

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki

## **Inhibition von HSP90 in Gemcitabine- und 5-Fluorouracil-resistenten Pankreaskarzinomen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Judith Lea Dibbern  
aus Hannover

Hamburg 2013

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.01.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. J. R. Izbicki**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. med. O. Mann**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. med. A. Pace**

*Meiner Familie*

<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Pankreaskarzinome	7
1.1.1 Epidemiologie	7
1.1.2 Ätiologie	8
1.1.3 Klinik	9
1.1.4 Diagnostik	10
1.1.5 Histologische Klassifikation	11
1.1.6 Therapie	12
1.1.6.1 operative Entfernung	12
1.1.6.2 Chemotherapie	14
1.1.6.3 Radiochemotherapie	16
1.1.6.4 Palliative Therapie	16
1.1.7 Prognose	16
1.1.8 Molekulares Profil	17
1.2 Hitzeschockproteine	18
1.2.1 Allgemeines	18
1.2.2 HSP90	18
1.2.2.1 Vorkommen	18
1.2.2.2 Chemische Struktur und ATPase-Zyklus	19
1.2.2.3 Funktion in gesunden Körperzellen	21
1.2.2.4 Funktion in Tumorzellen	22
1.2.2.5 Client Proteine von HSP90	24
1.2.3 Inhibitoren von HSP90	26
1.2.3.1 Allgemeines	26
1.2.3.2 Geldanamycin-Derivate	26
1.2.4 HSP70	28
1.2.5 HSP27	30
1.3 Zielsetzung	31
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>32</b>
2.1 Material	32
2.1.1 Geräte	32
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	33
2.1.3 Medien und Reagenzien	34

2.1.4 Selbst hergestellte Medien, Puffer und Lösungen	36
2.1.5 Antikörper	38
2.1.6 Untersuchungsmaterial	40
2.1.7 HSP90-Inhibitoren	40
2.1.8 Gemcitabine und 5-Fluorouracil	40
2.2 Methoden	41
2.2.1 Kultivierung der Zellen	41
2.2.2 MTT-Test	41
2.2.2.1 Zellvereinzelung und Quantifizierung	41
2.2.2.2 Zellproliferationsmessung	42
2.2.2.3 Addition von Gemcitabine, 5-Fluorouracil und den HSP90-Inhibitoren	42
2.2.2.4 Messung der Zellviabilität	43
2.2.2.5 Statistische Analyse	44
2.2.3 Proteinquantifizierung	44
2.2.3.1 Vorbehandlung der Zellen	44
2.2.3.2 Zellvereinzelung	45
2.2.3.3 Zellyse	45
2.2.3.4 Messung der Proteinkonzentration	46
2.2.4 Protein-Gelelektrophorese	47
2.2.4.1 Probenvorbereitung	47
2.2.4.2 SDS-PAGE	48
2.2.5 Transfer von immobilisierten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)	49
2.2.5.1 Vorbereitung der Gele	49
2.2.5.2 Transfer	49
2.2.5.3 Blocken der Membranen	50
2.2.6 Immunologischer Proteinnachweis	50
2.2.6.1 Applikation der Antikörper	50
2.2.6.2 Detektion	51
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>52</b>
3.1 Zellproliferationsmessung	52
3.1.1 Zellverdoppelungszeit	52

3.1.2 Zellproliferationshemmung durch Gemcitabine und 5-Fluorouracil	55
3.1.3 Zellproliferationshemmung durch HSP90-Inhibition	57
3.2 Effekt auf Zielproteine von HSP90	63
3.2.1 Tyrosinkinaserzeptoren	63
3.2.2 Kinasen	66
3.2.3 Hitzeschockproteine	69
3.2.4 Induktion der Apoptose	72
<b>4 Diskussion</b>	<b>75</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>10 Danksagung</b>	<b>124</b>
<b>11 Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>125</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Pankreaskarzinome

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom ist eine der aggressivsten Tumorerkrankungen mit konstanter Inzidenz in den meisten westlichen Industriestaaten (Herrerros-Villanueva et al. 2012). Obwohl Malignome des Pankreas lediglich die zehnthäufigste diagnostizierte Krebserkrankung darstellen, liegen sie mit einer Fünfjahresüberlebensrate von nur fünf Prozent an vierter Stelle der tumorbedingten Todesursachen und weisen damit die niedrigste Überlebensrate aller Krebserkrankungen auf (Jemal et al. 2007). 2008 erkrankten in Deutschland etwa 15 000 Menschen an einem Pankreaskarzinom (Deutsches Krebsregister).

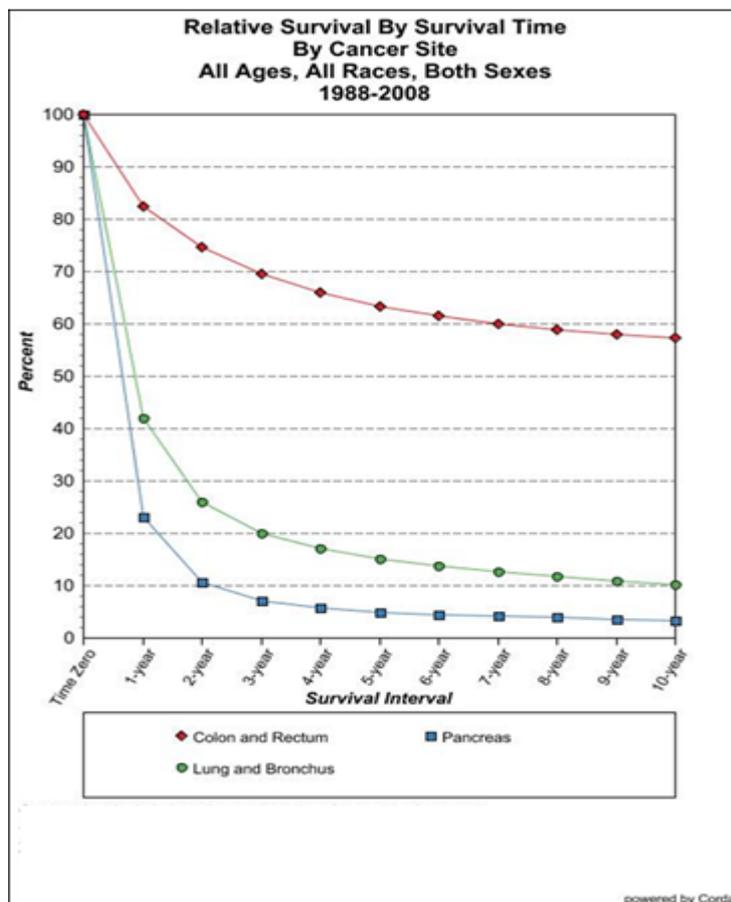


Abb.1: Prozentuales Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom, Bronchial- und Pankreaskarzinom (<http://seer.cancer.gov/faststats/selections.php?#Output>)

Unter den Neoplasien des Magen-Darm-Trakts liegt die Prävalenz der Pankreaskarzinome nach Kolon- und Magenkarzinomen an dritter Stelle (Jemal et al. 2010).

Die Geschlechterverteilung ist ausgeglichen, wobei der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr auftritt (Adler et al. 2007).

### **1.1.2 Ätiologie**

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist noch nicht endgültig geklärt. Zu den Hauptrisiken zählt Nikotinabusus, der die Gefahr einer Krebserkrankung der Bauchspeicheldrüse um den Faktor zwei bis fünf erhöht (Harnack et al. 1997; Talamini et al. 1999). Zudem spielen ethnische Komponenten eine Rolle. So ist die Inzidenz bei männlichen Afroamerikanern um 30-40% gesteigert (Yeo et al. 2002a). Auch Übergewicht in Verbindung mit geringer sportlicher Betätigung ist als Risikofaktor anerkannt (Adler et al. 2007).

Die familiäre Vorbelastung stellt einen weiteren wichtigen Punkt dar. Für Verwandte ersten Grades eines Patienten mit Pankreaskarzinom verdoppelt sich das Risiko, ebenfalls an einer Neoplasie der Bauchspeicheldrüse zu erkranken (Hruban et al. 2010).

Zudem sind einige erbliche Syndrome mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko behaftet, hierzu zählen beispielsweise das Peutz-Jeghers-Syndrom, das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) und die Ataxia teleangiectasia (Hruban et al. 2010).

Auf genetischer Ebene beinhaltet dies Mutationen im KRAS-, p53-, DPC4-, CDKN2- oder BRCA2-Gen sowie eine Überexpression des EGFR-Rezeptor/-Liganden-Systems (Klein et al. 2012; Rocha Lima und Centeno 2002). Auch Telomerabnormitäten und Chromosomeninstabilitäten sind in Pankreaskarzinomen oftmals gesehen (Jimeno und Hidalgo 2006).

Nach 20 Jahren kommt es bei vier Prozent der chronischen Pankreatitiden zu einer malignen Entartung, wobei vor allem Patienten mit hereditärer Pankreatitis betroffen sind, während eine Pankreatitis ethyloxischer Genese wahrscheinlich bislang überschätzt wurde (Malka et al. 2002). Auch Diabetes mellitus erhöht das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Chari et al. 2005).

Darüber hinaus werden schädliche Einflüsse durch übermäßigen Alkohol- und Kaffeekonsum sowie durch eine extrem fettreiche Ernährung diskutiert (Harnack et al. 1997).

Der Kontakt mit Pestiziden, Herbiziden und Fungiziden kann möglicherweise das Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs erhöhen, ebenso wie eine Exposition mit chlorierten

Kohlenwasserstoffen, Chrom und Kraftstoffdämpfen. Gesicherte Erkenntnisse liegen hierzu allerdings nicht vor (Adler et al. 2007).

### 1.1.3 Klinik

Das Pankreaskarzinom zeigt üblicherweise keine Frühwarnzeichen. Die Beschwerden sind uncharakteristisch und beinhalten Schmerzen oder Druckgefühl im Oberbauch, Inappetenz, Gewichtsabnahme, Leistungsschwäche, Übelkeit, Erbrechen und Steatorrhoe. In 60-70% entstehen ein Ikterus und erhöhte Cholestaseparameter durch Kompression des Ductus choledochus. Auch Rückenschmerzen können durch Tumoren des Pankreas erzeugt werden. Sie sind oftmals Zeichen einer Infiltration des Retroperitoneums beziehungsweise des Plexus coeliacus oder des Plexus mesentericus superior. Ebenso kommen paraneoplastische Syndrome wie rezidivierende Thrombosen und endokrinologische Störungen vor (Brüning 2004).

Da die Symptome typischerweise erst sehr spät auftreten, ist eine rechtzeitige Entdeckung der Krankheit erschwert und die therapeutischen Möglichkeiten somit stark eingeschränkt (Herrerros-Villanueva et al. 2012). Aus diesem Grund liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei über 50% der Patienten bereits eine metastasierte Erkrankung vor (Jemal et al. 2010).

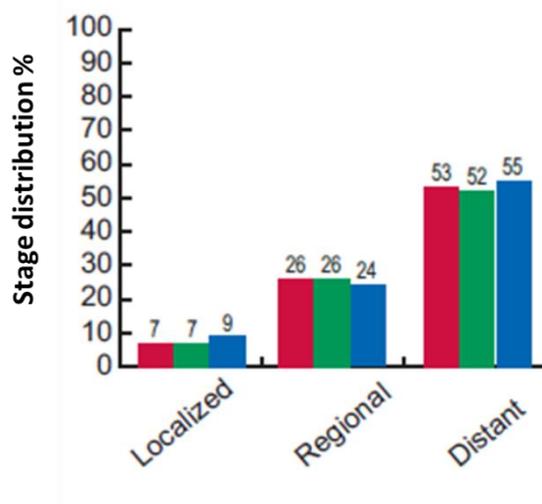
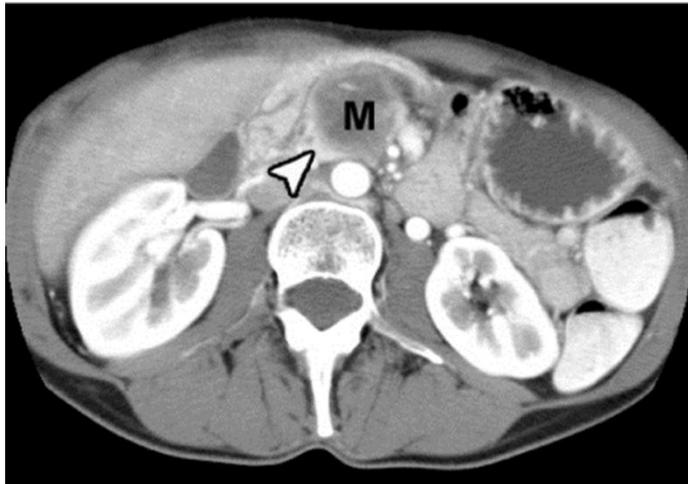


Abb.2: Prozentuale Verteilung der Tumorstadien bei Diagnosestellung, unterteilt nach ethnischer Herkunft (Jemal et al. 2010)

### 1.1.4 Diagnostik

Nach Vorstellung des Patienten in der Klinik sollte zunächst die ausführliche Anamnese und gründliche körperliche Untersuchung erhoben werden, woran sich eine Oberbauchsonographie anschließt. Die durch einen erfahrenen Untersucher durchgeführte Endosonographie stellt eine sehr sensitive Methode zur Detektion einer Pankreasneoplasie dar. Bei weiterhin bestehendem Karzinomverdacht sollte die anschließende Diagnostik mittels Computertomographie mit biphasischem Kontrastmittel beziehungsweise Magnetresonanztomographie mit Magnetresonanzcholangiopankreatikographie (MRCP) und -angiographie erfolgen, um die Beziehung des Tumors zu den Gefäßen darzustellen und somit die Operabilität beurteilen zu können (Francis 2003; Ghaneh et al. 2007).



*Abb.3: Computertomographische Darstellung einer Raumforderung des Pankreas (Francis 2003)*

Bei vorhandenem Pankreaskarzinom werden die Tumormarker CA 19-9 und CEA zumeist stark erhöht im Serum nachgewiesen. Aufgrund des niedrigen positiv prädiktiven Wertes sind sie jedoch nicht zum Screening geeignet und werden daher zumeist als Verlaufsparemeter eingesetzt. Laborchemisch stellen sich die Werte für Lipase und Amylase gewöhnlich ebenfalls erhöht dar (Lee et al. 2013; Wu et al. 2013).

Zur Beurteilung von pulmonalen und mediastinalen Fernmetastasen schließt sich eine Röntgenuntersuchung des Thorax an, bei suspektem Befund folgt eine thorakale Computertomographie. Unter bestimmten Umständen kann eine Staging-Laparoskopie in Betracht gezogen werden (Adler et al. 2007).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben 80% der Patienten bereits eine lokal fortgeschrittene Erkrankung (Yeo et al. 2002a).

Pankreaskarzinome werden nach dem TNM-System klassifiziert.

Stadium O	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stadium III	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tab.1: AJCC-Stadien des Pankreaskarzinoms 2010 (<http://www.cancerstaging.org/staging/index.html>)

### 1.1.5 Histologische Klassifikation

Histologisch wird zwischen exokrinen und endokrinen Pankreastumoren unterschieden. Über 95% der Neoplasien entstehen aus dem exokrinen Organ. Darunter fallen einige wenige gutartige Tumoren, wie Zystadenome und muzinöse Zystome (Degen et al. 2008).

Bei den malignen Tumoren handelt es sich in 90% der Fälle um Adenokarzinome, die als duktale Karzinome meist von den kleinen Pankreasgängen ausgehen (Degen et al. 2008).

Seltener treten auch azinäre Karzinome mit Herkunft vom Azinusepithel auf.

Außerdem kommen Plattenepithelkarzinome vor, sowie kleinzellige, szirrhöse oder anaplastische Formen, welche jedoch nur einen geringen Prozentsatz ausmachen.

Die Tumoren des endokrinen Pankreasgewebes zählen zu den neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes, die - abgesehen von bestimmten erblichen Syndromen - äußerst selten vorkommen (Yeo et al. 2002a).

Einige Studien beschreiben ein Progressionsmodell mit Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms. Diese werden als pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIn) bezeichnet und in verschiedene Stufen eingeteilt, die je nach Stadium typische Mutationen aufweisen (Rocha Lima und Centeno 2002). Ähnlich dem kolorektalen Karzinom besteht ein Modell, welches die unterschiedlichen Mutationen bei der Entstehung des duktales Adenokarzinoms beschreibt (Koorstra et al. 2008; Yeo et al. 2002a).

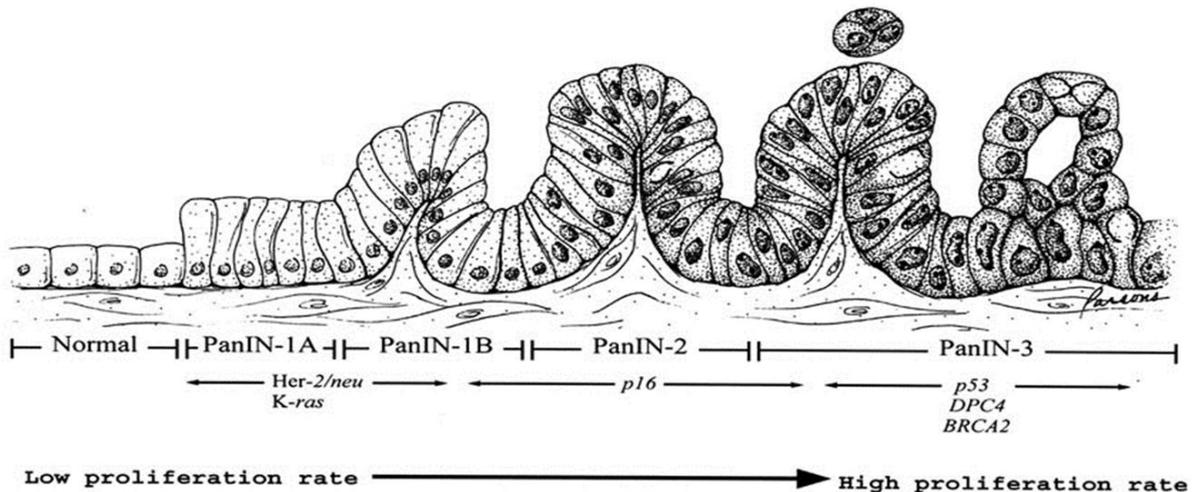


Abb.4.: Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms (Klein et al. 2002)

Weiterhin werden auch intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) und muzinös zystische Neoplasien (MCN) als potenzielle Krebsvorstufen beschrieben (Degen et al. 2007).

Ungefähr 70% der Karzinome sind im Pankreaskopf lokalisiert, 20% im Korpus und 10% im Pankreasschwanz (Ghaneh et al. 2007).

## 1.1.6 Therapie

### 1.1.6.1 Operative Entfernung

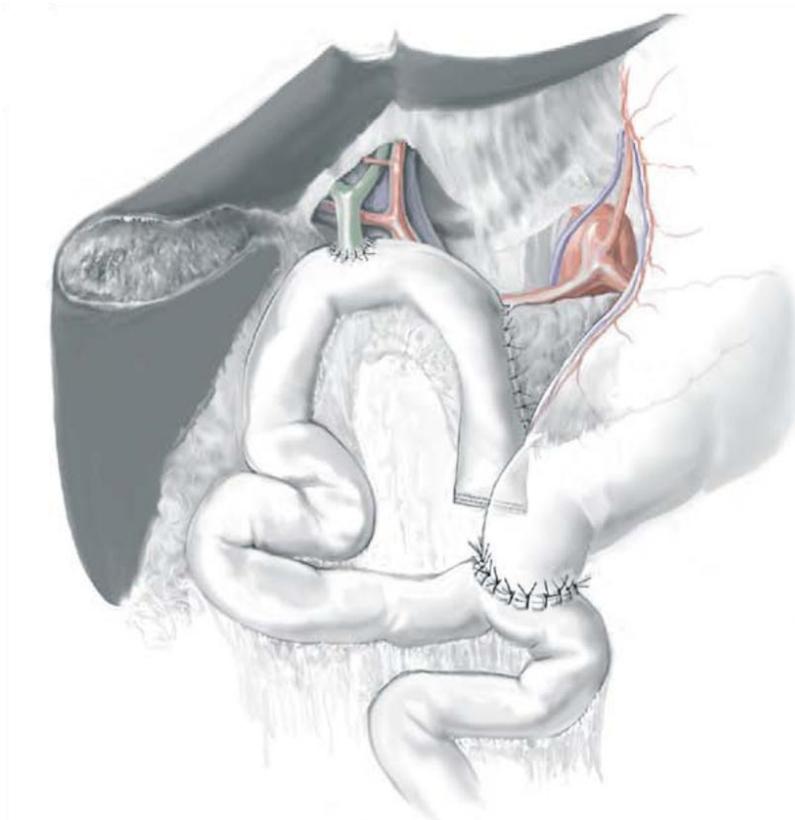
Einzigste Therapie mit kurativem Ansatz ist die operative Entfernung des Malignoms. Eine Resektion kann jedoch nur bei 10-15% der Patienten erfolgen, da bei den übrigen Patienten die Erkrankung bereits zu weit fortgeschritten ist (Nieto et al. 2008).

Ein Pankreastumor wird als resektabel eingestuft, wenn kein Anhalt für Fernmetastasen besteht und umliegende Gefäße (Truncus coeliacus, Arteria mesenterica superior) nicht durchsetzt sind. Eine Infiltration angrenzender Organe oder der Vena cava stellt nicht zwingend eine Kontraindikation für die Operation dar. Häufig kann die Resektabilität jedoch erst intraoperativ bestimmt werden und wird je nach Klinik unterschiedlich beurteilt. Der Eingriff sollte aufgrund der geringeren Mortalität und der besseren Resektabilitätsrate in spezialisierten Zentren angestrebt werden (Francis 2003; Warshaw und Fernández-del Castillo 1992).

Je nach Lokalisation des Tumors erfolgt eine partielle Duodenopankreatektomie nach Whipple und Kausch oder eine Pankreaslinksresektion.

Walther Kausch führte die erste Duodenopankreatektomie im Jahr 1909 durch, gefolgt von Allen Whipple, der 1935 eine Duodenopankreatektomie bei Pankreaskopfkarzinom als zweizeitige Operation beschrieb. 1946 modifizierten Waugh und Clagett die Operation zu der bis heute durchgeführten einzeitigen Prozedur. Bei Sitz des Tumors im Kopf der Bauchspeicheldrüse wird der Pankreaskopf, das Duodenum, die Gallenblase, der distale Ductus choledochus und das Antrum en bloc entfernt. Die Rekonstruktion der Magen-Darm-Passage erfolgt mittels Pankreatojejunostomie, biliodigestiver Anastomose und Gastrojejunostomie mit Braunscher Fußpunktanastomose.

Traverso und Longmire (1980) publizierten die pyloruserhaltende Operation.



*Abb.5: Rekonstruktion nach Whipple-OP (Yen et al. 2007)*

Bei Pankreasschwanztumoren wird der tumortragende Organteil sowie die Milz entfernt (Pankreaslinksresektion mit Splenektomie).

Eine totale Pankreatektomie muss bei multilokulären oder sehr großen Pankreastumoren vorgenommen werden. Die Indikation hierzu sollte allerdings äußerst eng gestellt werden,

da ein schwer kontrollierbarer Diabetes mellitus sowie eine exokrine Pankreasinsuffizienz resultieren (Yeo et al. 2002a).

### 1.1.6.2 Chemotherapie

Gemcitabine und 5-Fluorouracil (5-FU) sind bislang die einzigen Chemotherapeutika, die sich in klinischen Studien bei Pankreaskarzinomen als wirksam herausgestellt haben (Neptolemos et al. 2004).

Das Pyrimidinanalogon Gemcitabine (2'-deoxy-2',2'-difluorocytidinmonohydrochlorid) wurde ursprünglich als antivirales Medikament entwickelt, bevor es als Zytostatikum Verwendung fand. Es handelt sich um ein Vorläufermedikament, das erst in der Zelle enzymatisch zu seiner eigentlichen Wirkform umgewandelt wird (Burriss et al. 1997).

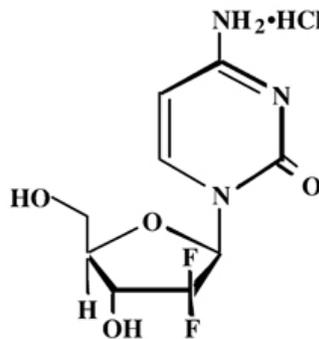


Abb.6: Strukturformel von Gemcitabine (<http://pi.lilly.com/us/gemzar.pdf>)

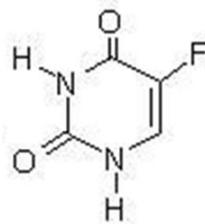
Nach Metabolisierung und intrazellulärer Phosphorylierung hemmt das Deoxycytidin-Analogon kompetitiv die DNA-Elongation. Statt der Base Cytosin wird Gemcitabinetriphosphat in den neu synthetisierten Desoxyribonukleinsäurestrang eingebaut, was zu einem Abbruch der DNA-Synthese und schließlich zum Zelltod führt (Noble und Goa 1997).

Gemcitabinetriphosphat wird in der Leber, der Niere und im Blut in eine unwirksame Substanz abgebaut und über die Nieren ausgeschieden (Noble und Goa 1997).

Eine signifikante Verlängerung des medianen tumorfreien Überlebens nach adjuvanter Behandlung mit Gemcitabine im Vergleich zu einer Resektion ohne chemotherapeutische Behandlung wurde in der CONKO-001-Studie beobachtet (13,4 versus 6,9 Monate). Nach 5 Jahren betrug das tumorfreie Überleben ohne adjuvante chemotherapeutische

Behandlung 5,5% und steigerte sich auf 16,5% nach Behandlung mit Gemcitabine (Oettle et al. 2007).

Wie auch Gemcitabine ist 5-FU ein Pyrimidinantagonist. Als Analogon der Base Uracil wird 5-FU bei der Zellteilung aufgrund der Strukturähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin (DNA-Nukleotide) beziehungsweise Uracil (RNA-Nukleotid) anstatt dieser in die DNA respektive RNA eingebaut. Die so entstandene Nucleinsäure ist nicht funktionstüchtig. 5-FU inhibiert sowohl die DNA- und RNA-Synthese als auch die Nucleotidbiosynthese über eine Hemmung der Thymidylat-Synthase (Longley et al. 2003).



*Abb.7: Strukturformel von 5-FU (Longley et al. 2003)*

Die European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC) bestätigte die Wirksamkeit der Zytostatika Gemcitabine und 5-Fluorouracil als adjuvante Therapie in Karzinomen des Pankreas, wohingegen eine adjuvante Radiochemotherapie das Outcome nicht verbesserte (Neptolemos et al. 2004). Das mittlere Überleben der chemotherapeutisch behandelten Patienten betrug 20,1 Monate, bei den Patienten mit Radiochemotherapie waren es nur 15,9 Monate. Patienten in dieser Gruppe, die keine Radiochemotherapie erhielten, zeigten sogar im Vergleich zu den mit Radiochemotherapie behandelten Patienten ein gesteigertes mittleres Überleben von 17,9 Monaten (Neptolemos et al. 2004).

In der ESPAC-3-Studie wurde Gemcitabine mit 5-FU verglichen. Das mediane Überleben betrug nach Behandlung mit Gemcitabine 23,6 Monate und nach Applikation von 5-FU 23,0 Monate, sodass zwischen den beiden Chemotherapeutika kein signifikanter Unterschied besteht (Neptolemos et al. 2010).

Wegen seines favorablen Nebenwirkungsprofils gilt Gemcitabine als Goldstandard unter den Chemotherapeutika zur adjuvanten und palliativen Behandlung von Pankreaskarzinomen (Neptolemos et al. 2010).

### **1.1.6.3 Radiochemotherapie**

Aufgrund der Ergebnisse der EORTC- und der ESPAC-1-Studie (Neptolemos et al. 2004) wird zurzeit in den deutschen S3-Leitlinien keine Radiochemotherapie bei resektablem Pankreaskarzinom empfohlen (Adler et al. 2007). Im Rahmen von klinischen Studien kann nach unvollständiger Resektion in Einzelfällen eine additive Radiochemotherapie durchgeführt werden (Adler et al. 2007; Ghaneh et al. 2008; Stocken et al. 2005). In den USA erfolgt üblicherweise eine adjuvante Radiochemotherapie (Herrerros-Villanueva et al. 2012; Roeder et al. 2012).

### **1.1.6.4 Palliative Therapie**

In einer palliativen Situation wird keine Resektion des Pankreas angestrebt, allerdings kann bei duodenaler Obstruktion eine Operation zur Wiederherstellung der Magen-Darm-Passage erfolgen. Eine Chemotherapie mit Gemcitabine stellt die Standardtherapie dar. Je nach Zustand des Patienten können jedoch auch Kombinationen von Gemcitabine mit Oxaliplatin, Cisplatin, Capecitabine oder Erlotinib erwogen werden. Bei symptomatischen Metastasen besteht die Option einer palliativen Strahlentherapie (Adler et al. 2007).

### **1.1.7 Prognose**

Die Prognose des Pankreaskarzinoms ist aufgrund später Diagnosestellung, aggressiven Wachstumsverhaltens, früh einsetzender Metastasierung und eingeschränkter therapeutischer Möglichkeiten extrem schlecht (Nieto et al. 2008). Daher stellen Pankreastumoren trotz des relativ seltenen Auftretens die fünfthäufigste Krebstodesursache weltweit und die vierthäufigste Krebstodesursache in den USA dar (Jemal et al. 2010).

Die Gesamtfünfjahresüberlebensrate aller Stadien ist geringer als fünf Prozent. Nach einer radikalen Operation verbessert sich die Fünfjahresüberlebensrate gewöhnlich auf 5-15% und kann auf bis zu 30% ansteigen, wenn eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt wurde (Yeo et al. 2002a).

Ohne Operation mit rein palliativen Maßnahmen ist die mittlere Überlebenszeit auf 3-9 Monate begrenzt (Merl et al. 2010).

Generell gehen Stadium und Größe des Tumors, eine eventuell vorliegende Lymphknotenmetastasierung und der Resektionsstatus in die Prognose des Pankreaskarzinoms mit ein (Geer et al. 1993; Yeo et al. 1997). So verschlechtert sich die Fünfjahresüberlebensrate von maximal 40% in Stadium I auf 0-8% in Stadium IV (Benassai et al. 2000; Yeo et al. 2002a).

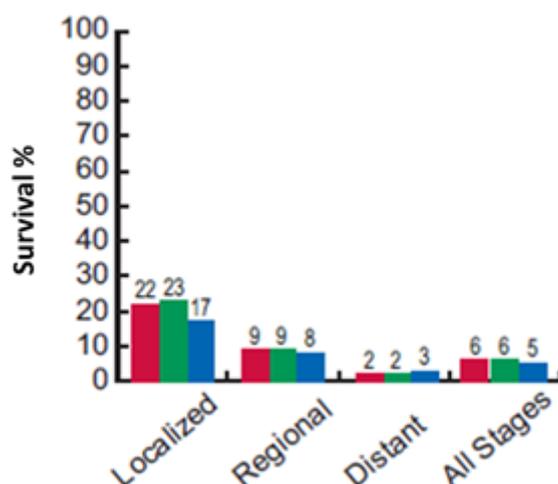


Abb.8: Prozentuales Überleben abhängig vom Erkrankungsstadium bei Diagnosestellung, unterteilt nach ethnischer Herkunft (Jemal et al. 2010)

Ein Durchmesser des Primärtumors von unter 3cm geht mit einer medianen Überlebenszeit von 18 Monaten einher, verglichen mit 11 Monaten bei einem Tumordurchmesser von mehr als 3cm. Hat das Karzinom bereits Lymphknoten infiltriert, reduziert sich die mittlere Überlebenszeit von 33 auf 13 Monate. Patienten mit tumorfreien Resektionsrändern haben eine mittlere Überlebenszeit von 26 Monaten, eine mikroskopisch unvollständige Entfernung des Malignoms verringert das mittlere Überleben auf 9 Monate (Benassai et al. 2000).

### 1.1.8 Molekulares Profil

Krebs ist eine Erkrankung genetischer Instabilität. Der Progress der Zelltransformation beinhaltet eine Reihe von Einzelmutationen, aus deren Akkumulation letztendlich die maligne Entartung der Zelle resultiert. Eine genaue Kenntnis dieser Transformationskette und somit der im Pankreaskarzinom typischerweise vorliegenden Mutationen ermöglicht die Entwicklung neuer Therapien, deren Anwendung durch die zielgerichtete, nur die entarteten Zellen betreffende Wirkung eine potenziell schonendere Therapieoption für die Patienten bieten würde.

Die molekulare Charakterisierung von Pankreaskarzinomen zeigt, dass das KRAS-Gen in über 90% aller duktaalen Adenokarzinome in mutierter Form vorliegt (Almoguera et al. 1988). Auch IGF-1R $\beta$  und EGFR sind in Pankreaskarzinomen häufig in überexprimierter Form vorhanden (Ahsan et al. 2012).

## **1.2 Hitzeschockproteine**

### **1.2.1 Allgemeines**

Hitzeschockproteine (HSPs) wurden erstmals 1962 als hochkonservierte Proteine, deren Expression durch verschiedene Arten von Stress induziert wird, entdeckt (Ritossa 1962). Sie kommen sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten vor. Die Hauptaufgabe der Hitzeschockproteine liegt in ihrer Funktion als „molekulares Chaperon“ (*frz.* Gouvernante), das bei der posttranslationalen Faltung und Stabilisierung von Proteinen assistiert und somit die optimale Funktion dieser garantiert. Zudem sind Hitzeschockproteine für den Import von Proteinen in verschiedene zelluläre Kompartimente, die Degradierung instabiler Proteine über den Ubiquitin-Proteasom-Weg und das Auflösen beziehungsweise die Prävention der Bildung von Proteinaggregaten verantwortlich (Bukau und Horwich 1998). Auch die Steuerung der Mitose und des Zellzyklus zählt zu ihren Aufgaben (Calderwood et al. 2006). Des Weiteren regulieren Hitzeschockproteine auf vielfältige Weise die Apoptose. Hierbei besitzen HSP27 und HSP70 eine antiapoptotische und HSP60 und HSP10 eine proapoptotische Funktion. Unter normalen Bedingungen liegen pro- und antiapoptotische Signale in einem Gleichgewicht vor (Garrido et al. 2001).

In Stresssituationen, wozu beispielsweise Hitze, metabolische Entgleisungen und chemische Noxen zählen, wird über Hitzeschocktranskriptionsfaktoren (HSF) die Transkription der für die Hitzeschockproteine codierenden Gene initiiert (Khalil et al. 2011).

Nach ihrem Molekulargewicht werden die Hitzeschockproteine in fünf Familien unterteilt: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 und die kleinen HSPs, zu denen unter anderem HSP27 gehört. Ihre Expression erfolgt entweder konstitutiv (HSP60, HSP90) oder sie werden durch Stress induziert (HSP70, HSP27) (Garrido et al. 2001). Hitzeschockproteine machen ein bis zwei Prozent des Gesamtproteins der Zelle aus, können aber bei Stress auf bis zu sechs Prozent gesteigert werden (Whitesell und Lindquist 2005).

### **1.2.2 HSP90**

#### **1.2.2.1 Vorkommen**

HSP90 ist der bekannteste Vertreter der Familie der Hitzeschockproteine. Es existieren verschiedene Isoformen, die im Zytoplasma, im Endoplasmatischen Retikulum (Grp94), in den Mitochondrien (TRAP1) und in der Zellmembran lokalisiert sind (Banerji 2009). Die

im Zytoplasma vorkommenden Isoformen HSP90 $\alpha$  und HSP90 $\beta$  sind essentiell für das Überleben der Zelle und werden von zwei separaten, hoch konservierten Genen codiert, die während der Evolution durch Duplikation entstanden sind (Whitesell und Lindquist 2005). In den meisten eukaryoten Zellen wird eine der zytoplasmatischen Isoformen konstitutiv hoch exprimiert und bei Stress nur gering induziert, während die andere Isoform basal bei einem niedrigen Niveau gehalten wird, um unter restriktiven Wachstumsbedingungen stark gesteigert zu werden (Scheibel und Buchner 1998). Gegenwärtige Studien zeigen, dass zumindest einige Funktionen zwischen den Isoformen HSP90 $\alpha$  und HSP90 $\beta$  differieren (Voss et al. 2000).

### 1.2.2.2 Chemische Struktur und ATPase-Zyklus

HSP90 ist ein flexibles Dimer. Jedes Monomer besteht aus einer N-terminalen Domäne (24-28 kDa), einer mittleren Domäne (38-44 kDa) und einer C-terminalen Domäne (11-15 kDa). Die N-terminale und die mittlere Domäne sind durch die hochvariable *linker region* miteinander verbunden (Brown et al. 2007).

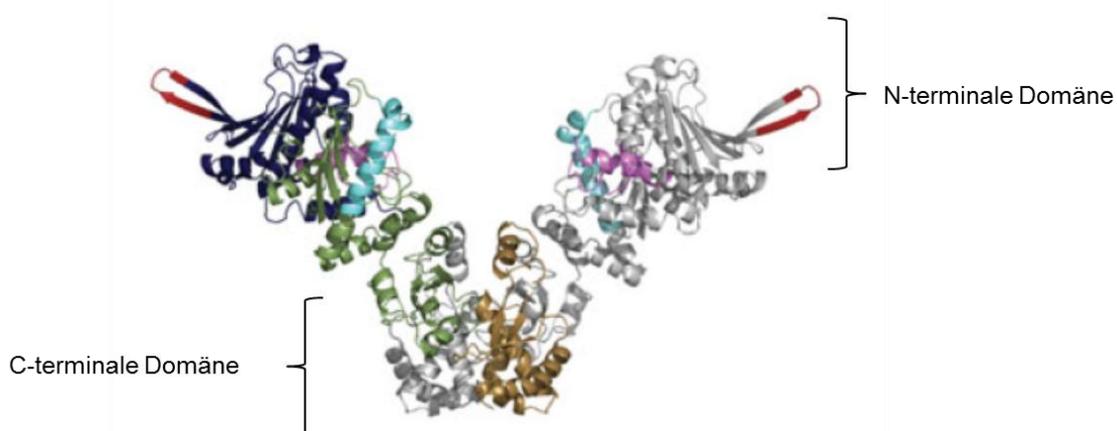


Abb.9: Struktur von HSP90 (modifiziert nach Krukenberg et al. 2011)

In der N-terminalen Domäne ist die ATP-Bindungstasche lokalisiert. Die C-terminale Domäne erleichtert die Bildung des Homodimers und begünstigt das Formen einer Tasche, in der Zielproteine binden können (Brown et al. 2007). Zudem interagiert diese Domäne mit diversen Co-Chaperonen, wie Hip, Hop, p23, HSP70, HSP40, Cdc37 und AHA1, mit denen HSP90 große Multi-Chaperon-Komplexe bildet und welche die Aktivität von HSP90 steuern (Calderwood et al. 2006; Pearl et al. 2008; Pratt und Toft 2003).

Die Bindung und Hydrolyse von ATP ist essentiell für die Funktion von HSP90 und bewirkt eine Konformationsänderung des Chaperons, die seine Fähigkeit zur Bindung, Faltung und Entlassung der Client Proteine reguliert (Brown et al. 2007). Diese Reaktion ist der limitierende Schritt des Enzyms und erfolgt in verschiedenen Etappen:

Nach der Bindung von ATP klappt sich ein kurzer Teil der N-terminalen Domäne (das so genannte „ATP lid“) über die Bindungstasche. Dadurch wird ein anderer Teil des N-terminalen Endes frei und bindet an der gegenüberliegenden N-Domäne der anderen Untereinheit des Dimers („molecular clamp mechanism“) (Brown et al. 2007; Wandinger et al. 2008). Die so entstandene Konformationsänderung bewirkt weitere Strukturveränderungen im gesamten Protein. Durch eine Assoziation der N- und M-Domänen und eine Verkürzung der Distanz zwischen den M-Domänen wird schließlich ein in sich gedrehtes, kompaktes Dimer gebildet. In dieser Konformation kann ATP nun in ADP und anorganisches Phosphat  $P_i$  hydrolysiert werden. Danach kommt es zur Dissoziation der N-Domänen, ADP und anorganisches Phosphat  $P_i$  werden aus der Bindungstasche entlassen und das HSP90-Dimer kehrt in seinen ursprünglichen Zustand zurück (Wandinger et al. 2008).

Der genaue Mechanismus der Substratbindung von HSP90 ist noch nicht geklärt. Da die Client Proteine von HSP90 stark in ihrer Struktur variieren, wird vermutet, dass nicht ein spezifisches Element, sondern die Stabilität (Hartson et al. 1998) beziehungsweise die Ladung einer bestimmten Region des jeweiligen Proteins entscheidend für die Bindung ist (Citri et al. 2006).

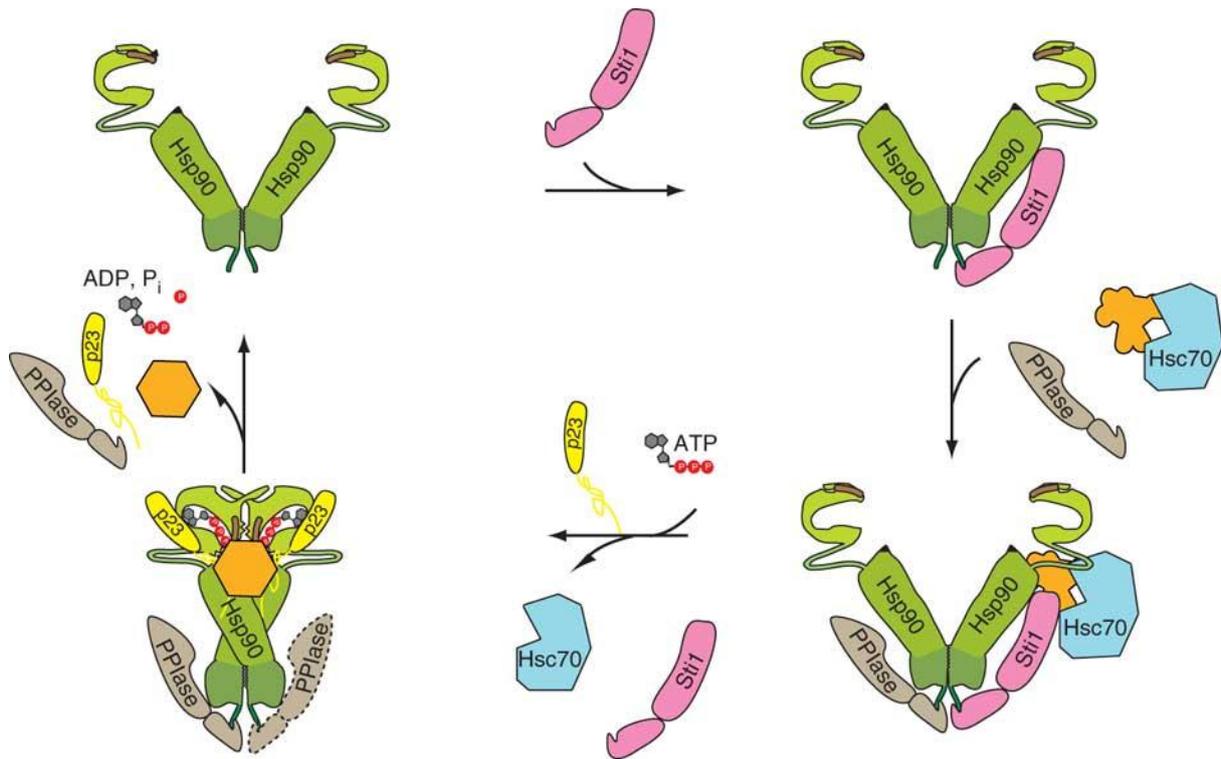


Abb.10: ATPase-Zyklus von HSP90 (Li et al. 2011)

### 1.2.2.3 Funktion in gesunden Körperzellen

Extrazellulär lokalisiertes HSP90 ist für immunologische Prozesse verantwortlich (Schmitt et al. 2007), intrazelluläres HSP90 hingegen nimmt zytoprotektive und antiapoptotische Funktionen wahr (Gurbuxani et al. 2001). Dabei zählt die Stabilisierung von Proteinen, insbesondere verschiedener Regulatorproteine, die in einer Stresssituation oder auch konstitutiv erfolgen kann, ebenso zu seinen Aufgaben wie eine Beteiligung am posttranslationalen Modifikationsprozess diverser Polypeptide (Calderwood et al. 2006). Signalmoleküle werden durch HSP90 in einer aktiven Konformation gehalten (Calderwood et al. 2006). Zudem schützt HSP90 die Zelle vor Apoptose, indem es eine unspezifische Aggregation von Proteinen verhindert und eine Neufaltung falsch gefalteter oder denaturierter Proteine bewirkt (Wandinger et al. 2008).

Die essentielle Rolle von HSP90 auch in gesunden Zellen wird unter anderem dadurch unterstrichen, dass ein Mangel an HSP90 bei *Drosophila melanogaster* zum Tod der Fruchtfliege führt (Whitesell und Lindquist 2005).

In fetalen Mäusen, denen HSP90 $\beta$  fehlte, kam es zum Tod dieser durch mangelnde Entwicklung der Plazenta (Voss et al. 2000).

### 1.2.2.4 Funktion in Tumorzellen

In der Krebszelle übernimmt HSP90 durch die Stabilisierung seiner Zielproteine verschiedene überlebenswichtige Aufgaben. Nach Hanahan und Weinberg (2000) existieren sechs Fähigkeiten, die charakteristisch für Tumorzellen sind und durch genetische Instabilität erlangt werden können:

- Umgehung der Apoptose
- autonomes Wachstum
- verstärkte Angiogenese
- Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- Invasion und Metastasierung
- ein unendliches replikatives Potential

HSP90 spielt eine essentielle Rolle in der Erwerbung und Erhaltung aller dieser Fähigkeiten. Eine Umgehung der Apoptose erfolgt durch eine Aktivierung von IGF-1R $\beta$  und Akt. Über mutierte Tyrosinkinase-Rezeptoren wird autonomes Wachstum der Zelle vermittelt. Eine verstärkte Angiogenese kann über die vermehrte Expression von HIF-1 $\alpha$ , MET, Src und VEGF erreicht werden. Die Hochregulierung von CDK4, CDK6 und Cyclin D bewirkt eine Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen. Invasion und Metastasierung werden durch MMP2 und Urokinase gefördert und ein unendliches replikatives Potential über die dauerhafte Aktivierung der Telomerase erzielt (Neckers 2007). Eine Interaktion von HSP90 mit dem HER2-Rezeptor in Mammakarzinomzellen erzeugt eine Umstrukturierung des Zytoskeletts als Voraussetzung zur Metastasierung (Sidera et al. 2008).

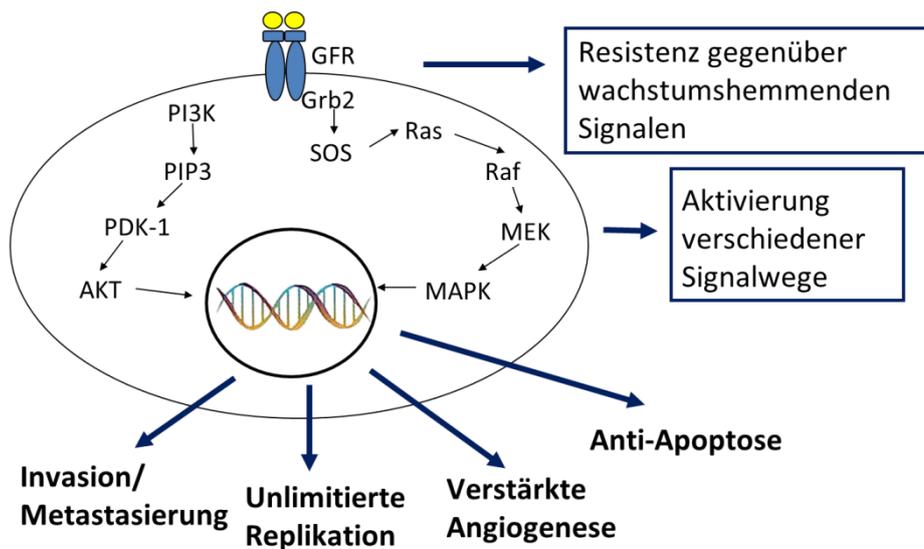


Abb.11: Aktivierung verschiedener Signalwege durch HSP90 und dadurch erworbene Eigenschaften der Krebszelle (eigene Darstellung, modifiziert nach Reinmuth und Thomas 2007)

Aufgrund einer Derepression der für HSP90 codierenden Gene während der malignen Entartung liegt HSP90 in den meisten Tumorzellen in überexprimierter Form vor (Calderwood et al. 2006).

Des Weiteren sorgt HSP90 über die Stabilisierung der Konformation mutierter Proteine und die Akkumulation dieser für eine Entwicklung neuer Phänotypen der Krebszellen, woraus eine bessere Anpassung und schnellere Entwicklung von Resistenzen resultiert (Kamal et al. 2003; Schmitt et al. 2007). Somit agiert HSP90 als Puffer der genetischen Variation (Pearl et al. 2008).

In Tumorzellen liegt HSP90 im Gegensatz zu den normalen Zellen eher in aktiven Komplexen vor (Kamal et al. 2003).

Eine chemotherapeutische Behandlung führt zu einer vermehrten Expression der die Hitzeschockproteine codierenden Gene und kann somit in einigen Fällen eine Resistenz gegenüber der Therapie bewirken (Vargas-Roig et al. 1998).

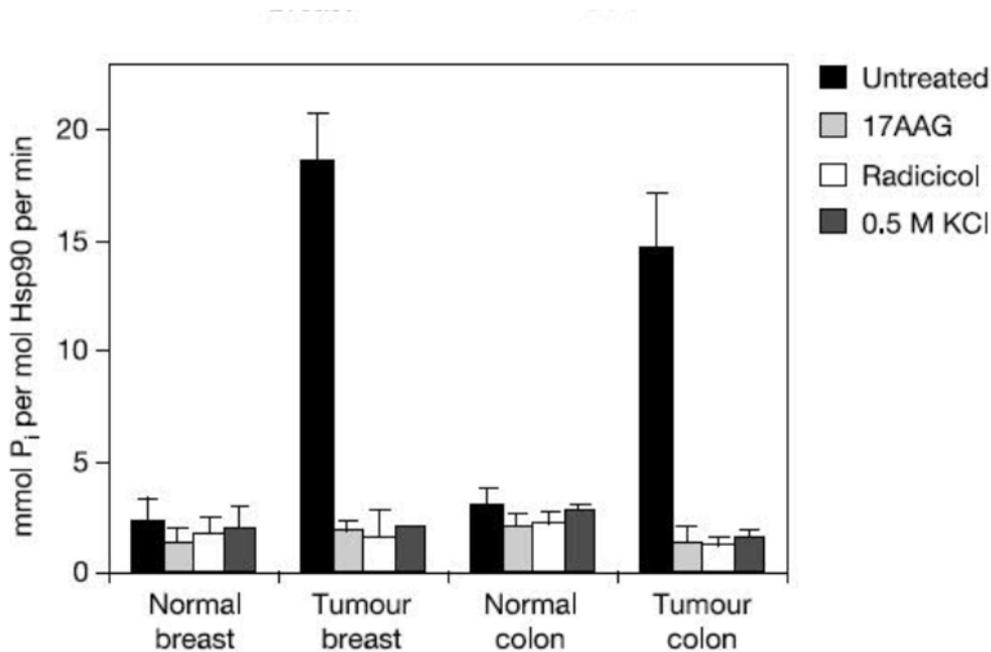


Abb.12: ATPase-Aktivität von HSP90 in Tumorgewebe im Vergleich zu gesunden Körperzellen nach Behandlung mit 17-AAG, Radicol oder KCl (Kamal et al. 2003)

### 1.2.2.5 Client Proteine von HSP90

HSP90 interagiert mit weit über 200 Substraten, die zumeist in regulatorische Signalwege der Zelle involviert sind (Hong et al. 2013). Zu den Client Proteinen von HSP90 zählen unter anderem Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. EGFR und HER2), Kinasen (z.B. Raf-1 und Akt), Transkriptionsfaktoren (z.B. p53 und NF- $\kappa$ B) und Steroidrezeptoren (Haupt et al. 2012; Neckers 2007).

EGFR und IGF-1R $\beta$  sind Transmembranrezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Nach Bindung ihres Liganden erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors mit nachfolgender Autophosphorylierung, wodurch verschiedene Signalkaskaden angeregt werden, die letztendlich DNA-Synthese und Zellproliferation induzieren (Hatake et al. 2007).

EGFR spielt eine zentrale Rolle in der Tumorentwicklung. In diversen Krebszellen (zum Beispiel kolorektales Karzinom, Bronchial- und Pankreaskarzinom) liegt EGFR in aktivierter, mutierter Form vor und bewirkt neben einem unkontrollierten Zellwachstum unter anderem eine Resistenz der Tumorzellen gegen unterschiedliche Chemotherapeutika, sodass eine Überexpression meist mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist (Hatake et al. 2007).

IGF-1R $\beta$  liegt in einigen Tumorentitäten, wie beispielsweise Mamma- und Prostatakarzinomen, überexprimiert vor und bewirkt nach Aktivierung eine Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen sowie eine Erhöhung des metastatischen Potentials der Krebszelle (Xue et al. 2012).

Das G-Protein KRAS vermittelt Signale für Zellwachstum und Differenzierung von Tyrosinkinase Rezeptoren zum Zellkern, wo es die Transkription bestimmter Gene initiiert (Khosravi-Far und Der 1994). Nach der Bindung eines externen Liganden, wie zum Beispiel EGF, erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors und somit eine Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität (Adjei 2001). Bedingt durch Mutationen wird das KRAS-Protoonkogen in ein Onkogen umgewandelt und somit eine normale Körperzelle zu einer Zelle mit neoplastischem Phänotyp transformiert. Das von diesem Gen transkribierte mutierte KRAS-Protein leitet die Signale der Wachstumsfaktorrezeptoren autonom weiter und sorgt so für eine Inhibition der Apoptose und unkontrolliertes Wachstum der Krebszelle. Mutationen im KRAS-Gen liegen in über 90% der malignen Neoplasien der Bauchspeicheldrüse vor und stellen eine der häufigsten genetischen Veränderungen dar (Almoguera et al. 1988).

Eines der Schlüsselenzyme der Ras-Familie ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), welche Akt durch Phosphorylierung aktiviert. Die Serin/Threonin-Kinase Akt reguliert den Zellzyklus und -metabolismus und beeinflusst über eine verstärkte Angiogenese das Tumorzellwachstum (Chen et al. 2005). Über eine Phosphorylierung verschiedener Effektoren der Apoptose sorgt Akt für ein Überleben der Zelle. Zudem wird über den PI3K-Signalweg invasives Tumorwachstum und eine Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Agenzien vermittelt (Adjei 2001; Jimeno und Hidalgo 2006).

Die MAPK-Kaskade enthält mindestens drei Proteinkinasen in Serie, die in der Aktivierung einer multifunktionalen MAPK gipfeln. Sie leiten extrazelluläre Stimuli an den Zellkern weiter und regulieren über eine verstärkte Transkription bestimmter Effektorgene Embryogenese, Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose (Pearson et al. 2001; Perego et al. 2010).

Sowohl über den Ras/Raf/MAPK- als auch über den PI3K/Akt-Signalweg werden D1 und Cdk 4 aktiviert, die beide für den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase wichtig sind, in der die DNA-Synthese stattfindet (Kamal et al. 2004).

### 1.2.3 Inhibitoren von HSP90

#### 1.2.3.1 Allgemeines

Eine Hemmung von HSP90 führt zu einem Abbau der verschiedenen Client Proteine über den Ubiquitin-Proteasom-Weg. Die HSP90-Inhibition scheint deswegen eine so wirksame Therapie zu sein, da simultan an verschiedenen Stellen des Signaltransduktionsweges angegriffen wird, was die Entwicklung von Resistenzen unwahrscheinlich macht (Prodromou et al. 1997; Song et al. 2008).

Radicicol und Geldanamycin sind natürlich vorkommende HSP90-Hemmer und besetzen beide kompetitiv die ATP-Bindungsstelle des Hitzeschockproteins. Durch den somit erzeugten Verlust seiner ATPase-Funktion kann HSP90 seine Aufgaben als Chaperon nicht mehr wahrnehmen (Taldone et al. 2008).

Mittlerweile sind zudem diverse synthetische Inhibitoren auf dem Markt, wie beispielsweise PU24FC1, CCT018159, Radamycin oder Novobiocin (Kusuma et al. 2011; Whitesell und Lindquist 2005).

#### 1.2.3.2 Geldanamycin-Derivate

Die wohl bekanntesten HSP90-Inhibitoren stellen Geldanamycin und seine Derivate dar. Geldanamycin ist ein Ansamycin mit einem Benzoquinone-Ring und wurde 1970 als Antibiotikum aus dem Actinobakterium *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Erst später wurde seine antiproliferative Wirkung in Tumoren entdeckt (Ochel et al. 2001).

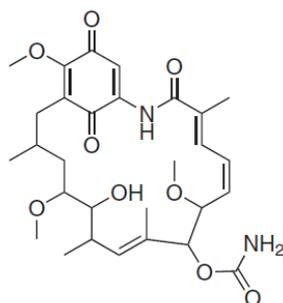


Abb.13: Strukturformel von Geldanamycin (<http://www.invivogen.com/geldanamycin>)

Aufgrund starker Hepatotoxizität, metabolischer und chemischer Instabilität und sehr geringer Solubilität in Wasser, die ein Lösen in Dimethylsulfoxid (DMSO) erforderlich macht, ist das Präparat jedoch nur begrenzt einsetzbar (Taldone et al. 2008). Daher wurden durch chemische Veränderungen neue Geldanamycin-Analoga synthetisiert. 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, Tanespimycin) zeigt eine gute

Aktivität *in vitro* und eine weitaus geringere Hepatotoxizität als Geldanamycin, ist aber ebenfalls nicht wasserlöslich. In den Vereinigten Staaten und in Großbritannien wird 17-AAG bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten klinisch erprobt (Guo et al. 2008; Hong et al. 2013).

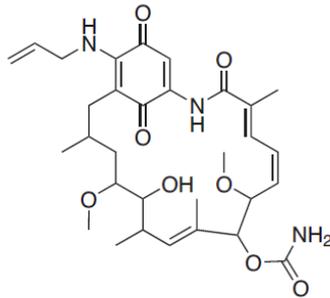


Abb.14: Strukturformel von 17-AAG (<http://www.invivogen.com/17-aag>)

17-AAG wird enzymatisch von CYP3A4 in seine Metabolite umgesetzt, wozu unter anderem 17-AG und ein Epoxid zählen. Ein Nebenprodukt des 17-AG-Metaboliten ist ein nephrotoxisch wirkendes Acrolein. Alle Metabolite von 17-AAG sind biologisch wirksam (Neckers 2007).

Die neueren Derivate 17-(2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl)amino-17-demethoxygeldanamycin (17-AEP-GA) und 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG, Alveospimycin) sind wasserlöslich und versprechen somit einen komfortableren Einsatz *in vivo*.

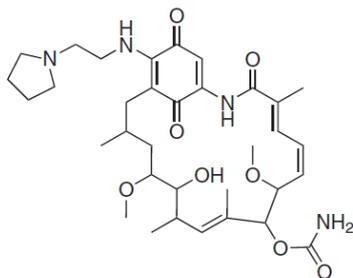


Abb.15: Strukturformel von 17-AEP-GA (<http://www.invivogen.com/17-aep-ga>)

17-DMAG wird nur minimal von CYP3A4 metabolisiert und aufgrund seiner veränderten chemischen Zusammensetzung nicht in 17-AG umgewandelt. Dies verspricht ein verbessertes Toxizitätsprofil von 17-DMAG gegenüber 17-AAG (Neckers 2007).

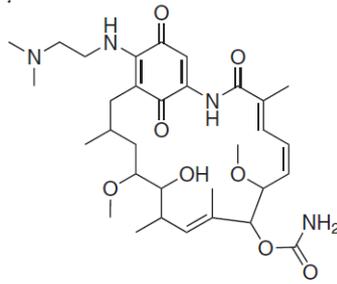


Abb. 16: Strukturformel von 17-DMAG (<http://www.invivogen.com/17-dmag>)

Geldanamycin-Analoga binden kompetitiv an der konservierten ATP-Bindungsstelle der aminoterminalen Domäne von HSP90 und verhindern somit die Bindung und Hydrolyse von ATP, wodurch HSP90 seine Chaperon-Funktion verliert (Tillotson et al. 2010). Dies führt zu einem Wachstumsstillstand des Tumors durch G1-Arrest sowie morphologischer und funktionaler Differenzierung, außerdem zu einer Aktivierung der Apoptose. Zusätzlich wird die Angiogenese verhindert (Hostein et al. 2001; Taldone et al. 2009).

Ein großer Vorteil des Einsatzes der Geldanamycin-Derivate besteht in der selektiven Wirkung in Krebszellen. Dies hat verschiedene Gründe: Krebszellen sind abhängig von Onkoproteinen und ein Abbau dieser betrifft maligne entartete Zellen wesentlich stärker als normale Zellen. Des Weiteren liegen Onkoproteine meist in mutierter Form vor und benötigen somit HSP90 zur Stabilisierung. Das intrazelluläre Milieu in den Krebszellen ist bestimmt von Azidose, Hypoxie und Mangel an Nährstoffen, was eine Umgebung des zellulären Stresses darstellt. Hierdurch wird HSP90 zur Stabilisierung der Proteine unabdingbar. Zuletzt binden einige HSP90-Inhibitoren mit Präferenz an HSP90-Komplexen in Krebszellen (Banerji 2009; Chiosis und Neckers 2006; Koga et al. 2009). So ist bei einer Inkubation von Geldanamycin mit Tumorzellen der  $IC_{50}$  im Vergleich mit normalen Zellen um den Faktor 100 erniedrigt (Kamal et al. 2003). Diese Gegebenheiten lassen vermuten, dass der Einsatz von HSP90-Hemmern verhältnismäßig nebenwirkungsarm ist.

### 1.2.4 HSP70

Die HSP70-Familie umfasst das vorwiegend stressinduzierte HSP70, konstitutiv exprimiertes HSC70, sowie mitochondriales HSP75 und Grp78, welches im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Garrido et al. 2006). HSP70 nimmt unterschiedliche Aufgaben in der Zelle wahr, wie die Assistenz bei der Faltung neu synthetisierter Polypeptide oder falsch gefalteter Proteine, die Bildung von Multi-

Chaperon-Komplexen und der Transport von Proteinen durch zelluläre Membranen (Garrido et al. 2006). Insbesondere ist HSP70 ein essentieller Inhibitor der Apoptose (Lanneau et al. 2007).

Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod. Als Auslöser wirken sowohl extra- als auch intrazelluläre Signale. Die Apoptose wird in die Initiations- und Ausführungsphase unterteilt, wobei Erstere sich in den intrinsischen und den extrinsischen Weg gliedert. Auslösend für den extrinsischen Weg ist die Bindung eines Liganden an den TNF-Rezeptor, worüber eine Signalkaskade ausgelöst wird, die letztlich in der Aktivierung von Caspase-8 resultiert.

Beim intrinsischen Weg wird Cytochrom c durch verschiedene Effektoren, wie beispielsweise Bax, Bad oder diverse Chemotherapeutika, aus den Mitochondrien freigesetzt. Cytochrom c bindet dann an Apaf-1 und aktiviert schließlich Caspase-9.

Während der Ausführungsphase bewirken Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 die Selbstverdauung der Zelle durch Aktivierung von DNasen. Letztendlich schnürt sich die Zelle in kleine Vesikel ab, die durch Phagozytose vernichtet werden (Hengartner et al. 2000; Kerr et al. 1972; Peter et al. 1997).

HSP70 hemmt die Apoptose auf unterschiedlichem Niveau:

Auf dem prä-mitochondrialen Level blockiert es die Aktivität der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK1), wodurch die Aktivierung von Caspase-3 inhibiert wird. Des Weiteren stabilisiert es die nicht-phosphorylierten Formen von Akt und PKC (Gabai et al. 2000; Park et al. 2001).

Auf mitochondrialem Niveau hemmt HSP70 die Translokation von Bax, was einer Permeabilität der mitochondrialen Membran vorbeugt und folglich die Freisetzung von Cytochrom c und AIF aus letzterer blockiert (Nylandsted et al. 2004; Stankiewicz et al. 2005).

Post-mitochondrial bindet HSP70 an Apaf-1 und verhindert so den Einbau von Procaspase-9 in das Apoptosom (Beere et al. 2000).

Auch die Caspase-unabhängigen Apoptosewege werden durch HSP70 gehemmt. Eine Assoziation von HSP70 mit Endonuklease G verhindert die DNA-Fragmentierung und eine Bindung an AIF, sowie dessen Translokation in den Nukleus und die Kondensation des Chromatins (Kalinowska et al. 2005; Matsumori et al. 2005).

Ein Mangel an HSP70 macht Zellen extrem anfällig für apoptotische Stimuli (Garrido et al. 2006).

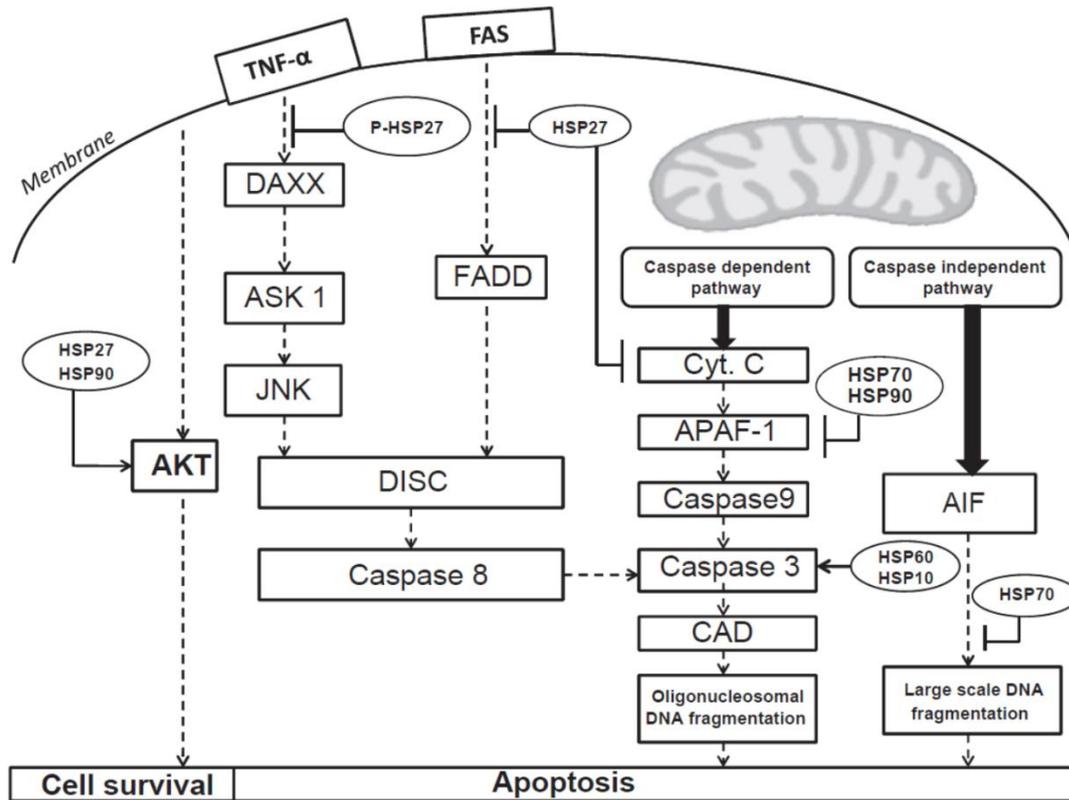


Abb.17: Apoptosewege und deren Beeinflussung durch HSPs (Khalil et al. 2011)

HSP70 benötigt meist ATP für seine Funktion, kann jedoch in manchen Konstellationen unabhängig von ATP agieren (Garrido et al. 2006).

### 1.2.5 HSP27

HSP27 gehört zur Familie der kleinen HSPs und wird je nach Entwicklungs- und Differenzierungszustand in vielen Gewebearten exprimiert (Garrido et al. 2000). Das Protein agiert ATP-unabhängig und seine Hauptfunktion besteht im Schutz vor Proteinaggregation in den Zellen (Garrido et al. 2001; Lanneau et al. 2007). Abhängig vom Phosphorylierungsstatus werden lange Oligomere gebildet, die seine Chaperon-Funktion begünstigen (Lanneau et al. 2007; Rogalla et al. 1999).

Über unterschiedliche Mechanismen hat HSP27 eine antiapoptotische Wirkung. Das Protein kann den antioxidativen Schutzmechanismus der Zelle durch eine Steigerung der intrazellulären Menge an Glutathion fördern, sodass die durch oxidierte Proteine verursachten toxischen Effekte neutralisiert werden (Garrido et al. 2001; Rogalla et al. 1999). Außerdem besitzt HSP27 die Fähigkeit zur Bindung und Stabilisierung von Aktin-

Polimeren (Lavoie et al. 1995). Über die zytoplasmatische Bindung des aus den Mitochondrien freigesetzten Cytochrom c erfolgt die Inhibierung von Procaspase-9 und Procaspase-3, wodurch die Bildung des Apoptosoms verhindert wird. Für diese Interaktion wird HSP27 in seiner Form als Dimer benötigt (Garrido et al. 2001). Durch eine Interaktion mit Daxx verhindert HSP27 einen über den Todesrezeptor Fas vermittelten Apoptoseweg (Charette et al. 2000).

### **1.3 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis eines durch funktionelle HSP90-Inhibition erzeugten antiproliferativen Effekts auf Adenokarzinome des Pankreas, die Resistenzen gegen 5-FU und Gemcitabine aufweisen.

Zunächst wurde die wachstumshemmende Wirkung des wasserunlöslichen Geldanamycin-Derivats 17-AAG sowie der wasserlöslichen Derivate 17-AEP-GA und 17-DMAG mittels MTT-Test verifiziert.

Im Anschluss wurde die Veränderung der Expression einiger Zielproteine von HSP90 nach Behandlung mit den oben genannten Wirkstoffen mittels Western Blot überprüft.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Produkt	Hersteller
Brutschrank 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	Heraeus Instruments
Kühlschrank +4°C	Linde
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Kryotec
Reinluftwerkbank <i>HERA safe</i>	Heraeus
Vakuumpumpe	vacuubrand
Wasserbad	medingen
Pipettierhilfe <i>pipetus</i>	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf
Multipipette <i>Finnpipette</i> (30-300µl)	Thermo Electron Corporation
Mikroskop <i>Axiovert 40 CFL</i>	Zeiss
Neubauer Zählkammer	Neubauer
Microplate Reader <i>MR 5000</i>	DYNATECH
Zentrifuge <i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf
Spannungsgerät <i>PowerPac Universal TM</i>	BIO RAD
Vortexer <i>Certomat MV</i>	B.Braun Biotech International
pH-Meter	inoLab
Magnetrührer <i>Ikamag RH</i>	Jemke&Kunkel, IKA Labortechnik
Schüttler <i>Rotamax 120</i>	Heidolph
Waage <i>TE 153S</i>	Sartorius
Heizblock <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf
Glasplatten <i>Mini Protean 3 System</i>	BIO RAD
Plastikkämme für die Gelherstellung	BIO RAD
Vorrichtung zum Gießen der Gele (Casting stand)	BIO RAD
Hamilton-Spritze	Hamilton

SDS-PAGE-Kammern <i>Mini Protean 3 electrophoresis system</i>	BIO RAD
Transferapparat <i>Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell</i>	BIO RAD
Filmkassette <i>x-ray cassette 24x30 cm</i>	rego

Tab.2: Geräte

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf
Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt
Glas Pasteurpipetten	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
Zellschaber (Cell Scraper)	nunc
Zellkulturschalen <i>nunclon surface</i> (5cm)	nunc
96-Loch-Platte <i>CellStar</i>	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße (0,1ml, 0,5ml) <i>safe-lock tubes</i>	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15ml, 30ml) <i>Cellstar</i>	Falcon
Nitrozellulosemembranen <i>Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane</i>	BIO RAD
Filterpapier <i>extra thick blot paper</i>	BIO RAD
Röntgenfilm <i>Medical x-ray screen film blue sensitive</i>	CEA

Tab.3: Verbrauchsmaterialien

### 2.1.3 Medien und Reagenzien

Produkt	Firma	Funktion
RPMI 1640 Medium	GIBCO	Bestandteile des Nährmediums (2.1.4)
FBS	GIBCO	
Penicillin/Streptomycin	GIBCO	
EGF (1µg/ml)	Pepto Tech	
FGF (1µg/ml)	Pepto Tech	
Gentamycin (10mg/ml)	Biochrom AG	
Transferrin (10µmol/ml)	Sigma	
Insulin (1µg/ml)	Sigma	
Trypsin EDTA	GIBCO	Splitten der Zellen (2.2.1.1)
Trypanblau 0,4%	GIBCO	Anfärben der Zellen und Überprüfung der Zellviabilität
17-AAG	InvivoGen	HSP90-Inhibition
17-AEP-GA	InvivoGen	HSP90-Inhibition
17-DMAG	InvivoGen	HSP90-Inhibition
Gemcitabinehydrochlorid <i>Gemzar</i>	Lilly	Zellwachstumshemmung
5-Fluorouracil <i>5-FU medac</i>	medac	Zellwachstumshemmung
Dimethylsulfoxid (DMSO) (99,5%)	Sigma- Aldrich	Organisches Lösungsmittel zum Lösen von 17-AAG
Destilliertes Wasser (aqua ad iniectabilia)	Braun	Lösen von 17-AEP-GA und 17- DMAG
CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS und PES)	Promega	Bestimmung der Anzahl lebendiger Zellen im MTT- Versuch (2.2.1.2.4)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) <i>Dilbecco's phosphate buffered saline</i>	GIBCO	Pufferlösung, Waschen der Zellen (2.2.2.2)
EDTA (Versen)	GIBCO	Lösen der Zellen aus dem Zellverband (2.2.2.2)

10x Cell Lysis Buffer	Cell Signaling	Herstellung des Puffers für die Zelllyse (2.1.4)
Benzonase	Sigma	
Proteaseinhibitor-Tabletten <i>Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche	
BCA-Reagenz <i>Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible</i>	PIERCE	Proteinnachweis (2.2.2.4)
30% Acrylamid/Bis 37,5:1	BIO RAD	bildet das Gerüst des Polyacrylamidgels, Gelherstellung (2.1.4)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BIO RAD	Polymerisationskatalysator, Gelherstellung (2.1.4)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BIO RAD	Polymerisationsinitiator, Gelherstellung (2.1.4)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BIO RAD	denaturierendes, ionisches Detergenz, Gelherstellung (2.1.4)
Sammelgelpuffer pH=6,8	BIO RAD	Gelherstellung (Sammelgel) (2.1.4)
Trenngelpuffer pH=8,8	BIO RAD	Gelherstellung (Trenngel) (2.1.4)
Isopropanol (99,5%)	Roth	Gelherstellung (2.1.4)
Laemmli Puffer	BIO RAD	Ladepuffer (2.2.3.1)
10x Laufpuffer (Tris/Glycine/SDS Buffer)	BIO RAD	Herstellung 1x Laufpuffer (2.1.4)
Proteinstandard <i>Precision Plus Protein Standards Dual Color</i>	BIO RAD	Proteinstandard (2.2.3.2)
Tris ( <i>hydroxymethyl</i> )- <i>aminomethan</i> ) <i>Trizma base</i> (99,9%)	Sigma	Puffersubstanz

NaCl <i>Sodium chloride, SigmaUltra</i> (99,5%)	Sigma	Puffersubstanz
Glycin	Sigma	Puffersubstanz
Tween20 ( <i>Polyoxyethylen</i> (20)- <i>sorbitan-monolaurat</i> )	Serva	Herstellung von TBS+1%tween (2.1.4)
Fettfreies Milchpulver <i>blotting</i> <i>grade blocker non-fat dry milk</i>	BIO RAD	Herstellung fettfreier Milch (2.1.4)
Natriumnitrit (10%)	Serva	Hemmer der Atmungskette, bewirkt längere Haltbarkeit der Antikörper-Mischungen durch Abtöten von Mikroorganismen (2.1.5)
Ponceau S <i>3-Hydroxy-4-((2-sulfo-</i> <i>4- ((4-sulfophenyl)azo)phenyl)azo)-</i> <i>2,7-naphthalindisulfonsäure</i> (0,2% in 3% TCA)	Serva	Anfärben der Proteine (2.2.4.2)
Substrat <i>Super Signal West Dura</i> <i>Extended Duration Substrate</i>	PIERCE	Antikörper-Detektion (2.2.5.1)

Tab.4: Medien und Reagenzien

### 2.1.4 Selbst hergestellte Medien, Puffer und Lösungen

Produkt	Herstellung	Verwendung
Nährmedium für die Zelllinien 5061, 5072 und 5156	500ml RPMI 1640 Medium 50ml FBS 5ml Penicillin/Streptomycin 2,5ml Transferrin 5ml EGF 5ml FGF 5ml Insulin 5ml Gentamycin	Zellkultur (2.2.1.1)

Nährmedium für die Zelllinie L.3.6pl	500ml RPMI 1640 Medium 50ml FBS 5ml Penicillin/Streptomycin 5ml Gentamycin	Zellkultur (2.2.1.1)
Puffer für die Zelllyse	3,6ml Cell Lysis Buffer, 12µl Benzonase, 150µl 25x Protease Inhibitor (eine Protease Inhibitor Tablet in 2ml destilliertes Wasser)	Zelllyse (2.2.2.3)
10% SDS	10g SDS 90ml Wasser	Herstellung der Gele
10% APS	1,5g APS 15ml Wasser	Herstellung der Gele
10x TBS	303g Tris 438g NaCl 5L Wasser mit 25% Salzsäure pH adjustieren bis pH=7,5	Herstellung von 1x TBS
1x TBS	100ml 10x TBS 900ml Wasser	Waschen der Membranen (2.2.5.1; 2.2.4.2)
TBS + 1% tween	100ml 10x TBS 900ml Wasser 1ml tween 20	Waschen und Lagern der Membranen (2.2.5.1; 2.2.4.2)
1x Laufpuffer	100ml 10x Laufpuffer 900ml Wasser	Gelelektrophorese (2.2.3.2)
10x Transferpuffer	29,3g Glycin 58,2g Tris 37ml SDS 1L Wasser	Herstellung von 1x Transferpuffer

1x Transferpuffer	100ml 10x Transferpuffer 300ml Wasser 200ml Methanol 400ml Wasser	Transfer (2.2.4.2)
5% fettfreie Milch	10g fettfreies Milchpulver (Non Fat Dry Milk) 200ml TBS	Blocken der Membranen (2.2.4.3)
Polyacrylamidgel, 12% (4x)	13,6ml H <sub>2</sub> O 16ml 30% Acrylamid/Bis 10ml 1,5M Puffer pH8,8 0,4ml 10% SDS 200µl APS 20µl TEMED	Gelelektrophorese (2.2.3.2)
Polyacrylamidgel, 5% (4x)	11,4ml H <sub>2</sub> O 3,4ml 30% Acrylamid/Bis 5ml 0,5M Puffer pH 6,8 0,2ml 10% SDS 100µl APS 20µl TEMED	Gelelektrophorese (2.2.3.2)

Tab.5: selbst hergestellte Medien, Puffer und Lösungen

### 2.1.5 Antikörper

Antikörper	Quelle	Molekulares Gewicht	Verdünnung	Firma
EGF Rezeptor Antikörper <i>polyklonal</i>	Kaninchen	170 kDa	1:1000	Cell Signaling
IGF-I Rezeptor β Antikörper <i>polyklonal</i>	Kaninchen	95 kDa	1:1000	Cell Signaling

p44/42 MAPK (Erk1/2) Antikörper <i>polyklonal</i>	Kaninchen	Doppelbande (42 und 44 kDa)	1:1000	Cell Signaling
Akt Antikörper <i>polyklonal</i>	Kaninchen	60 kDa	1:1000	Cell Signaling
Cleaved Caspase-3 Antikörper <i>Polyclonal</i>	Kaninchen	Doppelbande (17 und 19 kDa)	1:1000	Cell Signaling
Cleaved PARP Antikörper <i>polyklonal</i>	Kaninchen	89 kDa	1:1000	Cell Signaling
HSP90 Antikörper <i>monoklonal</i>	Maus	90 kDa	1:1000	Stressgen
HSP70 Antikörper <i>monoklonal</i>	Maus	70 kDa	1:1000	Stressgen
HSP27 Antikörper <i>monoklonal</i>	Maus	27 kDa	1:1000	Cell Signaling
Anti- $\beta$ -Actin <i>monoklonal</i>	Maus	42 kDa	1:2000	Sigma
Anti-mouse IgG	Ziege		1:20 000	Sigma
Anti-rabbit IgG	Ziege		1:20 000	Sigma

Tab.6: Antikörper

Die Lagerung der Antikörper erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Vor Anwendung wurden sie in 2,5%iger Milch gelöst.

Bereits verdünnte Antikörper wurden mehrmals benutzt und bei  $+4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach der ersten Verwendung wurde Natriumnitrit (10%) im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt, um ein Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Dabei sorgt Natriumnitrit, ähnlich wie auch Kohlenstoffmonoxid, über eine irreversible Blockade der Sauerstoffbindungsstelle der Cytochrom-c-Oxidase für eine Störung des Elektronentransports in der Atmungskette.

### **2.1.6 Untersuchungsmaterial**

Es wurden vier primäre Zelllinien untersucht, die aus Tumorgewebe von Adenokarzinomen des Pankreas etabliert wurden.

Die Zelllinien 5061, 5072 und 5156 stammen von Patienten, die in der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf operiert wurden. L.3.6pl ist eine sekundäre Zelllinie aus einem orthotopen Maus-Xenograft-Modell, die freundlicherweise von Dr. Bruns aus der Universität München zur Verfügung gestellt wurde.

Alle Zelllinien wuchsen in speziellen Nährmedien (Herstellung siehe 2.1.4) im Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.1.7 HSP90-Inhibitoren**

Die in Pulverform gelieferten Geldanamycin-Derivate 17-AAG, 17-AEP-GA und 17-DMAG wurden in Dimethylsulfoxid (17-AAG) beziehungsweise destilliertem Wasser (17-AEP-GA und 17-DMAG) gelöst und auf eine Konzentration von 1mM verdünnt. Um die Wirksamkeit beeinträchtigendes häufiges Auftauen und wieder Einfrieren zu vermeiden, wurde die HSP90-Inhibitor-Lösung zu je 100µl in 0,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert, sodass die jeweils erforderliche Menge bei Bedarf aufgetaut werden konnte.

### **2.1.8 Gemcitabine und 5-Fluorouracil**

Gemcitabine und 5-FU wurden in destilliertem Wasser gelöst und zu einer Konzentration von 1mM verdünnt. Ebenso wie die HSP90-Inhibitoren wurden Gemcitabine und 5-FU zu je 100µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Kultivierung der Zellen**

Die adhäsiv wachsenden Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop beurteilt, sodass bei Erreichen der Konfluenz eine Passagierung stattfinden konnte. Zur Vereinzelnung der Zellen erfolgte zunächst eine fünfminütige Inkubation mit 2ml Trypsin-EDTA bei 37°C. Trypsin spaltet extrazelluläre Proteine und erreicht somit ein schonendes Andauen der zellulären Gewebematrix, ohne die Zelloberfläche oder die Interzellularstruktur irreversibel zu schädigen.

Lösten sich die Zellen anschließend nicht vom Boden der Zellkulturflasche, wurden sie entweder für weitere 5 Minuten im Wärmeschrank belassen oder mittels Zellschaber mechanisch gelöst. Nach mehrmaligem Spülen mit 5ml Nährmedium wurde die so erhaltene Zellsuspension auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Zumeist erfolgte dies im Verhältnis 1:2, bei schneller proliferierenden Zellen (5156 und L.3.6pl) auch im Verhältnis 1:3.

Das in dem Medium enthaltene fetale Rinderserum bewirkt eine Inaktivierung des Trypsins, sodass dies den Zellverbund nicht mehr angreifen konnte.

#### **2.2.1.2 MTT-Test**

Der MTT-Test dient der kolorimetrischen Bestimmung der Zellzahl und -vitalität. Hierfür werden Zellen mit Reagenzien versetzt, deren Farbumschlag das Vorhandensein lebender Zellen beweist. Durch eine anschließende Absorptionsmessung wird ein Wert ermittelt, der sich proportional zur Zellzahl verhält. In dieser Arbeit wurde der MTT-Test zum Nachweis der zytotoxischen Wirkung der HSP90-Inhibitoren genutzt.

##### **2.2.1.2.1 Zellvereinzelnung und Quantifizierung**

Das Trypsinisieren der Zellen erfolgte wie unter 2.2.1.1 beschrieben. Mit 5ml Nährmedium wurden die Zellen aus den Flaschen herausgespült und in ein Reaktionsgefäß gefüllt. 100µl der so erhaltenen Zellsuspension wurden mit 100µl Farbstoff (Trypanblau 0,4%) vermischt. Von dieser Lösung wurden wiederum 100µl auf eine Neubauer Zählkammer gegeben. Dies ist ein spezieller Objektträger, in dessen Mittelfläche quadratische Felder definierter Größe eingelassen sind (Zählfläche). Das Deckglas, ein dünnes Glasplättchen, wird auf den seitlich der Zählfläche vorhandenen Auflagen platziert, die um einen

bestimmten Betrag (bei der in dieser Arbeit verwendeten Zählkammer: 0,1mm) erhöht sind. Dadurch wird ein Raum mit definiertem Volumen geschaffen. Die auszuzählende Zellsuspension wird seitlich aufpipettiert, saugt sich durch Kapillarkraft in den Zwischenraum und verteilt sich in einer Schicht mit genau bekannter Dicke. Da nur die Membran avitaler Zellen für Trypanblau durchlässig ist und sich diese somit isoliert blau anfärben lassen, konnte nun die Anzahl vitaler, nicht angefarbter Zellen bestimmt werden. Nach Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden lebendigen Zellen unter dem Lichtmikroskop ließ sich deren Anzahl pro Volumeneinheit errechnen.

Aus der Summe von vier ausgezählten Großquadraten wurde ein Mittelwert gebildet. Um die Zellzahl pro Volumeneinheit zu berechnen, wird dieser mit einem entsprechenden Faktor (Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe) multipliziert.

Damit war es möglich, die Zellen so zu verdünnen, dass die gewünschte Zelldichte erreicht wurde. Für die MTT-Tests wurde eine Konzentration von  $50 \times 10^3$  Zellen/ml verwendet.

### **2.2.1.2.2 Zellproliferationsmessung**

Zur Bestimmung der Dauer eines Zellzyklus wurden Zellen in unterschiedlicher Dichte auf einer 96-well Platte ausgesät und eine Wachstumsmessung nach 6 verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (0, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden).

### **2.2.1.2.3 Addition von Gemcitabine, 5-FU und den HSP90-Inhibitoren**

Die Zellsuspension wurde auf die gewünschte Anzahl von Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten pipettiert, wobei pro Kavität jeweils 100µl verwendet wurden. Damit bei der späteren Messung eine Subtraktion der Hintergrundabsorption erfolgen konnte, wurde eine Kavität nur mit zellfreiem Nährmedium befüllt.

Anschließend wurden die Platten für 24 Stunden im Wärmeschrank gelagert, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen.

Für 17-AAG, 17-AEP-GA und 17-DMAG wurden Konzentrationen von 0,1µM bis 1µM verwendet, die durch unterschiedlich starkes Verdünnen der HSP90-Inhibitoren mit Nährmedium erreicht wurden.

Gemcitabine und 5-FU wurden in Konzentrationen von 0,05µM bis 5µM genutzt.

Vor Addition der jeweiligen zu testenden Medikamente auf die restlichen Mikrotiterplatten wurde der Nullpunkt ermittelt. Dies ermöglichte das Bestimmen eines Ausgangswerts, damit bei nachfolgenden Messungen ein Wachstum oder eine Reduktion der Zellzahl (als

Hinweis auf einen Fehler im Versuch) in den unbehandelten Kavitäten festgestellt werden konnte.

Anschließend wurde das Medium aus den mit Zellen gefüllten Kavitäten der Mikrotiterplatte abgesaugt und die HSP90-Inhibitoren- beziehungsweise Gemcitabine- oder 5-FU-Mischung in aufsteigenden Konzentrationen hinzugefügt. Eine Reihe wurde nur mit Medium gefüllt und diente als Kontrolle.

Bei dem nicht-wasserlöslichen 17-AAG wurde das für die Kontrolle verwendete Medium zuvor mit 0,5% DMSO versetzt, um auszuschließen, dass die Wachstumsreduktion allein aufgrund der Zytotoxizität des Lösungsmittels erfolgte.

Die Platten wurden bis zum Zeitpunkt der Messung (nach 48, 72 oder 96 Stunden, abhängig von der Zellverdoppelungszeit der einzelnen Zelllinien) im Wärmeschrank belassen.

### **2.2.1.2.4 Messung der Zellviabilität**

Die Geldanamycin-Derivate 17-AAG, 17-AEP-GA und 17-DMAG sowie Gemcitabine wurden hinsichtlich ihrer wachstumshemmenden Wirkung mittels MTT-Test überprüft.

Je 20µl Reagenz (CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay), bestehend aus MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) und PES (phenazine ethosulfate), wurden in jede mit Zellen gefüllte Kavität pipettiert. Eine nur mit 100µl zellfreiem Medium gefüllte Kavität wurde ebenfalls mit 20µl Reagenz versetzt, um später die Hintergrundabsorption subtrahieren zu können. Die zu messende Platte wurde im Anschluss zurück in den Wärmeschrank gelegt. Nach zwei Stunden erfolgte die Absorptionsmessung auf einem *Microplate Reader* bei 490nm. Lebende Zellen reduzieren das Tetrazoliumsalz MTS mit Hilfe des von Dehydrogenase-Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums produzierten NADPH/NADH zu dem wasserunlöslichen violetten Formazan. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs, dessen Absorptionsspitze bei 490nm liegt, korreliert daher mit der Glykolyserate der Zellen.

### **2.2.1.2.5 Statistische Analyse**

Mit dem Programm Mikro Win 2000 wurden am Microplate Reader die Werte des MTT-Tests ermittelt.

Aus je vier Kavitäten mit gleicher Medikamentenkonzentration wurde ein Mittelwert errechnet, um Pipettierfehler auszugleichen. Der Leerwert (die nur mit Medium gefüllte Kavität) wurde von den restlichen Beträgen subtrahiert, um eine durch chemische

Interferenz von Bestandteilen des Nährmediums erzeugte Hintergrundabsorption zu korrigieren.

Die so erhaltenen absoluten Werte sind direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Durch eine multifaktorielle Varianzanalyse wurde die statistische Signifikanz der Ergebnisse bewiesen, wobei die Einflüsse der Medikamente, der Konzentration und der Messung berücksichtigt wurden.

Zudem wurde die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) mit dem Rechenprogramm „R“ berechnet.

Für jede Zelllinie, jeden Messzeitpunkt und jedes Medikament wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten.

### **2.2.2 Proteinquantifizierung**

#### **2.2.2.1 Vorbehandlung der Zellen**

Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $0,4 \times 10^6$ /ml in Zellkulturschalen mit 5cm Durchmesser pipettiert. Nach 24 Stunden wurde die Konfluenz der Zellen überprüft und die jeweiligen Inhibitoren hinzugefügt:

- Unbehandeltes Nährmedium als Nullprobe
- 17-AAG (in den Konzentrationen  $1\mu\text{M}$  und  $5\mu\text{M}$ ),
- 17-DMAG (in den Konzentrationen  $1\mu\text{M}$  und  $5\mu\text{M}$ ),
- Gemcitabine (in den Konzentrationen  $1\mu\text{M}$  und  $10\mu\text{M}$ ),
- sowie eine Kombination aus 17-DMAG und Gemcitabine  
(jeweils  $1\mu\text{M}$  17-DMAG versetzt mit  $1\mu\text{M}$  bzw.  $10\mu\text{M}$  Gemcitabine).

Die Zellen wurden für weitere 48 Stunden im Wärmeschrank belassen.

#### **2.2.2.2 Zellvereinzellung**

Nach Absaugen des Nährmediums wurden die Zellen zweimalig mit je 2ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. PBS ist eine balancierte Salz-Lösung, die zum Spülen oder Verdünnen verwendet wird und dabei die Aufrechterhaltung der intra- und extrazellulären osmotischen Balance ermöglicht.

Anschließend wurde 1ml EDTA Versen hinzugegeben und die Zellkulturschale 5-10 Minuten auf Eis inkubiert. Mit Hilfe von EDTA können einzelne Zellen aus einem Zellverbund isoliert werden, indem die Gewebematrix schonend aufgelöst wird.

Nachfolgend wurden die Zellen mit dem Zellschaber mechanisch gelöst und die so entstandene Zellsuspension in 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert. Diese lagerten auf Eis, bis alle Kulturschalen bearbeitet waren.

Nach Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm für 5 Minuten konnte der Überstand aus den Reaktionsgefäßen abgesaugt werden. Das darin verbleibende Zellpellet wurde in Stickstoff gefroren.

### **2.2.2.3 Zellyse**

In jedes Reaktionsgefäß wurde 100µl Puffer (Herstellung siehe 2.1.4) gegeben, zusammengesetzt aus Proteaseinhibitoren, Benzonase und Zellysis-Puffer.

Durch die Proteaseinhibitoren konnte eine Lyse der Zellen mit gleichzeitigem Schutz der extrahierten Proteine vor verschiedenen Proteasen erzielt werden. Die Benzonase ist eine Endonuklease, die spezifisch Nukleinsäuren verdaut, sodass eine Entfernung von DNA und RNA aus den Proben erreicht wurde. Der Zellysis-Puffer sorgte dafür, dass die Lyse unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgte.

Die Reaktionsgefäße wurden sorgfältig gemischt und 20 Minuten auf Eis gelagert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 8000 rpm wurde der dabei entstandene, Protein enthaltende Überstand in neue Reaktionsgefäße pipettiert. Bis sie benötigt wurden, konnten die so erhaltenen Proteinlysate bei -80°C gelagert werden. Der abgesetzte Rückstand in den Reaktionsgefäßen stellt Überreste der Zellmembranen dar und wurde verworfen.

### **2.2.2.4 Messung der Proteinkonzentration**

Die quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Reaktion nutzt die Biuret-Reaktion kombiniert mit einer Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure)-Reaktion zum kolorimetrischen Proteinnachweis.

In alkalischen wässrigen Lösungen erfolgt eine durch Peptide verursachte Reduktion des  $\text{Cu}^{2+}$ -Ions zu  $\text{Cu}^{1+}$  mit anschließender Bildung eines grünlich gefärbten Chelatkomplexes aus Peptiden und  $\text{Cu}^{1+}$  (Biuret-Reaktion). Bicinchoninsäure (BCA) verdrängt die schwach gebundenen Peptide aus dem Chelatkomplex mit dem reduzierten  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion und bildet selbst eine Komplexverbindung mit dem Kupfer, die einen Farbumschlag ins Violette erzeugt und eine starke lineare Absorption bei 562nm mit steigenden Proteinkonzentrationen zeigt. Die Absorption kann auch bei jeder anderen Wellenlänge zwischen 550nm und 570nm mit nur minimalem Signalverlust detektiert werden.

Im Gegensatz zu anderen quantitativen Methoden zur Proteinmessung ist die BCA-Methode auch in Proben möglich, die bis zu 5% Lösungsmittel enthalten.

Es wurden Proteinstandards mit Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 125µg/ml bis 2000µg/ml nach Herstelleranweisung (Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit) vorbereitet und 25µl jeder Konzentration in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte pipettiert. 25µl einer Suspension aus 6µl von jeder Proteinprobe und 54µl destilliertem Wasser wurden ebenfalls in je eine Kavität der Mikrotiterplatte gefüllt.

Das BCA-Reagenz bestand aus zwei Bestandteilen, die im Verhältnis 50:1 gemischt wurden.

Zu jeder mit Probe oder Standard befüllten Kavität wurden 200µl Reagenz hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption im *Microplate Reader* bei 562nm. Je nach Proteinmenge zeigte sich ein mehr oder weniger stark ausgeprägter Farbumschlag von grün zu violett. Mit Hilfe der Standards konnte die Proteinmenge mit dem Absorptionswert korreliert und anhand einer aus den Standards erstellten Geraden der jeweilige Proteinbetrag in den verschiedenen Proben errechnet werden. Somit konnte das für die SDS-PAGE (= sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis) erforderliche, jeweils 30µg Protein enthaltende Volumen der unterschiedlichen Proben kalkuliert werden.

### **2.2.3 Protein-Gelelektrophorese**

Eine Gelelektrophorese dient der Auftrennung von geladenen Partikeln nach Größe und Ladung im elektrischen Feld. Die Matrix des Gels besteht aus Agarose oder, wie in dieser Arbeit, aus polymerisiertem Acrylamid, welches ein engmaschiges Netz bildet, durch dessen Poren die aufzutrennende Substanz wandert.

Die hier verwendete SDS-PAGE ist eine Variante der Gelelektrophorese, bei der Proteine lediglich nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

#### **2.2.3.1 Probenvorbereitung**

Das jeweils 30µg Protein enthaltende Volumen der Proteinlysate-Proben wurde in 0,5ml Reaktionsgefäße pipettiert.

Um während der Elektrophorese nach Größe aufgetrennt werden zu können, müssen die Proteine in ihrer Primärstruktur vorliegen. Zu diesem Zweck wurde jedes Röhrchen mit

Laemmli Puffer, bestehend aus Beta-2-Mercaptoethanol, Sodiumdodecylsulfat (SDS), Bromphenolblau und Glycerol, im Verhältnis Probe:Puffer = 1:1 versetzt und 5 Minuten lang bei 99°C gemischt.

Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert.

Beta-2-Mercaptoethanol ist eine reduzierende Thiolverbindung, die eine irreversible Spaltung der Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten, welche die Tertiärstruktur des Proteins stabilisieren, bewirkt.

SDS führt zu einer Denaturierung der Proteine. Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur werden durch Spaltung von Wasserstoffbrücken aufgelöst. Anschließend lagern sich SDS-Ionen an das Protein, was in der Ausbildung von Protein-SDS-Komplexen resultiert, die eine konstante Ladung pro Masse aufweisen. Da nun alle Proteine negativ geladen sind, wandern sie durch das Polyacrylamid-Netz zur positiv geladenen Elektrode. Sie erfahren demnach alle dieselbe Beschleunigung, werden jedoch durch die Poren des Gels größenabhängig gebremst. Somit erfolgt die Auftrennung lediglich nach Molekülradius und nicht mehr in Abhängigkeit von der Ladung.

Ein Anfärben der Proben mit Bromphenolblau erleichtert das Befüllen der Taschen und lässt während der Elektrophorese die bereits zurückgelegte Distanz erkennen. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes wandert es ganz vorn und zeigt somit die Lauffront an.

Durch Glycerol wird eine Gewichtszunahme der Proben erreicht, die dadurch beim Einfüllen zum Boden der Taschen sinken und nicht in den Puffer diffundieren.

Pro Gel wurde ein Reaktionsgefäß mit 7µl Proteinstandard als molekularer Marker vorbereitet.

### **2.2.3.2 SDS-PAGE**

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden Gele aus Acrylamid, N,N'-methylbisacrylamid, Ammoniumperoxidsulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) hergestellt (siehe 2.1.4). Die Addition von TEMED löst eine radikalische Reaktion aus, bei der ein vernetztes Polymer gebildet wird, dessen Vernetzungsgrad und damit die Porengröße von der jeweiligen Acrylamid-Konzentration abhängt.

Als Sammelgel wurde ein 5%iges Acrylamid-Gel mit Sammelgelpuffer (pH=6,8) verwendet. Das Trenngel enthielt 12% Acrylamid und einen höher konzentrierten Puffer (pH=8,8).

Aufgrund der verschiedenen pH-Werte der verwendeten Puffer und der unterschiedlichen Porengröße von Sammel- und Trenngel wird diese Methode als diskontinuierlich

bezeichnet. Ein großer Vorteil der diskontinuierlichen Gelelektrophorese ist das Resultat von schärferen Banden.

Zuerst wurde das 12%ige Gel zwischen die Glasplatten gegossen. Um eine ebene Oberfläche zu erhalten, wurde es direkt nach dem Einfüllen mit Isopropanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisierung und Abgießen des Isopropanols erfolgte das Auffüllen des verbleibenden Platzes mit 5%igem Gel. Um Taschen zum Einfüllen der einzelnen Proben zu erzeugen wurden Plastikämme eingesetzt.

Nach dem Auspolymerisieren konnten die Gele in feuchte Tücher eingeschlagen im Kühlschrank bei +4°C für einige Tage gelagert oder direkt weiterverwendet werden.

Um die Gele mit den Proben zu beladen, wurden die Ämme entfernt und die Taschen anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen.

Die Gele wurden in die Elektrophorese-Kammern eingesetzt und letztere mit Laufpuffer aufgefüllt (Herstellung siehe 2.1.4). Anschließend wurden die vorbereiteten Proben mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen der Gele überführt. Der molekulare Marker wurde jeweils in eine Tasche pro Gel appliziert. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung von 100 Volt erfolgte die Auftrennung der Proteine ungefähr zwei Stunden lang, bis die Lauffront am Ende des Gels angekommen war.

Das Sammelgel erzielt die Bildung von schärferen Banden der Proteinproben vor Eintreten in das Trenngel. Dazu wird ein als Isotachophorese bekanntes Phänomen genutzt. Durch den niedrigeren Acrylamid-Gehalt ist das Sammelgel großporig, sodass sich die Proteine relativ frei im elektrischen Feld bewegen können. Die scharfen Banden entstehen aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit von Glycin und Chlorid-Ionen. Glycin wandert langsamer als die Protein-SDS-Komplexe, die ihrerseits wiederum langsamer als die Chlorid-Ionen wandern. Daher bilden sich Proteinstapel infolge der Potentialdifferenz zwischen den Lauffronten der beiden im Puffer enthaltenen Ionen aus, die alle mit der gleichen Geschwindigkeit wandern.

Bei Erreichen des Trenngels ändert sich der pH-Wert und die Porengröße des Polyacrylamid-Netzes verfeinert sich. Die Proteine sammeln sich aufgrund des erhöhten Widerstandes zunächst am Übergang zwischen den Gelen, um dann beim Durchwandern des Trenngels nach Molekulargewicht separiert zu werden. Durch den veränderten pH-Wert wird das Glycin ionisiert und seine Wanderungsgeschwindigkeit nimmt zu. Somit löst sich die zwischen Glycinat und Chlorid entstandene Potentialdifferenz auf und die Proteine beginnen, sich nach ihrer Größe zu trennen. Dabei wandern kleine Proteine schneller als große.

Der Marker erzeugt Banden von bekanntem Molekulargewicht, die farbig sichtbar werden und mit deren Hilfe die aufgetrennten Proteine, deren Molekulargewicht bekannt ist, identifiziert werden können.

### **2.2.4 Transfer von immobilisierten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)**

Der Western Blot ermöglicht eine Fixierung der nach Größe aufgetrennten Polypeptide auf einer Nitrozellulosemembran zum anschließenden Nachweis spezifischer Proteine mittels fluoreszierenden Antikörpern.

#### **2.2.4.1 Vorbereitung der Gele**

Die Gele wurden aus den Glasplatten gelöst und für 10 Minuten in Transferpuffer (Herstellung siehe 2.1.4) eingelegt, ebenso wie das Filterpapier und die Nitrozellulosemembranen.

#### **2.2.4.2 Transfer**

Im Transferapparat wurden je eine Membran und ein Gel zwischen Filterpapier platziert. Nach Befeuchten mit Transferpuffer wurden Luftbläschen zwischen den Schichten mit einer Pipette ausgerollt.

Der Transfer fand 10 Minuten bei 10 Volt und 1 Stunde 30 Minuten bei 20 Volt statt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes, das senkrecht zum Gel steht, migrieren die Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran, wo sie durch Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken immobilisiert werden und dort für die Immundetektion mittels spezifischer Antikörper verfügbar sind.

Der erfolgreiche und gleichmäßige Transfer wurde überprüft, indem die Proteinbanden mit Ponceau S (3-Hydroxy-4-((2-sulfo-4-((4-sulfophenyl)azo)phenyl)azo)-2,7-naphthalindisulfonsäure) angefärbt wurden. Der rote Azofarbstoff bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine und kann im Anschluss leicht mit TBS+0,1% tween wieder ausgewaschen werden.

#### **2.2.4.3 Blocken der Membranen**

Um eine unspezifische Interferenz der Membran mit dem Antikörper zu vermeiden, wurden die Membranen zwei Stunden lang mit 5%iger fettfreier Milch (Herstellung siehe 2.1.4) geblockt. Verbleibende unbesetzte Proteinbindungsstellen auf der Membran werden

hierbei von dem in der Milch enthaltenen Protein gebunden, sodass der Antikörper nur an seinem Zielprotein und nicht unspezifisch an der Membran binden kann. Somit wird ein störendes Hintergrundsignal minimiert, was präzisere Ergebnisse ermöglicht.

### **2.2.5 Immunologischer Proteinnachweis**

#### **2.2.5.1 Applikation der Antikörper**

Zur Detektion der gesuchten Proteine wurden die jeweiligen primären Antikörper in einer Lösung aus 2,5%iger Milch auf die Membranen appliziert und inkubierten unter Schütteln über Nacht bei 4°C.

Anschließend wurde nicht gebundener Primärantikörper durch Waschen mit TBS+0,1%tween (Herstellung siehe 2.1.4) entfernt und der sekundäre Antikörper im Verhältnis 1:20 000 auf die Membran gegeben. Dieser ist gegen den Fc-Bereich des Primärantikörpers gerichtet und selbst an ein Enzym (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt, das Lumineszenz produzieren kann. Je nachdem, welcher Primärantikörper verwendet wurde, war der Sekundärantikörper entweder gegen Maus- oder Kaninchen-IgG gerichtet. Nach zwei Stunden wurde überschüssiger Antikörper erneut abgewaschen und ein chemolumineszentes Substrat (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate) auf die Membranen gegeben. Dieses konnte an die Meerrettich-Peroxidase binden, die ihrerseits an den Sekundärantikörper konjugiert war, sodass Chemolumineszenz erzeugt wurde. Das Substrat wurde eine Minute lang auf den Membranen belassen und anschließend entfernt.

#### **2.2.5.2 Detektion**

In der Dunkelkammer wurde der Röntgenfilm auf die in Plastikfolie eingeschlagenen Membranen gelegt und anschließend entwickelt. Die Belichtungszeit des Films variierte in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern stark und musste an die jeweilige Intensität der Lumineszenzemission angepasst werden. In den meisten Fällen wurde zuerst eine Expositionszeit von einer Minute gewählt und nach dem Entwickeln die Qualität des Films beurteilt. Je nach Stärke des Signals wurde entschieden, ob die Exposition verkürzt oder verlängert werden musste.

Nach Entwicklung des Films wurde der Proteinmarker übertragen. Somit konnten die Proteinbanden einem spezifischen Gewicht zugeordnet werden.

Mit einem Antikörper gegen Aktin, einem Strukturprotein, wurde eine Ladekontrolle durchgeführt. Als Bestandteil des Zytoskeletts in allen eukaryotischen Zellen sollte die

Menge an Aktin zwischen den unterschiedlichen Proben nicht variieren. Ein gleichmäßiges Aktin-Signal zeigte somit, dass identische Mengen an Protein aufgetrennt und analysiert worden waren.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellproliferationsmessung

#### 3.1.1 Zellverdoppelungszeit

Aufgrund ihres Wirkmechanismus mit Angriffspunkt von Gemcitabine und 5-FU während der DNA-Replikation beziehungsweise von den HSP90-Inhibitoren bei der posttranslationalen Faltung von Proteinen können die in dieser Arbeit verwendeten Medikamente nur bei proliferierenden Zellen angreifen.

Um einen optimalen antiproliferativen Effekt zu erzielen und jede der nicht synchronisiert wachsenden Zellen zu erreichen, sollte die Expositionszeit der Medikamente mindestens der Dauer eines Zellzyklus entsprechen.

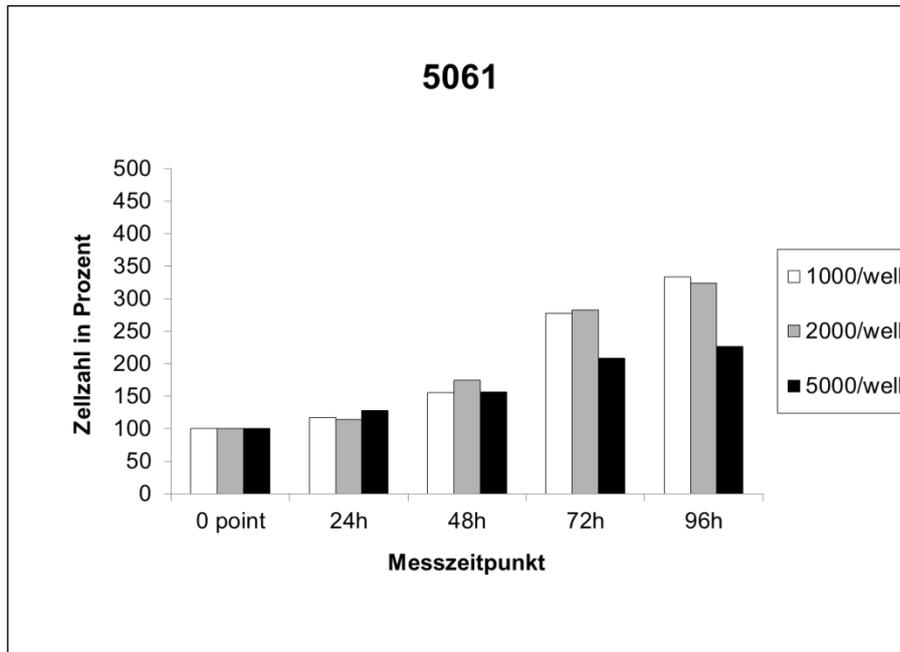
In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden unterschiedlich schnell proliferierende Zellen beobachtet (Abb.18).

Die Zelllinien 5061 und 5072 wiesen eine Duplikationszeit zwischen 72 und 96 Stunden auf, sodass eine Einwirkzeit der Medikamente von 96 Stunden gewählt wurde.

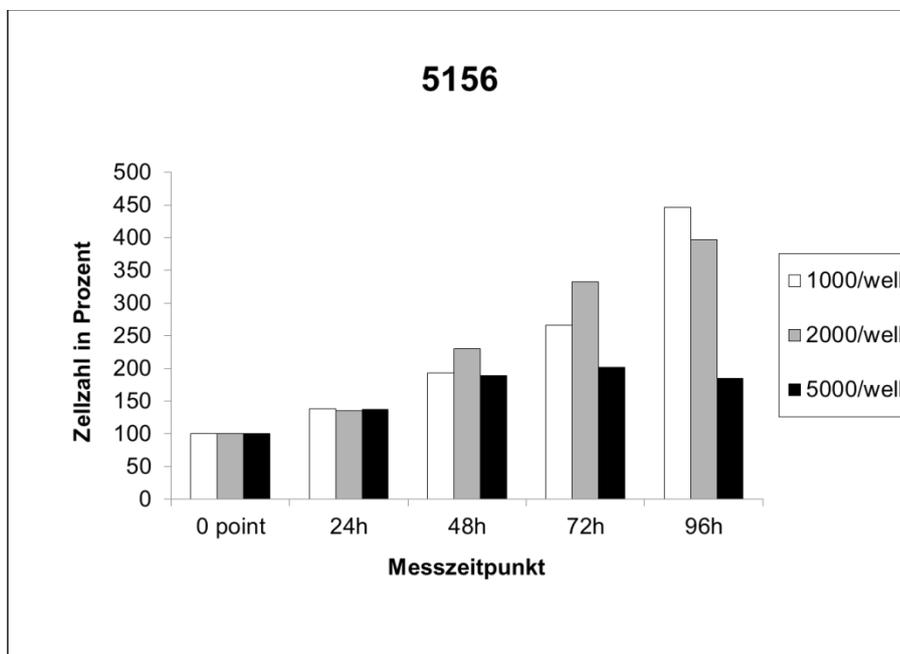
Die Zelllinien 5156 und L.3.6pl verdoppelten sich nach 48 bis 72 Stunden. Daher wurde eine Expositionszeit von 72 Stunden festgelegt.

Da das optimale Zellwachstum auch von der Zellkonzentration abhängt und es sowohl durch eine zu geringe als auch eine zu hohe Zelldichte zum spontanen Zelltod kommen kann, wurden Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Hier zeigte sich das beste Wachstum bei 1000-2000 Zellen pro Kavität, entsprechend einer Zellkonzentration von  $10\text{-}20 \times 10^3/\text{ml}$  (Abb.18). Aufgrund der in unseren Versuchen erwarteten Wachstumshemmung nach Addition der Medikamente wurde letztendlich eine Zellkonzentration von  $50 \times 10^3/\text{ml}$  ausgewählt.

a)



b)



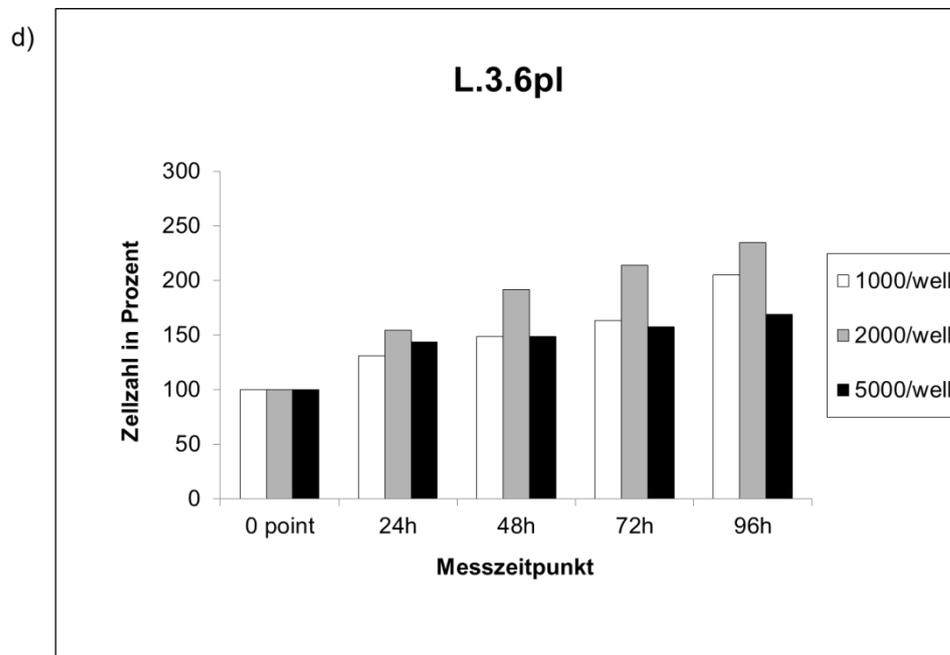
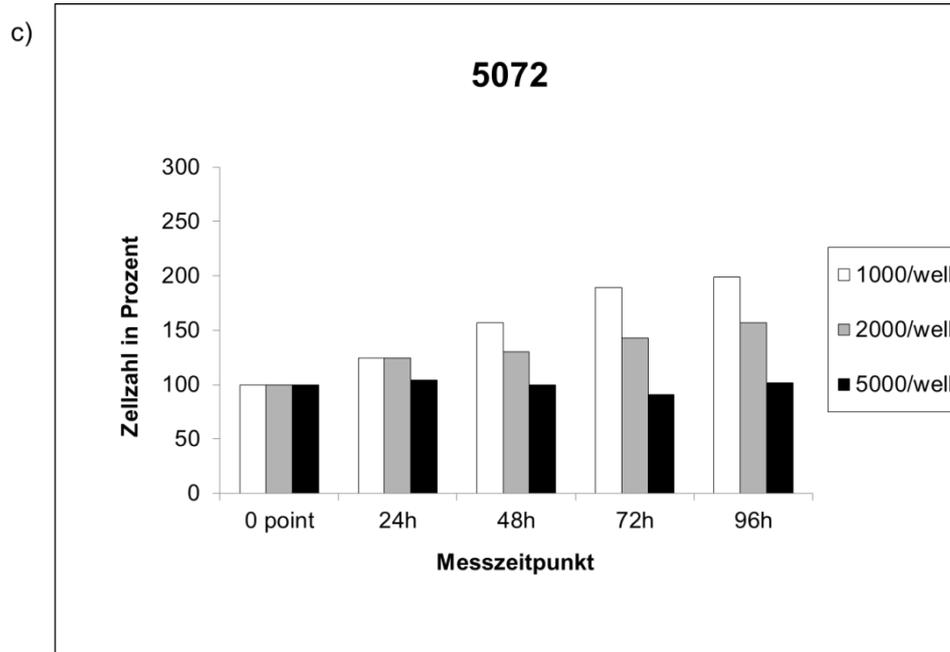


Abb.18: Prozentualer Anteil an vitalen Zellen der Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl gemessen nach 24, 48, 72 und 96 Stunden bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen von 1000/Kavität, 2000/Kavität und 5000/Kavität

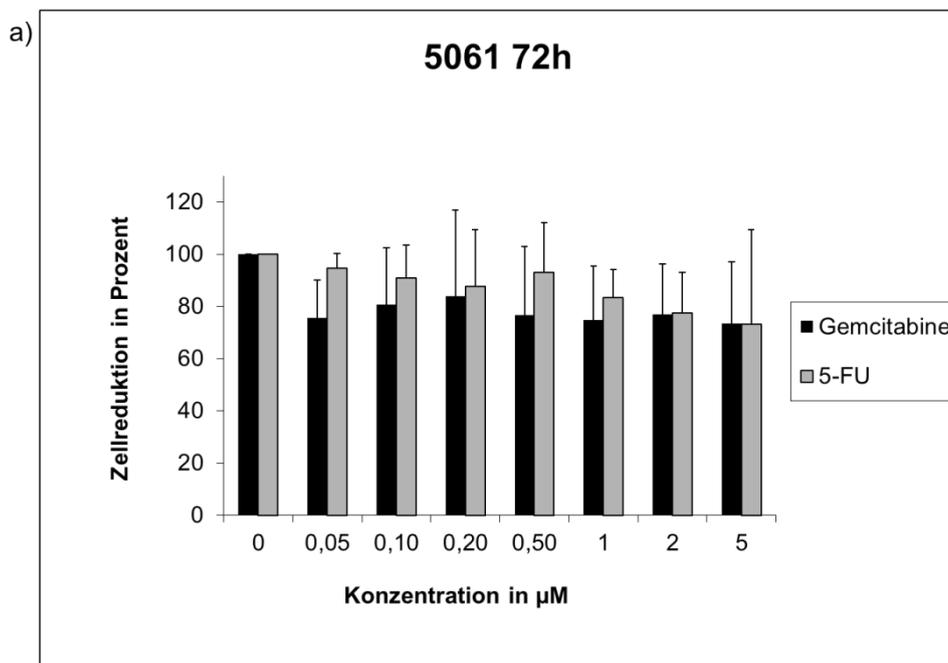
### 3.1.2 Zellproliferationshemmung durch Gemcitabine und 5-Fluorouracil

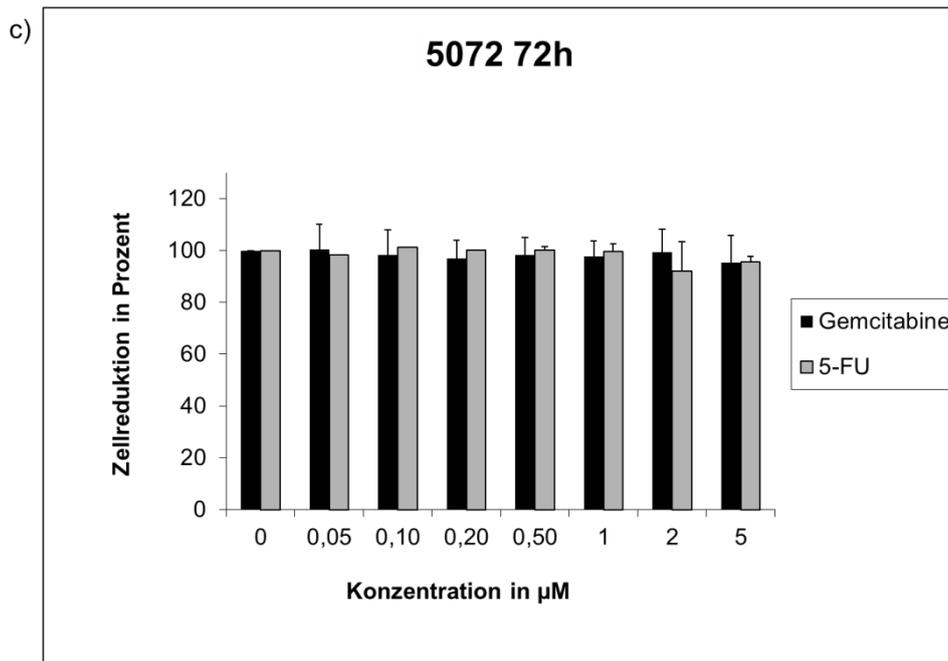
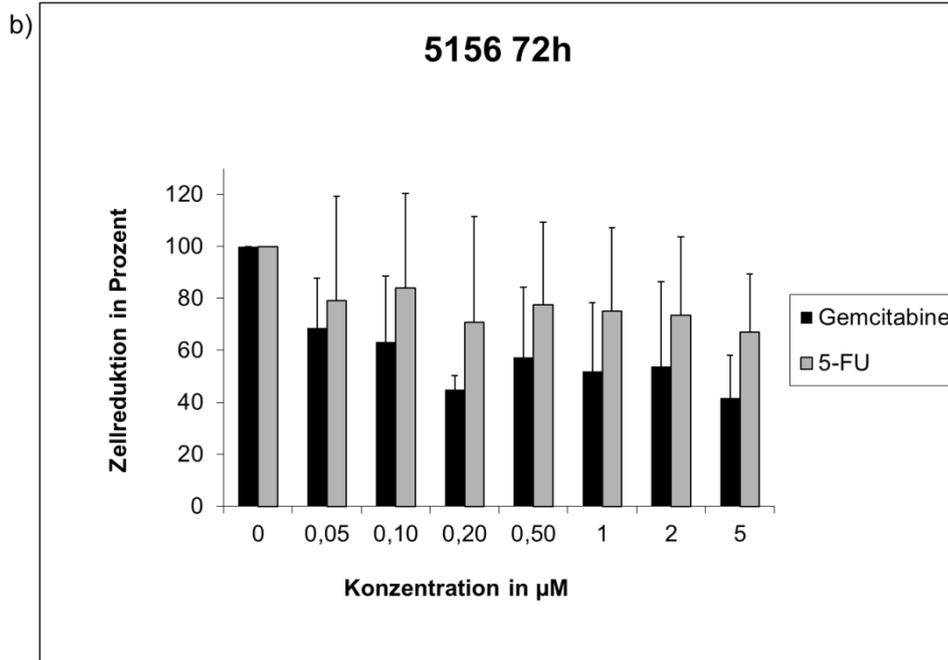
Die vier Zelllinien reagierten mit unterschiedlicher Sensitivität auf eine Behandlung mit Gemcitabine und 5-FU (Abb.19).

Die Zelllinien 5061 und insbesondere 5072 waren nahezu vollständig resistent gegen beide Chemotherapeutika, sodass selbst bei Verabreichung von hohen Dosierungen der Medikamente keine relevante Wachstumshemmung der Zellen erreicht werden konnte (Abb.19a und 19c).

5156 dagegen reagierte empfindlicher auf die Exposition mit Gemcitabine. Der  $IC_{50}$  lag bei  $0,2\mu M$ , allerdings erfolgte auch bei weiterer Dosissteigerung keine stärkere Reduktion des Zellwachstums. Im Gegensatz dazu konnte jedoch nach Behandlung mit 5-FU auch in hohen Dosen lediglich eine Zellreduktion auf maximal 70% erzielt werden (Abb.19b).

Einzig bei L.3.6pl zeigte Gemcitabine einen hohen antiproliferativen Effekt. Die Zelllinie wurde bereits bei einer Dosis von  $0,05\mu M$  auf 20% der ursprünglichen Zellzahl vermindert. Weniger empfindlich reagierte die Zelllinie jedoch auf eine Behandlung mit 5-FU, bei der selbst bei einer Konzentration von  $5\mu M$  keine 50%ige Wachstumshemmung erreicht werden konnte (Abb.19d).





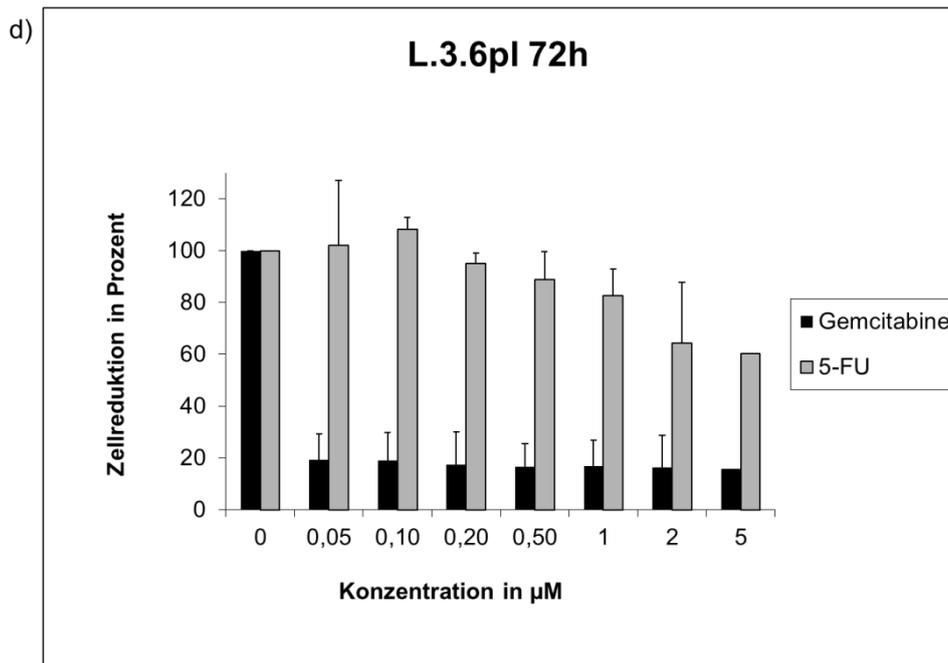
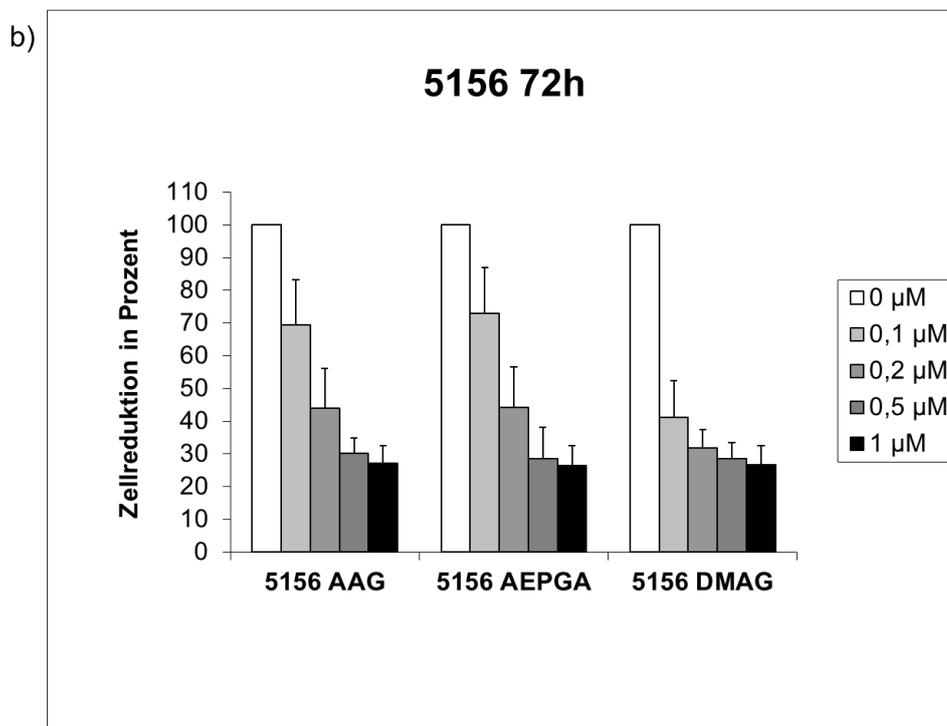
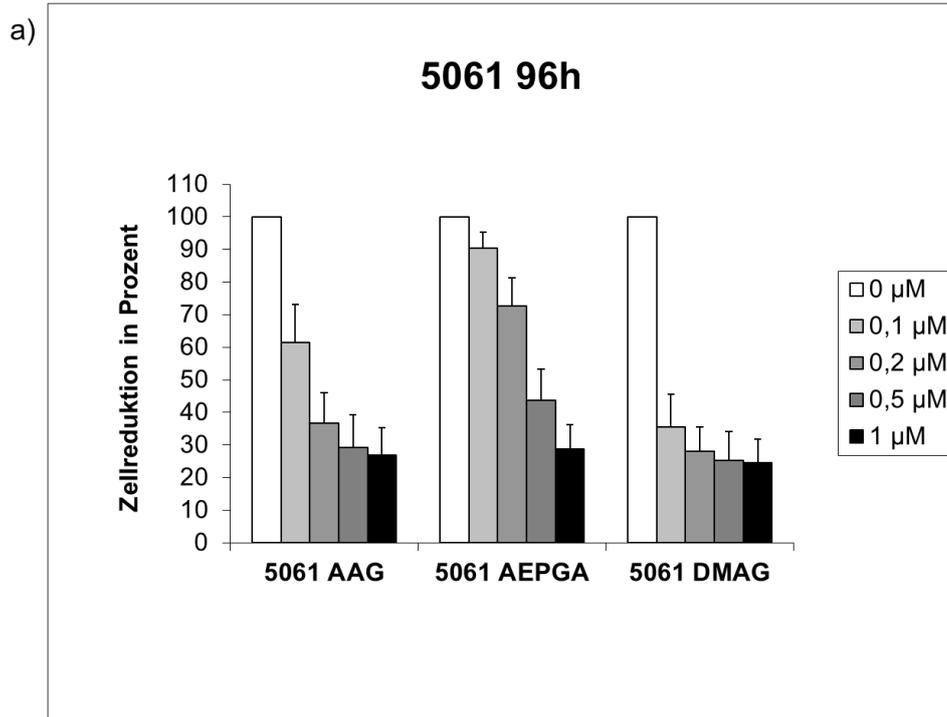


Abb.19: Prozentuale Reduktion der Zellzahl der Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl 72 Stunden nach Exposition mit Gemcitabine bzw. 5-FU in Konzentrationen von 0,05 $\mu\text{M}$  bis 5 $\mu\text{M}$

### 3.1.3 Zellproliferationshemmung durch HSP90-Inhibition

Es konnte eine hochsignifikante Hemmung des Zellwachstums durch die in dieser Arbeit verwendeten Geldanamycin-Derivate in allen Zelllinien in Abhängigkeit von Dosis und Zeit gezeigt werden. Zudem wurde eine annähernd gleich starke Wirksamkeit der HSP90-Inhibitoren in den verschiedenen Zelllinien beobachtet.

Um eine 50%ige Wachstumshemmung zu erreichen, genügte zumeist eine Wirkstoffkonzentration von 0,2 $\mu\text{M}$  (Abb.20).



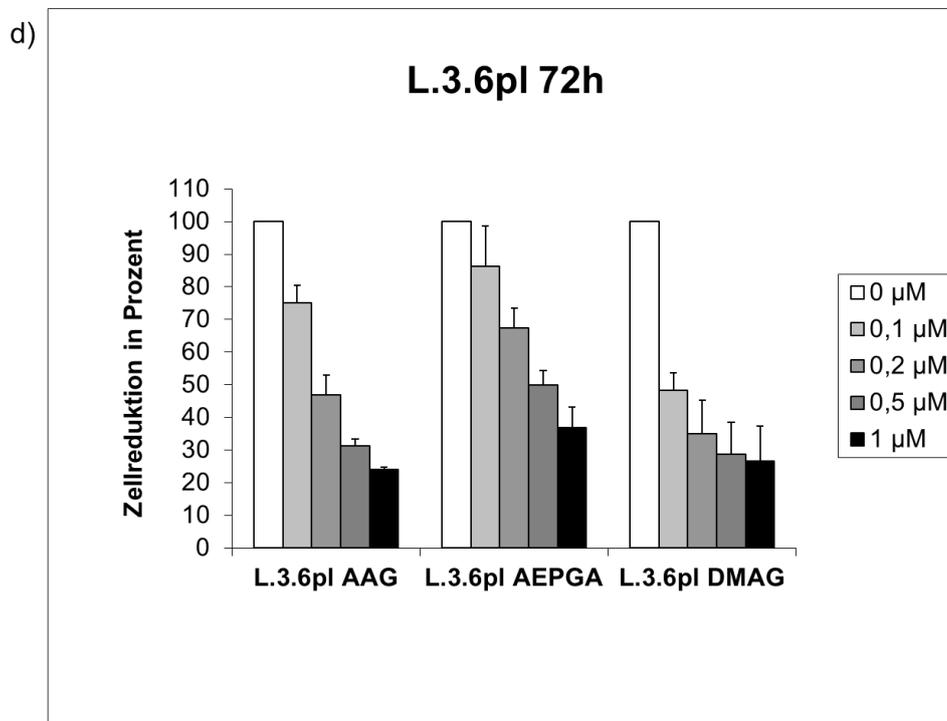
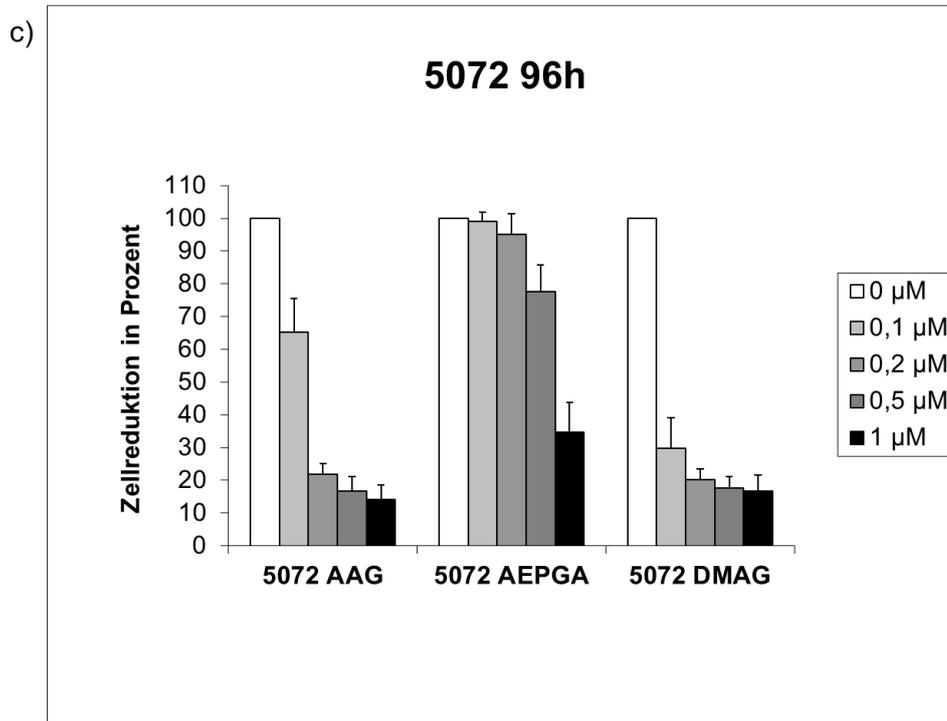
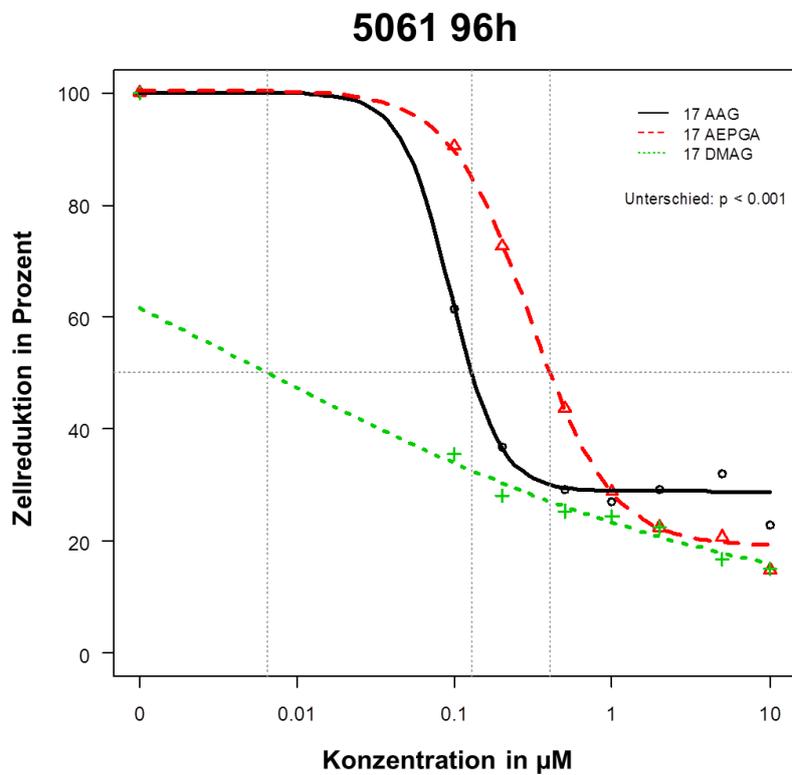


Abb.20: Prozentualer Anteil vitaler Zellen der Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl 72 bzw. 96 Stunden nach Applikation von 17-AAG, 17-AEP-GA und 17-DMAG in Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{M}$  bis 1 $\mu\text{M}$

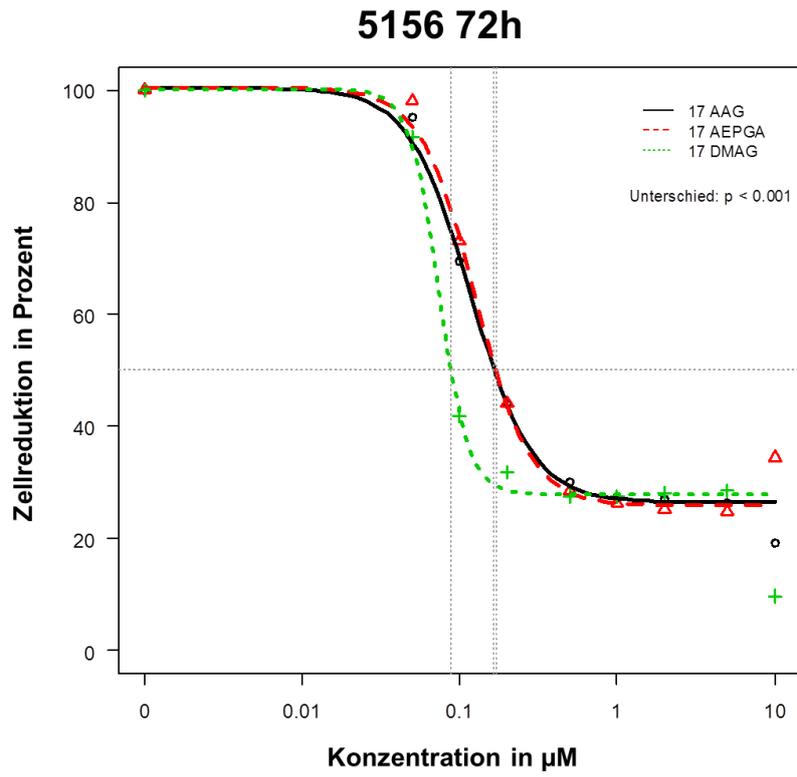
Geringfügige, nicht-signifikante Wirkungsunterschiede konnten zwischen den verschiedenen HSP90-Inhibitoren festgestellt werden. So zeigte sich das wasserlösliche 17-DMAG effizienter als 17-AAG. 17-AEP-GA benötigte insgesamt höhere Dosen, um einen antiproliferativen Effekt zu entfalten.

Der  $IC_{50}$  aller drei Medikamente nach 72 bzw. 96 Stunden lag unter  $1\mu\text{M}$ , bei 17-DMAG lag der  $IC_{50}$  sogar unter  $0,1\mu\text{M}$  (Abb.21).

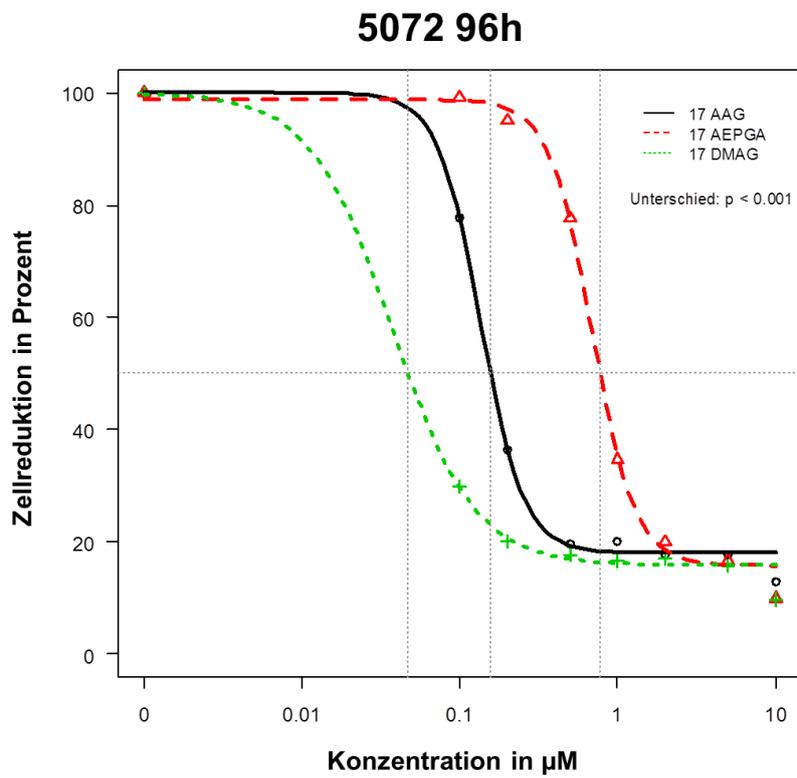
a)



b)



c)



d)

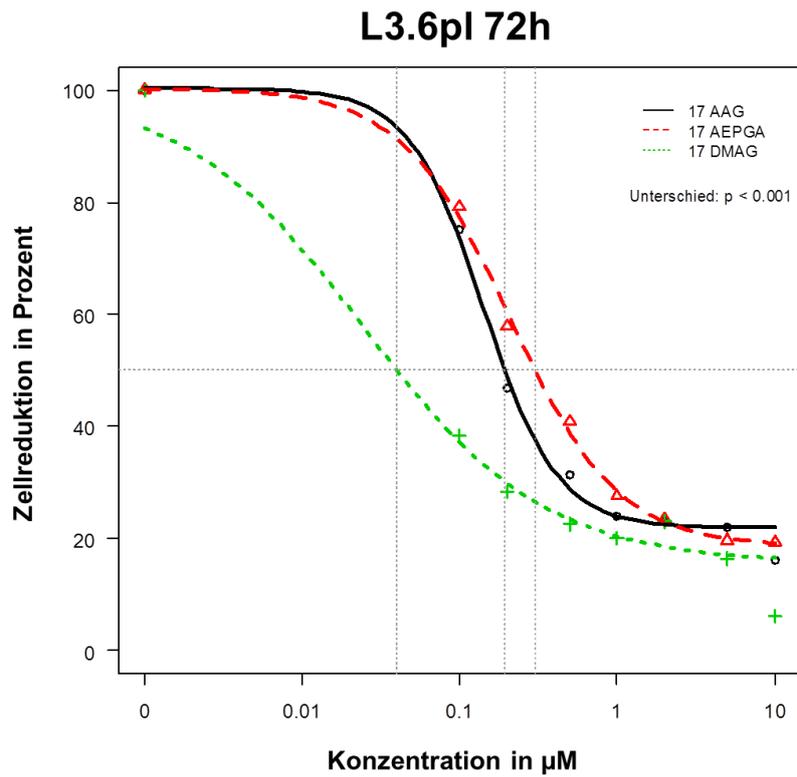


Abb.21:  $IC_{50}$  der Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L3.6pl nach Applikation von 17-AAG, 17-AEP-GA und 17-DMAG in Konzentrationen von  $0,1\mu\text{M}$  bis  $10\mu\text{M}$  für 72 bzw. 96 Stunden.

## **3.2 Effekt auf Zielproteine von HSP90**

Nach Exposition mit Gemcitabine beziehungsweise den HSP90-Inhibitoren erfolgte eine Analyse quantitativer Veränderungen der Expression unterschiedlicher Client Proteine von HSP90, darunter Wachstumsfaktorrezeptoren und Kinasen, einige wichtige Vertreter aus der Familie der Hitzeschockproteine sowie Effektorproteine der Apoptose.

### **3.2.1 Tyrosinkinase-rezeptoren**

Die Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR und IGF-1R $\beta$  werden in den meisten Tumoren verstärkt exprimiert oder liegen in mutierter Form vor, was sowohl ein unkontrolliertes Zellwachstum als auch eine Umgehung der Apoptose fördert.

In den in dieser Arbeit verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden EGFR und IGF-1R $\beta$  in unbehandelten Zellen ebenfalls überexprimiert (Abb.22).

Nach Exposition mit den unterschiedlichen HSP90-Inhibitoren wurde in allen Zelllinien eine starke, hochsignifikante Reduktion der Tyrosinkinase-rezeptoren demonstriert.

Dieser Effekt konnte am eindrucksvollsten bei den Zelllinien 5061 und 5072 gezeigt werden, bei denen nach Inkubation mit 17-AAG und 17-DMAG beide Rezeptoren nicht mehr detektierbar waren. Eine Behandlung mit Gemcitabine bewirkte bei 5061 eher eine Hochregulation der Wachstumsfaktorrezeptoren, bei 5072 war keine Veränderung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu erkennen. Die Kombination von 17-DMAG mit Gemcitabine führte, wie auch die Behandlung mit 17-DMAG alleine, zu einer starken Reduktion der Expression von IGF-1R $\beta$  und EGFR, sodass beide Wachstumsfaktorrezeptoren nicht mehr nachweisbar waren (Abb.22a und 22c).

Bei der Zelllinie 5156 wurde eine komplette Degradation von IGF-1R $\beta$  nach Behandlung mit 17-AAG und 17-DMAG erreicht. EGFR wurde nach Exposition mit den HSP90-Inhibitoren etwas weniger stark herunterreguliert. Gemcitabine führte zu einer vermehrten Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren. Eine Kombination von Gemcitabine mit 17-DMAG erzielte ähnliche Resultate wie die Behandlung mit den Geldanamycinderivaten als single agent (Abb.22b).

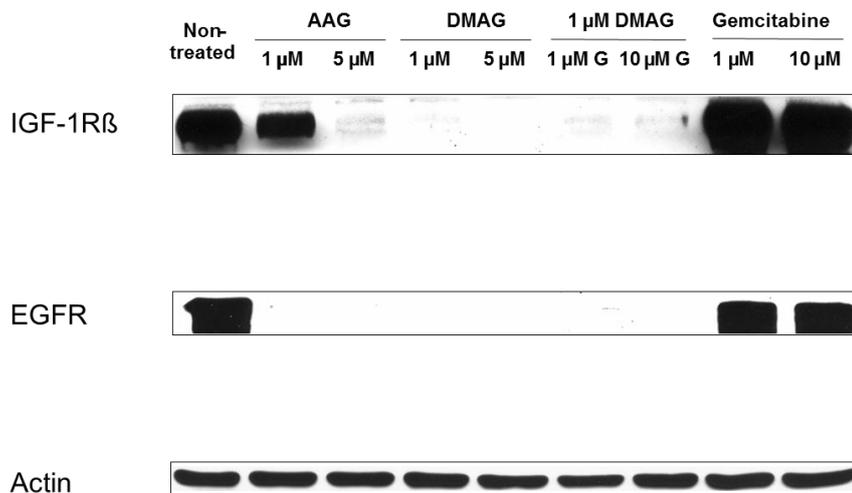
In der Zelllinie L.3.6pl konnte ein dosisabhängiger Abbau der Rezeptoren nach Inkubation mit den HSP90-Hemmern festgestellt werden. Eine komplette Degradation der Rezeptoren fand erst bei 5 $\mu$ M statt, jedoch führte auch eine geringere Konzentration von 1 $\mu$ M zu einer deutlich verminderten Expression von IGF-1R $\beta$  und EGFR. Zudem wurde eine geringfügig bessere Wirksamkeit von 17-DMAG gegenüber 17-AAG bemerkt. Die Behandlung mit

Gemcitabine führte, wie auch bei 5072, zu einer Hochregulation der Tyrosinkinase Rezeptoren. Eine Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine bewirkte ebenfalls eine Herunterregulierung der Rezeptoren, jedoch in geringerem Ausmaß als eine Behandlung mit 17-DMAG alleine (Abb.22d).

In allen Zelllinien konnte gleichermaßen gezeigt werden, dass 17-AAG und 17-DMAG in Konzentrationen von 1µM und 5µM zu einer starken Reduktion der Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren IGF-1Rβ und EGFR führten. Eine Behandlung der Zellen mit Gemcitabine bewirkte meist eine leicht verstärkte Expression. Die Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine erzielte ähnliche Resultate wie 17-DMAG als alleiniger Wirkstoff.

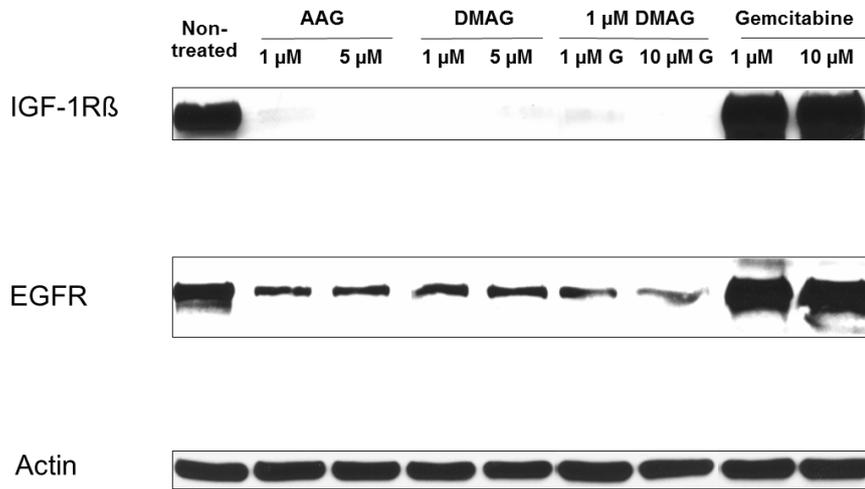
a)

**5061**



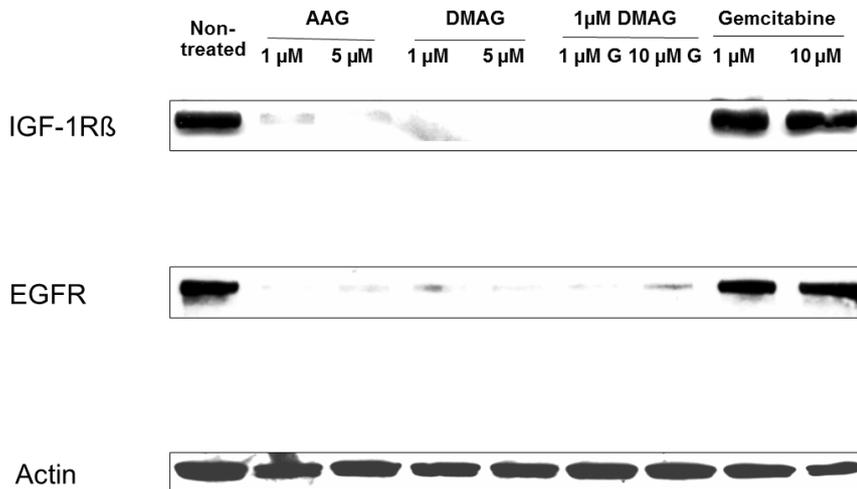
b)

**5156**



c)

**5072**



d)

**L3.6pl**

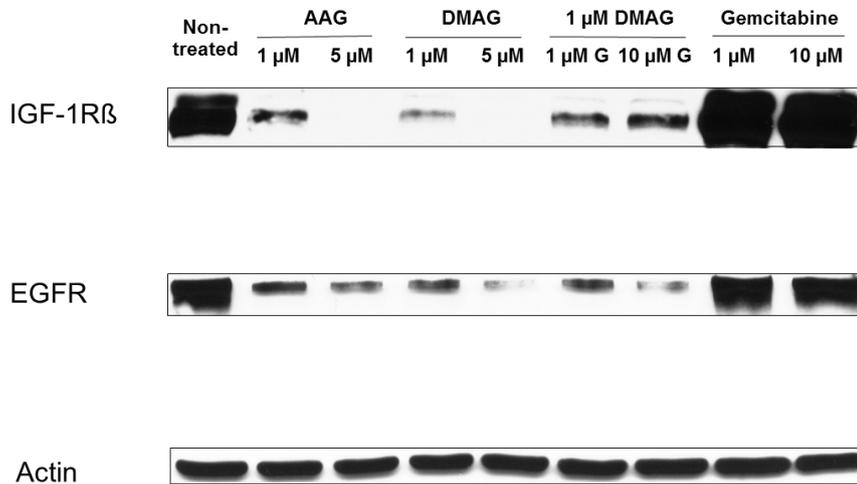


Abb.22: Veränderung der Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR und IGF-1Rβ in den Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L3.6pl nach Inkubation mit 17-AAG, 17-DMAG, einer Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine sowie Gemcitabine für 48 Stunden

### 3.2.2 Kinasen

MAP-Kinasen regulieren zahlreiche Zellprozesse, wie Mitose, Differenzierung und das Zellüberleben. Sie sind in die Expression der meisten Onkogene involviert. Zumeist sind die Kinasen in der Signaltransduktionskaskade den Wachstumsfaktorrezeptoren nachgeschaltet.

Die stärkste durch HSP90-Hemmer induzierte Herunterregulierung der Kinasen wurde wie auch bei den Wachstumsfaktorrezeptoren in den Zelllinien 5061 und 5072 beobachtet.

17-DMAG zeigte in der Zelllinie 5061 eine geringfügig bessere Wirksamkeit als 17-AAG. In beiden Zelllinien wurde eine deutliche Herunterregulation von Akt erreicht, während die Expression von MAPK weniger stark beeinflusst wurde. Gemcitabine bewirkte eine im Vergleich zu den unbehandelten Zellen unveränderte Expression sowohl von Akt als auch von MAPK. (Abb.23a und 23c).

Bei der Zelllinie 5156 konnte nur eine geringe Reduktion von MAPK nach Behandlung mit den HSP90-Inhibitoren und keine verminderte Expression von Akt erreicht werden. Gemcitabine bewirkte eine leichte Hochregulation beider Kinasen. Eine

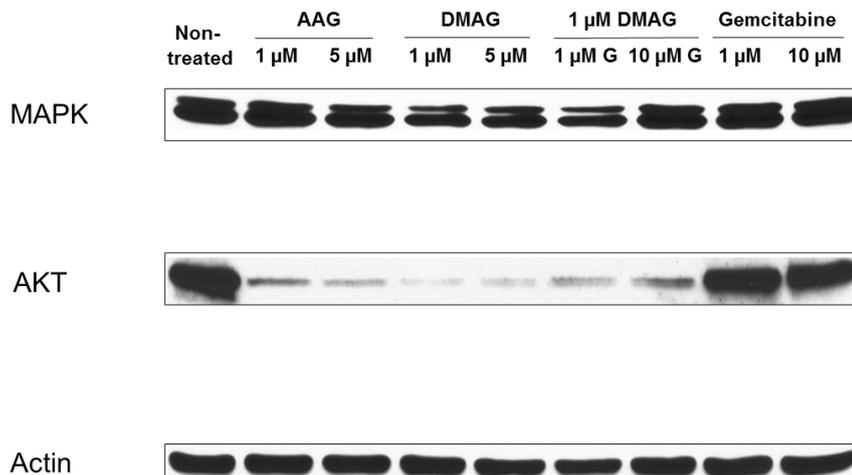
Kombinationsbehandlung von 17-DMAG mit Gemcitabine erzeugte keine verbesserte Wirksamkeit im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit den HSP90-Inhibitoren (Abb.23b).

L3.6pl zeigte eine stark verminderte Expression sowohl von MAPK als auch von Akt nach Inkubation mit 17-AAG und 17-DMAG. Zudem konnte eine etwas bessere Wirksamkeit von 17-AAG gegenüber 17-DMAG beobachtet werden. Eine Behandlung mit Gemcitabine bewirkte keine Degradation der Kinasen. Die Kombination von Gemcitabine mit 17-DMAG führte zu einer leicht verstärkten Expression der Kinasen im Vergleich zu einer Behandlung mit 17-DMAG alleine (Abb.23d).

In allen Zelllinien mit Ausnahme von 5156 führte die Behandlung mit 17-AAG und 17-DMAG zu einer Degradation der Kinasen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Inkubation der Zellen mit Gemcitabine bewirkte keine Herunterregulierung von Akt und MAPK. Eine Kombination von 17-DMAG mit Gemcitabine erzielte unterschiedliche Resultate in den verschiedenen Zelllinien.

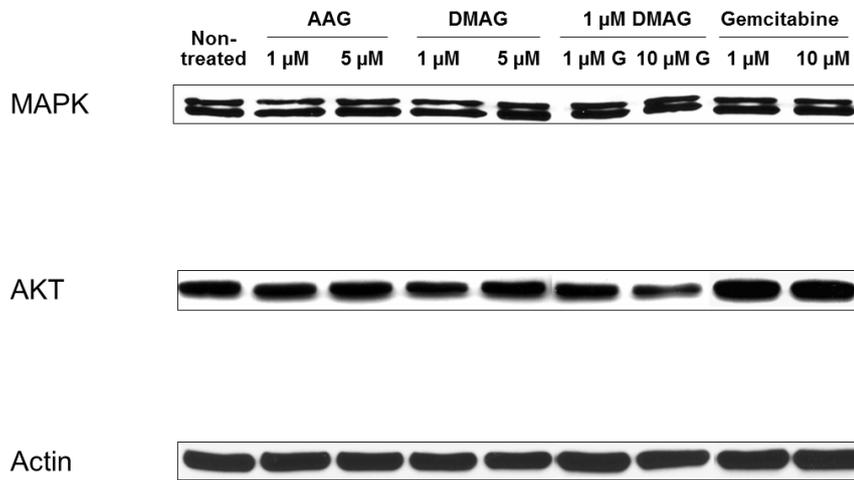
a)

**5061**



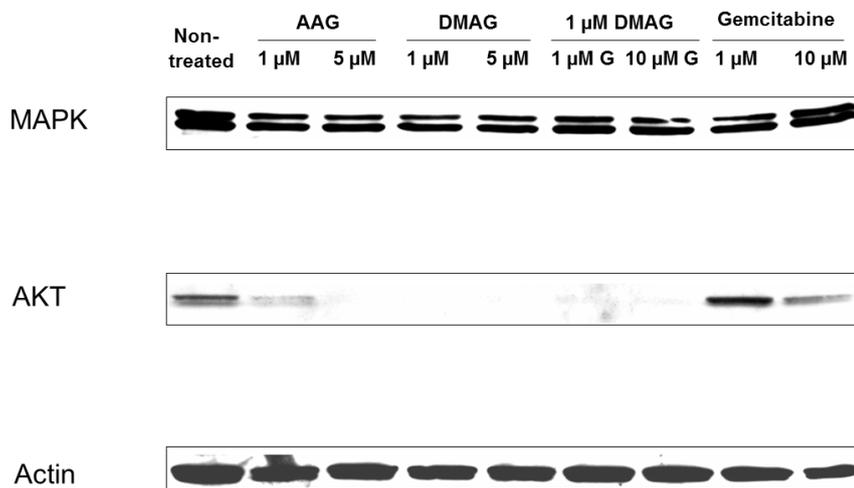
b)

5156



c)

5072



d)

**L3.6pl**

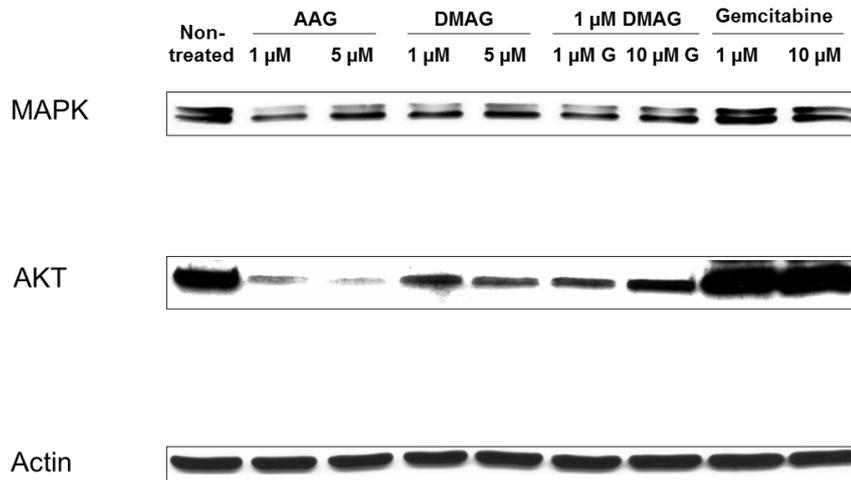


Abb.23: Expressionsveränderung der Kinasen MAPK und Akt in den Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L3.6pl nach Inkubation mit 17-AAG, 17-DMAG, einer Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine sowie Gemcitabine für 48 Stunden

**3.2.3 Hitzeschockproteine**

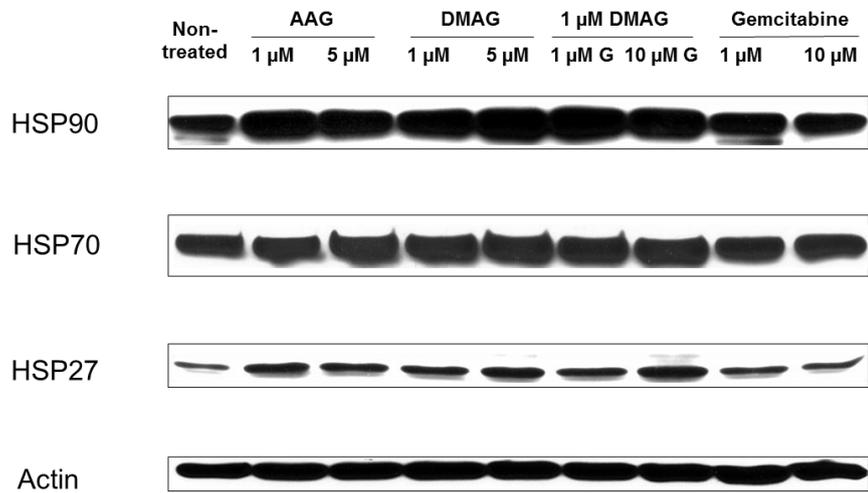
Die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP27 nehmen ähnliche Funktionen wie HSP90 in der Zelle wahr. Auch sie sind in die Faltung und Stabilisierung verschiedener Proteine involviert, ihre wichtigste Funktion jedoch liegt in der Hemmung des Zelltodes.

Sowohl HSP70 als auch HSP27 wurden in den untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit den Geldanamycin-Derivaten stark induziert. Auch die Menge an HSP90 stieg nach Behandlung mit seinem eigenen Inhibitor an.

Gemcitabine bewirkte keine Veränderung der bereits vorliegenden Menge der Hitzeschockproteine in den Zellen. Die Kombination von 17-DMAG mit Gemcitabine führte ebenfalls zu einer verstärkten Expression von HSP70, HSP27 und HSP90 (Abb.24).

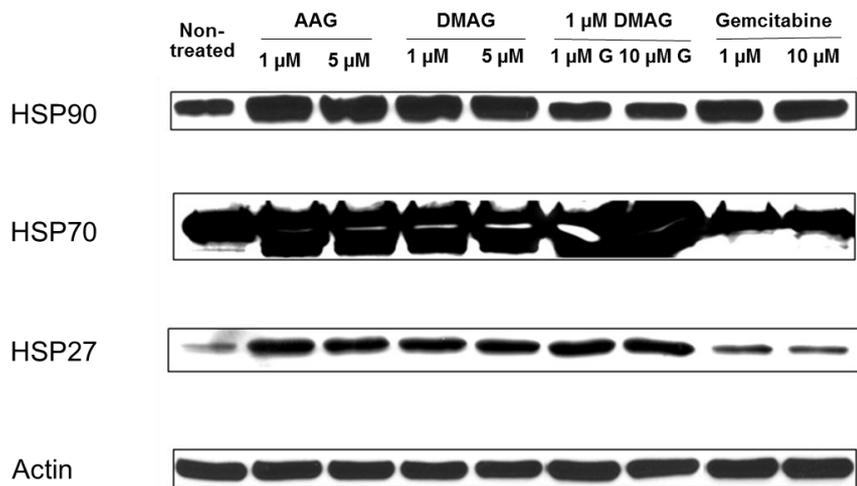
a)

**5061**



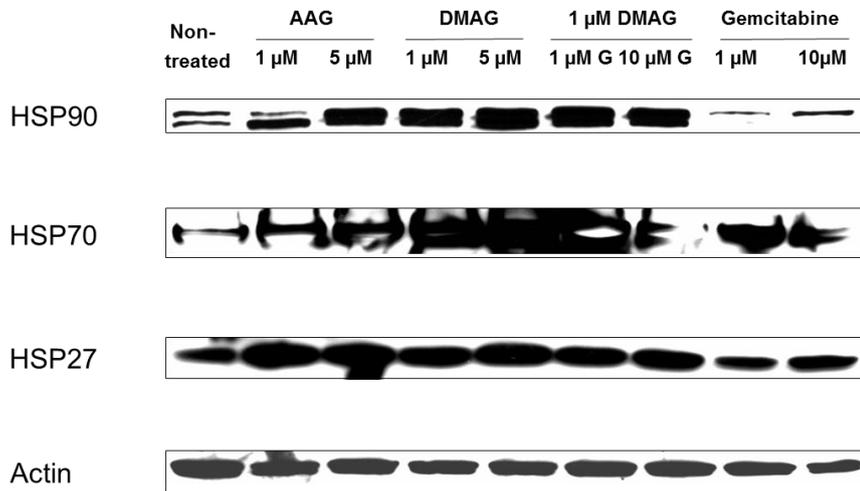
b)

**5156**



c)

**5072**



d)

**L3.6pl**

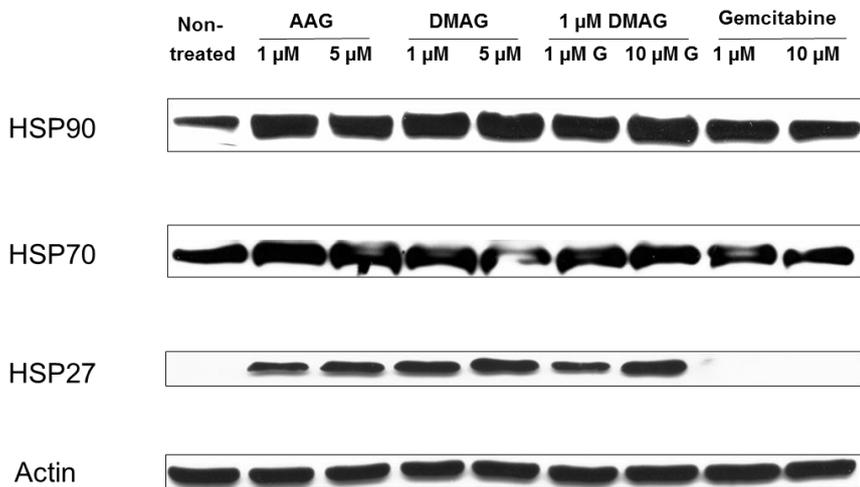


Abb.24: Veränderung der Expression von HSP90, HSP70 und HSP27 in den Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L3.6pl nach Inkubation mit 17-AAG, 17-DMAG, einer Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine sowie Gemcitabine für 48 Stunden

### **3.2.4 Induktion der Apoptose**

Caspase-3 ist eines der wichtigsten Effektorproteine der Apoptose. Die Aktivierung erfolgt über die proteolytische Prozessierung des inaktiven Zymogens in aktivierte Fragmente. Unter anderem ist Caspase-3 in die proteolytische Zerlegung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) involviert.

Dieses Protein ist für die Reparatur der DNA nach Stress zuständig und somit verantwortlich für das Zellüberleben. Durch die Zerlegung in seine Einzelteile während des Apoptose-Prozesses wird die zelluläre Zersetzung erleichtert.

Daher stellen die beiden fragmentierten Proteine (cleaved Caspase-3 und cleaved PARP) Apoptose-Marker dar, die im Western Blot nachgewiesen werden können.

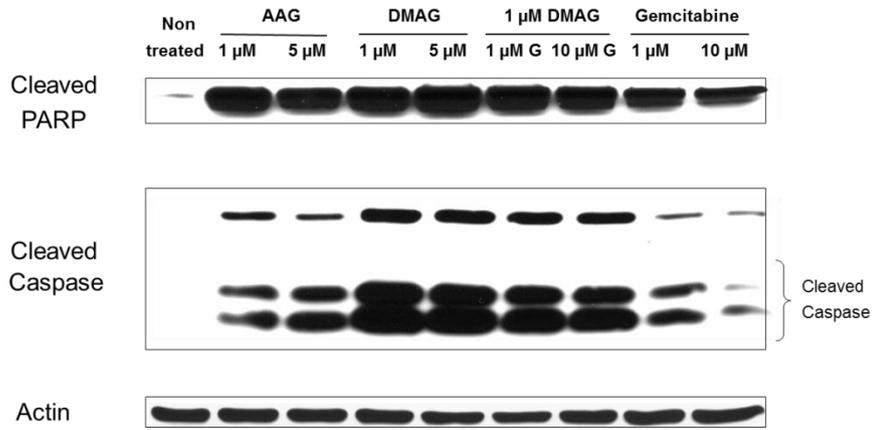
In unbehandelten Zellen sollten diese Marker nicht oder nur basal exprimiert sein, wie es auch bei den von uns verwendeten Zellen der Fall war. Nach Behandlung mit HSP90-Hemmern wurden sowohl cleaved Caspase-3 als auch cleaved PARP stark induziert. 17-DMAG erschien wiederum etwas stärker wirksam als 17-AAG (Abb.25).

Durch Gemcitabine erfolgte ebenfalls eine Induktion der Apoptose-Marker, wenn auch in den Zelllinien 5061, 5072 und 5156 nicht so stark wie nach Applikation der HSP90-Inhibitoren (Abb.25a-c). Die einzige Ausnahme bildete die Zelllinie L.3.6pl, bei der auch eine Behandlung mit Gemcitabine eine stark signifikante Hochregulierung der Apoptose-Marker bewirkte (Abb.25d).

Insgesamt sind die im Western Blot erhaltenen Ergebnisse mit denen der MTT-Tests konform.

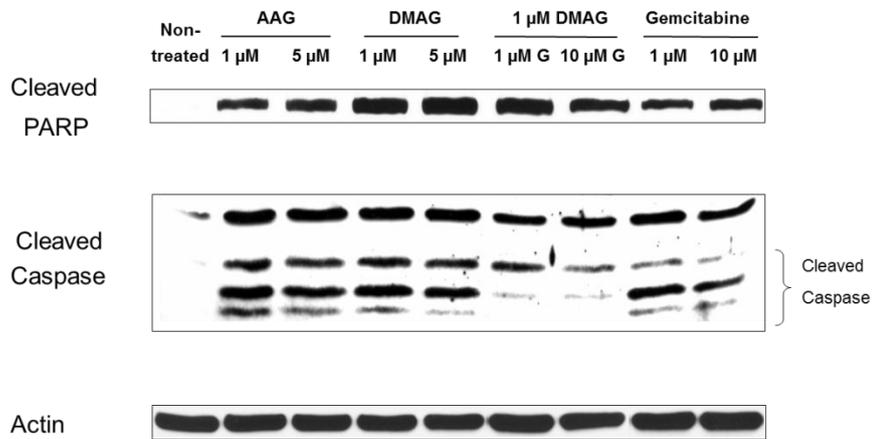
a)

**5061**



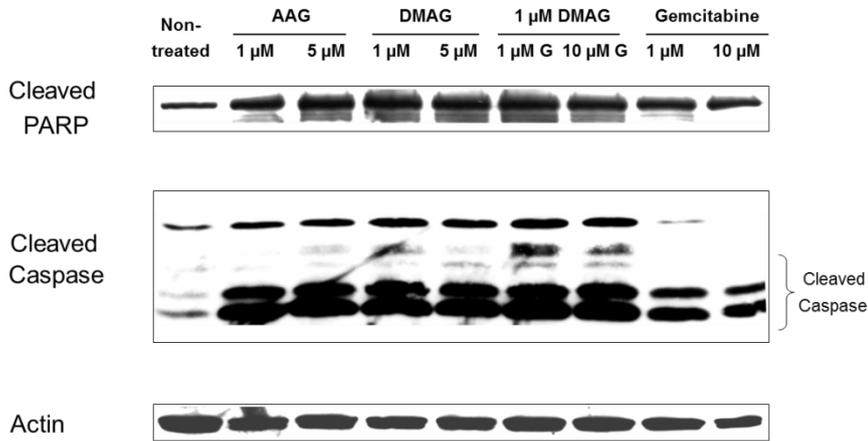
b)

**5156**



c)

**5072**



d)

**L3.6pl**

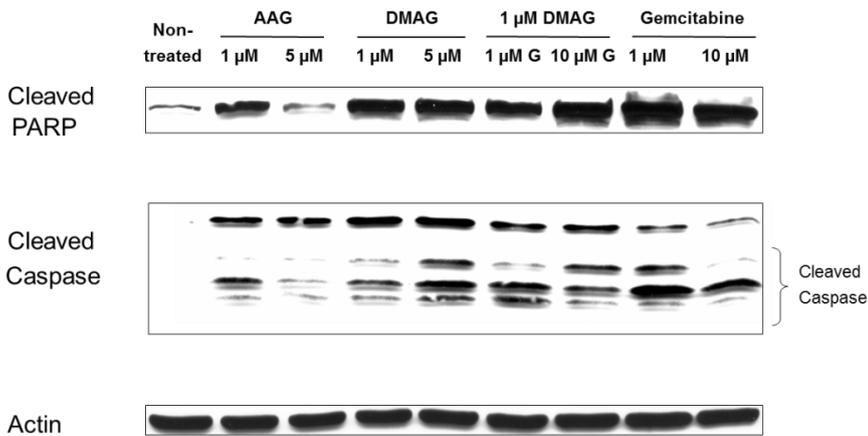


Abb.25: Veränderung der Expression der Apoptosemarker cleaved PARP und cleaved Caspase-3 in den Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L3.6pl nach Inkubation mit 17-AAG, 17-DMAG, einer Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine sowie Gemcitabine für 48 Stunden

## 4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom ist eine potenziell tödliche Erkrankung mit konstanter Inzidenz in den westlichen Industrieländern (Herrerros-Villanueva et al. 2012). 2012 verstarben in den USA 37 390 von 43 920 Erkrankten (National Cancer Institute). Obwohl nur an zehnter Stelle der häufigsten Tumoren bei Männern, sind Pankreaskarzinome die vierthäufigste Krebstodesursache in den USA (Li und Saif 2009). Die Fünfjahresüberlebensrate für alle Stadien dieser Erkrankung ist geringer als sechs Prozent (Jemal et al. 2007). Aufgrund unspezifischer, verzögert auftretender Symptome und der daraus resultierenden späten Diagnosestellung, verbunden mit der früh einsetzenden lymphatischen und hämatogenen Metastasierung, ist eine erfolgreiche operative Entfernung in nur wenigen Fällen möglich. Lediglich 8% der Tumoren befinden sich bei Diagnosestellung in lokalem Stadium, über 50% sind bereits metastasiert (Jemal et al. 2010). Selbst nach erfolgreicher Resektion mit kurativer Intention kommt es häufig zu Rezidiven. Daher liegt die Fünfjahresüberlebensrate sogar nach einem potenziell kurativen operativen Eingriff bei weniger als 15%, ohne deutliche Verbesserung in den letzten 30 Jahren (Jemal et al. 2010, Nitecki et al. 1995; Sperti et al. 1996). Auch eine radikale chirurgische Behandlung mit vaskulärer Resektion und erweiterter Lymphadenektomie im Gegensatz zur Standardresektion hat kaum Einfluss auf das Überleben (Farnell et al. 2005; Pedrazzoli et al. 1998; Yeo et al. 2002b).

In einer Studie von Hishinuma et al. wurde gezeigt, dass hepatische Metastasen in 80% die direkte Todesursache des metastasierten Pankreaskarzinoms darstellen (Ghaneh et al. 2007; Hishinuma et al. 2006). Daher kann eine auch nach potenziell kurativer Resektion durchgeführte chemotherapeutische Behandlung das Risiko einer Metastasierung minimieren und somit das Überleben steigern.

Zu den prognostischen Faktoren für das Überleben zählen Alter und Gesundheitszustand des Patienten, Rauchgewohnheiten, tumorbiologische Klassifikation, Lymphknotenstatus und lokale Invasion (Neptolemos et al. 2010). Zudem ist das Vorhandensein beziehungsweise Fehlen von Tumorzellen in den Resektionsrändern von Operationspräparaten ein weiteres wichtiges prognostisches Kriterium und bestimmt über die postoperative Therapie (Allema et al. 1995; Benassai et al. 2000; Geer und Brennan 1993; Nagakawa et al. 1996; Yeo et al. 1997). Zurzeit gibt es keine Standardtechnik zur

histopathologischen Untersuchung der Präparate, sodass der Anteil an Resektionen, in denen ein mikroskopischer Randbefall der Resektionsränder vorliegt (R1-Resektion), je nach Quelle von 16% bis über 75% variiert (Millikan et al. 1999; Nitecki et al. 1995; Pingpank et al. 2001; Raut et al. 2007; Sperti et al. 1996; Verbeke 2008; Willett et al. 1993; Yeo et al. 1995). Studien zufolge weisen die bislang als vollständige Resektionen (R0-Resektion) deklarierten Operationspräparate nach Aufbereitung durch ein neu etabliertes Protokoll in über 80% tatsächlich einen mikroskopischen Randbefall auf, der nicht erkannt wurde (Verbeke et al. 2006). In diesen Studien liegt die Rate an R1-Resektionen bei über 70% (Verbeke et al. 2006). Somit wird selbst eine ursprünglich lokal begrenzte und folglich chirurgisch heilbare Krankheit zu einer systemischen Erkrankung, die chemotherapeutischer Behandlung bedarf. Daher ist nicht nur bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem und damit inoperablem Pankreaskarzinom, sondern auch nach erfolgreicher operativer Entfernung eine Chemotherapie anzustreben, was derzeit auch klinisch praktiziert wird (Adler et al. 2007).

Bislang wurden zahlreiche Chemotherapeutika zur adjuvanten Therapie des Pankreaskarzinoms untersucht (Conroy et al. 2011b; Li und Saif 2009; Makrilia et al. 2011; Merl et al. 2010). Unter ihnen stellten sich vor allem die Substanzen Gemcitabine und 5-Fluorouracil (5-FU) als wirksam heraus. Dabei übersteigt das Ansprechen auf eine Therapie mit 5-FU selten 20% (Burris et al. 1997).

Auch Gemcitabine zeigt aufgrund häufiger intrinsischer oder erworbener Resistenzen der Pankreastumoren klinisch nur mäßige Erfolge (Bergman et al. 2002). Das Therapieansprechen liegt hier sogar nur bei 9,4% (Conroy et al. 2011a). Nach Aufnahme in die Zelle durch die Transporter hENT1 und hCNT3 wird das Pyrimidinanalogon dort in mehreren Schritten unter anderem durch die Deoxycytidinkinase phosphoryliert und damit in den aktiven Wirkstoff umgewandelt. Resistenzen gegen Gemcitabine können durch eine verminderte Expression von hENT1 und hCNT3 (Conroy et al. 2011b) oder durch reduzierte Aktivität der Deoxycytidinkinase entstehen (Ohhashi et al. 2008). Über den PI3K/Akt- und den NF- $\kappa$ B-Signalweg wird ebenfalls eine intrinsische Resistenz gegen Gemcitabine vermittelt (El Maalouf et al. 2009).

Kombinationen von Gemcitabine mit anderen Medikamenten, beispielsweise Farnesyltransferaseinhibitoren (Van Cutsem et al. 2004), monoklonalen Antikörpern zur Hemmung von VEGFR (Conroy und Mitry 2011), Platinderivaten oder Topoisomeraseinhibitoren (Conroy et al. 2011b) bewirkten bislang keine Vorteile.

Einzigste Ausnahme ist die Kombination von Gemcitabine mit EGFR-Inhibitoren:

In einer Studie des National Cancer Institute of Canada wurde ein Überlebensvorteil der Patienten nach Behandlung mit einer Kombination aus Gemcitabine und Erlotinib festgestellt. Das mittlere Überleben lag bei 6,24 Monaten. Durch Gemcitabine in der Monotherapie wurde lediglich ein medianes Überleben von 5,91 Monaten erzielt. Das Ergebnis ist statistisch signifikant, klinisch jedoch von fragwürdiger Relevanz (Moore et al. 2007).

Die Kombination von Gemcitabine mit Cetuximab, einem weiteren Hemmstoff von EGFR, erbrachte in einer Phase II-Studie ähnliche Resultate. Das mediane Überleben lag hier bei 7,1 Monaten in der Kombinationstherapie. In den meisten Fällen erfolgte allerdings lediglich eine Inhibition des Tumorwachstums, jedoch keine Tumormassenreduktion (Xiong et al. 2004). Phase III-Versuche ergaben keinen Wirksamkeitsvorteil gegenüber der bislang etablierten Therapie (Conroy und Mitry 2011).

In der PRODRIGE4/ACCORD11-Studie erfolgte die klinische Erprobung des Therapieschemas FOLFIRINOX, bestehend aus 5-FU, Irinotecan, Leucovorin und Oxaliplatin. Diese Kombination von Chemotherapeutika führte zu einem signifikanten Anstieg des mittleren Überlebens auf 11,1 Monate im Gegensatz zu 6,5 Monaten unter Monotherapie mit Gemcitabine. 31,6% der Patienten sprachen auf das Therapieregime mit FOLFIRINOX an (Conroy et al. 2011a; Merl et al. 2010).

Insgesamt ist der Therapieerfolg der bislang etablierten Chemotherapeutika jedoch begrenzt. Gerade beim Pankreaskarzinom aber wird dringend eine systemische Behandlungsoption benötigt, von der auch Patienten profitieren, bei denen keine kurative Resektion stattfinden konnte oder die bereits eine Metastasierung aufweisen.

In den letzten Jahren erfolgte die molekulare Charakterisierung verschiedener Tumorentitäten. Die somit erstellten molekularen Profile der Krebszellen erlauben die Entwicklung zielgerichteter Therapien (target therapy) gegen bestimmte, in den Tumorzellen vermehrt exprimierte Proteine, wie Wachstumsfaktorrezeptoren oder Kinasen. Bezüglich des Pankreaskarzinoms existieren drei Projekte des International Cancer Genome Consortium (ICGC) in Kanada, Australien und Italien, die an einer Gencharakterisierung arbeiten (Hudson et al. 2010).

In Pankreaskarzinomen wird eine Reihe von Proteinen überexprimiert, die in verschiedene Signaltransduktionswege involviert sind. Dabei handelt es sich unter anderem um die Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR und IGF-1R $\beta$  (Ahsan et al. 2012; Lang et al. 2007;

Talar-Wojnarowska und Malecka-Panas 2006), sowie die in der Signalkette nachfolgenden Proteinkinasen Akt und MAPK (Samuel und Hudson 2012).

Mehrere Inhibitoren von EGFR wurden entwickelt und befinden sich mittlerweile in klinischem Gebrauch. Zu ihnen gehören monoklonale Antikörper, wie Cetuximab und Panitumumab, welche an der extrazellulären Domäne von EGFR angreifen, sowie Kinaseinhibitoren wie Erlotinib und Gefitinib, die an der intrazellulären Domäne von EGFR binden und die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors verhindern. Trotz des viel versprechenden theoretischen Ansatzes ist die klinische Wirksamkeit dieser Therapien jedoch begrenzt und nur in Einzelfällen erfolgreich (Saridaki et al. 2010; Sawai et al. 2008).

Da Krebs eine multifaktorielle Erkrankung darstellt, die durch verschiedene, nacheinander erfolgende Mutationen entsteht, reicht es oftmals nicht aus, an nur einer Stelle zu intervenieren.

Eine medikamentöse Blockade des EGF-Rezeptors schließt die Möglichkeit einer EGFR-unabhängigen Aktivierung der wichtigsten in der Signalkette nachfolgenden Proteinkinasen nicht aus, sodass trotz des gehemmten Rezeptors eine Signalweiterleitung stattfinden kann. Dies kann entweder durch andere Wachstumsfaktorrezeptoren, wie HER2 oder IGF-1R $\beta$ , erfolgen oder durch das Vorliegen mutierter Proteinkinasen, die autonom funktionstüchtig sind und keine aktivierenden Mechanismen benötigen (El Maalouf et al. 2009). So kann KRAS, eine dem EGF-Rezeptor nachgeschaltete Proteinkinase, den MAPK- und den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren und darüber zellproliferative und antiapoptotische Signale vermitteln (Adjei 2001; Talar-Wojnarowska und Malecka-Panas 2006). Mutationen im KRAS- oder BRAF-Gen, die in 50% der kolorektalen Karzinome zu finden sind, führen zu einem Wirksamkeitsverlust der gegen EGFR gerichteten monoklonalen Antikörper (Saridaki et al. 2010).

Eine Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren kann auch über die Existenz einer Rückkopplungsschleife vermittelt werden, die eine Hochregulation von EGF-Rezeptoren nach Inkubation mit seinen Hemmstoffen bewirkt (Jimeno et al. 2005).

Die Inhibition von EGFR als therapeutischer Ansatz erreicht somit klinisch nur eingeschränkte Erfolge beim Pankreaskarzinom.

Durch eine vermehrte Expression von IGF-1R $\beta$  wird in Krebszellen eine Apoptoseresistenz sowie eine Erhöhung des metastatischen Potentials erreicht. Zahlreiche IGF-1R-Inhibitoren wurden entwickelt und befinden sich mittlerweile in klinischer

Erprobung. Die jeweilige Wirksamkeit der Medikamente bleibt jedoch abzuwarten (Xue et al. 2012).

Raf-Proteine gehören zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen und liegen ebenfalls in diversen Tumoren in mutierter Form vor. Über MEK sind sie in die Signalweiterleitung durch die MAPK-Kaskade involviert.

Eine Inhibition der MEK konnte in Tierversuchen bei Mäusen mit Kolonkarzinomen in 80% das Tumorwachstum beenden (Sebolt-Leopold et al. 1999). Flaherty et al. (2012) erreichten ein längeres progressionsfreies Überleben im Vergleich zur herkömmlichen Chemotherapie bei Patienten mit metastasiertem malignen Melanom und vorhandener BRAF-Mutation.

Auch die Hemmung von KRAS stellt ein attraktives theoretisches Modell dar, zumal diese Mutation in über 90% der Pankreaskarzinome vorliegt (Almoguera et al. 1988).

Für seine Interaktion mit der Zellmembran muss das RAS-Protein über 3 Schritte enzymatisch verändert werden. Der erste Schritt beinhaltet den Transfer einer Farnesylgruppe durch die Farnesyltransferase (Adjei 2001). Die Hemmung der posttranslationalen Farnesylierung von RAS durch Inhibitoren der Farnesyltransferase führt zu einem Aktivitätsverlust des Proteins mit Interruption nachfolgender Signaltransduktionswege. In vitro erzeugte eine Therapie mit Farnesyltransferaseinhibitoren eine Suppression des Tumorzellwachstums von Pankreaskarzinomzellen (Talar-Wojnarowska und Malecka-Panas 2006). Eine Hemmung von KRAS konnte jedoch in klinischen Phase II- und III-Studien keine Wirkung bei Neoplasien der Bauchspeicheldrüse erzielen (Cohen et al. 2003; Van Cutsem et al. 2004).

Die Proteinkinase C (PKC) gehört zu den Serin/Threonin-Proteinkinasen und reguliert eine Vielzahl von Signalwegen, unter anderem über PI3K/Akt und MAPK. Dadurch hat PKC vor allem Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung, Gentranskription und Angiogenese von Tumorzellen (Rizvi et al. 2006).

In Pankreaskarzinomen liegt PKC im Gegensatz zu pankreatischem Normalgewebe aktiviert vor (Ali et al. 2009), wobei hohe interindividuelle Schwankungen auftreten (El-Rayes et al. 2008). Eine Inhibition von PKC in könnte eine gesteigerte Sensitivität der Krebszellen gegenüber anderen chemotherapeutischen Agenzien bewirken. Verschiedene Hemmstoffe von PKC wurden untersucht, unter ihnen die ATP-kompetitiven Inhibitoren

Midostaurin, UCN-01 und Enzastaurin (Mizuno et al. 1993; Rizvi et al. 2006). Enzastaurin wird derzeit in Glioblastomen, Lymphomen, Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC), kolorektalen Karzinomen, Prostata- und Pankreaskarzinomen erprobt. In NSCLC, Kolon-, Prostata- und Mammakarzinomzelllinien zeigte es bereits antiproliferative Effekte, die zumeist mit einer verminderten Phosphorylierung von Akt einhergingen (Rizvi et al. 2006).

Bislang erforschte natürliche Inhibitoren, wie Bryostatine, erzielten allerdings trotz motivierender Ergebnisse *in vitro* bei diversen Mamma- und Bronchialkarzinom-Zelllinien in klinischen Versuchen als *single agent* eher enttäuschende Resultate (Zonder und Philip 1999). In Kombination mit zytotoxischen Substanzen wie Gemcitabine zeichnen sich positivere Ergebnisse ab (El-Rayes et al. 2006; El-Rayes et al. 2008). Haupteinsatzgebiet von Bryostatine bleiben jedoch hämatologische Neoplasien (Zonder und Philip 1999).

Zusammenfassend sind Tumorzellen, deren herausragende Eigenschaft ihre genetische Instabilität und Plastizität darstellt, schneller fähig, Resistenzen gegen Medikamente zu entwickeln, die nur an einem speziellen Punkt angreifen. Selbst eine Krebserkrankung, die typischerweise durch die Mutation eines bestimmten Gens verursacht wird, kann Resistenzen gegen die entsprechende *target therapy* entwickeln, wie es beispielsweise bei Behandlung der Leukämie mit Imatinib durch weitere Mutation des BCR-ABL-Gens vorkommt (Gorre et al. 2001).

Daher besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit der Wachstumshemmung durch ein Medikament, das verschiedene interferierende Signalwege der Krebszellen simultan attackiert, als bei Inhibition eines einzelnen Zielproteins.

Bezüglich des Pankreaskarzinoms gibt es eine Vielzahl an Mutationen, die zu seiner Entstehung führen können. Unterschiedliche Patienten weisen verschiedene molekulare Anomalien auf, sodass nicht jede gezielte Therapie auch bei jedem Erkrankten Wirkung zeigt (Biankin und Hudson 2011). Hinzukommend unterscheiden sich teilweise bei einem einzelnen Patienten die genetischen Alterationen zwischen Primärtumor und Metastasen (Campbell et al. 2010).

In den letzten Jahren gewannen HSP90-Hemmer zunehmend an Popularität. Die besondere Fähigkeit dieser Hemmstoffe besteht darin, dass sie an verschiedenen Signaltransduktionswegen zugleich angreifen und somit die Entstehung von Resistenzen und Kompensationsmechanismen unwahrscheinlich machen (Neckers und Ivy 2003).

Außerdem liegt HSP90 in den meisten Krebszellen überexprimiert vor und bietet somit ein selektives Angriffsziel für Medikamente, ohne normale Körperzellen zu schädigen (Calderwood et al. 2006). Ein weiterer Vorteil der Inhibitoren ist ihre Fähigkeit, 100-mal besser an HSP90 in Krebszellen als in normalen Körperzellen zu binden (Kamal et al. 2003).

Diverse in Tumoren mutierte oder vermehrt exprimierte Proteine zählen zu den Client Proteinen von HSP90, unter anderem auch EGFR, IGFR, MAPK und Akt (Neckers 2007). Mittels MTT-Test konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Geldanamycin-Derivate 17-AAG, 17-AEP-GA und 17-DMAG bereits in Dosen von unter 1µM das Wachstum von Gemcitabine- und 5-FU-resistenten Pankreaskrebszellen hoch signifikant inhibieren. Dabei wies das wasserlösliche 17-DMAG eine geringfügig bessere Wirksamkeit als 17-AAG und insbesondere 17-AEP-GA auf.

Im Anschluss an die bereits mittels MTT-Test aufgezeigte erfolgreiche HSP90-Inhibition wurde der Effekt der Geldanamycin-Derivate auf die quantitative Expression von Client Proteinen von HSP90 untersucht. Dabei wurden Wachstumsfaktorrezeptoren und Kinasen ausgewählt, die eine essentielle Rolle in Signaltransduktionswegen von Krebszellen spielen.

Sowohl EGFR, als auch IGF-1R $\beta$  und die in der Signalkette nachgeordneten Kinasen Akt und MAPK zeigten eine deutliche Reduktion der Expression nach Inkubation mit den HSP90-Hemmern. In der Zelllinie 5156 kam es allerdings nach HSP90-Inhibition nur zu einer minimalen Expressionsverminderung von MAPK und fehlender Herunterregulation von Akt. Dies kann zum Beispiel durch eine kompensatorische Aktivierung weiterer Signaltransduktionswege und Verlinkung mit dem MAPK- beziehungsweise Akt-Signalweg oder durch eine Stabilisierung der Kinasen durch andere Hitzeschockproteine erklärt werden.

Die apoptotische Wirkung der HSP90-Inhibitoren wurde durch eine nach Behandlung stark ansteigende Expression der Apoptose-Äquivalente cleaved Caspase-3 und cleaved PARP belegt.

In der Literatur finden sich ähnliche Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen: Mayer et al. (2012) stellten in endokrinen Tumoren des Pankreas eine Überexpression von HSP90 fest. Durch Applikation von 17-AAG und 17-DMAG wurde eine signifikante Reduktion der Zellviabilität erzielt. Zudem konnte der Zelltod durch Apoptose und eine Depletion

verschiedener Zielproteine von HSP90 nachgewiesen werden. Der Effekt einer Chemotherapie mit Doxorubicin wurde durch HSP90-Inhibition maximiert.

Wu et al. (2009) erreichten durch Behandlung mit 17-AAG eine effiziente Herunterregulierung der Client Proteine IGF-1R $\beta$  und Akt sowie eine Sensitivierung der Krebszellen für die Radiotherapie. Auch durch Lang et al. (2007) wurde nach HSP90-Inhibition eine Verringerung von IGF-1R $\beta$  und IL-6 in Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen.

In Ovarialkarzinomzelllinien erzielten Banerji et al. (2005b) eine Wachstumshemmung sowohl in vitro als auch in vivo durch Applikation von 17-AAG. Eine Sensitivierung gegen Paclitaxel wurde in gegenüber der herkömmlichen Chemotherapie resistenten Ovarialkarzinomzellen durch 17-AAG bewirkt (Neckers und Ivy 2003; Sain et al. 2006).

Auch in NSCLC erfolgte eine Wachstumsinhibition durch 17-AAG, verbunden mit einer Degradierung von EGFR. In Kombination mit Paclitaxel gewann 17-AAG an Effektivität (Sawai et al. 2008).

17-AAG erzielte in vitro den Zelltod durch Apoptose sowie die Degradation verschiedener Tyrosinkinaserzeptoren in Synovialzellsarkomen (Terry et al. 2005).

GIST-Tumoren, die Resistenzen gegen Imatinib aufwiesen, reagierten sensibel auf eine HSP90-Inhibition, welche eine Depletion von MAPK und Akt bewirkte (Bauer et al. 2006).

Bei Kolonkarzinomzellen konnte eine Induktion der Apoptose durch Inkubation mit 17-AAG erlangt werden. Zudem wurde die Inhibition des Ras/Raf/MAPK- sowie des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges gezeigt (Hostein et al. 2001).

In einer Studie von Lee et al. (2012) wurde eine signifikante Reduktion des Zellwachstums von Mammakarzinomzellen durch 17-AAG und 17-DMAG erreicht. Zudem konnte eine Suppression von Akt sowie eine Hochregulation von HSP70 und HSP27 durch Behandlung mit HSP90-Hemmern beobachtet werden.

Shimamura et al. zeigten 2005, dass EGFR-Inhibitoren in NSCLC-Zellen zwar eine initiale Wirkung erzielten, welche nach einiger Zeit jedoch refraktär wurden. Selbst diese Tumoren reagierten sehr empfindlich auf eine HSP90-Inhibition.

Eine synergistische Wachstumshemmung von Pankreaskarzinomzellen konnte durch eine simultane Behandlung mit Geldanamycin und einem Glycolyseinhibitor erreicht werden (Cao et al. 2008).

Während die HSP90-Inhibition durch 17-AAG in vitro äußerst positive Resultate erlangte, ergaben klinische Phase I-Versuche in verschiedenen soliden Tumoren bislang keine objektiven Remissionen (Hong et al. 2013).

Ramanathan et al. führten 2005 eine Phase I-Studie mit 17-AAG durch, in die 45 Patienten eingeschlossen waren. Es konnten weder Remissionen, noch eine konsistente Alteration von HSP90 und HSP70 in peripheren Blutzellen beobachtet werden.

In einer Studie von Solit et al. (2007) mit 54 Patienten unterschiedlicher Krebserkrankungen erreichte kein Patient eine komplette oder partielle Remission, allerdings zeigten einige Patienten ein verlängertes progressionsfreies Intervall. Mittels Western Blot-Analyse konnte die gesteigerte Expression von HSP70 sowie die Reduktion von Akt nach Behandlung mit 17-AAG nachgewiesen werden.

Ähnliche Resultate erreichten Banerji et al. (2005a), deren Studie 30 Patienten einschloss. Es zeigten sich keine Remissionen, jedoch wurde über zwei Patienten mit stabiler Erkrankung berichtet. In Biopsien der Tumoren konnte eine Inhibition diverser Client Proteine von HSP90 sowie eine Induktion von HSP70 gesehen werden.

In den klinischen Studien traten am häufigsten gastrointestinale und hepatische Nebenwirkungen auf, die sich zumindest zum Teil durch den Einsatz von DMSO als Lösungsmittel erklären ließen. Zudem schien eine Myelosuppression nicht der dosislimitierende Faktor zu sein, sodass eine Kombination mit anderen Chemotherapeutika vom Nebenwirkungsprofil her möglich erscheint (Banerji et al. 2005a). Problematisch waren allerdings die schwache Wasserlöslichkeit von 17-AAG sowie die starke Metabolisierung durch CYP3A4. Aufgrund der Toxizität musste bislang in suboptimaler Dosierung behandelt werden (Hong et al. 2013). Daher sind die Erfolge von 17-AAG in klinischen Phase II-Studien bislang begrenzt (Solit et al. 2007; Whitesell et al. 2012).

Zajac et al. (2010) untersuchten verschiedene Mammakarzinomzelllinien, um Signaltransduktionswege zu identifizieren, über die eine verminderte Wirksamkeit von 17-AAG erzeugt wird. In den resistenten Zelllinien fand sich vor allem eine Überexpression der NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signaltransduktionswege, deren Hemmung zusammen mit einer Inhibition von HSP90 eine Therapieoption bei gegenüber den Geldanamycinderivaten resistenten Tumorentitäten darstellt. Zudem wurde eine Mutation des NQO1-Gens, das für die Bio-reduktion und Aktivierung von 17-AAG notwendig ist, beschrieben, welche zu einer verminderten Sensitivität gegen 17-AAG führen kann (Taldone et al. 2008).

In der Literatur lassen sich nur vereinzelt Versuche mit 17-AEP-GA finden.

Lukasiewicz et al. (2009) testeten unterschiedliche Geldanamycinderivate in Rhabdomyosarkomzellen. Im Unterschied zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen stellte die Forschungsgruppe eine signifikant geringere Wirksamkeit von 17-AAG fest, wohingegen Geldanamycin, 17-AEP-GA und 17-DMAG eine hohe antiproliferative Aktivität aufwiesen. Alle HSP90-Inhibitoren induzierten die Apoptose, die im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde der MET-Signaltransduktionsweg durch die Geldanamycinderivate gehemmt.

Eine weitere Studie untersuchte den Effekt verschiedener Geldanamycinderivate auf Glioblastomzellen. Hier zeigte sich ebenfalls eine starke Inhibition des Zellwachstums durch 17-AEP-GA (Miekus et al. 2012).

Klinische Versuche mit 17-AEP-GA wurden bislang nicht durchgeführt.

17-DMAG weist eine bessere Löslichkeit in Wasser und vorteilhaftere pharmakokinetische Eigenschaften auf als 17-AAG (Hong et al. 2013).

Smith et al. (2005) verglichen die Wirkung von 17-AAG und 17-DMAG in vitro. Hierbei zeigte 17-DMAG eine größere antiproliferative Potenz als 17-AAG, insbesondere bei Pankreas-, Kolon- und Mammakarzinomen, Sarkomen und Melanomen. In allen Zelllinien konnte ein Anstieg von cleaved PARP als Apoptosemarker sowie eine verstärkte Expression von HSP70 beobachtet werden.

Bei hepatozellulären Karzinomen erzeugte 17-DMAG in vitro eine signifikante Wachstumsinhibition. Zudem kam es zu einer Herunterregulierung wichtiger Signalproteine (Leng et al. 2012).

Mittlerweile befindet sich 17-DMAG auch in klinischer Erprobung.

Für eine Studie von Ramanathan et al. (2010) wurden insgesamt 56 Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten rekrutiert, die 17-DMAG für 6 bis 14 Zyklen erhielten. Lediglich vier Patienten zeigten ein progressionsfreies Intervall. Die Expression von Client Proteinen von HSP90, die sowohl in Tumorbiopsien als auch in peripheren Blutzellen nachgewiesen wurden, war inkonsistent, sodass keine allgemeingültige Aussage getroffen werden konnte. Insgesamt wurde die Therapie gut vertragen. Als unerwünschte Folgen traten gastrointestinale, hämatologische und pulmonale Nebenwirkungen auf.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Kummar et al., die 2010 eine weitere Phase I-Studie an 31 Patienten mit verschiedenen Tumorarten durchführten, wobei die meisten Patienten bereits mehrere chemotherapeutische Behandlungen durchlaufen hatten. Hier konnte keine

partielle oder komplette Remission erreicht werden, bei neun Patienten kam es jedoch zu einer stabilen Erkrankung. Um den Effekt auf die Client Proteine von HSP90 zu verifizieren, wurde nach Applikation von 17-DMAG die Expression von HSP70-mRNA in peripheren Blutzellen gemessen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den prätherapeutischen Werten.

Die besten Resultate durch HSP90-Inhibition werden derzeit bei Patienten mit HER2-positiven Mammakarzinomen sowie nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen erzielt (Neckers und Workman 2012). In bestimmten Tumorentitäten mit besonderer Abhängigkeit von einem speziellen Onkoprotein, welches gleichzeitig zu den Client Proteinen von HSP90 zählt, scheint die klinische Wirksamkeit der HSP90-Hemmer gesteigert zu sein. Eine genauere Analyse der genetischen Alterationen der Tumoren zur Selektion von Patienten, die von einer HSP90-Inhibition profitieren, könnte daher sinnvoll sein (Haupt et al. 2012; Neckers und Workman 2012; Shimamura und Shapiro 2008).

Die erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen aus der HSP70-Familie korreliert positiv mit der Malignität einer Neoplasie. So konnte beobachtet werden, dass Tumoren, die HSP70 überexprimieren, öfter metastasieren, häufiger Resistenzen gegen eine Chemo- oder Radiotherapie ausbilden und insgesamt eine schlechtere Prognose aufweisen (Brondani da Rocha et al. 2004; Ciocca und Calderwood 2005; Nanbu et al. 1998; Powers et al. 2009; Vargas-Roig et al. 1998). Eine Überexpression von HSP70 und HSP27 korreliert mit einer Resistenz gegenüber einer Chemotherapie mit Doxorubicin in Brust-, Kolon- und Hodenkrebs (Richards et al. 1996).

HSP27 wirkt vor allem antiapoptotisch und steuert der erfolgreichen HSP90-Inhibition entgegen (Garrido et al. 2000).

In vorliegender Studie wurde die Expression von HSP90 selbst, HSP70 und HSP27 nach Behandlung mit den Geldanamycin-Derivaten überprüft. Nach erfolgter Inhibition konnte eine Hochregulierung aller drei Hitzeschockproteine bemerkt werden. Diese Ergebnisse sind konform zu Arbeiten anderer Forschungsgruppen (Lee et al. 2012; Yu et al. 2010).

Eine vermehrte Expressierung von HSP70 ist auch nach erfolgter Chemotherapie mit Paclitaxel, Doxorubicin und Gemcitabine beobachtet worden, einhergehend mit verminderter Sensitivität gegenüber den genannten Substanzen (Powers und Workman 2007).

Als Konsequenz der HSP90-Inhibition wird der Transkriptionsfaktor HSF-1 aus *inhibitory clutches* von HSP90 frei. Nach erfolgter Trimerisierung von HSF-1 findet die

Translokation zum Nukleus und die Bindung an Hitzeschock-Elemente in den Promotern der Hitzeschock-Gene statt, was zu einer verstärkten Transkription letzterer führt (Powers et al. 2009). Somit stellt eine Steigerung der Expression von HSP70 und HSP27 einen Kompensationsmechanismus dar, um die Funktion des ausgefallenen HSP90 zu ersetzen. Gleichzeitig kann dadurch die erfolgreiche Inhibition des Hitzeschockproteins bewiesen werden. Auch der quantitative Anstieg von HSP90 basiert auf der zur Kompensation des Mangels an funktionsfähigem HSP90 verstärkten Expression der HSP90-codierenden Gene (Powers et al. 2008).

Einige Studien zeigten, dass eine Reduktion von HSP70 *in vitro* durch antisense-cDNA einen Verlust der Zellviabilität verursachte (Frese et al. 2003; Nylandsted et al. 2002). So wurde durch Nylandsted et al. (2000) der Zelltod von Brustkrebszellen durch Inhibition der Synthese von HSP70 bewiesen.

Diese Ergebnisse konnten allerdings nicht von allen Forschungsgruppen bestätigt werden, da eine Inhibition von HSP70 eine Induktion von HSC70, einem weiteren Hitzeschockprotein aus der HSP70-Familie, bewirkt. Umgekehrt wird HSP70 nach Hemmung von HSC70 überexprimiert. Die beiden Hitzeschockproteine können gegenseitig ihre Funktion ersetzen, da HSP90 im Chaperon-Komplex sowohl mit HSP70 als auch mit HSC70 interagieren kann (Powers et al. 2008).

Eine kombinierte Hemmung beider HSP70-Formen resultiert in einem G1-Arrest und Apoptose der Zellen und führt zu einer Degradierung von Client Proteinen von HSP90 (Powers et al. 2008). Daher lässt sich vermuten, dass sich der Effekt der HSP90-Hemmung durch die gleichzeitige Inhibition von Proteinen aus der HSP70-Familie weiter verstärken lässt. Tatsächlich konnte eine ausgeprägte Steigerung der Sensitivität für 17-AAG in Kolonkarzinomzellen bei synchroner Hemmung von HSP70 und HSC70 festgestellt werden (Powers et al. 2008).

Auch eine simultane Inhibition von HSP90, HSP70 und HSP27 könnte eine effiziente Therapieoption darstellen.

Eine verstärkte Wirksamkeit durch kombinierte Hemmung von HSP90 und HSP27 konnte in einer Arbeit von Lee et al. (2012) gezeigt werden. Hierbei kam es durch Kombination von Geldanamycinderivaten mit Quercetin, einem Flavonoid, welches unter anderem HSP27 hemmt, zu einer deutlichen Wachstumsinhibition von Mammakarzinomzellen.

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Hemmung von HSF-1. In diversen Studien wurden Quercetin und KNK437 bereits erfolgreich *in vitro* zur Hemmung von HSF-1 eingesetzt. Beide Substanzen bewirkten einen Wachstumsstillstand von Krebszellen durch Inhibition

der stressinduzierten Expression von zahlreichen Hitzeschockproteinen. Allerdings waren zum Erreichen einer ausreichenden Aktivität hohe Mengen des Substrats notwendig, sodass ein klinischer Einsatz unwahrscheinlich scheint (Powers und Workman 2007). Triptolide, eine weitere Substanz, die unter anderem HSF-1 inhibiert, erzielte bislang vielversprechendere Ergebnisse (Powers und Workman 2007).

Erschwert wird dieser Ansatz allerdings durch die Tatsache, dass bislang noch kein spezifischer Hemmstoff von HSF-1 existiert (Whitesell et al. 2012).

Mittlerweile wurden weitere HSP90-Hemmer erforscht und lieferten ermutigende Resultate. Hierbei wurden nicht nur Inhibitoren, die ähnlich den Geldanamycin-Derivaten eine Bindung von ATP am N-terminalen Ende verhindern, sondern auch Substanzen mit differierenden Wirkmechanismen untersucht.

Ganetespib, ein synthetischer HSP90-Hemmer, der am aminoterminalen Ende von HSP90 bindet, zeigte in einer Studie von Shimamura et al. (2012) in NSCLC-Zellen eine gute antiproliferative Wirksamkeit und erzielte eine Degradation der Zielproteine von HSP90.

In Imatinib-sensiblen und -resistenten GIST-Zelllinien und einem GIST-Xenograft-Modell erreichte AT13387 eine Proliferationshemmung mit Depletion einiger Zielproteine von HSP90 (Smyth et al. 2012).

EC5, ein Dimer von Geldanamycin, führte in vitro sowie im Maus-Modell zur Apoptose der Tumorzellen und bewirkte die Verminderung verschiedener Client Proteine (Yin et al. 2005).

In einer Arbeit von Li et al. (2009) konnte eine Inhibition von HSP90 durch (-)-Epigallocatechin-3-gallate, eine in grünem Tee enthaltene Substanz, mit daraus resultierender Herunterregulation der Client Proteine von HSP90 und konsekutivem antiproliferativem Effekt in Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden.

Neue synthetische Pyrazol/Isoxazol-Amid-Analoga zeigten eine vielversprechende biologische Aktivität mit einer stärkeren Bindungsaffinität an HSP90 als herkömmliche HSP90-Inhibitoren. Zudem wirkten die synthetischen HSP90-Hemmer unabhängig von der NQO1-Konzentration der Zellen, was Resistenzen gegen diese Präparate unwahrscheinlich macht (Sharp et al. 2007).

Ein weiterer Ansatz ist eine Hemmung der Funktion von HSP90 über eine Inhibition der Assoziation des HSP90-Multichaperon-Komplexes. Diverse Studien demonstrierten eine erfolgreiche Degradation verschiedener Client Proteine:

Eine Arbeit von Zhang et al. (2008) zeigte eine verbesserte Effizienz bei simultaner Inhibition von HSP90 und dem Co-Chaperon Cdc37.

Auch das einer Behandlung mit 17-AAG vorangehende Ausschalten von AHA1, einem weiteren Co-Chaperon, in verschiedenen humanen Krebszelllinien führte zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber dem Geldanamycin-Derivat in vitro (Powers und Workman 2006).

Einige Versuchsgruppen beschäftigten sich mit Proteasom-Inhibitoren. Diese hemmen das Proteasom in seiner Aktivität, was durch eine Akkumulation von nicht-funktionstüchtigen Proteinen letztendlich in der Apoptose der Zelle resultiert. In Kombination mit HSP90-Hemmern lieferten Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib ermutigende Resultate (Mimnaugh et al. 2004; Neckers 2007).

Eine Acetylierung von Lysinresten an HSP90 inhibiert den ATPase-Zyklus des Moleküls und ist Angriffspunkt der Histon-Deacetylase-Inhibitoren. Zusammen mit HSP90-Hemmern erzielten diese eine synergistische Wirkung (Whitesell und Lindquist 2005).

Die Kombination von HSP90-Inhibitoren mit bereits etablierten, aber durch Resistenzen limitierten Chemotherapeutika ist in Theorie und Praxis erfolgversprechend. Da gerade maligne entartete Zellen auf die Anwesenheit von HSP90 als Chaperon angewiesen sind, könnte durch die Hemmung des Hitzeschockproteins die Adaptation der Krebszellen verhindert werden (Kamal et al. 2003; Whitesell et al. 2012). Eine Resistenz gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika ist oftmals ein multifaktorielles Geschehen, sodass eine Inhibition von HSP90, welche zu einer Unterbrechung diverser Signaltransduktionwege führt, die an der Entwicklung von Resistenzen beteiligt sind, eine Sensitivierung von Krebszellen für eine Chemotherapie bewirken könnte (Perego et al. 2010). Tatsächlich befinden sich diesbezüglich mehrere Substanzen in Erprobung:

In Neuroblastomzellen führte eine Behandlung mit 17-AAG, gefolgt von Doxorubicin, zu einer verstärkten Wachstumsinhibition (Sarangi et al. 2012).

Eine Phase I-Studie von Hubbard et al. (2011) schloss 39 Patienten mit soliden Tumoren unterschiedlicher Entitäten ein, die 17-AAG und Cisplatin, 17-AAG und Gemcitabine oder eine Kombination der drei Substanzen erhielten. Alle Patienten hatten bereits eine Chemo- oder Radiotherapie durchlaufen. Es konnten sechs partielle Remissionen beobachtet werden, die vorwiegend in der Gruppe mit der Dreierkombination auftraten. 13 Patienten zeigten eine stabile Erkrankung, welche in allen Behandlungsgruppen gleich häufig

vorkam. Die in peripheren Blutzellen gemessene Quantität an HSP90 war nach Medikamentenapplikation signifikant abgefallen, während HSP70 anstieg. Interessanterweise zeigte sich eine Korrelation zwischen einer verminderten Expression von HSP90 und dem Ansprechen auf die Therapie.

Iyer et al. (2012) führten eine Phase I-Studie mit 46 Patienten durch, die 17-AAG in Kombination mit Docetaxel erhielten. Eine partielle Remission konnte von einem Patienten erreicht werden. 19 Patienten zeigten ein verlängertes progressionsfreies Intervall. In peripheren Monozyten konnte eine gesteigerte Expression von HSP70 nachgewiesen werden, die Client Proteine Akt und Raf wiesen jedoch keine dosisabhängige Degradation auf.

In HER2-positiven Mammakarzinomen konnten partielle Remissionen durch Einsatz von Trastuzumab in Kombination mit 17-AAG beziehungsweise 17-DMAG erzielt werden (Jhaveri et al. 2012; Modi et al. 2011).

Inzwischen hat sich das Einsatzgebiet von HSP90-Hemmstoffen bereits auf nicht-maligne Erkrankungen ausgeweitet. So konnte der Replikationszyklus des Hepatitis B- und C-Virus sowie des Herpes simplex-Virus durch Geldanamycin gehemmt werden (Hu et al. 1996; Li et al. 2004; Waxman et al. 2001). Auch bei Autoimmunerkrankungen ist ein Einsatz von HSP90-Hemmern denkbar, da über eine Inhibition von HSP90 die Funktion der T- und B-Zellen beeinträchtigt wird. Eine Studie von Shimp et al. (2012) zeigte, dass HSP90 die Expression proinflammatorischer Proteine bei Lupus erythematodes begünstigt. Die Hemmung des Hitzeschockproteins führt somit zu einer Reduktion der Entzündungsmediatoren. Im Maus-Modell kam es durch HSP90-Inhibition zu einer verminderten Proteinurie und einer Verringerung der Milzgröße (Shimp et al. 2012).

Zudem wurde in Tierversuchen bereits ein Schutz des Gehirns vor fokaler Ischämie durch Geldanamycin erreicht (Lu et al. 2002). Auch im Herzmuskel soll Geldanamycin protektive Eigenschaften gegenüber Ischämie aufweisen (Conde et al 1997; Kamal et al. 2004).

Diese Datenlage unterstreicht die potenzielle Möglichkeit der klinischen Anwendung von HSP90-Inhibitoren.

Zusammenfassend hemmten die in dieser Arbeit untersuchten Geldanamycin-Derivate 17-AAG, 17-AEP-GA und 17-DMAG alle hoch signifikant in geringen Dosen das Wachstum der getesteten Pankreaskarzinomzelllinien. Des Weiteren bewirkten die Inhibitoren eine

synchrone Herunterregulation von für Krebszellen essentiellen Client Proteinen von HSP90 und erreichten somit eine simultane Unterbrechung proliferativer und antiapoptotischer Signalwege. Bei Karzinomen des Pankreas, die Resistenzen gegen Gemcitabine und/oder 5-FU aufweisen, existiert bisher keine wirksame Therapiealternative. Die in dieser Studie untersuchten HSP90-Inhibitoren zeigten auch bei resistenten Zelllinien eine signifikante Wachstumshemmung und ermöglichen daher neue Therapieoptionen.

Eine wie bei der target therapy beobachtete Resistenz gegenüber den verwendeten Substanzen ist aufgrund der vielfältigen Angriffspunkte von HSP90 und der Abhängigkeit der Krebszelle von den proteinstabilisierenden Chaperonen selten.

Auch das Toxizitätsprofil der neueren Geldanamycin-Derivate hat sich im Vergleich zu den Vorgängersubstanzen deutlich verbessert und erlaubt so einen nebenwirkungsärmeren Einsatz in der Klinik.

Da sich 17-AAG und 17-DMAG bereits in klinischer Erprobung befinden und bislang positive Resultate erzielen, stellt sich der zukünftige Einsatz der Geldanamycin-Derivate in der klinischen Therapie von Pankreaskarzinomen erfolgversprechend dar. Durch das Lösen von 17-AAG in DMSO wurden jedoch zum Teil zusätzliche Nebenwirkungen beobachtet, sodass das wasserlösliche 17-DMAG beziehungsweise synthetische HSP90-Hemmer eine vielversprechendere Zukunft aufweisen.

Abzuwarten bleibt, ob durch Kombination mit anderen proliferationshemmenden Medikamenten die antiproliferative Wirkung auf maligne Tumoren maximiert werden kann.

## 5 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die einzige potenziell kurative Therapie bei Pankreaskarzinomen stellt die chirurgische Entfernung des Malignoms dar, die aufgrund unspezifischer Symptome und der damit verbundenen späten Diagnosestellung jedoch nur in seltenen Fällen erfolgen kann. Auch nach operativer Intervention liegt die Fünfjahresüberlebensrate bei weniger als 15%. Als adjuvante Therapie oder in einer palliativen Situation wird in Deutschland derzeit eine Chemotherapie mit Gemcitabine durchgeführt. Bei Gemcitabine- und 5-FU-resistenten Karzinomen besteht bislang keine Behandlungsalternative.

HSP90 ist ein für das Überleben von Zellen essentielles Protein, das zytoprotektive und antiapoptotische Funktionen wahrnimmt. In seiner Funktion als „molekulares Chaperon“ assistiert es bei der Faltung und Stabilisierung diverser Proteine. Für maligne entartete Zellen ist HSP90 unabdingbar, da es Onkoproteine stabilisiert und in einer aktiven Konformation hält. Aufgrund der Möglichkeit einer simultanen Unterbrechung verschiedener Signaltransduktionskaskaden durch funktionelle HSP90-Inhibition stellt es eine attraktive Therapieoption dar.

**Methodik:** Mittels MTT-Test wurde der antiproliferative Effekt der wasserlöslichen Geldanamycin-Derivate 17-AEP-GA und 17-DMAG sowie des nicht-wasserlöslichen Derivats 17-AAG auf Gemcitabine- und 5-FU-resistente Adenokarzinomzellen des Pankreas überprüft. Im Anschluss erfolgte eine Analyse der Auswirkungen der HSP90-Inhibition auf Zielproteine von HSP90 durch Western Blot.

**Ergebnisse:** Alle untersuchten Geldanamycin-Derivate hemmten das Wachstum der vier Zelllinien hochsignifikant, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den wasserlöslichen und den wasserunlöslichen HSP90-Inhibitoren bestand. Der  $IC_{50}$  lag bei unter  $1\mu\text{M}$ . Das wasserlösliche 17-DMAG erreichte die effektivste Wachstumsinhibition. Im Western Blot konnte eine Depletion diverser Client Proteine von HSP90 nach dessen Inhibition demonstriert werden. In allen Zelllinien kam es zu einer Herunterregulation von EGFR und IGF-1R $\beta$  sowie von MAPK und Akt, mit Ausnahme der Zelllinie 5156, in der nur eine geringe Depletion von MAPK und Akt nachgewiesen werden konnte. Eine Induktion der Apoptose konnte durch Nachweis von cleaved Caspase-3 und cleaved PARP gezeigt werden. Die Hitzeschockproteine HSP90, HSP70 und HSP27 wurden nach Behandlung mit den HSP90-Hemmern kompensatorisch hochreguliert.

**Fazit:** Aufgrund der erfolgreichen Wachstumsinhibition der Krebszellen sowie der Depletion der Zielproteine von HSP90 in vitro erscheint der künftige Einsatz der Geldanamycin-Derivate in der Tumortherapie vielversprechend, zumal durch Verwendung der wasserlöslichen Derivate ein favorables Nebenwirkungsprofil erzielt werden kann. Diverse anderer Forschungsgruppen erreichten in vitro an unterschiedlichen Tumorentitäten ähnliche Resultate. Mittlerweile werden die Geldanamycin-Derivate in klinischen Phase I-Studien an fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen erprobt.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AHA1	activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1
AIF	apoptosis-inducible factor
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	Ak thymoma kinase
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	BCL2-associated X protein
BCA	bicinchoninic acid
BCR-ABL	breakpoint cluster region – actin binding LIM protein
BRAF	b-rapidly accelerated fibrosarcoma
BRCA-Gen	breast cancer Gen
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN2-Gen	cyclin-dependent kinase 2 Gen
Cdc37	cell division cycle 37 protein
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CT	Computertomographie
Cu	Kupfer

CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
Daxx	death-associated protein 6
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DPC4-Gen	deleted in pancreatic cancer Gen
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ESPAC	European Study Group on Pancreatic Cancer
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
Fas	tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
FBS	fetal bovine serum
Fc-Bereich	crystallisable fragment
FGF	fibroblast growth factor
G1-Phase	gap 1 Phase
GFR	growth factor receptor
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
Grp	glucose-regulated protein
hCNT3	human concentrative nucleoside transporter 3
hENT1	human equilibrative nucleoside transporter 1
HER2	human epithelial growth factor receptor 2

## Abkürzungsverzeichnis

---

HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
Hip	Hsc70-interacting protein
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
Hop	Hsp70/Hsp90 organizing protein
HSC70	Heat shock cognate protein 70
HSF	heat shock transcription factor
HSP	heat shock protein
IC <sub>50</sub>	half maximal inhibitory concentration
ICGC	International Cancer Genome Consortium
IGF-1R $\beta$	insulin-like growth factor-1 receptor $\beta$
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IPMN	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
JNK1	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KRAS	Kirsten rat sarcoma
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCN	muzinös-zystische Neoplasie
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP2	matrix metalloproteinase 2

## Abkürzungsverzeichnis

---

mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikographie
MTS	3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NF- $\kappa$ B	nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells
nm	Nanometer
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) 1
NSCLC	non-small cell lung cancer
PanIn	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	phosphate-buffered saline
PDK-1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
PES	phenazine ethosulfate
pH	potentia Hydrogenii
P <sub>i</sub>	inorganic phosphate
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate
PKC	Proteinkinase C

## Abkürzungsverzeichnis

---

Raf-1	rapidly accelerated fibrosarcoma-1 kinase
Ras	rat sarcoma kinase
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis
SOS	son of sevenless
S-Phase	Synthesephase
Src	sarcoma tyrosine kinase
TBS	tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRAP1	TNF-receptor associated protein 1
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol
5-FU	5-Fluorouracil
17-AAG	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
17-AEP-GA	17-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)amino-17-demethoxygeldanamycin
17-DMAG	17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin

## 7 Literaturverzeichnis

Adjei A (2001): Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 93 (14): 1062-1074.

Adler G, Seufferlein T, Bischoff S, Brambs H, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr J, Lutz M, Micke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag P, Schmid R, Schmiegel W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I (2007): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. *Z Gastroenterol* 45: 487-523.

Ahsan A, Ramanand S, Whitehead C, Hiniker S, Rehemtulla A, Pratt W, Jolly S, Gouveia C, Truong K, Van Waes C, Ray D, Lawrence T, Nyati M (2012): Wild-type EGFR Is Stabilized by Direct Interaction with HSP90 in Cancer Cells and Tumors. *Neoplasia* 14 (8): 670-677.

Ali A, Ali S, El-Rayes B, Philip P, Sarkar F (2009): Exploitation of protein kinase C: A useful target for cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 35: 1-8.

Allema J, Reinders M, van Gulik T, Koelemay M, Van Leeuwen D, de Wit L, Gouma D, Obertop H (1995): Prognostic Factors for Survival after Pancreaticoduodenectomy for Patients with Carcinoma of the Pancreatic Head Region. *Cancer* 75 (8): 2069-2056.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M (1988): Most Human Carcinomas of the Exocrine Pancreas Contain Mutant *c-K-ras* Genes. *Cell* 53: 549-554.

American Joint Committee on Cancer.

URL: <http://www.cancerstaging.org/staging/index.html> (Stand: 02.07.2013, 21:49).

Banerji U, O'Donnell A, Scurr M, Pacey S, Stapleton S, Asad Y, Simmons L, Maloney A, Raynaud F, Campbell M, Walton M, Lakhani S, Kaye S, Workman P, Judson I (2005a): Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of 17-Allylamino, 17-Demethoxygeldanamycin in Patients With Advanced Malignancies. *J Clin Oncol* 23 (18): 4152-4161.

Banerji U, Walton M, Raynaud F, Grimshaw R, Kelland L, Valenti M, Judson I, Workman P (2005b): Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships for the Heat Shock Protein

90 Molecular Chaperone Inhibitor 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Human Ovarian Cancer Xenograft Models. *Clin Cancer Res* 11 (19): 7023-7032.

Banerji U (2009): Heat Shock Protein 90 as a Drug Target: Some Like It Hot. *Clin Cancer Res* 15 (1): 9-14.

Bauer S, Yu L, Demetri G, Fletcher J (2006): Heat Shock Protein 90 Inhibition in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor. *Clin Cancer Res* 66 (18): 9153-9161.

Beere H, Wolf B, Cain K, Mosser D, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto R, Cohen G, Green D (2000): Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol* 2: 469-475.

Benassai G, Mastroianni M, Quarto G, Cappiello A, Giani U, Forestieri P, Mazzeo F (2000): Factors Influencing Survival After Resection for Ductal Adenocarcinoma of the Head of the Pancreas. *J Surg Oncol* 73: 212-218.

Bergman A, Pinedo H, Peters G (2002): Determinants of resistance to 2'-2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resis Update* 5: 19-33.

Biankin A, Hudson T (2011): Somatic variation and cancer: therapies lost in the mix. *Hum Genet* 130: 79-91.

Brondani Da Rocha A, Regner A, Grivicich I, Pretto Schunemann D, Diel C, Kovaleski G, Brunetto De Farias C, Mondadori E, Almeida L, Braga Filho A, Schwartzmann G (2004): Radioresistance is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines. *Int J Oncol* 25: 777-785.

Brown M, Zhu L, Schmidt C, Tucker P (2007): Hsp90 - From signal transduction to cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 241-246.

Brüning A (2004): Pankreaskarzinom. In: *Basislehrbuch Innere Medizin*. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. 3. Auflage, Urban&Fischer, München, 721-724.

Bukau B, Horwich A (1998): The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* 92: 351-366.

Burris H, Moore M, Andersen J, Green M, Rothenberg M, Modiano M, Cripps M, Portenoy R, Storniolo A, Tarassoff P, Nelson R, Dorr A, Stephens C, Von Hoff D (1997):

Improvements in Survival and Clinical Benefit With Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients With Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial. *J Clin Oncol* 15 (6): 2403-2413.

Calderwood S, Khaleque M, Sawyer D, Ciocca D (2006): Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31 (3): 164-172.

Campbell P, Yachida S, Mudie L, Stephens P, Pleasance E, Stebbings L, Morsberger L, Latimer C, McLaren S, Lin M, McBride D, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler A, Teague J, Griffin C, Burton J, Swerdlow H, Quail M, Stratton M, Iacobuzio-Donahue C, Futreal P (2010): The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 467 (7319): 1109-1113.

Cao X, Bloomston M, Zhang T, Frankel W, Jia G, Wang B, Hall N, Koch R, Cheng H, Knopp M, Sun D (2008): Synergistic Antipancreatic Tumor Effect by Simultaneously Targeting Hypoxic Cancer Cells With HSP90 Inhibitor and Glycolysis Inhibitor. *Clin Cancer Res* 14 (6): 1831-1839.

Charette S, Lavoie J, Lambert H, Landry J (2000): Inhibition of Daxx-Mediated Apoptosis by Heat Shock Protein 27. *Mol Cell Biol* 20 (20): 7602-7612.

Chari S, Leibson C, Rabe K, Ransom J, De Andrade M, Petersen G (2005): Probability of Pancreatic Cancer Following Diabetes: A Population-Based Study. *Gastroenterology* 129 (2): 504-511.

Chen J, Somanath P, Razorenova O, Hay W, Bornstein P, Byzova T (2005): Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability *in vivo*. *Nat Med* 11 (11): 1188-1196.

Chiosis G, Neckers L (2006): Tumor Selectivity of Hsp90 Inhibitors: The Explanation Remains Elusive. *ACS Chem Biol* 1 (5): 279-284.

Ciocca D, Calderwood S (2005): Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10 (2): 86-103.

Citri A, Harari D, Shohat G, Ramakrishnan P, Gan J, Lavi S, Eisenstein M, Kimchi A, Wallach D, Pietrokovski S, Yarden Y (2006): Hsp90 Recognizes a Common Surface on Client Kinases. *J Biol Chem* 281 (20): 14361-14369.

Cohen S, Ho L, Ranganathan S, Abbruzzese J, Alpaugh R, Beard M, Lewis N, McLaughlin S, Rogatko A, Perez-Ruixo J, Thistle A, Verhaeghe T, Wang H, Weiner L, Wright J, Hudes G, Meropol N (2003): Phase II and Pharmacodynamic Study of the Farnesyltransferase Inhibitor R115777 as Initial Therapy in Patients With Metastatic Pancreatic Carcinoma. *J Clin Oncol* 21 (7): 1301-1306.

Conde A, Lau S, Dillmann W, Mestrlil R (1997): Induction of Heat Shock Proteins by Tyrosine Kinase Inhibitors in Rat Cardiomyocytes and Myogenic Cells Confers Protection Against Simulated Ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 26: 1927-1938.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet J, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M, for the Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer and the PRODIGE Intergroup (2011a): FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 364 (19): 1817-1825.

Conroy T, Gavaille C, Adenis A (2011b): Metastatic pancreatic cancer: old drugs, new paradigms. *Curr Opin Oncol* 23: 390-395.

Conroy T, Mitry E (2011): Chimiothérapie de l'adénocarcinome du pancréas métastatique: defies et espoirs. *Bulletin du cancer* 98 (12): 1439-1446.

Degen L (2008): Cystic and solid lesions of the pancreas. *Best Pract Res Cl GA* 22 (1): 91-103.

Deutsches Krebsregister. Bauchspeicheldrüsenkrebs.

URL:

[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html) (Stand: 30.06.2013, 13:46).

El Maalouf G, Le Tourneau C, Batty G, Faivre S, Raymond E (2009): Markers involved in resistance to cytotoxics and targeted therapeutics in pancreatic cancer. *Cancer Treat Rev* 35: 167-174.

El-Rayes B, Gadgeel S, Shields A (2006): Phase I Study of Bryostatins 1 and Gemcitabine. *Clin Cancer Res* 12 (23): 7059-7062.

El-Rayes B, Ali S, Philip P, Sarkar F (2008): Protein Kinase C. A Target for Therapy in Pancreatic Cancer. *Pancreas* 36 (4): 346-352.

Farnell M, Pearson R, Sarr M, DiMagno E, Burgart L, Dahl T, Foster N, Sargent D, the Pancreas Cancer Working Group (2005): A prospective randomized trial comparing standard pancreatoduodenectomy with pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy in resectable pancreatic head adenocarcinoma. *Surgery* 138 (4): 618-628.

Flaherty K, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov L, Hassel J, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin J, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton M, Becker J, Casey M, Sherman L, Wu F, Ouellet D, Martin A, Patel K, Schadendorf D (2012): Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* 367 (2): 107-114.

Francis I (2003): Role of CT in the detection and staging of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Imaging* 4: 10-14.

Frese S, Schaper M, Kuster J, Miescher D, Jäättelä M, Buehler T, Schmid R (2003): Cell death induced by down-regulation of heat shock protein 70 in lung cancer cell lines is p53-independent and does not require DNA cleavage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126: 748-754.

Gabai V, Yaglom J, Volloch V, Meriin A, Force T, Koutroumanis M, Massie B, Mosser D, Sherman M (2000): Hsp72-Mediated Suppression of c-Jun N-Terminal Kinase Is Implicated in Development of Tolerance to Caspase-Independent Cell Death. *Mol Cell Biol* 20 (18): 6826-6836.

Garrido C, Arrigo A, Solary E (2000): Hsp27: A small heat shock protein with protective and tumorigenic effects. *Recent Res Devel Cancer* 2: 105-114.

Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G (2001): Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 433-442.

Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G (2006): Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 5 (22): 2592-2601.

Geer R, Brennan M (1993): Prognostic Indicators for Survival After Resection of Pancreatic Adenocarcinoma. *Am J Surg* 165: 68-73.

Ghaneh P, Costello E, Neptolemos J (2007): Biology and Management of Pancreatic Cancer. *Gut* 56: 1134-1152.

Ghaneh P, Smith R, Tudor-Smith C, Raraty M, Neptolemos JP (2008): Neoadjuvant and adjuvant strategies for pancreatic cancer. *EJSO* 34: 297-305.

Gorre M, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao P, Sawyers C (2001): Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification. *Science* 293: 876-880.

Guo W, Reigan P, Siegel D, Ross D (2008): Enzymatic Reduction and Glutathione Conjugation of Benzoquinone Ansamycin Heat Shock Protein 90 Inhibitors: Relevance for Toxicity and Mechanism of Action. *Drug Metab Dispos* 36 (10): 2050-2057.

Gurbuxani S, Bruey J, Fromentin A, Larmonier N, Parcellier A, Jäättelä M, Martin F, Solary E, Garrido C (2001): Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene* 20: 7478-7485.

Hanahan D, Weinberg R (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.

Harnack L, Anderson K, Zheng W, Folsom A, Sellers T, Kushi L (1997): Smoking, alcohol, coffee, and tea intake and incidence of cancer of the exocrine pancreas: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6: 1081-1086.

Hartson S, Ottinger E, Huang W, Barany G, Burn P, Matts R (1998): Modular Folding and Evidence for Phosphorylation-induced Stabilization of an hsp90-dependent Kinase. *J Biol Chem* 273 (14): 8475-8482.

Hatake K, Tokudome N, Ito Y (2007): Next Generation Molecular Targeted Agents for Breast Cancer: Focus on EGFR and VEGFR Pathways. *Breast Cancer* 14 (2): 132-149.

Haupt A, Joberty G, Bantscheff M, Fröhlich H, Stehr H, Schweiger M, Fischer A, Kerick M, Boerno S, Dahl A, Lappe M, Lehrach H, Gonzalez C, Drewes G, Lange B (2012): Hsp90 inhibition differentially destabilizes MAP kinase and TGF-beta signaling components in cancer cells revealed by kinase-targeted chemoproteomics. *BMC Cancer* 12 (38).

- Hengartner M (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L (2012): Adjuvant and neoadjuvant treatment in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 18 (14): 1565-1572.
- Hishinuma S, Ogata Y, Tomikawa M, Ozawa I, Hirabayashi K, Igarashi S (2006): Patterns of Recurrence After Curative Resection of Pancreatic Cancer, Based on Autopsy Findings. *J Gastrointest Surg* 10: 511-518.
- Hong D, Banerji U, Tavana B, George G, Aaron J, Kurzrock R (2013): Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): Lessons learned and future directions. *Cancer Treat Rev* 39: 375-387.
- Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke P (2001): Inhibition of Signal Transduction by the Hsp90 Inhibitor 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin Results in Cytostasis and Apoptosis. *Cancer Res* 61: 4003-4009.
- Hruban R, Canto M, Goggins M, Schulick R, Klein A (2010): Update on Familial Pancreatic Cancer. *Adv Surg* 44: 293-311.
- Hu J, Seeger C (1996): Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse Transcriptase. *Proc Natl Acad Sci* 93: 1060-1064.
- Hubbard J, Erlichman C, Toft D, Qin R, Stensgard B, Felten S, Ten Eyck C, Batzel G, Ivy S, Haluska P (2011): Phase I study of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, gemcitabine and/or cisplatin in patients with refractory solid tumors. *Invest New Drugs* 29 (3): 473-480.
- Hudson T, The International Cancer Genome Consortium (2010): International network of cancer genome projects. *Nature* 464 (7291): 993-998.
- Invivogen Herstellerinformation Geldanamycin.  
URL: <http://www.invivogen.com/geldanamycin> (Stand: 20.07.2013, 15:21 Uhr).
- Invivogen Herstellerinformation 17-AAG.  
URL: <http://www.invivogen.com/17-aag> (Stand: 20.07.2013, 15:22 Uhr).
- Invivogen Herstellerinformation 17-AEP-GA.  
URL: <http://www.invivogen.com/17-aep-ga> (Stand: 20.07.2013, 15:23 Uhr).

Invivogen Herstellerinformation 17-DMAG.

URL: <http://www.invivogen.com/17-dmag> (Stand: 20.07.2013, 15:24 Uhr).

Iyer G, Morris M, Rathkopf D, Slovin S, Steers M, Larson S, Schwartz L, Curley T, DeLaCruz A, Ye Q, Heller G, Egorin M, Ivy S, Rosen N, Scher H, Solit D (2012): A phase I trial of docetaxel and pulse-dose 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 69 (4): 1089-1097.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun M (2007): Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57: 43-66.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010): Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60: 277-300.

Jhaveri K, Miller K, Rosen L, Schneider B, Chap L, Hannah A, Zhong Z, Ma W, Hudis C, Modi S (2012): A Phase I Dose-Escalation Trial of Trastuzumab and Alveposimycin Hydrochloride (KOS-1022; 17 DMAG) in the Treatment of Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 18: 5090-5098.

Jimeno A, Rubio-Viqueira B, Amador M (2005): Epidermal Growth Factor Receptor Dynamics Influences Response to Epidermal Growth Factor Receptor Targeted Agents. *Cancer Res* 65 (8): 3003-3010.

Jimeno A, Hidalgo M (2006): Molecular biomarkers: their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 5 (4): 787-796.

Kalinowska M, Garnarcz W, Pietrowska M, Garrard W, Widlak P (2005): Regulation of the human apoptotic DNase/RNase Endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis* 10 (4): 821-830.

Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm M, Fritz L, Burrows F (2003): A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425: 407-410.

Kamal A, Boehm M, Burrows F (2004): Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends Mol Med* 10 (4): 283-290.

Kerr J, Wyllie A, Currie A (1972): Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.

Khalil A, Kabapy N, Deraz S, Smith C (2011): Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta* 1816: 89-104.

Khosravi-Far R, Der C (1994): The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev* 13: 67-89.

Klein A (2012): Genetic Susceptibility to Pancreatic Cancer. *Mol Carcinog* 51 (1): 14-24.

Klein W, Hruban R, Klein-Szanto A, Wilentz R (2002): Direct Correlation between Proliferative Activity and Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN): Additional Evidence for a Recently Proposed Model of Progression. *Mod Pathol* 15 (4): 441-447.

Koga F, Kihara K, Neckers L (2009): Inhibition of Cancer Invasion and Metastasis by Targeting the Molecular Chaperone Heat-shock Protein 90. *Anticancer Res* 29: 797-808.

Koorstra J, Feldmann G, Habbe N, Maitra A (2008): Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs). *Langenbecks Arch Surg* 393 (4): 561-570.

Krukenberg K, Street T, Lavery L, Agard D (2011): Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Q Rev Biophys* 44 (2): 229-255.

Kummar S, Gutierrez M, Gardner E, Chen X, Figg W, Zajac-Kaye M, Chen M, Steinberg S, Muir C, Yancey M, Horneffer Y, Juwara L, Melillo G, Ivy S, Merino M, Neckers L, Steeg P, Conley B, Giaccone G, Doroshow J, Murgo A (2010): Phase I Trial of 17-Dimethylaminoethylamino-17-Demethoxygeldanamycin (17-DMAG), a Heat Shock Protein Inhibitor, Administered Twice Weekly in Patients with Advanced Malignancies. *Eur J Cancer* 46 (2): 340.

Kusuma B, Duerfeldt A, Blagg B (2011): Synthesis and biological evaluation of arylated novobiocin analogs as Hsp90 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 21 (23): 7170-7174.

Lang S, Moser C, Gaumann A, Klein D, Glockzin G, Popp F, Dahlke M, Piso P, Schlitt H, Geissler E, Stoeltzing O (2007): Targeting Heat Shock Protein 90 in Pancreatic Cancer Impairs Insulin-like Growth Factor-I Receptor Signaling, Disrupts an Interleukin-6/Signal-

Transducer and Activator of Transcription 3/Hypoxia-Inducible Factor-1 Autocrine Loop, and Reduces Orthotopic Tumor Growth. *Clin Cancer Res* 13 (21): 6459-6468.

Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C (2007): Apoptosis Versus Cell Differentiation. *Prion* 1 (1): 53-60.

Lavoie J, Lambert H, Hickey E, Weber L, Landry J (1995): Modulation of Cellular Thermoresistance and Actin Filament Stability Accompanies Phosphorylation-Induced Changes in the Oligomeric Structure of Heat Shock Protein 27. *Mol Cell Biol* 15 (1): 505-516.

Lee C, Hong H, Chang Y, Chang W (2012): Inhibition of heat shock protein (Hsp) 27 potentiates the suppressive effect of Hsp90 inhibitors in targeting breast cancer stem-like cells. *Biochimie* 94: 1382-1389.

Lee K, Yi S, Chung M, Park S, Song S, Chung J, Park J (2013): Serum CA 19-9 and CEA Levels as a Prognostic Factor in Pancreatic Adenocarcinoma. *Yonsei Med J* 54 (3): 643-649.

Leng A, Liu T, Yang J, Cui J, Li X, Zhu Y, Xiong T, Zhang G, Chen Y (2012): The apoptotic effect and associated signaling of HSP90 inhibitor 17-DMAG in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Biol Int* 36: 893-899.

Li J, Saif M (2009): Any Progress in the Management of Advanced Pancreatic Cancer? *JOP J Pancreas* 10 (4): 361-365.

Li J, Richter K, Buchner J (2011): Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nat Struct Mol Biol* 18: 61-66.

Li Y, Tao P, Liu Y, Jiang J (2004): Geldanamycin, a Ligand of Heat Shock Protein 90, Inhibits the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 in Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (3): 867-872.

Li Y, Zhang T, Jiang Y, Lee H, Schwartz S, Sun D (2009): (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits Hsp90 Function by Impairing Hsp90 Association with Cochaperones in Pancreatic Cancer Cell Line Mia Paca-2. *Mol Pharmaceutics* 6 (4): 1152-1159.

Lilly Herstellerinformation Gemcitabine.

URL: <http://pi.lilly.com/us/gemzar.pdf> (Stand: 20.07.2013, 15:18).

Longley D, Harkin D, Johnston P (2003): 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature* 3: 330-338.

Lu A, Ran R, Parmentier-Batteur S, Nee A, Sharp F (2002): Geldanamycin induces heat shock proteins in brain and protects against focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 81: 355-364.

Lukasiewicz E, Miekus K, Kijowski J, Gozdzik J, Wilusz M, Bobis-Wozowicz S, Wiecha O, Majka M (2009): High anti tumor activity against rhabdomyosarcoma cells and low normal cells cytotoxicity of heat shock protein 90 inhibitors, with special emphasis on 17-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-amino-17-demethoxygeldanamycin. *J Physiol Pharmacol* 60 (3): 161-166.

Makrilia N, Syrigos K, Saif M (2011): Updates on Treatment of Gemcitabine-Refractory Pancreatic Adenocarcinoma. *JOP J Pancreas* 12 (4): 351-354.

Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Lévy P, Ruszniewski P (2002): Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 51: 849-852.

Matsumori Y, Hong S, Aoyama K, Fan Y, Kayama T, Sheldon R, Vexler Z, Ferriero D, Weinstein P, Liu J (2005): Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 899-910.

Mayer P, Harjung A, Breinig M, Fischer L, Ehemann V, Malz M, Scherübl H, Britsch S, Werner J, Kern M, Bläker H, Schirmacher P, Bergmann F (2012): Expression and therapeutic relevance of heat-shock protein 90 in pancreatic endocrine tumors. *Endocr-Relat Cancer* 19: 217-232.

Merl M, Abdelghany O, Li J, Saif M (2010): First-Line Treatment of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: Can We Do Better? *JOP J Pancreas* 11 (4): 317-320.

Miekus K, Kijowski J, Sekula M, Majka M (2012): 17AEP-GA, an HSP90 antagonist, is a potent inhibitor of glioblastoma cell proliferation, survival, migration and invasion. *Oncol Rep* 28: 1903-1909.

Millikan K, Deziel D, Silverstein J, Kanjo T, Christein J, Doolas A, Prinz R (1999): Prognostic Factors Associated with Resectable Adenocarcinoma of the Head of the Pancreas. *Ann Surg* 65 (7): 618-623.

Mimnaugh E, Xu W, Vos M, Yuan X, Isaacs J, Bisht K, Gius D, Neckers L (2004): Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 3: 551-566.

Mizuno K, Saido T, Ohno S, Tamaoki T, Suzuki K (1993): Staurosporine-related compounds, K252a and UCN-01, inhibit both cPKC and nPKC. *FEBS Letters* 330 (2): 114-116.

Modi S, Stopeck A, Linden H, Solit D, Chandarlapaty S, Rosen N, D'Andrea G, Dickler M, Moynahan M, Sugarman S, Ma W, Patil S, Norton L, Hannah A, Hudis C (2011): HSP90 Inhibition Is Effective in Breast Cancer: A Phase II Trial of Tanespimycin (17-AAG) Plus Trastuzumab in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Progressing on Trastuzumab. *Clin Cancer Res* 17: 5132-5139.

Moore M, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht J, Gallinger S, Au H, Murawa P, Walde D, Wolff R, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W (2007): Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25 (15): 1960-1966.

Nagakawa T, Nagamori M, Futakami F, Tsukioka Y, Kayahara M, Ohta T, Ueno K, Miyazaki I (1996): Results of Extensive Surgery for Pancreatic Carcinoma. *Cancer* 77 (4): 640-645.

Nanbu K, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Hamid A, Komatsu T, Mori T (1998): Prognostic Significance of Heat Shock Proteins HSP70 and HSP90 in Endometrial Carcinomas. *Cancer Detect Prev* 22 (6): 549-555.

National Cancer Institute.

URL: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html> (Stand: 02.07.2013, 21:52).

Neckers L, Ivy S (2003): Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* 15 (6): 419-424.

Neckers L (2007): Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci* 32 (3): 517-530.

Neckers L, Workman P (2012): Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clin Cancer Res* 18 (1): 64-76.

Neoptolemos J, Stocken D, Friess H, Bassi C, Dunn J, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr D, Büchler M, for the European Study Group for Pancreatic Cancer (2004): A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 350 (12): 1200-1210.

Neoptolemos J, Stocken D, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore M, Gallinger S, Mariette C, Wente M, Izbicki J, Friess H, Lerch M, Dervenis C, Olah A, Butturini G, Doi R, Lind R, Smith D, Valle J, Palmer D, Buckels J, Thompson J, McKay C, Rawcliffe C, Büchler M, for the European Study Group for Pancreatic Cancer (2010): Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection. *JAMA* 304 (10): 1073-1081.

Nieto J, Grossbard M, Kozuch P (2008): Metastatic Pancreatic Cancer 2008: Is the Glass Less Empty? *The Oncologist* 13: 562-576.

Nitecki S, Sarr M, Colby T, van Heerden J (1995): Long-Term Survival After Resection for Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas. *Ann Surg* 221 (1): 59-66.

Noble S, Goa K (1997): Gemcitabine. A Review of its Pharmacology and Clinical potential in non-Small Cell Lung Cancer and Pancreatic Cancer. *Drugs* 54 (3): 447-472.

Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jäättelä M (2000): Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci* 97 (14): 7871-7876.

Nylandsted J, Wick W, Hirt U, Rohde M, Leist M, Weller M, Jäättelä M (2002): Eradication of Glioblastoma, and Breast and Colon Carcinoma Xenografts by Hsp70 Depletion. *Cancer Res* 62: 7139-7142.

Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Høyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jäättelä M (2004): Heat Shock Protein 70 Promotes Cell Survival by Inhibiting Lysosomal Membrane Permeabilization. *J Exp Med* 200 (4): 425-435.

Ochel H, Eichhorn K, Gademann G (2001): Geldanamycin: the prototype of a class of antitumor drugs targeting the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones* 6 (2): 105-112.

Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein W, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H (2007): Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer. *JAMA* 297 (3): 267-277.

Ohhashi S, Ohuchida K, Mizumoto K, Fujita H, Egami T, Yu J, Toma H, Sadatomi S, Nagai E, Tanaka M (2008): Down-regulation of deoxycytidine kinase enhances acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer. *Anticancer Res* 28 (4B): 2205-2212.

Park H, Lee J, Huh S, Seo J, Choi E (2001): Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J* 20 (3): 446-456.

Pearl L, Prodromou C, Workman P (2008): The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J* 410: 439-453.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb M (2001): Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr Rev* 22 (2): 153-183.

Pedrazzoli S, DiCarlo V, Dionigi R, Mosca F, Pederzoli P, Pasquali C, Klöppel G, Dhaene K, Michelassi F and the Lymphadenectomy Study Group (1998): Standard versus extended lymphadenectomy associated with pancreatoduodenectomy in the surgical treatment of adenocarcinoma of the head of the pancreas: a multicenter, prospective, randomized study. *Ann Surg* 228 (4): 508-517.

Perego P, Cossa G, Zuco V, Zunino F (2010): Modulation of cell sensitivity to antitumor agents by targeting survival pathways. *Biochem Pharmacol* 80: 1459-1465.

Peter M, Heufelder A, Hengartner M (1997): Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci* 94: 12736-12737.

Pingpank J, Hoffman J, Ross E, Cooper H, Meropol N, Freedman G, Pinover W, LeVoyer T, Sasson A, Eisenberg B (2001): Effect of Preoperative Chemoradiotherapy on Surgical Margin Status of Resected Adenocarcinoma of the Head of the Pancreas. *J Gastrointest Surg* 5: 121-130.

Powers M, Workman P (2006): Targeting of multiple signaling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocr-Relat Cancer* 13: 125-135.

Powers M, Workman P (2007): Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. *FEBS Letters* 581: 3758-3769.

Powers M, Clarke P, Workman P (2008): Dual Targeting of HSC70 and HSP72 Inhibits HSP90 Function and Induces Tumor-Specific Apoptosis. *Cancer Cell* 14: 250-262.

Powers M, Clarke P, Workman P (2009): Death by chaperone. *Cell Cycle* 8 (4): 518-526.

Pratt W, Toft D (2003): Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery. *Exp Biol Med* 226: 111-133.

Prodromou C, Roe S, O'Brien R, Ladbury J, Piper P, Pearl L (1997): Identification and Structural Characterization of the ATP/ADP-Binding Site in the Hsp90 Molecular Chaperone. *Cell* 90: 65-75.

Ramanathan R, Trump D, Eiseman J, Belani C, Agarwala S, Zuhowski E, Lan J, Potter D, Ivy S, Ramalingam S, Brufsky A, Wong M, Tutchko S, Egorin M (2005): Phase I Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Study of 17-(Allylamino)-17-Demethoxygeldanamycin (17AAG, NSC 330507), a Novel Inhibitor of Heat Shock Protein 90, in Patients with Refractory Advanced Cancers. *Clin Cancer Res* 11 (9): 3385-3391.

Ramanathan R, Egorin M, Erlichman C, Remick S, Ramalingam S, Naret C, Holleran J, TenEyck C, Ivy P, Belani C (2010): Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, an Inhibitor of Heat-Shock Protein 90, in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* 28: 1520-1526.

Raut C, Tseng J, Sun C, Wang H, Wolff R, Crane C, Hwang R, Vauthey J, Abdalla E, Lee J, Pisters P, Evans D (2007): Impact of Resection Status on Pattern of Failure and Survival After Pancreaticoduodenectomy for Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann Surg* 246 (1): 52-60.

Reinmuth N, Thomas M (2007): Neue Therapiemöglichkeiten beim Lungenkarzinom. [http://www.journalonko.de/reddyphp/image.php%3Fid%3D1536%26ord%3D0%26kat%3Daktuell&imgrefurl=http://www.journalonko.de/aktuellview.php%3Fid%3D1536&usg=\\_\\_7nUVNZ5zxS3fQaeNx7dSP81a-UU=&h=283&w=378&sz=14&hl=de&start=0&zoom=1&tbnid=fXb-](http://www.journalonko.de/reddyphp/image.php%3Fid%3D1536%26ord%3D0%26kat%3Daktuell&imgrefurl=http://www.journalonko.de/aktuellview.php%3Fid%3D1536&usg=__7nUVNZ5zxS3fQaeNx7dSP81a-UU=&h=283&w=378&sz=14&hl=de&start=0&zoom=1&tbnid=fXb-)

8PR4NuJAHM:&tbnh=140&tbnw=188&ei=m3T\_UcqcJ8HetAbr\_4CoDw&itbs=1&iact=hc&vpx=4&vpy=254&dur=5998&hovh=194&hovw=260&tx=70&ty=64&page=1&ndsp=1&ved=1t:429,r:0,s:0,i:58 (Stand 05.08.2013, 11:52).

Richards E, Hickey E, Weber L, Masters J (1996): Effect of Overexpression of the Small Heat Shock Protein HSP27 on the Heat and Drug Sensitivities of Human Testis Tumor Cells. *Cancer Res* 56: 2446-2451.

Ritossa F (1962): A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18 (12): 571-573.

Rizvi M, Ghias K, Davies K, Ma C, Weinberg F, Munshi H, Krett N, Rosen S (2006): Enzastaurin (LY317615), a protein kinase C $\beta$  inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Mol Cancer Ther* 5: 1783-1789.

Rocha Lima C, Centeno B (2002): Update on pancreatic cancer. *Curr Opin Oncol* 14 (4): 424-430.

Roeder F, Timke C, Saleh-Ebrahimi L, Schneider L, Hackert T, Hartwig W, Kopp-Schneider A, Hensley F, Buechler M, Debus J, Huber P, Werner J (2012): Clinical phase I/II trial to investigate neoadjuvant intensity-modulated short term radiation therapy (5x5 gy) and intraoperative radiation therapy (15 gy) in patients with primarily resectable pancreatic cancer – NEOPANC. *BMC Cancer* 12 (112): 1-8.

Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo A, Buchner J, Gaestel M (1999): Regulation of Hsp27 Oligomerization, Chaperone Function, and Protective Activity against Oxidative Stress/Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  by Phosphorylation. *J Biol Chem* 274 (27): 18947-18956.

Sain N, Krishnan B, Ormerod M, De Rienzo A, Liu W, Kaye S, Workman P, Jackmann A (2006): Potentiation of paclitaxel activity by the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human ovarian carcinoma cell lines with high levels of activated AKT. *Mol Cancer Ther* 5: 1197-1208.

Samuel N, Hudson T (2012): The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 77-87.

Sarangi U, Paithankar K, Kumar J, Subramaniam V, Sreedhar A (2012): 17AAG Treatment Accelerates Doxorubicin Induced Cellular Senescence: Hsp90 Interferes with Enforced Senescence of Tumor Cells. *Drug Targets Insights* 6: 19-39.

Saridaki Z, Georgoulas V, Souglakos J (2010): Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 16 (10): 1177-1187.

Sawai A, Chandarlapaty S, Greulich H, Gonen M, Ye Q, Arteaga C, Sellers W, Rosen N, Solit D (2008). Inhibition of Hsp90 Down-regulates Mutant Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression and Sensitizes EGFR Mutant Tumors to Paclitaxel. *Cancer Res* 68: 589-596.

Scheibel T, Buchner J (1998): The Hsp90 Complex - A Super-Chaperone Machine as a Novel Target. *Biochem Pharmacol* 56: 675-682.

Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C (2007): Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 81: 15-27.

Sebolt-Leopold J, Dudley D, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan R, Teclé H, Barrett S, Bridges A, Przybranowski S, Leopold W, Saltiel A (1999): Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors *in vivo*. *Nat Med* 5 (7): 810-816.

Sharp S, Prodromou C, Boxall K, Powers M, Holmes J, Box G, Matthews T, Cheung K, Kalusa A, James K, Hayes A, Hardcastle A, Dymock B, Brough P, Barril X, Cansfield J, Wright L, Surgenor A, Foloppe N, Hubbard R, Aherne W, Pearl L, Jones K, McDonald E, Raynaud F, Eccles S, Drysdale M, Workman P (2007): Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone *in vitro* and *in vivo* by novel, synthetic, potent resorcinylic pyrazol/isoxazole amide analogues. *Mol Cancer Ther* 6: 1198-1211.

Shimamura T, Lowell A, Engelman J, Shapiro G (2005): Epidermal Growth Factor Receptors Harboring Kinase Domain Mutations Associate with the Heat Shock Protein 90 Chaperone and Are Destabilized following Exposure to Geldanamycins. *Cancer Res* 65 (14): 6401-6408.

Shimamura T, Shapiro G (2008): Heat Shock Protein 90 Inhibition in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 3 (6): S152-S159.

Shimamura T, Perera S, Foley K, Sang J, Rodig S, Inoue T, Chen L, Li D, Carretero J, Li Y, Sinha P, Carey C, Borgman C, Jimenez J, Meyerson M, Ying W, Barsoum J, Wong K, Shapiro G (2012): Ganetespib (STA-9090), a Nongeldanamycin HSP90 Inhibitor, Has Potent Antitumor Activity in In Vitro and In Vivo Models of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 18: 4973-4985.

Shimp S, Chafin C, Regna N, Hammond S, Read M, Caudell D, Rylander M, Reilly C (2012): Heat shock protein 90 inhibition by 17-DMAG lessens disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol* 9: 255-266.

Sidera K, Gaitanou M, Stellas D, Matsas R, Patsavoudi E (2008): A Critical Role for HSP90 in Cancer Cell Invasion Involves Interaction with the Extracellular Domain of HER-2. *J Biol Chem* 283 (4): 2031-2041.

Smith V, Sausville E, Camalier R, Fiebig H, Burger A (2005): Comparison of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17DMAG) and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) in vitro: effects on Hsp90 and client proteins in melanoma models. *Cancer Chemother Pharmacol* 56: 126-137.

Smyth T, Van Looy T, Curry J, Rodriguez-Lopez A, Wozniak A, Zhu M, Donsky R, Morgan J, Mayeda M, Fletcher J, Schöffski P, Lyons J, Thompson N, Wallis N (2012): The HSP90 inhibitor, AT13387, Is Effective against Imatinib-Sensitive and -Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor Models. *Mol Cancer Ther* 11 (8): 1799-1808.

Solit D, Ivy P, Kopil C, Sikorski R, Morris M, Slovin S, Kelly W, DeLaCruz A, Curley T, Heller G, Larson S, Schwartz L, Egorin M, Rosen N, Scher H (2007): Phase I Trial of 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res* 13 (6): 1775-1782.

Song D, Chaerkady R, Tan A, Garcia-Garcia E, Nalli A, Suarez-Gathier A, Lopez-Rios F, Zhang X, Solomon A, Tong J, Read M, Fritz C, Jimeno A, Pandey A, Hidalgo M (2008): Antitumor activity and molecular effects of the novel heat shock protein 90 inhibitor, IPI-504, in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 7 (10): 3275-3284.

Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, Pedrazzoli S (1996): Survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Surg* 83: 625-631.

Stankiewicz A, Lachapelle G, Foo C, Radicioni S, Mosser D (2005): Hsp70 Inhibits Heat-induced Apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation. *J Biol Chem* 280 (46): 38729-38739.

Stocken D, Büchler M, Dervenis C, Bassi C, Jeekel H, Klinkenbijl J, Bakkevold K, Takada T, Amano H, Neoptolemos J (2005): Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Canc* 92: 1372-1381.

Talamini G, Bassi C, Falconi M, Sartori N, Salvia R, Rigo L, Castagnini A, Di Francesco V, Frulloni L, Bovo P, Vaona B, Angelini G, Vantini I, Cavallini G, Pederzoli P (1999): Alcohol and Smoking as Risk Factors in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Dig Dis Sci* 44 (7): 1303-1311.

Talar-Wojnarowska R, Malecka-Panas E (2006): Molecular pathogenesis of pancreatic adenocarcinoma: Potential clinical implications. *Med Sci Monit* 12 (9): 186-193.

Taldone T, Gozman A, Maharaj R, Chiosis G (2008): Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. *Curr Opin Pharmacol* 8 (4): 370-374.

Taldone T, Sun W, Chiosis G (2009): Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 17 (6): 2225-2235.

Terry J, Lubieniecka J, Kwan W, Liu S, Nielsen T (2005): Hsp90 Inhibitor 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin Prevents Synovial Sarcoma Proliferation via Apoptosis in *In vitro* Models. *Clin Cancer Res* 11 (15): 5631-5637.

Tillotson B, Slocum K, Coco J, Whitebread N, Thomas B, West K, MacDougall J, Ge J, Ali J, Palombella V, Normant E, Adams J, Fritz C (2010): Heat Shock Protein 90 (Hsp90) inhibitor occupancy is a direct determinant of client protein degradation and tumor growth arrest in vivo. *J Biol Chem* 285 (51): 39835-39843.

Traverso L, Longmire W (1980): Preservation of the Pylorus in Pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 192 (3): 306-310.

Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne W, Szawlowski A, Schoffski P, Post S, Verslype C, Neumann H, Safran H, Humblet Y, Perez Ruixo J, Ma Y, Von Hoff D (2004): Phase III Trial of Gemcitabine Plus Tipifarnib Compared With

Gemcitabine Plus Placebo in Advanced Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol* 22 (8): 1430-1438.

Vargas-Roig L, Gago F, Tello O, Aznar J, Ciocca D (1998): Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 79: 468-475.

Verbeke C, Leitch D, Menon K, McMahon M, Guillou P, Anthony A (2006): Redefining the R1 resection in pancreatic cancer. *Br J Surg* 93: 1232-1237.

Verbeke C (2008): Resection margins and R1 rates in pancreatic cancer – are we there yet? *Histopathology* 52: 787-796.

Voss A, Thomas T, Gruss P (2000): Mice lacking HSP90 $\beta$  fail to develop a placental labyrinth. *Development* 127: 1-11.

Wandinger S, Richter K, Buchner J (2008): The Hsp90 Chaperone Machinery. *J Biol Chem* 283 (27): 18473-18477.

Warshaw A, Fernández-del Castillo C (1992): Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 326 (7): 455-465.

Waugh J, Clagett O (1946): Resection of the duodenum and head of the pancreas for carcinoma. *Surgery* 20: 224-232.

Waxman L, Whitney M, Pollok B, Kuo L, Darke P (2001): Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *PNAS* 98 (24): 13931-13935.

Whipple A, Parsons W, Mullins C (1935): Treatment of Carcinoma of the Ampulla of Vater. *Ann Surg* 102 (4):763-779.

Whitesell L, Lindquist S (2005): HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev* 5: 761-772.

Whitesell L, Santagata S, Lin N (2012): Inhibiting HSP90 to Treat Cancer: A Strategy in Evolution. *Curr Mol Medicine* 12: 1108-1124.

Willett C, Lewandrowski K, Warshaw A, Efird J, Compton C (1993): Resection Margins in Carcinoma of the Head of the Pancreas. *Ann Surg* 217 (2): 144-148.

Wu E, Zhou S, Bhat K, Ma Q (2013): CA 19-9 and Pancreatic Cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 11 (1): 53-55.

Wu X, Wanders A, Wardega P, Tinge B, Gedda L, Bergstrom S, Sooman L, Gullbo J, Bergqvist M, Hesselius P, Lennartsson J, Ekman S (2009): Hsp90 is expressed and represents a therapeutic target in human esophageal cancer using the inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Br J Cancer* 100: 334-343.

Xiong H, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff R, Deutsch J, Needle M, Abbruzzese J (2004): Cetuximab, a Monoclonal Antibody Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor, in Combination With Gemcitabine for Advanced Pancreatic Cancer: A Multicenter Phase II Trial. *J Clin Oncol* 22 (13): 2610-2616.

Xue M, Cao X, Zhong Y, Kuang D, Liu X, Zhao Z, Li H (2012): Insuline-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) Kinase Inhibitors in Cancer Therapy: Advances and Perspectives. *Curr Pharm Des* 18: 2901-2913.

Yen T, Evans D, Pedrazzoli S, Pasquali C, Sperti S, Nakakura E, Duncan M, Eckhauser F (2007): Resection for Neoplasms of the Pancreas. In: *Atlas of Upper Gastrointestinal and Hepato-pancreato-biliary Surgery*. Clavien P, Sarr M, Fong Y (Hrg). Springer, Berlin Heidelberg, 763-798.

Yeo C, Cameron J, Lillemoe K, Sitzmann J, Hruban R, Goodman S, Dooley W, Coleman J, Pitt H (1995): Pancreaticoduodenectomy for Cancer of the Head of the Pancreas. *Ann Surg* 221 (6): 721-733.

Yeo C, Cameron J, Sohn T, Lillemoe K, Pitt H, Talamini M, Hruban R, Ord S, Sauter P, Coleman J, Zahurak M, Grochow L, Abrams R (1997): Six Hundred Fifty Consecutive Pancreaticoduodenectomies in the 1990s: Pathology, Complications, and Outcomes. *Ann Surg* 226 (3): 248-260.

Yeo C, Cameron J, Lillemoe K, Sohn T, Campbell K, Sauter P, Coleman J, Abrams R, Hruban R (2002b): Pancreaticoduodenectomy With or Without Distal Gastrectomy and Extended Retroperitoneal Lymphadenectomy for Periapillary Adenocarcinoma, Part 2. *Ann Surg* 236 (3): 355-368.

Yeo T, Hruban R, Leach S, Wilentz R, Sohn T, Kern S, Iacobuzio-Donahue C, Maitra A, Goggins M, Canto M, Abrams R, Laheru D, Jaffee E, Hidalgo M, Yeo C (2002a): Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* 26 (4): 176-275.

Yin X, Zhang H, Burrows F, Zhang L, Shores C (2005): Potent Activity of a Novel Dimeric Heat Shock Protein 90 Inhibitor against Head and Neck Squamous Cell Carcinoma *In vitro* and *In vivo*. *Clin Cancer Res* 11 (10): 3889-3896.

Yu Y, Hamza A, Zhang T, Gu M, Zou P, Newman B, Li Y, Gunatilaka A, Zhan C, Sun G (2010): Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells. *Biochem Pharmacol* 79: 542-551.

Zajac M, Gomez G, Benitez J, Martinez-Delgado B (2010): Molecular signature of response and potential pathways related to resistance to the HSP90 inhibitor, 17AAG, in breast cancer. *BMC Med Genomics* 3 (44): 1-13.

Zhang T, Hamza A, Cao X, Wang B, Yu S, Zhan C, Sun D (2008): A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7 (1): 162-170.

Zonder J, Philip P (1999): Pharmacology and clinical experience with bryostatin 1: a novel anticancer drug. *Exp Opin Invest Drugs* 8 (12): 2189-2199.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Prozentuales Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom, Lungen- und Pankreaskarzinom	7
Abb.2	Prozentuale Verteilung der Tumorstadien bei Diagnosestellung, unterteilt nach ethnischer Herkunft	9
Abb.3	Computertomographische Darstellung einer Raumforderung des Pankreas	10
Abb.4	Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms	12
Abb.5	Rekonstruktion nach Whipple-OP	13
Abb.6	Strukturformel von Gemcitabine	14
Abb.7	Strukturformel von 5-FU	15
Abb.8	Prozentuales Überleben abhängig vom Erkrankungsstadium bei Diagnosestellung, unterteilt nach ethnischer Herkunft	17
Abb.9	Struktur von HSP90	19
Abb.10	ATPase-Zyklus von HSP90	21
Abb.11	Aktivierung verschiedener Signalwege durch HSP90 und dadurch erworbene Eigenschaften der Krebszelle	23
Abb.12	ATPase-Aktivität von HSP90 in Tumorgewebe im Vergleich zu gesunden Körperzellen nach Behandlung mit 17-AAG, Radicol oder KCl	24
Abb.13	Strukturformel von Geldanamycin	26
Abb.14	Strukturformel von 17-AAG	27
Abb.15	Strukturformel von 17-AEP-GA	27
Abb.16	Strukturformel von 17-DMAG	28

Abb.17	Apoptosewege und deren Beeinflussung durch HSPs	30
Abb.18	Prozentualer Anteil an vitalen Zellen der Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl gemessen nach 24, 48, 72 und 96 Stunden bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen von 1000/Kavität, 2000/Kavität und 5000/Kavität	53
Abb.19	Prozentuale Reduktion der Zellzahl der Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl 72 Stunden nach Exposition mit Gemcitabine bzw. 5-FU in Konzentrationen von 0,05µM bis 5µM	55
Abb.20	Prozentualer Anteil vitaler Zellen der Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl 72 bzw. 96 Stunden nach Applikation von 17-AAG, 17-AEP-GA und 17-DMAG in Konzentrationen von 0,1µM bis 1µM	58
Abb.21	IC <sub>50</sub> der Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl nach Applikation von 17-AAG, 17-AEP-GA und 17-DMAG in Konzentrationen von 0,1µM bis 10µM für 72 bzw. 96 Stunden	60
Abb.22	Veränderung der Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR und IGF-1Rβ in den Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl nach Inkubation mit 17-AAG, 17-DMAG, einer Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine sowie Gemcitabine für 48 Stunden	64
Abb.23	Expressionsveränderung der Kinasen MAPK und Akt in den Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl nach Inkubation mit 17-AAG, 17-DMAG, einer Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine sowie Gemcitabine für 48 Stunden	67
Abb.24	Veränderung der Expression von HSP90, HSP70 und HSP27 in den Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072 und d) L.3.6pl nach Inkubation mit 17-AAG, 17-DMAG, einer Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine sowie Gemcitabine für 48 Stunden	70

- Abb.25      Veränderung der Expression der Apoptosemarker cleaved PARP  
und cleaved Caspase-3 in den Zelllinien a) 5061, b) 5156, c) 5072  
und d) L.3.6pl nach Inkubation mit 17-AAG, 17-DMAG, einer  
Kombination von 17-DMAG und Gemcitabine sowie Gemcitabine  
für 48 Stunden      73

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab.1	AJCC-Klassifikation für das Pankreaskarzinom	11
Tab.2	Geräte	32
Tab.3	Verbrauchsmaterialien	33
Tab.4	Medien und Reagenzien	34
Tab.5	Selbst hergestellte Medien, Puffer und Lösungen	36
Tab.6	Antikörper	38

## 10 Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki und Prof. Dr. med. Emre F. Yekebas für die Überlassung des Themas danken.

Ich danke Dr. med. Yogesh Vashist und Dr. rer. nat. Tatyana Kalinina für die gute Betreuung und die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten sowie Antje Heinecke und Julia Kemmling für die Hilfe bei praktischen Tätigkeiten.

Dr. rer. nat. Cenap Güngör danke ich für die Beratung bei der Erstellung des Methodenteils.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich Eik Vettorazzi danken.

Simone Freytag danke ich für die Beratung bezüglich Grammatik und Rechtschreibung.

Für die Hilfe bei der Formatierung möchte ich mich bei Mirco Paske bedanken.

Insbesondere danke ich meinen Eltern und meinem Mann Nils für die Unterstützung und Motivationshilfe beim Verfassen der Arbeit.

## **11 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....