Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Aus der Klinik für Allgemein-, Thorax- und Viszeralchirurgie der Medizinischen Fakultät

Direktor: Prof. Dr. med. J. R. Izbicki

In vitro Studie zur Effektivität von Hsp90-Inhibitoren bei der Therapie des Ösophaguskarzinoms

DISSERTATION

Zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Juliane Caroline Quast
geboren in Berlin

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 30.10,2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Bockhorn

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter: PD Dr. O. Mann

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter: PD Dr. M. Blessmann

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen 7
2. Einleitung 9
2.1 Das Ösophaguskarzinom 9
2.1.1 Überblick 9
2.1.2 Definition 10
2.1.3 Epidemiologie/Inzidenz 10
2.1.4 Lokalisation 11
2.1.5 Entstehung, Wachstum und Metastasierung 11
2.1.6 Klinik 12
2.1.7 Stadien 13
2.1.8 Prognose und Therapie 14
2.1.9 Neue Therapieformen 18
3. Hsp90 und Hsp90-Inhibitoren 20
3.1 Hsp90 20
3.1.1 Überblick 20
3.1.2 Hitzeschockproteine 21
3.1.3 Essentielle Schritte in der Tumorprogression 23
3.1.4 Die Wirkung der Inhibition von Hsp90 23
3.2 Hsp90-Inhibitoren 28
3.2.1 Überblick 28
3.2.2 17 AAG 29
3.2.3 17 AEP-GA 30
3.2.4 17-DMAG 31
3.2.5 Hsp90 als Therapietarget bei Ösophaguskarzinomen 32
4. Ziel der Arbeit 34
5. Materialien und Methoden 35
5.1 Die Zelllinien und Zellkulturen 35
5.1.1 Die Ösophaguskarzinomzelllinien PT1590 und LN1590 35
5.1.2 Die Ösophaguskarzinomzelllinien OE 19 und OE 33 35
5.1.3 Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 36
5.1.4 Zellkulturen 36
5.2 Kulturmedien 37
5.2.1 Herstellung von TUM 37
5.2.2 Herstellung des OE-Medium 37
5.2.3 Einfriermedium 37
5.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien 38
5.3.1 Geräte 38
5.3.2 Plastikmaterialien 38
5.4 Chemikalien, Medien und Medikamente 40
5.4.1 Medikamente 40
5.4.2 Lösungen und Medienbestandteile 40
5.4.3 Färbelösung für Elisa-Immunoassey 41

5.4.4 Immunhistochemische Peroxidasereaktion 41
5.4.5 Immunologische Analyse (Western Blott) 43
5.4.6 Desinfektionsmittel 45
5.5 Methoden 46
5.5.1 Anzucht und Subkultivierung von Tumorzellen 46
5.5.2 Zellzahlbestimmung 47
5.5.3 Einfrieren von Zellen 47
5.5.4 Proliferationstest (MTT) 48
5.5.5 Die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} 49
5.5.6 Immunhistochemische Peroxidasereaktion 50
5.5.7 Western Blott 52
5.6 Software 55
5.7 Statistische Auswertung 55
6. Ergebnisse 56
6.1 Versuchsaufbau der MTT-Tests 56
6.1.1 Medienversuch 56
6.1.2 Auswertung der Versuche der unterschiedlichen Medien 57
6.1.3 Versuchsreihe mit unterschiedlichen Messzeiten 57
6.1.4 Auswertung der Versuchsreihe mit unterschiedlichen Messzeiten 58
6.1.5 Versuche mit unterschiedlicher Zelldichte und deren Auswertung 58
6.2 Versuchsreihen unterschiedlicher Medikamenten-konzentrationen zum Erreichen des IC50 59
6.2.1 Versuchsreihe mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 59
6.2.2 Versuchsreihe mit der Ösophaguskarzinomzelllinie PT1590 61
6.2.3 Modifizierter Versuchsaufbau 61
6.3 Versuche der Zelllinie PT1590 63
6.3.1 Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG 63
6.3.2 Versuchsauswertung der Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG 63
6.3.3 Versuche mit den wasserlöslichen Medikamenten 17 AEP-GA und 17-DMAG 64
6.4 Versuche der Zelllinie LN1590 65
6.4.1 Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG 65
6.4.2 Versuche mit den wasserlöslichen Medikamenten 17 AEP-GA und 17-DMAG 66
6.5 Versuche der Zelllinie OE19 67
6.5.1 Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG 67
6.5.2 Versuche mit den wasserlöslichen Medikamenten 17 AEP-GA und 17-DMAG 68
6.5.3 Modifizierter Versuchsaufbau mit geringeren Medikamenten-konzentrationen 69
6.6 Versuche der Zelllinie OE33 71
6.6.1 Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG 71
6.6.2 Versuche mit den wasserlöslichen Medikamenten 17 AEP-GA und 17-DMAG 72
6.7 Die Bestimmung des IC50 73
6.8 Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse 77
6.8.1 Immunhistochemischer Nachweis von Hsp90 77

6.8.2 Immunhistochemischer Nachweis von Her2 78
6.8.3 Immunhistochemische Reaktion der Zelllinien PT1590 und LN1590 zur Darstellung der Inhibition von Her2 durch die Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG 78
6.8.4 Immunhistochemische Reaktion der Zelllinien OE19 und OE33 zur Darstellung der Inhibition von Her2 durch die Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG 80
6.8.5 Immunhistochemische Reaktion der Zelllinien PT1590 und LN1590 zur Darstellung der Inhibition von Anti-IGF-IRα durch die Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG 81
6.9 Ergebnisse der Western Blott 82
6.9.1 Ergebnisse der Western Blott der PT1590-Zellen 83
6.9.2 Ergebnisse der Western Blott der LN1590-Zellen 84
6.9.3 Ergebnisse der Western Blott der OE19-Zellen 85
6.9.4 Ergebnisse der Western Blott der OE33-Zellen 86
7. Diskussion **87**
8. Zusammenfassung **93**
9. Literaturverzeichnis **95**
10. Danksagung **101**
11. Lebenslauf **102**
10. Eidesstattliche Erklärung **104**

1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Tabelle 1: Tabelle verwendeter Abkürzungen.

5-FU	5-Flourouracil
17 AAG	17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin
17 AEP-GA	17-[2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl]amino-17-demethoxygeldanamycin
17-DMAG	17-NN-Dimethyl Ethylene Diamine-Gentamycin
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AGFA	Aktien-Gesellschaft für Anilin-Fabrikation
AP	Alkalische Phosphatasen
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
AR	Androgene Rezeptoren
ATP	Adenosintriphosphatasen
bzw.	beziehungsweise
CP	Candle Power (Einheit der Lichtstärke)
CT	Computer Tomographie
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dubecco's Phosphate Buffered Saline
EC50	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF-R	Epidermal growth factor receptor
ER	Estrogen receptor
FCS	Foetal Bovine Serum
GA	Geldanamycin
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2

HPV	Humane Papillomaviren
Hsp	Hitzeschockproteine, auch Chaperone genannt.
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 receptor
M	Molar
mRNA	*Messenger R*ibonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form
PBS	Phosphate buffered saline
PCD	Programmed cell death
PDGF-R	Plated-derived growth factor receptor
PEG	Perkutane endoskopische Gastrotomie
PSG	Perkutan sonographische Gastrotomie
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
Rpm	Rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Rosewell Park Memoriale Institute (daher RPMI)
SDS	Sodium Dodecyl Sufat Solution
TBS	Tris Buffered Saline
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	Union Internationale Contre Cancer
USNCI	U. S. National Cancer Institute
V	Volt
WHO	World health organization

2. Einleitung

2.1 Das Ösophaguskarzinom

2.1.1 Überblick

Das Ösophaguskarzinom weist seit etwa 15 Jahren in den USA und in Teilen Westeuropas eine steigende Inzidenz auf. Es überwiegen Plattenepithelkarzinome (80-85%), gefolgt von Adenokarzinomen (10-15%), wobei das Adenokarzinom des Ösophagus derzeit den größten Inzidenzanstieg aller Malignome verzeichnet. [1-13]

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms ist insgesamt schlecht. Ösophaguskarzinome zusammengenommen weisen eine 5-Jahresüberlebensrate von etwa 20% auf. Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit Ösophaguskarzinomen liegt ohne Therapie bei etwa 6-12 Monaten nach Diagnosestellung. [14-18] Auch das mediane Überleben, unabhängig von Art der Therapie, liegt derzeit bei etwa 20 bis 22 Monaten. [17]

Unter kurativer Zielsetzung verfolgt man heute multimodale Konzepte, bei denen sich, je nach Tumorstadium und klinischem Gesamtbild, operative Verfahren, Bestrahlung und systemische Chemotherapie ergänzen. [14-18] Die kürzlich durchgeführten randomisierten Studien, in denen ein potentielles Benefit für neoadjuvante Therapie beim Ösophaguskarzinom gezeigt wurde, sind durch ungenügend chirurgische Standards gekennzeichnet. Daher sind diese Studien kritisch in Bezug auf die Wertigkeit der neoadjuvanten Therapie zu beurteilen. [19, 20]

Die wesentliche Säule der kurativen Therapie ist daher nach wie vor die Ösophagusresektion mit Lymphadenektomie und Speiseröhrenersatz für resektable Tumoren. Nichts desto trotz besteht die Notwendigkeit der Entwicklung einer guten, wirksamen Chemotherapie, da die meisten Patienten an einem Tumorrezidiv versterben. [21]

2.1.2 Definition

Ca. 5% aller Malignome des Gastrointestinaltraktes sind im Ösophagus gelegen, wovon sich etwa 15% im oberen, 50% im mittleren und 35% im unteren Drittel befinden.
Die meisten dieser Malignome sind Plattenepithel- oder entdifferenzierte Karzinome. Sehr selten kommen auch Sarkome vor.
Im distalen Drittel handelt es sich in ca. 30% der Fälle um Adenokarzinome.

Primäre Ösophagustumoren nach Klassifikation der WHO:

Tabelle 2: Tabelle primärer Ösophaguskarzinome nach Klassifikation der WHO.

Epitheliale Tumoren:	**Nicht-epitheliale Tumoren:**
Squamöses Papillom	***Leiomyom, Leiomyosarkom***
Intraepitheliale Neoplasie (squamös, adenomatös)	***Rhabdomyosarkom***
1. **Plattenepithelkarzinom**	***Kaposi Sarkom***
2. **Adenokarzinom** (adenosquamös, mucoepidermoid, adenoidzystisch, kleinzellig, undifferenziert)	***Lipom***
Karzinoider Tumor	***Granularzelltumor***
Andere	***Gastrointestinaler Stromatumor***
	Malignes Melanom
	Andere

2.1.3 Epidemiologie/Inzidenz

Die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms liegt in Deutschland bei etwa 3-6/100 000/Jahr mit insgesamt zunehmender Tendenz bei der Entwicklung von Adenokarzinomen.

Maligne Tumoren der Speiseröhre treten bei Männern bis zu 7-mal häufiger auf als bei Frauen.

Geografisch lässt sich eine unterschiedliche Verteilung der Häufigkeit des Vorkommens des Ösophaguskarzinoms erkennen. Während das Plattenepithelkarzinom eine besonders hohe Inzidenz in einem Grossteil von Asien sowie Skandinavien, Island, Chile, Curacao, Russland, Südostafrika und Nordwestfrankreich aufweist, ist die Inzidenz in Deutschland in den letzten Jahren konstant geblieben.
Das Plattenepithelkarzinom kommt in der schwarzen Bevölkerung deutlich häufiger vor als in der weißen. Darüber hinaus scheint es eine Häufung in sozioökonomisch schwächeren Schichten zu geben. Der Altersgipfel liegt bei etwa 55 Jahren.
Dem gegenüber findet sich das Adenokarzinom des Ösophagus überwiegend bei Männern weißer Hautfarbe, mit einem Altersgipfel von 65 Jahren und einer steigenden Inzidenz, parallel zum Anstieg des Barrett-Syndroms.

2.1.4 Lokalisation

Vorwiegend ist das Ösophaguskarzinom im Bereich der drei physiologischen Engen des Ösophagus lokalisiert: Dem Ösophaguseingang, der Trachealbifurkation und der Zwerchfellenge. (Häufigkeitsverteilung siehe 2.1.2 Definition.)

2.1.5 Entstehung, Wachstum und Metastasierung

Das Ösophaguskarzinom wächst typischerweise zunächst innerhalb der Speiseröhrenwand und breitet sich besonders in longitudinaler Richtung intramural aus. Aufgrund der engmaschigen Versorgung der Speiseröhre mit Lymphwegen, die nicht nur horizontal, sondern auch in Längsrichtung verlaufen, erfolgt oft frühzeitig die

lymphogene Metastasierung in die zervikalen, paraösophagealen, mediastinalen und paraaortalen Lymphknoten.
Hinzu kommt, dass der Ösophagus über keine Serosa verfügt. Diese Tatsache begünstigt eine schnelle Ausbreitung des Tumors in Form einer schnellen Infiltration benachbarter Strukturen.
Bei hämatogener Metastasierung sind meist Leber, Lunge und Skelett befallen.
Zum Diagnosezeitpunkt präsentieren die meisten Patienten ein fortgeschrittenes Leiden, und auch in Frühstadien sind bereits in ca. 30% der Fälle Lymphknotenmetastasen nachweisbar.

2.1.6 Klinik

Unspezifische Beschwerden können ein retrosternales Druckgefühl, Pyrosis, Gewichtsabnahme, Regurgitation, Pseudohypersalivation, Heiserkeit, Husten, Rückenschmerzen und selten das Erbrechen von Blut sein.
Das klassische Symptom des Ösophaguskarzinoms ist die zunehmende Dysphagie. Zunächst treten Schluckstörungen bei der Aufnahme fester Speisen auf, später auch bei Flüssigkeiten. Auch wenn die Dysphagie meist als erstes Symptom auftritt, wird sie dennoch als Spätsymptom gewertet, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Infiltration der Ösophaguswand vorliegt.

2.1.7 Stadien

TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome

Tabelle 3: Tabelle der TNM-Klassifikation von Ösophaguskarzinomen. Bezieht sich auf die 6. UICC Klassifikation.

T-Stadien:	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Nichtinvasives Karzinom
T1	Tumor begrenzt auf Lamina propria und Submukosa
T1m	Tumor auf Mukosa begrenzt
T1sm	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Adventitia
T4	Tumor breitet sich auf extraösophageale Strukturen aus

N-Stadien:	
N0	Keine regionären Lymphknoten befallen
N1	Befall regionaler Lymphknoten (zervikaler Ösophagustumor: tief zervikale und supraclaviculäre Lymphknoten; intrathorakaler Ösophagustumor: mediastinale und perigastrische Lymphknoten)

M-Stadien:		
M0	Keine Fernmetastasen	
M1	M1a	zervikale Lymphknoten bei suprabifurkalen/zöliakalen Lymph-knoten bei infrabifurkalen Karzinomen
	M1b	andere Fernmetastasen (Lymphknotenmetastasen im Bereich des Truncus coeliacus sind M1)

6. UICC-Stadien der Ösophaguskarzinome

Tabelle 4: Tabelle der 6. UICC-Stadien von Ösophaguskarzinomen.

UICC-Stadien der Ösophaguskarzinome:				
Stadium:	**TNM-System:**			**5-Jahres-Überlebensrate:**
0	Tis	N0	M0	
I	T1	N0	M0	67%
IIA	T2-3	N0	M0	43%
IIB	T1-2	N1	M0	26%
III	T3	N1	M0	16%
III	T4	Jedes N	M0	16%
IV	Jedes T	Jedes N	M1	3%
IVA	Jedes T	Jedes N	M1a	3%
IVB	Jedes T	Jedes N	M1b	3%

2.1.8 Prognose und Therapie

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms ist insgesamt schlecht. Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit Ösophaguskarzinomen liegt ohne Therapie bei etwa 6-12 Monaten nach Diagnosestellung. 60% der Ösophaguskarzinome sind bei Diagnosestellung inoperabel und nur 25% sind kurativ operabel im Sinne einer R0-Resektion, mit maximal 20%iger 5-Jahres-Überlebenszeit. Da in den meisten Fällen das Ösophaguskarzinom erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, liegt selbst bei radikaler Tumorentfernung die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur ca. 10-15%. [3, 5, 6, 10, 12, 16, 17]

Das Ergebnis von 34 randomisierten kontrollierten Studien sowie sechs Metaanalysen ergab, dass bei Erwachsenen mit resektablen Ösophaguskarzinomen die chirurgische Resektion die Therapie der Wahl ist.[16] Die Prognose ist jedoch wesentlich davon abhängig, ob ein Tumorbefall von Lymphknoten vorliegt.[22-27] Die Arbeit von Bogoevski et al. konnte zeigen, dass, um eine konkrete Aussage über den Verlauf der Erkrankung zu treffen, mindestens 18 Lymphknoten pathologisch untersucht werden müssen. Erst bei negativem Tumornachweis aller 18 Lymphknoten ist von einem sicheren nodal-negativem Lymphknotennachweis auszugehen.[22]

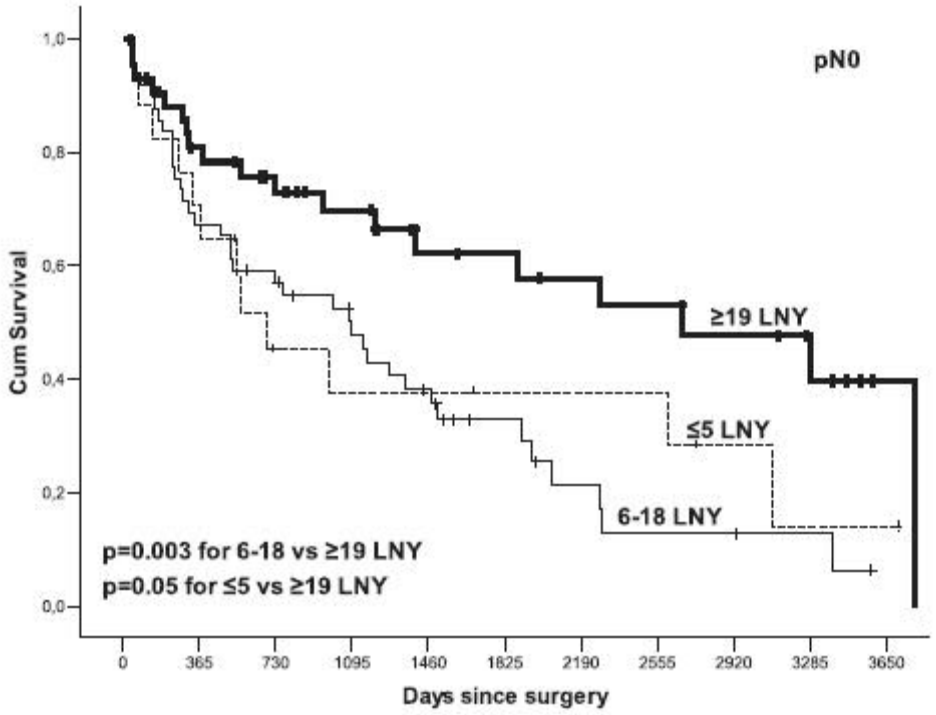


Abbildung 1: Die Durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten ohne Lymphknotenbefall (pN0) ist stark abhängig von der Anzahl resezierter Lymphknoten. Abbildung von Bogoevski D, Onken F, Koenig A, et al. Is it time for a new TNM classification in esophageal carcinoma? Ann Surg 2008; 247(4):633-41.

Im Falle des Vorliegens von positiven Lymphknoten, das heißt Befall von Lymphknoten durch Tumorzellen, ist die Anzahl der befallenen Lymphknoten ein entscheidender Faktor für den weiteren Verlauf der Erkrankung. [22]

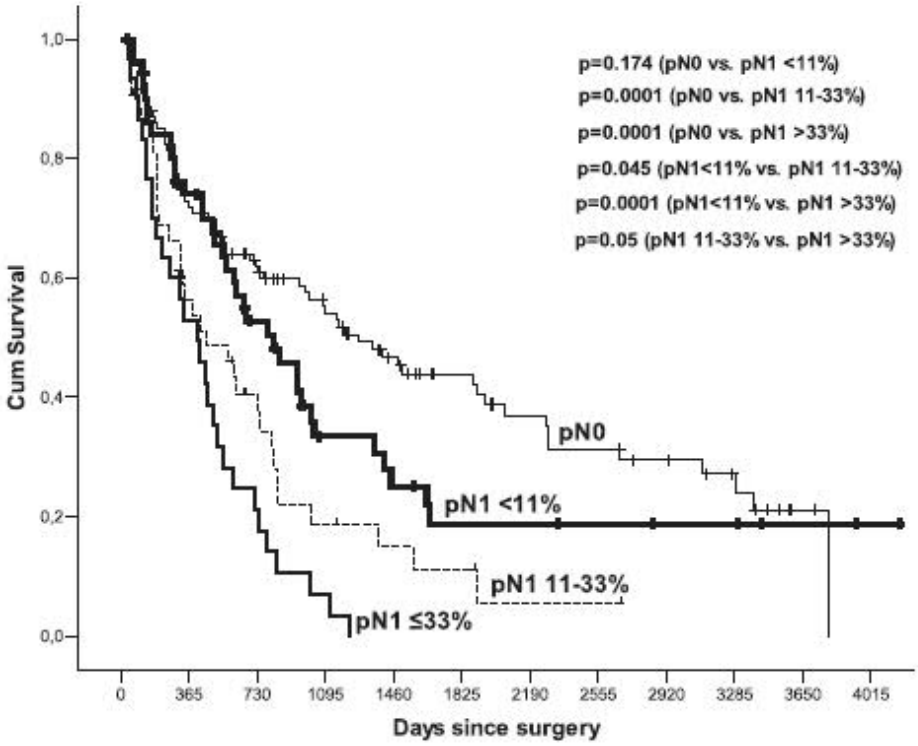
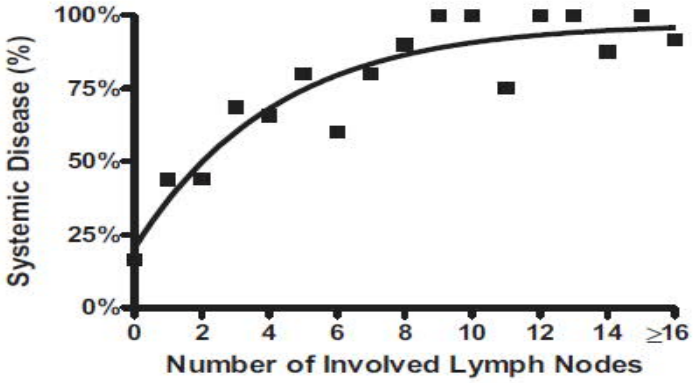


Abbildung 2: Die Analyse des Einflusses der Anzahl tumorbefallener Lymphknoten bei pN1 Patienten auf das durchschnittliche Überleben zeigte signifikant bessere Ergebnisse bei Patienten mit einer Rate von <11%, verglichen mit >11%. Abbildung von Bogoevski D, Onken F, Koenig A, et al. Is it time for a new TNM classification in esophageal carcinoma? Ann Surg 2008; 247(4):633-41.

Im Rahmen einer multinationalen Studie von Peyre et al. konnte gezeigt werden, dass Patienten mit nodal-negativem Pathologiebefund ein etwa 20%iges Risiko für eine systemische Metastasierung nach vollständiger Resektion des Ösophaguskarzimoms haben. Auch bei positivem Tumornachweis von Lymphknoten ist das Risiko für eine systemische Ausbreitung der Erkrankung mit steigender Anzahl der tumorbefallenen Lymphknoten überproportional zunehmend.[28]



# Involved Nodes	0	1	2	3	4	5	6	7	≥8
# Patients	298	82	50	51	38	25	25	10	74

FIGURE 1. Relationship between the number of involved lymph nodes and the frequency of systemic disease in patients with carcinoma of the esophagus (n = 653).

Abbildung 3: Verhältnis zwischen der Anzahl tumorbefallener Lymphknoten und dem Auftreten eines systemischen Tumorbefalles bei Patienten mit Ösophaguskarzinom. (n=653). Abbildung von Peyre C, Hagen J, DeMeester S et al. Predicting Systemic Disease in Patients With Esophageal Cancer After Esophagectomy. Ann Surg 2008:979-985.

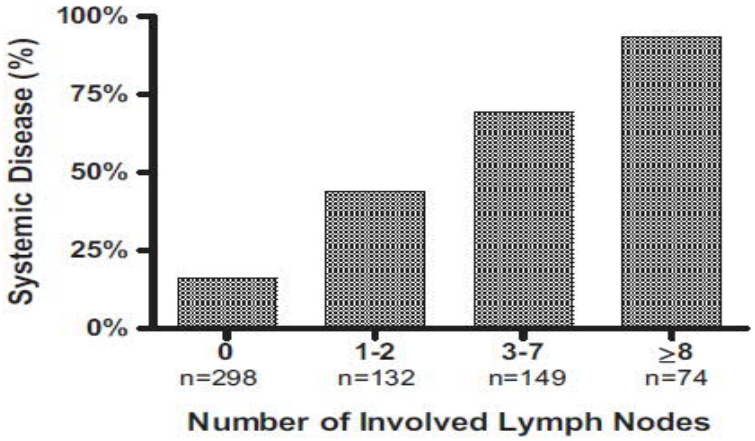


FIGURE 2. Frequency of systemic disease in patients with esophageal carcinoma. Patient groups defined by the number of involved lymph nodes (n = 653). $P < 0.0001$, chi square test for trend.

Abbildung 4: Häufigkeit einer systemischen Tumorausbreitung bei Patienten mit Ösophaguskarzinom. Patientengruppen definiert durch die Anzahl tumorbefallener Lymphknoten (n=653). Abbildung von Peyre C, Hagen J, DeMeester S et al. Predicting Systemic Disease in Patients With Esophageal Cancer After Esophagectomy. Ann Surg 2008:979-985.

Diese Erkenntnis ist als Prognosefaktor nicht unwesentlich, da es einen gezielteren Einsatz von neoadjuvanter und adjuvanter Therapie möglich machen könnte. Wenn bereits bei der präoperativen Evaluation ein nodaler Befall identifiziert wird, kann eine neoadjuvante Therapie in Erwägung gezogen werden. Bisher konnte zwar kein überzeugender Benefit adjuvanter Therapieverfahren beim Ösophaguskarzinom gezeigt werden,[17] aber eine auf Anzahl befallener Lymphknoten basierende Stratifikation könnte ein individuelles Therapiekonzept ermöglichen, um das Überleben bei Vorliegen eines Ösophaguskarzinoms zu verbessern.
Das Risiko lokoregionär ein Rezidiv der Erkrankung zu erfahren ist zwar nicht gut untersucht, in aber einzelnen institutiellen Erfahrungsberichten mit bis zu 70% angegeben.[23, 24, 26, 29-33]

Folglich lässt sich festhalten, dass die meisten der Patienten, die an einem Ösophaguskarzinom erkrankt sind, durch ein Wiederauftreten der Tumorerkrankung versterben. Trotz einer Anzahl durchgeführter randomisierter Studien konnte bisher keine substanzielle Verbesserung des Überlebens oder eine Senkung der Rezidivrate der Erkrankung durch eine systemische Chemotherapie erreicht werden. Auf Grund der fehlenden Datenlage werden daher aktuell Patienten, welche erfolgreich chirurgisch operiert wurden, nicht einer adjuvanten Chemotherapie zugeführt.[34] Wie bereits oben angeführt, ist jedoch dieser Umstand aus klinischer Sicht unbefriedigend, da die meisten dieser Patienten in weniger als 22 Monaten ein Rezidiv der Erkrankung erfahren.

2.1.9 Neue Therapieformen

Target-Therapie

Molekulare Profilerstellung zur Target-Therapien bietet eine neue Therapieoptionen bei malignen Tumorerkrankungen. Insbesondere Prognosefakoren konnten auf molekularbiologischer Basis identifiziert werden, wie zum Beispiel Östrogenrezeptoren

und Her2-Überexpression, die im Falle des Vorliegens eines Mamakarzinoms ein Paradigma für Target-Therapie darstellen. [35, 36]

Target-Therapieoptionen sind in der Klinik jedoch durch erworbene Resistenzen stark limitiert. Solche Resistenzen werden durch Kreuzreaktionen zwischen unterschiedlichen Signalkaskaden vermittelt, sind ausschlaggebend für das Überleben maligner Zellen und abhängig von Proteinen, Kinasen, Wachstumsfaktoren und Hormonen. Daher gibt es derzeit so gut wie keine Target-spezifische Therapie für das Ösophaguskarzinom. [37-39]

3. Hsp90 und Hsp90-Inhibitoren

3.1 Hsp90

3.1.1 Überblick

Krebszellen sind einem ständig vorherrschenden Stress ausgesetzt. Diesem auf besonders effektiver Art und Weise zu begegnen, ist eine der herausragendsten Eigenschaften von Krebszellen, die mitverantwortlich für das gute Überleben dieser Zellen ist. Maligne Tumorerkrankungen zeichnen sich dadurch aus, dass betroffene Zellen eine genetische Instabilität aufweisen. Zudem weisen Tumorzellen eine unglaubliche Anpassungsfähigkeit auf. Bedingt durch ständige Mutationsprozesse können Krebszellen auf eine zunächst wirksame Chemotherapiekonzentration mit multiplen ineinander übergreifenden Signalkaskaden reagieren und schließlich Resistenzen gegen diese Chemotherapeutika entwickeln. [40]

Unter Normalbedingungen, aber vor allem bei Stress, weisen Zellen eine Steigerung der Syntheserate verschiedener Hitzeschockproteine (HSP) auf, die zunächst in Zellen, die erhöhten Temperaturen ausgesetzt waren, entdeckt wurden. Hitzeschockproteine, auch Chaperone genannt, haben die Aufgabe, eine regelhafte Proteinfaltung zu kontrollieren und Proteine vor Degeneration bei Stress zu schützen. [41-43]

Im vergangenen Jahrzehnt ist insbesondere die Wichtigkeit eines Chaperons, dem Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), für das Überleben von Tumorzellen aufgefallen. [42-47]Die Tatsache, dass in einigen Tumorzellen ein zwei- bis zehnfach höherer Wert von Hsp90 gegenüber normalen Zellen zu finden war, ließ auf die große Bedeutung von Hsp90 für das Tumorzellwachstum und –überleben schließen. [48, 49]

3.1.2 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine sind das Produkt verschiedener Genfamilien, die für das Überleben von Zellen unter Stressbedingungen von Bedeutung sind. Benannt werden sie nach der relativen molekularen Masse ihrer verschlüsselten Proteine.

Die intrazellulären Reaktionen, die von Hitzeschockproteinen katalysiert werden, können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: in die der Halter-Proteine und die der Proteinfaltung. Die meisten Halter-Proteine sind den Hsp90- und Hsp70-Familien zuzuordnen, die an ungefalteten Polypeptidsequenzen, vorzugsweise an hydrophoben Regionen, Bindungen eingehen.

Hsp70 und Hsp90 arbeiten in großen Komplexen oder auch Chaperon-Maschinen, denen mehrere Zusatzproteine, Co-Chaperone, auch Co-Proteine oder Clientproteine genannt, angehören. Diese gehen eine Bindung mit den primären Chaperonen ein, um Substratselektion und den Zyklus der Verbindung mit und die Separation von dem Substrat zu vermitteln. Nach Vollendung ihrer molekularen Chaperonenfunktion werden Hsp70 und Hsp90 aktiv von den intrinsischen ATPase-Domainen der Proteinsubstrate entlassen.

Proteinfaltung kommt zum Tragen, nachdem die Halter-Proteine ihre Substrate verlassen haben und beinhaltet die Hsp60-Chaperonenfamilie sowie eine Vielzahl anderer Clientproteine. Die Chaperone gehen Eigenverbindungen ein, um große Faltkammern zu bilden, in denen die Substratproteine dann angemessene intramolekulare Interaktionen durchlaufen, um in einem ATP-abhängigen Prozess ihre korrekte Tertiärstruktur zu erlangen. [41, 43, 50]

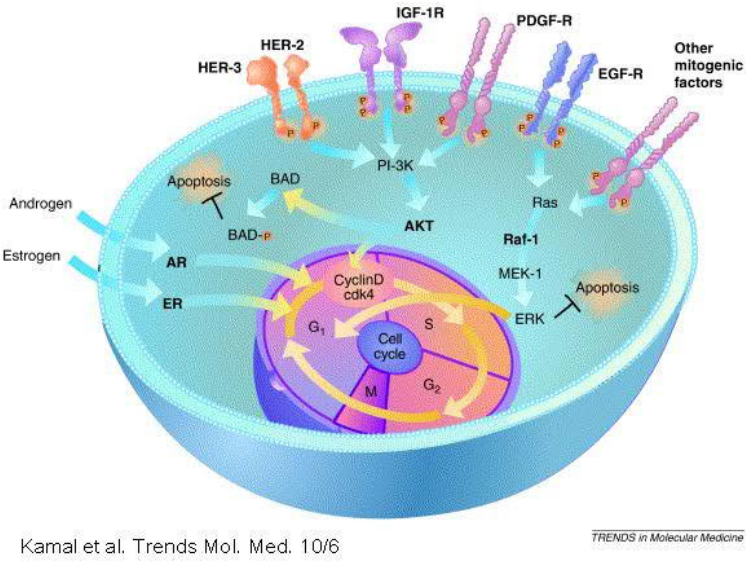


Abbildung 5: Hsp90-Co-Proteine regulieren mehrere Signaltransduktionskaskaden, die in Krebszellen dereguliert sind. Zu den Hsp90-Clientproteinen zählen sowohl Wachstumsfaktoren (Her2, IGF-1R und PDGF-R) als auch Kinasen (Akt und Raf-1), Zellregulatoren (cdk4) und nukleare Steroidrezeptoren (AR und ER). Abbildung von Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ et al. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. Trends Mol Med 2004; 10(6):283-90.

Zusätzlich zu ihrer Rolle als molekulare Chaperone haben Hitzeschockproteine Schlüsselfunktionen bei der Kontrolle des zellulären Metabolismus. Zellregulationen durch molekulare Chaperone werden durch die Haltefähigkeit von Hsp70 und Hsp90 vermittelt, die sich jeweils stabil an verschiedene regulierende Moleküle binden können. Somit hat Hsp90 eine wichtige Rolle in der Steuerung der Mitogenese, dem Fortschreiten des Zellzyklus und der Apoptose. [41, 43, 50]

3.1.3 Essentielle Schritte in der Tumorprogression

Die meisten Malignome entstehen durch eine stufenweise Weiterentwicklung von einem minimal veränderten Zustand mit leicht vermehrtem Wachstum und der Fähigkeit, Knoten oder Polypen zu bilden, über einen multipel abweichenden Zustand, der die Fähigkeit unbegrenzten Wachstums und Veränderung des lokalen Gewebes durch Invasion aufweist und letztlich den Anschluss an Gefäßsysteme, mit der Möglichkeit der Bildung von Zweittumoren oder Metastasen. Diese Entwicklung beinhaltet diverse molekulare und morphologische Veränderungen.

Hanahan und Weinberg fassten diese Charakterzüge als sechs essentielle Veränderungen der Zellphysiologie zusammen: (1.) Selbstversorgung durch Wachstumsfaktoren; (2.) Desensibilisierung gegenüber Wachstumsinhibition; (3.) Umgehung des programmierten Zelltodes (PCD); (4.) unlimitiertes Replikationspotential; (5.) Erhaltung der Angiogenese, und (6.) Gewebsinvasion und Metastasierung. [40, 51, 52]

Zusätzlich zur Progression durchlaufen die meisten humanen Tumore weitere Selektionen durch Exposition von verschiedenen Formen zytotoxischer Therapien, die dazu führen, dass einige Zellen unterschiedlicher Phenotypen überleben und Resistenzen gegen diese verwendeten zytotoxischen Therapeutika aufweisen.

Die zunehmende Hsp-Expression scheint nicht nur in den meisten Stadien der Tumorentwicklung, sondern auch in der Entstehung therapieresistenter Phenotypen involviert zu sein.[41, 43, 50]

3.1.4 Die Wirkung der Inhibition von Hsp90

Hsp90 beeinflusst die Aktivität und Stabilität vieler Proteine, die Schlüsselregulatoren für zelluläre Wachstums-, Differenzierungs- und Apoptoseprozesse darstellen und als Clientproteine bezeichnet werden. Es existieren bereits über 100 Hsp90-abhängige Proteine, die multiple Signaltransduktionskaskaden regulieren und in Tumorzellen überexpremiert werden.

Wegen der hohen Anzahl an Clientproteinen könnten Hsp90-Inhibitoren bei diversen Tumorerkrankungen, bei denen diese Clientproteine die Proliferation und das Überleben der Krebszellen fördern, zur Anwendung kommen und simultan gleich mehrere Krebszelleigenschaften inhibieren.
Ein bekanntes Clientprotein des Hsp90 ist das Her2. Her2 sowie Her2-abhängige Proteine reagieren äußerst sensibel auf Hsp90-Inhibitoren. Präklinische Daten von Studien mit Brust- und Prostatakarzinomzellen, die eine Her2-Überexpression aufwiesen, zeigten, dass der Hsp90-Inhibitor 17 AAG eine neue Therapieoption darstellen könnte. [45, 50, 53-55]
Klinische Studien mit dem semisynthetischen Derivat 17 AAG durchlaufen derzeit Phase II- und III-Versuche bei Brustkrebs und anderen Malignomen. [53, 55] Das 17 AAG Derivat Tanespimycin hat in einer Kombinationstherapie mit Trastuzumab (Herceptin®) vielversprechende Antitumoraktivität und Tolerabilität in Phase II-Versuchen bei Patienten mit Her2-positiven, metastasierendem Brustkrebs gezeigt. Obwohl die insgesamt gemessene Antitumoraktivität nur moderat war, repräsentiert diese Studie die erste Studie, die Tumorregression in soliden Tumoren durch Hsp90-Inhibition bewirkt. Ein update dieser Versuchsreihe wurde bei dem ASCO meeting 2008 präsentiert. Hier zeigte sich eine Responderrate von 24%. [54]

Die Anzahl der Hsp90-abhängigen Proteine wächst weiter, jedoch scheinen viele dieser Proteine zumindest ein Charakteristikum gemein zu haben, nämlich die funktionelle Notwendigkeit, Multiproteinkomplexe zu bilden.
Hsp90 selbst wird durch seine Clientproteine reguliert, die an der geordneten Abfolge eines dynamischen Multiproteinkomplexes teilnehmen, der mit dem ATPase-Zyklus von Hsp90 konformativ verbunden ist. [43, 50]

Hsp90-Inhibitoren (z.B. Geldanamycin) binden an der N-terminalen ATP-Bindungsstelle von Hsp90 und inhibieren somit die ATP-Bindung und Hydrolysierung und bewirken eine Blockierung des Komplexes, welche zur Degradation des betroffenen Proteins über das Proteasom führt. [50] (Abbildung 6)

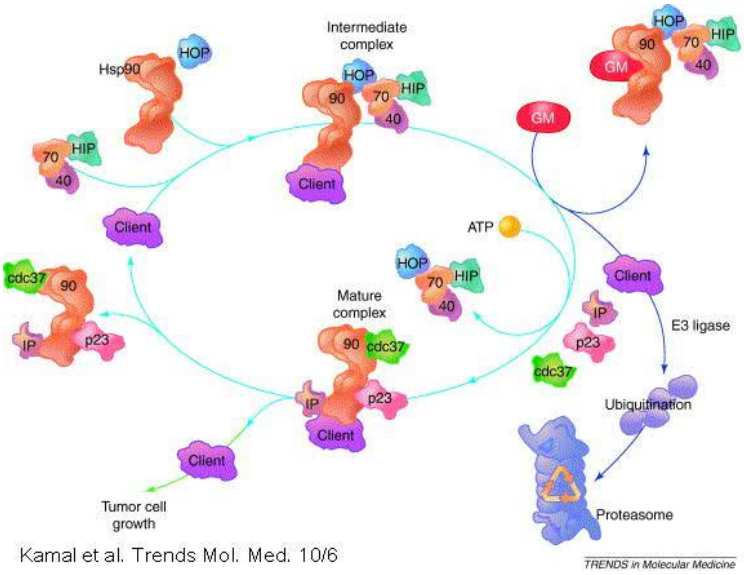


Abbildung 6: Darstellung des Hsp90-Chaperonenzyklusses, als dynamischer Prozess, bei dem Clientproteine (die Co-Chaperonen Hsp70, Hsp40, Hip und Hop inbegriffen) an den Hsp90-Komplex binden. Abbildung von Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ et al. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. Trends Mol Med 2004; 10(6):283-90.

Die Inhibition von Hsp90 durch spezifische pharmakologische Inhibitoren führt zur Degradation der Hsp90-abhängigen Proteine, der Unterdrückung des Tumorwachstums, morphologischen und funktionellen Differenzierungen sowie zur Aktivierung der Apoptose.

Erstaunlich ist, dass Hsp90 auch in vielen gesunden Zellen vorkommt, Hsp90-Inhibitoren jedoch mit hoher Selektivität Tumorzellen abtöten. Die genaue molekulare Basis dieser Tumorselektivität der Hsp90-Inhibitoren ist noch nicht bekannt. Auffallend ist, dass Hsp90 in normalen Zellen in einer unkomplexen Form, mit niedriger Affinität für Hsp90-Inhibitoren, in Krebszellen hingegen in einer komplexen Hsp90-Form mit hoher Affinität gegenüber Hsp90-Inhibitoren, vorliegt. [49]

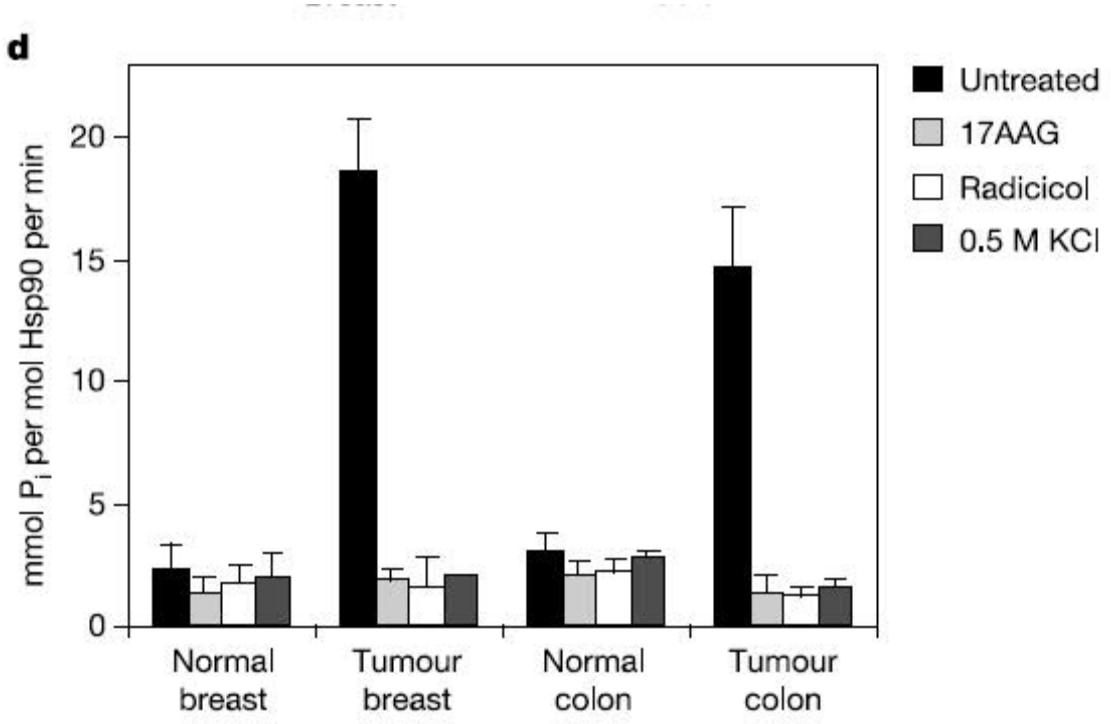
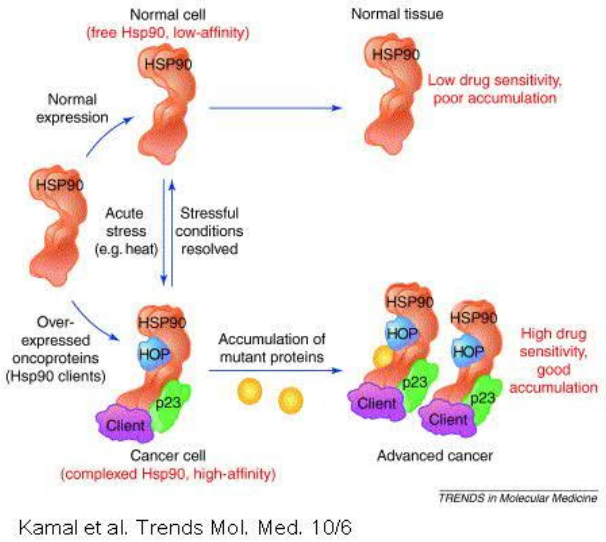


Abbildung 7: Hsp90 ATPase-Aktivität in humanem gesunden Gewebe verglichen mit humanem Tumorgewebe behandelt mit 10µM 17-AAG oder Radicicol und 0,5M KCl. Abbildung von Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. Nature 2003; 425(6956):407-10.

Des Weiteren konnte in der Studie von Kanal et al. gezeigt werden, dass Hsp90 gegenüber normalen Zellen in Tumorzellen z. B. beim Mama- und Colonkarzinom, überexprimiert wird. Die Behandlung normaler Zellen und Tumorzellen dieser Tumorentitäten mittels verschiedener Hsp90-Inhibitoren konnte nicht nur zeigen, dass die Hsp90-Inhibition zu einer ersichtlichen Reduktion der Proliferationsrate der Zellen führt, sondern auch, dass die Wirkung der Hsp90-Inhibition nahezu ausschließlich in Tumorzellen stattfindet.

Diese Erkenntnis bildet eine gute Grundlage für einen potentiellen Einsatz der Hsp90-Inhibitoren zur Behandlung von soliden Karzinomen, da eine systemische Chemotherapie stets einen Kompromiss zwischen einerseits dem Abtöten von malignen Zellen und andererseits dem Inkaufnehmen von tolerablen Nebenwirkungen ist. Diese kommen vor allem dadurch zustande, da sich stark im Körper teilende Zellen, wie z. B. Zellen des Gastrointestinaltraktes, durch das eingesetzte Chemotherapeutikum häufig ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen werden.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, erscheint es nahe liegend, dass im Wesentlichen alles in Lösung befindliche Hsp90 der Tumorzellen in einer aktivierten, komplexen Form vorzufinden ist, hingegen das Hsp90 normaler Zellen inaktiviert und ohne Beteiligung an einem multi-chaperonen-Komplex vorliegt.[50]



Kamal et al. Trends Mol. Med. 10/6

Abbildung 8: Modell der Tumorselektivität von Hsp90-Inibitoren und Hsp90-abhängiger maligner Progression. Das Modell konstatiert, dass die Akkumulation mutierter Proteine bei fortgeschrittenem Krebsleiden den Hsp90-Verbrauch weiter erhöht. Darüber hinaus weist das Modell darauf hin, dass die starke Affinitätsänderung von Hsp90 sowohl durch die Überexpression von Onkoproteinen als auch unter Stressbedingungen normaler Zellen angetrieben wird. Abbildung von Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ et al. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. Trends Mol Med 2004; 10(6):283-90.

3.2 Hsp90-Inhibitoren

3.2.1 Überblick

Das Benzoquinansamycin Geldanamycin (GA) ist der erste identifizierte Hsp90-Inhibitor, der von Whitesel et al entdeckt wurde, ohne jedoch zu wissen, welchen Effekt die Bindung von GA auf die Aktivität von Chaperonen haben würde. [41]
Geldanamycin bindet an der ATP-Bindungsstelle am Hsp90 mit einer viel größeren Affinität als ATP oder ADP. Da die GA-Bindungskonformation von Hsp90 der ATP-Bindungskonformation der Chaperonen gleicht, fördert die GA-Bindung einen stabilen Zusammenschluss der Super-Chaperonenmaschinerie, der die Degradation abhängiger Proteine über das Proteasom begünstigt.
Somit wird in der Gegenwart von GA die Halbwertzeit von Hsp90-abhängigen Proteinen verkürzt. [48]

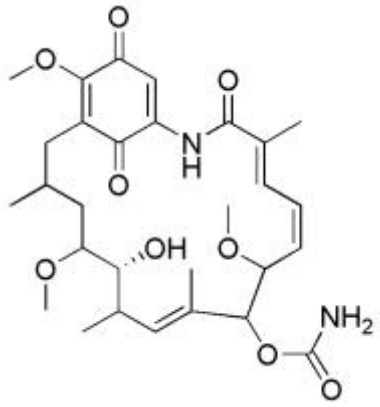


Abbildung 9: Strukturformel von Geldanamycin (GA).

Wegen seiner starken Hepatotoxizität ist Geldanamycin klinisch nicht zu verwenden. 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17 AAG) ist ein klinisch verwendetes semisynthetisches Derivat von GA mit geringerer Hepatotoxizität, jedoch schlechter Wasserlöslichkeit.

17-[2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl]aminno-17demethoxy-geldanamycin (17 AEP-GA) und 17-NN-Dimethyl Ethylene Diamine Geldanamycin (17-DMAG) sind wasserlösliche Analoga von 17 AAG.[56]

Chemische Informationen zu 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG:

Tabelle 6: Chemische Informationen zu verwendeten Medikamenten.

	17 AAG	17 AEP-GA	17-DMAG
Chemische Formel:	$C_{31}H_{43}N_3O_8$	$C_{34}H_{50}N_4O_8$	$C_{32}H_{48}N_4$, HCl
Molekulares Gewicht:	585,69 g/mol	648,78 g/mol	652 g/mol
Löslichkeit: löslich in	DMSO (1 mg/ml)	H_2O (10 mg/ml)	H_2O, Chloroform, DMSO, Methanol 10 mg/ml

3.2.2 17 AAG

Der Hsp90-Inhibitor 17-Allylamino-17demethoxygeldanamycin ist ein stabiles Geldanamycinanalogon, der im Vergleich zu Geldanamycin (GA) weniger toxisch ist, jedoch in DMSO gelöst werden muss, welches bereits eine gewisse Zelltoxizität aufweist.

Auch wenn 17 AAG eine schwächere Hsp90-Bindung aufweist als GA, zeichnet es sich durch ein besseres Toxizitätsprofil aus. In präklinischen Studien konnte die potente

antitumoröse Wirkung von 17 AAG bewiesen werden, so dass derzeit klinische Studien mit 17 AAG vorgenommen werden.

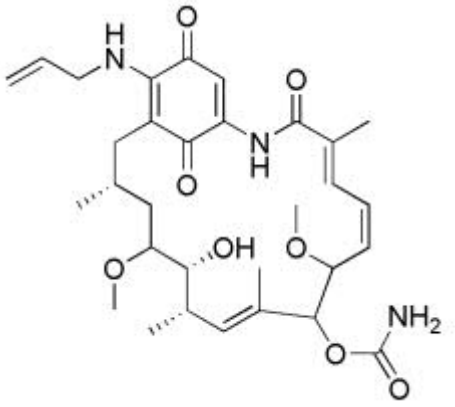


Abbildung 10: Strukturformel von 17-Allylamino-17demethoxygeldanamycin (17 AAG).

3.2.3 17 AEP-GA

17-[2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl]aminno-17demethoxygeldanamycin ist ein neues Geldanamycinanalogon mit einer Alkylamino-Gruppe an Stelle der Methoxy-Moiety an C17`. 17 AEP-GA ist weniger cytotoxisch als GA und behält seine biologische Aktivität. 17 AEP-GA zeigt eine ähnliche Tumorinduktion wie 17 AAG, ist jedoch in Wasser löslich.

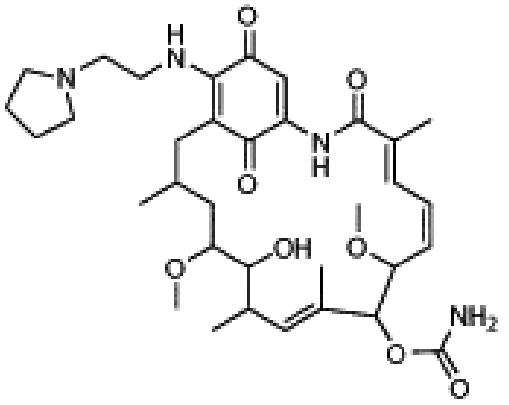


Abbildung 11: Strukturformel von 17-[2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl]aminno-17demethoxygeldanamycin (17 AEP-GA).

3.2.4 17-DMAG

Wie 17 AAG und 17 AEP-GA ist auch 17-DMAG ein weiteres Geldanamycin-analogon, das ein Inhibitor des Hitzeschockproteins Hsp90 ist.
17-NN-Dimethyl Ethylene Diamine Geldanamycin zeichnet sich durch eine hervorragende Bioverfügbarkeit aus, wird quantitativ weitaus weniger metabolisiert als 17 AAG und ist ebenfalls wasserlöslich.

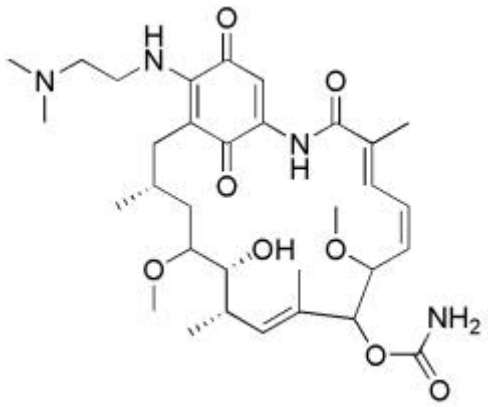


Abbildung 12: 17-NN-Dimethyl Ethylene Diamine Geldanamycin (17-DMAG).

3.2.5 Hsp90 als Therapietarget bei Ösophaguskarzinomen

Wu et al. konnten zeigen, dass Hsp90 beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus überexprimiert wird und der Einsatz von Hsp90-Inhibitoren eine potentielle Therapieoption bei diesem darstellt.[57]

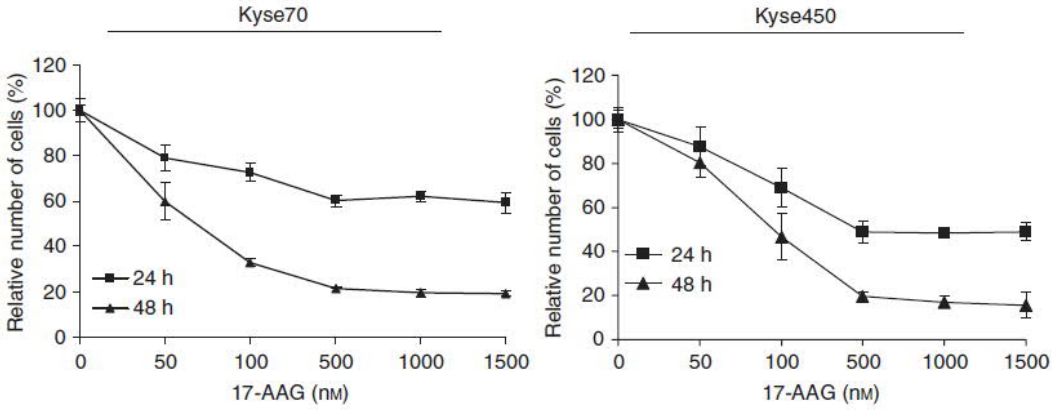


Abbildung 13: Darstellung der Proliferationsinhibition durch 17-AAG bei Zelllinien von Plattenepithelkarzinomzellen (Kyse70 und Kyse450). Abbildung aus Wu X, Wanders A, Wardega P, et al. Hsp90 is expressed and represents a therapeutic target in human oesophageal cancer using the inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. Br J Cancer 2009; 100(2):334-43.

Hsp90-Inhibitoren werden bereits von Phase I- bis Phase III- Studien in verschiedenen soliden Karzinomen untersucht.[58]

Tabelle 6: Entwicklungsstand klinischer Versuche mit Hsp90 Inhibitoren gemäß Ekman et al. [58]

Table 1. Stage of development of Hsp90 inhibitors.

Drug	Stage of development (Phase)	Indications (NCT ID)*
Tanespimycin (KOS-953)	III	GIST, multiple myeloma NCT00514371, NCT00546780
	II	Pancreatic NCT00577889, renal
	I	Solid tumours NCT00003969
Retaspimycin (IPI-504)	III	GIST NCT00688766
	II	GIST, NSCLC, breast NCT00627627, melanoma NCT00627419
Alvespimycin (KOS-1022; 17-DMAG)	I/II	Solid tumours, breast cancer NCT00803556
	I	Solid tumours NCT00248521, small intestine cancer NCT00088868
BMS-722782	II	Multiple myeloma
CNF1010 (17-AAG)	II	CLL NCT00319930, lymphoma, melanoma, prostate, renal, thyroid
STA-9090	II	Solid tumours NCT00688116, NCT00687934, hematological malignancies NCT00858572
AUY922	I/II	Breast cancer NCT00526045 Multiple myeloma NCT00708292
IPI-493	I	Solid tumours NCT00724425
SNX-5422	I	Solid tumours NCT00506805, NCT00644072, lymphomas NCT00647764, hematological malignancies NCT00595686
AT13387	I	Solid tumours NCT00878423
CNF2024 (BIIB021)	I	CLL NCT00344786, solid tumors NCT00345189
HSP990	I	Solid tumours NCT00879905
MPC-3100	I	Solid tumours NCT00920205
ABI-010	I	Solid tumours NCT00820768
XL888	I	Solid tumours NCT00796484

Data from ClinicalTrials.gov (assessed 18/6/2009).
*Publications identified by National Clinical Trials Identifier in Medline (NCT ID).
CLL: B-cell chronic lymphocytic leukemia; GIST: Gastrointestinal stromal tumours.

4. Ziel der Arbeit

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der antiproliferativen Wirkung verschiedener Hsp90-Inhibitoren auf das Wachstum verschiedener humaner Ösophaguskarzinomzelllinien sowie Lymphknotenmetastasen des Ösophagus.

Im ersten Schritt wurde in vitro die antiproliferative Wirkung von verschiedenen Hsp90-Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit bei sowohl wasserlöslichen als auch nicht-wasserlöslichen Derivaten untersucht. Anhand der Ergebnisse sollten die Wirkungsprofile der verschiedenen Hsp90-Derivate verglichen werden. Da bisherige Studien überwiegend mit dem wasserunlöslichen GA-Derivat 17 AAG durchgeführt wurden, sollte mit dieser Studie untersucht werden, ob mit den wasserlöslichen GA-Derivaten eine weniger toxische aber ebenso effektive Proliferationshemmung erreicht werden kann.

Im zweiten Schritt wurde das molekulare Profil unter Hsp90-Inhibition in den untersuchten Zellen evaluiert.

Im Weiteren wurde die antiproliferative Wirkung einer Hsp90-Inhibition auf molekularer Ebene mittels Western Blott untersucht. Eine molekulare Charakterisierung der Progressionsfaktoren, die durch die GA-Derivate inhibiert werden, wurde durch die Immunhistochemie und den Western Blott dargestellt.

5. Materialien und Methoden

5.1 Die Zelllinien und Zellkulturen

5.1.1 Die Ösophaguskarzinomzelllinien PT1590 und LN1590

Die Zelllinien PT1590 und LN1590 konnten aus Gewebeproben eines Patienten des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf etabliert werden. [59] Der Patient litt an einem Adenokarzinom des distalen Ösophagus (PT1590). Aus Lymphknotenmetastasen desselben Patienten konnte die Zelllinie LN1590 gewonnen werden. Nach mehreren Passagen in der Zellkultur zeigte sich eine Immortalität beider Zelllinien. Beide Zelllinien sind im Labor der Allgemeinchirurgie gut charakterisiert und werden routinemäßig verwendet.

5.1.2 Die Ösophaguskarzinomzelllinien OE 19 und OE 33

Die humanen Adenokarzinomzelllinien OE-33 und OE-19 wurden von der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, ÚK) erworben.
Die Zelllinie OE-33 wurde aus einem gering differenzierten Ösophagusadenom etabliert, das nach UICC als Stadium IIA klassifiziert worden war.
Die Zelllinie OE-19 stammt aus einem moderat differenzierten Adenokarzinom des ösophago-gastrischen Übergangs und wurde nach UICC als Stadium III klassifiziert. [60]

5.1.3 Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7

Die MCF-7 Mammakarzinomzelllinie (The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Breast Cancer Cell Line Daterbase) wurde aus dem Tumor einer 69-jährigen Kaukasierin gewonnen.
Die MCF-7 wurden dem Allgemeinchirurgischen Forschungslabor vom Institut für Tumorbiologie des UKE von Prof. K. Pantel überlassen und diente zu Vergleichszwecken.

5.1.4 Zellkulturen

Die gesamte Arbeit mit Zellkulturen wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Reinluftwerkbank und unter Verwendung steriler Einwegmaterialien durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Inkubator bei 37°C in einer mit 5% CO_2 angereicherten Atmosphäre und bei gesättigter Luftfeuchtigkeit.

Es wurden Versuche mit den oben genannten Zellkulturen durchgeführt.

5.2 Kulturmedien

- Tumorzellmedium „TUM“ für die Zelllinien: PT 1590, LN 1590 und MCF7
- OE-Medium für die Zelllinien: OE 19, OE 33

5.2.1 Herstellung von TUM

500 ml PRMI-Medium 1640 Medium mit Glutamine wird supplementiert mit:

- 50 ml FCS (10% FCS)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- 2,5 ml Transferrin
- 5 ml Insulin
- 5 ml Gentamycin
- 5 ml Basic Fibroblast Growth Factor-human
- 5 ml Epithel Growth Factor

5.2.2 Herstellung des OE-Medium

500 ml PRMI-Medium 1640 Medium mit Glutamine wird supplementiert mit:

- 25 ml FCS
- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- 5 ml Gentamycin

5.2.3 Einfriermedium

Recovery Cell Culture Freezing Medium von Gibco

5.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

5.3.1 Geräte

- Werkbank Hera safe von Heraeus Instruments
- Vakuum-Pumpsystem von vacuubrand
- Autoklav Hera cell 240 von Heraeus eingestellt auf 37°C und 5% CO2
- Lichtmikroskope von Hund Wetzlar und Axiovert 40 CFL von Zeiss
- Zentrifugen von Hettich Zentrifugen, Rotina 35 R und von Eppendorf Centrifuge 5417R
- Thermomixer comfort von Eppendorf
- Elisareader von Dynatech MR 5000
- Wasserbad von Medingen, eingestellt auf 23°C
- Kühlschrank von Linde, eingestellt auf 6°C (zur Aufbewahrung der Medien)
- Eisschrank von Bosch
- Pipetten von Eppendorf
- 8er Pipette von Eppendorf, Pipette 100, Eppendorf Research
- Multipipette plus von Eppendorf
- Pipet-aid von Drummond
- Power Pac von Bio Rad
- Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell von Bio Rad
- AGFA CP 1000 von Agfa

5.3.2 Plastikmaterialien

- Sterile 96-Lochplatten von Nunc, Nunclon Surface, flat bottom, Polystyrene
- Culture Slide Chamber, Polystyrene Vessel, Tissue Culture Treated Glass Slide von Falcon von Becton Dickinson

- Sterile Kulturflaschen von Starstedt, Canted Neck, Polystyrene red in den Größen 75 cm2 und 25 cm2
- Sterile PP-Test Tubes von Cellstar, Greiner bio-one in den Größen 50 ml und 15 ml
- Sterile Pipetten von Falcon, Advantage in den Größen 2 ml, 5 ml und 10 ml
- Absaugpipetten
- Sterile Petrischalen von Nunc, Nunclon Surface
- Pipettenspitzen von Eppendorf, epT.I.PS. Standard 20-300µl
- Eppendorf Tubes in den Größen 1,5 ml und 500 µl
- Cell-Scraper von Nunc, 23 cm

5.4 Chemikalien, Medien und Medikamente

5.4.1 Medikamente

- 17 AAG (17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin) von Invivo Gen
- 17 AEP-GA (17-[2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl]amino-17-demethoxygeldanamycin) von Invivo Gen
- 17-DMAG (17-NN-Dimethyl Ethylene Diamine-Gentamycin) von Invivo Gen

5.4.2 Lösungen und Medienbestandteile

- RPMI von Gibco, RPMI 1640 + Gluta MAX
- Recovery Cell Culture Freezing Medium von Gibco
- Trypsin von Gibco 25% Trypsin-EDTA
- Foetal Bovine Serum (FCS) von Gibco
- Penicillin/Streptomycin von Gibco
- Transferrin von Sigma
- Insulin von Sigma
- Gentamycin von Biochrom
- Basic Fibroblast Groth Factor human von Pepro Tech
- Epithel Groth Factor von Pepro Tech
- DMSO von Sigma
- DPBS von Gibco
- Acetonmethanol

5.4.3 Färbelösung für Elisa-Immunoassey

- MTT-Test von Promega, Cell Titer 96 AQueous One, Solution Cell Proliferation Assay

5.4.4 Immunhistochemische Peroxidasereaktion

Cell & Tissue Saining Kit, HRP-AEC System von R&D Systems, enthält:

- Peroxidase Blocking Reagent (6 ml einer 3% hydrogenen Peroxidase [H2O2])
- Avidin Blocking Reagent (6 ml einer Avidin Lösung, enthält 0.1% Natrium Azide [NaN3])
- Biotin Blocking Reagent (6 ml einer Biotin Lösung, enthält 0.1% NaN3)
- "Vial A" Secondary Biotinylated Antibodies (6 ml anti-Maus-, anti-Hase-, anti-Ziege oder anti-Ratte sekundär Antikörper, in je 0.01 M PBS [enthält 0.1% NaN3]
- "Vial B" High Sensitivity Streptavidin-HRP Conjugate (HSS-HRP) (6 ml Streptavidin konjugiert an HRP in 0.01 M PBS [enthält 1% Proteintransporter mit Konservierungsstoffen und Stabilisatoren])
- AEC Chromogen (1 ml 2%iger 3-amino-9-ethylcarbazole [ACE] in stabilisierendem Puffer)
- AEC Chromogen Puffer (2 Ampullen [15 ml/Ampulle] 0.1% H2O2 in Acetat Puffer
- Tropfflasche (15 ml leere Tropfflasche)
- Serum Blocking Reagent G (6 ml eines tierischen Serums in Puffer mit Konservierungsstoffen. Erhältlich als Mouse CTS003, Rabbit CTS006 und Rat CTS018 kits)
- Serum Blocking Reagent D (6 ml eines tierischen Serums in Puffer mit Konservierungsstoffen. Erhältlich als Goat CTS009 kit)

Außerdem werden benötigt:

- PBS, pH 7.4
- Mayer’s Hematoxylin Counterstrain von Sigma
- Aqueous Mounting Medium von R&D Systems

Primärantikörper:

- IGF-IRα (N-20): sc-712 von Santa Cruz Biotechnology
- Anti-Hsp90, Mouse Anti-Hsp90 Monoclonal Antibody von Stressgen
- HER2, Polyclonal Rabbit, Anti-Human, c-erbB-2 Oncoprotein von DakoCytomation

Negativ Kontrollen:

- Rabbit Immunoglobulin Fraction von DakoCytomation
- Mouse IgG1κ (MOPC-21) von Sigma

Zur Verdünnung der Rabbit Antikörper und entsprechendem Kontrollantikörper:

- Tris-HCl-Puffer Diluent von DakoCytomation

5.4.5 Immunologische Analyse (Western Blott)

Mini-Protean® 3 Cell von Bio Rad, enthält:

- Grosse Glasplatte: Die grosse Glasplatte enthält die darauf befestigten Glasspacer und ist 0,75 mm dick.
- Kleine Glasplatte: Die kleinere, dünnere Glasplatte bildet zusammen mit der Spacerglasplatte das Gelsandwich.
- Gelhalter: Mit Hilfe des grünen Gelhalters werden die grosse und die kleine Glasplatte zusammengehalten.
- Gelgießstand: Der grosse Gelgießstand hält das Gelsandwich zusammen mit dem Gelhalter. Gefederte Hebel sorgen dafür, dass die Gelkassette gegen die graue Dichtung gepresst wird und ein Auslaufen des Gels während des Giessens verhindert wird.
- Gelsandwich: Besteht aus den 2 Glasplatten mit dem polymerisierten Gel
- Kämme: Die grünen Kämme werden nach dem Gießen des Sammelgels sofort zwischen die 2 Glasplatten hineingesteckt.
- Elektrodenteil: Der weißliche Elektrodenteil hält das Gelsandwich während der Elektrophorese. Dazu gehören eine graue Dichtung, die beiden Elektroden und die Bananenstecker. Die Anode ist rot gekennzeichnet, während die Kathode schwarz gekennzeichnet ist.
- Befestigungsteil: Dient zur Fixierung des Elektrodenteils und des Gelsandwiches. Die Druckplatten und die Verschlussklemmen pressen das Gelsandwich gegen die U-förmige Dichtung auf dem Elektrodenteil und bilden so die innere Kammer.
- Mini-Tank, Deckel Mini-Tank und Deckel umschließen die innere Kammer während der Elektrophorese.

Außerdem werden benötigt:

- 30% Acrylamide/ Bis Solution 19:1 (5%C) von Bio Rad
- 1,5 M tris Puffer pH 8,8 für 12% Gel
- 0,5 M tris Puffer pH 6,8 für 5% Gel
- 10% SDS Sodium Dodecyl Sulfat Solution von Gibco, Ultra Pure

- 10% APS
- Temed N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine von Bio Rad
- Precision Plus Protein™ Dual Color Standards von Bio Rad
- 1x SDS running Puffer mit 10x Tris/ Glycine/ SDS Buffer von Bio Rad
- Loading Puffer
- Laborsoritze von Unimetrics
- Trans-Blott® SD Semi-Dry Transfer Cell von Bio Rad
- Trans-Blott® transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane von Bio Rad
- 1x transfer semidry Puffer
- Extra Thick Blot Paper Mini blot size von Bio Rad
- Proceau S solution von Serva
- TBS tween bestehend aus 100 ml 10x TBS, 900 ml Aqua dest., 1 ml Tween® puree von Serva
- Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk von Bio Rad
- Surgical Disposable Scalpel von B/Braun
- Frischhaltefolie
- Medical x-Ray Screen Film Blue Sensitive von CEA RR New
- X-Ray Cassette 24x 30 von Rego
- Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate von PIERCE bestehend aus Super Signal® West Dura Luminol/ Enhancer Solution und Super Signal® West Dura Stable Peroxide Buffer
- BCA™ Protein Assay Kit-Reducing Agent Compartible von PIERCE

Antikörper:

- Anti-Hsp90, Mouse Anti-Hsp90 Monoclonal Antibody von Stressgen
- Her2/ErbB2 Antibody von Cell Signaling
- EGF Receptor Antibody von Cell Signaling
- Insulin Receptor β (L55B10) Mouse mAb von Cell Signaling
- Anti-Actin, Verdünnung 1:5000, mouse von Sigma

5.4.6 Desinfektionsmittel

- 80% Ethanol

5.5 Methoden

5.5.1 Anzucht und Subkultivierung von Tumorzellen

Die Zellen wachsen als adhärent wachsende Zellen in ihrem jeweiligen Medium in 5% CO_2 in einem mit Wasserdampf gesättigten Brutschrank bei 37°C. Das Medium wird etwa alle 3-4 Tage erneuert. Ist die Konfluenz erreicht, werden die Zellen subkultiviert. Hierzu wird zunächst das Kulturmedium abgesaugt. Danach werden die Zellen mit 1 bzw. 2 ml Trypsin inkubiert, je nachdem, ob sich die Zellen in einer kleinen oder in einer großen Kulturflasche befinden. Die Inkubationszeit ist bei den jeweiligen Zelllinien unterschiedlich und muss umso länger gewählt werden, je stärker die Adhärenz der Zellen an der Kulturflasche ist. Beginnen sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche zu lösen, so kann das Trypsin mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt werden. Durch das Schütteln der Flasche kann das Ablösen der Zellen weiter erleichtert werden. Bei besonders adhärenten Zellen kann die Nutzung eines Cell-Scrapers vonnöten sein. Im folgenden Schritt werden die Zellen in 2,5 ml Medium aufgenommen. Die hierbei gewonnenen Zellen können nun in neue Kulturflaschen mit frischem Medium gegeben werden (Passagewechsel). Zur weiteren Subkultivierung von Zellen empfehlen sich kleine Kulturflaschen, die mit etwa 0,5 ml der in Lösung befindlichen Zellen zu befüllen sind. Hierzu werden etwa 7 ml frisches Medium gegeben. Werden Zellen für den Beginn eines Versuches benötigt, sollten große Kulturflaschen verwendet werden, um möglichst viele Zellen zur Verfügung zu haben. Große Kulturflaschen werden mit etwa 1 ml der zuvor gewonnenen Zellsuspension befüllt. Hinzugefügt werden etwa 12 ml Medium.

5.5.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die großen Zellkulturflaschen nach dem Absaugen des Mediums mit 2 ml Trypsin beimpft. Nach Lösung der Zellen werden diese in 10 ml Medium aufgenommen.
Zur Vereinfachung der Zählung wird nun eine 1:5 Zellsuspension in einer separaten 1,5-ml-Eppendorftube hergestellt. Mit dieser 1:5 Zellsuspension wird ein Objektträger mit Zählkammern beimpft.
Nun können die Zellen pro Zählkammer ausgezählt werden. Um einen möglichst genauen Wert zu erhalten, werden 4 Zählkammern ausgezählt und die durchschnittliche Zellzahl hieraus bestimmt. Dieser Wert muss mit 5 multipliziert werden, um den Wert für die 1:1 Zellsuspension zu erhalten. Das Ergebnis hieraus wird nun mit 10 000 multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro ml zu erhalten.

5.5.3 Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren von Zellen sollte nur dann erfolgen, wenn die Zellen eine hohe Konfluenz aufweisen. Sind die Zellen adhärent, kann das Medium abpipettiert werden. Im nächsten Schritt wird 0,05% Trypsin/EDTA aufpipettiert und für 5 min bei 37°C in 5% CO_2 im wasserdampfgesättigten Brutschrank inkubiert. Inwieweit sich die Zellen bereits von der Kulturflaschenoberfläche gelöst haben, kann unter lichtmikroskopischer Sicht kontrolliert werden. Bei schwer löslichen Zellen kann das Schütteln der Flasche oder sogar das Abschaben der Zellen mit Hilfe eines Cell-Scrapers von der Flaschenoberfläche nötig sein, um sämtliche Zellen in Lösung zu bringen.
Zum Abstoppen der Wirkung des Trypsins wird RPMI 1640 mit 10 % FCS in die Kulturflasche gegeben. Die nun entstandene Zellsuspension wird in ein 15 ml steriles Nunc pipettiert und bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml Freezing-Medium (mit DMSO) aufgenommen.

Da DMSO sehr zelltoxisch ist, ist es wichtig, den Nunc rasch auf Eis zu stellen. Anschließend erfolgt die eintägige Lagerung des Nuncs bei – 80°C. Die dauerhafte Aufbewahrung erfolgt dann im flüssigen Stickstoff bei – 196 °C.

5.5.4 Proliferationstest (MTT)

Das Prinzip des MTT-Tests

Der MTT Proliferationstest ist ein qualitativ colorimetrischer Test, der lebende Zellen durch ihre mitochondrale Stoffwechselaktivität nachweist. Die den Zellen angebotene Zusammensetzung, bestehend aus Tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, innert salt; MTS) und einem Elektronen verbindenden Reagenz (phenazine ethosulfate; PMS) und wird von den Mitochondrien vitaler Zellen in einer NADH abhängigen Reaktion zu Formazanen umgebaut. Die Quantität des Formazans wird bei 490 nm mit Hilfe des Elisareaders bestimmt. Die somit messbare Farbintensität ist direkt proportional der Anzahl vitaler Zellen in der Zellkultur.[61]

Durchführung des MTT-Tests

In einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wird die erwünschte Anzahl an Zellen pro well ausgesät und für 24 h bei 37°C in ihrem Medium kultiviert. Nach 24 Stunden werden zur Auswertung des Zeitpunktes Null die jeweiligen Löcher der Mikropipettierplatte mit 20 µl Cell Titer beimpft und erneut für 2 Stunden inkubiert. Nach 2 Stunden erfolgt die Auswertung mit Hilfe des Elisareaders, welcher Messungen bei 490 nm vornimmt. Hierdurch kann die Anzahl der Zellen zu Beginn des Versuches bestimmt werden.
Des Weiteren werden zum Zeitpunkt Null die unterschiedlichen Medikamenten-konzentrationen auf die vorbereiteten Mikropipettierplatten gebracht. Nach 48 Stunden erfolgt hier die Auswertung des Versuches durch den MTT-Test, wie schon zuvor für

die Zellzahlbestimmung zum Zeitpunkt Null mit einer Menge von 20 µl Cell Titer und einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Um eine möglichst hohe Ergebniszuverlässigkeit zu erreichen, wurde jede Messung mindestens dreimal in unabhängigen Versuchen durchgeführt.

5.5.5 Die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50}

Als mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) wird die Konzentration eines Inhibitors bezeichnet, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird.
In der Pharmakologie wird der IC_{50} verwendet, um die Wirkstärke eines Antagonisten anzugeben. Dieser ist vergleichbar mit der EC_{50} eines Agonisten.
Nach der Food and Drug Administration, der Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten, ist der IC_{50} die Konzentration einer Substanz, die notwendig ist für eine 50%ige Inhibition in vitro. Der EC_{50} gibt auch die Plasmakonzentration an, die erforderlich ist für einen 50%igen Effekt in vivo.
Abhängig ist der IC_{50} bzw. EC_{50} bei kompetitiven Inhibitoren von K_m, K_i und der Substratkonzentration:

$$IC50 = [1 + \frac{[Substrat]}{K_m}] \times K_i$$

Zur Berechnung des IC_{50} wurde in vorliegender Arbeit das Rechenprogramm ‚R' verwendet. Die Berechnungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Eik Vettorazzi, wissenschaftlicher Mitarbeiter vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf.

5.5.6 Immunhistochemische Peroxidasereaktion

Präparation der Chambersildes

Die Zellen werden, wie bereits im Teil ‚Anzucht und Subkultivierung von Tumorzellen' beschrieben, durch Behandlung mit Trypsin in Lösung gebracht. Anschließend wird die Zellzahl der einzelnen Zelllinien bestimmt. Die Zellsuspension wird mit dem entsprechenden Anteil an Medium verdünnt, sodass eine Zellkonzentration von 300 000 Zellen/µl vorzufinden ist. Jede Kammer wird mit 0,5 ml Zellsuspension befüllt, leicht geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden sind die Zellen am Zellboden adhärent, so dass das Medium abgesaugt werden kann. Nun werden die Kammern erneut mit 0,5 ml Medium befüllt, welches dieses Mal jedoch, außer in den Kontrollkammern, mit der gewünschten Konzentration eines der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA oder 17-DMAG versetzt ist.

Fixierung der Zellen in den Chamberslides

Zunächst wird das überstehende Medium aus den Kammern abgesaugt. Dann wird jede Kammer zweimal mit 500 µl 6 °C kaltem DPBS gewaschen, wobei die Chamberslides zwischendurch leicht geschüttelt werden. Im nächsten Schritt werden die Kammern mit 500 µl Acetonmethanol, welches direkt aus dem Eisfach kommt, befüllt und für 5 Minuten auf Eis gelagert. Danach wird das Acetonmethanol abgesaugt, sodass die Kammern bei Raumtemperatur trocknen können. Bis zum Zeitpunkt der Färbung können die Chamberslides nun im Eisfach gelagert werden.

Blockierungsvorgänge

Bevor abschließend die gewünschte Färbung durchgeführt werden kann, muss ein weiterer Schritt dazwischen geschoben werden, um sicher zu stellen, dass die später verwendeten Enzyme nur an erwünschten Rezeptoren binden. Dazu müssen andere

unspezifische Bindungsstellen zuvor blockiert werden. Nach jedem Blockierungsschritt (außer zwischen Serum-und Avidinblock) erfolgen drei Waschschritte der Kammern für jeweils 5 Minuten mit PBS.
Als erstes wird das Peroxidase Blocking Reagent aus dem Cell & Tissue Staining Kit für 5 Minuten auf die Kammern gegeben. Im nächsten Schritt wird das Serum Blocking Reagent G für 15 Minuten auf die Kammern aufgetragen und anschließend abgeklopft. Dann erfolgt eine 15-minütige Blockierung mit dem Avidin Blocking Reagent. Daran schließt sich der Biotin Block erneut für 15 Minuten an. Nun kann der Antikörper aufgetragen werden.

Auftragen der Primär- und Sekundärantikörper sowie des Enzyms

Im Anschluss an die Blockierungsvorgänge werden die Zellen mit dem Primärantikörper bzw. den entsprechenden Kontrollen über Nacht bei 4 °C inkubiert und wieder nach jedem Inkubationsschritt dreimal mit PBS gewaschen. Bei der vorliegenden Fragestellung wurden folgende Primärantikörper verwendet: anti-Hsp90, Her-2 und IGF-IRα. Als Kontrollen wurden für die Mouseantikörper Mouse IgG1κ (MOPC-21) und für die Rabbitantikörper Rabbit Immunoglobulin Fraction in der entsprechenden Konzentration eingesetzt. Danach wurde der Sekundäre Antikörper (Secondary Biotinylated Antibody) für 45 Minuten auf die Kammern aufgetragen. Im nächsten Schritt wurde das Enzym HSS-HRP für 30 Minuten aufgetragen.

Färbung

Als Substrat für die Färbung dient AEC Chromogen, von dem 1 Tropfen mit 2 ml AEC Chromogen Puffer gemischt werden. Nach 10-minütiger Inkubation werden die Kammern in destilliertem Wasser gesammelt. Zur Gegenfärbung wird Hematoxylin verwendet (3 Minuten) und anschließend unter Leitungswasser für 5 Minuten gebläut, dann in destilliertem Wasser gesammelt und mit Aquatex eingedeckt.
Nach dem Trocknen der Chamberslides kann nun die mikroskopische Auswertung erfolgen.

5.5.7 Western Blott

Das Prinzip des Western Blott

Western Blotting ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von markierten Antikörpern. Durch Elektophorese werden Proteine zunächst aufgetrennt, so dass sie durch Blottern auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend mit Antikörpern detektiert werden können.
Zur Gewinnung der Proteine werden die Kulturplatten mit den Tumorzellen zweimalig mit kaltem PBS gewaschen und ebenfalls in PBS und 10 mol/l Ethylenediaminetetraacetic-Säure-Puffer gesammelt und bei 2 krpm zentrifugiert. Im Anschluss werden die Zellen in einem Lyse-Puffer (bestehend aus 100 mM Tris-HCI [pH 7.4], 10 mM Ethylenediaminetetraacetic-Säure, 1% IGEPAL, 2 mM Phenilmethylsulfonylflurid, 50 mM NaF, 1 mM Na3VO4) angereichert mit 1x Proteinaseinhibitor-Cocktail lysiert. Das Lysat wird durch Zentrifugation gereinigt. Der Überstand wird gesammelt. Das Niveau der Proteinexpression der Lysatproben, jeweils mit gleicher Proteinmenge (50-100µg), werden durch Western Blott mit anti-Her2, anti-IGF-IRα, anti-EGF-R1 und anti-Hsp90 untersucht. Unter Verwendung von Super Signal ULTRA chemiluminescence kit und horseradish-coupled secondary anti-rabbit antibody werden spezifische Signale sichtbar gemacht. Die Determination der Signalintensität wird durch den Gebrauch von Bioimager erreicht.

Herstellung der Gele

Für die Durchführung der Immunoblot Analyse ist die Herstellung zweier polymerisierter Gele vonnöten. Es wird ein 12%-iges und ein 5%-iges Gel aus entsprechenden Konzentrationen an H_2O, 30%-igem Acrylamide/Bis, Puffer, 10%-igem SDS (im Wasserbad erwärmt) und Temed hergestellt.
Zunächst erfolgt die Befüllung der Kammern mit dem 12%-igen Gel und H_2O (Temed). Die Polymerisierung dauert 30 Minuten. Nach dem Abgießen des Überstandes erfolgt ein zweimaliger Waschvorgang mit destilliertem Wasser. Temed wird zum 5%-igen Gel

hinzugefügt, welches dann auf das 12%-ige Gel in den Kammern aufgetragen wird. Nun wird der Kamm eingesetzt. Es folgt ein weiterer 30-minütiger Polymerisierungsvorgang. Die Gel-Glasplatten werden unter fließendem Wasser abgewaschen. Nach der Entfernung der Kämme werden die entstandenen Taschen mit destilliertem Wasser gewaschen.

Befüllung der Taschen

Die Proben-Tubes, befüllt mit Loading-Puffer und der Proteinlösung der behandelten Zellen, werden bei 99°C und 850 rpm im Thermomixer für 5 Minuten geschüttelt und anschließend bei 21 °C und 4000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.
Der Taschenboden der Gelplatten wird markiert. Nun kann die Platte in den Elektrodenteil eingesetzt werden. Die innere Kammer wird komplett, die äußere zu einem Viertel mit dem Running-Puffer, bestehend aus Tris, Glycine und SDS, aufgefüllt.
Mit Hilfe einer Nadel werden die Taschen mit den Proben befüllt, wobei die erste Tasche als Standard zur Kontrolle dient und mit Bio-Rad Precission Plus Protein Dual Color Standarts aufgefüllt wird.
Das Power Pac Universal-Gerät wird mit dem Deckel verschlossen und das SDS Page 100V Programm eingeschaltet.

Herstellung des Gelsandwiches

Zunächst erfolgt die Vorbereitung der Trans-Blot® Transfer Nitrozellulose-Membran, indem diese in eine Plastikschale gegeben, mit destilliertem Wasser abgespült, daraufhin einmal mit transfer semidry Puffer befüllt und auf den Schüttler gegeben wird.
In der Zwischenzeit wird die Gelglasplatte aus dem Gerät entnommen. Die Geltaschen werden mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten, in eine weitere, mit Transferpuffer enthaltene Plastikschale gelegt und für 10 Minuten ebenfalls auf den Schüttler gegeben.
Criterion size Platten werden in eine Plastikschale gegeben und mit Transferpuffer durchtränkt. Die durchtränkten Criterionplatten werden auf den Blotter gelegt und

erneut mit Transferpuffer übergossen. Die Nitrozellulosemembranen werden nun auf die Criterionplatten gelegt und ebenfalls mit Transferpuffer übergossen. Hierauf werden die Gele gelegt, die wieder mit Transferpuffer übergossen werden. Zuletzt wird eine weitere Criterion size Platte auf die Gele gelegt, die wiederum erneut mit Transferpuffer übergossen wird.

Das nun entstandene Sandwich wird mit Hilfe einer Glaspipette überrollt, um eine mögliche Blasenbildung zu verhindern. Der Anodendeckel wird auf das Sandwich gelegt und durch den Plastikabdeckdeckel verschlossen. Das Gerät (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell) wird eingeschaltet (Methoden: Transfer, run, für 90 Minuten).

Beladen der Membran mit Antikörpern

Die Membran wird aus dem Sandwich entnommen, in eine Plastikschale gegeben und mit Ponceau S solution übergossen, welches die Proteine rot färbt.

Im Anschluss erfolgt zunächst ein Waschvorgang mit destilliertem Wasser, anschließend mit TBS tween, bis die rote Farbe herausgewaschen ist.

Dann wird eine 5% Milch hergestellt, mit der die Membranen für 2 Stunden geblockt werden. Die Milch wird abgegossen. Nun erfolgt die Herstellung eines Gemisches aus Milch und den entsprechenden Antikörpern. In diesem Gemisch werden die Membranen über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Es folgt das Abgießen der Antikörper und mehrere Waschvorgänge der Membranen. Zunächst dreimal mit TBS tween, dann einmal mit TBS für je 10 Minuten.

Nun werden die Zweitantikörper in 2,5 %-Milch gemischt (goat-anti-Mous/goat-anti-rabbitt 1 GG) und für eine Stunde auf die Membranen gegeben. Es folgt das Verwerfen der Antikörper sowie erneut der Waschvorgang wie oben beschrieben mit TBS tween und TBS.

Entwicklung des Filmes

Super Signal® West Dura Luminol/ Enhancer Solution wird mit dem Super Signal® West Dura Stable Peroxid Puffer gemischt und für eine Minute auf die Membran gegeben, die zuvor auf eine Platte gelegt wurde. Überschüssige Flüssigkeit wird mit

Hilfe einer Pipette abgerollt. Anschließend wird die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt und in eine Röntgenkassette gegeben.
In einer Dunkelkammer wird die Membran auf einen Film gelegt und für einige Minuten durch das Fluoreszieren des Zweitantikörpers belichtet.
Die Entwicklung des Filmes erfolgt unter Standartbedingungen durch eine Entwicklungsmaschine (AGFA CP 1000).

5.6 Software

- Microsoft® windows® XP: Microsoft® Office: Microsoft® Excel®, Microsoft Word®
- Mikro Win 2000
- R

5.7 Statistische Auswertung

Die Werte des MTT-Tests wurden durch den Elisareader mit Hilfe des Programms Mikro Win 2000 ermittelt. Die Auswertungen der Messergebnisse erfolgte anschließend durch das Programm Microsoft Excel®.
Zur Berechnung des IC_{50} wurde mit dem Programm R gearbeitet.
Die Berechnungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Eik Vettorazzi, wissenschaftlicher Mitarbeiter vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf.

6. Ergebnisse

6.1 Versuchsaufbau der MTT-Tests

Vorversuche

Um optimale Bedingungen eines Versuchsaufbaus zu schaffen, musste zunächst mit unterschiedlichen Versuchsanordnungen experimentiert werden. Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Zellzahlen zu Versuchsbeginn, unterschiedlicher Versuchsdauer und unterschiedlichen Nährmedien durchgeführt. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse wurden genutzt, um den Versuchsaufbau entsprechend modifizieren zu können.

6.1.1 Medienversuch

Um festzustellen, welche Auswirkung die FCS-Konzentration auf den Ausgang der Versuche hat, wurde eine Versuchsreihe mit verschiedenen FCS-Konzentrationen durchgeführt. In dieser Versuchsreihe wurde das TUM-Medium mit einem 2% FCS-Medium und einem 5% FCS-Medium verglichen. Es wurden 5 000 Zellen pro well als Ausgangswert gewählt. Die Zellzahl wurde zum Zeitpunkt Null, nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt. Als Medikament diente 17-DMAG mit einer Konzentration von 0,05, 0,5 und 5µM. Diese Versuchsreihe wurde sowohl mit PT 1590 als auch mit LN 1590 durchgeführt.

6.1.2 Auswertung der Versuche der unterschiedlichen Medien

Wir haben bei der Auswertung der Versuchsreihen festgestellt, dass die Zellproliferation der Zelllinien PT1590 und LN1590 im TUM-Medium und im 5%FCS-Medium in etwa miteinander vergleichbar ist. Im 2%FCS-Medium proliferieren die Zellen weniger stark. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass FCS die Zellproliferation wesentlich beeinflusst. Dennoch ist sowohl im TUM-Medium als auch im 5%FCS-Medium eine starke Minderung der Zellproliferation durch die unterschiedlichen 17-DMAG-Konzentrationen zu beobachten, was für eine gute Wirksamkeit des Medikaments auch im reichhaltigeren Medium spricht. Des Weiteren wird hier die Abhängigkeit der Zellinhibition bei den unterschiedlichen Konzentrationen von 17-DMAG viel deutlicher, als im Versuch mit dem 2%FCS-Medium.
In Anbetracht dieser Ergebnisse wurden die folgenden Versuche mit den Zelllinien PT1590 und LN1590 im TUM-Medium durchgeführt.

6.1.3 Versuchsreihe mit unterschiedlichen Messzeiten

Ziel dieser Arbeit war es, Medikamentenkonzentrationen zu finden, bei denen der IC_{50} erreicht wurde. Prämisse war, dass nicht nur die Medikamentenkonzentration, sondern auch die Zeit, die das jeweilige Medikament auf die Zellen einwirkte, Einfluss auf den Grad der Inhibition der Zellproliferation haben würde. Ziel der Versuchsanordnung war, dass der IC_{50} ohne die Notwendigkeit einer besonders hohen Medikamenten-konzentration erreicht wurde, um die Toxizität möglichst gering zu halten.
Hierzu wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der die Zellzahl zu den Zeitpunkten: Null, nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt wurde. Diese Versuchsreihe wurde mit der Zelllinie PT1590 durchgeführt. Als Medium diente das TUM-Medium. Als Ausgangswert wurden 15 000 Zellen pro well gewählt. Diese Versuchsreihe wurde mit den Medikamenten 17 AAG, 17 AEG-PA und 17-DMAG durchgeführt, jeweils in den Konzentrationen 0,05, 0,5 und 5 µM.

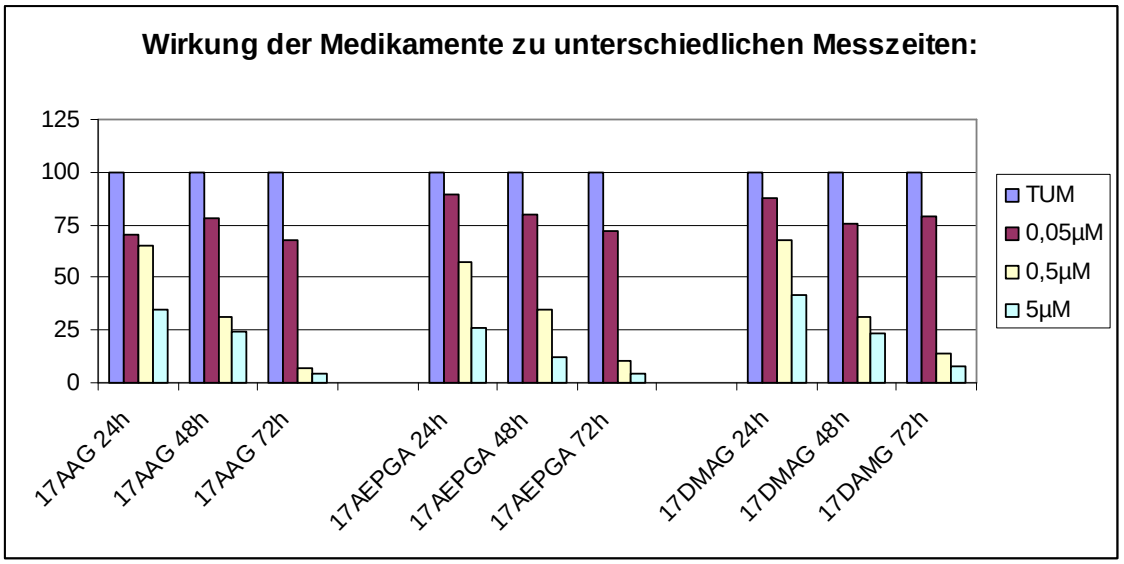


Abbildung 14: Versuche der Zelllinie PT1590 zur Wirkung von 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG zu unterschiedlichen Messzeiten.

6.1.4 Auswertung der Versuchsreihe mit unterschiedlichen Messzeiten

Die graphische Darstellung zu dieser Versuchsreihe lässt erkennen, dass bei jedem Medikament dieses Versuches das Erreichen einer 50%-ige Reduktion der Zellzahl in allen drei Messzeiten möglich ist. Hierfür sind jedoch unterschiedlich hohe Medikamentenkonzentrationen nötig. Da nach 24 Stunden nur die höchste der hier gewählten Medikamentenkonzentration eine 50%-ige Reduktion der Zellzahl erreicht, während diese nach 48 und nach 72 Stunden bereits durch die zweithöchste erreicht wurde, wurden die folgenden Versuchsreihen über 48 Stunden durchgeführt.

6.1.5 Versuche mit unterschiedlicher Zelldichte und deren Auswertung

Anfänglich wurden Versuchsreihen mit 5 000 Zellen pro well durchgeführt. Da hierbei der spontane Zelltod die Aussagefähigkeit der Versuchsergebnisse minderte, wurde in den folgenden Versuchen eine Zellzahl von 15 000 Zellen pro well gewählt. Da ebenso

eine zu hohe Zelldichte einen selbstlimitierenden Einfluss auf die Zellen hatte (zu viele Zellen pro Nährmedium), wurden schließlich Versuche mit einer Zellzahl von 10 000 Zellen pro well durchgeführt.

Versuchsaufbau folgender Versuchseihen

Tabelle 7: Tabelle zum Versuchsaufbau folgender Versuchsreihen.

Zellzahl zu Versuchsbeginn:	10 000 Zellen pro well
Versuchsdauer:	48 Stunden
Medium bei Versuchen der Zelllinien PT1590, LN 1590 und MCF-7:	TUM-Medium
Medium bei Versuchen der Zelllinien OE19 und OE33:	OE-Medium

6.2 Versuchsreihen unterschiedlicher Medikamenten-konzentrationen zum Erreichen des IC50

Versuche zur Findung geeigneter Medikamentenkonzentrationen

6.2.1 Versuchsreihe mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7

Um herauszufinden, in welchem Messbereich der Medikamentenkonzentration des jeweiligen Medikaments eine 50%ige Inhibition des Zellwachstums in etwa anzusiedeln war, wurden zunächst Versuchsreihen mit einzelnen wenigen Medikamenten-konzentrationen durchgeführt. Hier wurden sich Ergebnisse von bereits veröffentlichten Studien zu Nutze gemacht. Jefferson Terry et al. hatten in ‚Hsp90 Inhibitors 17-

Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin Prevents Synovial Sarcoma Proliferation via Apoptosis in *In vitro* Models' unter anderem die Wirksamkeit des Medikaments 17 AAG auf Mammakarzinomzellen der Zelllinie MCF-7 gezeigt.[62] Zur Eigenkontrolle und als Ausgangspunkt für weiterführende Versuche wurden daher ebenfalls Versuchsreihen mit der Zelllinie MCF-7 durchgeführt. Die Medikamentenkonzentrationen für diese Versuchsreihe betrugen, wie in der Studie von Jefferson et al., die Werte 0,05, 0,5 und 5µM.

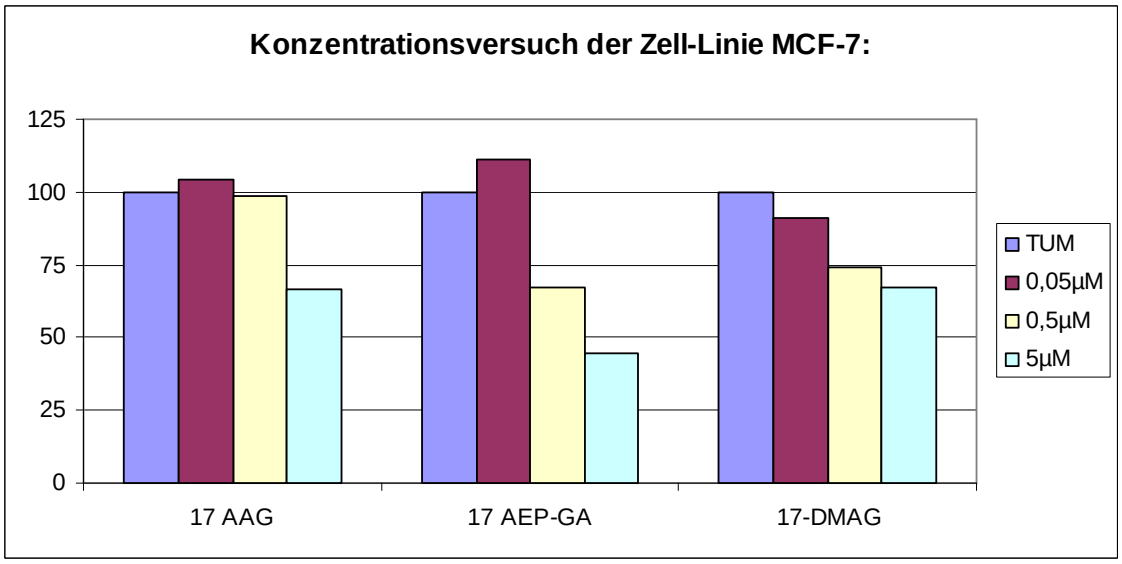


Abbildung 15: Versuch der Zelllinie MCF-7 zur Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.2.2 Versuchsreihe mit der Ösophaguskarzinomzelllinie PT1590

Um eine Orientierung zu bekommen, wie in den folgenden Versuchsanordnungen die Medikamentenkonzentrationen gewählt werden müssten, um eine 50%ige Zellinhibition zu erreichen, wurde der oben dargestellte Versuchsaufbau der Zelllinie MCF-7 auf die Zelllinie PT1590 übertragen. Somit wurden Versuche erneut mit den Medikamentenkonzentrationen: 0,05, 0,5 sowie 5µM durchgeführt.
Dieser Versuchsaufbau ermöglichte außerdem einen Vergleich der Sensibilität der Zelllinie MCF-7 mit der Sensibilität der unterschiedlichen Ösophaguszellkarzinomzelllinien auf die verwendeten Medikamente.

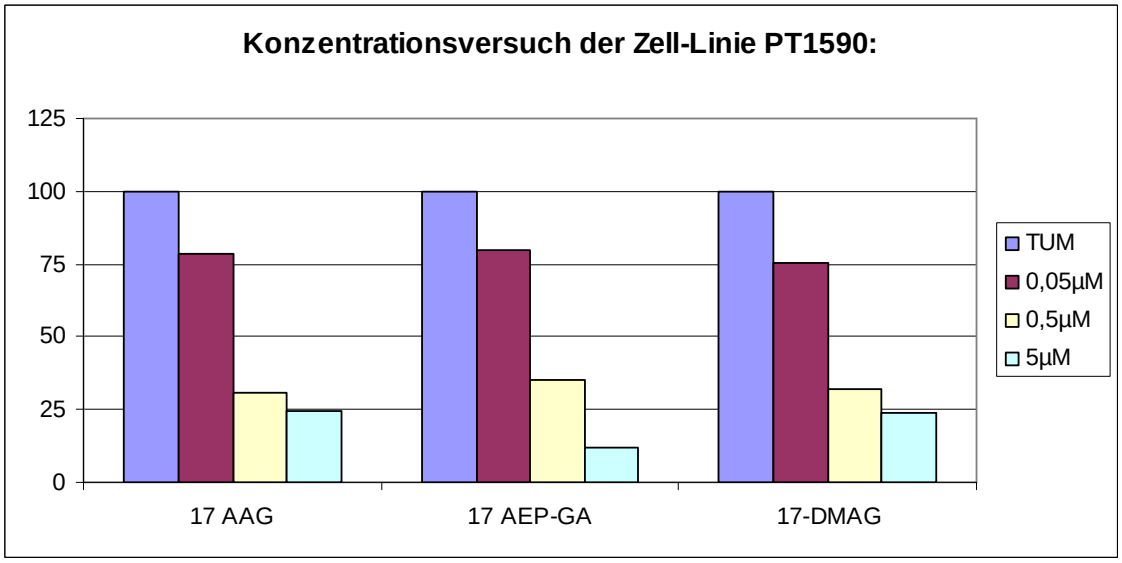


Abbildung 16: Versuch der Zelllinie PT1590 zur Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.2.3 Modifizierter Versuchsaufbau

Nach Auswertung dieser Ergebnisse konnte der Versuchsaufbau so modifiziert werden, dass Konzentrationen gewählt wurden, die das Erreichen einer 50%igen Zellinhibition

wahrscheinlicher machten. In diesen Bereichen wurden die Abstände der Medikamentenkonzentrationsunterschiede entsprechend enger gewählt.

Da die Versuchsergebnisse zeigten, dass eine 50%ige Zellinhibition bei einer Medikamentenkonzentration, die zwischen den Werten 0,05 und 0,5µM lag, erreicht wurde, wurde in den folgenden Versuchsreihen dieser Konzentrationsbereich genauer betrachtet. Als Medikamentenkonzentrationen wurden folglich gewählt: 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 und 5µM.

Bei Versuchen mit dem Medikament 17 AAG wurde zudem die Wirkung von DMSO in einer Konzentration von 0,1% getestet. 17 AAG ist als einziges der drei verwendeten Medikamente nicht wasserlöslich, sondern bedarf der Lösung in reinem DMSO.

Da DMSO bereits eine Eigentoxizität aufweist, sollte durch diese Versuchsanordnung zusätzlich nachgewiesen werden, dass die inhibitorische Wirkung von 17 AAG nicht durch die Toxizität seines Lösungsmittels hervorgerufen wird.

6.3 Versuche der Zelllinie PT1590

6.3.1 Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG

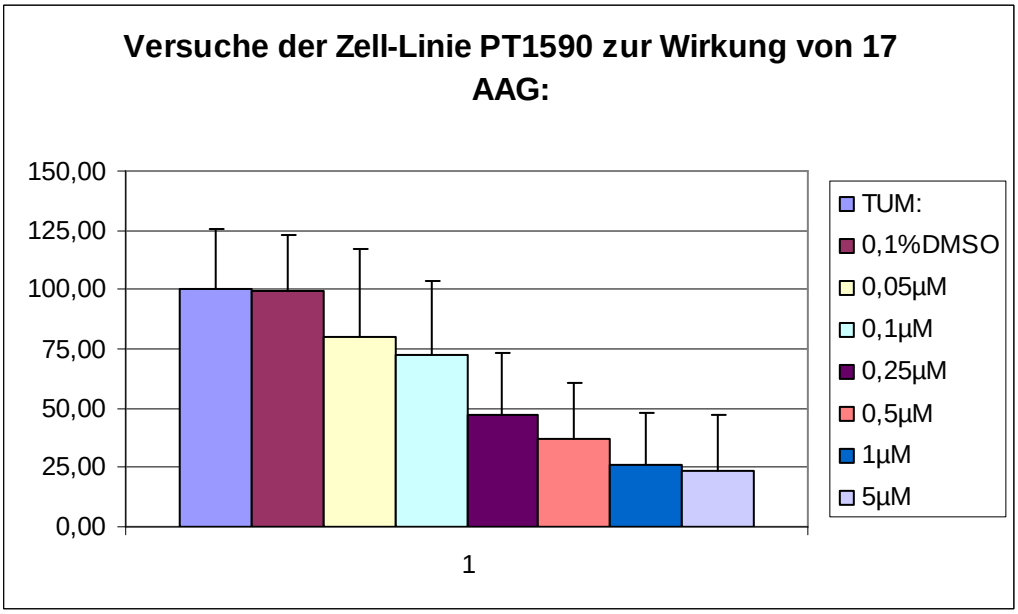


Abbildung 17: Versuch zur Wirkung von 17 AAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie PT1590. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.3.2 Versuchsauswertung der Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG

Die Graphik zeigt deutlich, dass DMSO einen äußerst geringen Beitrag zur Inhibition der Zellproliferation hat. Folglich ist die dargestellte Zellinhibition hauptsächlich auf die Wirkung von 17 AAG zurückzuführen.

6.3.3 Versuche mit den wasserlöslichen Medikamenten 17 AEP-GA und 17-DMAG

Für die Versuche mit 17 AEP-GA sowie 17-DMAG wurde der gleiche Versuchsaufbau wie oben beschrieben im Versuch mit 17 AAG gewählt, nur dass hier keine Messungen mit DMSO durchgeführt wurden, da sowohl 17 AEP-GA, als auch 17-DMAG wasserlösliche GA-Derivate sind, die kein DMSO als Lösungsmittel benötigen.

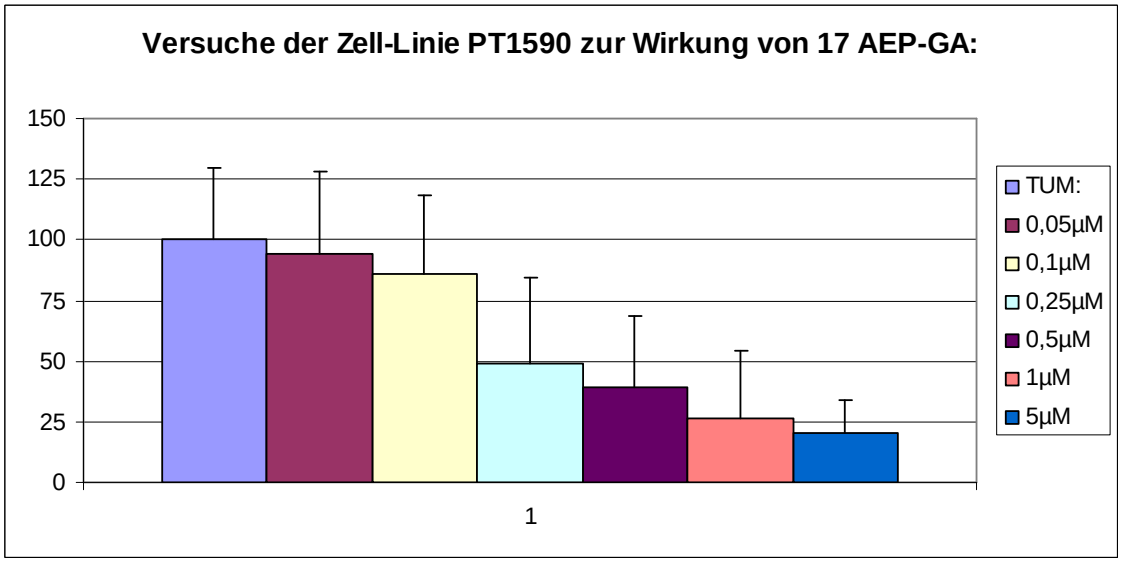


Abbildung 18: Versuch zur Wirkung von 17AEP-GA in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie PT1590. Versuchsdauer: 48Stunden.

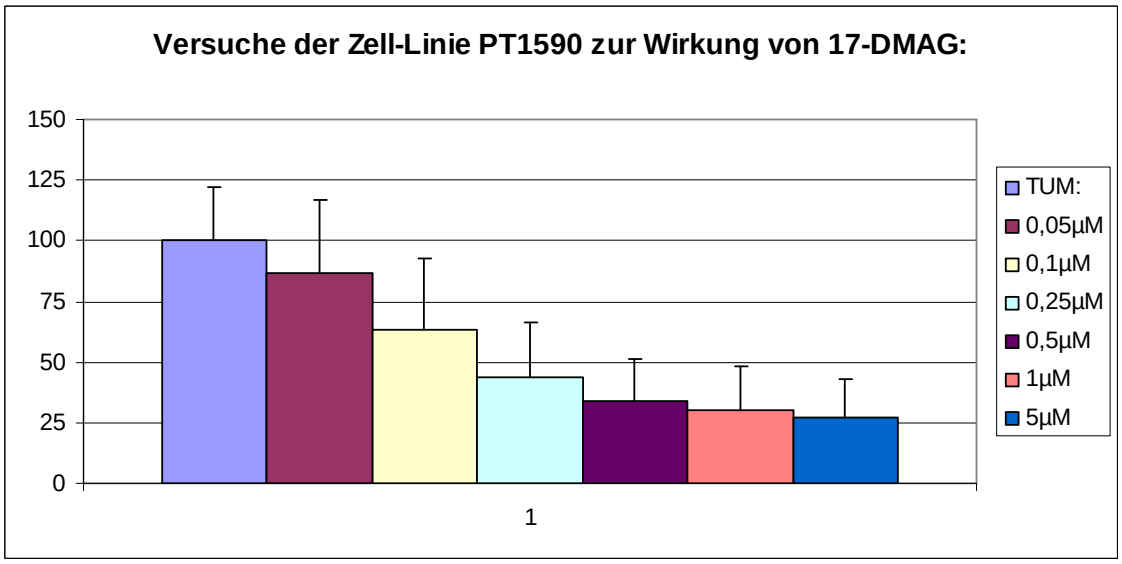


Abbildung 19: Versuch zur Wirkung von 17-DMAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie PT1590. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.4 Versuche der Zelllinie LN1590

6.4.1 Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG

Die oben beschriebene Versuchsanordnung wurde ebenso mit der Zelllinie LN1590 durchgeführt. Bei Versuchen mit dem Medikament 17 AAG wurde zusätzlich abermals die Wirkung von 0,1% DMSO getestet.

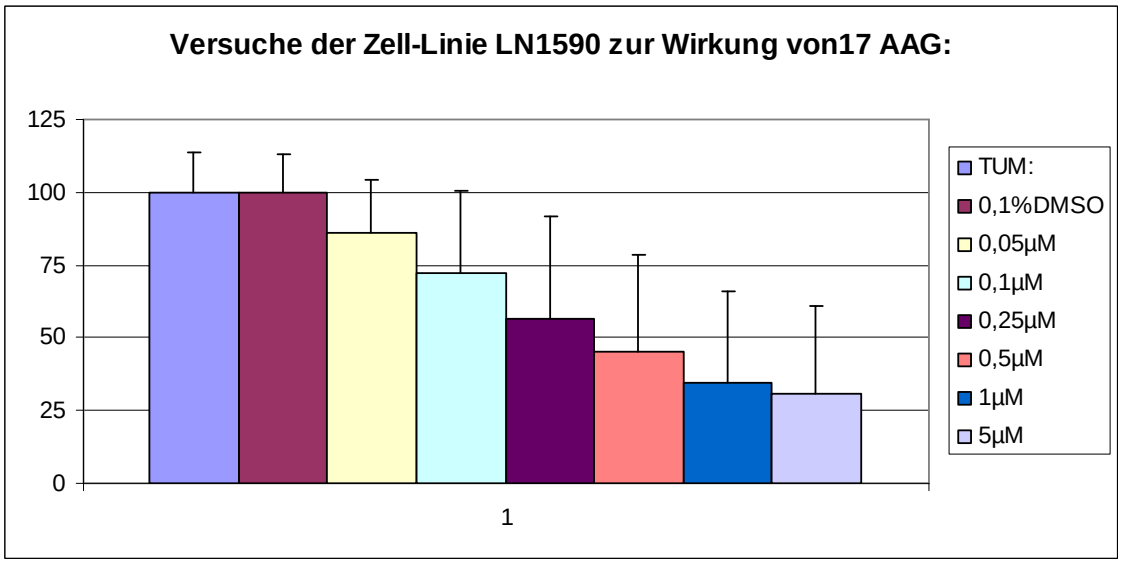


Abbildung 20: Versuch zur Wirkung von 17 AAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie LN1590. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.4.2 Versuche mit den wasserlöslichen Medikamenten 17 AEP-GA und 17-DMAG

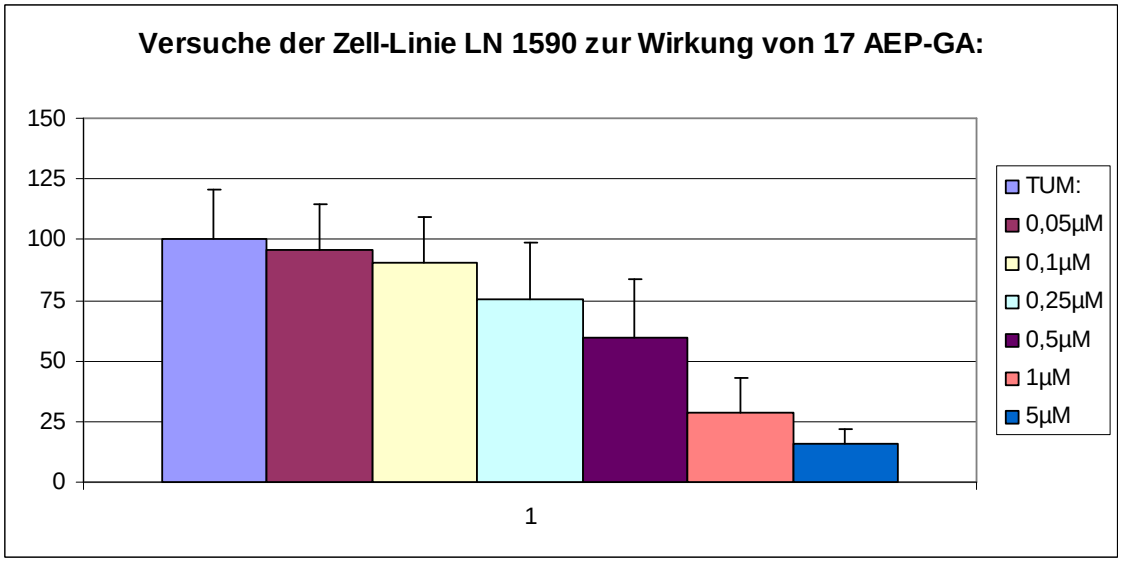


Abbildung 21: Versuch der Wirkung von 17 AEP-GA in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie LN1590. Versuchsdauer: 48 Stunden.

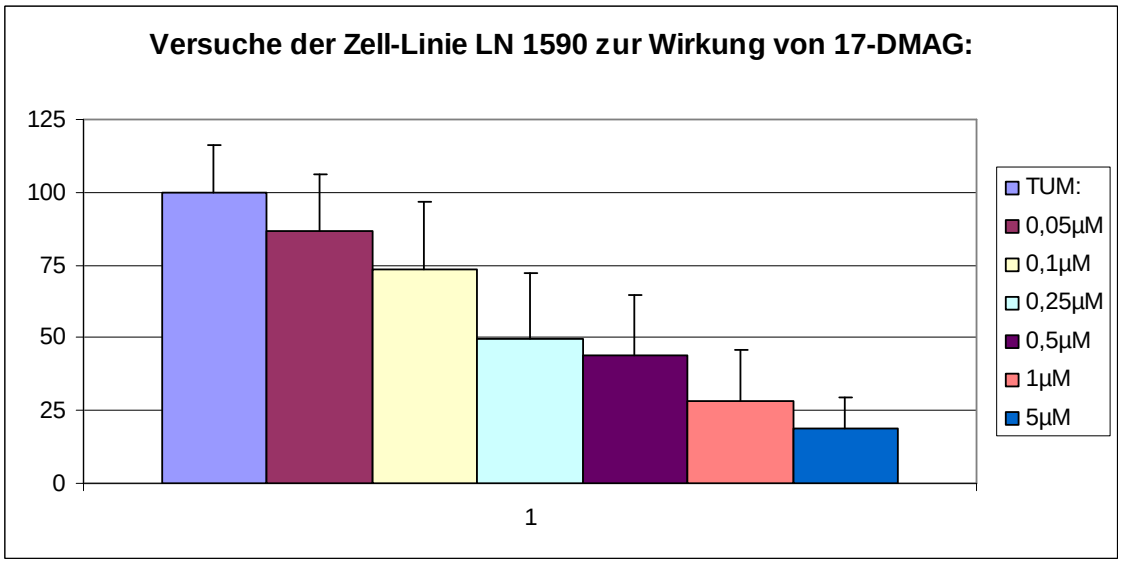


Abbildung 22: Versuch der Wirkung von 17-DMAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie LN1590. Versuchsdauer: 48 Stunden.

Informationen zu den Versuchen der Zelllinien OE19 und OE33

Als Versuchsanordnung diente erneut oben beschriebene Anordnung. Zu erwähnen bleibt nur, dass sich das Nährmedium bei den Zelllinien OE19 und OE33 unterscheidet. Hier wurde kein TUM-Medium, sondern OE-Medium verwendet. Als Medikamentenkonzentration diente die Vorlage oben dargestellter Ergebnisse. Somit wurden erneut Versuche mit den Medikamentenkonzentrationen 0,5, 0,1, 0,25, 0,5, 1 und 5µM durchgeführt.

6.5 Versuche der Zelllinie OE19

6.5.1 Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG

Auch hier diente 0,1% DMSO als Kontrolle.

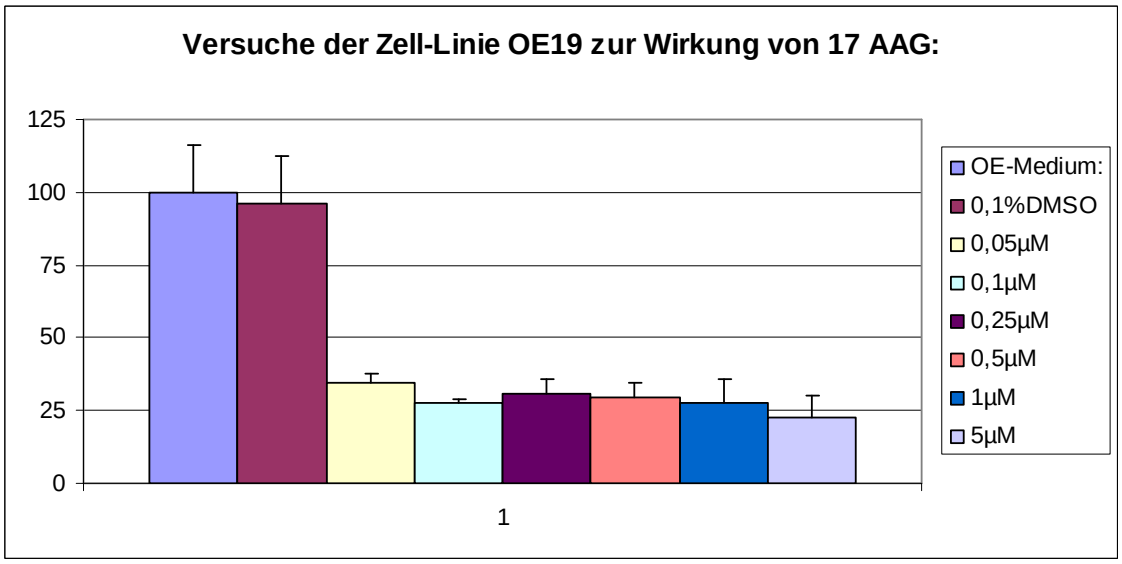


Abbildung 23: Versuch der Wirkung von 17 AAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie OE19. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.5.2 Versuche mit den wasserlöslichen Medikamenten 17 AEP-GA und 17-DMAG

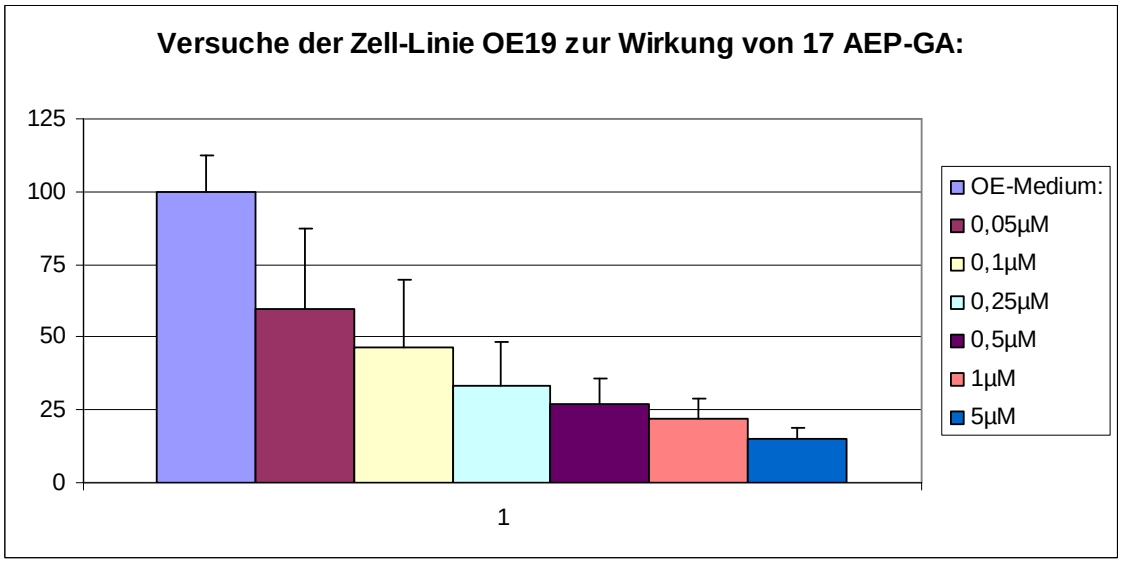


Abbildung 24: Versuch zur Wirkung von 17 AEP-GA in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie OE19. Versuchsdauer: 48 Stunden.

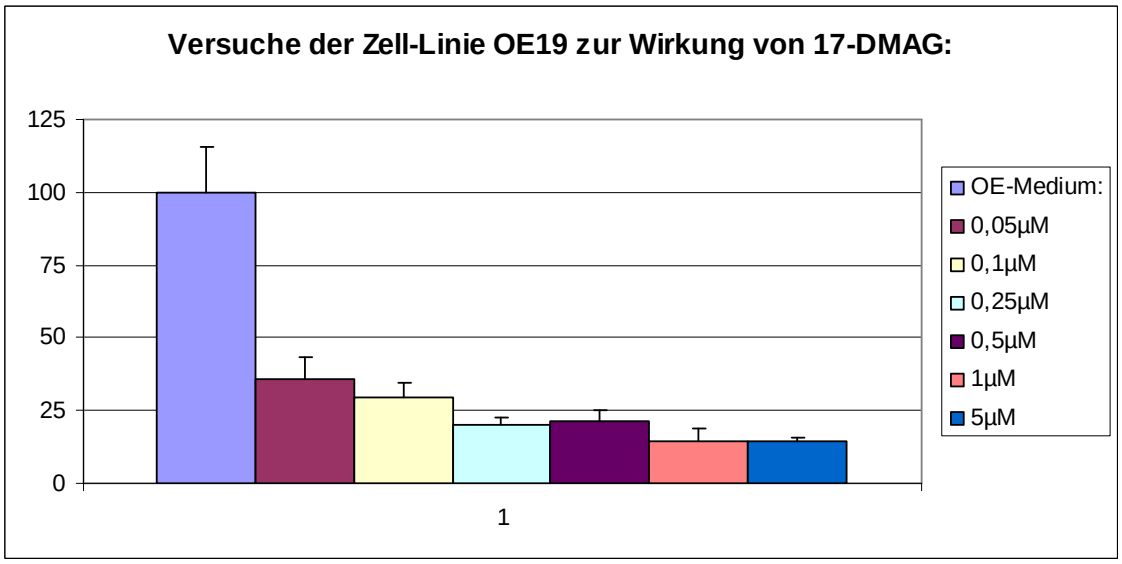


Abbildung 25: Versuch der Wirkung von 17-DMAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie OE19. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.5.3 Modifizierter Versuchsaufbau mit geringeren Medikamenten-konzentrationen

Da in den Abbildungen 23, 24 und 25 klar ersichtlich ist, dass die Tumorzellen der Zelllinie OE19 weitaus sensitiver auf die Medikamente reagieren, ist bei einem Versuchsaufbau mit oben gewählten Medikamentenkonzentrationen eine 50%ige Zellproliferationsinhibition bereits überschritten. Um Medikamentenkonzentrationen zu finden, bei denen in etwa eine 50%ige Inhibition erreicht wird, musste deshalb der Versuchsaufbau so modifiziert werden, dass die Medikamentenkonzentrationen niedriger gewählt wurden. Somit wurde eine erneute Versuchsreihe durchgeführt, bei der Versuche mit den Medikamentenkonzentrationen: 0,01, 0,025 und 0,05µM durchgeführt wurden.

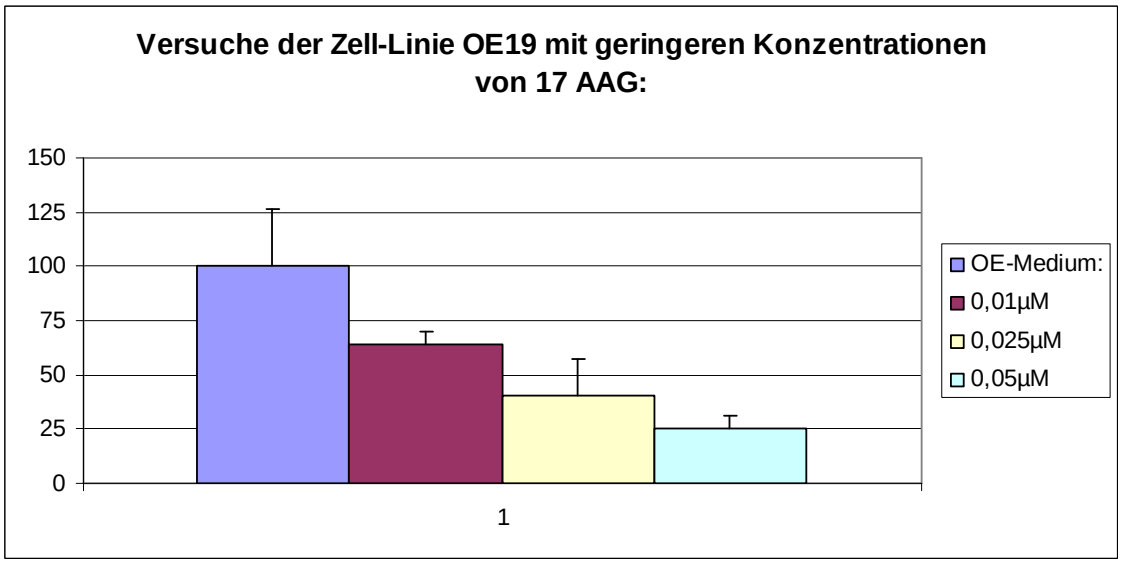


Abbildung 26: Modifizierter Versuchsaufbau der Zelllinie OE19 mit geringeren Medikamentenkonzentrationen. Versuch mit 17AAG. Versuchsdauer: 48 Stunden.

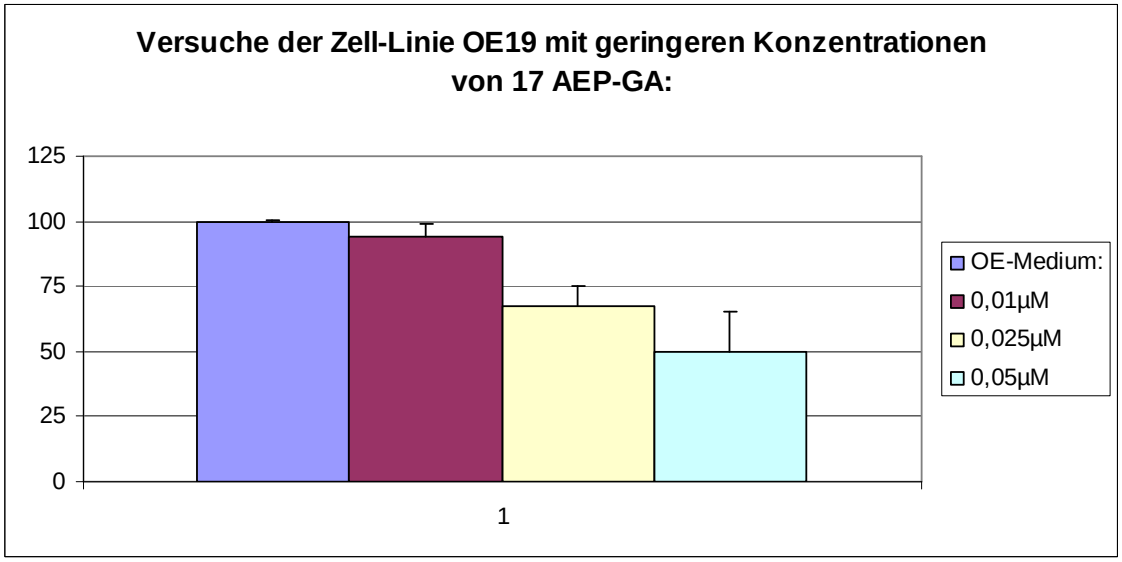


Abbildung 27: Modifizierter Versuchsaufbau der Zelllinie OE19 mit geringeren Medikamentenkonzentrationen. Versuch mit 17 AEP-GA. Versuchsdauer: 48 Stunden.

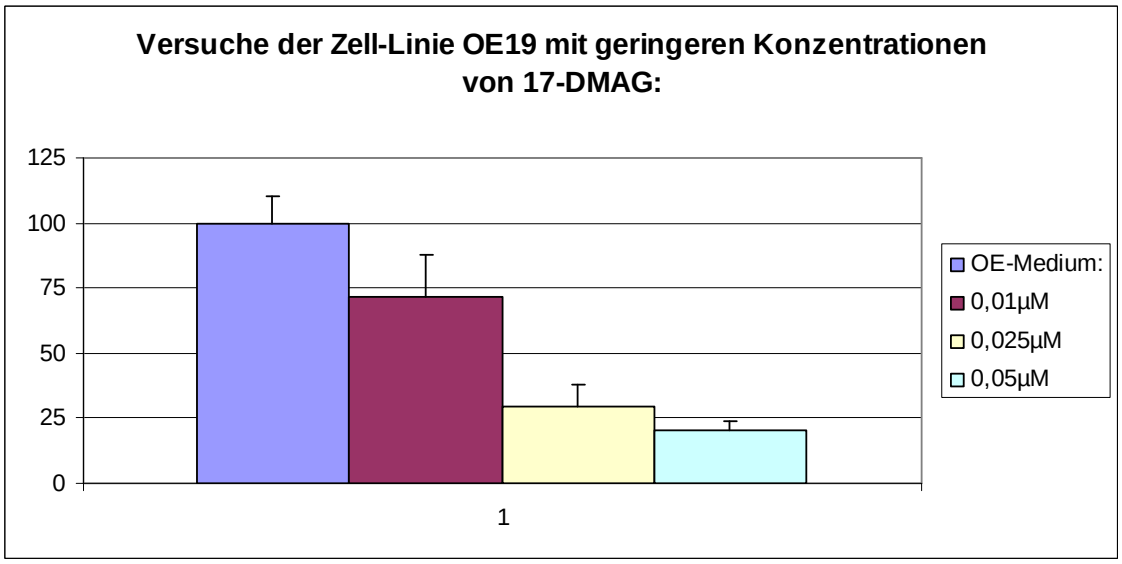


Abbildung 28: Modifizierter Versuchsaufbau der Zelllinie OE19 mit geringeren Medikamentenkonzentrationen. Versuch mit 17-DMAG. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.6 Versuche der Zelllinie OE33

6.6.1 Versuche mit dem in DMSO gelösten Medikament 17 AAG

Auch hier diente 0,1% DMSO als Kontrolle.

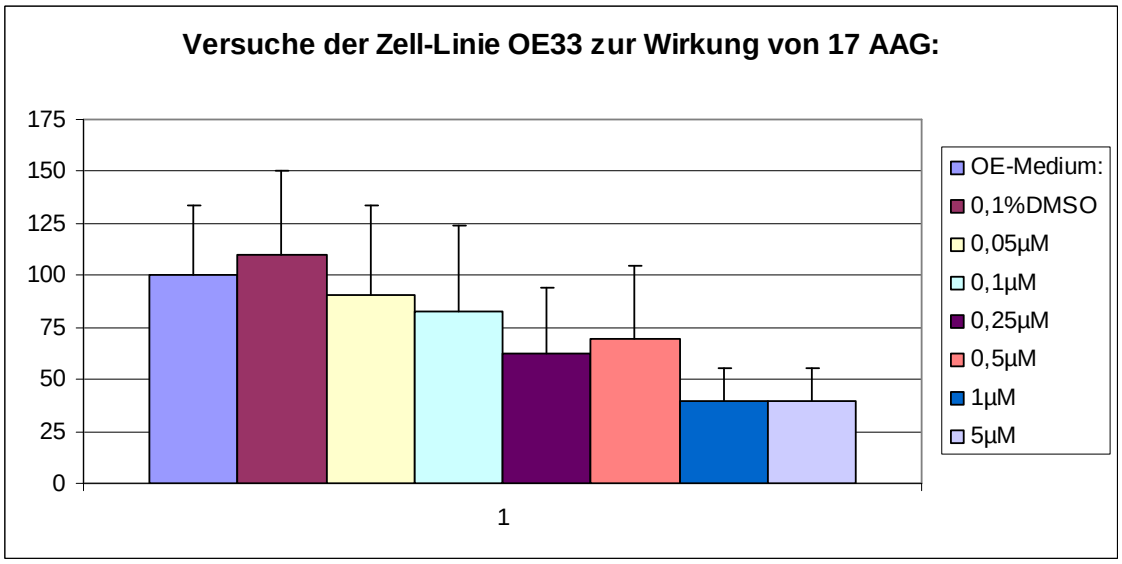


Abbildung 29: Versuch der Wirkung von 17 AAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie OE33. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.6.2 Versuche mit den wasserlöslichen Medikamenten 17 AEP-GA und 17-DMAG

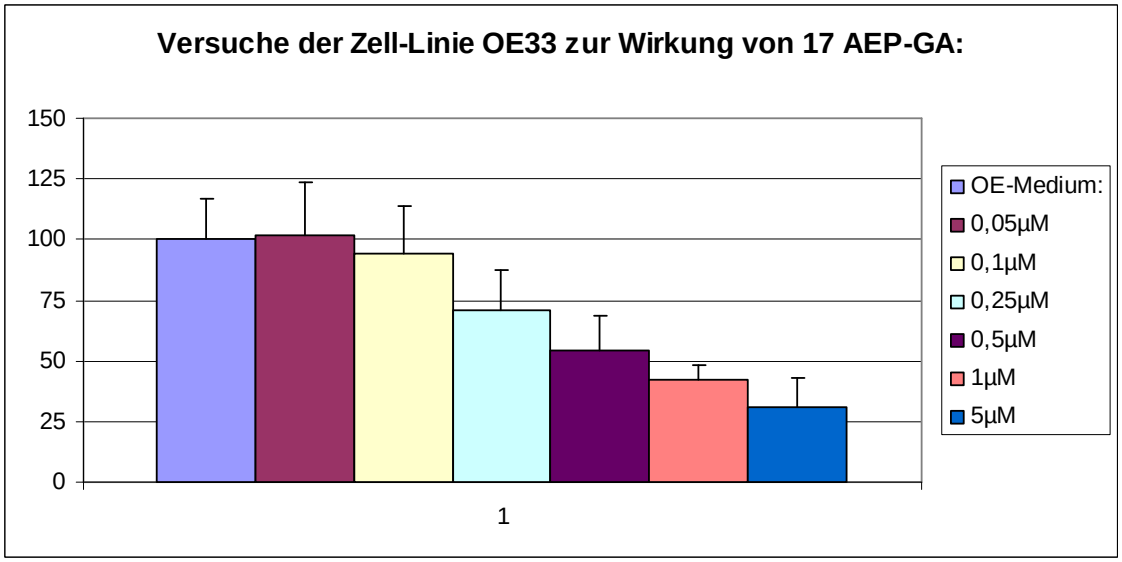


Abbildung 30: Versuch der Wirkung von 17 AEP-GA in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie OE33. Versuchsdauer: 48 Stunden.

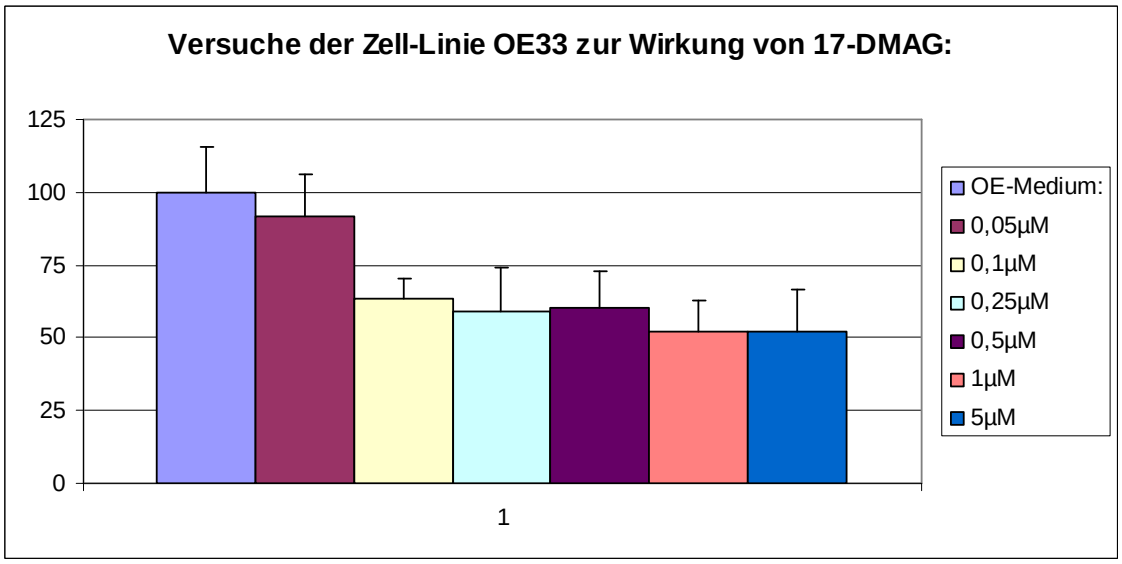


Abbildung 31: Versuch der Wirkung von 17-DMAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Versuch der Zelllinie OE33. Versuchsdauer: 48 Stunden.

6.7 Die Bestimmung des IC50

Mit Hilfe des Programms R konnte sowohl der $IC_{50,}$ als auch der p-Wert für sämtliche Zelllinien und Medikamente bestimmt werden.

Graphische Darstellung des IC_{50}:

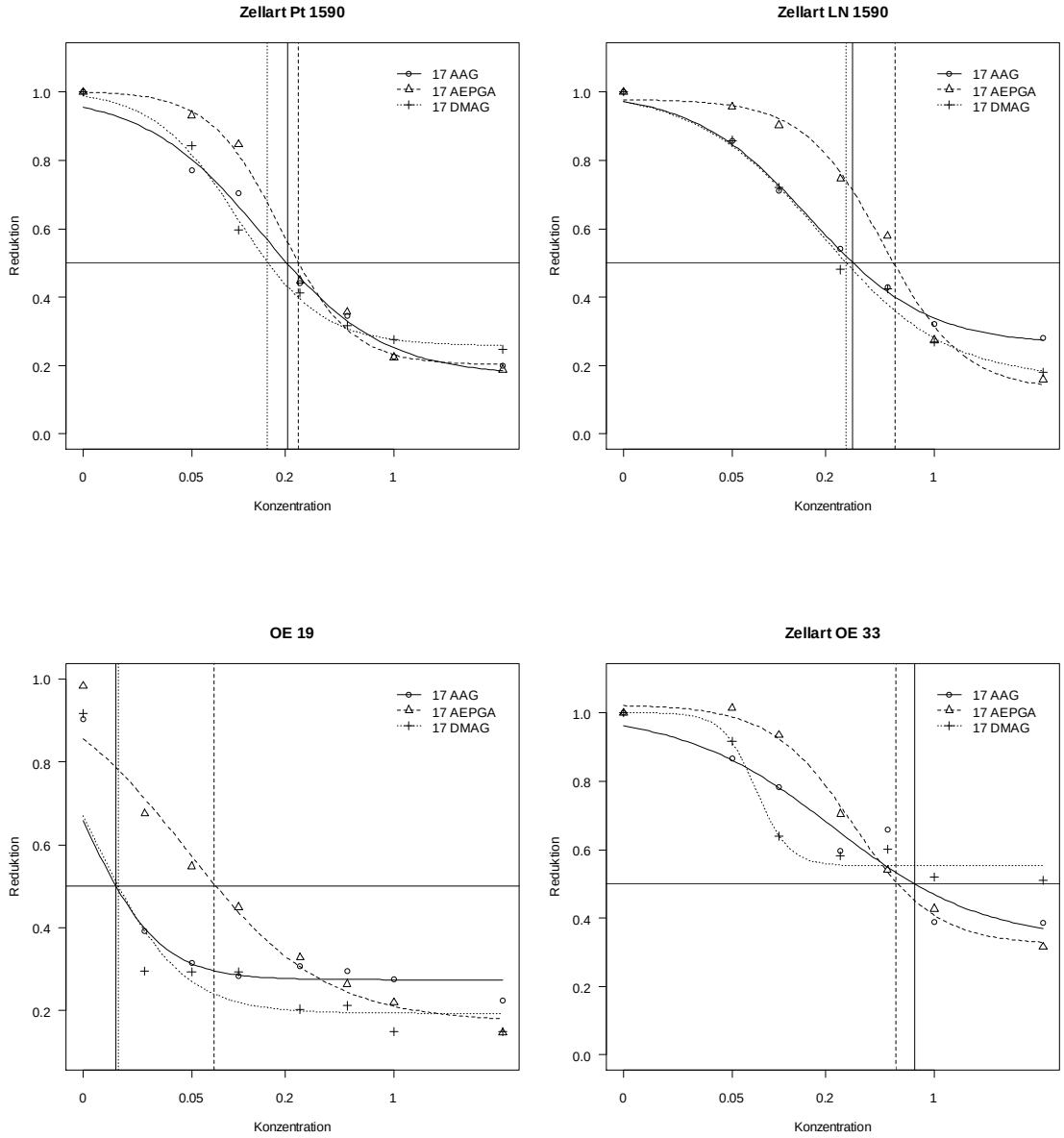


Abbildung 32: Darstellung des Graphischen Verlaufes der Zellreduktion. Darstellung des IC_{50}.

Abbildung 32 stellt die inhibitorische Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG auf die Ösophaguskarzinomzelllinien PT1590, LN1590, OE19 und OE33 graphisch dar. In allen Fällen konnte eine deutliche Inhibition der Tumorzellen erreicht werden. Die Ähnlichkeit der Kurvenverläufe der drei verwendeten

Medikamente in der Darstellung der Ergebnisse einer Zelllinie spricht für das ähnliche Wirkungsprofil dieser Medikamente. Insbesondere in der Darstellung der Ergebnisse der Zelllinien PT1590 und LN1590 wird dies deutlich.

Die Darstellung der Ergebnisse der Zelllinie PT1590 in Abbildung 32 zeigt Kurven, die sich in ihren Verläufen nicht sonderlich stark voneinander unterscheiden. Der IC_{50} aller 3 Medikamente ist um den Wert 0,2 µM anzufinden. Der niedrigste IC_{50} wird durch das Medikament 17-DMAG mit 0,154 µM erreicht, 17 AAG hat einen IC_{50} von 0,207 µM und 17 AEP-GA einen von 0,243 µM. Dies spricht sowohl für eine vergleichbare Wirkungsstärke, als auch für ein ähnliches Wirkungsprofil der drei Medikamente.

Auch die Kurvenverläufe, die die Medikamentenwirkung auf die Zellen der Zelllinie LN1590 zeigen, weisen große Ähnlichkeiten auf. Insbesondere wird dies bei der Betrachtung der Kurvenverläufe von 17 AAG und 17-DMAG deutlich. Die IC_{50}-Werte dieser beiden Medikamente liegen ebenfalls sehr dicht beieinander. Der IC_{50} des Medikaments 17 AAG wurde mit 0,300 µM berechnet, der von 17-DMAG mit 0,270 µM. Der IC_{50}-Wert von 17 AEP-GA wurde mit 0,564 µM berechnet

Von allen vier Ösophaguskarziomzelllinien, die Zelllinie LN1590 aus der Lymphknotenmetastase inbegriffen, weist OE19 die höchste Sensitivität gegenüber den verwendeten Medikamenten auf. Im Falle dieser Zelllinie mussten niedrigere Medikamentenkonzentrationen als bei allen anderen Ösophaguskarzinomzelllinien verwendet werden, um den IC_{50} dieser Zelllinie besser bestimmen zu können. Für das Medikament 17 AAG wurde der IC50 mit 0,016 µM, der von 17-DMAG mit 0,017µM berechnet. Der IC50 für das Medikament 17 AEP-GA wurde mit 0,070 µM berechnet.

Bereits die Abbildungen 29, 30 und 31 lassen erkennen, dass die Ergebnisse der Zelllinie OE33 keine so regelmäßigen Verläufe in ihrem Inhibitionsverhalten aufweisen wie alle anderen verwendeten Zelllinien. OE33 stellte sich zudem als die Zelllinie heraus, die unter den verwendeten Zelllinien die geringste Sensibilität gegenüber den Medikamenten zeigt. Dennoch ist auch hier eine eindeutige Inhibition durch die Medikamente zu erkennen. Bei 17 AAG ließ sich der IC_{50} mit 0,746 µM berechnen, der

von 17 AEP-GA mit 0,566 µM. Die Kurvenverläufe dieser Medikamente ähneln sich. Der IC_{50} von 17-DMAG war mit Hilfe des Rechenprogramms R nicht zu bestimmen, da in den durchgeführten Versuchen keine 50%-ige Inhibition erreicht wurde.

Tabelle zu den Ergebnissen der Berechnungen des IC50

Tabelle 8: Tabelle zu den Werten: IC50 mit Standardfehler, sowie p-Wert aus T-Test, der für den Unterschied zwischen den Medikamenten 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG berechnet wurde.

	17 AAG		**17 AEP-GA**		**17-DMAG**		
	IC50 in µM	**Standard-Fehler**	**IC50 in µM**	**Standard-Fehler**	**IC50 in µM**	**Standard-Fehler**	**p-Wert**
PT1590	0.207	0.060	0.243	0.070	0.154	0.042	0.413
LN1590	0.300	0.117	0.564	0.104	0.270	0.094	0.003
OE19	0.016	0.003	0.070	0.016	0.017	0.003	<0.0001
OE33	0.746	0.488	0.566	0.163	Nicht beurteilbar		0.001

6.8 Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse

Zunächst wurde die Expression von Hsp90 und Her2 in den vier Zelllinien PT1590, LN 1590, OE19 und OE33 mit der Peroxidase-Methode färberisch dargestellt. Dann sollte gezeigt werden, ob eine Reduktion bestimmter Clientproteine von Hsp90, Her2 und IGF-IRα, durch die Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG als Zeichen einer funktionellen Inhibition von Hsp90 erzielt werden kann. Als Negativkontrolle diente zum einen der Mausantikörper Mouse IgG1κ (MOPC-21) und zum anderen der Hasenantikörper Rabbit Immunoglobulin Fraction.

6.8.1 Immunhistochemischer Nachweis von Hsp90

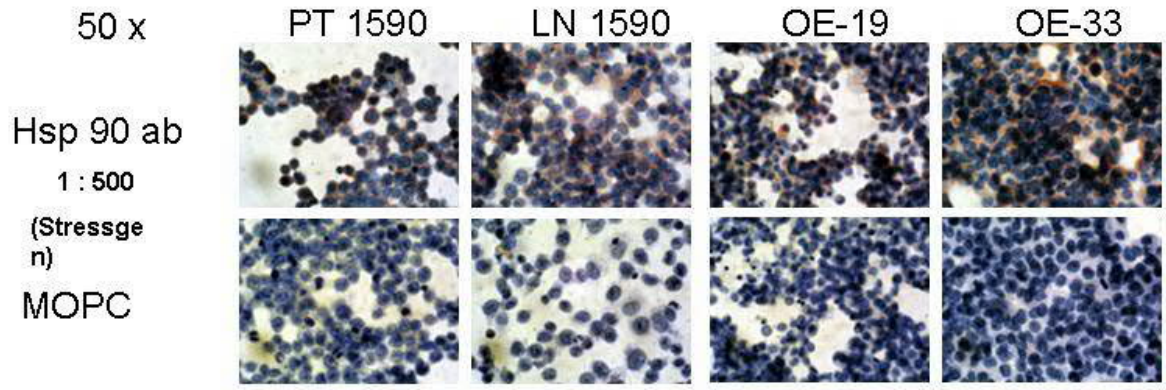


Abbildung 33: Immunohistochemischer Nachweis von Hsp90.

Abbildung 33 zeigt nach der Behandlung mit Anti-Hsp90 eine positive Peroxidase-Reaktion.

6.8.2 Immunhistochemischer Nachweis von Her2

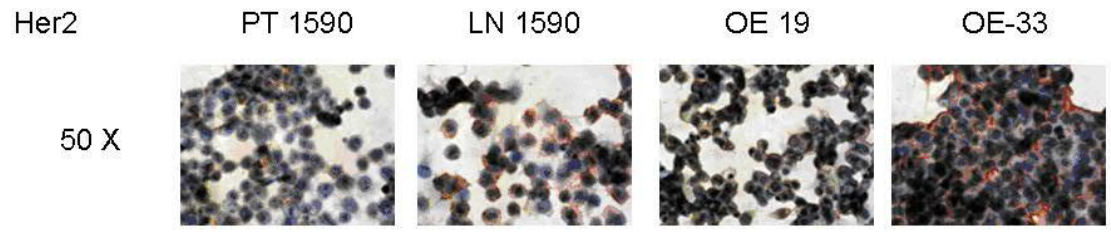


Abbildung 34: Immunohistochemischer Nachweis von Her2.

Abbildung 34 stellt nach Behandlung mit Anti-Her2 durch positive Peroxidase-Reaktion das Vorhandensein des Hsp90-Co-Proteins Her2 färberisch dar. Die Negativkontrollen sind in den folgenden Abbildungen zur Darstellung der Inhibition von Her2 durch die Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG zu finden.
Her2 wird in den Zelllinien PT1590, LN1590, OE19 und OE33 unterschiedlich stark exprimiert.

6.8.3 Immunhistochemische Reaktion der Zelllinien PT1590 und LN1590 zur Darstellung der Inhibition von Her2 durch die Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG

In den folgenden Versuchsreihen sollte die Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG auf die Hsp90-Clientproteine Her2 und IGF-IRα deutlich gemacht werden.

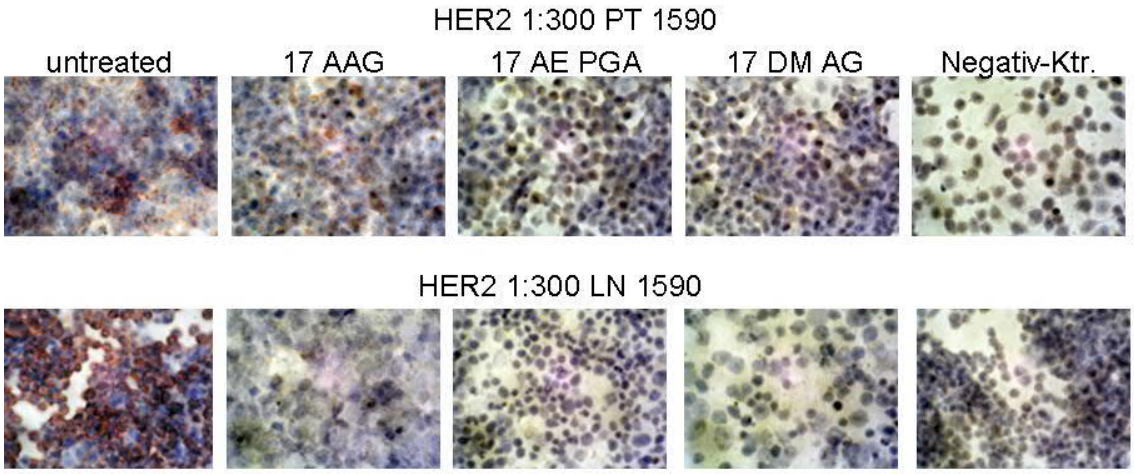


Abbildung 35: Immunhistochemischer Nachweis der Inhibition von Her2 durch die Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG. Darstellung der Zelllinien PT1590 und LN1590.

Abbildung 35 zeigt die Inhibition von Her2 durch die Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG.

Eine starke Reduktion von Her2 konnte bei der Zelllinie LN1590 beobachtet werden. Während die unbehandelten LN1590-Zellen eine starke Her2-Expression zeigen, konnte bei den Zellen, die mit den Medikamenten behandelt wurden, kaum noch Expression von Her2 nachgewiesen werden.

Die unbehandelten PT1590-Zellen zeigen in den durchgeführten Versuchen eine etwas geringere Her2-Expression als bei LN1590 und auch die Reduktion durch die Medikamente ist weniger drastisch, aber dennoch zu konstatieren.

6.8.4 Immunhistochemische Reaktion der Zelllinien OE19 und OE33 zur Darstellung der Inhibition von Her2 durch die Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG

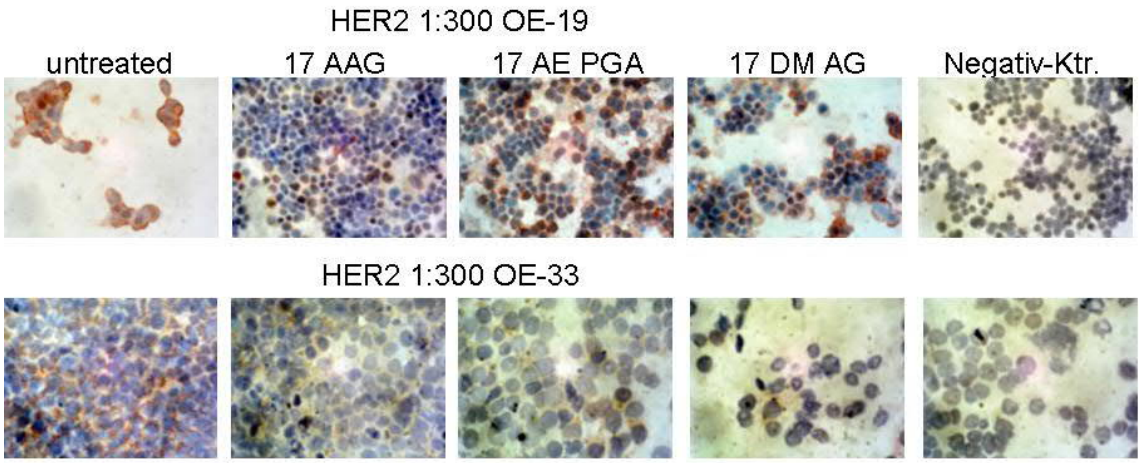


Abbildung 36: Immunhistochemischer Nachweis der Inhibition von Her2 durch die Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG. Darstellung der Zelllinien OE19 und OE33.

Wie bereits im Versuch mit den Zellen der Zelllinien PT1590 und LN1590, sollte ebenso bei den Zellen der Zelllinien OE19 und OE33 die Inhibition von Her2 durch die verwendeten Medikamente durch einen immunhistochemischen Peroxidasenachweis bewiesen werden. Aufgrund der geringen Zelldichte der unbehandelten OE19 Zellen lassen sie sich nicht ganz unproblematisch mit den behandelten Zellen vergleichen. Dennoch lassen die dargestellten Zellen eine starke Färbung erkennen, und diese Intensität ist bei den behandelten Zellen vermindert. Dies spricht für den verminderten Gehalt an Her2 und für die inhibitorische Wirkung der Medikamente auf das Hsp90-Clientprotein Her2.

Bei der zweiten Zelllinie (OE33) ist dieser Effekt noch drastischer. Hier weisen die unbehandelten OE33-Zellen eine relativ starke Her2-Expression auf, während die behandelten Zellen kaum noch Expressionen zeigen.

6.8.5 Immunhistochemische Reaktion der Zelllinien PT1590 und LN1590 zur Darstellung der Inhibition von Anti-IGF-IRα durch die Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG

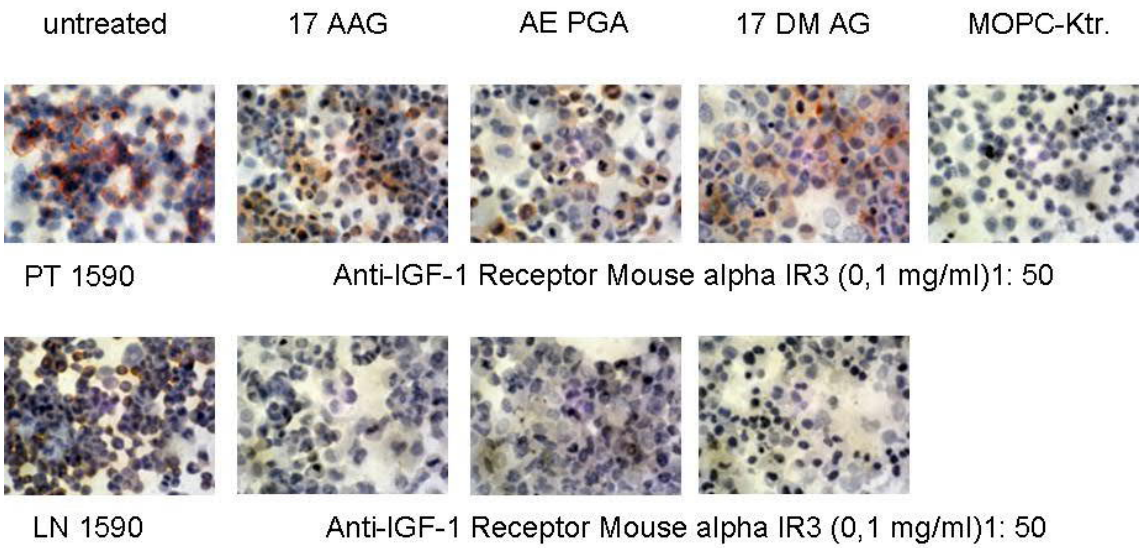


Abbildung 37: Immunhistochemischer Nachweis der Inhibition von IGF-IRα durch die Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG. Darstellung der Zelllinien PT1590 und LN1590.

Abbildung 37 zeigt die Inhibition von IGF-IRα durch die Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG auf die Zellen der Zelllinien PT1590 und LN1590. Eine starke IGF-IRα-Expression ist bei den unbehandelten PT1590-Zellen nachzuweisen. Diese fällt bei den behandelten PT1590-Zellen deutlich geringer aus.
Bei den unbehandelten LN1590-Zellen fällt der IGF-IRα-Nachweis geringer aus. Eine Reduktion von IGF-IRα ist bei den behandelten Zellen dennoch gut zu erkennen.
Der unterschiedlich stark ausfallende IGF-IRα-Nachweis bei unbehandelten Zellen spricht dafür, dass IGF-IRα in den unterschiedlichen Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert wird.

6.9 Ergebnisse der Western Blott

Reduktion von Hsp90-Clientroteinen durch verschiedene Hsp90-Inhibitoren

Western Blott wurden durchgeführt, um die Reduktion der Hsp90-Clientproteine Her2, IGF-IRα und EGF-R1 durch die Medikamente 17 AAG, 17AEP-GA und 17-DMAG zu beweisen.

Actin diente in sämtlichen Versuchsreihen als Kontrolle. Durch Actin soll die gleichmäßige Verteilung der Proteine in allen Kammern nachgewiesen werden.

6.9.1 Ergebnisse der Western Blott der PT1590-Zellen

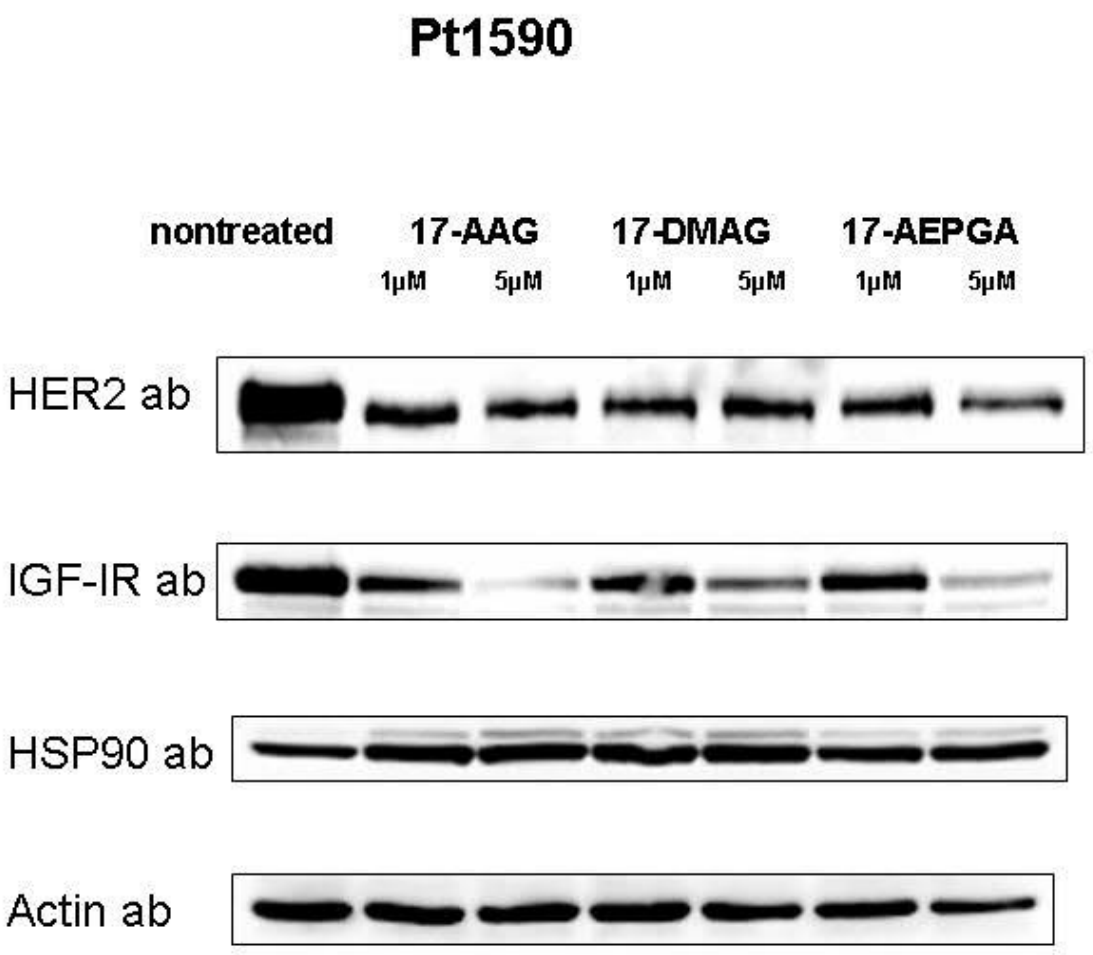


Abbildung 38: Darstellung der Ergebnisse der Western Blott der Zelllinie PT1590 zum Nachweis der Funktionsinhibition von Hsp90.

Abbildung 38 macht die Wirkung der Medikamente auf den Expressionslevel von Her2 und IGF-IR deutlich. Während sich die Bande der PT1590-Zellen ohne Medikamente sehr deutlich abzeichnet, sind die Banden der Zellen, die unter Medikamenteneinfluss stehen, wesentlich geringer prominent.

Der Hsp90-Level wird durch die Medikamente nicht beeinflusst. Hsp90 ist sowohl bei den unbehandelten PT1590-Zellen, als auch bei den Zellen, die unter Medikamenteneinfluss stehen, etwa gleich stark nachzuweisen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der Hsp90-Level durch die Medikamente zwar nicht vermindert wird und somit gut nachweisbar ist, seine Funktion jedoch inhibiert wird. Für die Inhibition

seiner Funktionstüchtigkeit spricht der verminderte Level seiner Clientproteine Her2 und IGF-IR im Western Blott.

6.9.2 Ergebnisse der Western Blott der LN1590-Zellen

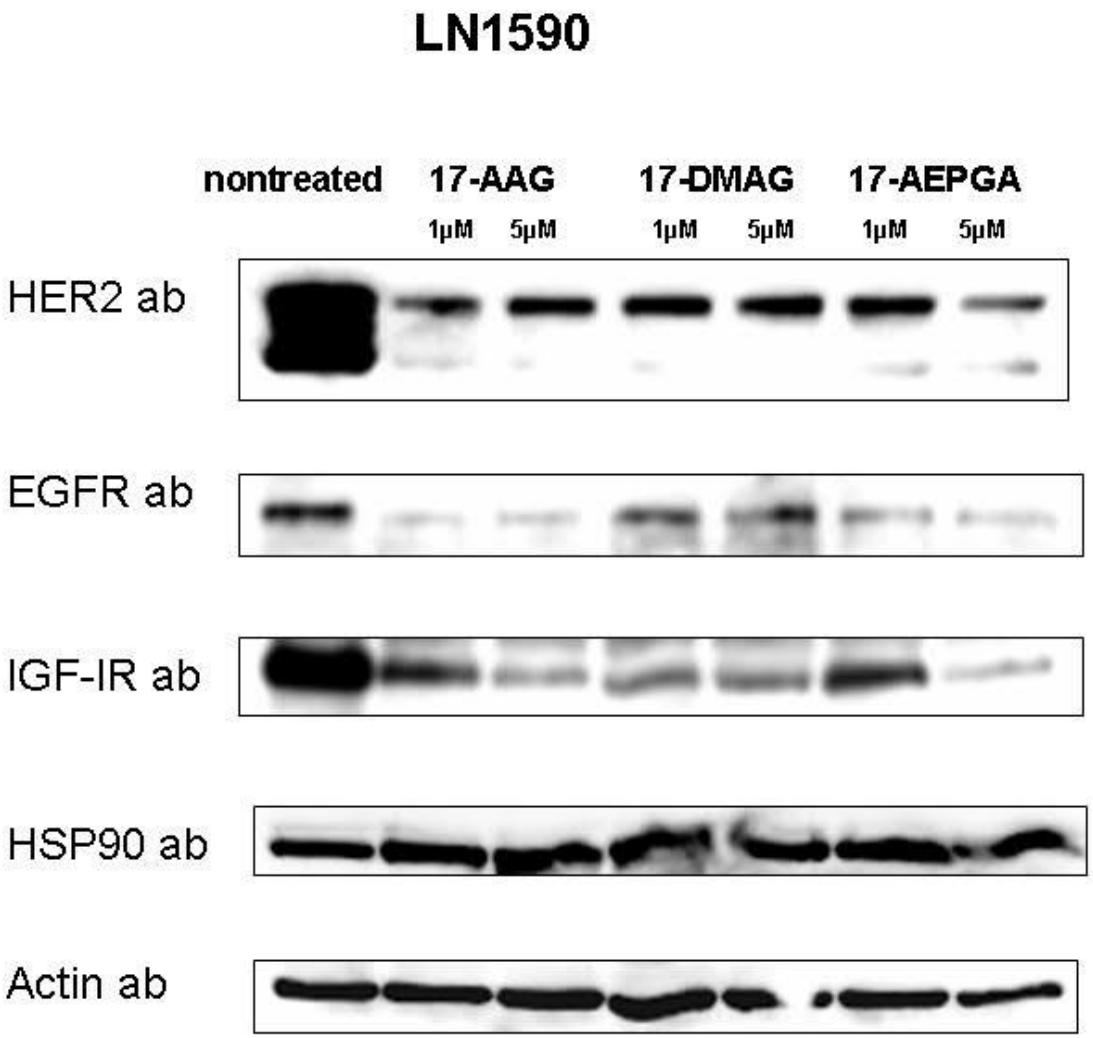


Abbildung 39: Darstellung der Ergebnisse der Western Blott der Zelllinie LN1590 zum Nachweis der Funktionsinhibition von Hsp90.

Die Ergebnisse der Western Blott der Zelllinie LN1590 fielen ähnlich aus wie die der Zelllinie PT1590. Auch hier ist eine eindeutige Reduktion von Her2 und IGF-IR durch die verwendeten Medikamente zu erkennen, während sich der Hsp90-Level der Zellen ohne und mit Medikamenteneinfluss annähernd gleicht. Zusätzlich ist in Abbildung 39 das Ergebnis des Expressionslevels eines weiteren Hsp90-Inhibitors, nämlich dem von

EGF-R1 dargestellt. EGF-R1 scheint besonders stark durch die Wirkung der Medikamente 17 AAG und 17 AEP-GA inhibiert zu werden.

6.9.3 Ergebnisse der Western Blott der OE19-Zellen

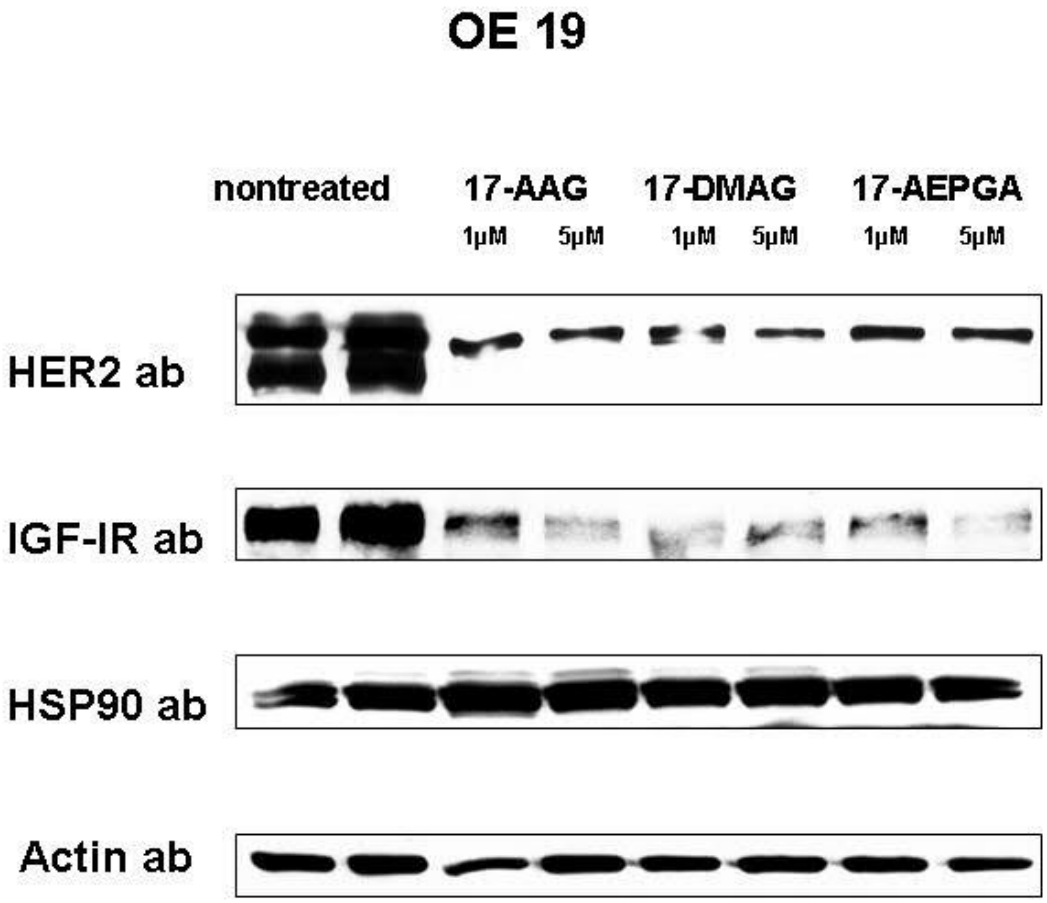


Abbildung 40: Darstellung der Ergebnisse der Western Blott der Zelllinie OE19 zum Nachweis der Funktionsinhibition von Hsp90.

In der Darstellung der Ergebnisse der Western Blott der Zelllinie OE19 ist der Effekt der Medikamente erneut deutlich sichtbar. Die unbehandelten Zellen zeigen in der Abbildung 40 einen viel höheren Expressionslevel von Her2 und IGF-IG, als die behandelten Zellen. Das Expressionslevel von Hsp90 und Actin blieb in beiden Fällen, wie erwartet, in etwa gleich.

6.9.4 Ergebnisse der Western Blott der OE33-Zellen

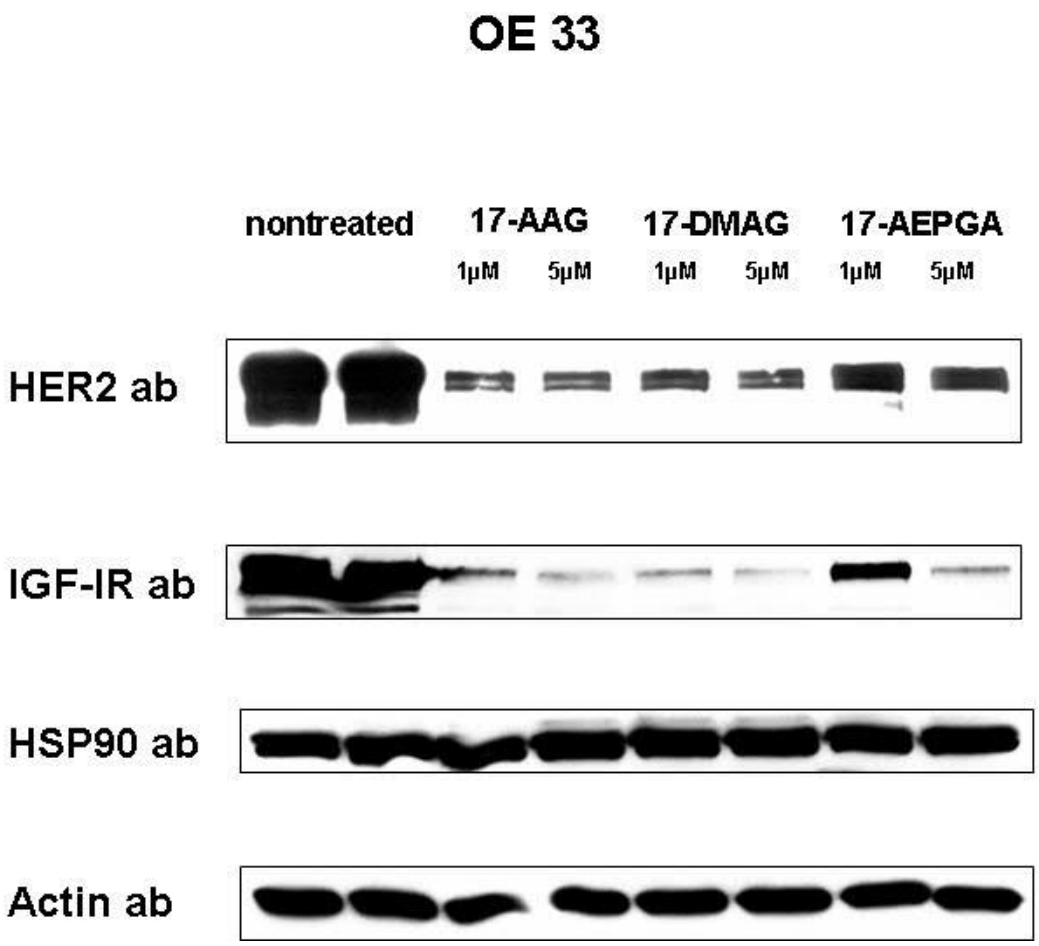


Abbildung 41: Darstellung der Ergebnisse der Western Blott der Zelllinie OE33 zum Nachweis der Funktionsinhibition von Hsp90.

Ähnlich wie in den vorangegangenen Abbildungen macht die Darstellung der Ergebnisse der Western Blott der Zelllinie OE33 die inhibitorische Wirkung der Medikamente auf die Hsp90-Clientproteine Her2 und IGF-IR deutlich.

7. Diskussion

Das Auftreten von Adenokarzinomen des Ösophagus hat in den vergangenen 15 Jahren insbesondere in den USA und in Teilen Westeuropas deutlich zugenommen. Die Prognose zum Diagnosezeitpunkt eines Ösophaguskarzinoms ist zumeist schlecht, da die frühen Tumorstadien häufig keine Symptome aufweisen. Klassische Symptome, wie beispielsweise die Dysphagie, treten häufig erst dann auf, wenn das Krebsleiden bereits weit fortgeschritten ist, sodass zu diesem Zeitpunkt zumeist bereits eine Metastasierung eingesetzt hat.[2-5, 11, 12]

Der klinisch relevanteste Faktor für das Überleben ist der Nodalstatus. So scheint ein wesentlicher Zusammenhang zwischen der Anzahl tumorbefallener Lymphknoten und der Wahrscheinlichkeit eines systemischen Rezidivs der Erkrankung zu bestehen. [22, 27, 28]
In einer Studie von Peyre at al. konnte gezeigt werden, dass die Anzahl befallener Lymphknoten einen signifikanten Prognosefaktor für die Entwicklung einer systemischen Tumorausbreitung darstellt. Eine systemische Erkrankung tritt in etwa 20% der Patienten ohne vorherigen nodalen Befall auf. Sind acht oder mehr Lymphknoten betroffen, zeigt sich in 93% eine systemische Ausbreitung. [28] Das Rezidiv ist die häufigste Todesursache des Ösophaguskarzinom. [63] Da auch ein nodal negativer Status in ca. 20% der Fälle zum systemischen Rezidiv führt, bedarf es einer effektiven systemischen Therapie, auch wenn der Vorteil einer adjuvanten Therapie beim Ösophaguskarzinom aktuell nicht durch Evidenz zu belegen ist. [17]

Eine Chemotherapie kommt häufig dann zum Einsatz, wenn die Erkrankung fortgeschritten ist und nicht mehr chirurgisch entfernt werden kann, als so genannte palliative Therapieoption.[17]
Im Rahmen des adjuvanten Setting hat die Chemotherapie, wie bereits oben beschrieben, aktuell keinen klinisch relevanten Wert.[34] Gleichwohl ist jedoch die Notwendigkeit einer systemischen Chemotherapie, bei der hohen lokoregionären und systemischen Rezidivrate, dringend gegeben.

Die Schlüsselrolle von Hsp90 bei Entstehung und Progress von malignen Erkrankungen ist für solide Karzinome belegt.[41, 43, 49, 50] Die Inhibition von Hsp90 durch spezifische pharmakologische Inhibitoren konnte zeigen, dass durch eine singuläre spezifische funktionelle Inhibition des Hsp90-Moleküls eine simultane Downregulation und schlussendlich die Degradation einer Vielzahl tumorrelevanter Wachstumsfaktoren, inklusive Rezeptoren, Kinasen sowie an Signalkaskaden beteiligten Proteinen, hervorgerufen wird. Somit führt eine Inhibition Hsp90-abhängiger Proteine zur Unterdrückung des Tumorwachstums und einer Aktivierung der Apoptose. [50, 64, 65]
Der Vorteil der Hsp90-Inhibition besteht in der Tatsache, dass durch dessen Einsatz der Wirkungsgrad in Tumorzellen um ein vielfaches höher ist als in Normalgewebe und zeitgleich multiple Signalkaskaden inhibiert werden.[49]
Potentielle Hsp90-Inhibitoren werden derzeit schon bei verschiedenen soliden und hämatologischen Erkrankungen in Phase I- bis Phase III-Studien untersucht.[47, 53, 55, 58] In der Klinik ist durch den zunehmenden Einsatz von molekularer Charakterisierung von Tumorzellen die Anwendung von targetspezifischen Therapien attraktiv. Bei Karzinomen wird regelmäßig in den Operationspräparaten ein molekular-immunhistologisches Profil der Tumorzellen bestimmt. Die beste Datenlage hierfür ist für das Herceptin® (Her2) gegeben.[66-68] Gleichwohl ist jedoch der Einsatz der targetspezifischen Therapien in der Klinik bislang außerhalb begrenzter und zumeist palliativ ausgerichteter Studien nicht zu finden.

Unsere Daten zeigen, dass die humanen Adenokarzinomzelllinien PT1590, OE19 und OE 33 sowie die Zelllinie der Lymphknotenmetastase LN1590 im höchsten Masse sensibel auf Hsp90-Inibition mit signifikanter Proliferationshemmung reagieren. Dieser Effekt ist bereits unter Verwendung einer geringen Konzentration der Hsp90-Inhibitoren zu erreichen. Des Weiteren ist nicht nur der wasserunlösliche Hsp90-Inhibitor 17 AAG, sondern auch die wasserlöslichen Hsp90-Inhibitoren 17 AEP-GA und 17-DMAG vergleichbar wirksam.
Das Versagen targetspezifischer Therapien in der Klinik beruht auf der Tatsache, dass diese Therapien meist nur gegen einen einzelnen Faktor oder Signalweg gerichtet sind und es im Rahmen der klinischen Behandlung durch Entwicklung von Resistenzmechanismen zum Versagen dieser spezifischen Therapien kommt. Das

bedeutet, dass durch so genanntes onkogenes switching oder Reaktivierung von Signalkaskaden, die zur Reaktivierung von weiter unten gelegenen Signalwegen führen, die Tumorzelle gegenüber einer spezifischen Therapie immun wird. [69-71]

Die Verwendung von Hsp90-Inhibition bietet jedoch durch die Schlüsselrolle von Hsp90 in der Tumorzelle einen Ansatz, dieser Problematik entgegen zu wirken. Wie wir erfolgreich zeigen konnten, führte die bereits niedrig dosierte Konzentration von Hsp90-Inhibitoren zur signifikanten Proliferationshemmung in allen untersuchten Zelllinien und Lymphknotenmetastasen. Dies ist eine unabdingbare Voraussetzung für einen potentiellen Einsatz einer systemischen Chemotherapie, da diese nicht nur gegen den Primärtumor, sondern ebenso gegen zirkulierende Tumorzellen, beziehungsweise bereits manifeste Lymphknoten- oder Organmetastasen gerichtet sein sollte.

Insbesondere bei Adenokarzinomen des Ösophagus spielt dieser Tatbestand eine wichtige Rolle. In der Arbeit von Reichelt et al. konnte gezeigt werden, dass Her-2 als Target von Herceptin® z. B. eine differenzierte Expression zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen selbigen Tumors aufweist. In einer weiteren Arbeit von Stöcklein et al. wurde diese differenzierte Expression sogar auf disseminierte Tumorzellen im Knochenmark untersucht. [21, 72] Das unterschiedliche molekulare Profil zwischen Primärtumor und verschiedenen Metastasen in verschiedenen Organen ist entscheidend für die Wahl der systemischen Therapie.

Unsere molekulare Profilerstellung der Hsp90-inhibierten Zellen zeigte, dass die Wirkung von Hsp90-Inhibition bereits sehr früh auf molekularer Ebene umgesetzt wird. Bereits nach kurzer Zeit konnte eine signifikante Herabregulation von Wachstumsfaktoren mit dem Western Blott gezeigt werden. Besonders hervorzuheben ist, dass es nicht nur zur Inhibition eines einzigen Proteins, sondern zur Expressionsinhibition mehrerer wachstumsrelevanter Faktoren (Her2, IGF-IR und EGF-R1) führt, wobei auch auf molekularer Ebene die Wirkung der wasserlöslichen Hsp90-Inhibitoren 17 AE-PGA und 17-DMAG, im Vergleich zum nicht wasserlöslichen Hsp90-Inhibitor 17 AAG, ebenso wirksam war.

Es gilt festzuhalten, dass bei allen untersuchten Zelllinien die Inhibition von Hsp90, eine funktionelle Inhibition darstellte, da, wie mittels Western Blott gezeigt wurde, die Konzentration von Hsp90 unter Inhibition konstant blieb.

Hsp90 ist auch in vielen gesunden Zellen nachzuweisen, meist jedoch in einer inaktiven Form. Hsp90-Inhibitoren inhibieren mit hoher Selektivität Tumorzellen, da in diesen das Hsp90 in einer aktiven Form vorliegt. Somit weisen Krebszellen eine viel stärkere Sensitivität gegenüber HSP90-Inhibitoren auf, als dies in normalem Gewebe der Fall ist.[49] Insbesondere daher ist diese Erkenntnis von Bedeutung, da hierdurch das Auftreten häufig vorkommender Nebenwirkungen, die beim Einsatz einer Chemotherapie häufig vorzufinden sind und zumeist durch das Absterben gesunder Zellen bedingt werden, unwahrscheinlich ist, beziehungsweise nur geringgradig ausfallen dürfte. Dies ist nicht unerheblich, da das Auftreten von Nebenwirkungen die Lebensqualität von Menschen mit einem bösartigen Tumorleiden deutlich mindern kann und einen wichtigen Faktor für die Auswahl und Durchführbarkeit einer Chemotherapie darstellt.

Das Ziel dieser Studie war es, die antitumoröse Wirkung der 17 AAG-Derivate auf unterschiedliche Ösophaguskarzinomzellen in vitro zu beweisen, um anschließend Vergleiche in der Wirkung und den Wirkungsmechanismen vornehmen zu können.
Des Weiteren sollte mit Hilfe einer Peroxidase-Methode färberisch die Reduktion bestimmter Clientproteine von Hsp90, Her2 und IGF-IRα, durch die Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG bewiesen werden. Mittels Western Blott sollte diese These, durch Darstellung des verminderten Expressionslevels von Her2, IGF-IR und zum Teil auch von EGF-R1, durch die Wirkung der Medikamente 17 AAG, 17AEP-GA und 17-DMAG bestätigt werden.

Alle drei Medikamente zeigten eine deutliche antitumoröse Wirkung in den in vitro Versuchen der unterschiedlichen Ösophaguszelllinien.
Es zeigte sich, dass die wasserlöslichen Analoga keine geringere antitumoröse Wirkung aufwiesen als das in DMSO lösliche 17 AAG. In einigen Versuchen konnte sogar eine etwas stärkere Wirkung der wasserlöslichen Derivate gezeigt werden, wobei die Wirkung der drei Medikamente im Allgemeinen keine wesentlichen Unterschiede erkennen ließ.
Allerdings konnten deutliche Unterschiede in der Sensibilität der verschiedenen Tumorzelllinien gezeigt werden. Sämtliche verwendeten Ösophaguszelllinien wiesen

eine deutlich höhere Sensibilität gegenüber den Medikamenten 17 AAG, 17 AEP-GA und 17-DMAG auf als die Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Dieses ist im Einklang mit den Daten von Terry et al. bezüglich Effektivität von 17 AAG. [62] Die Versuche mit der MCF-7-Zelllinie dienten zum einen als Vergleichskontrolle, mit bereits beschriebener Wirkung bei Hsp90 Inhibition durch eine andere Arbeitsgruppe, zum anderen wurden die Versuche auch als interne Vorlage des Versuchsaufbaus genutzt.
Vergleicht man die einzelnen Ösophaguskarzinomzelllinien (die Zelllinie LN1590 aus einer Lymphknotenmetastase inbegriffen) so zeigt sich, dass OE19 die mit Abstand sensitivste und OE33 die am wenigsten sensitive der vier getesteten Ösophaguskarzinomzelllinien ist.
Die unterschiedliche Sensitivität kann durch verschieden starke Expression von wachstumsrelevanten Faktoren bedingt sein. Wie in der Peroxidase-Reaktion gezeigt, ist die Expression von Her2 und IGF-IRα in den Zelllinien PT1590, LN1590, OE19 und OE33 unterschiedlich stark.
Außerdem fiel eine starke Reduktion von Her2 bei der Zelllinie LN1590 auf, ebenso bei der OE33-Zelllinie. Während die unbehandelten Zellen eine starke Her2-Expression zeigten, konnte bei den Zellen, die mit den Hsp90-Inhibitoren behandelt wurden, kaum noch Expression von Her2 nachgewiesen werden.
Eine Aussage, inwieweit das unterschiedliche Niveau der Her2-, bzw. IGF-IRα-Exprimierung Auswirkung auf die Wirksamkeit der Hsp90-Inhibitoren hat, kann allein an Hand der durchgeführten Versuche jedoch nicht gemacht werden. Hierzu wären weiterführende Versuche erforderlich.

Auch die Ergebnisse des Western Blott bieten interessante Interpretationsmöglichkeiten. Hier zeigt sich, dass der Hsp90-Level durch die Medikamente scheinbar nicht beeinflusst wird und somit sowohl bei den unbehandelten, als auch bei Zellen, die unter Medikamenteneinfluss stehen, etwa gleich stark nachweisbar ist. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Hsp90-Expression durch die Medikamente zwar nicht vermindert, seine Funktion jedoch inhibiert wird. Für die Inhibition seiner Funktionstüchtigkeit spricht der verminderte Level seiner Clientproteine Her2, IGF-IR sowie EGF-R1 in den Western Blott. Eine Quantifizierung der Inhibitionsstärke bleibt jedoch methodisch bedingt aus, obwohl Unterschiede deutlich erkennbar sind.

Die Medikamente bewirken eine Proliferationsinhibition und induzieren die Apoptose der Ösophaguskarzinomzellen in vitro. Da wasserlösliche Derivate kein zelltoxisches DMSO als Lösungsmittel benötigen, ist eine bessere Verträglichkeit in vivo zu erwarten. Dies wäre jedoch im Mausmodell (in vivo) zu verifizieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die wasserlöslichen Derivate 17 AEP-GA und 17-DMAG keine geringere antitumoröse Wirkung aufweisen als das in DMSO lösliche 17 AAG. Alle drei Medikamente führen zur signifikanten funktionellen Inhibierung des Hsp90, was die Verminderung verschiedener Clientproteine bewirkt. Daraus resultiert eine parallele Inhibition mehrerer Signaltransduktionswege, was schlussendlich in signifikanter Proliferationshemmung aller getesteten Karzinom-zelllinien endete.

8. Zusammenfassung

Das Ösophaguskarzinom ist eine zumeist tödlich verlaufende Erkrankung. Wie in randomisierten Studien gezeigt wurde, liegt die mediane Überlebenszeit, trotz Einsatz von multimodalen Therapiekonzepten, bei weniger als 22 Monaten. Klinisch ist der nodale Status von erheblicher Relevanz. Bereits nodal-negative Patienten tragen das Risiko von etwa 20%, eine systemische Metastasierung im Laufe der Zeit zu zeigen. Hieraus resultiert die Notwendigkeit der Entwicklung einer wirksamen Chemotherapie, welche aktuell keine klinische Bestätigung im Einsatz findet. Da sich sowohl durch die Anwendung derzeit gängiger Chemotherapeutika, als auch durch Radiotherapie bisher keine Verbesserung der Überlebenszeit zeigte und sich diese zum Teil sogar negativ auf Lebensqualität und Mortalitätsrate auswirkten, ist die Ösophagusresektion nach wie vor die Therapie der Wahl bei kurativer Zielsetzung. Die meisten Patienten mit Ösophaguskarzinom versterben, auch nach kompletter Resektion und negativem Nodalstatus, an einer systemischen Tumorausbreitung.
Das Hsp90 stellt ein attraktives Target in der Onkologie dar. Ein Vorteil der Inhibition des Hsp90 besteht darin, dass gleichzeitig eine Vielzahl von Proteinen, so genannter Hsp90-Clientproteinen, die für das Überleben und Fortschreiten eines bösartigen Tumorleidens wichtig sind, gehemmt werden und somit simultan mehrere für Tumorzellen relevante Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden inhibiert werden. Des Weiteren wird durch Hsp90-Inhibitoren mit hoher Selektivität das aktive Tumor-Hsp90, nicht jedoch das Hsp90 gesunder Zellen inhibiert. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da hierdurch das Auftreten von Nebenwirkungen, die durch das Abtöten gesunder Zellen bedingt werden, minimiert wird.

Durch simultane Inhibition von mehreren wachstumsrelevanten Faktoren bietet die Hsp90-Inhibition einen potentiellen Therapieansatz bei der Behandlung des Adonokarzinoms des Ösophagus. Wir konnten zeigen, dass Hsp90 in humanen Tumorzelllinien des Adenokarzinoms des Ösophagus und in Lymphknotenmetastasen hoch exprimiert wird und eine Inhibition bereits durch niedrige Dosierung von Hsp90-

Inhibitoren (sowohl wasserlösliche (17 AEPGA und DMAG) als auch nicht wasserlösliche (17-AAG)) erreicht werden kann. Die verwendeten Dosierungen führten bereits nach kürzester Zeit zur molekularen Veränderung in der Tumorzelle mit nahezu vollständigem Verschwinden von sämtlichen aktuell als Targettherapie angesehenen Wachstumsfaktoren, wie IGF-IR, EGF-R1 und Her-2. Insbesondere die Tatsache, dass Hsp90-Inhibitoren nicht nur in Primärtumorzellen, sonder auch in Lymphknoten-metastasen zu einer Inhibition der wachstumsrelevanten Faktoren führt, verweist auf das Potential dieses Ansatzes als mögliche Therapieoption. Wir konnten des Weiteren zeigen, dass die molekulare Imbalance in den Tumorzellen zur signifikanten Proliferationshemmung der jeweiligen Zellreihe führte.

Ein wichtiges Ergebnis unserer Studie war, dass Unterschiede in der Sensibilität beziehungsweise Sensitivität gegenüber den verschiedenen Hsp90-Inhibitoren bei gleicher Tumorentität bestehen und die wasserlöslichen Hsp90-Inhibitoren eine gleich gute Wirksamkeit wie die wasserunlöslichen zeigten.

So konnte mittels MTT-Test gezeigt werden, dass sowohl das in DMSO lösliche 17 AAG, als auch die wasserlöslichen Medikamente 17 AEP-GA und 17-DMAG eine deutliche antitumoröse Wirkung in den in-vitro-Versuchen der unterschiedlichen Ösophaguszelllinien aufwiesen. Die verschiedenen Tumorzelllinien zeigten deutliche Unterschiede in der Sensibilität gegenüber den verwendeten Medikamenten. OE19 war die mit Abstand sensitivste und OE33 die am wenigsten sensitive der vier getesteten Ösophaguskarzinomzelllinie, die Zelllinie LN1590 aus einer Lymphknotenmetastase inbegriffen.

Diese antiproliferative Wirkung einer Hsp90-Inhibition konnte auch auf molekularer Ebene mittels Western Blott und durch die immunzytologische Peroxidase-Analyse bestätigt werden.

9. Literaturverzeichnis

1. Caygill CP, Watson A, Reed PI, Hill MJ. Characteristics and regional variations of patients with Barrett's oesophagus in the UK. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003; 15(11):1217-22.
2. Cook MB, Chow WH, Devesa SS. Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005. Br J Cancer 2009; 101(5):855-9.
3. Crane LM, Schaapveld M, Visser O, et al. Oesophageal cancer in The Netherlands: increasing incidence and mortality but improving survival. Eur J Cancer 2007; 43(9):1445-51.
4. Eloubeidi MA, Mason AC, Desmond RA, El-Serag HB. Temporal trends (1973-1997) in survival of patients with esophageal adenocarcinoma in the United States: a glimmer of hope? Am J Gastroenterol 2003; 98(7):1627-33.
5. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. N Engl J Med 2003; 349(23):2241-52.
6. Falk J, Carstens H, Lundell L, Albertsson M. Incidence of carcinoma of the oesophagus and gastric cardia. Changes over time and geographical differences. Acta Oncol 2007; 46(8):1070-4.
7. Haghdoost AA, Hosseini H, Chamani G, et al. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus in Kerman, Iran. Arch Iran Med 2008; 11(4):364-70.
8. Hayeck TJ, Kong CY, Spechler SJ, et al. The prevalence of Barrett's esophagus in the US: estimates from a simulation model confirmed by SEER data. Dis Esophagus; 23(6):451-7.
9. Kitajima M, Kitagawa Y. Surgical treatment of esophageal cancer--the advent of the era of individualization. N Engl J Med 2002; 347(21):1705-9.
10. Orringer MB, Marshall B, Chang AC, et al. Two thousand transhiatal esophagectomies: changing trends, lessons learned. Ann Surg 2007; 246(3):363-72; discussion 372-4.

11. Parfitt JR, Miladinovic Z, Driman DK. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastroesophageal junction and distal stomach in Canada -- an epidemiological study from 1964-2002. Can J Gastroenterol 2006; 20(4):271-6.

12. Shahbaz Sarwar CM, Luketich JD, Landreneau RJ, Abbas G. Esophageal cancer: an update. Int J Surg; 8(6):417-22.

13. Voutilainen M. Epidemiological trends in oesophageal cancer in the Nordic countries. Scand J Gastroenterol 2008; 43(3):323-7.

14. Fiorica F, Di Bona D, Schepis F, et al. Preoperative chemoradiotherapy for oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. Gut 2004; 53(7):925-30.

15. Kranzfelder M, Schuster T, Geinitz H, et al. Meta-analysis of neoadjuvant treatment modalities and definitive non-surgical therapy for oesophageal squamous cell cancer. Br J Surg; 98(6):768-83.

16. Malthaner RA, Wong RK, Rumble RB, Zuraw L. Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a clinical practice guideline. BMC Cancer 2004; 4:67.

17. Malthaner RA, Wong RK, Rumble RB, Zuraw L. Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. BMC Med 2004; 2:35.

18. Urschel JD, Vasan H. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. Am J Surg 2003; 185(6):538-43.

19. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. N Engl J Med 2006; 355(1):11-20.

20. Ychou M, Boige V, Pignon JP, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. J Clin Oncol; 29(13):1715-21.

21. Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, et al. Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. Cancer Cell 2008; 13(5):441-53.

22. Bogoevski D, Onken F, Koenig A, et al. Is it time for a new TNM classification in esophageal carcinoma? Ann Surg 2008; 247(4):633-41.

23. Cense HA, van Eijck CH, Tilanus HW. New insights in the lymphatic spread of oesophageal cancer and its implications for the extent of surgical resection. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2006; 20(5):893-906.

24. Bhansali MS, Fujita H, Kakegawa T, et al. Pattern of recurrence after extended radical esophagectomy with three-field lymph node dissection for squamous cell carcinoma in the thoracic esophagus. World J Surg 1997; 21(3):275-81.

25. Hulscher JB, van Sandick JW, Tijssen JG, et al. The recurrence pattern of esophageal carcinoma after transhiatal resection. J Am Coll Surg 2000; 191(2):143-8.

26. Nakagawa S, Kanda T, Kosugi S, et al. Recurrence pattern of squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus after extended radical esophagectomy with three-field lymphadenectomy. J Am Coll Surg 2004; 198(2):205-11.

27. Darling G. The role of lymphadenectomy in esophageal cancer. J Surg Oncol 2009; 99(4):189-93.

28. Peyre CG, Hagen JA, DeMeester SR, et al. Predicting systemic disease in patients with esophageal cancer after esophagectomy: a multinational study on the significance of the number of involved lymph nodes. Ann Surg 2008; 248(6):979-85.

29. Dresner SM, Griffin SM. Pattern of recurrence following radical oesophagectomy with two-field lymphadenectomy. Br J Surg 2000; 87(10):1426-33.

30. Gu Y, Swisher SG, Ajani JA, et al. The number of lymph nodes with metastasis predicts survival in patients with esophageal or esophagogastric junction adenocarcinoma who receive preoperative chemoradiation. Cancer 2006; 106(5):1017-25.

31. Mariette C, Balon JM, Piessen G, et al. Pattern of recurrence following complete resection of esophageal carcinoma and factors predictive of recurrent disease. Cancer 2003; 97(7):1616-23.

32. Roder JD, Busch R, Stein HJ, et al. Ratio of invaded to removed lymph nodes as a predictor of survival in squamous cell carcinoma of the oesophagus. Br J Surg 1994; 81(3):410-3.

33. Tachibana M, Kinugasa S, Hirahara N, Yoshimura H. Lymph node classification of esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Eur J Cardiothorac Surg 2008; 34(2):427-31.

34. Zhang J, Chen HQ, Zhang YW, Xiang JQ. Adjuvant chemotherapy in oesophageal cancer: a meta-analysis and experience from the Shanghai Cancer Hospital. J Int Med Res 2008; 36(5):875-82.

35. Goel S, Chirgwin J, Francis P, et al. Rational use of trastuzumab in metastatic and locally advanced breast cancer: implications of recent research. Breast; 20(2):101-10.

36. Mathew J, Perez EA. Trastuzumab emtansine in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: a review. Curr Opin Oncol; 23(6):594-600.

37. Hong L, Li S, Han Y, et al. Angiogenesis-related molecular targets in esophageal cancer. Expert Opin Investig Drugs; 20(5):637-44.

38. Syrigos KN, Zalonis A, Kotteas E, Saif MW. Targeted therapy for oesophageal cancer: an overview. Cancer Metastasis Rev 2008; 27(2):273-88.

39. Zhao R, Casson AG. Epigenetic aberrations and targeted epigenetic therapy of esophageal cancer. Curr Cancer Drug Targets 2008; 8(6):509-21.

40. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. Trends Biochem Sci 2006; 31(3):164-72.

41. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. Nat Rev Cancer 2005; 5(10):761-72.

42. Riggs DL, Cox MB, Cheung-Flynn J, et al. Functional specificity of co-chaperone interactions with Hsp90 client proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol 2004; 39(5-6):279-95.

43. Burrows F, Zhang H, Kamal A. Hsp90 activation and cell cycle regulation. Cell Cycle 2004; 3(12):1530-6.

44. Janin YL. Heat shock protein 90 inhibitors. A text book example of medicinal chemistry? J Med Chem 2005; 48(24):7503-12.

45. Soti C, Nagy E, Giricz Z, et al. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. Br J Pharmacol 2005; 146(6):769-80.

46. Dai C, Whitesell L. HSP90: a rising star on the horizon of anticancer targets. Future Oncol 2005; 1(4):529-40.

47. Chiosis G, Caldas Lopes E, Solit D. Heat shock protein-90 inhibitors: a chronicle from geldanamycin to today's agents. Curr Opin Investig Drugs 2006; 7(6):534-41.

48. Isaacs JS, Xu W, Neckers L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. Cancer Cell 2003; 3(3):213-7.

49. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. Nature 2003; 425(6956):407-10.

50. Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. Trends Mol Med 2004; 10(6):283-90.

51. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100(1):57-70.

52. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell; 144(5):646-74.

53. Banerji U. Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. Clin Cancer Res 2009; 15(1):9-14.

54. Modi S, Stopeck A, Linden H, et al. HSP90 Inhibition Is Effective in Breast Cancer: A Phase II Trial of Tanespimycin (17-AAG) Plus Trastuzumab in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Progressing on Trastuzumab. Clin Cancer Res; 17(15):5132-9.

55. Kim YS, Alarcon SV, Lee S, et al. Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial. Curr Top Med Chem 2009; 9(15):1479-92.

56. Fukuyo Y, Hunt CR, Horikoshi N. Geldanamycin and its anti-cancer activities. Cancer Lett; 290(1):24-35.

57. Wu X, Wanders A, Wardega P, et al. Hsp90 is expressed and represents a therapeutic target in human oesophageal cancer using the inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. Br J Cancer 2009; 100(2):334-43.

58. Ekman S, Bergqvist M, Tell R, et al. Hsp90 as a therapeutic target in patients with oesophageal carcinoma. Expert Opin Ther Targets; 14(3):317-28.

59. Scheunemann P, Izbicki JR, Pantel K. Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymph nodes. N Engl J Med 1999; 340(21):1687.

60. Pierini R, Kroon PA, Guyot S, et al. Procyanidin effects on oesophageal adenocarcinoma cells strongly depend on flavan-3-ol degree of polymerization. Mol Nutr Food Res 2008; 52(12):1399-407.

61. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2):55-63.

62. Terry J, Lubieniecka JM, Kwan W, et al. Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin prevents synovial sarcoma proliferation via apoptosis in in vitro models. Clin Cancer Res 2005; 11(15):5631-8.

63. Klein CA, Stoecklein NH. Lessons from an aggressive cancer: evolutionary dynamics in esophageal carcinoma. Cancer Res 2009; 69(13):5285-8.

64. Miyata Y. Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents. Curr Pharm Des 2005; 11(9):1131-8.

65. Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. Endocr Relat Cancer 2006; 13 Suppl 1:S125-35.

66. Ladjemi MZ, Jacot W, Chardes T, et al. Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy. Cancer Immunol Immunother; 59(9):1295-312.

67. Lin SX, Chen J, Mazumdar M, et al. Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. Nat Rev Endocrinol; 6(9):485-93.

68. Mannocci A, De Feo E, de Waure C, et al. Use of trastuzumab in HER2-positive metastatic breast cancer beyond disease progression: a systematic review of published studies. Tumori; 96(3):385-91.

69. Hengstler JG, Bockamp EO, Hermes M, et al. Oncogene-blocking therapies: new insights from conditional mouse tumor models. Curr Cancer Drug Targets 2006; 6(7):603-12.

70. Pusztai L, Esteva FJ. Continued use of trastuzumab (herceptin) after progression on prior trastuzumab therapy in HER-2-positive metastatic breast cancer. Cancer Invest 2006; 24(2):187-91.

71. Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD. Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. Nat Rev Cancer 2004; 4(9):718-27.

72. Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis M, et al. Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. Mod Pathol 2007; 20(1):120-9.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Jakob R. Izbicki, Direktor der Klinik für Allgemein-, Thorax- und Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf und meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. med. Emre Yekebas** danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit in ihrer Abteilung.

Des Weiteren danke ich meinem Betreuer **Herrn Dr. med. Yogesh Vashist** für seine Unterstützung und das Interesse an dieser Arbeit.

Mein Besonderer Dank geht an **Frau Tatjana Kalinina** für ihre Hilfe im Forschungslabor bei Fragestellungen jeglicher Art, sowie an **Frau Antje Heinecke** für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Ich danke **Petra Schröder** bei der Hilfe mit der immunhistochemischen Analyse.

Thorsten Dohrmann danke ich für seine Hilfe bei technischen, inhaltlichen, sowie Ausarbeitungsfragen.

Eik Vettorazzi aus dem Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie danke ich für die Hilfe bei der statistischen Ausarbeitung der Ergebnisse.

Ganz besonders danken möchte ich jedoch meiner Familie. Meinen Eltern **Eggert und Dorothee Quast**, meinem Onkel **Rainer Quast**, sowie meinen beiden Schwestern **Friederike und Constanze** für ihre vielfältige Unterstützung zu jeder Zeit.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Juliane Caroline Quast

Geboren am 14.10.1981 in Berlin

Schulausbildung

1988-1992	Grundschule Tangstedt, Kreis Stormarn, Deutschland
1992-2001	Gymnasium Langenhorn, Hamburg, Deutschland
Juni 2001	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Hochschulausbildung

Oktober 2001 bis Mai 2008	Studium der Humanmedizin an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, Hamburg
April 2004	Ärztliche Vorprüfung
Mai 2008	Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr

Februar bis April 2007	Chirurgie Allgemeinchirurgie und Traumatologie, GF Jooste Hospital, Kapstadt, Südafrika
April bis Juni 2007	Chirurgie Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungs-chirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg
Juni bis Oktober 2007	Mund- Kiefer und Gesichtschirurgie Klinikum Nord, Heidbergkrankenhaus, Hamburg

Oktober bis Dezember 2007	Innere Medizin Abteilung für Hämato-/Onkologie; Klinik für Kardiologie sowie Zentrale Notaufnahme, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg

Weiterbildung

Dezember 2008 bis November 2010	Assistenzärztin für Chirurgie, Spital Bülach, Schweiz
Dezember 2010 bis November 2011	Assistenzärztin für Kinderchirurgie, Kinderspital Zürich, Schweiz
Seit Januar 2012	Fellow Plastische Chirurgie, Kinderspital Zürich, Schweiz

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....