EASE Score für den ErbB-Signalweg in der Analyse aller mindestens zweifach überexprimierten Gene.

6.3 Einfluss auf die Sensitivität von Paclitaxel

Da Paclitaxel in der Therapie des Mammakarzinoms eine große Rolle spielt, wurden die bisher erwähnten Inhibitoren auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Zelllinien HCC38 und HCC38CisR für die Behandlung mit Paclitaxel zu sensitivieren, untersucht. Dafür wurde zunächst der IC_{50} für Paclitaxel an beiden Zelllinien ermittelt (vgl. Abbildung 33). Die Daten zeigten zum einen, dass zwischen Cisplatin und Paclitaxel keine Kreuzresistenz besteht, da beide Zelllinien einen ähnlichen IC_{50} besitzen (HCC38: IC_{50} 4,3 nM, $pIC_{50} = 8,37 \pm 0,02$; HCC38CisR: IC_{50} 2,7 nM, $pIC_{50} = 8,57 \pm 0,02$). Zum anderen befindet sich das Bottom-Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve nicht, wie unter Cisplatin in der Regel zu beobachten, bei 0% oder nahe 0% sondern im Bereich von 10-20%. Um auszuschließen, dass Paclitaxel die Mitochondrienaktivität steigert und so das Ergebnis der MTT Assays beeinflusst, wurde ein zweiter Zellviabilitätsassay, der Neutralrot-Assay, durchgeführt. Dieser nutzt nicht die Aktivität der Mitochondrien zur Ermittlung der Zellviabilität. Für diesen Vergleich wurde die Zelllinie T47D verwendet. Der Vergleich der Ergebnisse beider Assays zeigte, dass der ermittelte IC_{50} in beiden Fällen fast gleich war (MTT: IC_{50} 10,5 nM, $pIC_{50} = 7,96 \pm 0,03$; Neutralrot: IC_{50} 13,7 nM, $pIC_{50} = 7,87 \pm 0,05$; vgl. Abbildung 34). Die Erhöhung des Bottom Plateaus war ebenfalls in beiden Assays erkennbar. Da sich trotz dieser Erhöhung problemlos der IC_{50} ermitteln ließ und dieser sowohl für den MTT-, als auch den Neutralrot Assay fast identisch war, wurde der MTT Assay in den weiteren Versuchen verwendet.

6.3 Einfluss auf die Sensitivität von Paclitaxel

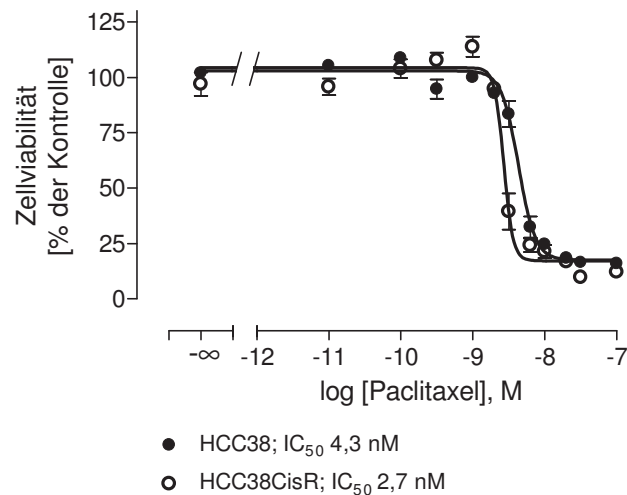


Abbildung 33 IC₅₀ für Paclitaxel an der Zelllinie HCC38 und HCC38CisR. Der IC₅₀ wurde über 72h im MTT Assay ermittelt. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten $\pm$ SEM von 5 voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

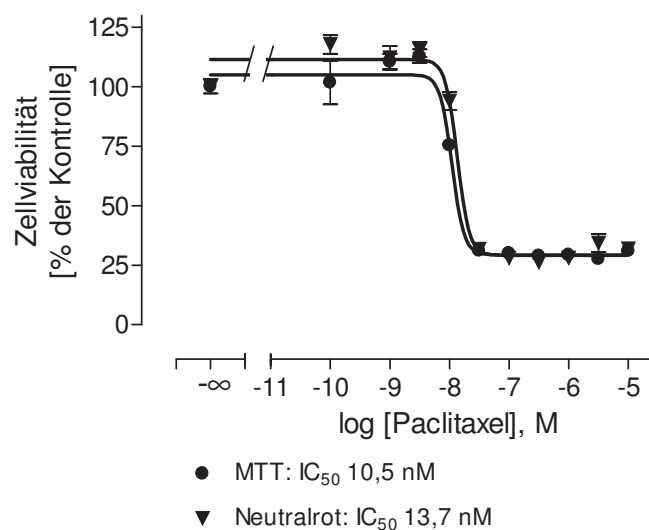
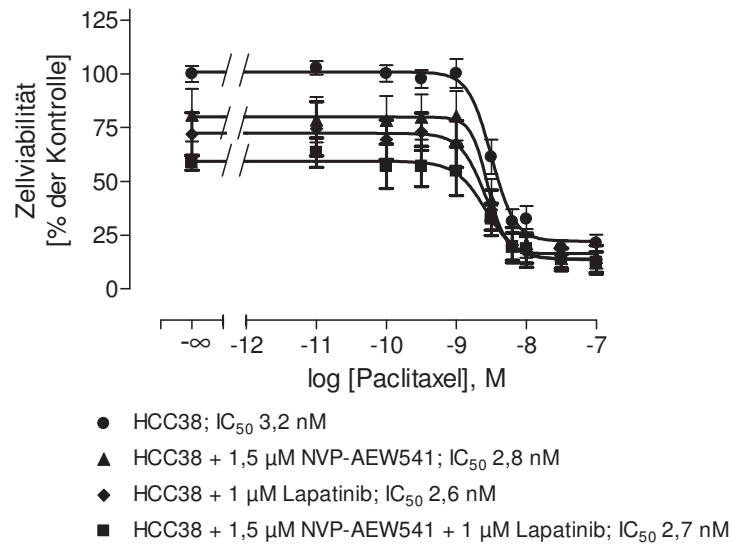


Abbildung 34 Vergleich Neutralrot Assay vs. MTT Assay zur Ermittlung des IC₅₀ für Paclitaxel. Der IC₅₀ wurde über 72h an der Zelllinie T47D bestimmt. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten $\pm$ SEM von 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

In den weiteren Versuchen wurden alle bisher verwendeten Inhibitoren hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Zelllinie HCC38 oder HCC38CisR für die Behandlung mit Paclitaxel zu sensitivieren, untersucht. Dafür wurden sie, analog zu den bisherigen Versuchen, 48h vor der Zugabe von Paclitaxel präinkubiert. Keine der Substanzen (NVP-AEW541, Lapatinib, NVP-BEZ235, Vorinostat, Panobinostat, LMK235) konnte eine der beiden Zelllinien signifikant für eine Behandlung mit Paclitaxel sensitivieren (vgl. Abbildung 35 - Abbildung 37).

A



B

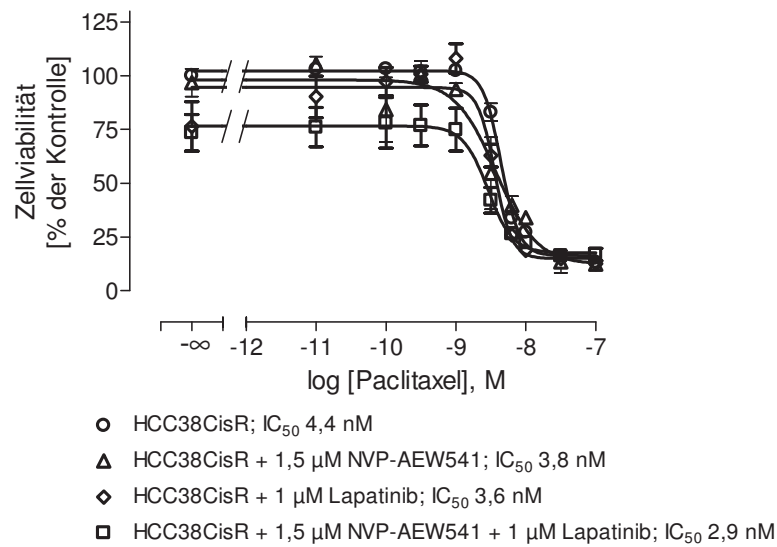


Abbildung 35 Einfluss von NVP-AEW541 und Lapatinib auf die Paclitaxelsensitivität von HCC38 und HCC38CisR. HCC38 (A) und HCC38CisR (B) wurden 48h vor Zugabe von Paclitaxel für 72h mit 1,5 μ M NVP-AEW541, 1 μ M Lapatinib oder deren Kombination präinkubiert. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten $\pm$ SEM von 1-2 voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

6.3 Einfluss auf die Sensitivität von Paclitaxel

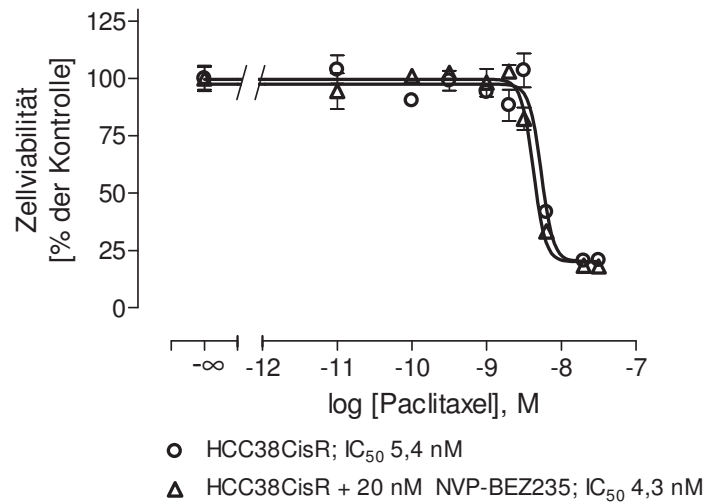


Abbildung 36 Einfluss von NVP-BE2235 auf die Paclitaxelsensitivität von HCC38CisR. Die Zelllinie wurde 48h vor Zugabe von Paclitaxel für 72h mit 20 nM NVP-BE2235 präinkubiert. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten $\pm$ SEM von einem Experimenten in Dreifachbestimmung.

A

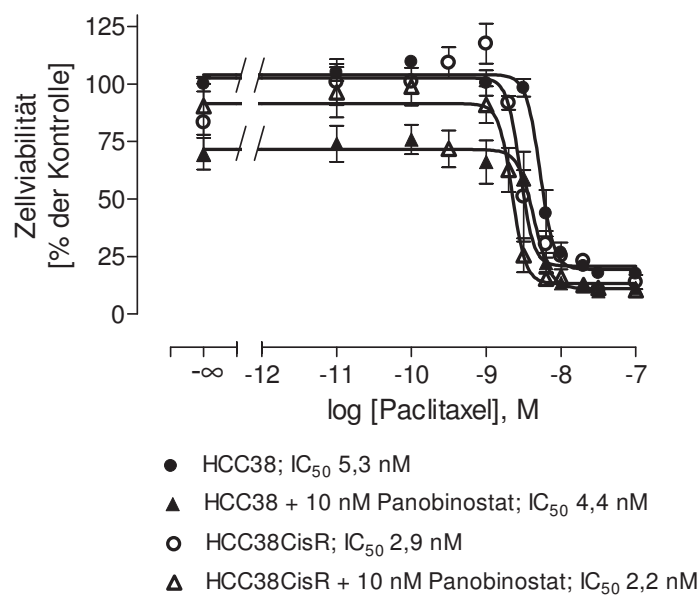
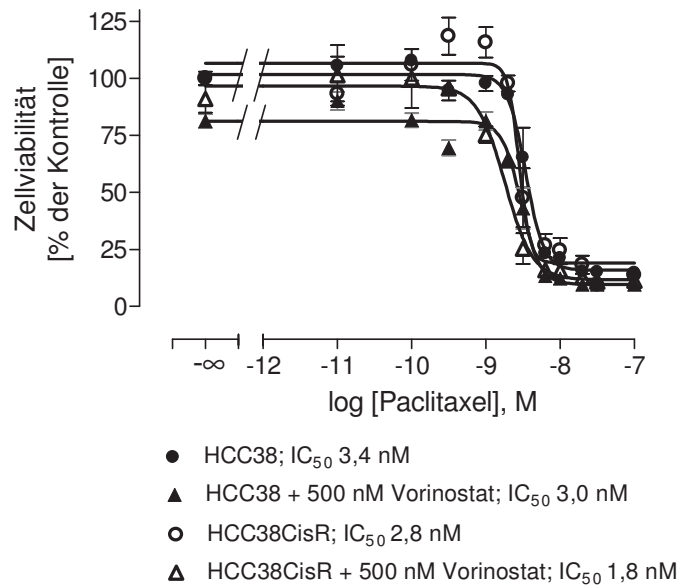


Abbildung 37 Einfluss von HDACi auf die Paclitaxelsensitivität von HCC38 und HCC38CisR.

Legende s. Seite 126

B



C

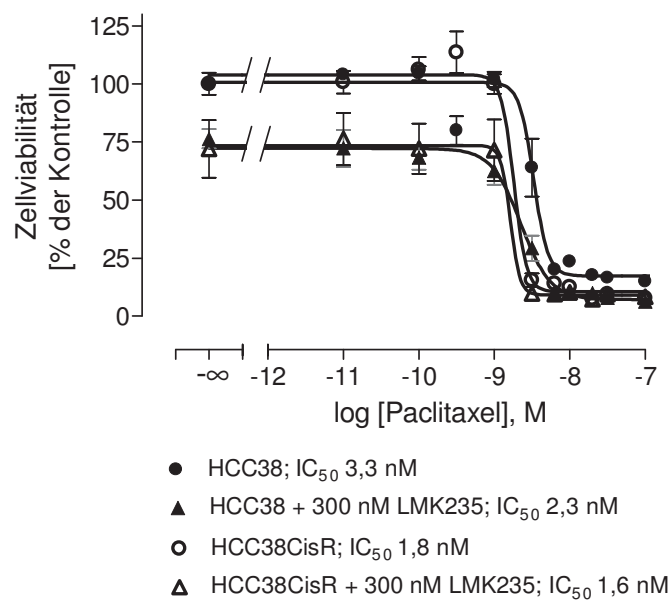


Abbildung 37 Einfluss von HDACi auf die Paclitaxelsensitivität von HCC38 und HCC38CisR. Die Zelllinien wurden 48h vor Zugabe von Paclitaxel für 72h mit 10 nM Panobinostat (A), 500 nM Vorinostat (B) oder 300 nM LMK235 (C) präinkubiert. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten $\pm$ SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Die Sensitivierung für die Behandlung mit Cisplatin, die durch HDAC-Inhibition bzw. durch Hemmung des PI3K-Akt-Signalwegs beobachtet werden konnte, ist somit selektiv für dieses Zytostatikum und zeigt keine Effekte auf die Behandlung mit Paclitaxel.

6.4 Der Naturstoff Torrubiellin B

Der Naturstoff Torrubiellin B wurde hinsichtlich seiner Zytotoxizität an einer Reihe von cisplatin sensitiven und –resistenten Tumorzelllinien untersucht. Als Nicht-Karzinom-Zellen wurden HEK293 Zellen in die Untersuchung eingeschlossen. Dafür wurde der IC_{50} im MTT über 72h ermittelt (vgl. Abbildung 38) und Resistenzfaktoren im Vergleich zu Cisplatin berechnet (vgl. Tabelle 17) [Hemphill *et al*, 2015].

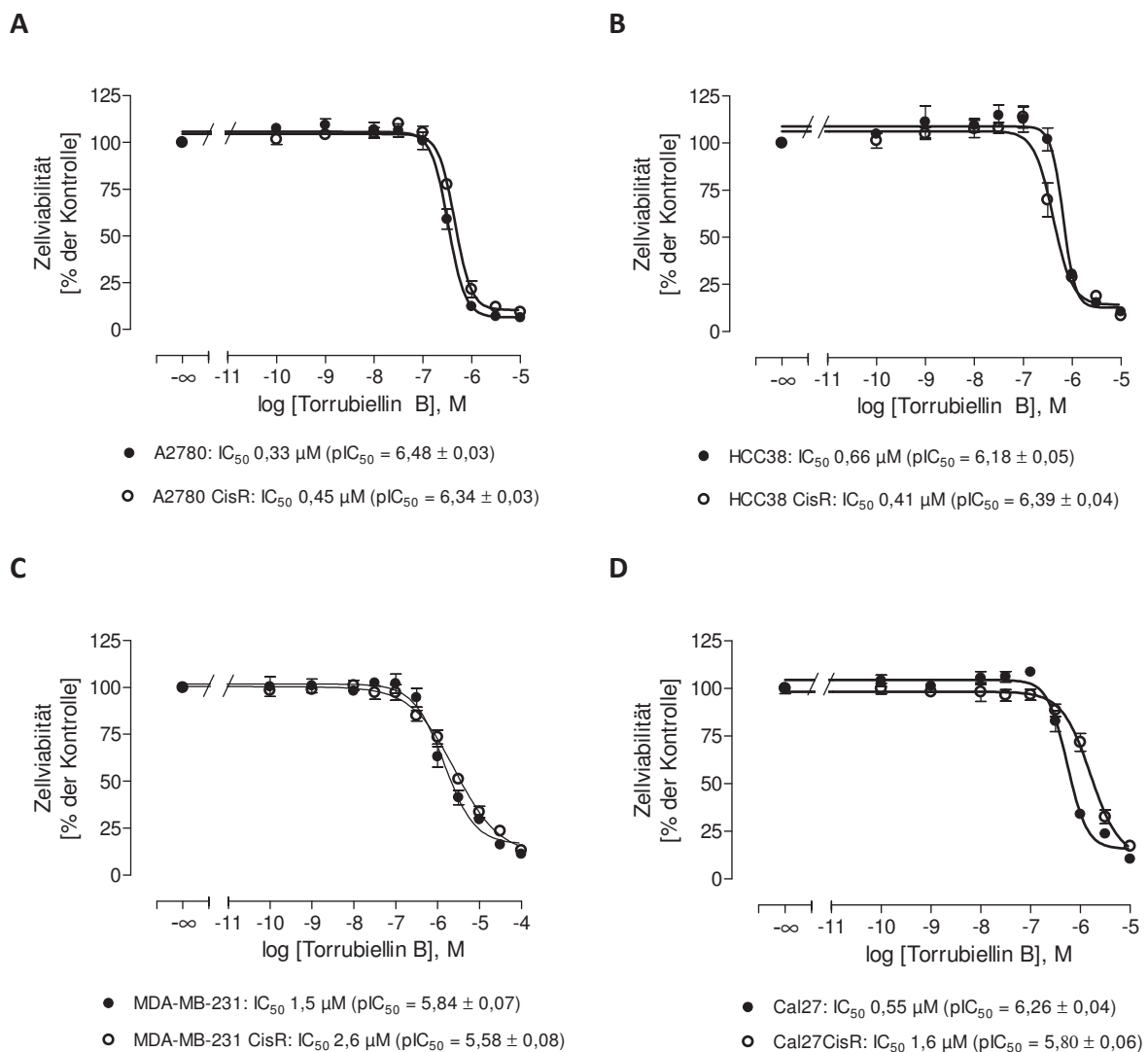
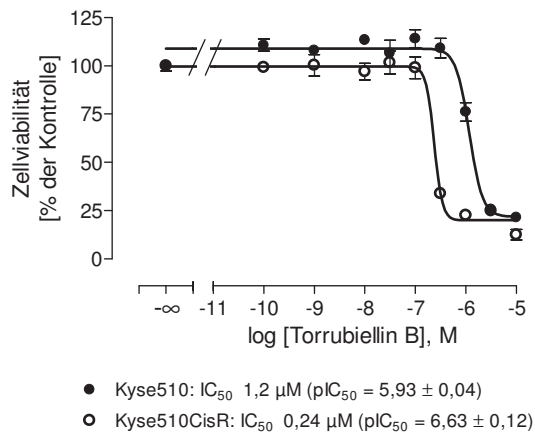


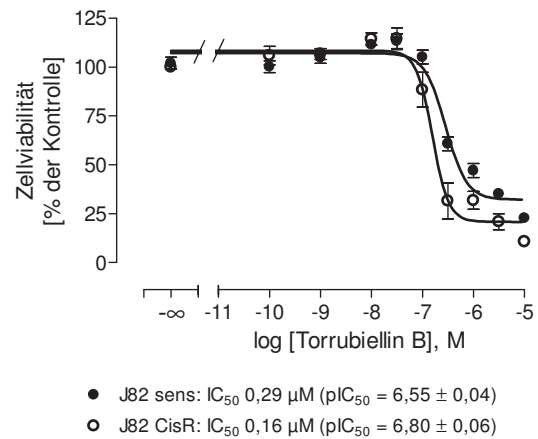
Abbildung 38 Ermittlung des IC_{50} von Torrubiellin B an verschiedenen Tumorzelllinien.

(Legende s. Seite 134)

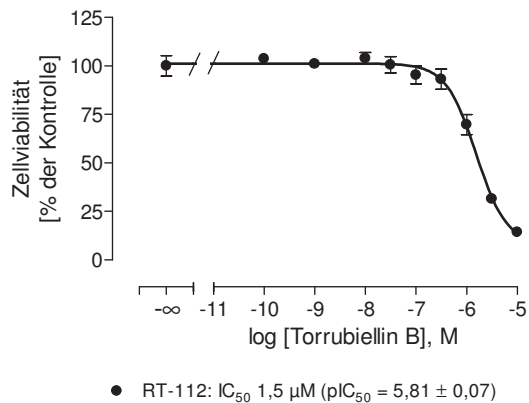
E



F



G



H

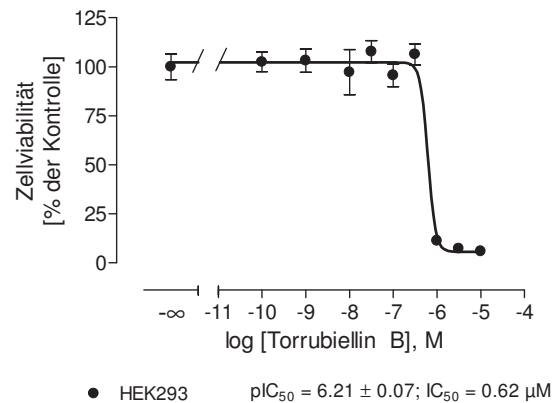


Abbildung 38 Ermittlung des IC_{50} von Torribiellin B an verschiedenen Tumorzelllinien. Der IC_{50} (72h, MTT Assay) wurde an den cisplatinsensitiven und -resistenten Zelllinien A2780 (A), HCC38 (B), MDA-MB-231 (C), Cal27 (D), Kyse510 (E), J82 (F), der cisplatinsensitiven Zelllinie RT-112 (G) und den humanen embryonalen Nierenzellen HEK293 (H) ermittelt. Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM von 1-4 voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung dar.

6.4 Der Naturstoff Torrubellin B

Tabelle 16 Zusammenfassung der IC₅₀-Werte für Cisplatin

Zelllinie	IC ₅₀ (Cisplatin), Ursprungszelllinie [μM]	IC ₅₀ (Cisplatin), cisplatinresistente Zelllinie [μM]
A2780	1,5	11,7
HCC38	2,7	9,5
MDA-MB-231	13,9	38,1
Cal27	19,2	43,9
Kyse510	2,5	8,4
J82	3,5	16,1
RT-112	18,4	-

Die IC₅₀-Werte wurden über 72h im MTT Assay ermittelt. Daten stellen den Mittelwert von 1-4 voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung dar.

Tabelle 17 Zusammenfassung der MTT-Ergebnisse als Resistenzfaktoren für Torrubellin B und Cisplatin an verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Resistenzfaktor (Torrubiellin B)	Resistenzfaktor (Cisplatin)
A2780	Ovarialkarzinom	1,4	7,8
HCC38	Mammakarzinom (triple-negativ)	0,6	3,5
MDA-MB-231	Mammakarzinom (triple-negativ)	1,8	2,7
Cal27	Zungenkarzinom	2,9	2,3
Kyse510	Ösophaguskarzinom	0,2	3,4
J82	Blasenkarzinom	0,6	4,6

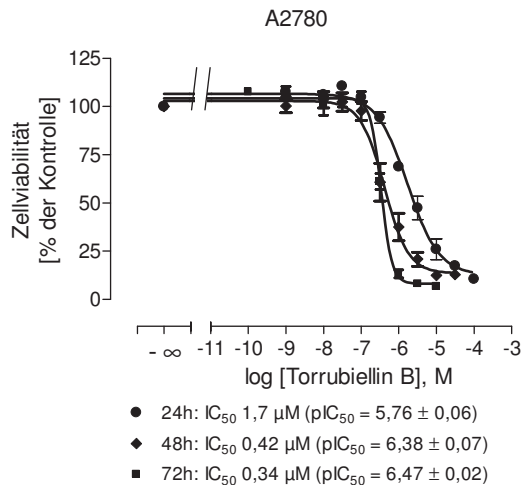
Die Resistenzfaktoren wurden berechnet als IC₅₀ (cisplatinresistente Zelllinie) / IC₅₀ (Ursprungszelllinie). Die IC₅₀-Werte wurde über 72h im MTT Assay ermittelt und entsprechen den Mittelwerten von 1-4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung

Die ermittelten IC_{50} -Werte zeigten, dass mit Ausnahme von Cal27 für alle anderen Zelllinien der Resistenzfaktor für Cisplatin über dem für Torrubellin B lag. Bei den Zelllinien HCC38, Kyse510 und J82 wiesen die cisplatinresistenten Zelllinien einen niedrigeren IC_{50} für Torrubellin B, als die Ursprungszelllinien auf. Torrubellin B zeigte an HEK293 Zellen eine ähnliche Zytotoxizität wie an den verwendeten Tumor-Zelllinien.

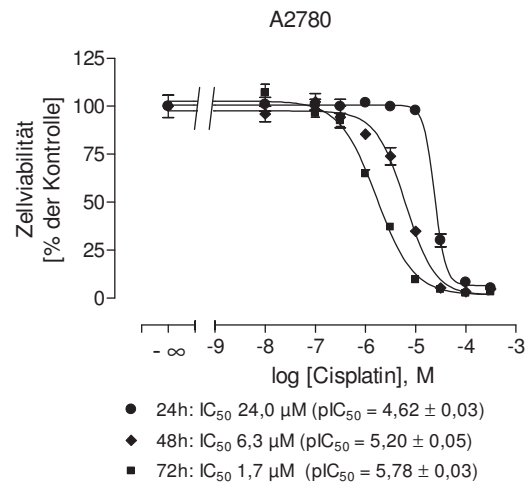
Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit des Effekts von Torrubellin B wurde der IC_{50} an den Zelllinien HCC38 und A2780 auch nach 24 und 48h ermittelt und mit dem für Cisplatin verglichen (vgl. Abbildung 39). Die IC_{50} -Werte für Torrubellin nahmen, ebenso wie die für Cisplatin, mit steigender Inkubationszeit ab. Im Gegensatz zu Cisplatin war der IC_{50} für Torrubellin B nach 48-stündiger Inkubationszeit nur geringfügig höher, als nach 72-stündiger Inkubationszeit.

6.4 Der Naturstoff Torrubieillin B

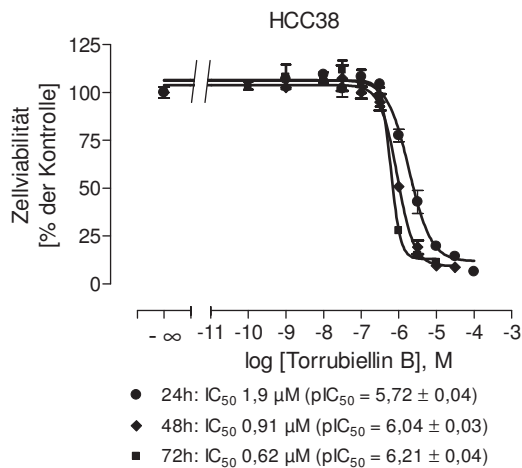
A



B



C



D

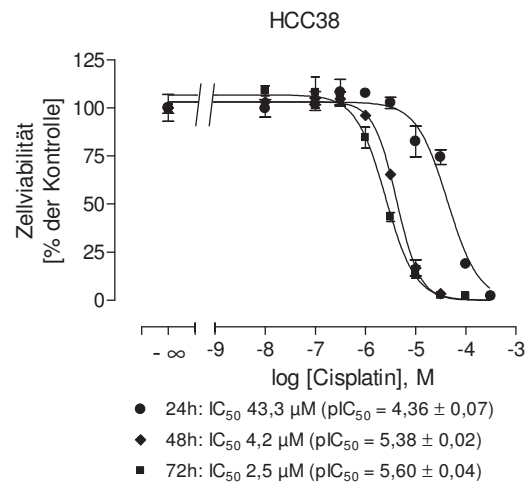
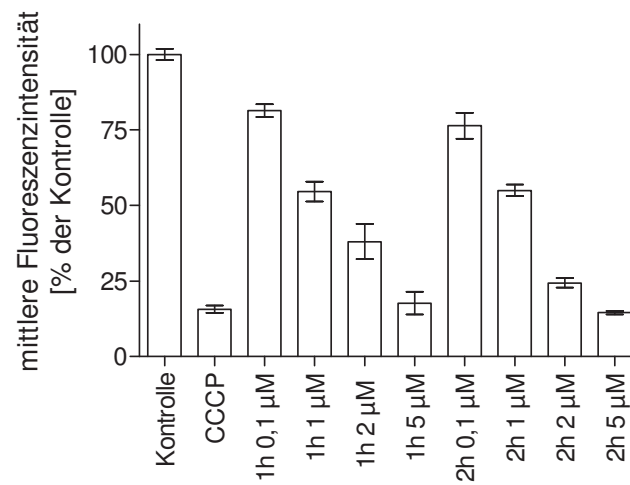


Abbildung 39 Zeitabhängigkeit des IC_{50} von Torrubieillin B im Vergleich zu Cisplatin. Der IC_{50} für Torrubieillin B (A/C) bzw. Cisplatin (B/D) wurde über 24h, 48h und 72h an den Zelllinien A2780 (A/B) bzw. HCC38 (C/D) im MTT Assay ermittelt. Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM von 2-3 voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung dar.

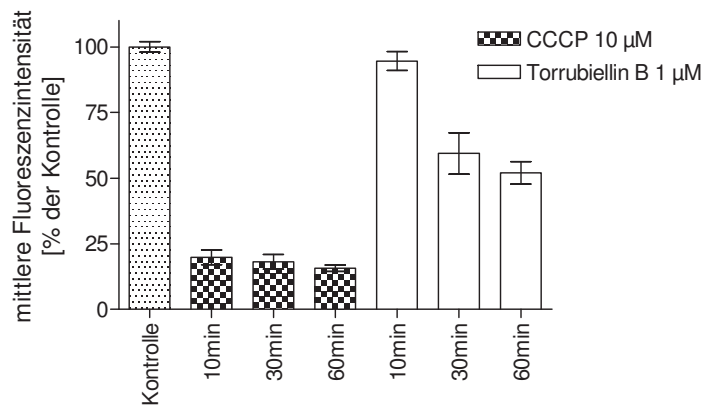
Zur Untersuchung eines möglichen Wirkmechanismus von Torrubieillin B wurde dessen Wirkung auf das Mitochondrienpotential der Zellen ermittelt. Dafür wurde die mittlere Fluoreszenzintensität nach Färbung der Zellen mit TMRE im Durchflusszytometer ausgewertet. Als Positivkontrolle für den Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials wurde der Entkoppler CCCP verwendet. Unter CCCP sank die mittlere Fluoreszenzintensität auf 10-15% der nur mit TMRE behandelten Probe. An der Zelllinie A2780 war ein Einfluss von Torrubieillin B auf das Mitochondrienpotential erkennbar, der sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig war (vgl. Abbildung 40 A). Bei ein- oder zweistündiger

Inkubationszeit nahm die mittlere Fluoreszenzintensität von 0,1 μM ($81,4 \pm 2,1\%$) zu 5 μM ($17,6 \pm 3,7\%$) Torrubellin B deutlich ab. Der Vergleich der Werte für die gleichen Konzentrationen nach ein- oder zweistündiger Inkubationszeit zeigte kaum einen Unterschied zwischen beiden Zeitpunkten (vgl. Abbildung 40 A). Bei Betrachtung kürzerer Inkubationszeiten führte CCCP bereits nach 10min zu einem fast kompletten Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials. Bei der für Torrubellin B gewählten Konzentration von 1 μM war ein leicht verzögerter Wirkeintritt erkennbar. Während nach 10min noch $94,7 \pm 3,6\%$ der mittleren Fluoreszenzintensität erhalten war, war dies nach 30min ($59,4 \pm 7,8\%$) bzw. 60min ($52,0 \pm 4,3\%$) deutlich weniger (vgl. Abbildung 40 B). Aus der Auftragung der mittleren Fluoreszenzintensitäten nach einstündiger Inkubationszeit gegen den negativen dekadischen Logarithmus der verwendeten Konzentration ließ sich ein IC_{50} von 0,78 μM für Torrubellin B bezüglich des Einflusses auf das Mitochondrienpotential abschätzen. Dafür wurde das Bottom-Plateau der Kurve auf die mittlere Fluoreszenzintensität unter CCCP fixiert, da diese Substanz zu einem vollständigen Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials führt. An drei weiteren Zelllinien (A2780CisR, HCC38 und HCC38CisR) wurde der Effekt von Torrubellin B auf das Mitochondrienpotential bestätigt. An allen drei Zelllinien wurde mit steigender Konzentration von Torrubellin B eine Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität beobachtet (vgl. Abbildung 40 D).

A



B



C

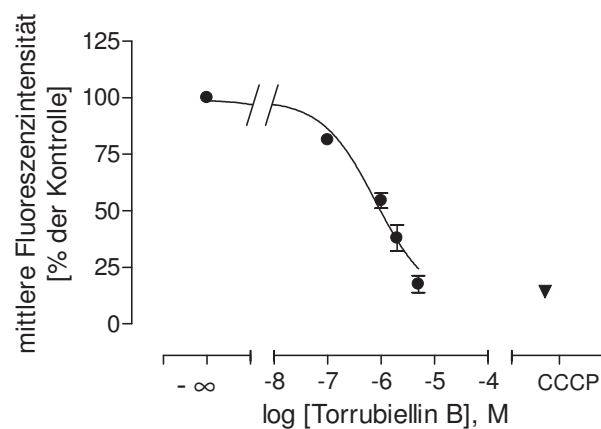


Abbildung 40 Mitochondrienpotential nach Behandlung mit Torrubiellin B.

(Legende s. Seite 134)

D

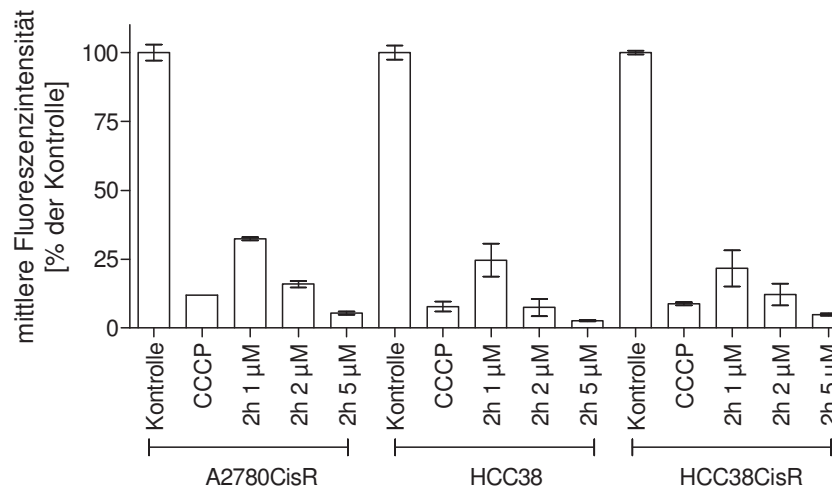


Abbildung 40 Mitochondrienpotential nach Behandlung mit Torribiellin B. 10 µM CCCP inkubiert für 20min dienten als Positivkontrolle für den Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials. **(A)** Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von Torribiellin B inkubiert für 1-2h an der Zelllinie A2780. **(B)** Zeitabhängigkeit des Effektes von 1 µM Torribiellin B im Vergleich zu 10 µM CCCP. **(C)** Auftragung der Daten aus (A) für die 1-stündige Inkubationszeit in eine Konzentrations-Effekt-Kurve. **(D)** Konzentrationsabhängigkeit des Effekts von Torribiellin B inkubiert für 2h an den Zelllinien A2780CisR, HCC38 und HCC38CisR. Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert $\pm$ SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten.

Im Apoptose Assay wurde untersucht, ob die beobachtete Abnahme des Mitochondrienpotentials zu einer Induktion von Apoptose führte. In allen 4 untersuchten Zelllinien (A2780, A2780CisR, HCC38 und HCC38CisR) konnte Torribiellin B zeit- und konzentrationsabhängig Apoptose induzieren. Während 1 µM Torribiellin B nach 24h kaum Apoptose induzieren konnte, stieg der Anteil an apoptotischen Zellkernen nach 48h deutlich an. Die Konzentration von 5 µM war bereits nach 24h deutlich in der Lage Apoptose zu induzieren (vgl. Abbildung 41). Die Präinkubation mit dem Caspaseinhibitor QVD-OPh führte in allen 4 Zelllinien zu einer Abnahme des Anteils an apoptotischen Zellkernen. Nichtsdestotrotz konnte nur in den beiden cisplatinresistenten Zelllinien das Auftreten von Apoptose vollständig blockiert werden.

6.4 Der Naturstoff Torrubieillin B

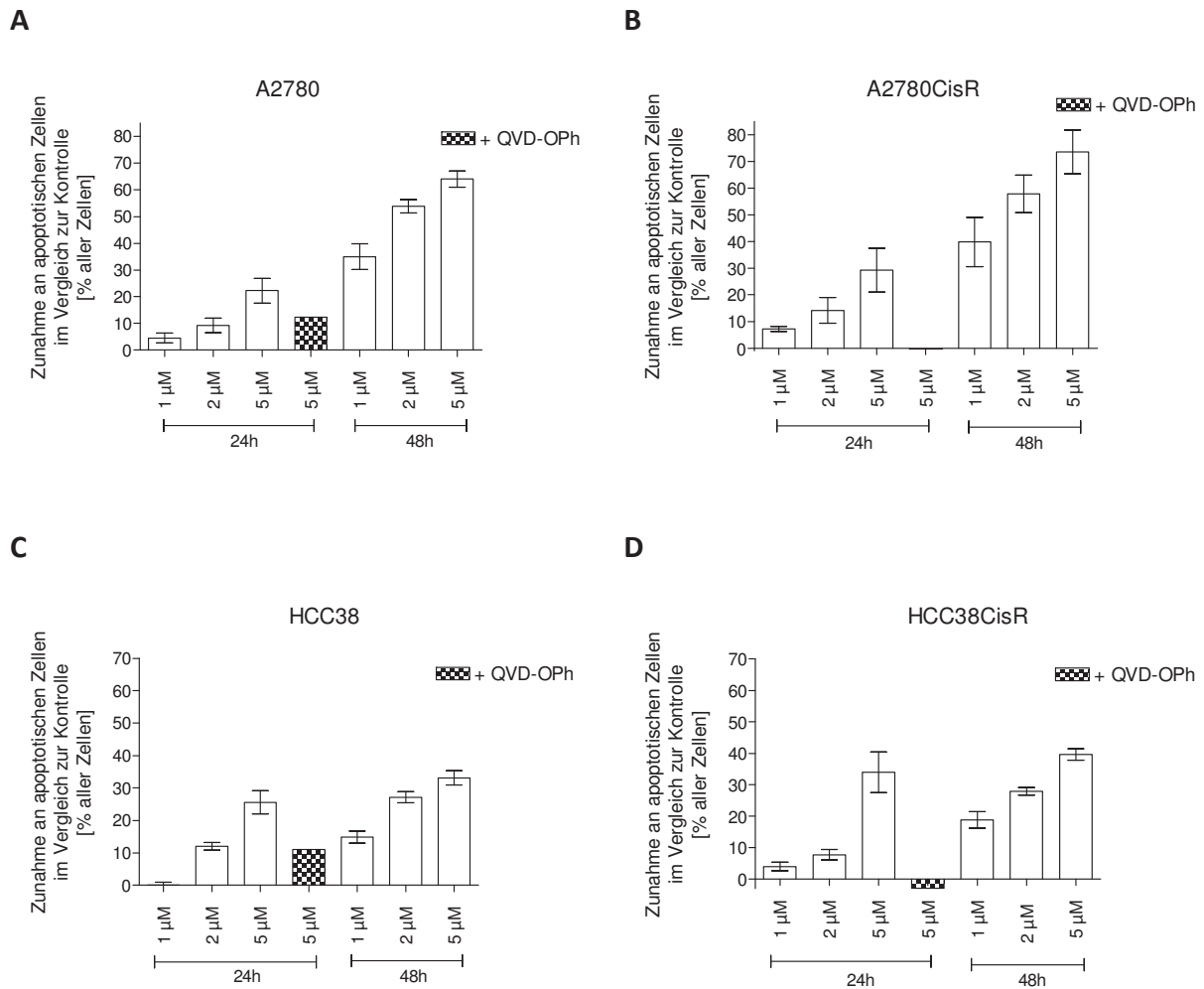
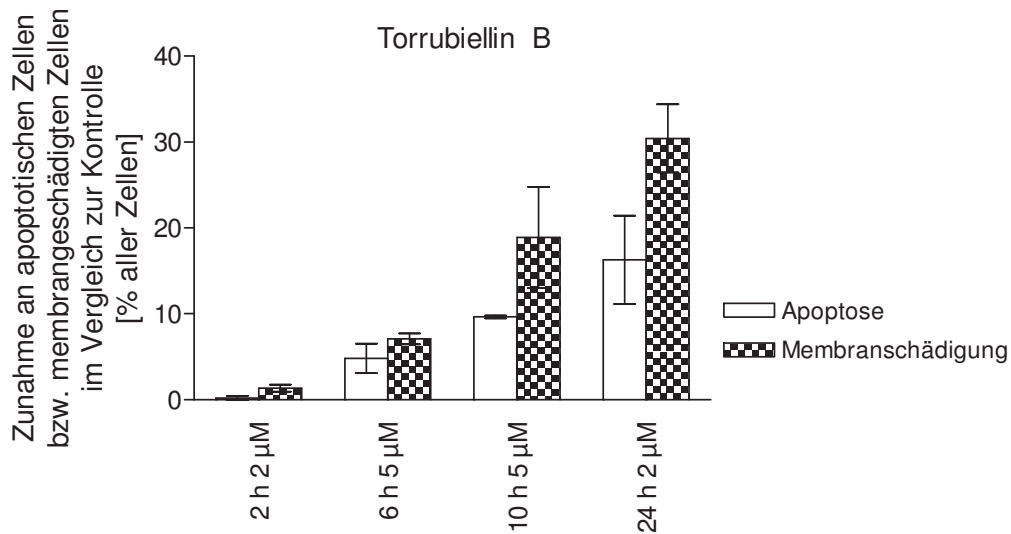


Abbildung 41 Induktion von Apoptose nach Behandlung mit Torrubieillin B. Zur Auswertung wurde die Differenz zwischen dem Anteil apoptotischer Zellkerne in der behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle gebildet. Die Zelllinien A2780 **(A)**, A2780CisR **(B)**, HCC38 **(C)** und HCC38CisR **(D)** wurden für 24 oder 48h mit Torrubieillin B (1-5 µM) inkubiert. QVD-OPh wurde in einer Konzentration von 20 µM 2h vor Torrubieillin zu den Zellen gegeben. Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert $\pm$ SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten. Die Experimente mit QVD-OPh wurden nur einmal durchgeführt.

A



B

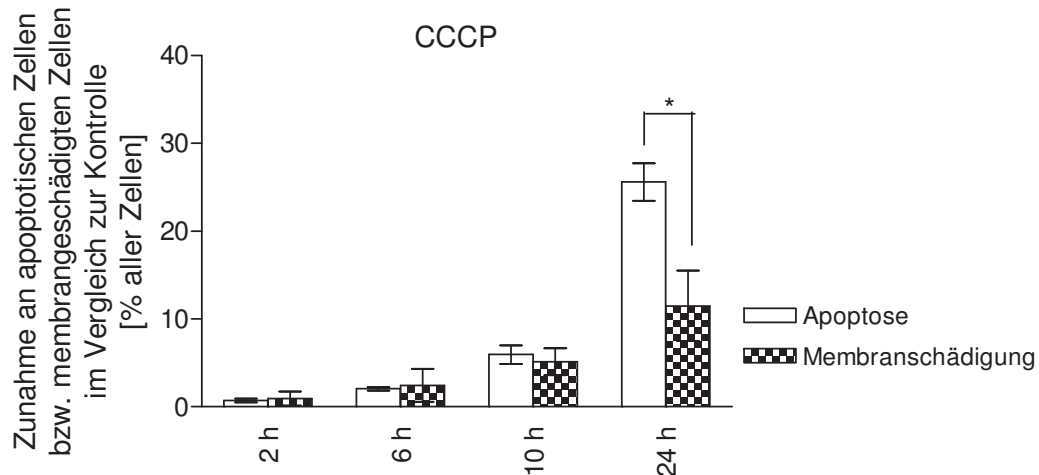


Abbildung 42 Induktion von Apoptose im Vergleich zur Membranschädigung durch Torrubiellin B bzw. CCCP. Zur Auswertung wurde die Differenz zwischen der behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle gebildet. Die Induktion von apoptotischen Zellkernen (links) wurde dem Anteil an Zellen mit Membranschädigung (rechts) gegenübergestellt. Torrubiellin B **(A)** und 10 µM CCCP **(B)** wurden an der Zelllinie A2780 inkubiert. Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert $\pm$ SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten. * $p < 0,5$

Neben der Induktion von Apoptose könnte, aufgrund der chemischen Struktur von Torrubiellin B, auch eine Schädigung der Zellmembran für die zytotoxische Wirkung verantwortlich sein. Deshalb wurden beide Effekte parallel zueinander an der Zelllinie A2780 untersucht. Die niedrige Konzentration von 2 µM zeigte nach 2h weder eine Zunahme an apoptotischen Zellkernen noch eine Zunahme an Zellen mit Membranschädigung. Nach 24h

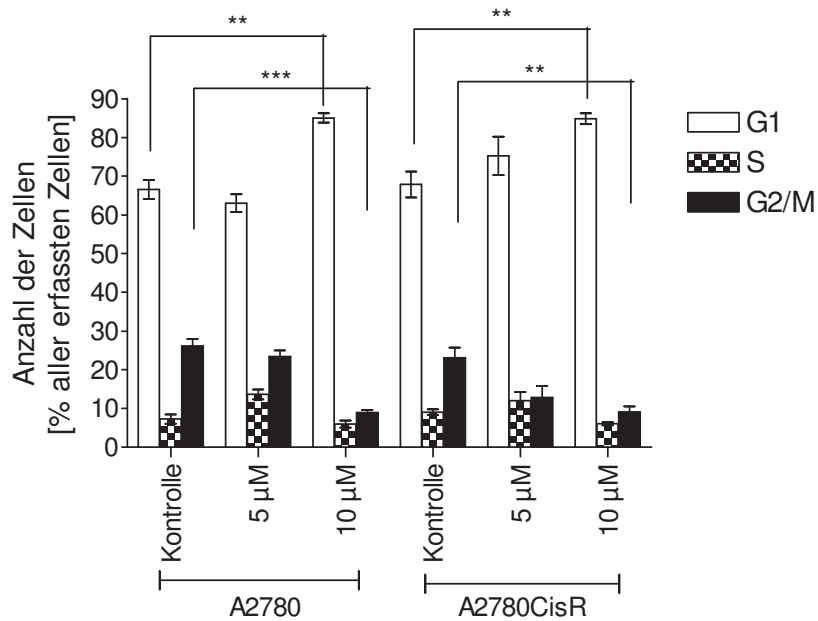
war sowohl die Induktion von Apoptose ($16,3 \pm 5,3\%$) als auch eine Membranschädigung ($30,4 \pm 4,0$) zu beobachten. Die höhere Konzentration von $5 \mu\text{M}$ induzierte nach 6h sowohl Apoptose ($4,8 \pm 1,7\%$), als auch eine Membranschädigung ($7,1 \pm 0,6\%$). Nach 10h war, ebenso wie für $2 \mu\text{M}$ und 24h, eine stärkere Schädigung der Membran ($18,9 \pm 5,9\%$) im Vergleich zur Induktion der Apoptose ($9,7 \pm 0,2\%$) erkennbar. In beiden Fällen waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant (vgl. Abbildung 42 A). Im Vergleich dazu wurde CCCP untersucht. Nach 2h, 6h und 10h war eine geringfügige Steigerung des Anteils apoptotischer Zellkerne und des Anteils an Zellen mit Membranschädigung zu beobachten. Zu diesen Zeitpunkten war das Ausmaß beider Effekte gleich. Nach 24h wurde signifikant ($p < 0,05$) mehr Apoptose ($25,6 \pm 2,1\%$) als Membranschädigung ($11,5 \pm 4,0\%$) induziert.

Die Zellzyklusverteilung veränderte sich unter Torrubellin signifikant in den Zelllinien A2780, A2780CisR und HCC38CisR hin zu einer Steigerung des Anteils an Zellen in der G_1 -Phase bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils an Zellen in der G_2/M -Phase. Dieser Effekt war bei den Zelllinien A2780 und A2780CisR lediglich für die Konzentration von $10 \mu\text{M}$ signifikant. Der Anteil an den Zellen in der G_1 -Phase stieg von $66,6 \pm 2,5\%$ auf $85,0 \pm 1,1\%$ (A2780) bzw. von $67,9 \pm 3,4\%$ auf $84,8 \pm 1,4\%$ (A2780CisR). Dabei sank der Anteil von Zellen in der G_2/M -Phase von $26,1 \pm 1,8\%$ auf $9,0 \pm 0,61\%$ (A2780) bzw. von $23,1 \pm 2,6\%$ auf $9,1 \pm 1,5\%$ (A2780CisR; vgl. Abbildung 43 A). An der Zelllinie HCC38CisR konnten beide eingesetzten Konzentrationen diesen Effekt signifikant auslösen. Das Ausmaß des Effektes lag im Bereich der A2780-Zelllinien. An der Zelllinie HCC38 wurde kein signifikanter Effekt beobachtet. Diese Zelllinie zeigte jedoch im Vergleich zu den anderen 3 Zelllinien bereits in der unbehandelten Kontrolle einen hohen Anteil an Zellen in der G_1 -Phase ($78,5 \pm 1,5\%$; vgl. Abbildung 43 B).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Torrubellin B mit einem IC_{50} von $13,0 \mu\text{M}$ ($\text{pIC}_{50} = 4,89 \pm 0,08$) die Rückfaltung der Luciferase durch HSP90 inhibieren kann (vgl. Abbildung 44 A). Zum Vergleich wurde der bekannte HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 herangezogen, dessen IC_{50} bei $199,5 \text{ nM}$ lag (vgl. Abbildung 44 B). Während durch Torrubellin B die Lumineszenzintensität in der höchsten Konzentration vollständig unterdrückt werden konnte, wurde diese durch NVP-AUY922 maximal auf 54% der Lumineszenzintensität der Kontrolle reduziert. Für N-terminale HSP90-Inhibitoren, wie das NVP-AUY922 wurden im Luciferase-Rückfaltungs-Assay nur eine Hemmung der Lumineszenzintensität von 40-50% beschrieben. Der C-terminale Inhibitor Novobiocin war

jedoch in der Lage die Lumineszenzintensität vollständig zu hemmen [Sadikot *et al*, 2013], [Moita, 2017].

A



B

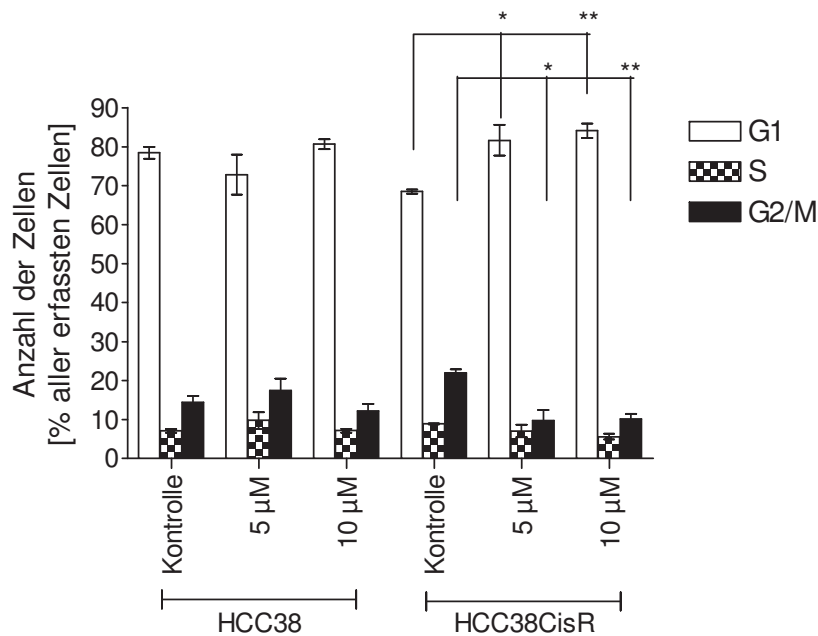
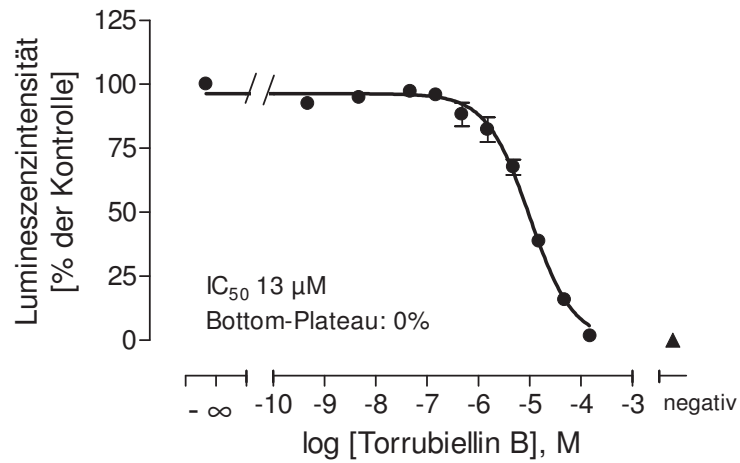


Abbildung 43 Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit Torribiellin B. Torribiellin B wurde in den Konzentrationen von 5 µM und 10 µM für 24h an den Zelllinien A2780 (**A**) und HCC38 (**B**) inkubiert. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

A



B

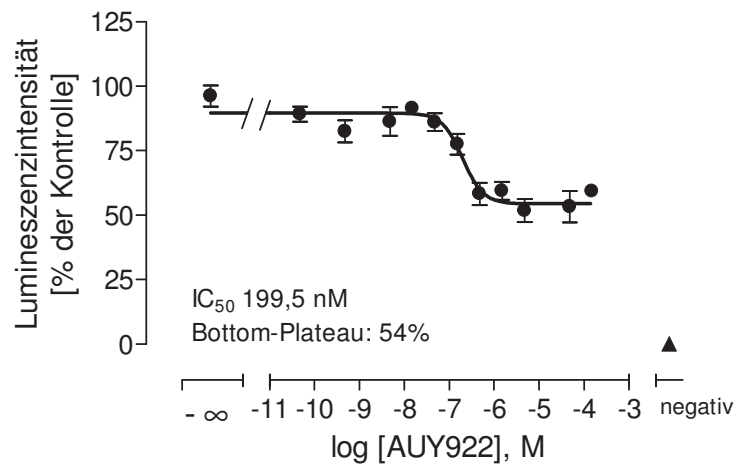


Abbildung 44 HSP90 Assay. Ermittlung des IC₅₀ im HSP90-Assay für Torrubieillin B (**A**) im Vergleich zu dem bekannten HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 (**B**). Die Negativkontrolle enthielt kein Zelllysate. Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

7. Diskussion

7.1 Beeinflussung der Cisplatin sensitivität von HCC38 und HCC38CisR

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cisplatinresistenz der Zelllinie HCC38 mit einer Aktivierung des EGFR und IGF1R sowie des nachgeschalteten PI3K/Akt-Signalwegs assoziiert ist. Daraufhin erwies sich die gleichzeitige Behandlung mit einem EGFR- und einem IGF1R-Inhibitor als synergistisch in Bezug auf die Induktion von Apoptose. Die Cisplatinresistenz konnte durch NVP-BEZ235 als dualen Inhibitor von PI3K und mTOR überwunden werden. Diese Ergebnisse konnten durch Daten an der ebenfalls triple-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 untermauert werden.

Der Einsatz von HDACi als eine weitere Möglichkeit, die Sensitivität für Cisplatin in der TNBC-Zelllinie HCC38 und dessen cisplatinresistentem Subklon zu erhöhen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht. Zunächst wurde für den bereits zugelassenen HDACi Panobinostat gezeigt, dass die Substanz in der Lage war, die Cisplatinsensitivität in der cisplatinsensitiven und -resistenten Zelllinie zu erhöhen (vgl. Abbildung 20 A). Der zum Vergleich getestete HDACi Vorinostat konnte in fast gleichem Ausmaß den IC_{50} für Cisplatin an beiden Zelllinien senken (vgl. Abbildung 20 B). Die Inhibition der HDAC war somit ursächlich für die Sensitivierung für Cisplatin verantwortlich. Der Synergismus zwischen Panobinostat und Cisplatin wurde durch Ermittlung der Cls (vgl. Tabelle 11) und im Apoptose Assay (vgl. Abbildung 21) bestätigt. Für die Ermittlung der Cls wurde nur die Zelllinie HCC38 verwendet. Da jedoch bei der 48-stündigen Präinkubation mit Panobinostat für beide Zelllinien ein deutlicher Effekt auf den IC_{50} für Cisplatin beobachtet werden konnte, wurde ein Synergismus für beide Zelllinien angenommen. Die Behandlung mit dem HDACi LMK235 führte zu einer noch stärkeren Sensitivierung für Cisplatin als mit Panobinostat bzw. Vorinostat, da die IC_{50} -Werte für beide Zelllinien nach Präinkubation mit LMK235 fast zweifach unter denen nach Präinkubation mit den anderen HDACi lagen (vgl. Abbildung 23). Die eingesetzten Konzentrationen der HDAC-Inhibitoren waren dabei äquitoxisch und entsprachen an der Zelllinie HCC38 etwa einer IC_{75} und an der Zelllinie HCC38CisR etwa einer IC_{90} . Ebenso wie für Panobinostat konnte der Synergismus zwischen LMK235 und Cisplatin durch Ermittlung der Cls an der Zelllinie HCC38 (vgl. Tabelle 13) und im Apoptose Assay (vgl. Abbildung 24) bestätigt werden.

7.1 Beeinflussung der Cisplatinsensitivität von HCC38 und HCC38CisR

Bei der Betrachtung der Zeitabhängigkeit des Effekts von LMK235 auf die Erhöhung der Cisplatinsensitivität, konnte gezeigt werden, dass die 48-stündige Präinkubation vor der Behandlung mit Cisplatin der Koinkubation überlegen war (vgl. Abbildung 26). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Kim *et al.*, die gezeigt haben, dass die Präinkubation von Tumorzellen mit den HDACi Vorinostat oder Trichostatin A die Zytotoxizität von Cisplatin stärker steigern konnte, als eine Inkubation nach Zugabe des Zytostatikums [Kim *et al.*, 2003]. Vermutlich benötigen HDACi eine gewisse Zeitspanne um diejenigen epigenetischen Effekte auszulösen, die für die Erhöhung der Sensitivität für Cisplatin zuständig sind. Aus diesem Grund wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Fähigkeit von LMK235, die Zelllinien HCC38 und HCC38CisR für die Behandlung mit Cisplatin zu sensitivieren, nach 48-stündiger Präinkubation mit dem HDACi untersucht. Der IC_{50} für Cisplatin war konzentrationsabhängig und sank mit steigender Konzentration von LMK235 (vgl. Abbildung 27 A/B). Wurde der resultierende IC_{50} für Cisplatin gegen die verwendete Konzentration von LMK235 aufgetragen, ließ sich ein exponentieller Verlauf darstellen (vgl. Abbildung 27 C/D). Aus diesem Grund sollten die verwendete Konzentration bei der Behandlung mit HDACi sorgfältig ausgewählt werden, um ineffektive Therapien zu vermeiden.

Da HDACi die zellulären Prozesse auf vielfältige Weise beeinflussen können, ist die Identifikation von bestimmten, für die Wirkung verantwortlichen, Angriffspunkten schwierig. Die Beeinflussung des Zellzyklus war an beiden Zelllinien (HCC38 und HCC38CisR) und für beide HDACi (Panobinostat, vgl. Abbildung 22 und LMK235, vgl. Abbildung 25) nur sehr schwach ausgeprägt. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen [Xue *et al.*, 2016] war dies vermutlich nicht der hauptsächliche Wirkmechanismus an den Zelllinien HCC38 und HCC38CisR. Die Analyse der Genexpressionsdaten mit Hilfe von DAVID [Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b] lieferte einen Überblick über die durch die HDACi beeinflussten Signalwege. Die Behandlung der Zelllinie HCC38CisR mit LMK235 oder Panobinostat führte zu einer überproportional starken Herunterregulierung von Genen, die im ErbB-Signalweg eine Rolle spielen (vgl. Tabelle 14). Dass die Aktivierung des EGFR und IGF1R sowie des ihnen nachgeschalteten PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs eine Rolle in der Cisplatinresistenz der Zelllinie HCC38CisR spielt, konnte bereits gezeigt werden [Gohr *et al.*, 2017]. Auch auf Genexpressionsebene zeigte der Vergleich von HCC38CisR mit der Ursprungszelllinie HCC38 eine überproportionale Steigerung der Genexpression von Mitgliedern des ErbB-Signalwegs (vgl. Tabelle 14). Dies alles sprach dafür, dass die negative Regulation des ErbB-Signalwegs

einer der Angriffspunkte war, die zu einer durch die Behandlung mit HDACi induzierten Revertierung der Cisplatinresistenz der Zelllinie HCC38CisR führten. Indem ein weiterer Inhibitor, der den ErbB-Signalweg hemmt, mit LMK235 kombiniert wurde, sollte die Cisplatinsensitivität von HCC38CisR weiter gesteigert werden. Dies war mit dem EGFR/ErbB2 Inhibitor Lapatinib und dem IGF1R-Inhibitor NVP-AEW541 nicht möglich (vgl. Abbildung 28). NVP-BEZ235 als Inhibitor von PI3K und mTOR konnte in Kombination mit LMK235 jedoch den IC_{50} für Cisplatin der Zelllinie HCC38CisR auf 0,89 μ M, und somit auf die Hälfte des durch LMK235 allein erzielten IC_{50} , senken (vgl. Abbildung 29). Im Western Blot konnte zusätzlich zu der bereits gezeigten Aktivierung des EGFR und IGF1R eine verstärkte Expression von PI3K in HCC38CisR gezeigt werden, die vermutlich zusätzlich zur verstärkten Phosphorylierung von Akt beitrug (vgl. Abbildung 31). LMK235 alleine konnte die PI3K Expression leicht vermindern, ohne dass dies einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt hatte. Die Kombination von NVP-BEZ235 und LMK235 war jedoch in der Lage, die PI3K Expression und die Phosphorylierung von Akt stark zu vermindern, ohne einen Einfluss auf die Expression von Akt zu zeigen (vgl. Abbildung 31). Auch die Phosphorylierung des EGFR und IGF1R wurde so stark vermindert, dass sie weniger stark sichtbar war, als in der Ursprungszelllinie HCC38. Diese umfassende Inhibition des EGFR, des IGF1R und des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges hatte starken Einfluss auf den IC_{50} für Cisplatin der Zelllinie HCC38CisR. Durch die Kombination von LMK235 und NVP-BEZ235 lag der IC_{50} unterhalb des IC_{50} der Ursprungszelllinie HCC38. Der Synergismus von Vorinostat und NVP-BEZ235 bezüglich der Inhibition des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs und somit auch bezüglich der Zytotoxizität wurde bereits an Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien beschrieben [Erlich *et al*, 2012]. Unsere Resultate an TNBC-Zellen stehen im Einklang mit diesen Ergebnissen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Cisplatinresistenz, die auf der verstärkten Aktivierung dieses Signalwegs beruhte, durch den HDACi alleine vollständig revertiert werden konnte und sich die Cisplatinsensitivität in Kombination mit NVP-BEZ235 sogar über die der Ursprungszelllinie steigern ließ.

Außerdem ist erwähnenswert, dass die Genexpression der Zelllinie HCC38-Panobinostat, im Vergleich zu HCC38, nicht die in der Zelllinie HCC38CisR beobachtete verstärkte Expression von Genen des ErbB-Signalwegs zeigte (EASE Score: 0,66, vgl. Tabelle 15). Die Zelllinie HCC38-LMK liegt in etwa zwischen der Zelllinie HCC38CisR und HCC38-Panobinostat. Trotz insgesamt höherer Expression von Mitgliedern des ErbB-Signalwegs lässt sich auch für diese Zelllinie keine signifikante Aktivierung des ErbB-Signalwegs zeigen (EASE-Score: 0,13). Die

partielle Verhinderung der Ausbildung der Cisplatinresistenz (vgl. Abbildung 32) durch die dauerhafte Inkubation mit einem der beiden HDACi könnte deshalb auf der Verhinderung der Aktivierung dieses Signalwegs beruhen.

Die Zelllinie HCC38 zeigte keine verstärkte Aktivierung des ErbB Signalwegs (vgl. Fig. 3E). Trotzdem konnte durch LMK235 an dieser Zelllinie die Sensitivität für Cisplatin gesteigert werden. Der Effekt von LMK235 muss also auf einem anderen Angriffspunkt beruhen. Dies bleibt der Gegenstand weiterführender Untersuchungen und zeigt die vielfältigen Möglichkeiten der Beeinflussungen der Tumorzellen durch HDACi. Insgesamt konnte für den HDACi LMK235 ein im Vergleich zu Panobinostat überlegener Effekt hinsichtlich der Sensitivierung der TNBC-Zelllinie HCC38 und dessen cisplatinresistentem Subklon für die Behandlung mit Cisplatin gezeigt werden. Die dabei eingesetzten Konzentrationen der beiden HDAC Inhibitoren waren äquitoxisch. LMK235 konnte eine bereits manifeste Cisplatinresistenz vollständig revertieren. Dieser Effekt konnte durch die Kombination mit dem PI3K und mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 weiter gesteigert werden. Dies lag daran, dass beide Substanzen den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in der Zelllinie HCC38CisR beeinflussten. Der Einsatz von HDACi bei triple-negativem Brustkrebs ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Da die alleinige Behandlung von soliden Tumoren mit HDAC Inhibitoren bisher keine zufriedenstellenden Ergebnisse zeigte, tendiert der Großteil der Studien zu einer Kombinationstherapie [Garmpis *et al*, 2017]. Durch unsere Daten können Cisplatin und NVP-BEZ235 als potentielle Therapien in Kombination mit HDACi in einem triple negativen Mammakarzinom mit aktiviertem PI3K/Akt-Signalweg vorgeschlagen werden.

Insgesamt konnten in diesem Teil der Arbeit 4 verschiedene Ansätze für die Behandlung einer TNBC-Zelllinie bzw. ihres cisplatinresistenten Subklons aufgezeigt werden:

- 1) Die Kombination von NVP-AEW541 und Lapatinib wirkte stark synergistisch hinsichtlich der Zytotoxizität in einer cisplatinresistenten TNBC-Zelllinie mit aktiviertem EGFR und IGF1R.
- 2) Die Behandlung dieser cisplatinresistenten Zelllinie mit NVP-BEZ235 und Cisplatin führte zu einem Synergismus beider Substanzen mit einer kompletten Revertierung der Cisplatinresistenz.
- 3) HDAC-Inhibitoren wirkten synergistisch mit Cisplatin in der cisplatinsensitiven und –resistenten Zelllinie. Dabei konnten sie eine bestehende Cisplatinresistenz vollständig revertieren und die Ausbildung einer Cisplatinresistenz partiell verhindern.

7 Diskussion

- 4) Beruht die Cisplatinresistenz auf einer Aktivierung von RTKs und dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, kann die Kombination eines HDAC Inhibitors (hier: LMK235) mit NVP-BEZ235 die Cisplatinresistenz über den ursprünglich sensiblen Zustand hinaus steigern.

Abbildung 45 zeigt eine Zusammenfassung der o.g. Therapieansätze.

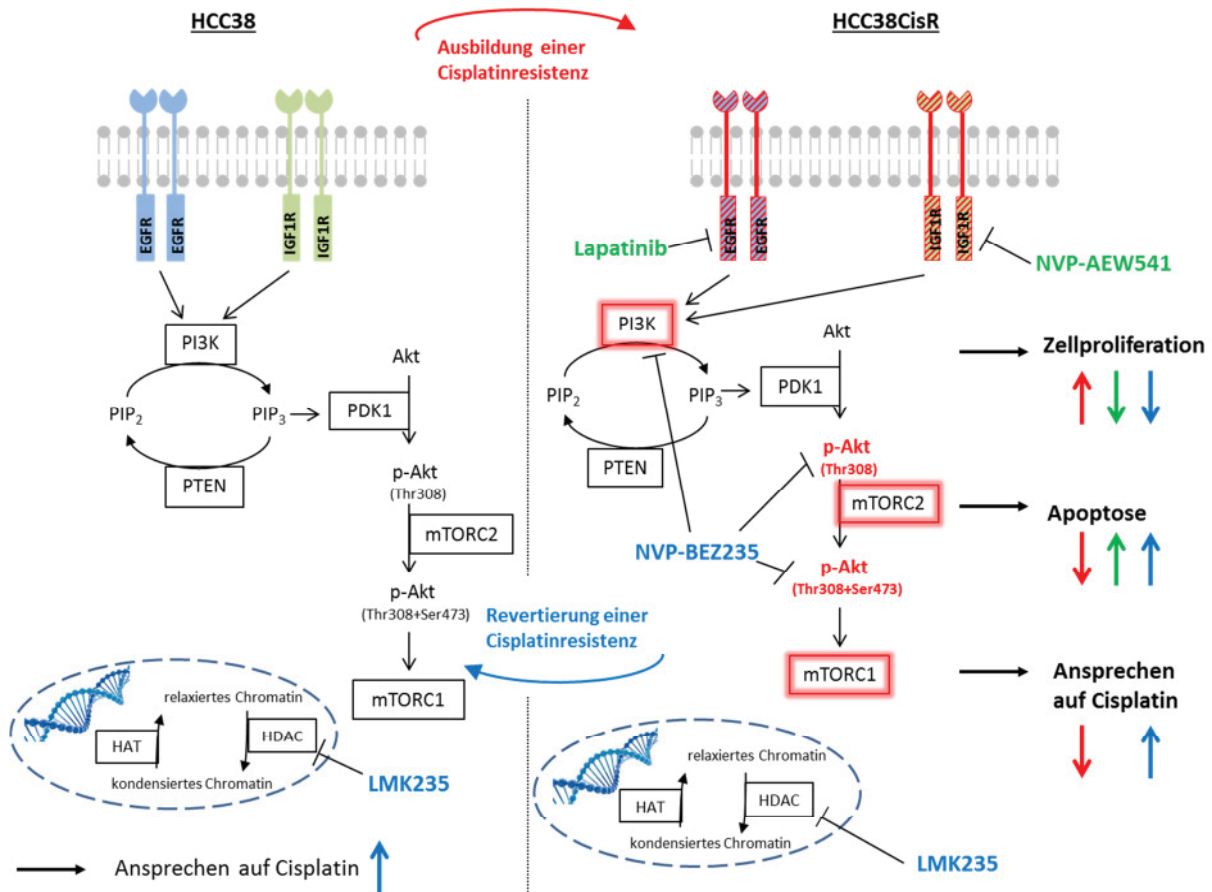


Abbildung 45 Zusammenspiel der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren. Rot zeigt eine Hyperaktivität im Zusammenhang mit der Ausbildung einer Cisplatinresistenz. Grün zeigt Target und Effekt der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren. Blau zeigt Target und Effekt der von LMK235 und NVP-BEZ235.

Für den zielgerichteten Einsatz der o.g. Therapieansätze an cisplatinresistenten Zellen bzw. generell in der Tumorthherapie könnte eine Phosphorylierung von RTKs bzw. Akt einen potentiellen Biomarker darstellen.

Weder die 48-stündige Präinkubation mit HDACi noch mit NVP-BEZ234, NVP-AEW541 oder Lapatinib konnte die Zelllinien HCC38 oder HCC38CisR für eine Behandlung mit Paclitaxel sensitivieren (Abbildung 35 - Abbildung 37). Da, wie in den vorherigen Abschnitten

ausgeführt, alle erwähnten Substanzen direkt oder indirekt einen Einfluss auf den ErbB-Signalweg bzw. den ihm nachgeschalteten PI3K/Akt/mTOR-Signalweg besitzen, konnte davon ausgegangen werden, dass die Inhibition dieser Signalwege auf die Sensitivität der Zelllinien HCC38 bzw. HCC38CisR gegenüber Paclitaxel keinen entscheidenden Einfluss hatte. Im Gegensatz dazu ist in der Literatur an Schilddrüsenkarzinomzelllinien und einer Melanomzelllinie beschrieben, dass Inhibitoren des EGFR-Signalweges die Sensitivität für Paclitaxel erhöhen können [Landriscina *et al*, 2010], [Zhang *et al*, 2013]. Auch für HDAC Inhibitoren gibt es entsprechende Literatur an Ovarialkarzinomzelllinien und Brustkrebszelllinien [Liu *et al*, 2014], [Robertson *et al*, 2013]. Die neuen Therapieansätze (HDAC-Inhibition und EGFR-Inhibition) erwiesen sich an den hier untersuchten Tumorzelllinien HCC38 und HCC38CisR jedoch als selektiv für die Behandlung mit Cisplatin.

7.2 Der Naturstoff Torrubellin B

Zu den in [Hemphill *et al*, 2015] präsentierten IC_{50} -Werten für Torrubellin B, wurden die IC_{50} -Werte der 3 Blasenkarzinom-Zelllinien J82, J82CisR und RT-112 ergänzt. Die IC_{50} -Werte lagen im Bereich von 0,16 μ M bis 2,6 μ M (vgl. Abbildung 38). Beim Vergleich dieser Werte mit den unter den gleichen Bedingungen ermittelten IC_{50} -Werten für Cisplatin (vgl. Tabelle 16) fiel auf, dass die Höhe des IC_{50} für Cisplatin nicht das Ansprechen auf Torrubellin B vorhersagen konnte. Die aus den IC_{50} -Werten an den jeweils cisplatinsensitiven und -resistenten Zellpärchen (vgl. Tabelle 17) berechneten Resistenzfaktoren waren in allen Fällen, mit Ausnahme von Cal27, für Cisplatin höher als für Torrubellin B. In 3 Fällen (HCC38, Kyse510, J82) war Torrubellin B stärker zytotoxisch an der cisplatinresistenten Zelllinie als an der Ursprungszelllinie. Dies alles untermauerte die Stellung von Torrubellin B als Substanz, deren Zytotoxizität unabhängig vom Ansprechen der Zelllinien auf Cisplatin war. Da der IC_{50} für Torrubellin B an der Zelllinie HEK293 in etwa im Bereich der verwendeten Tumor-Zelllinien war, kann die Substanz nicht als selektiv toxisch auf Karzinomzellen beschrieben werden. Beim Vergleich der Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von Torrubellin B und Cisplatin sank der IC_{50} für beide Substanzen erwartungsgemäß von der 24-stündigen bis zur 72-stündigen Inkubationszeit. Bei Betrachtung des Verhältnisses der IC_{50} -Werte an der Zelllinie A2780 nach 72h, 48h und 24h fiel auf, dass der IC_{50} für Torrubellin B schneller sank, als der für Cisplatin. Während die IC_{50} -Werte für Torrubellin B nach 48h und 72h nahezu identisch waren, lag zwischen den IC_{50} -Werten für Cisplatin noch ein Faktor von 3,5. An der

Zelllinie HCC38 war dieser deutliche Effekt nur beim Vergleich der IC_{50} -Werte nach 72h und 24h erkennbar (vgl. Abbildung 39). Der Eintritt der zytotoxischen Wirkung von Torrubellin B erfolgte also schneller als der von Cisplatin und legte somit einen Wirkmechanismus nahe, der schneller als der von Cisplatin zum Zelltod führte.

Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials für Naturstoffe mit Anthracengrundgerüst wurde des Öfteren beschrieben [Xie *et al*, 2008; Xing *et al*, 2015] und könnte einer der Mechanismen sein, durch die Torrubellin B zum Zelltod führte. Die Experimente zur Detektion des Mitochondrienpotentials zeigten, dass Torrubellin B zu einer Abnahme des Mitochondrienpotentials in den Zelllinien führte, da an den 4 untersuchten Zelllinien in allen Fällen konzentrationsabhängig die mittlere Fluoreszenzintensität abnahm (vgl. Abbildung 40 A/D). In der Regel wird die Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials durch zwei verschiedene Wege induziert. Entweder handelt es sich bei der Substanz um ein Protonophor, wie das in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendete CCCP, das Protonen über die innere Mitochondrienmembran transportiert, oder die Substanz induziert über verschiedene Wege ein Protonenleck, durch das Protonen ungehindert die Membran passieren können [Kadenbach, 2003]. In beiden Fällen kommt es zu einer Aufhebung des Protonengradienten. Auf welchem Weg Torrubellin B als Entkoppler wirkt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Als lipophile Substanz, die in der Lage ist, ein Proton abzugeben und trotzdem Biomembranen passieren kann, wäre eine Wirkung als Protonophor denkbar. Die im weiteren Verlauf detektierte Wirkung auf die Integrität der Zellmembran (vgl. Abbildung 42) legte jedoch gleichermaßen eine Schädigung der Mitochondrienmembran mit nachfolgendem Protonenleck nahe. Interessanterweise lag der an der Zelllinie A2780 nach einstündiger Inkubation abgeschätzte IC_{50} von Torrubellin B für die Aufhebung des Mitochondrienpotentials mit $0,78 \mu\text{M}$ im Bereich des IC_{50} , der im MTT Assay für die Zytotoxizität ermittelt wurde (vgl. Abbildung 40 C). Der Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten im Mitochondrien-Assay zeigte nahezu keine Veränderung von der ein- zur zweistündigen Behandlung mit Torrubellin B (vgl. Abbildung 40 A). Der Effekt von Torrubellin B auf das Mitochondrienpotential war also bereits nach einer Stunde nahezu voll ausgeprägt, während der Effekt auf die Zellviabilität erst nach ca. 48h voll ausgeprägt war (vgl. Abbildung 39 A). Ebenso verhielt es sich mit der Induktion von Apoptose. Der Apoptose Assay zeigte, dass Torrubellin B konzentrations- und zeitabhängig in allen vier untersuchten Zelllinien Apoptose auslöste (vgl. Abbildung 41). Trotz eines fast vollständigen Verlusts des

7.2 Der Naturstoff Torrubellin B

Mitochondrienpotentials nach zweistündiger Behandlung mit 2 μ M Torrubellin B (vgl. Abbildung 40 A/D), konnte erst nach 48h in deutlichem Ausmaß Apoptose detektiert werden. An Osteosarkom-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass der mitochondriale Entkoppler CCCP zwar den Protonengradienten der Mitochondrien aufhob, dass dies aber nicht zwangsweise zur Ausschüttung von Cytochrom C und nachfolgender Induktion von Apoptose führen musste [Lim *et al*, 2001]. An der Leukämie-Zelllinie K562 wurde ebenfalls nicht zwingend das Auftreten von Apoptose nach Entkopplung des Mitochondrienpotentials detektiert [Mlejnek & Dolezel, 2015]. Der frühzeitige Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials steht also nicht im Widerspruch zur erst später auftretenden Induktion von Apoptose und könnte somit zur beobachteten Zytotoxizität von Torrubellin B beitragen.

Als ein weiterer potentieller Angriffspunkt von Torrubellin B wurde aufgrund der Lipophilie der Substanz eine Schädigung der Zellmembran diskutiert. Der parallel durchgeführte Vergleich des Ausmaßes von ausgelöster Apoptose und induzierter Membranschädigung zeigte, dass der Anteil an Zellen mit Membranschädigung den Anteil an Zellen, in denen Apoptose sichtbar war, überstieg (vgl. Abbildung 42 A). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Substanz CCCP löste im Gegensatz nach 24h deutlich mehr Apoptose als Membranschäden aus (vgl. Abbildung 42 B). Zum einen führte also der bereits nach 10min deutlich sichtbare Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials unter CCCP (vgl. Abbildung 40 B) erst nach 24h zu einem deutlichen Anstieg an apoptotischen Zellkernen in der hier verwendeten Messmethode. Dies entsprach den Ergebnissen für Torrubellin B, das in der Konzentration von 2 μ M nach 1h zur Abnahme des Mitochondrienpotentials führte, Apoptose aber erst nach 48h auslöste. Zum anderen war es wahrscheinlich, dass für die Zytotoxizität von Torrubellin B neben der Beeinträchtigung des Mitochondrienpotentials auch eine Membranschädigung verantwortlich war.

Die Analyse der Zellzyklusverteilung, zeigte einen weiteren potentiellen Mechanismus für die zytotoxische Wirkung von Torrubellin B auf. Für alle Zelllinien, außer HCC38, wurde ein G₁-Zellzyklusarrest beobachtet. Dies könnte durch die Aufhebung des Mitochondrienpotentials bedingt sein, da auch für den Entkoppler FCCP ein G₁-Phasenarrest, der zur Proliferationshemmung beitrug, beschrieben wurde [Han *et al*, 2009]. Da auch für HSP90-Inhibitoren ein Zellzyklus-Arrest beschrieben wurde [Zhao *et al*, 2016], könnte ebenfalls die unten beschriebene Inhibition von HSP90 durch Torrubellin B (vgl. Abbildung 44 A) zum G₁-

Arrest beitragen. Außerdem wäre ein direkter Einfluss von Torrubellin B auf die Zellzyklusverteilung denkbar.

Als weiteren potentiellen Mechanismus, der zur Zytotoxizität von Torrubellin B beitragen könnte, wurde die Inhibition der Funktion des Chaperons HSP90 identifiziert (vgl. Abbildung 44). Chaperone sind in der Zelle für die korrekte Faltung von Proteinen und die Aufrechterhaltung dieser zuständig. Falsch gefaltete Proteine werden von ihnen erkannt und abgebaut [Zhao & Houry, 2005]. Innerhalb der Chaperone nimmt HSP90 eine Schlüsselrolle ein. Zu den sogenannten Client-Proteinen, deren Funktion von der korrekten Faltung durch HSP90 abhängig ist, zählen beispielsweise Akt [Bai *et al*, 2011], Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie [Lee *et al*, 2011] und Steroidrezeptoren [Wayne *et al*, 2011]. Da diese und weitere Client-Proteine im Tumorgeschehen eine Rolle spielen, lag ein Einsatz von HSP90-Inhibitoren in der Tumorthherapie nahe. Der Großteil der bisher entwickelten HSP90-Inhibitoren, wie z.B. NVP-AUY922, binden an die N-terminale ATP-Bindungsstelle und unterbrechen so den Zyklus der Proteinfaltung durch HSP90 [Kim & Kim, 2011]. Im Vergleich zu dem bekannten HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 zeigte Torrubellin B einen höheren IC_{50} . Nichtsdestotrotz konnte die Rückfaltung der Luciferase durch Torrubellin B in der höchsten Konzentration vollständig inhibiert werden, während dies durch NVP-AUY922 nicht der Fall war (vgl. Abbildung 44). Wie bereits erwähnt, können N-terminale Inhibitoren von HSP90, wie NVP-AUY922, die Lumineszenzintensität im Luciferase-Rückfaltungs-Assay nur um 40-50% senken [Moita, 2017]. Ein selektiver Angriff von Torrubellin B an der ATP-Bindungsstelle von HSP90 erschien deshalb unwahrscheinlich. Ob Torrubellin B an einer anderen Bindungsstelle von HSP90 bindet oder ob nicht die Inhibition von HSP90 selbst, sondern eines für die Funktionsfähigkeit notwendigen Co-Chaperons für die fehlende Rückfaltung der Luciferase verantwortlich war, wurde aber nicht abschließend geklärt.

Insgesamt wurden 4 Angriffspunkte von Torrubellin B identifiziert, die zu der bereits beschriebenen Zytotoxizität der Substanz führten:

- 1) Das Mitochondrienpotential wurde aufgehoben.
- 2) Die Integrität der Zellmembran wurde beeinträchtigt.
- 3) Die Zellen zeigten einen G_1 -Arrest.
- 4) Die Funktion der HSP90-Maschinerie wurde gehemmt.

7.2 Der Naturstoff Torrubellin B

Dies alles führte zur Hemmung der Proliferation und Induktion von Apoptose unabhängig von der Sensitivität der Zelllinien für die Behandlung mit Cisplatin.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass mehrere Therapieansätze für das cisplatinresistente triple-negative Mammakarzinom vorgeschlagen werden konnten, wobei die Aktivierung von RTKs bzw. Akt einen potentiellen Biomarker für den Einsatz dieser darstellte. Als Leitstruktur für völlig neue Zytostatika, deren Zytotoxizität unabhängig vom Resistenzstatus gegenüber Cisplatin ist, könnte Torrubellin B dienen, dessen vielfältigen zellulären Wirkungen weiter charakterisiert wurden.

Literaturverzeichnis

Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* (2005) **24**(50): 7455-64

Ayub A, Yip WK, Seow HF. Dual treatments targeting IGF-1R, PI3K, mTORC or MEK synergize to inhibit cell growth, induce apoptosis, and arrest cell cycle at G1 phase in MDA-MB-231 cell line. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* (2015) **75**: 40-50

Bai L, Xu S, Chen W, Li Z, Wang X, Tang H, Lin Y. Blocking NF-kappaB and Akt by Hsp90 inhibition sensitizes Smac mimetic compound 3-induced extrinsic apoptosis pathway and results in synergistic cancer cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* (2011) **16**(1): 45-54

Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehar J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P, Jr., de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palescandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* (2012) **483**(7391): 603-7

Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* (2009) **9**(7): 463-75

Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R. The novel orally bioavailable inhibitor of phosphoinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin, NVP-BEZ235, inhibits growth and proliferation in multiple myeloma. *Experimental cell research* (2009) **315**(3): 485-97

Beckwith H, Yee D. Minireview: Were the IGF Signaling Inhibitors All Bad? *Mol Endocrinol* (2015) **29**(11): 1549-57

Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews Clinical oncology* (2016) **13**(11): 674-690

Borenfreund E, Shopsis C. Toxicity monitored with a correlated set of cell-culture assays. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* (1985) **15**(8-9): 705-11

Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Vina JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer treatment reviews* (2010) **36**(3): 206-15

Budman DR, Tai J, Calabro A, John V. The histone deacetylase inhibitor panobinostat demonstrates marked synergy with conventional chemotherapeutic agents in human ovarian cancer cell lines. *Invest New Drugs* (2011) **29**(6): 1224-9

Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RH, Wiemer EA. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* (2011) **14**(1): 22-34

Burris HA, 3rd, Hurwitz HI, Dees EC, Dowlati A, Blackwell KL, O'Neil B, Marcom PK, Ellis MJ, Overmoyer B, Jones SF, Harris JL, Smith DA, Koch KM, Stead A, Mangum S, Spector NL. Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *J Clin Oncol* (2005) **23**(23): 5305-13

Camirand A, Zakikhani M, Young F, Pollak M. Inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor signaling enhances growth-inhibitory and proapoptotic effects of gefitinib (Iressa) in human breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR* (2005) **7**(4): R570-9

Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* (2010) **70**(2): 440-6

Connolly R, Stearns V. Epigenetics as a therapeutic target in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2012) **17**(3-4): 191-204

Darzynkiewicz Z, Juan G. Overview of nucleic acid analysis. *Curr Protoc Cytom* (2001) **Chapter 7**: Unit 7 1

Dickinson M, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect. *Invest New Drugs* (2010) **28 Suppl 1**: S3-20

Eckstein N, Servan K, Hildebrandt B, Politz A, von Jonquieres G, Wolf-Kummeth S, Napierski I, Hamacher A, Kassack MU, Budczies J, Beier M, Dietel M, Royer-Pokora B, Denkert C, Royer HD. Hyperactivation of the insulin-like growth factor receptor I signaling pathway is an essential event for cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Cancer Res* (2009) **69**(7): 2996-3003

Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, Wuskell JP, Loew LM. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophysical journal* (1988) **53**(5): 785-94

Engelke LH. Neue Ansätze zur Überwindung oder Verhinderung der Cisplatinresistenz in verschiedenen Krebszelllinien. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität (2015)

Engelke LH, Hamacher A, Proksch P, Kassack MU. Ellagic Acid and Resveratrol Prevent the Development of Cisplatin Resistance in the Epithelial Ovarian Cancer Cell Line A2780. *Journal of Cancer* (2016) **7**(4): 353-63

Erlich RB, Kherrouche Z, Rickwood D, Endo-Munoz L, Cameron S, Dahler A, Hazar-Rethinam M, de Long LM, Wooley K, Guminski A, Saunders NA. Preclinical evaluation of dual PI3K-mTOR inhibitors and histone deacetylase inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* (2012) **106**(1): 107-15

Farhan M, Wang H, Gaur U, Little PJ, Xu J, Zheng W. FOXO Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer. *International journal of biological sciences* (2017) **13**(7): 815-827

Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, Alam T, Alizadeh-Navaei R, Allen C, Alsharif U, Alvis-Guzman N, Amini E, Anderson BO, Aremu O, Artaman A, Asgedom SW, Assadi R, Atey TM, Avila-Burgos L, Awasthi A, Ba Saleem HO, Barac A, Bennett JR, Bensenor IM, Bhakta N, Brenner H, Cahuana-Hurtado L, Castaneda-Orjuela CA, Catala-Lopez F, Choi JJ, Christopher DJ, Chung SC, Curado MP, Dandona L, Dandona R, das Neves J, Dey S, Dharmaratne SD, Doku DT, Driscoll TR, Dubey M, Ebrahimi H, Edessa D, El-Khatib Z, Endries AY, Fischer F, Force LM, Foreman KJ, Gebrehiwot SW, Gopalani SV, Grosso G, Gupta R, Gyawali B, Hamadeh RR, Hamidi S, Harvey J, Hassen HY, Hay RJ, Hay SI, Heibati B, Hiluf MK, Horita N, Hosgood HD, Ilesanmi OS, Innos K, Islami F, Jakovljevic MB, Johnson SC, Jonas JB, Kasaeian A, Kassa TD, Khader YS, Khan EA, Khan G, Khang YH, Khosravi MH, Khubchandani J, Kopec JA, Kumar GA, Kutz M, Lad DP, Lafranconi A, Lan Q, Legesse Y, Leigh J, Linn S, Lunevicius R, Majeed A, Malekzadeh R, Malta DC, Mantovani LG, McMahon BJ, Meier T, Melaku YA, Melku M, Memiah P, Mendoza W, Meretoja TJ, Mezgebe HB, Miller TR, Mohammed S, Mokdad AH, Moosazadeh M, Moraga P, Mousavi SM, Nangia V, Nguyen CT, Nong VM, Ogbo FA, Olagunju AT, Pa M, Park EK, Patel T, Pereira DM, Pishgar F, Postma MJ, Pourmalek F, Qorbani M, Rafay A, Rawaf S, Rawaf DL, Roshandel G, Safiri S, Salimzadeh H, Sanabria JR, Santric Milicevic MM, Sartorius B, Satpathy M, Sepanlou SG, Shackelford KA, Shaikh MA, Sharif-Alhoseini M, She J, Shin MJ, Shiue I, Shrimme MG, Sinke AH, Sisay M, Sligar A, Sufiyan MB, Sykes BL, Tabares-Seisdedos R, Tessema GA, Topor-Madry R, Tran TT, Tran BX, Ukwaja KN, Vlassov VV, Vollset SE, Weiderpass E, Williams HC, Yimer NB, Yonemoto N, Younis MZ, Murray CJL, Naghavi M. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* (2018) **4**(11): 1553-1568

Foulkes WD, Smith IE, Reis JS. Triple-Negative Breast Cancer. *New Engl J Med* (2010) **363**(20): 1938-1948

Galam L, Hadden MK, Ma Z, Ye QZ, Yun BG, Blagg BS, Matts RL. High-throughput assay for the identification of Hsp90 inhibitors based on Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase. *Bioorganic & medicinal chemistry* (2007) **15**(5): 1939-46

Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* (2012) **31**(15): 1869-83

Garmpis N, Damaskos C, Garmpi A, Kalampokas E, Kalampokas T, Spartalis E, Daskalopoulou A, Valsami S, Kontos M, Nonni A, Kontzoglou K, Perrea D, Nikiteas N, Dimitroulis D. Histone Deacetylases as New Therapeutic Targets in Triple-negative Breast Cancer: Progress and Promises. *Cancer genomics & proteomics* (2017) **14**(5): 299-313

Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* (2009) **28 Suppl 1**: S24-31

Gediya LK, Chopra P, Purushottamachar P, Maheshwari N, Njar VC. A new simple and high-yield synthesis of suberoylanilide hydroxamic acid and its inhibitory effect alone or in combination with retinoids on proliferation of human prostate cancer cells. *J Med Chem* (2005) **48**(15): 5047-51

Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C, Hansen G, Woodbrook R, Wolfe C, Hamadeh RR, Moore A, Werdecker A, Gessner BD, Te Ao B, McMahon B, Karimkhani C, Yu C, Cooke GS, Schwebel DC, Carpenter DO, Pereira DM, Nash D, Kazi DS, De Leo D, Plass D, Ukwaja KN, Thurston GD, Yun Jin K, Simard EP, Mills E, Park EK, Catala-Lopez F, deVeber G, Gotay C, Khan G, Hosgood HD, 3rd, Santos IS, Leasher JL, Singh J, Leigh J, Jonas J, Sanabria J, Beardsley J, Jacobsen KH, Takahashi K, Franklin RC, Ronfani L, Montico M, Naldi L, Tonelli M, Geleijnse J, Petzold M, Shrimme MG, Younis M, Yonemoto N, Breitborde N, Yip P, Pourmalek F, Lotufo PA, Esteghamati A, Hankey GJ, Ali R, Lunevicius R, Malekzadeh R, Dellavalle R, Weintraub R, Lucas R, Hay R, Rojas-Rueda D, Westerman R, Sepanlou SG, Nolte S, Patten S, Weichenthal S, Abera SF, Fereshtehnejad SM, Shiue I, Driscoll T, Vasankari T, Alsharif U, Rahimi-Movaghar V, Vlassov VV, Marcenes WS, Mekonnen W, Melaku YA, Yano Y, Artaman A, Campos I, MacLachlan J, Mueller U, Kim D, Trillini M, Eshrati B, Williams HC, Shibuya K, Dandona R, Murthy K, Cowie B, Amare AT, Antonio CA, Castaneda-Orjuela C, van Gool CH, Violante F, Oh IH, Deribe K, Soreide K, Knibbs L, Kereselidze M, Green M, Cardenas R, Roy N, Tillman T, Li Y, Krueger H, Monasta L, Dey S, Sheikhabaehi S, Hafezi-Nejad N, Kumar GA, Sreeramareddy CT, Dandona L, Wang H, Vollset SE, Mokdad A, Salomon JA, Lozano R, Vos T, Forouzanfar M, Lopez A, Murray C, Naghavi M. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol* (2015) **1**(4): 505-27

Gohr K, Hamacher A, Engelke LH, Kassack MU. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR overcomes cisplatin resistance in the triple negative breast cancer cell line HCC38. *BMC Cancer* (2017) **17**(1): 711

Gosepath EM, Eckstein N, Hamacher A, Servan K, von Jonquieres G, Lage H, Gyorffy B, Royer HD, Kassack MU. 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* (2008) **123**(9): 2013-9

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews Genetics* (2009) **10**(1): 32-42

Han YH, Moon HJ, You BR, Kim SZ, Kim SH, Park WH. Effects of carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone on the growth inhibition in human pulmonary adenocarcinoma Calu-6 cells. *Toxicology* (2009) **265**(3): 101-7

Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* (1998) **351**(9113): 1393-6

Hartog H, Van Der Graaf WT, Boezen HM, Wesseling J. Treatment of breast cancer cells by IGF1R tyrosine kinase inhibitor combined with conventional systemic drugs. *Anticancer research* (2012) **32**(4): 1309-18

Hemphill CFP, Daletos G, Hamacher A, Kassack MU, Lin WH, Mandi A, Kurtan T, Proksch P. Absolute configuration and anti-tumor activity of torrubiellin B. *Tetrahedron Lett* (2015) **56**(30): 4430-4433

Hiddemann W, Bartram CR, Huber H. Die Onkologie. Vol. 2. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag (2010)

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* (2009a) **37**(1): 1-13

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* (2009b) **4**(1): 44-57

Huang F, Greer A, Hurlburt W, Han X, Hafezi R, Wittenberg GM, Reeves K, Chen J, Robinson D, Li A, Lee FY, Gottardis MM, Clark E, Helman L, Attar RM, Dongre A, Carboni JM. The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors. *Cancer Res* (2009c) **69**(1): 161-70

Huang X, Wang S, Lee CK, Yang X, Liu B. HDAC inhibitor SNDX-275 enhances efficacy of trastuzumab in erbB2-overexpressing breast cancer cells and exhibits potential to overcome trastuzumab resistance. *Cancer letters* (2011) **307**(1): 72-9

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* (2005) **5**(5): 341-54

Isaka M, Palasarn S, Tobwor P, Boonruangprapa T, Tasanathai K. Bioactive anthraquinone dimers from the leafhopper pathogenic fungus *Torrubiella* sp. BCC 28517. *The Journal of antibiotics* (2012) **65**(11): 571-4

Isakoff SJ, Mayer EL, He L, Traina TA, Carey LA, Krag KJ, Rugo HS, Liu MC, Stearns V, Come SE, Timms KM, Hartman AR, Borger DR, Finkelstein DM, Garber JE, Ryan PD, Winer EP, Goss PE, Ellisen LW. TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* (2015) **33**(17): 1902-9

Jiang W, Ji M. Receptor tyrosine kinases in PI3K signaling: The therapeutic targets in cancer. *Seminars in cancer biology* (2019)

Jin Q, Esteva FJ. Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2008) **13**(4): 485-98

Johnston J, Navaratnam S, Pitz M, Maniate J, Wiechec E, Baust H, Gingerich J, Skliris G, Murphy L, Los M. Targeting the EGFR Pathway for Cancer Therapy. *Current medicinal chemistry* (2006) **13**(29): 3483-3492

Jones HE, Gee JM, Hutcheson IR, Knowlden JM, Barrow D, Nicholson RI. Growth factor receptor interplay and resistance in cancer. *Endocr Relat Cancer* (2006) **13 Suppl 1**: S45-51

Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta Bioenergetics* (2003) **1604**(2): 77-94

Kaletsch A, Pinkernell M, Hoffmann MJ, Vasudevar AAJ, Hansen FK, Wiek C, Hanenberg H, Wang C, Gertzen C, Gohlke H, Kassack MU, Kurz T, Schulz WA, Niegisch G. Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells. *Clinical Epigenetics* (2018) **submitted**

Kauffmann G, Pentimalli R, Doldi S, Hall M. Michele Peyrone (1813-1883), Discover of Cisplatin. *Platinum Metals Rev* (2010) **54**(4): 250-25

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* (2007) **7**(8): 573-84

Kim LS, Kim JH. Heat shock protein as molecular targets for breast cancer therapeutics. *Journal of breast cancer* (2011) **14**(3): 167-74

Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res* (2003) **63**(21): 7291-300

Koboldt D, Fulton R, McLellan M, Schmidt H, Kalicki Veizer J, McMichael J, Fulton L, Dooling D, Ding L, Mardis E, Wilson R, Ally A, Balasundaram M, Chun H-JE, Carlsen R, Carter C, Chu A, Chuah E, Chun H-J, Holt RA, Dhalla N, Guin R, Hirst C, Hirst M, Holt R, Lee D, Li H, Mayo M, Moore R, Mungall A, Pleasance E, Gordon Robertson A, Schein J, Shafiei A, Sipahimalani P, Slobodan J, Stoll D, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zeng T, Zhao Y, Birol I, Pho NH, Marra M, Cherniack A, Saksena G, Onofrio R, Pho N, Carter S, Schumacher S, Tabak B, Hernandez B, Gentry J, Nguyen H, Crenshaw A, Ardlie K, Beroukhir R, Winckler W, Getz G, Gabriel S, Meyerson M, Chin L, Park P, Kucherlapati R, Hoadley K, Todd Auman J, Fan C, Turman Y, Shi Y, Li L, Topal M, He X, Chao H-H, Prat A, Silva G, Iglesia M, Zhao W, Usary J, Berg J, Adams M, Booker J, Wu J, Gulabani A, Bodenheimer T, Hoyle A, Simons J, Soloway M, Mose L, Jefferys S, Balu S, Parker J, Neil Hayes D, Perou C, Malik S, Mahurkar S, Shen H, Weisenberger D, Triche Jr T, Lai P, Bootwalla M, Maglinte D, Berman B, Baylin S, Laird P, Creighton C, Donehower L, Noble M, Voet D, Gehlenborg N, DiCara D, Zhang J, Zhang H, Wu C-J, Yingchun Liu S, Lawrence M, Zou L, Sivachenko A, Lin P, Stojanov P, Jing R, Cho J, Sinha R, Park R, Nazaire M-D, Robinson J, Thorvaldsdottir H, Mesirov J, Reynolds S, Kreisberg R, Bernard B, Bressler R, Erkkila T, Lin J, Thorsson V, Zhang W, Shmulevich I, Ciriello G, Weinhold N, Schultz N, Gao J, Cerami E, Gross B, Jacobsen A, Arman Aksoy B, Antipin Y, Reva B, Shen R, Taylor B, Ladanyi M, Sander C, Anur P, Spellman P, Lu Y, Liu W, Casasent TD, Mills G, Akbani R, Zhang N, Broom B, Casasent T, Wakefield C, Unruh A, Baggerly K, Coombes K, Weinstein J, Haussler D, Benz C, Stuart J, Benz S, Zhu J, Szeto C, Scott G, Yau C, Paull E, Carlin

D, Wong C, Sokolov A, Thusberg J, Mooney S, Ng S, Goldstein T, Ellrott K, Grifford M, Wilks C, Ma S, Craft B, Yan C, Hu Y, Meerzaman D, Gastier Foster J, Bowen J, Ramirez N, Black A, Brookens R, White P, Zmuda E, Frick J, Lichtenberg T, George M, Gerken M, Harper H, Leraas K, Wise L, Tabler T, McAllister C, Barr T, Hart Kothari M, Tarvin K, Saller C, Sandusky G, Mitchell C, Iacocca M, Brown J, Rabeno B, Czerwinski C, Petrelli N, Dolzhansky O, Abramov M, Voronina O, Potapova O, Marks J, Suchorska W, Murawa D, Kycler W, Ibbs M, Korski K, Spychała A, Murawa P, Brzeziński J, Perz H, Łażniak R, Teresiak M, Tatka H, Leporowska E, Bogusz Czerniewicz M, Malicki J, Mackiewicz A, Wiznerowicz M, Van Le X, Kohl B, Viet Tien N, Thorp R, Van Bang N, Sussman H, Duc Phu B, Hajek R, Phi Hung N, Curley E, Quyet Thang H, Zaki Khan K, Penny R, Mallery D, Shelton C, Yena P, Ingle J, Couch F, Lingle W, King T, Patangan M, Dyer M, Liu S, Meng X, Waldman F, Stöppler H, Kimryn Rathmell W, Thorne L, Huang M, Boice L, Hill A, Morrison C, Gaudio C, Bshara W, Daily K, Egea S, Pegram M, Gomez Fernandez C, Dhir R, Bhargava R, Brufsky A, Shriver C, Hooke J, Leigh Campbell J, Mural R, Hu H, Somiari S, Larson C, Deyar in B, Kvecher L, Kovatich A, Ellis M, Stricker T, White K, Olopade O, Luo C, Chen Y, Bose R, Chang L-W, Beck A, Chu A, Pihl T, Jensen M, Sfeir R, Kahn A, Kothiyal P, Wang Z, Snyder E, Pontius J, Ayala B, Backus M, Walton J, Baboud J, Berton D, Nicholls M, Srinivasan D, Raman R, Girshik S, Kigonya P, Alonso S, Sanbhadti R, Barletta S, Pot D, Sheth M, Demchok J, Mills Shaw K, Yang L, Eley G, Ferguson M, Tarnuzzer R, Sofia HJ, Buetow K, Fielding P, Ozenberger B, Guyer M, Sofia H, Palchik J. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* (2012) **490**(7418): 61-70

Krieger V, Hamacher A, Gertzen CGW, Senger J, Zwinderman MRH, Marek M, Romier C, Dekker FJ, Kurz T, Jung M, Gohlke H, Kassack MU, Hansen FK. Design, Multicomponent Synthesis, and Anticancer Activity of a Focused Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Library with Peptoid-Based Cap Groups. *J Med Chem* (2017) **60**(13): 5493-5506

Landriscina M, Maddalena F, Fabiano A, Piscazzi A, La Macchia O, Cignarelli M. Erlotinib enhances the proapoptotic activity of cytotoxic agents and synergizes with paclitaxel in poorly-differentiated thyroid carcinoma cells. *Anticancer research* (2010) **30**(2): 473-80

Law JH, Habibi G, Hu K, Masoudi H, Wang MY, Stratford AL, Park E, Gee JM, Finlay P, Jones HE, Nicholson RI, Carboni J, Gottardis M, Pollak M, Dunn SE. Phosphorylated insulin-like growth factor-i/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is related to poor survival. *Cancer Res* (2008) **68**(24): 10238-46

Lee JH, Choi KJ, Seo WD, Jang SY, Kim M, Lee BW, Kim JY, Kang S, Park KH, Lee YS, Bae S. Enhancement of radiation sensitivity in lung cancer cells by celastrol is mediated by inhibition of Hsp90. *International journal of molecular medicine* (2011) **27**(3): 441-6

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* (2007) **2**(2): 329-33

Lim ML, Minamikawa T, Nagley P. The protonophore CCCP induces mitochondrial permeability transition without cytochrome c release in human osteosarcoma cells. *FEBS letters* (2001) **503**(1): 69-74

Lin A, Piao HL, Zhuang L, Sarbassov dos D, Ma L, Gan B. FoxO transcription factors promote AKT Ser473 phosphorylation and renal tumor growth in response to pharmacologic inhibition of the PI3K-AKT pathway. *Cancer Res* (2014) **74**(6): 1682-93

Liu Z, Tong Y, Liu Y, Liu H, Li C, Zhao Y, Zhang Y. Effects of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) combined with paclitaxel (PTX) on paclitaxel-resistant ovarian cancer cells and insights into the underlying mechanisms. *Cancer cell international* (2014) **14**(1): 112

LoRusso PM, Jones SF, Koch KM, Arya N, Fleming RA, Loftiss J, Pandite L, Gadgeel S, Weber BL, Burris HA, 3rd. Phase I and pharmacokinetic study of lapatinib and docetaxel in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* (2008) **26**(18): 3051-6

Maira S-M, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Stauffer F, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, García Echeverría C, Fritsch C, Chene P, Garcia Echeverria C. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics* (2008) **7**(7): 1851-1863

Marek L, Hamacher A, Hansen FK, Kuna K, Gohlke H, Kassack MU, Kurz T. 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* (2013) **56**(2): 427-36

Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochimica et biophysica acta* (2010) **1799**(10-12): 717-25

McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M, O'Donovan N, Stordal B. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Frontiers in Oncology* (2014) **4**: 40

Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, Faquin WC, Clark JR, Begum S, Westra WH, Wada H, Busse PM, Ellisen LW, Rocco JW. Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* (2009) **15**(5): 1645-54

Mlejnek P, Dolezel P. Loss of mitochondrial transmembrane potential and glutathione depletion are not sufficient to account for induction of apoptosis by carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone in human leukemia K562 cells. *Chemico-biological interactions* (2015) **239**: 100-10

Moita AJR. Kombinationen von HDAC- und HSP90-Inhibitoren zur Erhöhung der Cisplatin-Sensitivität von Ovarialkarzinomzellen Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität (2017)

Montero JC, Esparis-Ogando A, Re-Louhau MF, Seoane S, Abad M, Calero R, Ocana A, Pandiella A. Active kinase profiling, genetic and pharmacological data define mTOR as an important common target in triple-negative breast cancer. *Oncogene* (2014) **33**(2): 148-56

Moon du G, Lee SE, Oh MM, Lee SC, Jeong SJ, Hong SK, Yoon CY, Byun SS, Park HS, Cheon J. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor synergistically potentiates the antitumor effects of cisplatin in bladder cancer cells. *International journal of oncology* (2014) **45**(3): 1027-35

Nambiar D, Rajamani P, Singh RP. Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. *Mutation research* (2011) **728**(3): 139-57

Nicholls DG, Ward MW. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends in neurosciences* (2000) **23**(4): 166-74

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods* (1991) **139**(2): 271-9

O'Brien NA, McDonald K, Tong L, von Ew E, Kalous O, Conklin D, Hurvitz SA, di Tomaso E, Schnell C, Linnartz R, Finn RS, Hirawat S, Slamon DJ. Targeting PI3K/mTOR overcomes resistance to HER2-targeted therapy independent of feedback activation of AKT. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* (2014) **20**(13): 3507-20

Ott I, Gust R. Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika. *Pharmazie in unserer Zeit* (2006) **35**: 124-133

Papa A, Caruso D, Tomao S, Rossi L, Zaccarelli E, Tomao F. Triple-negative breast cancer: investigating potential molecular therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* (2015) **19**(1): 55-75

Poggio F, Bruzzone M, Ceppi M, Ponde NF, La Valle G, Del Mastro L, de Azambuja E, Lambertini M. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* (2018) **29**(7): 1497-1508

Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* (2008) **8**(12): 915-28

Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer* (2012) **12**(3): 159-69

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* (2004) **4**(7): 505-18

Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols* (2006) **1**(3): 1458-61

Robertson FM, Chu K, Boley KM, Ye Z, Liu H, Wright MC, Moraes R, Zhang X, Green TL, Barsky SH, Heise C, Cristofanilli M. The class I HDAC inhibitor Romidepsin targets inflammatory

breast cancer tumor emboli and synergizes with paclitaxel to inhibit metastasis. *Journal of experimental therapeutics & oncology* (2013) **10**(3): 219-33

Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, Poulikakos PI, Scaltriti M, Moskatel E, Baselga J, Guichard S, Rosen N. mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer discovery* (2011) **1**(3): 248-59

Rosner M, Hengstschlaeger M. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Human Molecular Genetics* (2008) **17**(19): 2934-2948

Sachdev D, Zhang X, Matise I, Gaillard-Kelly M, Yee D. The type I insulin-like growth factor receptor regulates cancer metastasis independently of primary tumor growth by promoting invasion and survival. *Oncogene* (2010) **29**(2): 251-62

Sadikot T, Swink M, Eskew JD, Brown D, Zhao H, Kusuma BR, Rajewski RA, Blagg BS, Matts RL, Holzbeierlein JM, Vielhauer GA. Development of a high-throughput screening cancer cell-based luciferase refolding assay for identifying Hsp90 inhibitors. *Assay and drug development technologies* (2013) **11**(8): 478-88

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology* (1995) **19**(3): 183-232

Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Dieras V, Hegg R, Im SA, Shaw Wright G, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Funke R, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *The New England journal of medicine* (2018) **379**(22): 2108-2121

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* (2012) **9**(7): 671-5

Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, Botero ML, Llonch E, Atzori F, Di Cosimo S, Maira M, Garcia-Echeverria C, Parra JL, Arribas J, Baselga J. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res* (2008) **68**(19): 8022-30

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* (2003) **22**(47): 7265-79

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* (1985) **150**(1): 76-85

Stenzel K, Hamacher A, Hansen FK, Gertzen CGW, Senger J, Marquardt V, Marek L, Marek M, Romier C, Remke M, Jung M, Gohlke H, Kassack MU, Kurz T. Alkoxyurea-Based Histone

Deacetylase Inhibitors Increase Cisplatin Potency in Chemoresistant Cancer Cell Lines. *J Med Chem* (2017) **60**(13): 5334-5348

Sun Y, Sun Y, Yue S, Wang Y, Lu F. Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *Current topics in medicinal chemistry* (2018) **18**(28): 2420-2428

Tate CR, Rhodes LV, Segar HC, Driver JL, Pounder FN, Burow ME, Collins-Burow BM. Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat. *Breast cancer research : BCR* (2012) **14**(3): R79

Tran DD, Saran S, Dittrich-Breiholz O, Williamson AJ, Klebba-Farber S, Koch A, Kracht M, Whetton AD, Tamura T. Transcriptional regulation of immediate-early gene response by THOC5, a member of mRNA export complex, contributes to the M-CSF-induced macrophage differentiation. *Cell death & disease* (2013) **4**: e879

von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, Blohmer JU, Jackisch C, Paepke S, Gerber B, Zahm DM, Kummel S, Eidtmann H, Klare P, Huober J, Costa S, Tesch H, Hanusch C, Hilfrich J, Khandan F, Fasching PA, Sinn BV, Engels K, Mehta K, Nekljudova V, Untch M. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology* (2014) **15**(7): 747-56

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* (2007) **8**(4): 275-83

Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews Drug discovery* (2005) **4**(4): 307-20

Wawruszak A, Luszczki JJ, Grabarska A, Gumbarewicz E, Dmoszynska-Graniczka M, Polberg K, Stepulak A. Assessment of Interactions between Cisplatin and Two Histone Deacetylase Inhibitors in MCF7, T47D and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines - An Isobolographic Analysis. *PloS one* (2015) **10**(11): e0143013

Wayne N, Mishra P, Bolon DN. Hsp90 and client protein maturation. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* (2011) **787**: 33-44

Werner H. Tumor suppressors govern insulin-like growth factor signaling pathways: implications in metabolism and cancer. *Oncogene* (2012) **31**(22): 2703-14

Xie SQ, Hu GQ, Zhang ZQ, Xu M, Ji BS. Anti-tumour effects of HL-37, a novel anthracene derivative, in-vivo and in-vitro. *The Journal of pharmacy and pharmacology* (2008) **60**(2): 213-9

Xing JY, Song GP, Deng JP, Jiang LZ, Xiong P, Yang BJ, Liu SS. Antitumor Effects and Mechanism of Novel Emodin Rhamnoside Derivatives against Human Cancer Cells In Vitro. *PloS one* (2015) **10**(12): e0144781

Xu L, Qi Y, Xu Y, Lian J, Wang X, Ning G, Wang W, Zhu Y. Co-inhibition of EGFR and IGF1R synergistically impacts therapeutically on adrenocortical carcinoma. *Oncotarget* (2016)

Xue K, Gu JJ, Zhang Q, Mavis C, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Czuczman MS, Guo Y. Vorinostat, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, promotes cell cycle arrest and re-sensitizes rituximab- and chemo-resistant lymphoma cells to chemotherapy agents. *Journal of cancer research and clinical oncology* (2016) **142**(2): 379-87

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology* (2001) **2**(2): 127-37

Yee D. Insulin-like growth factor receptor inhibitors: baby or the bathwater? *Journal of the National Cancer Institute* (2012) **104**(13): 975-81

Yee D. Anti-insulin-like growth factor therapy in breast cancer. *Journal of molecular endocrinology* (2018) **61**(1): T61-t68

Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* (2008) **27**(41): 5497-510

Zhang XJ, Zhang L, Liu YP, Xu HM, Sun P, Song JG, Luo YH. [Molecular mechanism of chemosensitization to paclitaxel in human melanoma cells induced by targeting the EGFR signaling pathway]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* (2013) **35**(3): 181-6

Zhao R, Houry WA. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* (2005) **83**(6): 703-10

Zhao Z, Zhu J, Quan H, Wang G, Li B, Zhu W, Xie C, Lou L. X66, a novel N-terminal heat shock protein 90 inhibitor, exerts antitumor effects without induction of heat shock response. *Oncotarget* (2016)

Zou H, Li L, Garcia Carcedo I, Xu ZP, Monteiro M, Gu W. Synergistic inhibition of colon cancer cell growth with nanoemulsion-loaded paclitaxel and PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 through apoptosis. *International journal of nanomedicine* (2016) **11**: 1947-58

Abkürzungen

4EBP1	<i>eukaryotic initiation factor 4E-binding protein</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> (ATP-bindende Kasette)
ABCC1/2	<i>multidrug-resistance protein 1/2</i>
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-X _L	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BER	<i>base excision repair</i>
Bik	<i>Bcl-2 interacting killer</i>
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BRCA 1/2	<i>breast cancer gene 1/2</i>
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i> (Cyclinabhängige Kinase 2)
CI	<i>combination index</i> (Kombinationsindex)
CTCL	<i>Cutaneous T-Cell Lymphoma</i> (kutanen T-Zell Lymphom)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ER	Estrogenrezeptor

Abkürzungen

ErbB2	<i>Epidermal growth factor receptor 2 (auch: Her2)</i>
ErbB3	<i>Epidermal growth factor receptor 3</i>
ErbB4	<i>Epidermal growth factor receptor 4</i>
ERCC1	<i>excision repair cross-complementing 1</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKS	fetales Kälberserum
FOXO	<i>forkhead box transcription factor</i>
FSC	<i>forward scatter (Vorwärtsstreulicht)</i>
gPS	<i>green processed signal (prozessiertes Signal der grünen Fluoreszenz)</i>
GSH	Glutathion
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF (Heparin-bindendes EGF)</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor 2 (auch: ErbB2)</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase (Merrettichperoxidase)</i>
HSP90	<i>Heat Shock Protein of 90 kDa</i>
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration bei halbmaximaler Wirkung
IGF1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
IRS	<i>Insulin-receptor substrate</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mcl-1	<i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
mLST8	<i>mTOR-associated protein LST8 homolog</i>
MMR	<i>DNA mismatch repair</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug-resistance protein</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

Abkürzungen

NER	<i>nucleotide excision repair</i>
nPS	<i>normalized processed signal</i> (normalisiertes, prozessiertes Fluoreszenzsignal)
OCT2	organischer Kationen-Transporter 2
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p-Akt	phospho-Akt
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PK1	Phosphoinositide-dependent Kinase-1
p-EGFR	phospho-EGFR
p-ErbB2	phospho-ErbB2
p-ErbB3	phospho-ErbB3
p-ErbB4	phospho-ErbB4
PI	Propidiumiodid
p-IGF1R	phospho-IGF1R
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pIC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus des IC ₅₀
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PKD	Proteinkinase D
PP	Polypropylen
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	<i>Phosphatase und Tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAPTOR	<i>regulatory-associated protein of mTOR</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (relative Zentrifugalkraft)
rPS	<i>red processed signal</i> (prozessiertes Signal der roten Fluoreszenz)
RICTOR	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	Rezeptortyrosinkinase

Abkürzungen

SCLC	<i>small cell lung cancer</i> (kleinzelliges Lungenkarzinom)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SLC	<i>solute carriers</i>
SSC	<i>side scatters</i> (Seitwärtsstreulich)
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i> (TRIS-gepufferte Kochsalzlösung)
TBS-T	<i>TRIS-buffered saline</i> mit Zusatz von Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNBC	<i>triple negative breast cancer</i> (triple-negatives Mammakarzinom)
TGF- α	<i>transforming growth factor α</i>
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-glycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC 1/2	<i>tuberous sclerosis 1/2</i>
VF	Verdünnungsfaktor
XPF	<i>xeroderma pigmentosum complementation group F</i>

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias U. Kassack für die Überlassung des interessanten Themas und für die Anregungen und konstruktive Kritik während der Promotionsphase. Insbesondere bin ich dankbar, dass auch er die Motivation nicht verloren hat, diese Arbeit zu einem positiven Ende zu führen.

Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. Catalina F. Pérez Hemphill aus dem Arbeitskreis von Prof. Proksch danke ich für die Überlassung der Substanz Torrubieillin B.

Dem Arbeitskreis von Prof. Kurz danke ich für die Überlassung der Substanz LMK235.

Frau Dr. Laura Engelke danke ich für die Generierung der cisplatinresistenten Zelllinie HCC38CisR.

Frau Dr. Alexandra Hamacher danke ich dafür, dass sie mir Ihre Daten an der Zelllinie MDA-MB-231 zur Verfügung gestellt hat.

Ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Arbeitskreis Ana, Laura, Nicole, David, Chenyin, Pla, Magda, Alex, Michaela, Lars, Christian und Daniel für die gemeinsam verbrachte Zeit. Die gute Zusammenarbeit, das gemeinsame Ertragen des täglichen Wahnsinns, die Mensa-Gänge und die Gespräche am casual friday werden mir immer in guter Erinnerung bleiben. David danke ich für Luxus-Kaffeepausen und dafür, dass unsere Freundschaft geblieben ist. Insbesondere möchte ich Ana für die immerwährende Unterstützung bei der Arbeit, für das viele Lachen bei und nach der Arbeit und für die gemeinsam verzehrten Gebäckstücke danken.

Ein Dankeschön geht auch an meine Mitstreiterinnen und Mitstreiter im Praktikum Arzneimittelanalytik Ana, David, Anuseema, Emanuele, Stephan und Michele für die vielen lustigen Momente während der Studentenbetreuung.

Ein besonderer Dank geht an Alex, deren Enthusiasmus und Energie mich als Studentin für die Forschung begeistert haben. Danke, dass Du dein großes Wissen über die Zellkultur und das wissenschaftliche Arbeiten mit mir geteilt hast. Danke für unzählige Ratschläge und dein

Danksagung

immer offenes Ohr bei Problemen jeglicher Art. Danke für das richtige Wort zur richtigen Zeit und für deinen Optimismus. Danke für die schönen Ausflüge und die vielen lustigen Erinnerungen, die bleiben werden.

Ich danke meiner Familie für die immerwährende Unterstützung. Danke fürs Nachfragen und Nicht-Nachfragen und einfach da sein. Ich bin unendlich froh euch alle an meiner Seite zu wissen.

Ich danke meinem Mann Christian, dass er immer für mich da war. Dein Optimismus musste oft für uns beide reichen. Ohne dich hätte ich sicher aufgegeben. Danke, dass du so ein toller Reisebegleiter durchs Leben bist.

Und zum Schluss danke ich Hendrik dafür, dass er mir jeden Tag zeigt, was wichtig ist.