

Der Effekt von Trabectedin und Hyperthermie auf Sarkomzellen (in vitro)

Berit Spitzbarth geb. Otremba

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III im Klinikum Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

Der Effekt von Trabectedin und Hyperthermie auf Sarkomzellen (in vitro)

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Berit Spitzbarth geb. Otremba

aus Papenburg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rolf Issels

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans Roland Dürr, Prof. Dr. Stefan Endres

Betreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Eric Kampmann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2017

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis.....	1
2. Abbildungsverzeichnis	4
3. Tabellenverzeichnis.....	5
4. Abkürzungsverzeichnis	6
5. Einleitung	10
5.1 Weichteilsarkome	10
5.1.1 Klassifizierung	10
5.1.2 Therapie	13
5.2 Trabectedin	16
5.2.1 Wirkmechanismus.....	17
5.2.2 Einsatzgebiete und Ansprechraten	20
5.3 Hyperthermie	22
5.3.1 Zelluläre Stressreaktion nach Hitze	23
5.3.2 Hyperthermie in der Klinik	25
5.4 Trabectedin und Hyperthermie	26
6. Zielsetzung	27
7. Material und Methoden	28
7.1 Zellbiologische Arbeitstechniken	28
7.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	28
7.1.2 Zellkultur und Zellzahlbestimmung.....	30
7.1.3 Kryokonservierung	31
7.2 WST-Zellproliferationsassay	31
7.3 Klonogener Assay.....	32
7.4 Hitzeschockbehandlung.....	33

7.5 Trabectedinbehandlung	34
7.6 Kombinationsbehandlungen	34
7.7 Western-Blot.....	35
7.7.1 Proteinisolation und -Messung.....	36
7.7.2 Blotting	37
8. Ergebnisse	39
8.1 WST1-Viabilitätsassay	39
8.1.1 Bestimmung der Zellzahl für den WST-Assay	39
8.1.2 Bestimmung der Behandlungsbedingungen	39
8.1.3 Behandlung mit Trabectedin.....	41
8.1.4 Behandlung mit Hitzeschock	42
8.1.5 Behandlung mit Trabectedin und Hyperthermie.....	45
8.2 Klonogener Assay.....	50
8.2.1 Behandlung mit Trabectedin.....	50
8.2.2 Behandlung mit Trabectedin und Hyperthermie – klonogener Assay.....	51
9.0 Western Blot.....	54
9.1 Expression der Hitzeschockproteine nach Hitzeschock	54
9.2 Trabectedin und Hyperthermie: Expression der Hitzeschockproteine	54
10. Diskussion	57
10.1 Überblick und Rationale.....	57
10.2 Resultate der Einzelbehandlungen.....	58
10.3 Resultate der Kombinationsbehandlungen	61
10.4 Zusammenfassung der Kombinationsbehandlungen	62
10.5 Hitzeschockprotein 70	62
11. Zusammenfassung und Überblick.....	64
11.1 Hyperthermie und Trabectedin bei Weichteilsarkomen.....	64

12. Literatur	65
13. Eidesstattliche Versicherung	78

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Strukturformel Trabectedin
Abbildung 2	Ablauf der Behandlungen
Abbildung 3	Zeit- und Konzentrationsabhängige Effekte Liposarkom
Abbildung 4	WST-Assay 72 h Behandlung mit Trabectedin
Abbildung 5	Hitzeempfindlichkeit Fibroblasten
Abbildung 6	Hitzeempfindlichkeit Leiomyosarkom
Abbildung 7	Hitzeempfindlichkeit Liposarkom
Abbildung 8	Hitzeempfindlichkeit Synovialsarkom
Abbildung 9	90 min Hyperthermie und Trabectedin – MRC 5, SKUT-1, SW872, SW 982
Abbildung 10	150 min Hyperthermie und Trabectedin – MRC 5, SKUT-1, SW872, SW 982
Abbildung 11	Klonogener Assay 72 h Trabectedin-Behandlung
Abbildung 12	Klonogener Assay Hyperthermie und Trabectedin – SKUT-1
Abbildung 13	Klonogener Assay Hyperthermie und Trabectedin – SW 982
Abbildung 14	Western Blot bei 41,5 °C, Expression der Hitzeschockproteine
Abbildung 15	Western Blot Expression der Hitzeschockproteine nach Behandlung mit Trabectedin und Hyperthermie
Abbildung 16	Western Blot Densitometrie: Expression der HSP nach Behandlung mit Trabectedin und Hyperthermie am Beispiel des Leiomyosarkom, Liposarkom und Synovialsarkom

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TNM-Klassifikation für Weichteilsarkome
Tabelle 2	Stadiengruppierung für Weichteilsarkome
Tabelle 3	Zelllinien

4. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
a. e.	Am ehesten
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid assay
BRCA	breast cancer
C	Kontrolle (Graphiken)
Ca.	Circa
CLS	Cell Line Service
Cm	Zentimeter
CO ²	Kohlenstoffdioxid
d. h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EIA	Etoposid, Ifosfamid, Anthrazyklin
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medical Agency
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ESMO	European Society for Medical Oncology
ET	Ecteinascidia turbinata
FCS	Fetales Kälberserum
FNCLCC	Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer
FUS-CHOP	Fused in Sarcoma-C/EBP-homologous protein
g	Erdbeschleunigung
G	Grading
Ggfs.	Gegebenenfalls
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
h	Stunden
HPF	Haupt Gesichtsfeld
HSP	Hitzeschockprotein
IC	Inhibitorische Konzentration
I. v.	Intravenös
kDa	Kilo Dalton
M	Metastasen
M	Molar

MAF	Musculoaponeurotic fibrosarcoma
Med. ÜLZ	Mediane Überlebenszeit
Mg/m ²	Miligramm pro Quadratmeter
MHz	Megahertz
min.	Mindestens
min	Minute
ml	Milliliter
Mo.	Monate
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
N	„Node“; Lymphknotenstatus
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nano Meter
nM	Nano Molar
NOS	„Not otherwise specified“
o.	Oder
OD	Optische Dichte
P	Passagezeit der Zellkultur
PBS	Phosphate buffered saline (= Phosphat gepufferte Salzlösung)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFS	Progression free survival

pH	potentia Hydrogenii
pM	Piko Molar
RFS	Relapse free survival
Rpm	Revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Sicherheitsstufe
SD	Stable Disease
sec	Sekunde
T	Tumorgröße
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered Saline
U. a.	Unter Anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
ÜLZ	Überlebenszeit
USA	United States of America
V	Volt
WST	Tetrazoliumsaz (water soluble tetrazolium)
z. B.	zum Beispiel

5. Einleitung

5.1 Weichteilsarkome

Weichteilsarkome umfassen eine heterogene Gruppe von Tumoren, die sich aus dem embryonalen Mesenchym entwickeln. Zu den Geweben mesenchymalen Ursprungs zählen Knochen- und Muskelgewebe, Fett- und peripheres Nervengewebe sowie das umgebende Gewebe von Blut- und Lymphgefäßen. Weichteilsarkome können überall am Körper auftreten, obwohl der Großteil (> 50 %) an den Extremitäten zu finden ist. Häufig betroffen sind außerdem das Retroperitoneum, der Rumpf und der Kopf-Hals-Bereich [Lawrence W Jr. et al., 1987]. Für die Entstehung von Weichteilsarkomen sind keine allgemeingültigen Ursachen bekannt, allerdings wurde bei bestimmten Subtypen (z. B. Leiomyosarkom) eine Assoziation zum Epstein-Barr-Virus bei AIDS-Patienten gefunden [McClain KL et al., 1995]. Zudem kann ein Weichteilsarkom viele Jahre nach einer Strahlentherapie auftreten [Brady MS et al., 1992]. Auch bestimmte Syndrome und Erkrankungen, die mit spezifischen Mutationen einhergehen, wie zum Beispiel das Retinoblastom oder die Neurofibromatose gehen statistisch gesehen mit einer gehäuften Inzidenz für Sarkome einher [Wong FL et al., 1997, Ferner et al., 2002].

Epidemiologisch konnten im Jahr 2012 in den USA über 11.000 Neuerkrankungen und ca. 4000 Todesfälle berichtet werden [Siegel et al., 2012]. Die Inzidenz in Europa liegt bei ca. 3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, was diese Entität zu einer seltenen Erkrankung macht [Samartzis et al., 2013].

Meist verursachen Sarkome keine spezifischen Symptome. Die häufigsten Beschwerden treten durch lokalen Druck im betroffenen Gewebe oder Organ auf. Weitere Beschwerden sind nicht typisch und zeigen eine große klinische Vielfalt aufgrund der variierenden anatomischen Lagen [Clark MA et al., 2005].

5.1.1 Klassifizierung

Man unterteilt die Weichteilsarkome in verschiedene histologische Subtypen. Zum heutigen Zeitpunkt sind weit über 60 verschiedene Untergruppen beschrieben [Fletcher CD et al., 2006]. Die häufigsten sind das Liposarkom, das Leiomyosarkom, das synoviale Sarkom und das undifferenzierte pleomorphe Sarkom.

Nach einem molekularpathologischen Modell kann man die unterschiedlichen Sarkomentitäten in Bezug auf zugrundeliegende genetische Veränderung in Gruppen einteilen [Ladanyi et al., 2008, Barretina et al., 2010]:

- a.) Sarkome mit definierbaren Mutationen (z. B. Gastrointestinaler Stromatumor [GIST], Dermatofibrosarcoma protuberans etc.)
- b.) Sarkome mit Translokationen (z. B. Ewing-Sarkom, myxoides Liposarkom, synoviales Sarkom etc.)
- c.) Sarkome mit komplexen genetischen Veränderungen (z. B. undifferenziertes pleomorphes Sarkom, Leiomyosarkom, pleomorphes Liposarkom etc.)

Die verschiedenen Subtypen variieren in ihrem Ansprechen auf gegebene Therapiestrategien [Clark MA, 2005, Hartmann JT, 2005, Jain, 2010].

Weichteilsarkome machen insgesamt weniger als 1 % aller Krebserkrankungen aus, sie können in Hochrisikosituationen (z. B. großer Tumor und hohes Grading) frühzeitig metastasieren, was mit einer deutlichen Reduktion der Lebenserwartung einhergeht. Zusammengefasst entwickelt etwa die Hälfte aller Patienten mit Weichteilsarkomen Fernmetastasen mit einer resultierenden medianen Überlebenszeit von 8 - 12 Monaten [Jemal A et al., 2007, Blay JY et al., 2003].

Weitere relevante Prognosefaktoren sind neben der Größe des Tumors und des Differenzierungsgrades, vor allem die Eindringtiefe, der Sitz (retroperitoneal oder intraabdominell gelten als eher ungünstig), das Alter des Patienten, der histologische Subtyp, sowie der Sicherheitsabstand der Resektion [Gronchi A et al., 2010].

Das histologische Grading ist ein wichtiger Prognosefaktor und ein Indikator für das Risiko einer Fernmetastasierung. Das in Europa am häufigsten verwendete Grading-System ist das französische Grading nach der French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group (FNCLCC). Dieses dreistufige System basiert auf dem histologischen Typ, dem Ausmaß der Dedifferenzierung, der Nekroserate und der mitotischen Aktivität [Coindre et al., 2006]. Das American Joint Committee on Cancer (AJCC) hat ein vierstufiges Gradingssystem, welches

die Tumorgöße, den Lymphknotenstatus, das Grading und die Fernmetastasierung beinhaltet, entwickelt [Mazeron et al., 1987].

Die wichtigsten Prognoseparameter sind Grundlage der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 1) und der Stadieneinteilung der UICC bzw. der AJCC 2010 (siehe Tabelle 2).

Diese Einteilung geht neben dem Grading in die Therapieplanung mit ein.

Tabelle 1

TNM-Klassifikation für Weichteilsarkome (nach UICC/AJCC 2010)

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor maximal 5 cm in größter Ausdehnung
a	oberflächlich
b	tief
T2	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
a	oberflächlich
b	tief
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2

Stadiengruppierung für Weichteilsarkome (UICC/AJCC 2010)

Stadium I A	G 1, 2	T 1 a/b	N 0	M 0
Stadium I B	G 1, 2	T 2 a/b	N 0	M 0
Stadium II A	G 3, 4	T 1 a/b	N 0	M 0
Stadium II B	G 3, 4	T 2 a/b	N0	M 0
Stadium III	jedes G	jedes T	N 0 N 1	M 0 M 0
Stadium IV	jedes G	jedes T	jedes N	M1

5.1.2 Therapie

Trotz der vielen unterschiedlichen histologischen Subtypen werden die meisten Sarkome nach den gleichen Standards behandelt. Bekannte Ausnahmen stellen z. B. der Gastrointestinale Stromatumor oder das Kaposi-Sarkom dar [ESMO Guidelines, 2014].

Die Behandlungsstrategie umfasst verschiedene Therapieansätze, sodass eine interdisziplinäre, multimodale Zusammenarbeit in einem spezialisierten Zentrum notwendig ist. Die zu erreichenden Ziele sind auf der einen Seite die lokoregionale Kontrolle des Tumors, am besten die vollständige Resektion, und auf der anderen Seite die Vorbeugung einer möglichen Fernmetastasierung. Die Säulen der Therapie umfassen neben der chirurgischen Resektion, eine prä-/ intra-/ oder postoperative Strahlentherapie und eine neo-/ adjuvante Chemotherapie. Die regionale Hyperthermie in Kombination zur systemischen Chemotherapie ist heutzutage eine zusätzliche wichtige Therapieoption. Da viele histologische Subtypen nur geringe Sensitivität gegenüber den zur Verfügung stehenden Zytostatika haben, sind zur Therapie der fortgeschrittenen Erkrankung dringend

Behandlungsalternativen und neue Therapiestrategien notwendig. Der Fokus liegt derzeit auf einer optimalen, langfristigen lokalen Kontrolle des Tumors. Eine neoadjuvante Therapie, um den Tumor möglichst operabel zu machen und vorhandene Mikrometastasen zu behandeln ist in individuellen Fällen zu erwägen [ESMO, 2014, Issels et al., 2001 und 2010]. In Studien zur Anthrazyklin-basierten neoadjuvanten Chemotherapie ließen sich Ansprechraten bis zu 34 % erreichen, allerdings zeigte sich auch ein relevantes Risiko einer Progression des Tumors (bis zu 30 %), welches unter Hinzunahme einer regionalen Tiefenhyperthermie am geringsten ausgeprägt war [Meric et al., 2010, Issels et al., 2010].

Bei lokalisierten adulten Weichteilsarkomen besteht bei operablen Tumoren zunächst eine kurative Situation und die Therapie der Wahl ist eine R0-Resektion mit einem ausreichenden Sicherheitsabstand, durchgeführt von einem erfahrenen Chirurgen in einem spezialisierten Sarkom-Zentrum. R0 bedeutet, dass mikroskopisch ein tumorfreier Schnittrand vorliegt, auch „Resektion im Gesunden“ genannt. Bei einer sogenannten R1-Resektion lassen sich mikroskopisch Tumorzellen an den Schnitträndern nachweisen, bei einer R2-Resektion findet sich makroskopisch Tumorgewebe an der Absetzungsstelle. Eine R1-Resektion geht mit einem deutlich erhöhten Risiko für Lokalrezidive einher [Patrikidou et al., 2011]. Bei einer R1- oder R2-Resektion folgt entweder eine erneute Operation oder eine postoperative Strahlentherapie bzw. in speziellen/individuellen Fällen eine Chemotherapie. Bei oligometastasierten Sarkomen (< 5 Metastasen) ist auch die (minimalinvasive) Metastasenchirurgie von Bedeutung um weiterhin einen kurativen Therapieansatz zu verfolgen, bei welcher neben dem Primarius auch die einzelnen lokalisierten Metastasen mit einem geeigneten Sicherheitsabstand reseziert werden. Neben der chirurgischen Resektion gibt es zudem andere lokale Verfahren, um die Metastasen zu behandeln, wie z. B. die Radiofrequenzablation oder die stereotaktische Bestrahlung.

Bei nicht-resektablen Weichteiltumoren, Tumoren, die verstümmelnde Operationen erfordern würden oder Hochrisiko-Tumoren bei Vorliegen mehrerer Risikofaktoren z. B. Stadium IIb (siehe Tab. 2) ist eine primäre Strahlentherapie und/oder eine neoadjuvante Chemotherapie, ggfs. in Kombination mit einem regionalen Hyperthermieverfahren indiziert [ESMO Guidelines, 2014]. Die regionale Tiefenhyperthermie wird in den aktuellen ESMO-Leitlinien als ergänzende Behandlungsstrategie empfohlen. Eine große EORTC-Studie aus dem Jahr 2010 ließ unter Hinzunahme eines regionalen Tiefenhyperthermieverfahrens einen signifikanten Vorteil von lokalem progressionsfreiem Überleben und krankheitsfreiem

Überleben, sowie eine Verdopplung des Therapieansprechens verzeichnen [Issels et al., 2010].

Eine 2015 erhobene und auf dem Europäischen Krebskongress präsentierte Langzeitbeobachtung zeigte zudem die signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens unter der Kombinationstherapie [Issels RD et al., 2015).

Die präoperative Therapie wird eingesetzt zum sogenannten „down-sizing“; also zu einer präoperativen Tumorschrumpfung um weniger ausgedehnte Operationsmaßnahmen, weniger Spätkomplikationen und ein besseres chirurgisches Ergebnis zu ermöglichen. Allerdings sind Nebenwirkungen, wie z. B. Wundheilungsstörungen, nicht zu vernachlässigen. Aktuelle Studien um den Stellenwert der präoperativen Strahlentherapie zu prüfen werden derzeit durchgeführt. Bei inadäquatem Sicherheitsabstand der Resektion, in anderen speziellen Fällen (z. B.: Schlechter Differenzierungsgrad; G2 - 3, tiefe und große Tumore) und bei nicht-operablen Tumoren ist eine postoperative Strahlentherapie obligat [Casali et al., 2010].

Vergleichbar wird die neoadjuvante Chemotherapie eingesetzt, um den Primärtumor zu verkleinern und die Resektion zu erleichtern. Darüber hinaus kann so bereits frühzeitig eine systemische Therapie mit Wirksamkeit gegen Mikrometastasen verabreicht werden. Der Stellenwert der neoadjuvanten Therapie ist dennoch aktuell unklar. Ein Ansprechen unter Therapie ist zum einen mit einem besseren chirurgischen Ergebnis und besseren Überlebensparametern assoziiert [Chen Y et al., 2013]. Es konnte jedoch zum anderen in einer randomisierten Phase-II-Studie mit 134 auswertbaren Patienten kein signifikanter Überlebensvorteil nach neoadjuvanter Chemotherapie nachgewiesen werden [Gortzak E. et al., 2001].

Der Stellenwert einer adjuvanten Chemotherapie ist derzeit ebenso umstritten, in älteren Studien konnte bei bestimmten Voraussetzungen (z. B. FNCLCC-Grading 3) ein Vorteil gegenüber den Patienten gesehen werden, die keine adjuvante Chemotherapie bekamen [Italiano et al., 2010]. In einer aktuellen multizentrischen Studie von Woll et al. (2012) konnte jedoch kein Vorteil im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben (PFS/RFS) oder auf das Gesamtüberleben (OS) nachgewiesen werden, sodass der derzeit der Stellenwert einer adjuvanten Chemotherapie unklar ist. Große Metaanalysen, wie u. a. die von Pervaiz et al. (2008) kamen ebenfalls zu keinem übereinstimmenden Ergebnis. Unter gewissen Umständen scheinen Patienten mit Risikofaktoren (wie z. B. Grading 3, großer Tumor etc.) von einer

adjuvanten Chemotherapie zu profitieren [Woll PJ et al., 2012]. Die Indikationsstellung zur neo-/ adjuvanten Strahlentherapie und Chemotherapie sollte aus diesen Gründen in einem spezialisierten Zentrum geprüft werden.

Die Standard-Erstlinienchemotherapie zum down-sizing und bei metastasierten Weichteilsarkomen ist in den meisten Fällen eine Anthrazyklin-basierte Therapie, im Sinne einer Monotherapie mit Doxorubicin oder eine Kombinationstherapie mit Ifosfamid. Ansprechraten von 20 - 34 % werden bei einer solchen Erstlinientherapie erreicht. Im Falle der Kombinationstherapie werden höhere Ansprechraten erreicht, jedoch zeigte sich hier kein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben [Judson et al., 2014].

Einen allgemeingültigen Konsens bezüglich einer Zweitlinientherapie gibt es aktuell nicht [Penel et al., 2011]. Substanzen, die nach Versagen der Erstlinientherapie zum Einsatz kommen sind Gemcitabine, Docetaxel, Dacarbazin, neuerdings auch der Multityrosinkinase-Inhibitor Pazopanib und neuere Substanzen wie Trabectedin [ESMO Guidelines, 2012]. Eine Zulassung der Europäischen Arzneimittelkommission zur Zweitlinientherapie gibt es aktuell nur für Trabectedin, Pazopanib und Dacarbazin. Derzeit laufen außerdem viele Studien zur Identifizierung weiterer geeigneter Substanzen für die Therapie wie zum Beispiel Eribulin [Schöffski P. et al., 2015] oder Olaratumab [Tap WD. Et al., 2015]. Bei weit fortgeschrittenen und metastasierten Tumoren ohne Ausblick auf eine kurative Therapiestrategie, sowie einer erwarteten deutlichen Einschränkung der Lebensqualität durch eine Radio- oder Systemtherapie, ist auch ein rein palliatives Therapiekonzept, im Sinne einer optimalen Symptomkontrolle, eine denkbare Therapiealternative.

5.2 Trabectedin

Trabectedin (Ecteinascidin-743, ET-743, Yondelis[®]) ist eine neuere zytostatisch wirkende Substanz, welche seit 2007 zur Therapie des fortgeschrittenen Weichteilsarkoms, sowie in Kombination mit liposomalen Doxorubicin seit 2009 für die Therapie des Ovarialkarzinomes zugelassen ist. Eingesetzt wird die Substanz bei metastasierten Weichgewebssarkomen nach Versagen der Erstlinientherapie oder bei Unverträglichkeit bzw. Kontraindikationen gegenüber dieser. Klinische Studien um weitere Einsatzgebiete zu ermitteln laufen derzeit [Bui-Nguyen et al., 2015 und López-Guerrero JA et al., 2015].

Zunächst wurde Trabectedin als Naturprodukt aus der Seescheide *Ecteinascidia turbinata* extrahiert [Pommier et al., 1996]. Für die therapeutische Anwendung wird es heutzutage semisynthetisch hergestellt [Menchaca et al., 2003]. Die chemische Struktur besteht aus drei zusammenhängenden Tetrahydroisoquinolinringen, diese drei Untereinheiten werden als A-, B- und C-Untereinheit klassifiziert. Die Einheiten A und B binden an die DNS, wobei die Untereinheit C mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Endonukleasen interagieren kann. Der Mechanismus der Antitumorwirkung ist noch nicht vollständig verstanden, es scheint jedoch verschiedene Wirkorte und -mechanismen zu geben.

5.2.1 Wirkmechanismus

Trabectedin interagiert mit der DNS indem es sequenzabhängig kovalent an die kleine Furche bindet. Dabei wird Guanin an der N2 Position alkyliert. Durch die Anlagerung von Trabectedin wird die DNS in Richtung der großen Furche gekrümmt, was die Bindung an verschiedene Proteine verhindert und die aktivierte Transkription unterdrückt [Zewail-Foote M, 1999, 2001]. Auf zellulärer Ebene führt Trabectedin zu einer Verlangsamung der Progression in der S-Phase des Zellzyklus und einen p53 unabhängigen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase [Gajate C, 2002, Li WW et al., 2001, Herrero et al., 2006].

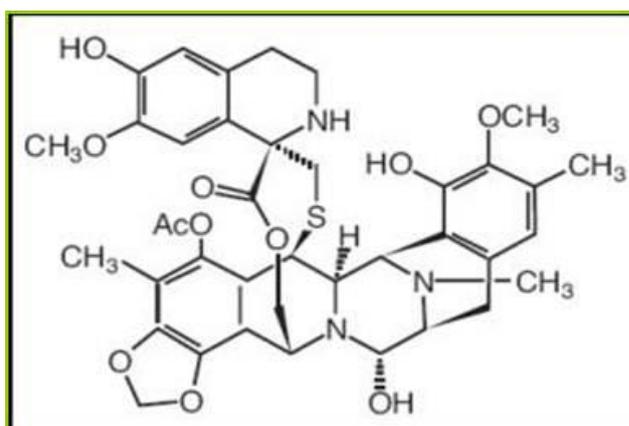


Abbildung 1

Chemische Struktur Trabectedin (Pharma Mar)

Das wichtigste Wirkprinzip und demnach die wahrscheinlich ausschlaggebende Wirkkomponente von Trabectedin ist die Induktion von DNS-Doppelstrangbrüchen. Trabectedin scheint dabei auf das intakte transkriptions-gekoppelten Reparatursystem TC-NER (transcription-coupled nucleotide excision repair) angewiesen zu sein. Die NER-Reparatur ist zur Reparatur von chemischen Modifikationen der DNS und zur Beseitigung von Addukten zuständig. Sie gliedert sich in folgende Schritte: Zunächst erfolgt die Schadenserkenkung der aktuell zu transkribierenden DNS, dann wird der entsprechende Abschnitt eingeschnitten, das defekte Stück herausgeschnitten und schließlich erfolgt eine Neusynthese und Ligation des DNS-Abschnittes [Petruseva IO et al., 2014]. Dieses Reparatursystem erkennt die DNS-Helixdistorsion, die durch die Bindung des Trabectedins an die DNS entsteht. Dies führt zur Aktivierung und Bindung spezieller Proteine an den defekten Bereich der DNS, unter anderem dem Schlüsselprotein XPG (Xeroderma pigmentosum Gen Gruppe G). An der DNS gebundenes Trabectedin bindet im Folgenden XPG und ggf. weitere TC-NER Proteine. Die so entstehenden toxischen Proteinaggregate führen zu DNS-Doppelstrangbrüchen und zum Zelltod [Herrero et al., 2006].

Zellen, denen ein funktionales TC-NER-System fehlt, sind deutlich resistenter gegenüber der Behandlung mit Trabectedin [Takebayashi et al., 2001, Herrero et al., 2006]. Dies stellt insofern eine Besonderheit dar, als dass ein funktionsfähiges NER-System die Wirkung anderer DNS bindender Zytostatika vermindert [Damia G, 2001, D’Incalci et al., 2002].

Es wird vermutet, dass Trabectedin nach Bindung von XPG und Assemblierung weiterer Proteine des NER-Systems sogenannte toxische Komplexe formt, die in der S-Phase zu für die Zellen sehr schädlichen Doppelstrangbrüchen prozessiert werden [Cassier et al., 2008]. Das sogenannte HRR-System (homologous recombination repair) ist für die Reparatur solcher Doppelstrangbrüche nach der S-Phase zuständig. Im Rahmen dieses Reparaturvorganges werden zunächst zwei doppelsträngige DNS-Enden mit homologen Nukleotidsequenzen einander angenähert. Parallel erfolgt eine Prozessierung der DNS-Enden und abschließend die Neuverknüpfung. Diese kann zu einem Chromosomen-Austausch (Crossover) führen. [San Filippo J et al., 2008]. Wenn essentielle Bestandteile des HRR-Reparatursystems, wie z. B. das Protein Rad51, fehlen und die Zellen ein nicht-funktionelles HRR-System aufweisen, reagieren diese deutlich sensitiver auf die Behandlung mit Trabectedin, da in diesem Fall die kumulativen DNS-Schäden nicht zu beheben sind [Herrero et al., 2006, Tavecchio et al., 2008].

Herrero et al. postulierten zusammenfassend folgenden Mechanismus: Trabectedin bindet zunächst kovalent an die DNS, das resultierende Addukt wird von dem NER-System erkannt. In diesem Zusammenhang wird XPG am COOH Terminus von der Trabectedin-Untereinheit C gebunden. Weitere Proteine des NER werden nachfolgend ebenso gebunden, was zur Entstehung toxischer Komplexe führt. In der S-Phase des Zellzyklus führen diese Komplexe zu Doppelstrangbrüchen, die bei einem ineffizienten HRR-System schlechter repariert werden können und so die Zelle vermehrt zum Absterben bringen [Herrero et al., 2006].

Entsprechend des postulierten Wirkmechanismus legen die klinischen Studien nahe, dass Trabectedin auf ein funktionsfähiges NER-System angewiesen ist und ein dysfunktionelles HRR-System die Wirkung verstärkt. Retrospektive mRNA-Analyse verschiedener Tumorbiopsate von mit Trabectedin behandelten Patienten zeigen gemäß dieses Mechanismus, dass Tumore, die eine hohe Expression des NER Proteins XPG aufweisen, gesteigerte Ansprechraten auf eine Therapie mit Trabectedin zeigen. Zudem waren Tumore, die eine hohe Expression des HRR-Proteins BRCA1 (breast cancer susceptibility 1 gene) zeigen, resistenter gegenüber der Behandlung mit Trabectedin und weisen ein schlechteres Outcome auf [Schöffski et al., 2011, Italiano et al., 2011].

Trabectedin moduliert außerdem die Wechselwirkung zwischen der DNS und bestimmten Transkriptionsfaktoren. Durch eine strukturelle Veränderung der DNS wird die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren inhibiert. Trabectedin hemmt in vivo die hitzeschock-vermittelte Induktion des HSP 70-Promotors [Minuzzo et al., 2000]. Die Bindung des Transkriptionsfaktor NF-Y (Neurofibromatose Y Gen) wird konzentrationsabhängig inhibiert, andere Transkriptionsfaktoren wie MAF, MYC werden jedoch nicht beeinflusst [Bonfanti et al., 1999]. Zudem hemmt Trabectedin die Überexpression des MDR-1 (multi-drug-resistance-1 Gen), welches für ein P-Glykoprotein kodiert. Dieses Glykoprotein ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber verschiedener Zytostatika [Ganjoo KN, 2009].

Desweiteren konnte auch gezeigt werden, dass Trabectedin wichtige immunologische Effekte induziert, die günstige Auswirkungen auf das Mikromileu des Tumors haben [D'Incalci et al., 2010, Germano G et al., 2013]. Trabectedin hemmt die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und somit auch die Entstehung sogenannter Tumor-assoziiertes Makrophagen (TAM), die Proliferation und Invasion der Tumorzellen fördern und die

Tumorangiogenese begünstigen [Galmarini et al., 2014]. Zudem wird die Expression und Konzentration der proinflammatorischen Mediatoren CCL2 und Interleukin-6 sowie des Angiogenesefaktors VEGF (vascular epidermal growth factor) durch Trabectedin reduziert [Allavena et al., 2005 und 2013, Germano et al., 2010].

5.2.2 Einsatzgebiete und Ansprechraten

Trabectedin wirkt bekanntermaßen *in vitro* stark auf Weichteilsarkomzellen. Hier sind sehr niedrige IC50-Werte (0,2 – 300 pM) in der Literatur vorbeschrieben. Die zytotoxische Wirkung entfaltet sich dosis- und zeitabhängig [Li WW et al., 2001]. Eine Arbeit von Moneo et al. beschreibt außerdem ein gutes Ansprechen auf niedrige Dosen von Trabectedin von Zellen, die eine p53-Mutation oder -Deletion aufweisen, sodass anzunehmen ist, dass p53 ein Bestandteil eines möglichen Resistenzmechanismus gegenüber Trabectedin sein könnte [Moneo et al., 2007].

Derzeit erfolgt der Einsatz von Trabectedin, gemäß der Zulassung der Europäischen Kommission entsprechend der Empfehlungen der European Medicine Agency (EMA), als Zweitlinientherapie bei Versagen der Erstlinien-Chemotherapie mit Antrahzyklinen und ggfs. Ifosfamid oder bei bestehenden Kontraindikationen für den Einsatz der konventionellen Erstlinienmedikamente.

Eine 5 - 10 % Ansprechrate und eine SD von 30 - 40 % wurden in diversen Phase II Studien bei Patienten mit Anthracyclin-refraktären Sarkomen beschrieben [Cassier, 2008, Reichart, 2008]. In einer prospektiven Phase II Studie für Patienten mit Liposarkomen oder Leiomyosarkomen wurde gezeigt, dass ein drei wöchentliches Regime (1,5 mg/m² als i. v. Infusion über 24 h) einem wöchentlichen Regime mit einem progressionsfreien Überleben von 3,3 Monaten und einem Gesamtüberleben von 13,9 Monaten einer wöchentlichen Applikation gegenüber überlegen ist [Demetri et al., 2009]. Seitdem gilt das dreiwöchentliche Regime als Standard. Samuels et al. zeigten in einem worldwide-expanded access program bei 1895 Patienten mit Weichteilsarkomen hohe Krankheitsstabilisierungsraten (43 %) und ein Gesamtüberleben von 11,9 Monaten. Dabei zeigten sich die beste Verlängerung des Gesamtüberlebens mit 16,2 Monaten bei Patienten mit einem der L-Sarkome (Leiomyosarkom und Liposarkom) [Samuels et al., 2013].

In einer randomisierten Phase III Studie mit 518 Patienten zeigte sich die dreiwöchentliche Gabe von Trabectedin gegenüber der Therapie mit Dacarbazin in Bezug auf das progressionsfreie Überleben überlegen (4,2 vs. 1,5 Monate). Im Gesamtüberleben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede [Demetri GD. Et al., 2015]. Auf diese Studie erhielt Trabectedin 2015 auch die Zulassung zur Therapie refraktärer Sarkome in den USA und in Japan.

Der Einsatz von Trabectedin als Erstlinientherapie oder als Kombinationspartner, z. B. mit Anthrazyklinen, ist derzeit Gegenstand aktueller Forschungsstudien (z. B. aktuelle Phase-II-Studie beim Leiomyosarkom oder Phase-III-Studie bei translokationsassoziierten Sarkomen) [Blay et al., 2014, Pautier et al., 2015, Kawai et al., 2015].

Ein wichtiger Vorteil, besonders für die aktuell praktizierte Behandlung in der Zweit- oder Drittlinientherapie, ergibt sich aus der Tatsache, dass Trabectedin so gut wie keine Kreuzresistenz mit anderen Zytostatika oder Pharmaka besitzt, ein relativ niedriges Nebenwirkungsspektrum aufweist und auch bei älteren vortherapierten Patienten eingesetzt werden kann [Blay, 2008 und 2013, Cassier, 2008].

Kürzlich konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass Patienten, auch nach vorheriger Systemtherapie, unter der Trabectedintherapie ein verbessertes Überleben aufweisen und die Trabectedintherapie nach Möglichkeit bis zu einem Tumorprogress fortgeführt werden sollte. Es gibt Einzelfälle von Langzeitansprechern, welche zum Teil eine Therapie über mehrere Jahre erhalten haben [Blay et al., 2013].

Für eine Untergruppe der Weichteilsarkome, das myxoide Liposarkom, werden hohe Ansprechraten (30 - 50 %), ein langes progressionsfreies Überleben (bis 17 Monate) und ein signifikant verbessertes Langzeitüberleben für Patienten unter Behandlung mit Trabectedin beschrieben. Stabilisierungsraten von bis zu 80 % wurden mitunter dokumentiert [Sandberg et al., 2004]. Zudem ergab sich bei dieser Tumorentität ein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben [Grosso et al., 2009]. Diese Subentität ist mit der Translokation t(12;16) oder t(12;22) assoziiert und führt über ein Fusionsprotein, an dem das RNA-bindende Protein FUS involviert ist (z. B. FUS-CHOP bei t(12;16)) zur Entstehung der Tumore [Grosso et al., 2009]. Neueste Studien zeigen, dass Trabectedin eine Deplatzierung des Fusionsproteins vom Zielpromoter initiiert und a. e. dadurch die erhöhte Ansprechrate hervorruft [Forni et al., 2009]. Das Fusionsprotein induziert bzw. erhält nicht nur die Dedifferenzierung der

Adipozyten, sondern hat ebenfalls Einflüsse auf die Tumorangiogenese und Tumorinflammation [Germano et al., 2010]. Eventuell sind die hohen Ansprechraten beim myxoiden Liposarkom daher auch durch eine positive Beeinflussung des Tumormikromilieus zu erklären.

Bei Zellen des myxoiden Liposarkoms wurde außerdem abermals die Beobachtung gemacht, dass Trabectedin den VEG-F (vascular epidermal growth factor) herunterreguliert, welcher eine entscheidene Rolle für die Tumorperfusion und somit auch für das Tumorwachstum spielt [Germano et al., 2010].

5.3 Hyperthermie

Das Verfahren der Hyperthermie führt zu einer kontrollierten Temperaturerhöhung. Man unterscheidet lokale Oberflächen- und Tiefenhyperthermie von Teil- bzw. Ganzkörperhyperthermie. Therapeutische Anwendung findet heutzutage hauptsächlich die regionale Hyperthermie (RHT), die ein Zielgebiet von 5 - 20 cm Tiefe umfasst und Temperaturen zwischen 39 und 44 °C erreicht. Hiermit sollen gezielt Tumorzellen geschädigt werden mit minimalen Effekten auf das gesunde Gewebe [Bettaieb et al., 2013]. In der regionalen Hyperthermie wird mittels elektromagnetischer Wellen die Temperaturerhöhung des Tumors und des umgebenden Areals erzielt. Die elektromagnetischen Wellen werden über Antennen, die um den tumortragenden Abschnitt angeordnet sind, übertragen. Die Temperaturkontrolle wird entweder invasiv mittels Sonden oder nichtinvasiv mittels Magnetresonanzbildgebung überwacht. Die Hyperthermie-Therapie erfolgt heutzutage meist als Ergänzung zur Radio- oder Chemotherapie.

Die Hyperthermie beeinflusst den Tumor bereits über verschiedene Mechanismen. Zum einen gibt es Effekte auf das Tumormilieu: Die Temperaturverteilung im Tumorareal ist heterogen, da sie durch viele gewebsspezifische Einflüsse (Muskelgewebe, Fettgewebe, Knochen) sowie unterschiedliche Blutperfusionen stark beeinflusst wird. So gibt es beispielsweise im Tumor hypoxische und azidotische Areale, welche eine erhöhte Sensitivität für die Behandlung mit Hyperthermie zeigen [Issels et al., 2008]. Zum anderen wird über eine Perfusionssteigerung nach der Hyperthermie und damit verbesserte Gewebeoxygenierung z. B. die Zytotoxizität einer Strahlentherapie gesteigert.

In Kombination mit einer Chemotherapie wird das Anfluten der Zytostatika in der erwärmten Region, sowie die metabolische Aktivierung der Zytostatika beschleunigt [Issels RD et al., 2008]. Viele Chemotherapeutika interagieren mit zellulären Zielstrukturen (zum Beispiel Alkylantien mit der DNS). Die Reaktivität dieser Interaktionen wird ebenfalls gesteigert. Es konnte bereits *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass einige Substanzen erfolgreich in ihrer Wirkung durch eine Kombination mit Hyperthermie verstärkt werden, zu diesen gehören unter anderem: Cisplatin, Carboplatin, Cyclophosphamid, Bleomycin und Gemcitabine [Issels et al., 2008]. Entscheidend für eine gute Therapiewirksamkeit ist die zeitliche und tumorspezifische individuelle Abstimmung der gegebenen Therapien. Hier sind insbesondere pharmakokinetische und pharmakodynamische Aspekte, sowie der Mechanismus der induzierten Thermotoleranz (zeitlich begrenzte Toleranz des betreffenden Gewebes nach einer subletalen Hitzebehandlung gegenüber einer erneuten Hitzeeinwirkung) zu berücksichtigen. Ideal wäre es, wenn ein subletaler Schaden durch ein Zytostatikum lokal durch Hyperthermie in einen letalen Schaden verwandelt wird ohne die systemischen Nebenwirkungen zu verstärken.

5.3.1 Zelluläre Stressreaktion nach Hitze

Werden Zellen Stressbedingungen ausgesetzt, beispielsweise Hitze, können bestimmte Reaktionen beobachtet werden: Bei der Applikation von Temperaturen ab 41 °C kann ein Wachstumsstopp und bei fortgesetzter Dauer und Erhöhung der Temperatur ein direkter zytotoxischer Effekt von Hitze festgestellt werden. Durch die vermehrte Denaturierung von Proteinen, deren Funktionsverlust und die Entstehung von toxischen Aggregaten fehlgefalteter Proteine, ist das weitere Überleben der Zelle gestört bis unmöglich [Zaarur, 2006].

Insgesamt kommt es bei der Hyperthermie durch eine Vielzahl von Mechanismen zu einer Störung der zellulären Homöostase [Roti Roti et al., 2008].

Hyperthermie scheint besonders in der S-Phase des Zellzyklus seine toxische Wirkung zu entfalten [Powell et al., 2011, Van der Waal RP et al., 2001]. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass die S-Phase des Zellzyklus zum einen auch der Zeitpunkt ist, an dem viele Zytostatika den Zelltod der Tumorzellen hervorrufen, aber auch zum anderen in dieser Phase eine sekundäre Zelltransformation, im Sinne einer onkogenen Transformation, stattfinden

kann. Man muss also annehmen, dass eine zeitlich abgestimmte Hyperthermiebehandlung den zytostatischen Effekt verstärken kann und das Risiko für Zweitkarzinome (durch eine Zelltransformation in dieser Phase) senken kann [Issels et al., 2008].

Bereits 1997 zeigten Dahm-Daphi et al., dass sich durch eine Hitzeschockbehandlung die Zahl der Doppelstrangbrüche in der DNS der behandelten Zellen steigern lässt [Dahm-Daphi et al., 1997]. Es werden DNS-Reparaturmechanismen durch die Hyperthermie gehemmt, welche z. B. Strangbrüche reparieren, die durch Strahlentherapie verursacht werden [Iliakis G et al., 2008]. Krawzyk et al. zeigen in ihrer Arbeit, dass ein milder Hitzeschock (41 - 42,5 °C) über eine BRCA2-Degradation das HRR-System inhibieren kann. BRCA2 ist ein Tumorsuppressor, welcher essentiell für die genomische Stabilität und die Funktion des HRR-Systems ist, indem es für die Rekrutierung der Rekombinase RAD51 die Doppelstrangbruchreparatur einleitet [Park et al., 2014]. Dieser Hyperthermie-Effekt konnte bei verschiedenen Zelllinien, unter anderem auch bei frischen Tumorzellproben, über eine, nach vorangegangener Hitzeapplikation, nicht-vorhandene Expression von BRCA2, sowie der aufgehobenen Rekrutierung von RAD51 zu den DNS-Reparatur-Foci gezeigt werden [Krawzyk et al., 2011]. Bereits vorher konnte gezeigt werden, dass die Expression von BRCA1, ebenfalls ein HRR-Protein, auch nach Hyperthermie vermindert ist [Xian et al., 2003]. Die Potentielle Hemmung des HRR-Systems ist im Hinblick auf eine Kombinationsbehandlung mit Trabectedin von großem Interesse, da Zellen mit einem nicht-funktionellen HRR-System verbesserte Ansprechraten für Trabectedin zeigen [Herrero et al., 2016].

Weiterhin kann nach einem Hitzeschock neben auch anderen Arten von zellulärem Stress die rapide Zunahme in der Expression einer kleinen Anzahl von Genen beobachtet werden, den Hitze-Schock-Genen. Sie kodieren eine Klasse von intrazellulären Proteinen, die zum Teil basal exprimiert werden und nach Stressreaktionen vermehrt synthetisiert werden: Die Hitzeschock-Proteine. Die Hitzeschockproteine fungieren als Regulator der Proteinfaltung und des Proteinabbaus in der Zelle. Die Zunahme der Expression solcher Proteine nach einem Hitzeschock wird als „heat shock response“ bezeichnet. Es werden verschiedene Hitzeschockfaktoren (HSF) ausgeschüttet, diese können wiederum bestimmte Promotor-Regionen der Hitzeschockgene aktivieren. Die Hitzeschockproteine werden anhand ihrer Größe (kDa) in Untergruppen eingeteilt (z. B. HSP 27, 70, 90 etc.). Man unterscheidet zwei verschiedene Klassen, Chaperone und ATP-abhängige Proteasen. Chaperone binden

fehlgefaltete, bzw. teilweise denaturierte Proteine und ermöglichen ihre Rückfaltung in die funktionsfähige Struktur, während ATP- abhängige Proteasen fehlgefaltete Proteine abbauen. Dadurch kann ein gewisses Maß an Stress von der Zelle verarbeitet und überlebt werden [Wickner, 1999]. Durch die Überexpression der Hitzeschockproteine nach Hitzeschock kann es zu einer Toleranz der Zelle gegenüber dem Hitzeschock kommen, der sogenannten Thermotoleranz. Zusätzlich besitzen sie antiapoptotische Aktivität [Zaarur et al., 2006]. Einige Hitzeschockproteine, z. B. HSP 70 können direkt durch einen Hitzeschock und einer resultierenden Zellnekrose aktiviert werden und in den Extrazellularraum gelangen, wo diese immunstimulatorische Wirkung entfalten [Melcher A et al., 1998, Srivastava P et al., 2002, Basu S et al., 2000]. Hyperthermie führt demnach über die Expression des Hitzeschockproteins 70 auch zu immunologischen Vorgängen.

Die extrazellulären HSPs werden z.B. von natürlichen Killerzellen erkannt, die wiederum eine Immunreaktion auslösen [Nössner et al., 2002, Srivastava, 2002, Jolesch et al., 2011]. HSP 70 ist das am stärksten hochregulierte Hitzeschockprotein nach einem nicht-lethalen Hitzeschock. Nach dem Hitzeschock wird es auch an der Oberfläche der Zelle präsentiert, wodurch die betroffenen Zellen für das Immunsystem erkennbar werden und von dendritischen Zellen prozessiert werden, was zu einer Aktivierung des Immunsystems führt [Milani et al., 2007].

5.3.2 Hyperthermie in der Klinik

Klinische Studien um den Effekt von Hyperthermie mit etablierten Therapieoptionen zu untersuchen wurden für viele Tumorentitäten, unter anderem für Lungenkrebs, Brustkrebs, Blasenkrebs, Hautkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, durchgeführt [Bettaieb et al., 2013, Van der Zee et al., 2008].

Bei lokal fortgeschrittenem Brustkrebs mit Infiltration der Brustwand zeigen sich vielversprechenden Resultate, wenn eine Bestrahlung mit einer zusätzlichen Hyperthermiebehandlung ergänzt wird [Welz et al., 2005]. Des Weiteren gibt es große Studien zu einer dreifach-Kombination aus Chemo-/Strahlentherapie und Hyperthermie beim fortgeschrittenen Cervixkarzinom [Heijkoop ST et al., 2012].

In der Gruppe der Hochrisiko-Weichteilsarkome zeigte sich kürzlich in einer multizentrischen Phase-III-Studie, dass (neo-) adjuvant eine Kombination von regionaler Hyperthermie und Chemotherapie (EIA-Schema) gegenüber Chemotherapie alleine, ein signifikant verbessertes Tumorausprechen, eine bessere lokale Kontrolle sowie einen signifikanten Vorteil im krankheitsfreien Überleben ergab. Zudem ließ sich eine nur sehr geringe Toxizität durch die Hyperthermiebehandlung verzeichnen [Issels RD, 2008 und 2010]. Die Langzeitbeobachtung zeigte zudem die signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens unter der Kombinationstherapie [Issels RD et al., 2015].

5.4 Trabectedin und Hyperthermie

Die regionale Hyperthermie ist eine etablierte und empfohlene Option in der Therapie des fortgeschrittenen Weichteilsarkoms. Da sich gezeigt hat, dass Trabectedin und Hyperthermie mit verschiedenen Komponenten der DNS-Reparatursysteme interagieren, scheinen sie vielversprechende Kombinationspartner zu sein. Hyperthermie inhibiert das HRR-System durch eine BRCA2 Degradation. Wie unter 5.2 beschrieben, sind Zellen, denen ein funktionsfähiges HRR-System fehlt, weitaus sensibler für eine Behandlung mit Trabectedin, sodass über diesen Mechanismus ein möglicher verstärkender Effekt zu erwarten ist.

Viele zytotoxische Agenzien oder auch ionisierende Strahlen führen, wie Trabectedin, über DNS-Schäden zum Zelltod der Tumorzellen. Diese Schäden können jedoch zu einem gewissen Maß von der DNS-Reparaturmaschinerie behoben werden. Dass dieser „Rettungsmechanismus“ von einer Hitzeapplikation lokal im Tumorgewebe blockiert wird, um spezifisch die Tumorzellen für die zytostatische Therapie zu sensibilisieren, ist ein komplett neuer Ansatz der Tumorthherapie.

Trabectedin inhibiert in vivo die Hitzeschock vermittelte Aktivierung des HSP 70-Promotors [Minuzzo et al., 2000]. Die Inhibition der Induktion von HSP 70 durch Trabectedin ist eine zusätzliche Rationale für eine Kombination von Trabectedin und Hyperthermie, um da die HSP 70 Induktion in Zusammenhang mit der Entwicklung der Thermotoleranz stehen könnte.

6. Zielsetzung

Im ersten Teil der Experimente sollten zunächst ausgewählte Zelllinien charakterisiert und auf ihre individuelle Hitzesensibilität untersucht werden. In diesem Schritt wurden die gewählten Zelllinien bei unterschiedlichen Temperaturen für definierte Zeiträume einem Hitzeschock unterzogen. Die Reaktion der verschiedenen Sarkomzellen auf die Applikation von Trabectedin in aufsteigenden Dosen war ebenfalls Teil der ersten Untersuchungen.

Im zweiten Teil sollte dann überprüft werden, ob die Kombinationsbehandlung mit Trabectedin und Hitzeschock einen verstärkenden Effekt, im Sinne einer gesteigerten Toxizität aufweisen.

In einem dritten Schritt wurde dann die Expression des Hitzeschockproteins 70 nach alleiniger Hyperthermie- und Trabectedin-Behandlung, sowie nach der Kombinationsbehandlung gemessen.

7. Material und Methoden

7.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

7.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Material:

Albumin Standard, (Thermo Scientific, USA)

EDTA (0,5 M), (Thermo Scientific, USA)

Dulbecco's modified eagle's serum (DMEM), (Invitrogen, USA)

Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS), (Invitrogen, USA)

Trypsin-EDTA (0,05 %), (Invitrogen, USA)

Fetales Kälberserum (FCS), (PANTM Biotech GmbH, Aidenbach)

Minimum Essential Medium Eagle, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg)

Rinderserumalbumin (BSA), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg)

Natrium Pyruvat, (Biochrom AG, Berlin)

Non-essential amino acid (NEA), (Biochrom AG, Berlin)

Ethanol

Penicillin/Streptomycin

PBS-Puffer

RPMI Medium

DMSO

Kunststoffartikel für Zellkultur

Geräte:

Brutschrank, (Binder)

Zentrifuge

Laminar-Flow-Werkbank, (Herasafe Thermo Scientific)

Standardlichtmikroskop

Tabelle 3

Verwendete Zelllinien

MRC-5 p 5 p = Passage	Fibroblasten Normal human fetal lung fibroblasts (diploid, 46 XY)	DMEM (4,5 g/L Glucose) 2 mM L- Glutamine, 5 % FCS	Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum München
SKUT-1 p 25 S1	Leiomyosarkom Mixed mesodermal tumor consistent with leiomyosarcome grade III, hypodiploid to hyperdiploid (tumorigenic in nude mice)	MEM Eagle in Earle's BSS mit nonessential amino acids and Na- Pyruvat, 10 % FCS	CLS (300455)
SW 872 p 37 S1	Liposarkom Undifferentiated tumor consistent with liposarcoma hypertriploid; 66 - 81 (tumorigenic in nude mice)	DMEM (4,5 g/L Glucose), 2 mM L- Glutamine, 5 % FCS	CLS (300405)
SW 982	Synovialsarkom Undifferentiated	DMEM (4,5 g/L Glucose), 2 mM L-	CLS (300404)

p 47	malignant tumor	Glutamine, 5 % FCS	
S1	hyperdiploid; modal: 48; 42 - 58		

7.1.2 Zellkultur und Zellzahlbestimmung

Die Zellkulturbehandlungen sowie die Zubereitung der benötigten Lösungen fanden unter sterilen Bedingungen unter Verwendung der Laminar-Air-Flow statt. Die Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach jeweils ca. 72 h wurden die Zellen bei ausreichender Konfluenz nach mikroskopischer Kontrolle passagiert. Dafür wurden der Kulturflascheninhalt zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und im Anschluss für 3 min mit 2 ml Trypsin bei 37 °C im Brutschrank gelöst. Trypsin spaltet als Endopeptidase des Dünndarms extrazelluläre Proteine und löst die Zellen so vom Boden der Kulturflasche. Da dieser Vorgang sein Optimum bei einer Temperatur von 37 °C erreicht wurden die Kulturflaschen für 2 min in den Brutschrank bei 37 °C gestellt. Mit 10 ml Abstoppmedium (10 % FCS) wurden die gelösten Zellen (Kontrolle mittels Lichtmikroskop) in ein 50 ml Falcon überführt und bei 1500 rpm abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet zunächst in 5 ml frischem Medium resuspendiert, wovon wiederum 10 µl je nach Dichte der Zellen mit Trypanblau verdünnt und in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben wurde. Die Trypanblaufärbung stellt eine sichere und schnelle Methode dar, um die Anzahl der Zellen in einer umschriebenen Probe zu ermitteln. Als saurer Farbstoff kann Trypanblau geschädigte Zellmembranen durchdringen und intrazellulär an bestimmte Proteine binden. Diese beschädigten Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau. Vitale Zellen hingegen werden als weißliche, runde Strukturen sichtbar, was eine selektive Darstellung der vitalen Zellen unter dem Mikroskop erlaubt. Um die Zellzahl zu quantifizieren wurden die vitalen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

Nachdem die einzelnen Kammern der Neubauer-Zählkammer mit der Suspension befüllt wurden, konnten die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt werden und die gewünschte Zellzahl pro Milliliter berechnet werden. Die Formel zur Berechnung der Zellkonzentration

pro ml lautet: Gezählte Zellen $\times 10^4 / 4 \times 2 / 2$. In der Regel wurden 1 - 1,5 Millionen Zellen pro 75 cm² Kulturflasche ausgesät.

7.1.3 Kryokonservierung

Nach oben beschriebener Methode wurden die Zellen ebenfalls für das Einfrieren vorbereitet. Die Zellen wurden für diesen Verwendungszweck mit einer höheren Zellzahl (5.000.000/ml) in einem speziellen Einfriermedium resuspendiert, in welchem, um eine Zellschädigung durch eine mögliche Kristallbildung zu verhindern, 10 % DMSO hinzugefügt wurde. Die Suspension wurde in Cryovials bei – 80 °C eingefroren und nach wenigen Tagen zur langfristigen Verwahrung in Stickstofftanks überführt. Wenn eine erneute Kultur der Zellen gewünscht war, wurden die Cryovials aufgetaut und mit einem Nährmedium (siehe Tabelle 3) resuspendiert. Nach Zentrifugation erfolgte eine erneute Resuspension und Passage in eine Kulturflasche. Nach 24 h Wachstumsphase standen die Zellen für eventuelle Experimente bereit.

7.2 WST-Zellproliferationsassay

Zusatzmaterial:

WST1 Cell Proliferation Reagent (Roche, Mannheim)

96-well-Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen)

Geräte:

ELISA-Reader (SPECTROstar^{Nano}), (BMG Labtech)

Um den zytotoxischen Effekt der experimentellen Behandlungen zu messen wurde ein WST-Assay zur Messung der Viabilität der Zellen verwendet. In vitalen Zellen, die eine intakte Atmungskette enthalten, werden Tetrazoliumsalze, wie im WST1 Cell Proliferation Agent vorhanden, zu farbigen Formazansalzen mittels NADH und NADPH reduziert. Die Quantifizierung erfolgt photometrisch mit Hilfe des ELISA-Readers (bei 420 - 480 nm),

wobei die Absorption direkt mit der Aktivität der Atmungskette in den Zellen und indirekt mit der Zellzahl korreliert.

Um eine standardisierte und möglichst genau dem exponentiellen Wachstum der Zellreihen entsprechende Zellzahl pro Well zu finden, wurden zunächst alle zu untersuchenden Zelllinien in 96-Well-Platten mit aufsteigende Zellzahlen (500 - 64.000) ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Eine initiale Aussaat von 3000 Zellen pro Well konnte bei der für die Behandlung notwendigen Kulturdauer im Viabilitätsassay als optimal ermittelt werden (Graphik nicht gezeigt).

In unterschiedlichen Ansätzen wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Trabectedin, verschiedenen Hitze-Schock-Bedingungen (unterschiedliche Temperaturen und Expositionszeiten) oder einer Kombination behandelt (siehe Behandlungsschema).

Um einen möglichen Effekt des DMSO, welches in 0,1 %iger Konzentration in der Trabectedinsuspension vorhanden war, zu kontrollieren, wurden Kontrollmessungen mit Medium ohne und mit 0,1 %iger DMSO-Lösung durchgeführt.

Die Zellen wurden 24 h nach der Auskultivierung behandelt. Nach Beendigung der Behandlungszeiten erfolgte die Messung im ELISA-Reader. Zuvor musste jedem Well 10 µl des Cell Proliferation Agens hinzugegeben werden und für 1 h inkubiert werden. Aus der gemessenen Absorption kann die vorhandene Zellviabilität quantifiziert werden.

7.3 Klonogener Assay

Material:

6-well-Platten, (Becton Dickinson, USA)

Zellzählstift, (Novodirect GmbH, Kehl/Rein)

Färbung/Fixierung:

20 % Ethanol, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg)

0,8 % Ammoniumoxalat, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg)

2 % Crystal violet, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg)

Colony fixation-staining solution, glutaraldehyd 6,0 %, crystal viole 0,5 % in H₂O

Der Koloniebildungstest stellt eine sehr sensitive Methode dar, um zu prüfen ob eine Behandlung die Proliferationsfähigkeit der Zellen beeinträchtigt hat. Der Test misst in vitro ob die einzelne Zelle die Fähigkeit eine Kolonie zu bilden besitzen, dies wird als Maß der unbegrenzten Teilungsfähigkeit einer Zelle angesehen. Eine Kolonie wird definiert als Ansammlung von mindestens 50 Zellen. Der klonogene Assay ist eine geeignete Methode um die Zellreproduktion nach einer vorangegangenen Bestrahlung zu messen, sie kann jedoch auch verwendet werden um die Reproduktion nach Gabe von anderen zytotoxischen Agentien zu messen [Franken et al., 2006].

Insgesamt ca. 10 Tage nach Aussaat, Ziel ist es etwas 6 potentielle Zellteilungen abzuwarten, wurden die Kolonien nach Fixation und Färbung unter dem Mikroskop gezählt. Es erfolgte die Methode „Plating before treatment“: Unbehandelte Zellen wurden wie gewohnt geerntet, in 6-Well-Platten ausgesät und für 24 h bei 37 °C im Brutschrank gehalten. Diese Ruhezeit dient dem Setzen bzw. Anheften der Zellen am Boden der 6-Well-Platten. Dem schloss sich eine 72 h Inkubationsperiode mit Trabectedin in verschiedenen Konzentrationen (0,1 - 1000 pM und DMSO-Kontrolle) an. Der Hitzeschock erfolgt analog zum WST-Assay 48 h nach Aussaat und 24 h nach der Behandlung mit Trabectedin. Nach 72 h wurde vorsichtig das Medium gewechselt und weitere 4 - 7 Tage unter mikroskopischer Kontrolle gewartet. Nach o. g. Färbung und Fixation wurde die Anzahl der Kolonien unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen ausgezählt in Bezug auf die Anzahl der Kolonien unter der Kontrollbedingung gesetzt und graphisch dargestellt.

7.4 Hitzeschockbehandlung

Die Hyperthermiebehandlung der Zellen wurde im Brutschrank und im Wasserbad simuliert. Als Behandlungstemperaturen wurde 41,8 °C, 43 °C und 44 °C gewählt. Als Kontrolle dienten jeweils die Zellen, die für die gleiche Zeitdauer bei 37 °C im Brutschrank gehalten wurden. Die Dauer der Hyperthermiebehandlung betrug, im Wasserbad ohne Aufwärmphase und im Brutschrank mit einer Aufwärmphase von 30 min, entweder 1 h oder 2 h. Die Auswirkung der Behandlung auf die Zellen wurde mittels WST-Assay und klonogenem Assay erhoben.

7.5 Trabectedinbehandlung

Trabectedin wurde von der Hausapotheke des Klinikum Grohaderns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Ausgangslösung entsprach einer Konzentration von 65,6 μM . Im Folgenden wurde die Trabectedin-Lösung aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Aliquots enthielten Trabectedin in einer 1:100 Verdünnung mit sterilem Wasser und 10 % DMSO.

Für den WST-Assay wurden immer fixe Zellzahlen für unterschiedlich lange Zeitdauern (24, 48 und 72 h) mit Trabectedin inkubiert. Für den klonogenen Assay erfolgte die Inkubation mit Trabectedin für 72 h. Alle Konzentrationsstufen und Kontrollansätze enthielten 0,1 % DMSO. Die jeweiligen Bedingungen und Therapiedauern sind bei der Ergebnisdarstellung beschrieben.

7.6 Kombinationsbehandlungen

Nach 24 h Kultur bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank erfolgte die Gabe von Trabectedin (s. u.), nach weiteren 24 h wurde der Hitzeschock appliziert (s. u.) und nach weiteren 48 h erfolgte entweder die Messung im Rahmen des WST-Assays oder ein Mediumwechsel und eine anschließende Auswertung der Kolonien nach ca. 7 Tagen im Rahmen des klonogenen Assays.

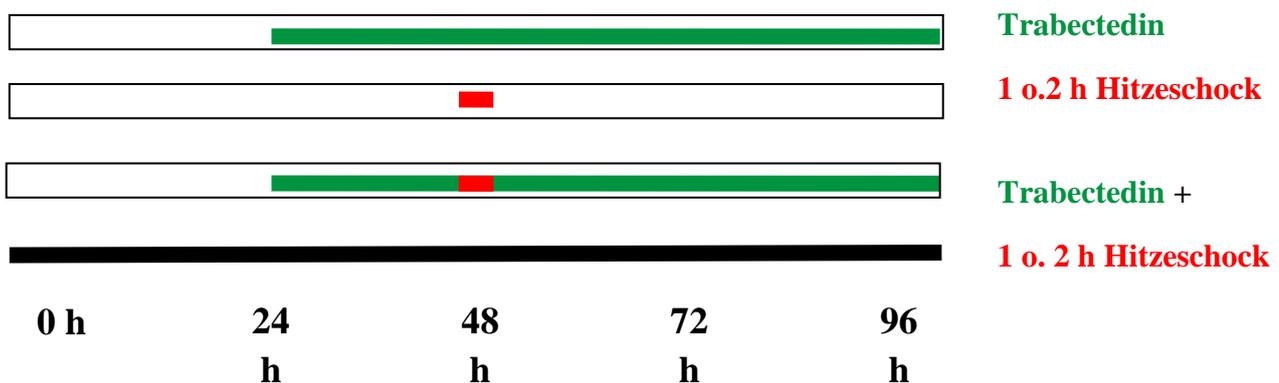


Abbildung 2 Zeitlicher Ablauf der jeweiligen Behandlungen

7.7 Western-Blot:

Der Western Blot ermöglicht den spezifischen immunologischen Nachweis von Proteinen, in diesem experimentellen Ansatz insbesondere den Nachweis einzelner Hitzeschockproteine nach zeitlich aufeinander abgestimmter Behandlung mit Hyperthermie und Trabectedin.

Die Zellen wurden mit Trabectedin in aufsteigenden Dosen behandelt. Nach 24 h erfolgte die Hyperthermiebehandlung für 90 min bei 41,8 °C oder 43 °C. Nach unterschiedlichen Erholungszeiten erfolgte die Proteinextraktion und Messung der Konzentration der Hitzeschockproteine. Für die Untersuchungen der HSP 70 Expression nach erfolgter Behandlung wurde eine Erholungszeit von 16 h festgesetzt.

Zusatzmaterial:

EDTA, (Thermo Scientific, USA)

Lysispuffer, (Thermo Scientific, USA)

Nitrozellulose Membran, (Thermo Scientific, USA)

Protease/Phosphataseinhibitor, (ThermoScientific, USA)

Pierce BCA Protein Assay-Kits, (Thermo Scientific, USA)

Loadingpuffer, (Roth)

Natriumchlorid, (Merck, Grafing)

Protein Standard (Kaleidoskope), (BioRad, München)

Rinderserumalbumin (BSA), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg)

Tris, (Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München)

TBS 10x, (Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München)

Tween 20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg

Western-Blot Detection Reagent, (GE Healthcare, UK)

Geräte:

Ultraschall, Branson Sonifier 250

Plattenphotometer SPECTROstar^{Nano}, BMG Labtech

Mini Trans-Blot® Cell Anlage, Bio Rad

Nassblot-Apparatur 422 Electro Eluter, BioRad

Optimax X-Ray Film Processor, PROTEC

7.7.1 Proteinisolation und -Messung

Die zu analysierenden Zellen wurden wie bei den vorherigen Experimenten ausgesät (in 25 cm² Kulturflaschen, 0,7 Millionen Zellen pro Flasche) und nach obigem Schema behandelt.

Nach Abschluss der Behandlung erfolgte die Proteinisolation, dafür wurde das überständige Medium der Kulturflaschen verworfen und die zu analysierenden Proben zunächst auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst und nach Zugabe des Abstopppmediums in ein geeignetes Falconröhrchen gegeben. Im Anschluss erfolgten die Zentrifugation und die Aufnahme der Zellpellets in 1 ml PBS. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets entweder eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Für die Weiterverwendung wurden die Pellets mit 100 µl eines Puffers (10 µl Protease-/Phosphataseinhibitor und 10 µl EDTA mit 1 ml Lysispuffer (1:10 verdünnt)) aufgenommen und weitere 15 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss daran erfolgte die Ultraschallbehandlung der Zellen für 3 sec (50 % Leistung, Output 5). Nach einer 10 min Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen wiederum für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (13.000 g), um im Anschluss den proteinhaltigen Überstand in Eppendorf-Röhrchen zu überführen.

Anschließend wurde mittels Pierce BCA Protein Assay-Kit die Proteinkonzentration gemessen. Um die Messung vorzubereiten wurde zu den Proben und den Kontroll-Standards die bereit gestellte „working-solution“ zugegeben und das Gemisch für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer 10 min Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei 562 nm im Plattenphotometer gemessen.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben zunächst mit dem Lysispuffer auf 1 µg Protein/µl Probe verdünnt und anschließend mit 25 µl Loadingpuffer versetzt. Dann erfolgte die Denaturierung für 10 min bei 95 °C im Heizblock.

7.7.2 Blotting

Nachfolgend wurde die SDS-Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), die eine Variante der Gelelektrophorese darstellt um Stoffgemische nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufzutrennen, durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden die Proben kurz zentrifugiert und gevortext. Es wurden Trenn- und Sammelgele, die 4 bzw. 12 % Acrylamid enthielten, hergestellt. Die Gele wurden über Nacht gekühlt, um die Auspolymerisierung vom Polyacrylamid stattfinden zu lassen. Nach Fertigstellung der Gele wurden diese mit den Proben (10 bis 100 µg Protein/Slot) und dem Standard (Protein Marker „Kaleidoskope“) beladen. Der Lauf erfolgte in Elektrophorese Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS, pH 8,2 - 8,3) mit der Mini Trans-Blot® Cell Anlage bei 75 V für 15 min anschließend bei 120 V für 1 h 45 min.

Filter und eine Nitrozellulose-Membran wurden im Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol) eingeweicht. Nach Beendigung der SDS-Page wurde das Gel auf der Blot-Apparatur (Porendurchmesser 0,45 µm) geschichtet.

Im Anschluss an das „Blotting“ folgte zunächst ein Waschvorgang mit TBS-T (0,2 % Tris; 1,5 M NaCl; 0,05 % Tween; pH 7,4) und im Anschluss eine Inkubation mit TBS-T und 5 % Milchpulver für ca. 45 min bei Raumtemperatur. Dies dient dem Blockieren von freien Bindungsstellen, an die sich sonst die spezifischen Antikörper heften würden.

Nach Beendigung der Inkubation mit Milchpulver folgten drei Waschvorgänge mit TBS-T für jeweils 5 min Nach Hinzufügen des ersten Antikörpers (Verdünnung mit 5 % BSA und TBS-T) wurden die Membranen über Nacht unter ständiger Bewegung bei 4 °C inkubiert. Es folgten wiederholte Waschvorgänge mit TBS-T am darauffolgenden Tag und abschließend die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Verdünnung mit TBS-T und Milchpulver) für ca. 1 h bei 4 °C.

Für die Entwicklung wurden die Blots in Entwicklungskassetten transferiert und mit 1 ml Entwicklungslösung (500 µl Detection Reagent 1 + 500 µl Detection Reagent 2) benetzt. Für

die Entwicklung wurde Optimax X-Ray Film Processor verwendet und unterschiedlich lange Belichtungszeiten ausgewählt.

8. Ergebnisse

8.1 WST1-Viabilitätsassay

8.1.1 Bestimmung der Zellzahl für den WST-Assay

Zur Bestimmung der in den WST-Assay einzubringenden Zellzahlen wurden sogenannte Zellverdünnungsreihen durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien waren Fibroblasten (MRC-5), Liposarkomzellen (SW 872), Leiomyosarkomzellen (SKUT-1) und Synovialsarkomzellen (SW 982). Für das geplante experimentelle Setting wurden Zellen der gewählten Zelllinien in aufsteigenden Zellzahlen (500 - 64.000 Zellen/Well) in 96-Well-Platten ausgesät. Das Wachstum bzw. die Zellzahl wurde täglich kontrolliert und zeigte, dass in dem Bereich zwischen 2000 und 4000 Zellen pro Well ein exponentielles Wachstum zu verzeichnen war, sodass dieser Bereich für den Viabilitätsassay geeignet erschien. Zu sehen war außerdem, dass die Synovialsarkomzellen (SW982) die höchste Proliferation zeigten. Die Fibroblasten (MRC-5) wiesen als Nicht-Tumorzelllinie die niedrigste Proliferationsrate auf.

8.1.2 Bestimmung der Behandlungsbedingungen

In den ersten WST-Experimenten zur toxischen Wirkung von Trabectedin alleine, die mit Konzentrationsreihen bis 1000 nM durchgeführt wurden, zeigte sich ein zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt. In der Abbildung 4 sind die Ergebnisse für die Liposarkomzellen wiedergegeben.

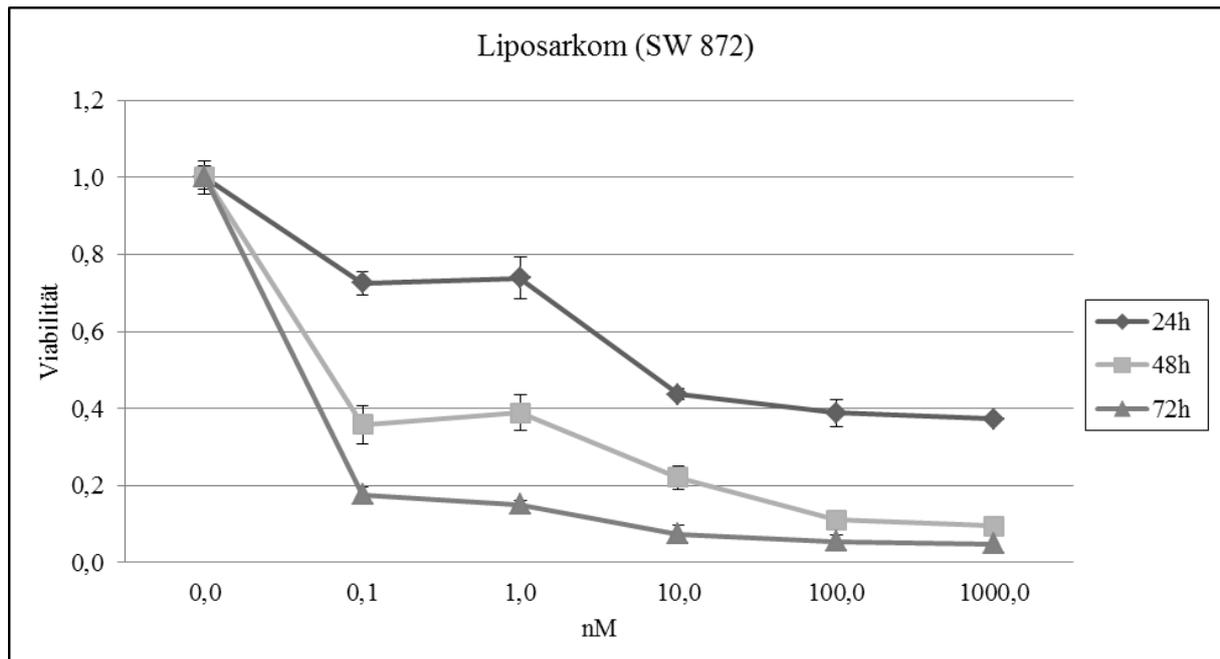


Abbildung 3 Zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt am Beispiel der Trabectedinbehandlung der Liposarkomzelllinie SW 872; Liniendiagramm; unterschiedliche Inkubationszeiten (24 - 72 h) mit aufsteigenden Konzentrationen von Trabectedin (0,1 - 1000 nM).

Zum einen nimmt bei steigender Trabectedin-Konzentration das Zellüberleben (Viabilität) stetig ab, zum anderen wird ersichtlich, dass wenn die Inkubationsdauer verlängert wird, ebenso die Viabilität abnimmt. Diese Abbildung zeigt bereits deutlich, wie sensitiv die Zelllinien auf eine Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Trabectedin im nanomolaren Bereich reagieren. Bei einer Inkubationszeit von 72 h sinkt bei einer Konzentration von 100 nM das Zellüberleben auf unter 10 %.

Da bereits eine Behandlung mit 0,1 nM Trabectedin zu einer ausgeprägten Reduktion der Viabilität sowohl bei den Liposarkomzellen, als auch bei den Leiomyosarkomzellen (SKUT-1, Daten nicht gezeigt) führte, wurden die folgenden Experimente mit niedrigeren Konzentrationen von Trabectedin (0,01- 1000 pM) durchgeführt. So sollte die Viabilität sensitiver beobachtet werden und kleine, aber essentielle, Effekte besser nachgewiesen werden. Die Inkubationszeiten wurden ebenfalls in den ersten Experimenten variiert, wir testeten eine 24 h, sowie 48 h und 72 h Inkubationsperiode. Als Inkubationsdauer wurde schließlich der Zeitraum von 72 h gewählt, da sich hier in den ersten Experimenten zur

Bestimmung der Behandlungsbedingungen die effektivste Reduktion der Viabilität nachweisen ließ.

8.1.3 Behandlung mit Trabectedin

Nachdem die Inkubationsdauer von 72 h, sowie die Verdünnungen der Konzentrationsreihe (0,01 - 1000 pM) festgelegt waren, wurden die vier ausgewählten Zelllinien (MRC-5, SKUT-1, SW 872 und SW 982) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Trabectedin für 72 h bei 37 °C inkubiert. Mittels des WST-Assays wurde anschließend die Viabilität der Zellen bestimmt.

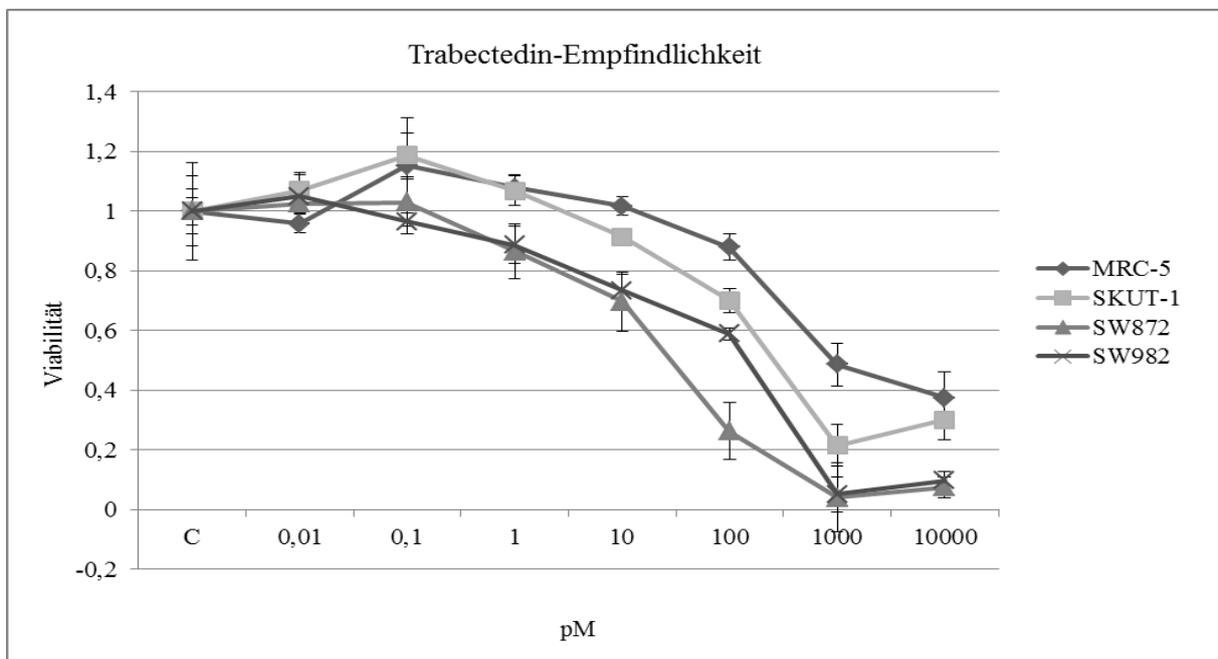


Abbildung 4 Konzentrationsabhängiger Effekt der Trabectedinbehandlung auf die Viabilität der Zelllinien MRC-5, SKUT-1, SW 872, SW 982; Liniendiagramm; Inkubationszeit 72 h, aufsteigende Konzentrationen Trabectedin 0,01 - 10000 pM.

In der Abbildung 4 werden die Ergebnisse des WST-Assays dargestellt. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität bei allen vier Zelllinien. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (0,01 - 10000 pM) Trabectedin behandelt, als Kontrolle

diente jeweils eine unbehandelte Probe. Die Synovial-, sowie die Liposarkomzellen waren sehr sensitiv für die Behandlung mit Trabectedin. Bei einer Konzentration von 10 pM war die Viabilität bereits auf ca. die Hälfte verringert. Die Leiomyosarkomzellen wiesen erst bei einer Konzentration von ca. 300 pM eine Viabilität von 50 % auf. Die Fibroblasten stellten sich als die resistenteste Zelllinie dar, wobei die Behandlung mit einer Trabectedin-Konzentration von 1000 pM (entspricht 1 nM) in einer Abnahme der Viabilität auf ca. 38 % resultierte. Das Leiomyosarkom zeigte sich intermediär sensitiv.

8.1.4 Behandlung mit Hitzeschock

Um die gewählten Zelllinien zunächst individuell auf die jeweilige Hitzeempfindlichkeit zu untersuchen, wurden die vier Zellreihen im nächsten Schritt für verschiedene Zeitdauern und mit verschiedenen Temperaturen inkubiert.

Zur Bestimmung des Effektes des alleinigen Hitzeschocks auf die Viabilität wurden alle untersuchten Zellreihen für eine Zeitdauer von 1 bis zu 4 h mit 41,8 °C oder 43 °C im Brutschrank inkubiert. Es wurden Vergleichsexperimente mit einer Inkubation im Wasserbad (dargestellt als gestrichelte Linien in den Diagrammen) durchgeführt. Da durch die Inkubation im Brutschrank bei technisch weniger Aufwand gleiche Toxizitäten erreicht wurden, verwendeten wir diese für die weiteren Experimente. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Zellen bei 37 °C (gleiches Zeitschema) im Brutschrank inkubiert. Nach der jeweiligen Hitzeschock-Applikation wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C im Brutschrank gehalten. Diese Zeitspanne wird im Folgenden als „recovery time“ (Erholungszeit) bezeichnet. Diese Phase wurde miteinbezogen, da direkt nach dem applizierten Hitzeschock am ehesten im Rahmen einer akuten Stressreaktion der Zellen eine deutliche Zunahme der Viabilität gemessen wurde (Daten nicht gezeigt). Die gemessenen Viabilitäten sind in den Abbildungen 5 - 8 dargestellt.

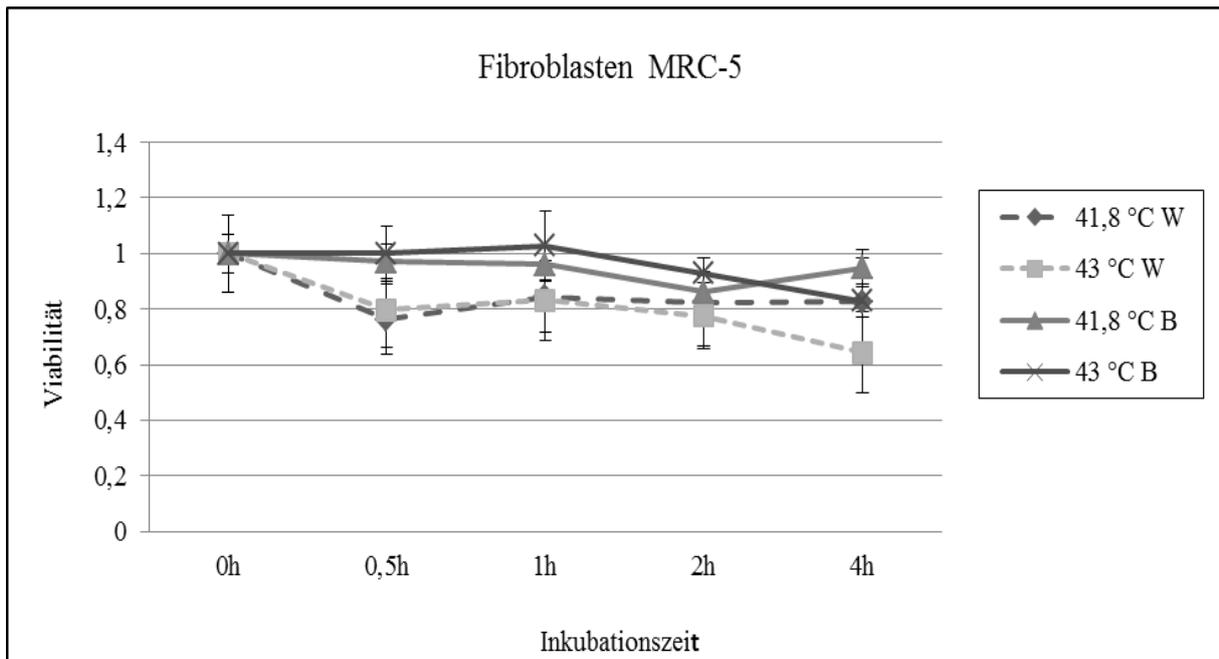


Abbildung 5 Zeitabhängiger Effekt der Hitzeapplikation am Beispiel der Fibroblasten MRC-5; Liniendiagramm; Inkubation im Brutschrank (B) und im Wasserbad (W) für unterschiedliche Applikationsdauern (0,5 bis 4 h).

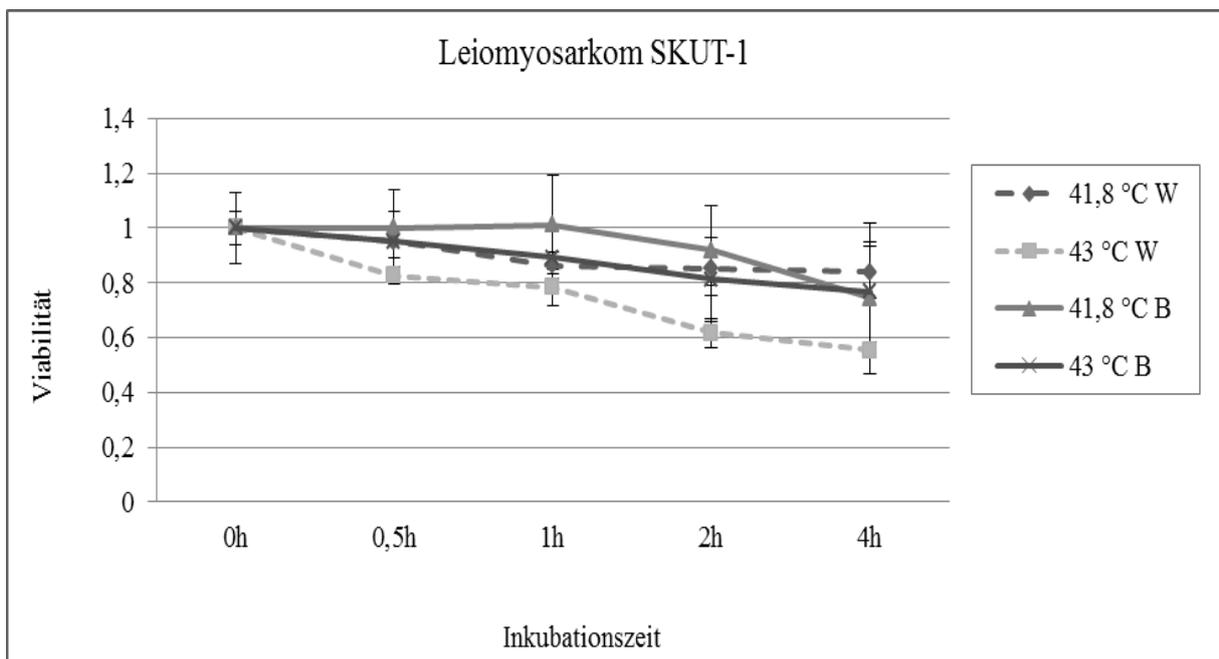


Abbildung 6 Zeitabhängiger Effekt der Hitzeapplikation am Beispiel des Leiomyosarkom SKUT-1; Liniendiagramm; Inkubation im Brutschrank (B) und im Wasserbad (W) für unterschiedliche Applikationsdauern (0,5 bis 4 h).

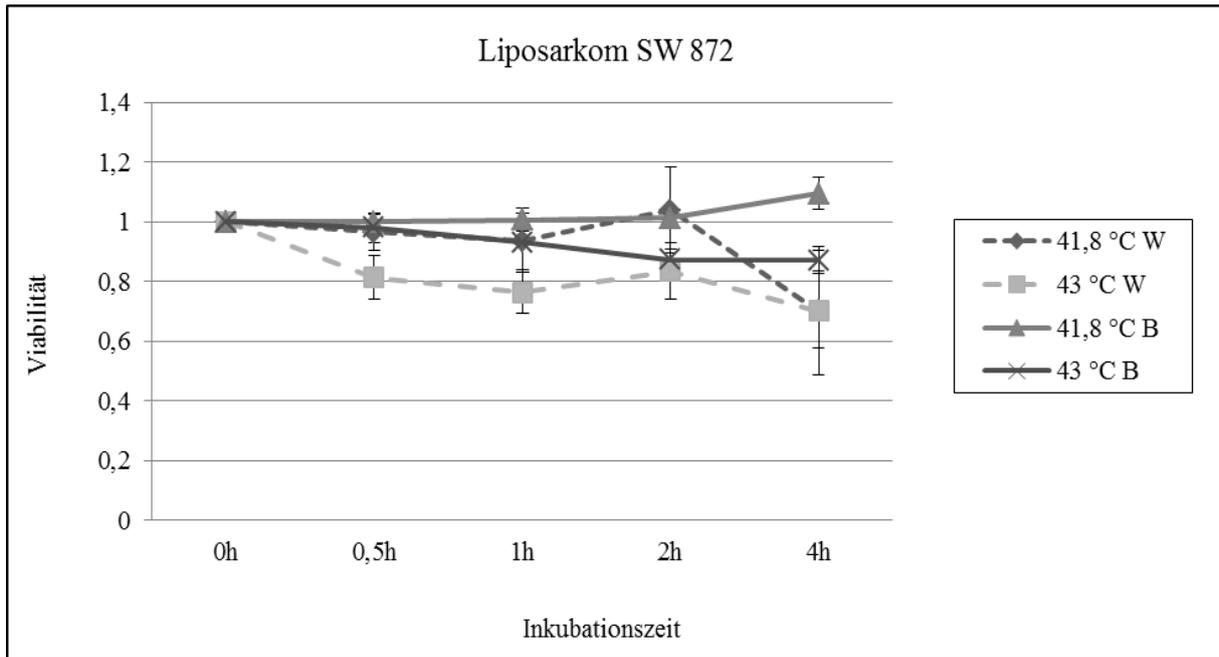


Abbildung 7 Zeitabhängiger Effekt der Hitzeapplikation am Beispiel des Liposarkom SW 872; Liniendiagramm; Inkubation im Brutschrank (B) und im Wasserbad (W) für unterschiedliche Applikationsdauern (0,5 bis 4 h).

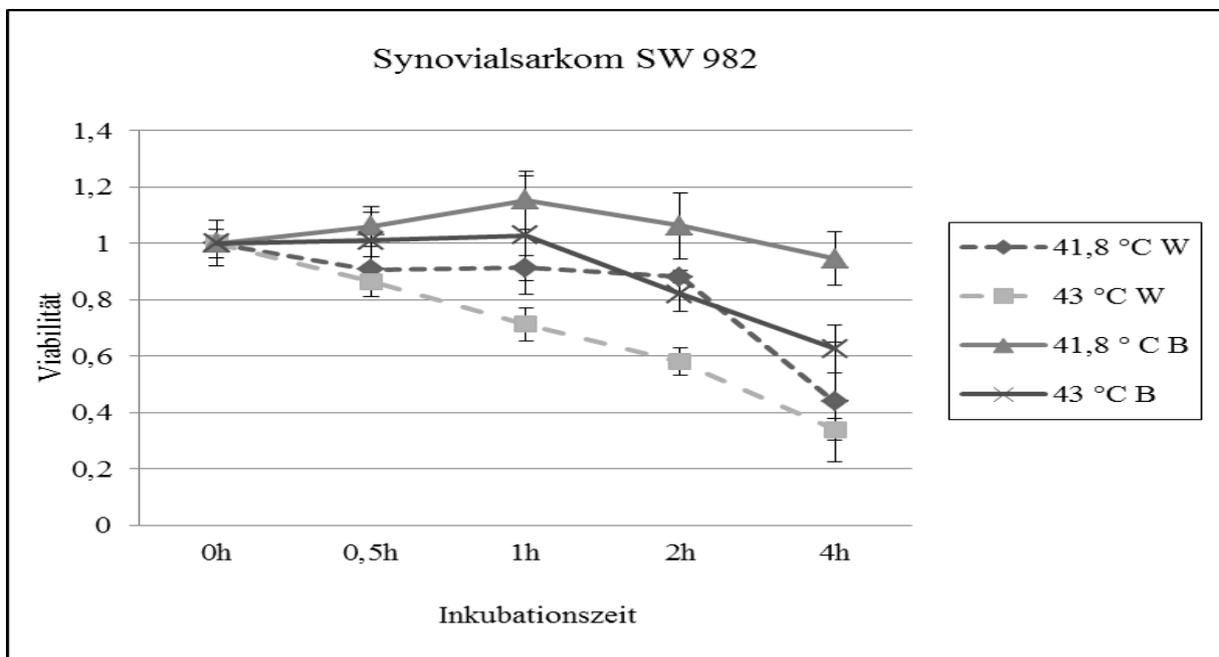


Abbildung 8 Zeitabhängiger Effekt der Hitzeapplikation am Beispiel des Synovialsarkom SW 982; Liniendiagramm; Inkubation im Brutschrank (B) und im Wasserbad (W) für unterschiedliche Applikationsdauern (0,5 bis 4 h).

Die Hyperthermiebehandlung der Fibroblasten zeigte nur sehr begrenzt einen Effekt bezogen auf die Abnahme der Viabilität. Die Zelllinie stellte sich als eher resistent gegenüber einer alleinigen Hitzebehandlung dar. Am effektivsten zeigte sich die Abnahme der Viabilität bei einer Behandlung mit 43 °C bei einer vierstündigen Inkubationsdauer mit einer Reduktion auf maximal 80 % der Ausgangsviabilität. Die Liposarkomzellen wiesen ein vergleichbar geringes Ansprechen auf die Hitzebehandlung auf. Die Leiomyosarkomzellen zeigten generell eine höhere Empfindlichkeit auf die Hyperthermiebehandlung. Selbst die alleinige Inkubation mit 41,8 °C im Brutschrank konnte nach vier Stunden eine Reduktion der Viabilität auf knapp 80 % erzielen. Bei 43 °C zeigte sich zusätzlich ein verstärkter Effekt mit einer Abnahme der Viabilität um fast die Hälfte.

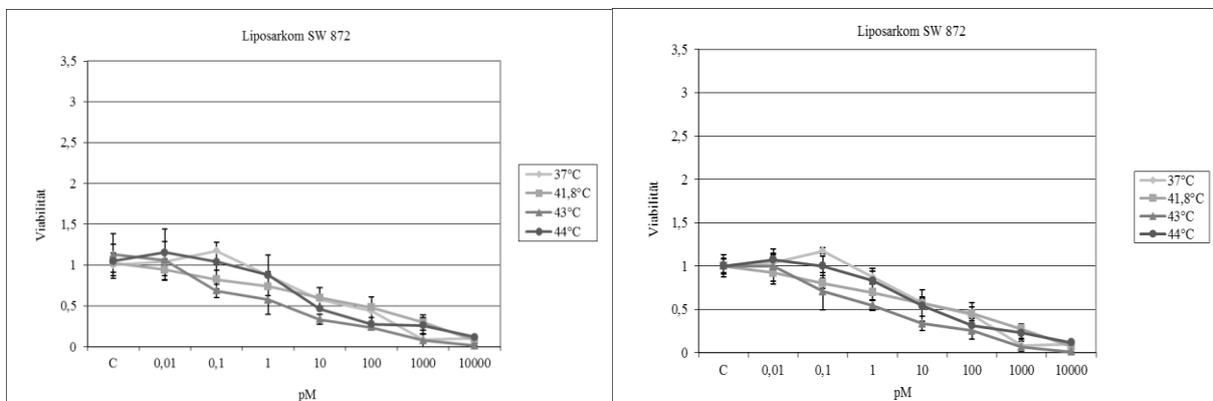
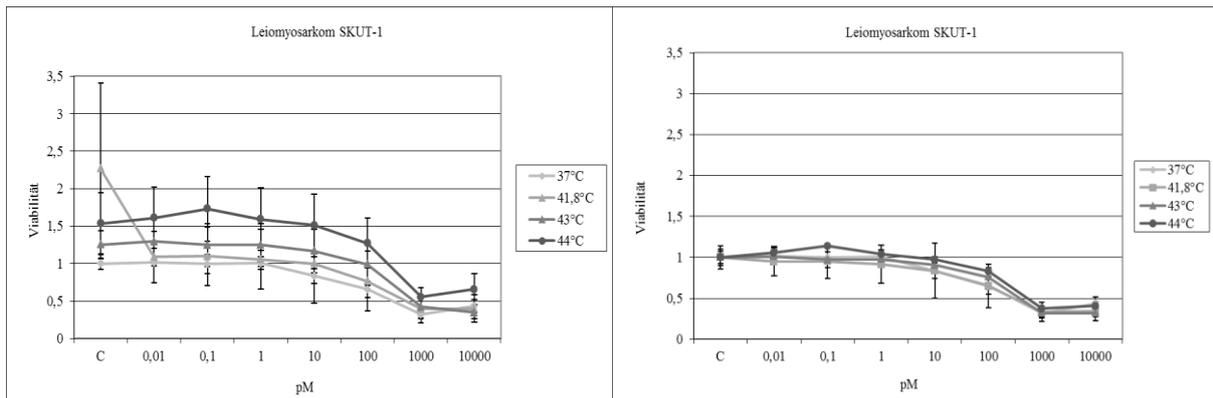
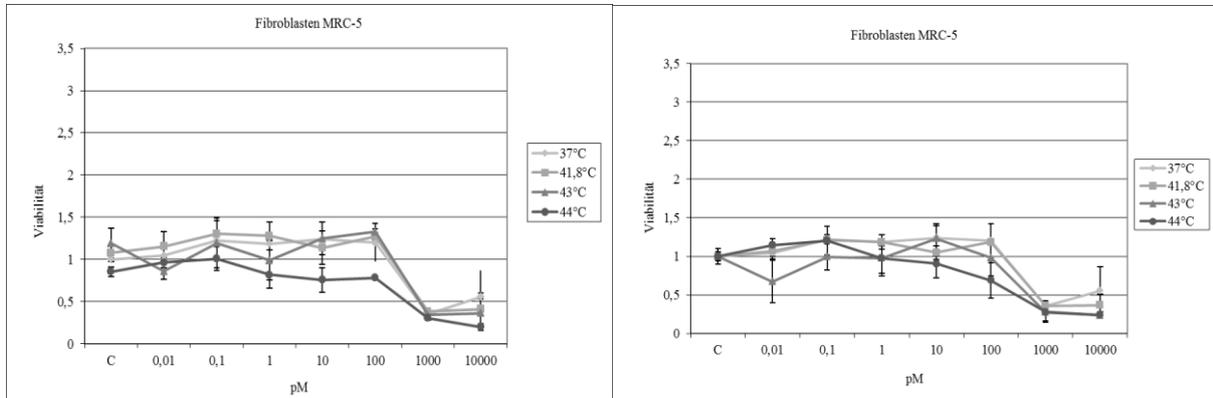
Das Synovialsarkom präsentierte sich ebenfalls als sehr empfindlich gegenüber der Hyperthermie-Behandlung. Nach einer vierstündigen Hitzebehandlung bei 43 °C im Brutschrank konnte eine Abnahme der Viabilität auf etwa 60 % erzielt werden und im Wasserbad sogar auf unter 40 %.

Insgesamt war die Effektivität der Behandlung im Wasserbad stärker, was am Ehesten durch den höheren zellulären Stress wegen einer schnelleren Aufwärmung zu erklären ist. Da aber auch bei der Inkubation im Brutschrank relevante Reduktionen der Viabilitäten detektierbar waren, wurden aufgrund der einfacheren und schnelleren Durchführbarkeit die Inkubationen der folgenden Experimente im Brutschrank durchgeführt.

8.1.5 Behandlung mit Trabectedin und Hyperthermie

In den nachfolgenden Experimenten wurde nun die Kombinationsbehandlung mit Trabectedin und Hyperthermie an den Zelllinien getestet.

8.1.5.1 Kombinationsbehandlungen 90 Minuten Hitzeshock und Trabectedin



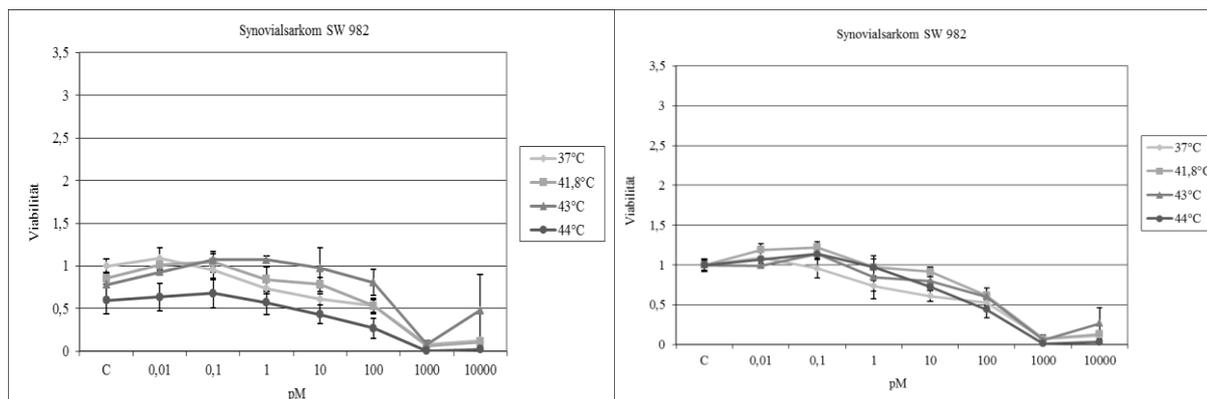


Abbildung 9 90 min Hitzeschock, Kombinationsbehandlungen bestehend aus einer Hitzeapplikation und einer Trabectedin-Behandlung; Liniendiagramm; MRC-5, SKUT-1, SW 872, SW 982. Links unkorrigierte Werte, rechts korrigiert um den toxischen Effekt der Hyperthermiebehandlung.

In Abbildung 9 sind die Resultate der Kombinationsbehandlungen (Hyperthermie und Trabectedinapplikation) am Beispiel der o. g. Zelllinien dargestellt. Ein Divergieren der Kurven in den rechtsseitig abgebildeten Darstellungen weist auf eine relevante Chemosensibilisierung hin.

Die Fibroblasten stellten sich in den vorhergehenden Experimenten als die resistentesten Zellen dar. Diese Beobachtung wurde in dem Kombinationsexperiment bestätigt. Eine Abnahme der Viabilität konnte erst bei höheren Trabectedin-Konzentrationen erreicht werden (ab 10 pM). Eine zusätzliche relevante Beeinflussung durch die verschiedenen Hyperthermiebehandlungen zeigte sich nicht. Auch bei der höchsten gewählten Konzentration von 10000 pM konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Die Leiomyosarkomzellen zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität bis 1000 pM. Erneut ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Temperaturen feststellen.

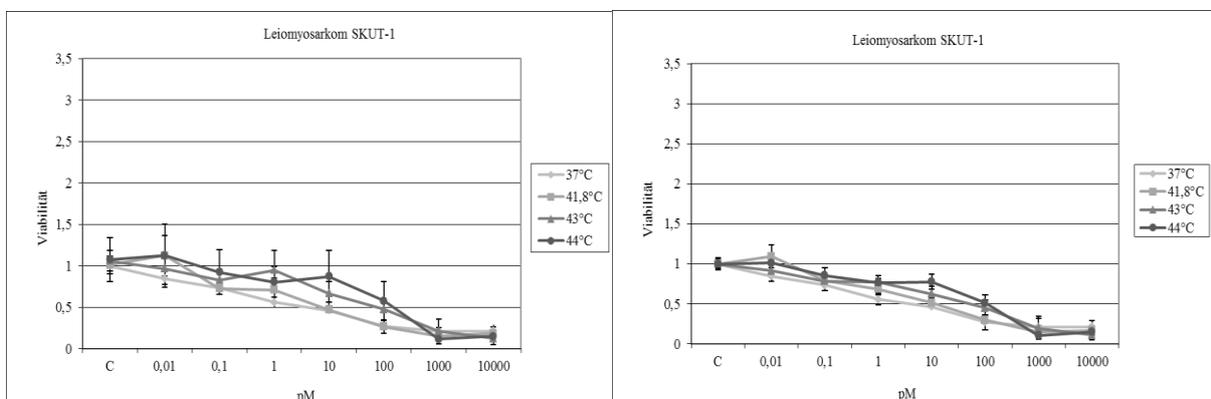
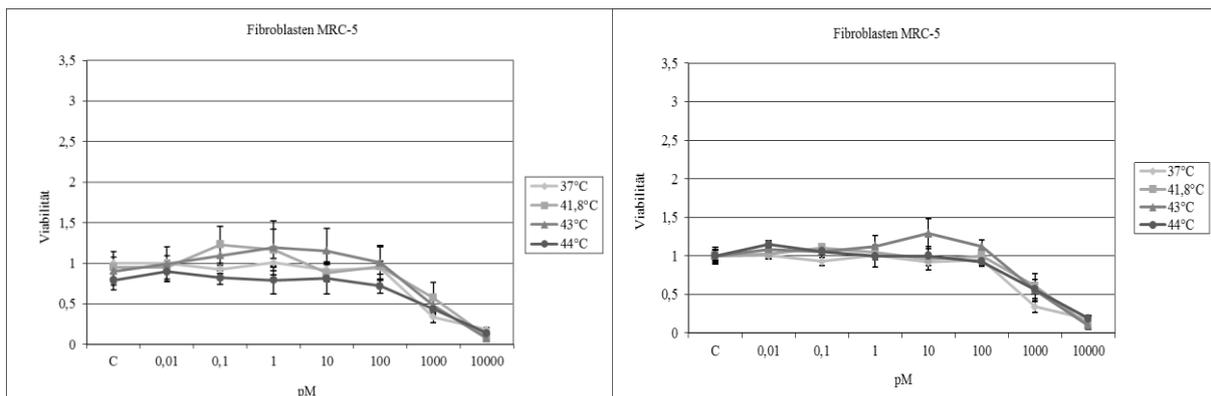
Die Liposarkomzellen zeigten im Vergleich zu den anderen Zelllinien das sensitivste Ansprechen auf die Trabectedinbehandlung. Eine Konzentration von 1 pM Trabectedin

reduzierte die Viabilität auf 50 %. Wie zuvor ließ sich jedoch keine relevante Verstärkung durch die Hyperthermiebehandlungen erkennen.

Die Synovialsarkomzellen zeigen ebenfalls im Vergleich zu den ersten beiden Zelllinien eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber der Trabectedinbehandlung. Bei Konzentrationen von 100 pM Trabectedin wurde die Viabilität auf ca. 50 % reduziert. Erneut ließ sich jedoch keine relevante Verstärkung durch die Hyperthermiebehandlungen erkennen.

8.1.5.2 Kombinationsbehandlungen 150 Minuten

Da nach einer Applikation von 90 min Hitzeschock kein verstärkender Effekt der Trabectedin-Wirkung gesehen werden konnte, wurde die Hitzeschockdauer auf 150 min (30 min Aufwärmphase und 120 min Hitzeschock) verlängert.



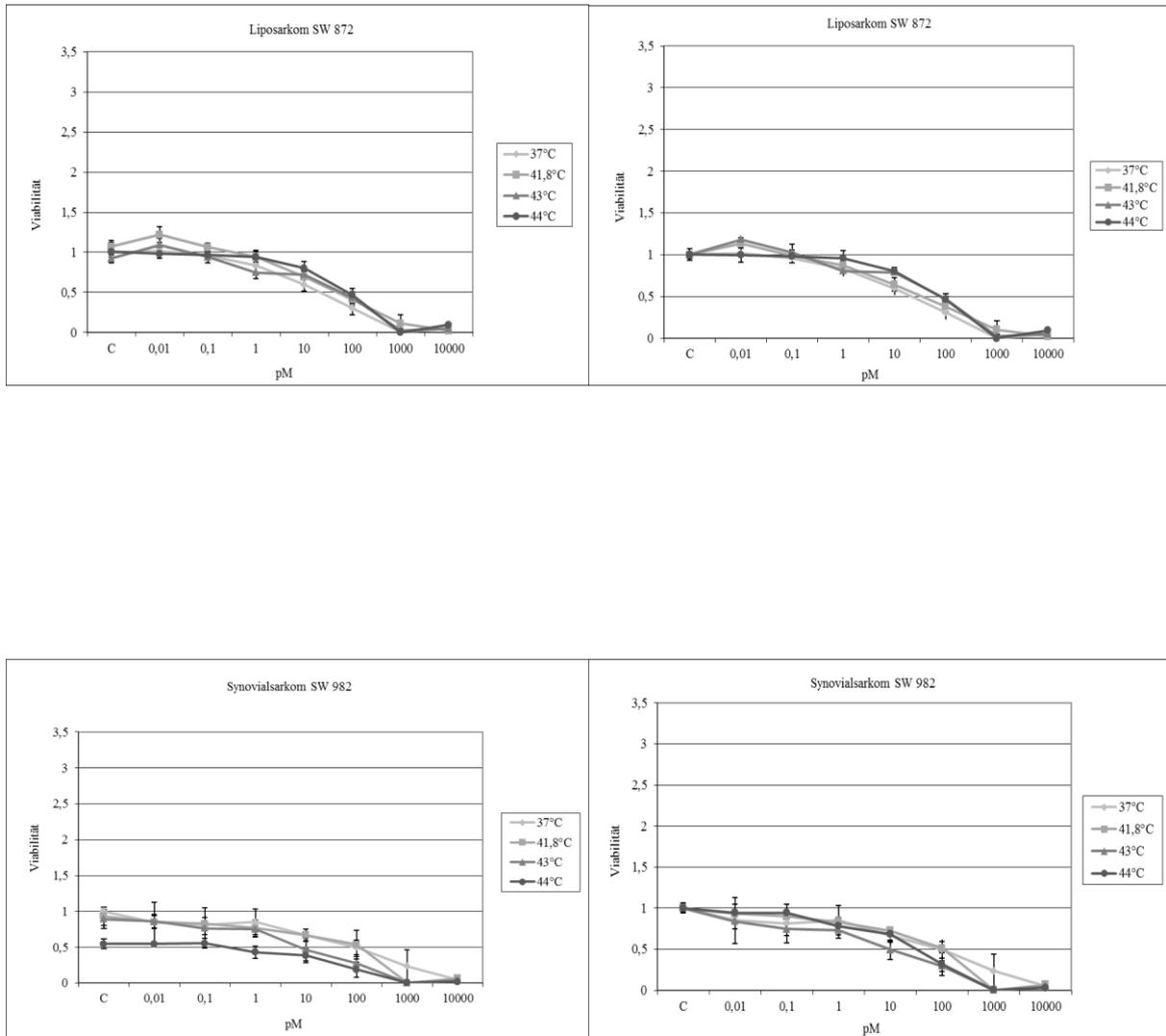


Abbildung 10 150 min Hitzeschock, Kombinationsbehandlungen bestehend aus einer Hitzeapplikation und einer Trabectedin-Behandlung; Liniendiagramm; MRC-5, SKUT-1, SW 872, SW 982. Links unkorrigierte Werte, rechts korrigiert um den toxischen Effekt der Hyperthermiebehandlung.

In diesem Experiment mit der verlängerten Hyperthermiedauer zeigte sich bei den Fibroblasten, den Liposarkomzellen und den Leiomyosarkomzellen im Vergleich zu dem gleichen Ansatz bei einer 90 min Hyperthermiephase erneut kein relevanter Einfluss eines zusätzlichen Hitzeschocks.

Bei den Synovialsarkomzellen zeigte sich erstmals die Tendenz einer gesteigerten Effektivität der Trabectedinbehandlung bei 43 °C und 44 °C. Ein eindeutiges Auseinanderdivergieren der

Kurven nach Korrektur des Hyperthermie-Effektes, was bei einem relevanten verstärkenden Effekt durch die Hyperthermie zu erwarten wäre, blieb jedoch aus.

Insgesamt zeigten alle WST-Experimente keinen eindeutig verstärkenden Effekt der Hyperthermiebehandlung auf die Reduktion der Viabilität durch die Behandlung mit Trabectedin.

8.2 Klonogener Assay

8.2.1 Behandlung mit Trabectedin

Da die Untersuchungen mittels WST-Assays zu keinen eindeutigen Effekten geführt hatten und die Ergebnisse zum Teil recht große Schwankungen ergeben hatten, entschieden wir, die Wirkung von Trabectedin und Hitzeschock zusätzlich mit dem klonogenen Assay zu untersuchen.

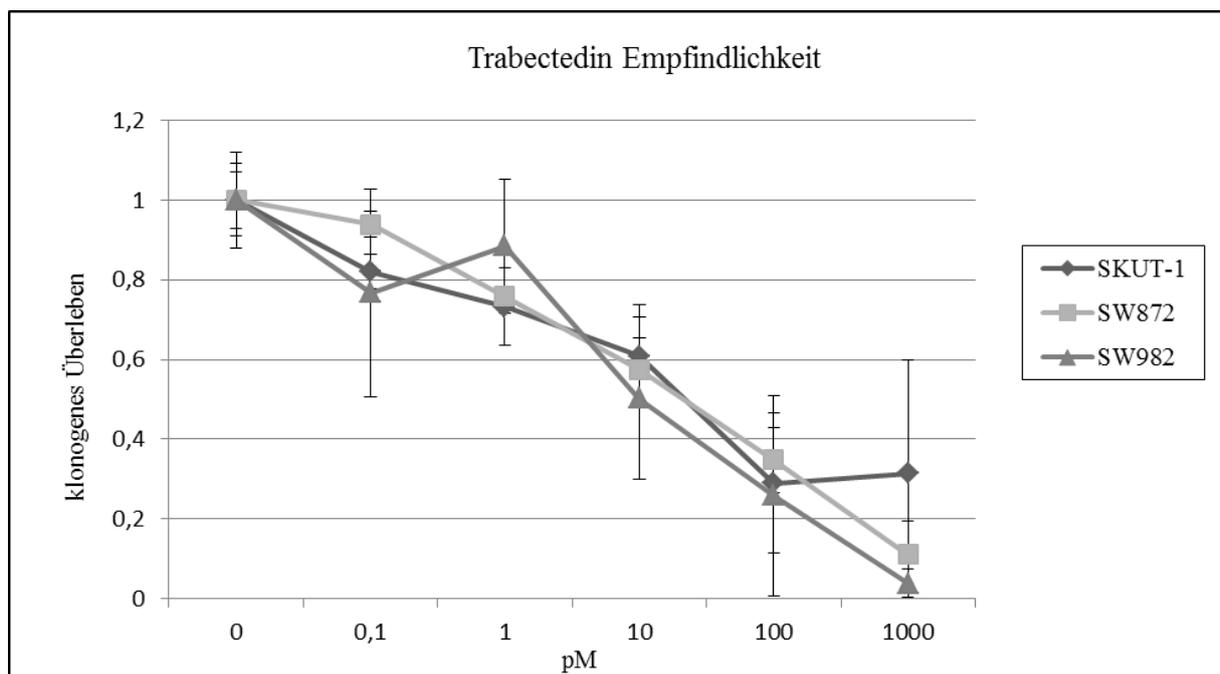
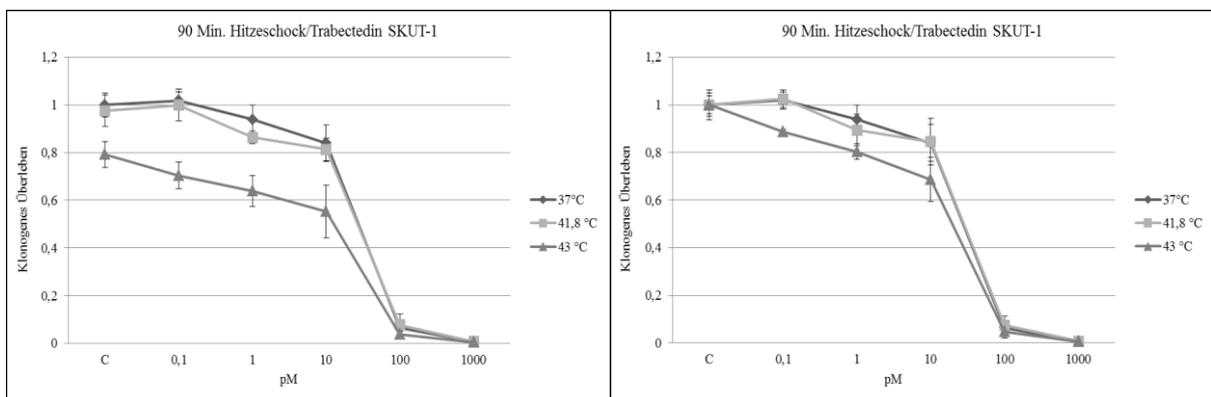


Abbildung 11 Klonogener Assay, konzentrationsabhängiger Effekt der Trabectedinbehandlung der dargestellten Zelllinien SKUT-1, SW 872, SW 982; Liniendiagramm; Inkubationszeit 72 h.

Für den klonogenen Assay konnten nur drei der ursprünglich vier Zelllinien verwendet werden, da die Fibroblasten unter den Behandlungsbedingungen keine Kolonien bildeten. Bei den drei Zellreihen zeigte sich in ihrem Ansprechen auf die Behandlung mit Trabectedin kein relevanter Unterschied. Bei einer Trabectedin-Konzentration von 50 pM gelang bei allen Zelllinien eine Reduktion des klonogenen Überlebens auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Die Liposarkomzellen zeigten fast identische Werte im WST-Assay. Im klonogenen Assay reagierten die Zellen des Synovial- und Leiomyosarkom im Vergleich zu den Messergebnissen im WST-Assay deutlich empfindlicher auf die Behandlung mit Trabectedin.

8.2.2 Behandlung mit Trabectedin und Hyperthermie – klonogener Assay

Für diese Experimente wurden von uns zwei der vier Zelllinien (Zellen des Leiomyo- und des Synovialsarkoms) ausgewählt, um erneut zu überprüfen ob sich durch die zeitlich aufeinander abgestimmte Behandlung von Trabectedin und Hyperthermie ein verstärkender Effekt ergibt. Diese Experimente wurden wiederum mit 90 und 150 min Hyperthermie durchgeführt.



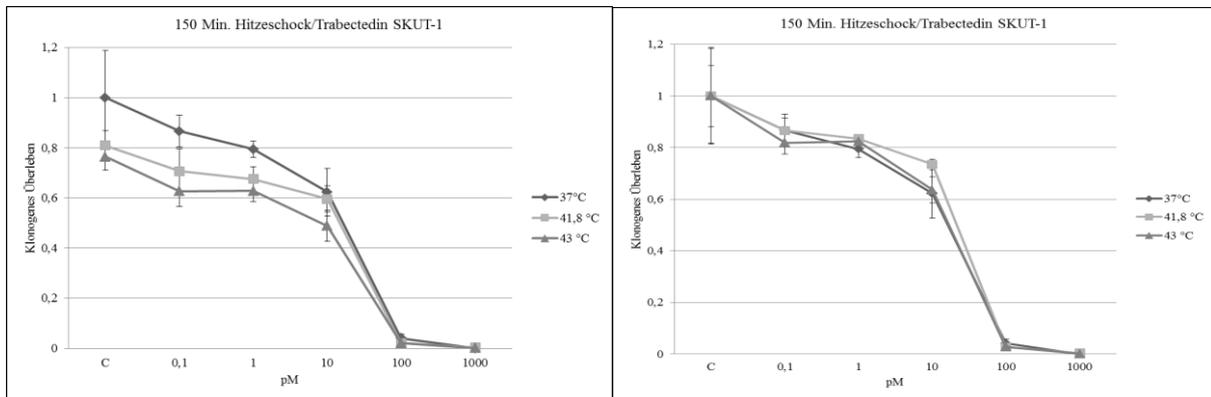
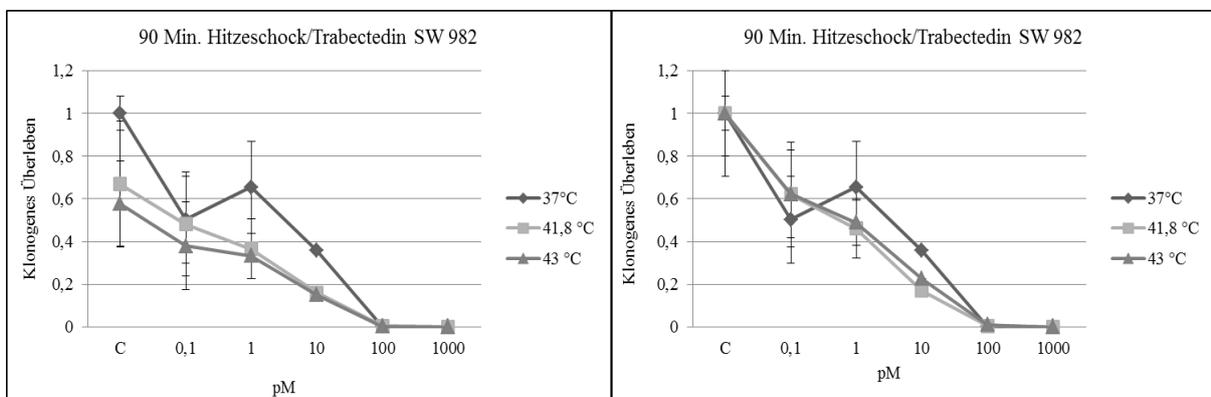


Abbildung 12 Klonogener Assay 90 und 150 min Hyperthermie und Trabectedin – Leiomyosarkom SKUT-1.

Bei den Leiomyosarkomzellen zeigten die Zellen, die für 90 bzw. 150 min bei 43 °C und für 150 min bei 41,8 °C mit steigenden Konzentrationen von Trabectedin behandelt wurden, eine deutlichere Abnahme des klonogenen Überlebens im Vergleich zu den bei 37 °C behandelten Zellen, so dass eine stärkere Toxizität der Kombinationsbehandlung anzunehmen ist. Nach Korrektur des Hyperthermie-Effektes zeigt sich jedoch nur ein leichtes Divergieren der Kurve bei 90 min Hyperthermie. Im Vergleich zu dem WST-Assay konnte zudem eine vermehrte Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit bereits bei niedrigeren Konzentrationen des Trabectedins verzeichnet werden.



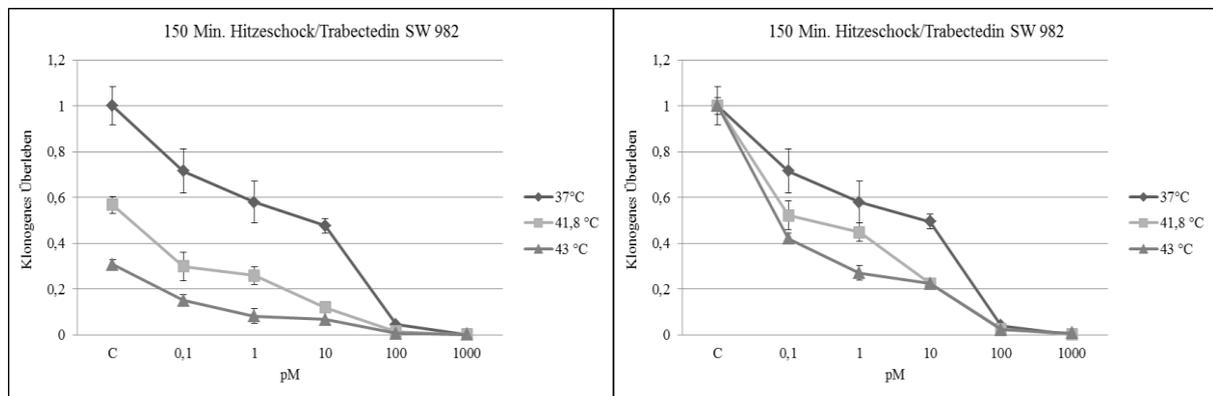


Abbildung 13 Klonogener Assay 90 und 150 min Hyperthermie und Trabectedin – Synovialsarkom SW 982.

Die Zellen des Synovialsarkom zeigten sich bereits nach der Applikation von 90 min Hyperthermiebehandlung deutlich empfindlicher auf die gewählten Bedingungen als die Leiomyosarkomzellen. Es zeigte sich wie bei den WST-Assays ein konzentrations- und temperaturabhängiger Effekt. Im Vergleich zu den vorherigen WST-Assays ließ sich die Abnahme des klonogenen Überlebens erneut bereits bei niedrigen Trabectedin-Konzentrationen nachweisen.

Für beide Hyperthermiedauern (90 min und 150 min) zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Temperaturkurven mit deutlicher Divergenz nach Korrektur des Hyperthermieeffektes, sodass sich hier Hinweise auf eine relevante Chemosensibilisierung ergeben.

9.0 Western Blot

Ziel der nachfolgenden Western Blot Experimente war es anhand der HSP 70 Expression zu zeigen, dass im Rahmen der Behandlungen ein relevanter Hitzeschock appliziert wurde. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Trabectedin in den verwendeten Dosierungen einen Einfluss auf die Expression von HSP 70 hat.

9.1 Expression der Hitzeschockproteine nach Hitzeschock

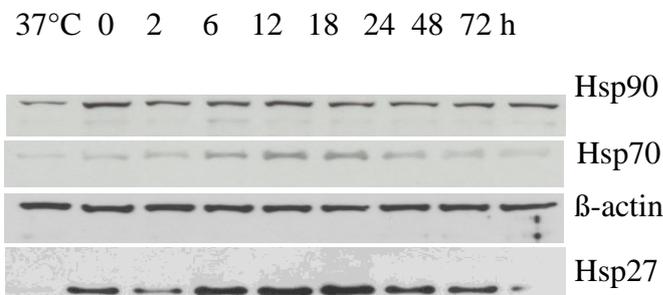


Abbildung 14 Western Blot bei 41,5 °C, Expression der Hitzeschockproteine nach Hitzeschock mit bis zu 72 h recovery time am Beispiel der Zellen des Liposarkom (SW 872).

Die Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analysen zur Expression der Hitzeschockproteine HSP 27, 70 und 90 im zeitlichen Verlauf über 72 h nach Hitzeschock. HSP 27 und 70 werden durch eine vorangegangene Hyperthermie-Behandlung hochreguliert. Die Hochregulation von HSP 27 und 70 erfolgt mit einer Latenz von ca. 2 h und fällt nach einem Maximum nach ca. 16 h wieder ab. HSP 90 wird nach dem applizierten Hitzeschock nicht hochreguliert.

9.2 Trabectedin und Hyperthermie: Expression der Hitzeschockproteine

Die in Abbildung 15 dargestellten Western Blot Analysen 16 h nach Hyperthermie und nach Vorbehandlung mit Trabectedin bei den Leiomyosarkomzellen (Skut-1), den

Liposarkomzellen (SW872) und den Synovialsarkomzellen (SW892) zeigen, dass die Hochregulation von HSP 70 durch Trabectedin in diesen Experimenten nicht beeinflusst wird. Die Expression von HSP 90 wird weder durch die Hyperthermie noch durch die Behandlung mit Trabectedin beeinflusst. Bei SW 892 fällt eine besonders niedrige basale Expression von HSP 70 auf, welches nach Hyperthermie sehr stark induziert wird.

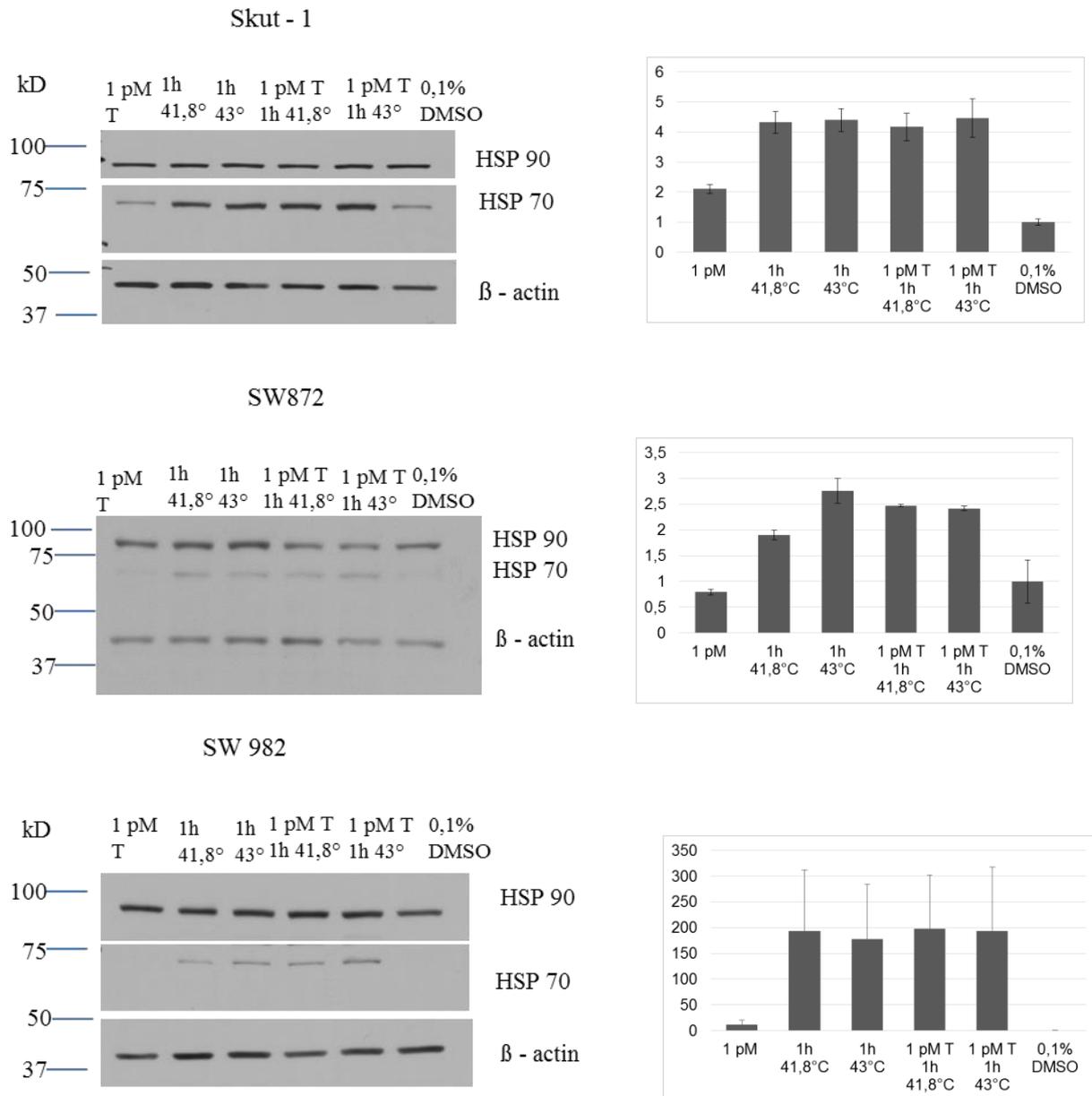


Abbildung 15 Western Blot Expression der HSP nach Behandlung mit Trabectedin und Hyperthermie am Beispiel des Leiomyosarkom (SKUT-1), Liposarkom (SW 872) und

Synovialsarkom (SW 982). Links ein repräsentativer Blot und rechts die densitometrische Auswertung (n = 3).

10. Diskussion

10.1 Überblick und Rationale

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Kombinationsbehandlung mit Trabectedin, einer seit 2007 u.a. für die Weichteilsarkome zugelassenen Substanz, und Hyperthermie, welche eine etablierte Therapieoption beim fortgeschrittenen Weichteilsarkom darstellt, an ausgewählten Weichteilsarkomzelllinien und an einer Kontrollzelllinie getestet.

Weichteilsarkome stellen eine seltene und heterogene Gruppe von Tumoren dar, die in den meisten Fällen eine schlechte Prognose aufweisen. In vielen Fällen sind die Tumore zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen und metastasierten Stadium und müssen oftmals einem multimodalen Therapiekonzept in einem spezialisierten Zentrum zugeführt werden. Die möglichen Säulen der multimodalen Sarkomtherapie umfassen neben einer oftmals radikalen Operation, die prä-/intra oder postoperative Strahlentherapie, die Chemotherapie und regionale Hyperthermieverfahren [ESMO Guidelines, 2014]. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass die einzelnen Therapieverfahren untereinander kombiniert werden sollten um sich in ihrer Wirkung zu verstärken.

Die kurativen Therapieoptionen in der Sarkomtherapie sind jedoch oftmals initial schon limitiert, da häufig bereits bei Diagnosestellung ein fortgeschrittener Tumor nachgewiesen wird. In dieser Situation hat der Patient derzeit immer noch eine deutlich eingeschränkte Lebenserwartung von nur wenigen Jahren, so dass eine dringende Notwendigkeit besteht bessere Therapien für die Krankheitsentität zu entwickeln.

Da die initial aus der Seescheide isolierte Substanz Trabectedin einen Wirkmechanismus aufweist, der sich von vielen anderen zytostatischen und zytotoxischen Substanzen unterscheidet und zudem noch nicht vollständig erforscht ist, erschien es sehr interessant, mögliche Kombinationspartner für deren therapeutische Anwendung zu erforschen [Pommier et al., 1996]. Trabectedin ist bereits seit 2007 als Zweitlinientherapie nach Versagen einer initialen, Anthrazyklin-basierten Chemotherapie oder bei Unverträglichkeit der Erstlinientherapie für das fortgeschrittene Weichteilsarkom sowie seit 2009 in Kombination mit Anthrazyklinen für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom zugelassen [Bui-Nguyen et al., 2015 und López-Guerrero et al., 2015]. Vielversprechende Studien zeigen, z. B. dass das progressionsfreie Überleben, auch bei Patienten die schon vorangegangene Chemotherapie

erhalten hatten, mit Trabectedin deutlich verlängert werden konnte. [Schmitt et al., 2010]. Trabectedin weist einen multifaktoriellen Wirkmechanismus auf, indem es direkt mit der DNS interagiert, aber auch diverse Einflussfaktoren auf das Mikromilieu der Tumorzellen zeigt [Germano G et al., 2013].

Die regionale Tiefenhyperthermie (RHT) hat seit vielen Jahren einen hohen Stellenwert in der Sarkomtherapie. So wurde erst kürzlich in einer großen, multizentrischen Phase-III-Studie ein deutlicher Überlebensvorteil bei den Patienten gesehen, die an einem Hochrisiko-Weichteilsarkom erkrankt waren und neoadjuvant eine Kombination aus Chemotherapie und Hyperthermie erhielten im Gegensatz zu den Patienten, die nur eine Chemotherapie vor der Operation bekamen [Issels et al., 2010].

Welche Chemotherapeutika besonders gut mit der regionalen Hyperthermie kombiniert werden können und eventuell auch zu einem verstärkten Zellsterben führen können ist teilweise erforscht, jedoch gibt es noch viele Kombinationsmöglichkeiten, die bisher nicht beschrieben wurden. Seit Jahren etablierte klassische zytostatische Substanzen, wie z. B. Cisplatin sind in der Kombinationsbehandlung bereits untersucht worden, neuere Substanzen, wie z.B. Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren müssen erst getestet werden [Issels et al., 2008].

Interessant ist neben der Zusammensetzung der jeweiligen Therapieoptionen auch die zeitliche Abstimmung der Behandlungsoptionen, sodass beispielsweise die zeitlich zur Hyperthermie exakt terminierte Gabe eines Zytostatikums die Zelle an einem empfindlichen Punkt in der Teilungsphase treffen könnte [Laszlo et al., 1998]. Bei den Hyperthermieverfahren spielt darüber hinaus der Mechanismus der Thermotoleranz eine wichtige Rolle.

10.2 Resultate der Einzelbehandlungen

Es wurde die generelle zelllinienspezifische Hitzesensibilität der vier Zelllinien geprüft. In der Literatur zeigte sich, dass eine Hyperthermie-Behandlung mit Temperaturen von 41,8 °C subletal auf die getesteten Zelllinien wirkt [Laszlo et al., 1998]. Da dieses Phänomen besonders interessant erschien, wurde diese Temperaturstufe ausgewählt. 43 °C scheint bei

den meisten Ziellinien eine letale Temperatur zu sein, zumal bei einer Temperatur von über 42,5 °C die direkte Denaturierung der Proteine stattfindet [Issels et al., 2008].

Die Erwartung war, dass die Hyperthermiebehandlung wegen ihrer Effekte auf nukleäre Proteine und die DNS-Reparatur [Iliakis G. et al., 2008] schnell proliferierender Sarkomzellen effektiver zu einer Abnahme der Viabilität führt als die Hyperthermiebehandlung der Kontroll-Zelllinie der Fibroblasten.

Die Zellen des Synovialsarkom stellten sich als ausgesprochen hitzesensibel dar. Die Zellen der L-Sarkome (Liposarkom, Leiomyosarkom) reagierten im Vergleich dazu eher weniger empfindlich auf die Hitzeapplikation, dennoch konnte bei allen getesteten Zelllinien eine Toxizität der Hitzeschockbehandlung detektiert werden. Wie erwartet reagierten die Fibroblasten am wenigsten auf die Hitzeschock-Applikation.

In den ersten Medikamenten-Versuchen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass alle drei gewählten Sarkomzelllinien sensitiv auf bereits niedrige Trabectedin-Konzentrationen reagieren. Dem gegenüber zeigten die Fibroblasten die geringste Sensitivität gegenüber Trabectedin. Die Versuche zur Applikationsdauer zeigten bei einer 72 h Therapiedauer die größte Abnahme der Viabilität.

Die alleinige Gabe von Trabectedin in steigenden Dosierungen führte zu leicht unterschiedlichen Reaktionen bei den verschiedenen Zelllinien. Die Synovialsarkomzellen zeigten bei sehr niedrigen Dosen bereits relevante Abnahmen der Viabilität.

Da bei unterschiedlichen Subtypen der Sarkome verschiedene genomische Alterationen vorliegen können, ist es interessant zu sehen, welche Subgruppen besonders sensitiv auf die Behandlung reagieren [Barretina et al., 2010]. Die einzelnen Unterformen der jeweiligen Sarkome zeigen unterschiedliche Reaktionsmuster auf eine Behandlung mit Trabectedin [Grosso et al., 2009]. Samuels et al (2013) dokumentierten Progressionsarresten bis 54 % bei den L-Sarkomen und 38 % bei den anderen Entitäten. Bei der großen Anzahl von Subgruppen und der Seltenheit mancher dieser Tumor, gibt es aktuell kaum weiteres Wissen über die Empfindlichkeit der verschiedenen Untergruppen, das über die Unterteilung in L- und nicht L-Sarkome hinausgeht.

Moneo et al (2007) beschreiben in ihrer Arbeit, dass Zellreihen, die eine p 53-Mutation oder - Deletion aufweisen, besonders sensibel ($IC_{50} < 1 \text{ nM}$) gegenüber der Behandlung mit

Trabectedin reagieren. Eine der dort verwendeten Zelllinien mit einer p53-Mutation, SW 872 (Liposarkomzellen) wurde ebenfalls in unseren Experimenten verwendet. Die hohe Sensitivität auf die Gabe von Trabectedin im pikomolaren Bereich konnte von uns ebenfalls nachvollzogen werden. Neben den Zellen des Liposarkoms konnten wir eine sehr hohe Empfindlichkeit der Synovialsarkomzelllinie SW 982 in unseren Experimenten nachweisen, sodass sich als nächster Schritt eine Untersuchung des p53-Mutationsstatus der verwendeten Zelllinien ergeben könnte. Zusätzlich sind diese Untersuchungen bisher nur in vitro durchgeführt worden und bedürfen einer Bestätigung in vivo. Insgesamt könnte allerdings eine bestehende p53-Mutation ein möglicher prädiktiver Marker für die Ansprechraten auf eine Therapie mit Trabectedin sein.

Eine mögliche Verbindung zu den DNS-Reparatursystemen ergab sich ebenfalls in der Arbeit von Moneo et al. (2007). In p53-mutierten Zellen schienen Einzelstrangbrüche der DNS, die durch das Zusammenwirken von Trabectedin und dem NER-System entstanden sind, nicht erkannt und damit nicht repariert zu werden.

Trabectedin interferiert in der Zelle mit verschiedenen DNS-Reparaturmechanismen. Es ist angewiesen auf ein funktionierendes NER-System und wirkt besonders effizient bei Zellen, die eine Mutation im HRR-System aufweisen [Herrero et al., 2006]. Zusätzlich konnten Schöffski et al. (2011) zeigen, dass die klinische Wirksamkeit einer Sarkomtherapie mit der Expression wichtiger Proteine der NER- und HRR-Systeme korreliert. Als weiterführenden Schritt können die gewählten Zelllinien hinsichtlich ihrer Aktivität der o. g. DNS-Reparatursysteme charakterisiert werden.

Krawzyk et al. (2011) zeigen in ihrer Arbeit, dass Hyperthermie über eine BRCA-2 (breast cancer 2-Degradation) das HRR-System inhibiert und somit die Tumorzellen gegenüber einer Strahlentherapie sensibilisieren kann. Im Vorfeld wurde zudem eine Verminderung des HRR-Proteins BRCA-1 nach Hyperthermie nachgewiesen [Xian et al., 2003].

Da Zellen mit eingeschränkter HRR-Aktivität besonders sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Trabectedin sind, galt es zu überprüfen ob sich durch die zeitlich aufeinander abgestimmte Kombinationsbehandlung von Hyperthermie zur HRR-Inhibition und Trabectedin ein verstärkender Effekt ergibt.

10.3 Resultate der Kombinationsbehandlungen

Es wurde neben dem bereits in den Vorversuchen verwendeten WST-Assay ein klonogener Assay verwendet. In den Experimenten des WST-Assays konnte auch bei verstärkter Hitzeapplikation (150 min) bei keiner Zelllinie ein relevanter verstärkender Effekt der Hyperthermie nachgewiesen werden.

In den Experimenten des klonogenen Assays konnten folgende Ergebnisse verzeichnet werden:

Wurden die Leiomyosarkomzellen mit steigenden Dosen Trabectedin und simultan mit Hyperthermie behandelt, zeigte sich vor allem bei der verlängerten Hitzeperiode von 150 min ein gering verstärkender Effekt. Bei dem Synovialsarkom konnte bereits nach einer Hitzeanwendung von 90 min eine auffällig gesteigerte Abnahme des klonogenen Überlebens registriert werden, die sich bei 150 min deutlich verstärkte.

Die unterschiedlichen Ergebnisse im WST- und im klonogenen Assay werden auf eine erhöhte Sensitivität und Spezifität des klonogenen Assay zurückgeführt [Hoffmann et al., 1999]. Die Fähigkeit Kolonien zu bilden könnte mehr über die tatsächliche Schädigung der Zelle aussagen, als die Messung der mitochondrialen Aktivität 24 h nach erfolgter Behandlung im Rahmen des WST-Assays. Dennoch ist der WST-Assay ein schnelles und einfaches Screening-Verfahren. Der klonogene Assay weist sensitiver Unterschiede und Effekte nach. Nachteile des klonogenen Assays sind unter anderem Verklumpungsartefakte und der deutliche höhere Arbeits- und Zeitaufwand. Bei beiden Ansätzen besteht darüber hinaus als Nachteil die fehlende Vergleichbarkeit zur klinischen Wirkweise, da keine gewebespezifischen Gegebenheiten berücksichtigt werden können. Eine bessere klinische Vorhersage als die 2D-Kulturen könnten *in vitro* Gewebemodelle wie z. B. Kulturen multizellulärer Tumorsphäroide oder Kulturen von Tumorbiopsien gewonnen werden.

Zudem können hier unmöglich allgemeingültige Aussagen getroffen werden, da jede Zellpopulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach oder während der Hyperthermie sensibel für eine mögliche Behandlung sein könnte. Hier gilt es genauer die Korrelate der Hitzereaktion (wie z. B. Hitzeschockproteine) zu messen bzw. zu identifizieren und die zeitliche Behandlung noch effektiver aufeinander abzustimmen. Zudem muss berücksichtigt werden, dass es sich in diesen Versuchen um Zellkulturbedingungen handeln und keineswegs der komplexe Regelkreis eines menschlichen Stoffwechsels nachgestellt werden kann, sodass

Effekte, die das Mikromilieu des Tumors betreffen nicht berücksichtigt werden können. Zudem können keine Areale unterschiedlicher Oxygenierung nachgestellt werden. Mögliche immunmodulatorische Effekte sind in diesem Setting außerdem außer Acht gelassen.

10.4 Zusammenfassung der Kombinationsbehandlungen

In den hier durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass der Effekt von Trabectedin durch Hitzeschock mit 41,8 und 43 °C bei den Zelllinien des Leiomyo- und Synovialsarkom verstärkt werden kann. Die gewählten Hitzeschock-Temperaturen sollen die klinisch messbare heterogene Temperaturverteilung im Tumor nachstellen. Die Ansprechraten auf geringe Dosen von Trabectedin decken sich mit den in der Literatur vorgeschriebenen [Li WW et al., 2001]. Der vorgeschriebene durch Hitzeschock verstärkte Effekt eines Zytostatikums (Chemosensibilisierung) konnte *in vitro* bei pharmakologisch relevanten Konzentrationen von Trabectedin erstmals mittels klonogenem Assay bei der Synovialsarkomzelllinie SW 982 nachgewiesen werden.

Den verstärkenden Effekt erklären wir uns zum einen in der erhöhten Sensitivität des Synovialsarkomes auf bereits geringe Dosen von Trabectedin (auch ohne Hitzeschock-Applikation) und auf das höchste Ansprechen auf die singuläre Hitzeschock-Applikation. Zum anderen ist die Überlegung anzustellen, dass in diesen Zelllinien über die beschriebene Hitzeschock-induzierte-BRCA-2-Degradation und damit herabgesetzte Aktivität des HRR-Reparatursystems eine verstärkte Ansprechrate auf Trabectedin zu verzeichnen ist. Inzwischen konnte die Wirkungssteigerung von Trabectedin durch Hyperthermie bestätigt werden und gezeigt werden, dass die Degradierung von BRCA-2 eine entscheidende Rolle für die Chemosensibilisierung spielt [Harnicek et al., 2016].

10.5 Hitzeschockprotein 70

Hyperthermie induziert die Bildung von Hitzeschockproteinen [Zaarur et al., 2006]. In den gezeigten Western Blot Experimenten wurde eine Induktion von HSP 70 und HSP 27 durch den Hitzeschock nachgewiesen. Diese zeigte sich zeitabhängig mit maximaler Wirkung zwischen 6 und 18 h nach der Hyperthermie.

Hitzeschockproteine fungieren als Schutzmechanismen für die Zellen. In der Literatur wird HSP 70 bereits als neues Target bei zukünftigen antineoplastischen Therapien gehandelt [Koren et al., 2010]. Es scheint, dass HSP 70 eine zentrale Rolle für das nicht-Ansprechen auf eine Hitzeschock-Behandlung bestimmter Tumorentitäten spielt in dem es onkogene Proteine manipuliert und u.a. Akt, eine wichtige Proteinkinase, die für das Überleben der Zelle mitverantwortlich ist, kontrolliert [Koren et al., 2009].

Minuzzo et al. konnten zeigen, dass Trabectedin die Induktion des HSP 70-Promotors durch Hyperthermie inhibiert, indem es an den Promoter bindet und so die Transkription verhindert [Minuzzo et al., 2000]. In den hier dargestellten Western Blots und ELISA-Messungen konnte eine Inhibierung der HSP 70-Induktion durch Trabectedin für die im Vorfeld gewählten Bedingungen der Kombinationsbehandlung nicht nachgewiesen werden. Allerdings kamen in diesem Rahmen nur sehr niedrige Konzentrationen von Trabectedin im pikomolaren Bereich zum Einsatz, sodass eine höhere Konzentration von Trabectedin eine Hochregulation von HSP 70 womöglich unterdrücken könnte. In der Arbeit von Minuzzo wurden Trabectedinkonzentrationen bis 100 nM verwendet. Zudem erfolgte die Trabectedinbehandlung in einem zweistündigen Abstand zur Hyperthermiebehandlung und nach einer recovery time von lediglich 2 h nach dem Hitzeschock erfolgten die Messungen, sodass sich insgesamt sehr unterschiedliche zeitliche Abläufe in den jeweiligen Behandlungsregimen ergeben und damit ein Vergleich nicht möglich ist.

11. Zusammenfassung und Überblick

11.1 Hyperthermie und Trabectedin bei Weichteilsarkomen

Sowohl die Behandlung mit regionalen Hyperthermieverfahren als auch die Behandlung mit Trabectedin gehören inzwischen zu den Standardverfahren der Therapie von fortgeschrittenen Weichteilsarkomen.

Die regionale Tiefenhyperthermie zeigte in der Kombinationsbehandlung mit einer neoadjuvanten Chemotherapie deutliche Vorteile im Gesamtüberleben. Trabectedin gilt als vielversprechendes neues Agens, mit einem neuen Wirkmechanismus. Mögliche Kombinationspartner sollten weiter untersucht werden.

Aufgrund der fehlenden langfristig wirksamen Therapieoptionen bei den seltenen und bei Diagnosestellung oft fortgeschrittenen Tumorentitäten der Weichteilsarkome, ist es dringend notwendig neue Therapieoptionen zu erforschen und zu etablieren.

Wegen des Hinweises einer Wirkungsverstärkung von Trabectedin *in vitro* beim Leiomyosarkom und Synovialsarkom in dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Kombination beider Therapieverfahren weiter geprüft werden.

12. Literatur

- Allavena P, Signorelli M, Chieppa M, Erba E, Bianchi G, Marchesi F, et al. (2005): Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent Yondelis (Trabectedin): Inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Res*; 65:(7) 2964-2971.
- Allavena P, Germano G, Belgiovine C, D'Incalci M, Mantovani A (2013): Trabectedin: A drug from the sea that strikes tumor-associated macrophages. *Oncoimmunology* 2013 Jun 1;2(6):e24614.
- Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, DeCarolis PL, et al. (2010): Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft tissue sarcoma therapy. *Nature genetics*.
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson K, Srivastava PK (2000): Necrotic but not apoptotic cell death releases hsp, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *International Immunology*, vol. 12 no. 11 1539-1546.
- Bettaieb A, Wrzal PK, Averill-Bates DA (2013): *Hyperthermie: Cancer Treatment and Beyond. Cancer Treatment – Conventional and innovative Approaches*. ISBN 978-953-51-1098-9, Publisher: InTech. Doi: 10.5772/55795.
- Blay JY, van Glabbeke M et al. (2003): Advanced soft-tissue sarcoma: A disease that is potentially curable for a subset of patients treated with chemotherapy. *Eur J Cancer* 39: 64-69.
- Blay JY, von Mehren M, Samuels B, Fanucchini M, Ray-Coquard I et al. (2008): Phase I Combination Study of Trabectedin and Doxorubicin in Patients with Soft-Tissue Sarcoma” *Clin Cancer Res*; 14(20), 6656-6662C.

- Blay JY, Italiano A, Ray-Coquard I, Le Cesne A, Duffaud F, Rios M et al. (2013): Long-term outcome and effect of maintenance therapy in patients with advanced sarcoma treated with trabectedin: an analysis of 181 patients of the French ATU compassionate use program. *BMC Cancer*, 2013 Feb 6:13:64.
- Blay JY, Leahy MG, Nguyen BB, Patel SR, Hohenberger P, Santoro A, et al. (2014): Randomised phase III trial of Trabectedin versus doxorubicin-based chemotherapy as first-line therapy in translocation-related sarcomas. *Eur J Cancer*, 2014 Apr;50(6):1137-47.
- Bokemeyer C, Franzke A et al. (1997): A phase I/II study of sequential, dose-escalated, high dose ifosfamide plus doxorubicin with peripheral blood stem cell support for the treatment of patients with advanced soft-tissue sarcomas. *Cancer* 80(7): 1221-27.
- Bonfanti M, La Valle E, Fernandez Sousa-Faro JM et al. (1999): Effect of Ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and DNA. *Anticancer Drug Des*; 14:179-186.
- Brady MS, Gaynor JJ et al. (1992): Radiation-associated sarcoma of bone and soft tissue. *Arch Surg* 127(12): 1379-85.
- Bui-Nguyen B, EORTC, SARC et al. (2015): A phase IIb multicentre study comparing the efficacy of trabectedin to doxorubicin in patients with advanced or metastatic untreated soft tissue sarcoma: the TRUST trial. *Eur J Cancer* 2015 Jul; 51 (10).
- Casali PG, Blay JY, E.C.E.C.P.o. experts (2010): Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2010. 21 Suppl 5: p. v198-203.
- Cassier PA, Dufresne A, Blay JY, Fayette J (2008): Trabectedin and its potential in the treatment of soft tissue sarcoma. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 4(I) 109-116.

- Chen, Y., et al. (2013): Radiographic response to neoadjuvant therapy and its impact on scope of surgery and prognosis in stage IIB/III soft tissue sarcomas. *BMC Cancer*, 2013.13: p.591.
- Clark MA, Fisher C et al. (2005): Soft-tissue sarcomas in adults. *New England Journal of Medicine* 353(7): 701-11.
- Coindre JM et al. (2006): Grading of Soft Tissue Sarcomas: Review and Update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. Vol.130. No. 10, pp 1448-1453.
- D’Incalci M, Erba E, Damia G et al. (2002): Unique features of the mode of action of ET-743. *Oncologist*; 7: 210-216.
- D’Incalci M, Galmarini CM (2010): A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol Cancer Ther* Aug;9(8):2157-63. Epub 2010 Jul 20.
- Dahm-Daphi J, Brammer I, Dikomey E (1997): Heat effects on the repair of DNA double-strand breaks in CHO cells. *Int J Radiat Biol*. 1997 Aug;72(2): 171-9.
- Damia G, Silvestri S et al. (2001): Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. *Int J Cancer* 92(4): 538-88.
- Demetri GB, Chawla SP, von Mehren M et al. (2009): Efficacy and safety of trabectedin in patients with advanced or metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of prior anthracyclines and ifosfamide: results of a randomized II study of two different schedules. *J Clin Onc* 2009;27:4188-96.
- Demetri GD, von Mehren M, Jones RL, Hensley ML, Schuetze SM, Staddon A et al. (2015): Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 14. pii: JCO.2015.62.4734.

Eppink B, Krawzyk PM, Stap J, Kanaar R (2012): Hyperthermia-induced DNA repair deficiency suggests novel therapeutic anti-cancer strategies. *Int J Hyperthermia* 2012;28(6):509-17.

ESMO/European Sarcoma Networking Working Group (2012): Soft-Tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 23 (Supplement 7): vii 92-vii99.

Ferner RE, Gutmann DH (2002): International Consensus Statement on Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors in Neurofibromatosis 1. *Cancer Res* 62:1573-1577.

Fletcher CD et al. (2006): The evolving classification of soft-tissue tumors: an update based on the new WHO classification. *Histopathology*; 48(1): 3-12.

Forni C, Minuzzo M, Viridis E, Tamborini E, Simone M, Tavecchio et al. (2009): Trabectedin (ET-743) promotes differentiation in myxoid liposarcoma tumors. *Mol Cancer Ther* 2009 Feb;8(2):449-57.

Franken N, Rodermond H, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 1(5): 2315-19.

Gajate C, An F, Mollinedo F (2002): Differential cytostatic and apoptotic effects of Ecteinascidin-743 in cancer cells. Transcription dependent cell cycle arrest and transcription-independent JNK and mitochondrial mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 277(44): 41580-41589.

Galmarini CM, D'Incalci M, Allavena P (2014): Trabectedin and Plitidepsin: Drugs from the Sea that strike the tumor microenvironment. *Mar Drugs* 2014 Jan 27;12(2):719-33.

Ganjoo, KN, Patel,SR (2009): Trabectedin: an anticancer drug from the sea. *Expert Opin Pharmacother* 10 (16): 2735-43.

- Germano G, Frapoli R, Simone M, Tavecchio M, Erba E, Pesce S, et al. (2010): Antitumor and anti-inflammatory effects of Trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. American Association for Cancer Research.
- Germano G, Frapoli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liquori M, et al. (2013): Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* Feb 11;23(2):249-62.
- Gortzak E, Azzarelli A, Buesa J, et al. (2001) A randomised phase II study on neo-adjuvant chemotherapy for „high-risk” adult soft-tissue sarcoma. *Eur J Cancer* 37: 1096–1103].
- Gronchi A, Lo Vullo S, Colombo C, Collini P, Stacchiotti S, Mariani L, et al. (2010): Extremity soft tissue sarcoma in a series of patients treated at a single institution: local control directly impacts survival. *Ann Surg.* Mar.251(3):506-11.
- Grosso F, Jones RL, Demetri GD, Judson IR, Blay JY, Le Cesne A, et al. (2007): Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. *Lancet Oncology* Jul;8(7): 595-602.
- Grosso F, Sanfilippo R, Viridis E, Piovesan C, Collini P, Dileo P et al. (2009): Trabectedin in myxoid liposarcomas (MLS): a long-term analysis of a single-institution series. *Annals of Oncology* 20; 1439-1444.
- Harnicek D, Kampmann E, Lauber K et al. (2016): Hyperthermia adds to trabectedin effectiveness and thermal enhancement is associated with BRCA2 degradation and impairment of DNA homologous recombination repair. *Int J Cancer* 139(2): 467-79.
- Hartmann JT, Patel S. (2005): Recent developments in salvage chemotherapy for patients with metastatic soft-tissue sarcoma. *Drugs* 65(2): 167-78.

Heijkoop ST, Franckena M, Thomeer MG, Boere IA, Van Monfort C, Van Doorn HC (2012): Neoadjuvant chemotherapy followed by radiotherapy and concurrent hyperthermia in patients with advanced-stage cervical cancer: a retrospective study. *Int J Hyperthermia* 2012;28(6):554-61.

Herrero AB, Martin-Castellanos C, Marco E, Gago F, Sergio M (2006): Cross-Talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor Trabectedin. *Cancer Research*;66: (16) 8155-8162.

Hoffmann RM et al. (1991): In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis and prognosis. *J Clin Lab Anal* 1991;5(2): 133-43.

Iliakis G, Wu W, Wang M (2008): DNA double strand break repair inhibition as a cause of heat radiosensitization: re-evaluation considering backup pathways of NHEJ. *Int J Hyperthermie* 2008 Feb;24(1):17-29.

Issels RD (2008): Hyperthermia adds to chemotherapy. *European Journal of Cancer* 2008 Nov;44(17): 2546-54.

Issels RD et al. (2001): Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long term results of a phase II study. *European journal of cancer* 37; 1599-1608.

Issels RD, et al. (2010): Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet* 10.1016/ S.1470-2045(10)70071-1.

Issels RD, Lindner , et al. (2009): *Die Rolle der Hyperthermie*. SMART Books.

Issels RD, Lindner LH, Ghadjjar P, et al. (2015): Improved overall survival by adding regional hyperthermia to neo-adjuvant chemotherapy in patients with localized high-risk soft

tissue sarcoma (HR-STS): Long-term outcomes of the EORTC 62961/ESHO randomized phase III study. European Cancer Congress Abstract number: 13LBA1.

Italiano A, Delva F, Mathoulin-Pelissier S, Le Cesne A, Bonvalot S, Terrier P, et al. (2010): Effect of adjuvant chemotherapy on survival in FNCLCC grade 3 soft tissue sarcomas: a multivariate analysis of the French Sarcoma Group Database. *Ann Oncol* Dec;21(12):2436-41.

Italiano, A., Laurand, A., Laroche, A., Casali, P., Sanfilippo, R., Le Cesne, A., et al. (2011), *ERCC5/XPG*, *ERCC1*, and *BRCA1* gene status and clinical benefit of trabectedin in patients with soft tissue sarcoma. *Cancer*, 117: 3445–3456.

Jain, Xu, Pietro Lee (2010): Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int J Clin Exp Pathol*; 3(4):416-429): 1).

Jemal A., Siegel R et al. (2007): Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57:43-66.

Jolesch A, Elmer K, Bendz H, Issels RD, Noessner E (2011): Hsp 70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *Eur. J. Cell Biol.*

Judson I, Verweij J, Gelderblom et al. (2014): Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomized controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014 Apr;15(4): 415-23. Doi:10.1016/S1470-2045(14)70063-4.

Kawai A et al. (2015): Trabectedin monotherapy after standard chemotherapy versus best supportive care in patients with advanced, translocation-related sarcoma: a randomized, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015 Apr;16(4): 406-16.

Koren J et al. (2010): Facilitating Akt Clearance via Manipulation of Hsp 70 activity and levels. *Journal of biological chemistry* vol. 285, no.4 pp. 2498-2505.

- Krawzyk P, Eppink B, Essers J, Stap J, Rodermond H, Odijk H, et al. (2011): Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. PNAS.
- Ladanyi M, Antonescu CR, Dal Cin P (2008): Cytogenetic and molecular genetic pathology of soft-tissue tumors. Sharon W. Weiss, John R. Goldblum (Eds.), SoftTissue Tumors, Mosby Elsevier, ch. 4:73-102.
- Laszlo A (1998): The relationship of heat shock proteins, thermotolerance and protein synthesis. Exp Cell Res, 1998 Oct; 178(2):401-14.
- Lawrence W Jr, Donegan WL, Natarajan N, Mettlin C, Beart R, Winchester D (1987): Adult soft-tissue sarcomas. A pattern of care survey of the American College of Surgeons. Ann Surg. 1987 205(4): 349-359.
- Li WW, Takahashi N, Jhanwar S, Cordon-Cardo C, Elisseyeff Y, Jimeno J, et al. (2001): Sensitivity of soft-tissue sarcoma cell lines to chemotherapeutic agents: identification of ecteinascidin-743 as a potent cytotoxic agent. Clin Cancer Res 7(9): 2908-11, 2001.
- Lindner LH, Eichhorn ME, Eibl H, Teichert N, Schmitt-Sody M, Issels RD, et al. (2004): Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. Clin Cancer Res 2004 Mar 15;10(6):2168-78.
- López-Guerrero JA, Romero I, Poveda A (2015): Trabectedin therapy as an emerging treatment strategy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. Clin J Cancer 2015 Jan; 34(1): 41-9.
- Ma Yong Xian, Saijun Fan et al. (2003): Role of BRCA1 in heat shock response. Oncogene (2003) 22, 10-27.
- Mazeron JJ, Suit HD (1987): Lymph nodes as sites of metastases from sarcomas of soft tissue. Cancer 60(8): 1800-8, 1987.

- McClain KL, Leach CT et al. (1995): Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. *New England Journal of Medicine* 332(1): 12-18.
- Melcher A, Todryk S, Hardwick N, Ford M, Jacobson M, Vile RG (1998): Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med.* 4(5): 581-587.
- Menchaca R, Martinez V, Rodriguez A, Rodriguez N, Flores M, Gallego P, et al. (2003): Synthesis of natural ecteinascidins (ET-729, ET-745, ET-759B, ET-736, ET-637, ET-594) from cyanosafracin B. *J Org Chem* 2003 Nov 14:68(23):8859-66.
- Meric, F. et al. (2002): Radiographic response to neoadjuvant chemotherapy is a predictor of local control and survival in soft tissue sarcomas. *Cancer* 2001.95(5):p.1120-6.
- Milani V, Noessner E, Ghose S, Issels RD et al. (2002): Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia*; 18: 563-75.
- Minuzzo M, Marchini S, Broggin M, Faircloth G, D'incalci M, Mantovani R (2000): Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *PNAS*, vol. 97 no. 12, 6780-6784.
- Moneo et al. (2007): Extreme sensitivity to Yondelis (Trabectedin, ET-743) in low passaged sarcoma cell lines correlates with mutated p 53. *Journal of cellular biochemistry* 100:339-348.
- Multhoff G, Vega V, Rodriguez-Silva M, Frey T, Gehrman M, Diaz JC, et al. (2008): Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol* 2008; 180:4299-4307.

- Noessner E, Gastpar R, Milani V, Brandl A, Calderwood SK, Issels RD et al. (2002): Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J. Immunol.* 169, 5424–5432.
- O’Connor MJ, Martin NM, Smith GC (2007): Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene.* 2007 Dec 10;26(56): 7816-24.
- Park JY, Singh TR, Nassar N, Zhang F, Freund M, Hanenberg H, et al. (2014): Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene* 2014; 33 (40):4803-12.
- Patrikidou A, Domont J, Cioffi A, Le Cesne A (2001): Treating soft tissue sarcomas with adjuvant chemotherapy. *Curr. Treat. Options Oncol.* Mar.12(1): 21-31.
- Pautier P, Floquet A et al. (2015): Trabectedin in combination with doxorubicin for first-line treatment of advanced uterine or soft-tissue leiomyosarcoma (LMS-02): a non-randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015 Apr;16(4):457-64.
- Penel N, Van Glabbeke M, Marreaud S, Quali M, Blay JY, Hohenberger P (2011): Testing new regimens in patients with advanced soft tissue sarcoma: analysis of publications from the last 10 years. *Ann Oncol.* Jun;22(6): 1266-72.
- Petruseva IO, Evdokimov AN, Lavrik OI (2014): Molecular mechanism of global genome nucleotid excision repair. *Acta Nature* 2014 Jan;6(1):23-34.
- Pervaiz N, et al. (2008): A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma. *Cancer*, 2008. 113 (3):p.573-581.
- Pommier Y, Kohlhagen G, Bailly C et al. (1996): DNA-sequence and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent

- antitumor compound from the caribbean tunicate Eteinascin turbinate. *Biochemistry*; 35 (41): 13303-13309.
- Powell S, Kachnic L et al. (2011): Homologous recombination research is heating up and ready for therapy. *PNAS* vol. 108 no.24 9731-9732.
- Reichart P, Musch A (2008): Therapie fortgeschrittener Weichteilsarkome im Erwachsenenalter. *Arzneimitteltherapie* 26:193-201, Heft 6.
- Roti Roti JL (2008): Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): Cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia* 24:3-15.
- Samartzis D, Nishi N, Cologne J, Funamoto S et al. (2013): Ionizing Radiation Exposure and the development of Soft-Tissue Sarcomas in Atomic-Bomb survivors. *Journal of Bone and Joint Surgery*, Band 95-A, Ausgabe 3 Seiten 222-229.
- Samuels BL, et al. (2013): Clinical outcomes and safety with trabectedin therapy in patients with advanced soft tissue sarcomas following failure of prior chemotherapy: results of a worldwide expanded access program study. *Ann Oncol*, 2013. 24(6): p.1703-9.
- Sandberg AA et al. (2004): Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 155(1):1-24.
- San Filippo J, Sung P, Klein H (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:22957.doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.
- Schmitt T, Keller E, Dietrich S, Wuchter P, Ho, A, Egerer Ge (2010): Trabectedin for metastatic soft tissue sarcoma: A retrospective single center analysis. *Marine Drugs* 8, 2647-2658.
- Schöffski P, Taron M, Jimeno J, Grosso F, Sanfilippo R, Casali PG, et al. (2011): Predictive Impact of DNA repair functionality on clinical outcome of advanced sarcoma patients

- treated with Trabectedin: A retrospective multicentric study. *European J of Cancer* 47 1006-1012.
- Schöffski P, Maki RG, Italiano A, et al. (2015) Randomized, open-label, multicenter, phase III study of eribulin versus dacarbazine in patients (pts) with leiomyosarcoma (LMS) and adipocytic sarcoma (ADI). *J Clin Oncol* 33 (suppl; abstr LBA10502).
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2012): Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*; 62(1):10-29.
- Srivastava,P. (2002): Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu.Rev. Immunol.* 20, 395–425.
- Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB et al. (2001): Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotid-excision repair. *Nat Med*; 7:961-966.
- Tap WD, Jones RL, Chmielowski, B et al. (2015): A randomized phase Ib/II study evaluating the safety and efficacy of olaratumab (IMC-3G3), a human anti-platelet-derived growth factor α (PDGFR α) monoclonal antibody, with or without doxorubicin (Dox), in advanced soft tissue sarcoma (STS). *J Clin Oncol* 33 (suppl; abstr 10501)].
- Tavecchio M, Simone M, Erba E, Foiani M, D’Incalci M, Damia G et al. (2008): Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *Eur J Cancer.* 2008 Mar;44(4):609-18.
- Van der Waal RP, Griffith L, Wright WD, Borelli MJ, Roti JL (2001): Delaying S-Phase progression rescues cells from heat-induced S-phase hypertoxicity. *J Cell Physiol* 187:236-243.
- Van der Zee J, Vujaskovic Z, Kondo M, Sugahara T (2008): The Kadota Fund International Forum 2004 –Clinical Group Sensus. *Int J Hyperthermia* 24(2): 111-122

- Welz S, Hehr T, Lamprecht U, Scheithauer H, Budach W, Bamberg M (2005):
Thermoradiotherapy of the chest wall in locally advanced or recurrent breast cancer
with marginal resection. *Int J Hyperthermia* 2005 Mar;21(2):159-67.
- Woll PJ, Reichardt P, Le Cesne A, Bonvalot S, Azzareli A, Hoekstra HJ et al. (2012):
Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide and lenograstim for resected
soft-tissue sarcoma (EORTC 62931): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet
Oncol* Oct;13(10):1045-54.
- Wong FL, Boice Jr JD et al. (1997): Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose
and sarcoma risk. *JAMA* 278(15): 1262-67.
- Xian MY, Fan S, Xiong J, et al. (2003): Role of BRCA1 in heat shock response. *Oncogene*
(22):10–27.
- Zaarur N, Gabai VL, Porco JA, Calderwood S, Sherman MY et al. (2006): Targeting heat
shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. *Cancer
Research*; 66:(3), 1783-1790.
- Zewail-Foote M, Li VS, Kohn H et al. (2001): The inefficiency of incisions of Ecteinascidin
743-DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the
DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor
agent. *Chem Biol* 8(11): 1033-49.
- Zewail-Foote M, Hurley LH et al. (1999): Ecteinascidin 743; a minor groove alkylator that
bends DNA toward the major groove. *J Med Chem*; 42: 2493-2497.

13. Eidesstattliche Versicherung

Spitzbarth geb. Otremba, Berit Kim

Ich erkläre hiermit Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „*Der Effekt von Trabectedin und Hyperthermie auf Sarkomzellen (in vitro)*“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Helmbrechts, 24.08.2016

Berit Kim Spitzbarth, geb. Otremba