

Aus der Chirurgischen Klinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer
Molekulare Onkoimmunologie
Leiterin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ana Maria Waaga-Gasser

Molekulare Reparaturmechanismen durch
Heat Shock Proteine nach der
hyperthermen intraperitonealen Chemoperfusion
bei Peritonealkarzinose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Malte Wolfram Vetterlein
aus Hamburg
Würzburg, März 2017

Referent: apl. Prof. Dr. med. Martin Gasser
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Scheurlen
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Januar 2018

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Grundlagen zur Peritonealkarzinose	1
1.1.1. Definition, Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.2. Epidemiologie, Klinik und Diagnostik	2
1.1.3. Staging und Indikationsstellung zu Behandlungsoptionen	3
1.1.3.1. <i>Peritoneal cancer index</i>	5
1.1.3.2. <i>Completeness of cytoreduction score</i>	8
1.1.3.3. Consensus Statement der Society of Surgical Oncology	8
1.1.4. Zytoreduktive Peritonektomie nach Sugarbaker	9
1.1.5. Hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion (HIPEC)	10
1.1.5.1. Grundlagen zur HIPEC	10
1.1.5.2. Durchführung der hyperthermen Chemoperfusion	11
1.1.5.3. Zytostatika in der HIPEC	12
1.2. Hyperthermie in der Krebstherapie	13
1.2.1. Die Wirkung von Temperaturerhöhungen	13
1.2.1.1. Veränderungen im Tumormikromilieu	14
1.2.2. Heat Shock Proteine	14
1.2.2.1. Grundlagen	14
1.2.2.2. Molekulare Wirkmechanismen der HSP	15
1.2.2.3. HSP90	16
1.2.2.4. HSP70	17
1.2.2.5. HSP27	17
1.2.2.6. HSP-Expression in Malignomen	18
2. Fragestellung	21
3. Materialien	22
3.1. Verwendete Puffer, Reagenzien und Chemikalien	22
3.2. Kulturzellen	23
3.3. Zellkulturmedien und Puffer	23

3.4. Puffer für die Proteinbiochemie	23
3.4.1. Selbst hergestellte Puffer.....	23
3.4.2. Lösung zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford).....	24
3.4.3. Lösungen für die SDS-PAGE (gebrauchsfertig)	24
3.4.4. Proteinmarker	24
3.4.5. Lösungen für Western Blot (gebrauchsfertig)	24
3.4.6. Blocklösungen für Immundetektion.....	25
3.4.7. Chemilumineszenzlösungen (gebrauchsfertig).....	25
3.5. Antikörper.....	25
3.5.1. Primärantikörper	25
3.5.2. Sekundärantikörper	25
3.6. Primer.....	26
3.7. Kits	26
3.7.1. Zur Isolierung von Membranproteinen aus Tumorzellen	26
3.7.2. Zur Quantifizierung der Tumorzellapoptose	26
3.7.3. Zur RNA-Isolierung	27
3.7.4. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)	27
3.8. Verbrauchsmaterialien	27
3.9. Geräte.....	28
4. Methoden	30
4.1. Patientenkollektiv	30
4.2. Zellkultur.....	32
4.2.1. Auftauen und Sedimentieren eukaryotischer Zellen	32
4.2.2. Kultivierung von HT-29 Zellen	32
4.3. Zellbiologische Methoden.....	33
4.3.1. Das Hyperthermie <i>in vitro</i> Modell.....	33
4.3.2. MTS-Zytotoxizitätstest	33
4.3.3. Apoptose-Test und Durchflusszytometrie	34
4.4. Proteinbiochemische Methoden.....	36
4.4.1. Gewinnung von Gesamtzellextrakten	36
4.4.1.1. Adhärente HT-29 Zellen	36
4.4.1.2. Gefrorenes Gewebe aus den <i>in vivo</i> HIPEC-Biopsien	36

4.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	36
4.4.3. SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	37
4.4.4. Western Blot	38
4.4.5. Immundetektion fixierter Proteine	38
4.5. Molekularbiologische Methoden	39
4.5.1. Totale RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	39
4.5.2. Methodik der PCR	40
4.5.3. Real-Time-quantitative-PCR.....	40
4.6. Immunhistochemie und Immunzytochemie	41
5. Ergebnisse	42
5.1. Ex vivo Analysen der Patienten mit Peritonealkarzinose	42
5.1.1. Veränderte HSP-Genexpression post HIPEC-Therapie	42
5.1.2. Veränderte HSP-Proteinexpression post HIPEC-Therapie	44
5.2. Das Hyperthermie <i>in vitro</i> Modell.....	47
5.2.1. Veränderte HSP-Genexpression in HT-29 Zellen nach <i>in vitro</i> induzierter Hyperthermie.....	47
5.2.2. Veränderte HSP-Proteinexpression in HT-29 Zellen nach <i>in vitro</i> induzierter Hyperthermie.....	50
5.2.3. Zellproliferation und Apoptose in HT-29 Zellen nach <i>in vitro</i> induzierter Hyperthermie.....	52
6. Beantwortung der Fragen.....	56
7. Diskussion	58
7.1. Verstärkte Expression von Heat Shock Proteinen in peritoneal metastasierten Tumoren nach HIPEC-Therapie	58
7.2. Vergleich der temperaturinduzierten HSP-Expressionsänderung nach kurzer und längerer Regenerationsphase	59
7.3. Effekt von Temperaturerhöhungen auf HSP-Expression, Proliferation und Apoptose in Tumorzellen.....	61
7.4. Heat Shock Proteine als Zielstrukturen: Einführung von HSP- Inhibitoren	64
8. Zusammenfassung.....	67

9. Abkürzungsverzeichnis	70
10. Literaturverzeichnis	73
11. Abbildungsverzeichnis	84

1. Einleitung

1.1. Grundlagen zur Peritonealkarzinose

1.1.1. Definition, Ätiologie und Pathogenese

Die Peritonealkarzinose (PC) ist im Allgemeinen definiert als fortgeschrittene, durch peritonealen Befall gekennzeichnete Metastasierung gastrointestinaler, ovarieller und anderer maligner abdomineller Primärtumore und Tumorrezidive.¹ Mit einigen Ausnahmen, wie dem primär peritonealen muzinösen Pseudomyxoma peritonei (PMP), stellt die Peritonealkarzinose stets einen durch Tumorausbreitung per continuitatem oder durch iatrogene Tumorzellverschleppung entstandenen sekundären Tumorbefall des Bauchfells dar. Durch Ablösung einzelner Tumorzellen vom Primarius und mit Hilfe der zirkulierenden Peritonealflüssigkeit gelangen die disseminierten Zellen an vom Primärtumor mitunter entfernte Lokalisationen innerhalb der Bauchhöhle.² Die Wege dieses intraperitonealen Transports werden von diversen Faktoren wie der Schwerkraft, peritonealer Recessi sowie diaphragmatischer und mesenterialer Auslenkung beeinflusst.³ Des Weiteren besitzen viele Tumorzellen inhärente motilitätsfördernde Mikrofilamente aus Aktin, die als Lamellipodien und Filopodien durch Polymerisation auch eine autonome Fortbewegung der disseminierten Tumorzelle gewährleisten.⁴ Die Ablösung vom Primarius erfolgt zumeist spontan aufgrund hoher Drücke der interstitiellen Flüssigkeit im Tumor, welche durch rasche Tumorzellproliferation, mangelnden Lymphabfluss, Kontraktion der interstitiellen Matrix mit Fibrosierung und gesteigerten osmotischen Druck durch anaerobe Glykolyse sowie durch das Entweichen von Plasmaproteinen bedingt sein können.⁵ Der direkte Kontakt des Primarius mit der Peritonealhöhle erfordert bereits eine tumoröse maligne Perforation ins Peritoneum viscerale. Folglich zeigt die peritoneale Metastasierung in den meisten Fällen bereits eine fortgeschrittene Malignomerkrankung an. Auch die iatrogene Tumorzellverschleppung im Rahmen der operativen Versorgung des Primärtumors stellt einen Risikofaktor für die peritoneale Dissemination von Tumorzellen dar. Insbesondere bei R1-

oder R2-Resektionen mit unbeabsichtigten Mikrotraumata des Tumors kann es zum Austritt von proliferationsfähigen und potentiell invasiven Malignomzellen über verletzte Lymph- oder Blutgefäße in die Bauchhöhle kommen.⁶ Über Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 oder CD44 bindet die Tumorzelle an peritoneale Mesothelzellen und wandert nach Induktion der Apoptose und Auflösen der interzellulären Verbindungen dieser Zielzellen in die extrazelluläre Matrix ein. Integrin-Untereinheiten gewährleisten letztlich diese Invasion in submesotheliale Schichten.^{7,8} Ebenso spielen inflammatorische und immunologische Vorgänge durch die Stimulation der Produktion von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 für die direkte Bindung von Tumorzellen an Strukturen der extrazellulären Matrix wie das Omentum majus eine entscheidende Rolle und begünstigen deren Invasion.⁹

1.1.2. Epidemiologie, Klinik und Diagnostik

Die peritoneale Dissemination von Tumorzellen abdomineller Malignome ist die hauptsächliche Ursache für die Metastasierung und die Rezidive einer PC.¹⁰ Bei etwa jedem zehnten Patienten wird bei der exploratorischen Laparoskopie zur Feststellung etwaiger kurativer Resektionsmöglichkeiten des Primärtumors eine PC diagnostiziert.¹¹ Die PC eines biologisch aggressiven Tumors ist mit einer schlechten klinischen Prognose vergesellschaftet und stellt einen entscheidenden Grund für die hohe Morbidität und Mortalität bei Tumorerkrankungen des Abdomens in der heutigen Welt dar. In multizentrischen Studien lag das mediane Überleben bei der PC eines kolorektalen Karzinoms bei 5,2 Monaten (n = 118), bei der PC eines Magenkarzinoms sogar nur bei 3,1 Monaten (n = 125).¹² Aufgrund der oftmals erst späten Symptomatologie einer PC gestaltet sich deren Frühdiagnose immer noch schwierig. Neben möglichen unspezifischen abdominellen Beschwerden bleibt das Krankheitsbild oftmals für lange Zeit inapparent, das Auftreten eines Aszites ist oft das erste eindrückliche klinische Zeichen.¹³ Zu diesem Zeitpunkt ist die peritoneale Tumordissemination jedoch in den meisten Fällen bereits weit fortgeschritten. Abhängig vom Befallsmuster der peritonealen Besiedelung können auch Cholestasezeichen, Hydronephrose oder Dysphagie- und Stenosesymptomatik auftreten.

Aufgrund der strengen Indikationsstellung für eine operative Intervention ist beim Verdacht auf oder bei bereits gesicherter PC eine ausführliche und konsequente Diagnostik von Nöten.¹⁴ Diese beinhaltet die obligate klinische Untersuchung mitsamt Anamneseerhebung von Begleiterkrankungen und Voroperationen, die Abnahme des Routinelabors mit entitätsspezifischen Tumormarkern sowie die zwingende Drei-Phasen-Computertomographie von Thorax, Abdomen und Becken mit oraler, intravenöser und rektaler Kontrastierung. Ergänzend werden außerdem befundbezogene Untersuchungen wie eine vollständige Koloskopie beim kolorektalen Karzinom, Rektoskopie mitsamt Endosonographie beim Rektumkarzinom oder Gastroskopie mit Endosonographie beim Magenkarzinom durchgeführt. Bei unklarer extraabdomineller Metastasierung können außerdem additive Untersuchungen wie Sonographie, Magnetresonanztomographie oder Positronenemissionstomographie bzw. PET/CT die Diagnostik unterstützen.

1.1.3. Staging und Indikationsstellung zu Behandlungsoptionen

War die Behandlung der PC bislang ausschließlich der systemischen Chemotherapie vorbehalten¹⁵, so wurde diese in den letzten Jahren um einen weiteren, vielversprechenden Therapieansatz ergänzt. Mit potentiell kurativer Intention steht in spezialisierten Peritonealkarzinosezentren einem hochselektionierten Patientenkollektiv ein kombiniertes Therapieregime aus zytoreduktiver Chirurgie (CRS) und hyperthermer intraperitonealer Chemoperfusion (HIPEC) zur Verfügung. Grundvoraussetzung für die Durchführung dieser aufwändigen und ausgedehnten Operation ist jedoch die bereits angesprochene Selektion der geeigneten Patienten. Während beim Magenkarzinom mit synchroner oder metachroner PC erst die Fernmetastasierung als Kontraindikation für CRS und HIPEC gilt¹⁶, sind bei anderen Primarii diverse Faktoren wie Entität, Ausdehnung des Tumorbefalls, Tumorhistologie sowie der Allgemeinzustand und die Komorbiditäten des Patienten von großer Bedeutung. Existieren für das kolorektale Karzinom mit konkomitanter Peritonealkarzinose bereits Algorithmen zur Behandlungsstrategie (Abbildung 1), so liegen für das peritoneal metastasierte Ovarialkarzinom bislang lediglich Hinweise und Tendenzen vor, die einen

Vorteil im Sinne einer Überlebensverlängerung durch die kombinierte Therapie mit CRS und HIPEC anzeigen.¹⁷

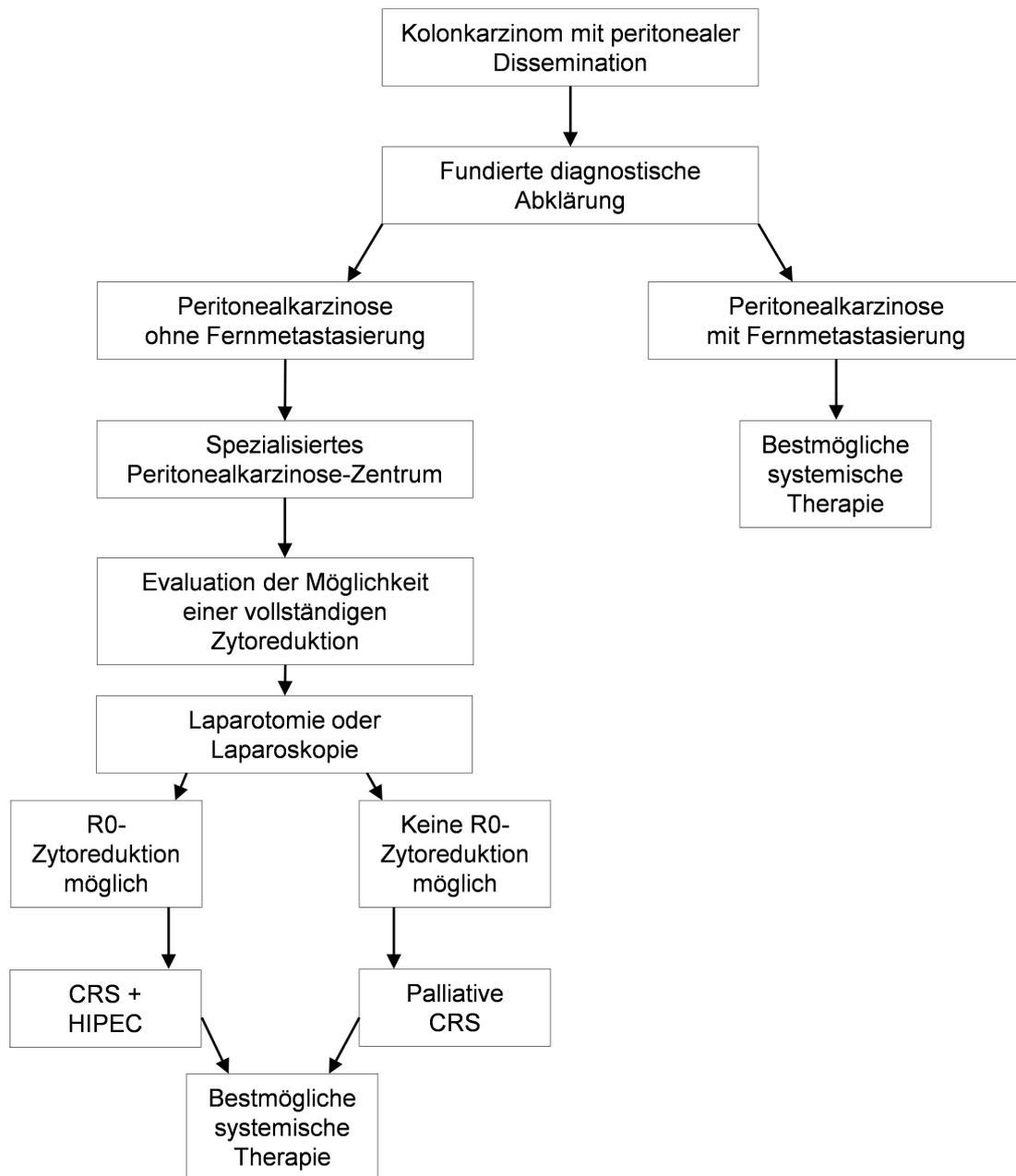


Abbildung 1. Behandlungsalgorithmus für das Kolonkarzinom mit bekannter peritonealer Dissemination (nach Esquivel et al., 2008).¹⁸

Die exakte Ausdehnung einer PC und damit verbundene Therapieentscheidungen lassen sich nur mittels diagnostischer Laparoskopie ermitteln und eruieren. Es kommen verschiedene Staging-Systeme zum Einsatz, die, in Kombination, eine Indikation zum weiteren chirurgischen Vorgehen rechtfertigen können oder auch zur weiteren rein palliativ ausgerichteten Behandlung führen.

1.1.3.1. *Peritoneal cancer index*

Das heutzutage am häufigsten verwendete Staging-System ist der von Paul Sugarbaker entwickelte *peritoneal cancer index* (PCI) zur semiquantitativen Bestimmung des peritonealen Tumorbefalls.¹⁴

Der PCI ermittelt numerisch die Verteilung des Tumors über insgesamt 13 abdominopelvine Regionen und kombiniert diese mit der jeweiligen Läsionsgröße. Zwei transversale und zwei sagittale Achsen teilen das Abdomen in neun Regionen ein. Die obere transversale Achse liegt auf Höhe der tiefsten Stelle des Rippenbogens, die untere transversale Achse liegt etwa auf Höhe der *Spina iliaca anterior superior*. Die sagittalen Achsen teilen das Abdomen in drei gleichgroße Sektoren auf. Die Achsen definieren somit neun Regionen, die im Uhrzeigersinn nummeriert werden. 0 markiert hierbei den Bauchnabel und 1 den Bereich unterhalb des rechten Zwerchfells. Regionen 9 bis 12 segmentieren den Dünndarm in proximales und distales Jejunum bzw. Ileum.

Die *lesion size* (LS), also die Läsionsgröße der Tumoren, wird im Rahmen der diagnostischen Laparoskopie nach der Adhäsiolyse und vollständiger Inspektion der peritonealen und viszeralen Oberflächen innerhalb der Bauchhöhle bestimmt. Die numerische Zuordnung erfolgt hierbei nach folgendem Schema:

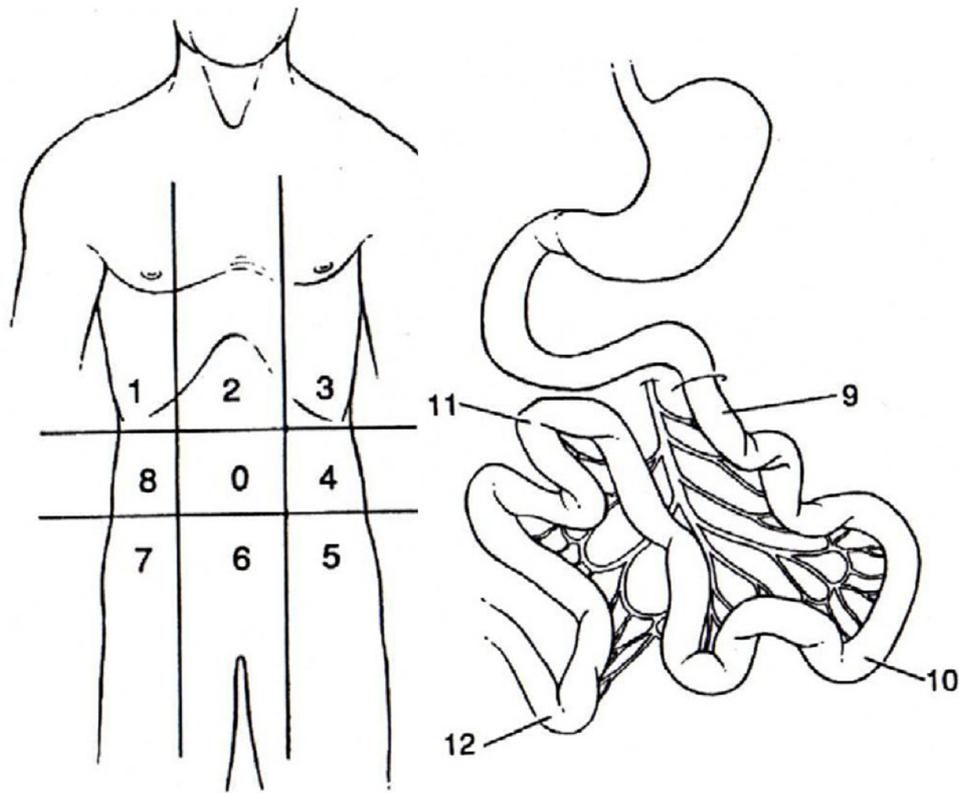
LS-0 kein Tumor sichtbar

LS-1 Tumorgröße < 0,5 cm

LS-2 Tumorgröße < 5,0 cm

LS-3 Tumorgröße > 5,0 cm oder Konfluenz

Die Läsionsgrößen werden für jede der 13 abdominopelvinen Regionen bestimmt und am Schluss addiert. Es entstehen somit PCI-Scores von 0 bis maximal 39 Punkten (Abbildung 2).¹⁹



Regionen	Läsionsgröße (LS)
0 periumbilikal	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 10px;">↑</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Intraoperative Zuordnung</p> <p>0 kein Tumor sichtbar</p> <p>1 Tumorgröße < 0,5 cm</p> <p>2 Tumorgröße 0,5 - 5 cm</p> <p>3 Tumorgröße > 5 cm</p> </div> <div style="margin-left: 10px;">↓</div> </div>
1 rechter Oberbauch	
2 Epigastrium	
3 linker Oberbauch	
4 linke Flanke	
5 linker Unterbauch	
6 Becken	
7 rechter Unterbauch	
8 rechte Flanke	
9 proximales Jejunum	
10 distales Jejunum	
11 proximales Ileum	
12 distales Ileum	

Abbildung 2. Peritoneal Cancer Index-Score (nach Jacquet, Sugarbaker, 1996).¹⁴

Um das PCI-System quantitativer und reproduzierbarer zu machen, ist jede Region nicht nur durch oberflächliche Orientierungsflächen definiert, sondern lässt sich ebenfalls anhand der sich in jeder Region befindlichen anatomischen Strukturen klassifizieren (Tabelle 1).

Tabelle 1. Anatomische Strukturen in den 13 abdominopelvinen Regionen (nach Harmon, Sugarbaker, 2005).¹⁹

Regionen		Anatomische Strukturen
0	Regio umbilicalis	Medianlaparotomie - Omentum majus - Colon transversum
1	Regio hypochondriaca dextra	Lobus hepatis dexter - Unterfläche des rechten Hemidiaphragmas - rechter retrohepatischer Raum
2	Regio epigastrica	Epigastrisches Fett - Lobus hepatis sinister - Omentum minus - Ligamentum falciforme
3	Regio hypochondriaca sinistra	Unterfläche des linken Hemidiaphragmas - Milz - Pankreasschwanz - anteriore und posteriore Oberflächen des Magens
4	Regio abdominalis lateralis sinistra	Colon descendens - linke parakolische Recessi
5	Regio inguinalis sinistra	Colon sigmoideum
6	Regio pubica	Ovarien, Tuben, Uterus - Harnblase, Douglas-Pouch - Colon rectosigmoideum
7	Regio inguinalis dextra	Rechte Beckenseitenwand - Caecum - Appendix vermiformis
8	Regio abdominalis lateralis dextra	Rechte parakolische Recessi - Colon ascendens
9	Proximales Jejunum	
10	Distales Jejunum	
11	Proximales Ileum	
12	Distales Ileum	

Allgemein gilt ein PCI-Score > 20 als relative Kontraindikation für eine elektive Intervention bei der Peritonealkarzinose. Bei Patienten mit einem PCI > 20 ist die palliative chirurgische Therapie dann indiziert, wenn Symptome, die in naher Zukunft auftreten könnten, gelindert oder sogar verhindert werden.¹⁹ Entitätsabhängig wird beim Magenkarzinom mitunter ein maximaler PCI von 10 gefordert. Beim Kolonkarzinom werden auch höhere Scores von bis zu 20 akzeptiert, um die Indikation zur potentiell kurativen Operation zu rechtfertigen.^{16,18} Eine Sonderrolle nehmen abermals das Pseudomyxoma

peritonei und das minimal aggressive Mesotheliom ein, bei denen auch bei einem PCI-Score von 39 kurativ operiert werden kann, da aufgrund der geringen Invasivität nur eine minimale Rezidivwahrscheinlichkeit besteht.²⁰

1.1.3.2. Completeness of cytoreduction score

Therapieziel der kombinierten zytoreduktiven Operation vor hyperthermer Chemotherapie ist immer die komplette makroskopische Entfernung des Tumors, welche durch den *completeness of cytoreduction score* (CCR-Score) klassifiziert wird.^{21,22} Während der diagnostischen Laparoskopie des Bauchfells bzw. nach CRS wird diese Klassifikation nach folgendem Schema vorgenommen:

CCR-0	kein verbliebener sichtbarer Tumor vorhanden
CCR-1	Tumorreste < 0,25 cm
CCR-2	Tumorreste zwischen 0,25 cm und 2,5 cm
CCR-3	Tumorreste > 2,5 cm

Da Tumorreste < 0,25 cm nicht mit hoher Sicherheit identifiziert werden können, gelten sowohl CCR-0- als auch CCR-1-Resektionen als tumorfrei. Ist nach intraoperativer Beurteilung eine CCR-0/1-Resektion möglich, ist, unter Berücksichtigung aller weiterer Faktoren, eine CRS mit HIPEC indiziert und stellt dann einen erheblichen Überlebensvorteil im Vergleich zur alleinigen systemischen Chemotherapie dar.²³⁻²⁵ Insbesondere die komplette Zytoreduktion stellt den entscheidenden prognostischen Indikator auf eine Überlebensverlängerung dar.²⁶ In einer Studie mit 48 Patienten mit peritoneal metastasiertem kolorektalen Karzinom konnte ein medianes Überleben von 63 Monaten mit einem 5-Jahres-Überleben von 51% nach CRS und HIPEC gezeigt werden. Die Kontrollgruppe mit alleiniger Chemotherapie wies hingegen ein medianes Überleben von nur 24 Monaten auf.²⁷

1.1.3.3. Consensus Statement der Society of Surgical Oncology

Als drittes Selektionskriterium für die CRS und HIPEC hat die *Peritoneal Surface Malignancy Group* acht Variablen festgelegt, welche die Wahrscheinlichkeit auf eine vollständige Zytoreduktion erhöhen und somit die Indikation am ehesten rechtfertigen²⁸:

- ECOG-Performance-Status²⁹ ≤ 2
- Keine extraabdominelle Tumormanifestation
- Maximal drei kleine resektable Lebermetastasen
- Keine Anzeichen von Cholestase bzw. biliärer tumorbedingter Obstruktion
- Kein Harnstau bzw. Harnleiterstenose
- Maximal eine intestinale Obstruktion
- Limitierter Dünndarmbefall
- Limitierter Tumorbefall des *Lig. gastrohepaticum/Omentum minus*

1.1.4. Zytoreduktive Peritonektomie nach Sugarbaker

Die zytoreduktive Peritonektomie, die 1995 von Paul Sugarbaker erstmalig publiziert wurde, ist eine Kombination verschiedener chirurgischer Prozeduren und stellt eine langwierige und mitunter sehr aufwändige Operation der Bauchhöhle dar.³⁰ Moran et al. teilten den Eingriff in folgende Einzelschritte ein³¹:

- Hemikolektomie rechts mit Omentektomie und Splenektomie
- Peritonektomie des rechten und linken Oberbauchs
- Cholezystektomie und Resektion der Glisson-Kapsel der Leber
- (Subtotale) Gastrektomie
- Anteriore Rektumresektion und Peritonektomie des Beckens

Die in Steinschnittlage durchgeführte Operation beginnt mit der vollständigen medianen Laparotomie vom Xiphoid bis zur Symphyse und anschließender abdominaler Exploration zur Bestimmung des Resektionsausmaßes. Bei den meisten Patienten zeigt sich das Omentum majus als sogenannter *omental cake* vollständig tumordurchsetzt, so dass die Omentektomie und, bei Infiltration des Colon transversum, eine En-bloc-Resektion desselbigen unabdingbar sind. Es folgt die Peritonektomie des linken Oberbauchs, bei der sich eine Splenektomie in den meisten Fällen nicht vermeiden lässt. Um eine vollständige Exploration des rechten Oberbauchs zu gewährleisten, muss der gesamte rechte Leberlappen intraoperativ mobilisiert werden. Aufgrund des häufigen Tumorbefalls im Bereich der Leber sind in den meisten Fällen eine

Resektion der Leberkapsel sowie die Cholezystektomie vonnöten. Die finale Peritonektomie des kleinen Beckens erfordert nicht selten eine anteriore Rektumresektion mit Blasenteilresektionen unter Darstellung und Schonung der Ureteren. Unter Umständen ist bei Patientinnen die zusätzliche Hysterektomie oder Adnexektomie notwendig. Grundsätzlich wird der genaue Ablauf der CRS nach der abdominalen Exploration festgelegt. Gegebenenfalls kann es je nach Tumorbefall zu ausgedehnten Multiviszeralresektionen kommen, um die CCR-0/1-Resektion zu gewährleisten.^{30,32}

1.1.5. Hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion (HIPEC)

1.1.5.1. Grundlagen zur HIPEC

Auch wenn das Ziel der CRS eine vollständige Entfernung der makroskopisch sichtbaren intraperitonealen Tumormasse ist, so beansprucht die HIPEC-Therapie ein noch höheres Therapieziel; die Eradikation von Mikrometastasen und makroskopisch nicht mehr sichtbaren abgelösten Tumorzellen. Dieser äußerst bedeutende Teil der Behandlung setzt eine optimale thermische Homogenität sowie eine erhöhte chemotherapeutische Penetration ins Tumorgewebe und einen damit verbundenen verstärkten zytotoxischen Effekt voraus.¹⁰ Aktuell wird die HIPEC, wenn auch nicht unumwunden, als eine Therapiemodalität der ersten Wahl bei der vom Kolonkarzinom metastasierten Peritonealkarzinose vorgeschlagen.³³ Nicht außer Acht zu lassen ist jedoch die mit der HIPEC assoziierte signifikante Morbidität und behandlungsbezogene Mortalität.³⁴ Folglich bedarf es einer kritischen Validierung der nutzbringenden Effekte von Hyperthermie und lokaler chemotherapeutischer Zytotoxizität.

Der Synergismus zwischen Hyperthermie und intraoperativer Chemotherapie, insbesondere unter Verwendung ausgewählter Chemotherapeutika, wurde bereits hinreichend dokumentiert. In den letzten Jahren begann eine steigende Zahl von Therapiezentren mit dem regulären Einsatz dieser Behandlungskombination mit ermutigenden Ergebnissen. In einer prospektiven randomisierten Studie zeigten Patienten mit CRS und anschließender HIPEC ein medianes Überleben von 22,2 Monaten, verglichen mit 12,6 Monaten medianem Überleben bei Patienten, die lediglich monotherapeutisch mit einem

systemisch applizierten Chemotherapeutikum behandelt wurden.²⁵ In einer weiteren Studie überlebten 7 von 21 Patienten mit Peritonealkarzinose bei gastrischen und kolorektalen Primarii tumorfrei in einem Nachsorge-Intervall von 8-43 Monaten. Alle Patienten erhielten zuvor die kombinierte Therapie bestehend aus CRS und HIPEC.³⁵ In beiden Studien erfolgte die HIPEC-Behandlung entsprechend der Sugarbaker-Technik, welche die chirurgische Entfernung der makroskopisch sichtbaren Peritonealkarzinose in Kombination mit der HIPEC umfasst und die einen Vorteil im Hinblick auf das Überleben zeigen konnte.³⁶

1.1.5.2. Durchführung der hyperthermen Chemoperfusion

Die Applikation der intraperitonealen Chemoperfusion erfolgt zumeist intraoperativ am Ende der Zytoreduktion. Der entscheidende Vorteil einer intraoperativen Perfusion der Chemotherapeutika liegt bei der relativ homogenen intraperitonealen Verteilung der Zytostatika, welche bei früh postoperativer Applikation der Therapie durch Adhäsionen von Operationswundflächen gestört sein kann. Die Perfusion wird in der Regel so wie folgt beschrieben durchgeführt.³² Für die Perfusion, welche bei offenem und geschlossenem Abdomen durchgeführt werden kann, werden insgesamt vier Drainagen benötigt. Das Perfusat wird über eine großlumige *Inflow*-Drainage im Mittelbauch intraabdominell appliziert. Zwei subdiaphragmale Ablaufdrainagen beidseits sowie eine im Douglas-Raum platzierte Drainage garantieren den Abfluss des Chemotherapeutikums. Die Temperaturkonstanz des Perfusats wird über Temperatursonden in Ösophagus, *Inflow*-Drainage und Douglas-Raum kontrolliert und mittels Wärmetauscher gewährleistet. Über ein Rollerpumpensystem erfolgt zunächst die alleinige Applikation von etwa 4 l Trägerlösung bis zum Erreichen der erforderlichen Temperatur von etwa 42 °C. Das Zytostatikum wird erst nach Erreichen dieser Temperaturen hinzugegeben, um die intraabdominelle Zieltemperatur von 41,5-43 °C zu erreichen. Die Temperaturüberwachung erfolgt während der gesamten Perfusionsdauer, die je nach verwendetem Protokoll bei 60-90 min liegt. Die Perfusionsprotokolle sind jedoch bisher nicht standardisiert und weisen mitunter signifikante Unterschiede

in Abhängigkeit von Tumorentität und den *standard operating procedures* des behandelnden Peritonealkarzinosezentrums auf.³⁷

1.1.5.3. Zytostatika in der HIPEC

Für die HIPEC gibt es bis heute keine Standardisierung bezüglich der als Chemotherapeutika eingesetzten Zytostatika (Tabelle 2). Die eingesetzten Pharmaka sind in den meisten Fällen charakterisiert durch einen direkten zytotoxischen Effekt sowie die antitumorale Aktivität im Sinne eines synergistischen Wirkens zusammen mit der Hyperthermie. Ein hohes Molekulargewicht sowie gute Wasserlöslichkeit, also spezifische pharmakologische Merkmale, gewährleisten die prolongierte Retention des Therapeutikums in der Peritonealhöhle mit nur geringer systemischer Absorption.³⁸ Folglich kann die systemische Belastung des Organismus nach der HIPEC-Therapie in akzeptablem Rahmen gehalten werden.³⁹ Verglichen mit der intravenösen systemischen Chemotherapie weist die HIPEC außerdem zusätzliche Variablen wie Perfusatvolumen, Temperaturlevel, Hyperthermiedauer und Wahl der Perfusionstechnik (offenes oder geschlossenes Abdomen) auf, welche die Pharmakokinetik und Effizienz der Therapeutika beeinflussen können. Die am häufigsten eingesetzten Pharmaka sind heute Mitomycin C (MMC)^{25,40,41}, 5-Fluoruracil (5-FU)⁴² sowie die Kombination aus beiden.^{23,24,43} Beim kolorektalen Karzinom gewinnen zunehmend Platinderivate wie Oxaliplatin (OX) und Irinotecan (IRI)/Carboplatin (CPT) an Bedeutung, da aus der Behandlung mit diesen Zytostatika möglicherweise bessere Überlebensraten resultieren. In einer Phase-II-Studie mit einer Kombination aus Oxaliplatin und Irinotecan konnte dies bei allerdings erhöhter Morbidität gezeigt werden.⁴⁴ Im Rahmen der HIPEC zeigte Oxaliplatin zudem eine höhere Effizienz im Sinne einer deutlich erhöhten 5-Jahres-Überlebensrate als die Kombination aus MMC und 5-FU im Rahmen einer normothermen intraperitonealen Chemotherapie (EPIC).⁴⁵ Die Morbidität war in dieser Studie bei beiden Therapieschemata vergleichbar.

Tabelle 2. Chemotherapeutika in der HIPEC-Therapie (nach Sommariva et al., 2011).³⁸

Zytostatikum	Hitzesynergismus	Penetrationstiefe	Nebenwirkungen	Primarius
Doxorubicin	Ja	4-6 Zellschichten	Peritonealsklerose, Bauchschmerzen	Mesotheliom, Sarkomatose, Ovar, Magen
Mitomycin C	Ja	2000 µm	Darmperforation	Kolon, Appendix, Magen
Cisplatin	Ja	1-3 mm	--	Kolon, Appendix, Mesotheliom, Sarkomatose
Oxaliplatin	Ja	1-2 mm	--	Kolon, Appendix
Etoposide	Ja	n.a.	--	Magen
Mitoxantrone	Ja	5-6 Zellschichten	Intestinale Obstruktion	Ovar
Melphalan	Ja	n.a.	--	Kolon, Appendix
Irinotecan	Nein	n.a.	--	Kolon, Appendix
Docetaxel	Nein	n.a.	--	Ovar
Paclitaxel	Nein	40-80 Zellschichten	--	Ovar
Carboplatin	Ja	0,5 mm	--	Ovar

n.a. - nicht angegeben

1.2. Hyperthermie in der Krebstherapie

1.2.1. Die Wirkung von Temperaturerhöhungen

Neben den zytotoxischen Effekten der eingesetzten chemotherapeutischen Agenzien wie Oxaliplatin und 5-Fluoruracil im Rahmen der HIPEC-Therapie scheint die Hyperthermie ebenfalls eine grundlegende Rolle für die Zytotoxizität zu spielen. Bisher geht man davon aus, dass das Erhitzen des Zytostatikums die peritoneale Konzentration dessen erhöhen und gleichzeitig die systemische Absorption reduzieren kann, was bereits im Mausmodell gezeigt werden konnte.⁴⁶ Mögliche Nebenwirkungen sollen somit auf ein Minimum reduziert werden.

Tumorzellen haben jedoch in diesem Zusammenhang eigenständige Mechanismen entwickelt, um ihre Integrität und Viabilität vor solchen externen Stressoren zu schützen. Die Hyperthermie hat einige eigenständige, unabhängige sowie komplexe zelluläre Effekte und stimuliert andererseits molekulare Signalkaskaden, die weitere, in der onkologischen Therapie zunehmend an Bedeutung gewinnende Temperatureffekte auslösen.

1.2.1.1. Veränderungen im Tumormikromilieu

Aufgrund von Temperaturschwankungen kommt es sowohl im Normalgewebe als auch im Tumorgewebe zu empfindlichen Abweichungen der Gewebesperfusion und Oxygenierung. Fördert die Hyperthermie im Normalgewebe eine Durchblutung, so kommt es bei steigenden Temperaturen im Tumor eher zu einem Zusammenbruch der Perfusion und somit auch der Sauerstoffsättigung.⁴⁷ Des Weiteren wird ein eigenständiger zytotoxischer Effekt der Hyperthermie beschrieben, der insbesondere bei Tumorzellen aufgrund spezifischer pH-Werte und anderer Milieufaktoren stärker als am Normalgewebe ausgeprägt zu sein scheint. Ebenso zeigt der hypertherme Einfluss auf die Tumorzelle einen sensibilisierenden Effekt im Hinblick auf die applizierten Zytostatika. Auch wenn diese Effekte stark tumorabhängig sind, versucht man sie sich in der onkologischen Therapie zu Nutze zu machen und Behandlungsansätze daran anzupassen. Auch spezifische Stimulationen von Immunreaktionen wie die Induktion von natürlichen Killerzellen⁴⁸ und unspezifische Wirkungen wie eine vermehrte Zytokinausschüttung⁴⁹ sind in den letzten Jahren untersucht worden und spielen für die Therapie mitunter eine entscheidende Rolle.

1.2.2. Heat Shock Proteine

1.2.2.1. Grundlagen

Im Sinne der Adaption der Tumorzelle an die veränderten Umgebungsbedingungen bei einer Hyperthermie kommt es bei erhöhten Temperaturen letztlich auch zu molekularen Zellantworten in Form einer gesteigerten Proteinsynthese. Eine besondere Rolle nehmen hierbei die

sogenannten Heat Shock Proteine (HSP) ein. Sie wirken durch die eigene Expressionssteigerung im Sinne einer zellulären Protektion verschiedenartigen externen Stressoren wie Ischämie sowie Hitzestress und oxidativem Stress entgegen.⁵⁰⁻⁵² Ihre Expression wird also in Folge einer Vielzahl von physiologischen und milieubedingten Stressfaktoren induziert.

Die HSP humaner Zellen werden entsprechend ihres molekularen Gewichts in vier große Hauptfamilien eingeteilt: HSP90, HSP70 (auch: HSP72), HSP60 und *small* HSP (15-30 kDa), zu denen das HSP27 gehört. Sie werden entweder konstitutiv exprimiert oder bei extrinsischen Veränderungen der Zelle regulativ induziert und befinden sich in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten. Die am häufigsten untersuchten und klinisch-onkologisch bedeutsamsten HSP sind HSP90, HSP70 und HSP27.⁵³

1.2.2.2. Molekulare Wirkmechanismen der HSP

Mehrere Mechanismen gewährleisten den zytoprotektiven Effekt einer Tumorzelle. Eng gebunden an diese übergreifende Hauptfunktion sind die drei unterschiedlichen Funktionsweisen der HSP. An erster Stelle fungieren die HSP als molekulare Chaperone. Oftmals werden sie zu diesem Zweck zu großen sogenannten *chaperone machines* zusammengesetzt. Diese großen Proteinkomplexe enthalten neben akzessorischen Proteinen auch Co-Chaperone und stellen durch Bindung an ungefaltete Sequenzen der Zielproteine deren Konformationswiederherstellung auch unter Stresseinwirkung sicher.⁵⁴ Viele zelluläre Proteine entfalten sich bei Hitzestress unkontrolliert, ihre denaturierten Anteile werden dann von den *chaperone machines* erkannt und unter Mithilfe von Chaperoninen (HSP60) zurück in die ursprüngliche Sekundär- bzw. Tertiärstruktur überführt, um Proteinaggregationen zu verhindern.^{55,56} Proteindenaturierung und Proteinaggregation sind starke Trigger für den programmierten Zelltod (*programmed cell death*, PCD) bzw. die Apoptose. Einen weiteren Wirkungsbereich der HSP stellt somit außerdem die Interaktion mit Schlüsselproteinen der apoptotischen Signalkaskade innerhalb der Zelle dar. HSP sind stark wirksame antiapoptotische Proteine und interferieren mit den intrazellulären PCD-Prozessen auf verschiedenen Ebenen. Sowohl extrinsische

als auch intrinsische Signalwege der Caspase-vermittelten Apoptose werden von den verschiedenen HSP inhibiert.⁵² Als dritten zytoprotektiven Effekt vermitteln die HSP die gezielte proteasomale Degradierung bestimmter Proteine unter Stresskonditionen, was zur Unterdrückung apoptotischer Signalkaskaden führen kann.

1.2.2.3. HSP90

Das HSP90 wird konstitutiv in der eukaryotischen Zelle exprimiert und macht etwa 1-2 % aller zytosolischen Proteine aus. Seine beiden homologen Unterformen HSP90 α und HSP90 β sorgen für die korrekte Faltung, Reifung und Aufrechterhaltung der funktionalen Stabilität einer Vielzahl von Zielproteinen, den sogenannten HSP90-Klientenproteinen. HSP90 bindet ATP-abhängig an Proteine mit instabilen Tertiärstrukturen, zahlreiche Co-Chaperone wie Hip, CHIP oder Bag-1 vermitteln hierbei die Erkennung des Substrats sowie die Assoziation an und Dissoziation von der Zielstruktur. Der ADP- oder ATP-Bindungsstatus wird über Co-Chaperone stabilisiert und somit die Affinität zum Substrat erhöht oder erniedrigt.⁵⁷ Die meisten der HSP90-Klienten sind in entscheidende Zellfunktionen wie Wachstum, Proliferation und Überleben involviert, Prozesse, die insbesondere in Tumorzellen eine bedeutende Rolle spielen. So wurden viele tumorassoziierte Proteine wie Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) oder Fusionskinasen wie BCR-ABL als Substrate von HSP90 identifiziert.⁵³ Eine HSP90-Überexpression wirkt beispielsweise durch die Bindung an Apaf-1 anti-apoptotisch und inhibiert die Oligomerisierung und Aktivierung der Procaspase 9.⁵⁸ Des Weiteren greift HSP90 in die Angiogenese ein. Gemeinsam mit HSP70 stabilisiert und akkumuliert HSP90 den Transkriptionsfaktor HIF α (*hypoxia inducible factor-1 α*), der zahlreiche Zielgene aktiviert, welche in die Forcierung von Angiogenese und Adaptation an Hypoxie einbezogen sind.^{59,60} Weitere HSP90-abhängige Regulationsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und die Stickstoffmonoxid-Synthase steuern die Proliferation und Mobilität von vaskulär-endothelialen Zielzellen. Sie agieren in komplexen Signalkaskaden, die die Neovaskularisation in Tumoren gewährleisten.⁶¹

1.2.2.4. HSP70

Die humane Zelle enthält verschiedene Unterformen der HSP70-Familie, darunter das stressinduzierbare HSP72 und das konstitutiv exprimierte HSP73.⁶² So wie HSP90 sind HSP70-Proteine ATP-abhängige molekulare Chaperone, die die korrekte Faltung anderer intrazellulärer Proteine gewährleisten. Im Gegensatz zu HSP90 spielt HSP70 jedoch vor allem bei neu synthetisierten Proteinen eine entscheidende Rolle. Mittels Zusammenführung großer Proteinkomplexe wird die Funktion dieser Chaperone sichergestellt. In der antiapoptotischen Funktion der HSP übernimmt HSP70 eine tragende Rolle auf zahlreichen Ebenen der apoptotischen Signalwege (Abbildung 3). Prä-mitochondrial inhibiert HSP70 die JNK und verhindert dadurch deren Aktivierung und folglich die Caspase-3-Induktion.⁶³ Auf mitochondrialer Ebene wird die Translokation von Bax (BCL-2-assoziiertes Protein) in die äußere Mitochondrienmembran und somit die mitochondriale Permeabilisierung verhindert. Der AIF (*Apoptosis inducing factor*) und Cytochrom c (Cyt c) können nicht mehr aus dem Mitochondrium entlassen werden.⁶⁴ Auch post-mitochondrial wirksam bindet HSP70 an Apaf-1 und verhindert damit die Rekrutierung der Procaspase-9 ins Apoptosom.⁶⁵ Ebenso werden extrinsische apoptoseinduzierende Signalwege direkt von HSP70 beeinflusst. So bindet es an die Transmembranproteine DR4 (*death receptor*) und DR5 und verhindert somit die Aktivierung des DISC (*death inducing signaling complex*) und die Induktion der Caspase-8.⁶⁶ HSP70 ist schlussendlich das einzige HSP, das jenseits des Caspase-3-Komplexes antiapoptotisch in der Zelle wirkt. Während der finalen Phase der Apoptose wird chromosomale DNA normalerweise intranukleär durch die CAD (*caspase-activated DNase*) abgebaut. Die enzymatische Aktivität dieser DNase wird durch HSP70 reguliert und kann bei Überexpression des HSP ausgesetzt werden.⁶⁷

1.2.2.5. HSP27

Das *small Heat Shock Protein* HSP27 bedient sich unterschiedlicher Signalwege, um antiapoptotisch auf die Zelle einzuwirken. Ein grundsätzlicher Unterschied zu HSP70 und HSP90 besteht in der ATP-Unabhängigkeit von

HSP27. Die aktive Form liegt in nicht-phosphorylierten Oligomeren vor und bindet an völlig verschiedene Zielstrukturen in der Zelle.⁵² Der Hauptmechanismus der Apoptoseinhibition besteht in einer Blockade des Caspase-3-Aktivierungskomplexes. Dies erreicht HSP27 zum einen über die Bindung an Cytochrom c, wodurch dessen Absonderung vom Mitochondrium verhindert wird, zum anderen über die hemmende Wirkung auf das Smac-Protein, einem inhibitorischen Protein, das normalerweise an IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) bindet und somit im Regelfall deren inhibitorische Wirkung auf den Caspase-3-Komplex aufhebt. Durch die Hemmung von Smac sind die IAPs bei HSP27-Überexpression nun aktiv und verhindern die Apoptose.⁶⁸ Als zellstabilisierendes Moment hat HSP27 außerdem einen regulierenden Effekt auf F-Aktin, einen Hauptbestandteil der intrazellulären Mikrofibrillen, welche die zytoskelettale Stabilität und morphologische Struktur der Zelle sichern und einen Zusammenbruch der Zellstruktur verhindern.⁶⁹ Aufgrund dieser Interaktionen lässt sich bei HSP27-Überexpression auch eine verstärkte Aktin-vermittelte Zellmigration feststellen, was insbesondere in Tumorzellen bedeutsam für das metastatische Verhalten des Tumors ist.⁷⁰ HSP27 ist das einzige der HSP, das über die gezielte proteasomale Zerstörung bestimmter Proteine einen antiapoptotischen Effekt erzielt. So wird unter Hyperthermie IκBα ubiquitiniert und damit für den Abbau durch das Proteasom markiert. IκBα ist ein Protein, das normalerweise den nukleären Transkriptionsfaktor NF-κB blockiert. Auf diese Weise wird die durch NF-κB begünstigte Zellviabilität durch die gezielte Zerstörung des NF-κB-Inhibitors gefördert bzw. die NF-κB-vermittelte Apoptose inhibiert.^{71,72}

1.2.2.6. HSP-Expression in Malignomen

Aufgrund der zahlreichen antiapoptotischen, proliferationsfördernden und zellstabilisierenden Effekte der HSP ist es wenig verwunderlich, dass in vielen malignen Tumoren die HSP erhöht exprimiert werden.⁵³ Die zytoprotektiven Funktionen dieser Proteine stellen das Überleben der Krebszelle sicher. Folglich erfahren die Zellen unter Stresseinwirkung und Stimulation mit Hyperthermie, oxidativem Stress oder zytostatischen Therapeutika ebenso eine Hochregulierung der Heat Shock Chaperone.⁷³ In verschiedenen Modellen

steigerte die HSP-Überexpression das Tumorwachstum, das metastatische Potential des Tumors und potentielle Chemotherapieresistenzen (*multi drug resistance*; MDR).⁷⁴ Der klinisch bedeutsame Aspekt dieser Beobachtung ist eine deutliche Korrelation zwischen HSP-Überexpression und klinisch relevanten Parametern wie Patientenüberleben und Therapieansprechen in gänzlich verschiedenen Tumorentitäten.^{75,76} Eine direkte Korrelation zwischen HSP27-Überexpression und Chemotherapieresistenz wurde für einige humane Malignome postuliert, so unter anderem für das Ovarialkarzinom sowie das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.⁷⁶ HSP70 und HSP27 wird vermehrt Bedeutung als Prädiktoren für eine Chemotherapieresistenz und ein kürzeres Rezidiv-freies Überleben beim Mammakarzinom beigemessen.^{76,77} Viele Proteine in Tumorzellen sind ebenfalls abhängig von intrazellulärer Proteinfaltung - vermittelt über HSP90 -, insbesondere im Hinblick auf deren Stabilität, Konformität und Reifung, was HSP90 zu einem vielversprechenden Ziel in der Pharmakotherapie bei der Behandlung von Karzinomen macht.⁷⁸ Die HSP-Expression in Krebszellen scheint schlussendlich eine Schlüsselrolle im Schutz vor therapieinduzierter Tumorzellapoptose zu spielen. Dennoch ist der zugrundeliegende Einfluss der HSP auf Tumorprogression und Behandlungsresistenz bislang nur unzureichend verstanden.^{76,79}

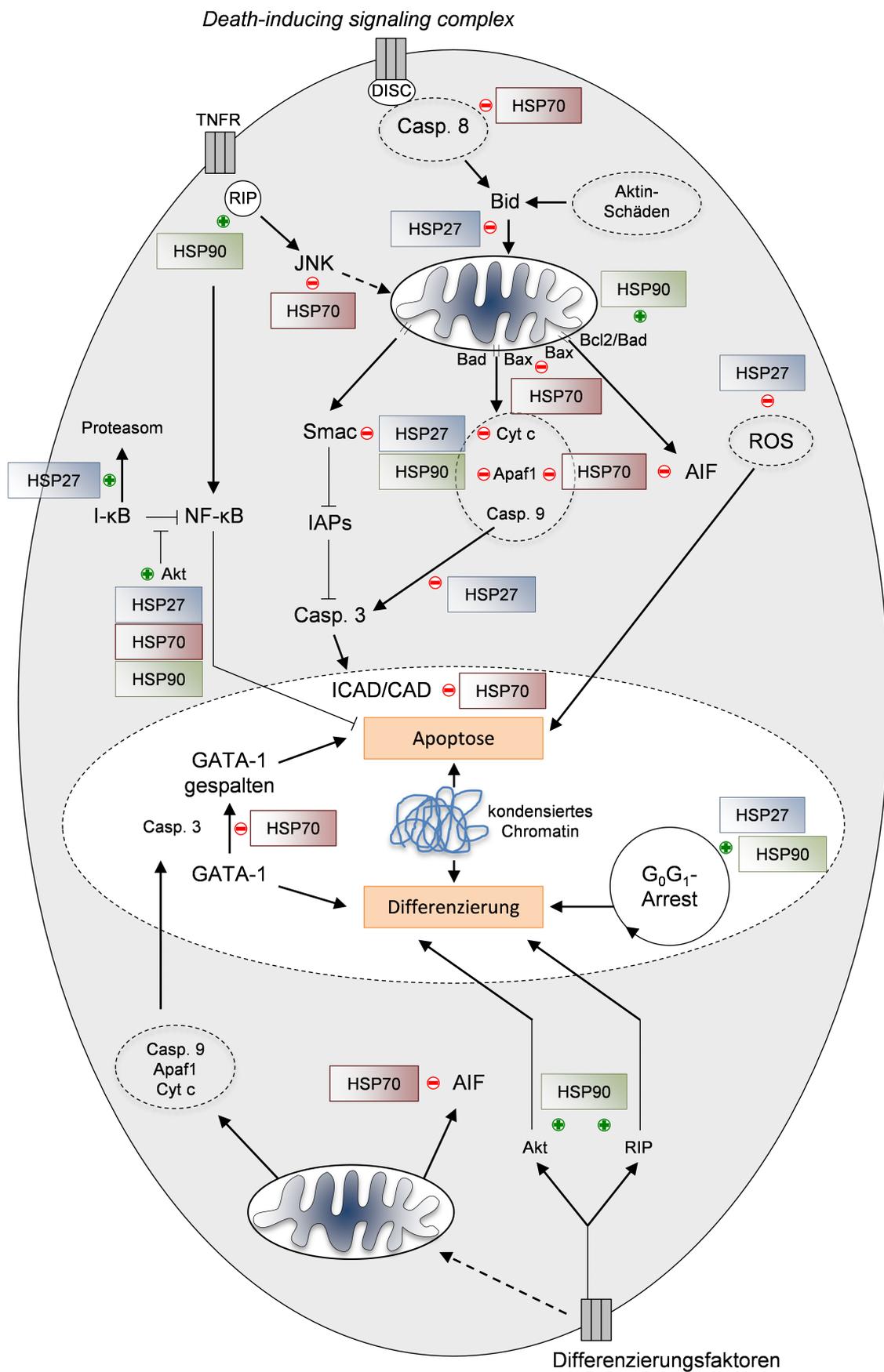


Abbildung 3. Modulation von Apoptose und Zelldifferenzierung durch HSP27, HSP70 und HSP90 (nach Lanneau et. al, 2007).⁷¹

2. Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kommt es bei Peritonealkarzinose-Patienten nach HIPEC zu einer messbaren Veränderung der HSP-Expression in verschiedenen Tumorentitäten?
2. Welchen Einfluss hat der isolierte Hyperthermieeffekt auf die HSP-Expression im Kolonkarzinom?
3. Sind bezüglich der gewählten Temperatur der einstündigen Hyperthermie unterschiedliche Effekte auf die HSP-Expression zu erkennen und ist eine zeitliche Kinetik sichtbar?
4. Welchen Effekt haben die gewählten verschiedenen Temperaturen und Regenerationszeiten nach der Hyperthermie auf die Proliferation und Apoptose von HT-29 Kolonkarzinomzellen?

3. Materialien

3.1. Verwendete Puffer, Reagenzien und Chemikalien

Puffer/Reagenz/Chemikalie	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
cDNA - Human Adult Normal Tissue: Colon	BioChain (Newark, CA, USA)
Deckmedium Glycergel®	Dako (Glostrup, Dänemark)
3,3'-Diaminobenzidin-Tabletten SIGMAFAST™	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura (Torrance, CA, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt)
MTS-Reagenz CellTiter 96® AQueous	Promega (Mannheim)
One Solution Cell Proliferation Assay	
PBS-Pulver (10x Dulbecco's)	AppliChem (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG (Berlin)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
RNA-Stabilisierungsreagenz RNAlater	Qiagen (Hilden)
TRIzol® Reagenz	Life Technologies (Darmstadt)
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG (Berlin)
Tween® 20	AppliChem (Darmstadt)

3.2. Kulturzellen

Zelllinie	Zelltyp/Erkrankung	Hersteller
HT-29	Humanes Kolon, kolorektales Adenokarzinom	ATCC (Manassas, VA, USA)

3.3. Zellkulturmedien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
McCoy's 5A Medium, modifiziert mit 1,5 mmol/l L-Glutamin und 2200 mg/l Natriumbikarbonat	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 10 % (v/v) FCS Vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt, Inkubation bei 37 °C und 5 % CO ₂ ATCC (Manassas, VA, USA)
DPBS (gebrauchsfertig)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
<i>Enzyme free cell dissociation solution</i> <i>PBS based (1x), flüssig</i>	Millipore (Billerica, MA, USA)

3.4. Puffer für die Proteinbiochemie

3.4.1. Selbst hergestellte Puffer

Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer (Lysepuffer)	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % NP-40 1 % Desoxycholat 0,1 % SDS 5 mM NaF 1 Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail <u>Vor Gebrauch frisch hinzugefügt:</u> 1 mM DTT 1 mM PMSF

Puffer	Zusammensetzung
Strip-Puffer	2 % SDS 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

3.4.2. Lösung zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford)

Puffer/Reagenz	Hersteller
Bradford-Reagenz Roti®-Quant	Carl Roth (Karlsruhe)

3.4.3. Lösungen für die SDS-PAGE (gebrauchsfertig)

Puffer/Reagenz	Hersteller
NuPAGE® LDS Probenpuffer (4x)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE® Reduktionsagens (10x)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
5 % (v/v) NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

3.4.4. Proteinmarker

Marker	Hersteller
Fermentas™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

3.4.5. Lösungen für Western Blot (gebrauchsfertig)

Puffer/Reagenz	Hersteller
5 % (v/v) NuPAGE® Transferpuffer (20x)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
20 % Methanol	

3.4.6. Blocklösungen für Immundetektion

5 % (m/v) Magermilchpulver in PBS-

Tween

5 % (m/v) BSA in PBS-Tween

3.4.7. Chemilumineszenzlösungen (gebrauchsfertig)

Puffer/Reagenz

SuperSignal West Pico

Chemilumineszenzsubstrat: Lösung A,
B

SuperSignal West Femto

Chemilumineszenzsubstrat: Lösung A,
B

Hersteller

Thermo Fisher Scientific (Waltham,
MA, USA)

Thermo Fisher Scientific (Waltham,
MA, USA)

3.5. Antikörper

3.5.1. Primärantikörper

Antigen, Art, Wirt

HSP27, mAK, Maus

β -Aktin, pAK, Kaninchen

HSP70/72, mAK, Maus

HSP90, mAK, Maus

Hersteller

Santa Cruz Biotechnology
(Heidelberg)

Abcam (Cambridge, UK)

Rockland (Gilbertsville, PA, USA)

Abcam (Cambridge, UK)

3.5.2. Sekundärantikörper

Antigen, Art, Kopplung, Wirt

Kaninchen, pAK, IgG-HRP, Ziege

Maus, pAK, IgG-HRP, Ziege

Hersteller

Santa Cruz Biotechnology
(Heidelberg)

Santa Cruz Biotechnology
(Heidelberg)

3.6. Primer

Primer	Bezeichnung	Hersteller
HSP27	Hs_HSPB1_1_SG QuantiTect primer assay	Qiagen (Hilden)
HSP72	Hs_HSPA1A_2_SG QuantiTect primer assay	Qiagen (Hilden)
HSP90	Hs_HSP90AA1_3_SG QuantiTect primer assay	Qiagen (Hilden)
β-Aktin	Hs_ACTB_1_SG QuantiTect primer assay	Qiagen (Hilden)

3.7. Kits

3.7.1. Zur Isolierung von Membranproteinen aus Tumorzellen

Kit	Hersteller
DUALXtract total membrane protein extraction kit	Dualsystems Biotech AG (Schlieren, Schweiz)

Zusammensetzung:

100 ml Zellpermeabilisationspuffer
50 ml
Membranproteinextraktionspuffer
250 ml Zellwaschlösung

3.7.2. Zur Quantifizierung der Tumorzellapoptose

Kit	Hersteller
CELL LAB ApoScreen™ Annexin V-FITC Apoptosis Kit	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)

3.7.3. Zur RNA-Isolierung

Kit	Hersteller
iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega (Mannheim)

3.7.4. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Kit	Hersteller
MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay No ROX	Eurogentec Deutschland GmbH (Köln)

3.8. Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einfrierröhrchen Cryo.s™	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Filtrierpapier	Hartenstein (Würzburg)
Küvetten, Polystyrol (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Medizinischer Röntgenfilm	Fujifilm (Tokyo, Japan)
Mikrozentrifugenröhrchen Eppendorf Tubes®	Eppendorf (Hamburg)
Nitrozellulose, vorgeschnitten (0,45 µm Porengröße)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Polyacrylamid NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gel	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Parafilm® M	Brand (Wertheim)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® (10, 200, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Stahlkugeln (rostfrei) zur Gewebehomogenisierung (3-7 mm)	Qiagen (Hilden)

Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen CELLSTAR®

(75 cm², roter Filterdeckel)

Zellkulturtestplatten (96 Kalotten)

Zellschaber

Zentrifugenröhrchen CELLSTAR®

(25 ml, 50 ml)

Hersteller

Greiner Bio-One (Frickenhausen)

TPP Techno Plastic Products AG

(Trasadingen, Schweiz)

SPL Life Sciences (Pocheon-si,

Gyeonggi-do, Südkorea)

Greiner Bio-One (Frickenhausen)

3.9. Geräte

Gerät

BioPhotometer

Brutschrank Heraeus Function Line

DNA Engine Opticon® 2

Durchflusszytometer Coulter Epics XL

Gelkammer XCell SureLock® Mini-
Cell

Gelkammer XCell II™ Blot Module

Handdispenser Multipette® plus

Inversmikroskop Axiovert 40C

Magnetrührer mit Heizplatte MR 3001

K

Mastercycler® gradient

Mehrkanalpipette Eppendorf

Research® plus

Netzgerät Electrophoresis Power

Supply E835

Hersteller

Eppendorf (Hamburg)

Thermo Fisher Scientific (Waltham,

MA, USA)

Bio-Rad Laboratories GmbH

(München)

Beckman Coulter (Brea, CA, USA)

Life Technologies (Carlsbad, CA,

USA)

Life Technologies (Carlsbad, CA,

USA)

Eppendorf (Hamburg)

Carl Zeiss Mikroskopie (Jena)

Heidolph Instruments GmbH & Co.

KG (Schwabach)

Eppendorf (Hamburg)

Eppendorf (Hamburg)

Consort (Turnhout, Belgien)

Gerät	Hersteller
Pipetten Eppendorf Research® (variabel)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand (Wertheim)
Plattformschüttler, rotierend, Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Präzisionswaage CP4201	Sartorius (Göttingen)
Röntgenkassette	Dr. Goos-Suprema GmbH (Heidelberg)
Spektralphotometer NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Sterilbank HERAsafe®	Kendro (Langenseibold)
ThermoStat™ plus	Eppendorf (Hamburg)
TissueLyser II	Qiagen (Hilden)
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Vortexzentrifuge Combispin	Hartenstein (Würzburg)
Vortexmixer Minishaker	IKA (Staufen)
Wasserbad mit Schüttelvorrichtung	Memmert (Schwabach)
Zählkammer (Neubauer)	Hartenstein (Würzburg)
Zentrifuge Heraeus® Biofuge® fresco	Kendro (Hanau)
Zentrifuge Heraeus® Multifuge® 1 S-R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Zytozentrifuge Shandon Cytospin® 4	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

4. Methoden

4.1. Patientenkollektiv

Acht Patienten mit einer Peritonealkarzinose und verschiedenen Primärtumoren, bei denen in domo eine zytoreduktive Operation in Kombination mit der HIPEC-Therapie im Zeitraum 09/2009 bis 08/2010 durchgeführt wurde, wurden in die Studie eingeschlossen (Tabelle 3). Von allen Patienten wurde präoperativ nach ausführlicher Aufklärung eine Einverständniserklärung im Sinne eines *informed consent* eingeholt, in der die Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie gegeben wurde. Schließlich wurde die geplante Studie ebenfalls durch die lokale Ethikkommission genehmigt. Klinische Daten bezüglich Primärtumorentität, chemotherapeutischer Behandlung und Therapieresponse zur HIPEC wurden in einer Tumordatenbank gesammelt und zusammengefasst (Tabelle 3). Die HIPEC-Therapie wurde stets unter spezifischen Konditionen durchgeführt (1 h permanenter chemotherapeutischer Fluss über eine externe Pumpe in die Bauchhöhle nach der Resektion relevanter Tumormassen bei Erhöhung der Temperatur des Perfusats auf bis zu 43 °C), die Biopsien der peritonealen Tumoren wurden jeweils vor und nach der HIPEC-Prozedur entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung konserviert. Die Probenanteile für die folgende RNA-Extraktion wurden in RNAlater, jene für die Western Blot Analysen ohne weiteren Zusätze und die anderen Anteile für die Weiterverarbeitung im Kryostaten in Tissue-Tek® schockkonserviert. Die Patienten wurden im Intervall von 6 Monaten im Rahmen der Nachsorge nach CRS und HIPEC untersucht, die klinische Therapieantwort wurde auf Basis der Tumorprogression nach HIPEC evaluiert. Hierbei dienten die Tumorgröße und die Entwicklung eines Aszites als semiquantitative Parameter (Tabelle 3).

Tabelle 3. Charakteristika von acht Patienten mit Peritonealkarzinose, die einer CRS mit HIPEC zugeführt wurden.

Patientennummer	Geschlecht / Alter bei OP	Primärtumor	PCI	Intraoperative Chemotherapie	Intervention	Outcome nach HIPEC
1	m/70	Appendix, Adenokarzinom	14	Mitomycin C (30 mg/m ²)	Kurativ CCR-0	AWD, 27 Monate nach HIPEC
2	w/52	Peritoneales Mesotheliom	17	Cisplatin/Doxorubicin (75 und 15 mg/m ²)	Kurativ CCR-0	DOD, 24 Monate nach HIPEC
3	w/58	Magen, Siegelringzellkarzinom	8	Mitomycin C (30 mg/m ²)	Kurativ CCR-0	DOD, 18 Monate nach HIPEC
4	w/63	Ovarialkarzinom	22	Cisplatin/Doxorubicin (75 und 15 mg/m ²)	Kurativ CCR-0	NED, 24 Monate nach HIPEC
5	w/44	Appendix, Adenokarzinom	10	Oxaliplatin (300 mg/m ²)	Kurativ CCR-0	NED, 20 Monate nach HIPEC
6	w/56	Pankreas, Adenokarzinom	12	Mitomycin C (30 mg/m ²)	Palliativ CCR-1	Moderate Progression
7	w/54	Appendix, Karzinoid	28	Mitomycin C (30 mg/m ²)	Palliativ CCR-2	Moderate Progression
8	m/47	Peritoneales Mesotheliom	30	Cisplatin/Doxorubicin (75 und 15 mg/m ²)	Palliativ CCR-2	Geringe Progression

AWD, alive with disease; DOD, dead of disease; m, männlich; NED, no evidence of disease; PCI, Peritoneal cancer index; CCR, Completeness of cytoreduction; w, weiblich.

4.2. Zellkultur

4.2.1. Auftauen und Sedimentieren eukaryotischer Zellen

Als zelluläre Grundlage für die Zellkultur und das Hyperthermie *in vitro* Modell diente die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank erfolgte ein kurzes Antauen der Zellen im Wasserbad bei 37 °C und das sofortige Überführen in 50 ml modifiziertes McCoy's 5A Medium. Nach anschließender Zentrifugation bei 311 x g für 10 min wurde der Überstand abgegossen und das Pellet erst in 1 ml Medium resuspendiert und dann mit Medium auf 50 ml aufgefüllt. Es folgten eine zweite Sedimentierung unter gleichen Geräteeinstellungen, das erneute Abkippen des Überstands, die Resuspension des Pellets in 1 ml Medium sowie die Überführung der Zellen in eine T75 Zellkulturflasche mit 15 ml Medium.

4.2.2. Kultivierung von HT-29 Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank in Form eines Monolayers kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Flaschen lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Konfluenz und zum Ausschluss einer bakteriellen oder mykotischen Kontamination überprüft. Sämtliche Arbeiten mit HT-29 Zellen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen an einer Sterilbank durchgeführt. Das Nährmedium setzte sich zusammen aus McCoy's 5A Medium, das mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin angereichert wurde. Die weitere Subkultivierung der Zellen erfolgte ca. alle 5 Tage, um eine jeweilige Konfluenz von 70-90 % zu erreichen. Hierbei wurden die Zellen vorerst mit 10 ml PBS-Lösung gewaschen und für das Ablösen vom Flaschenboden für ca. 3-8 min bei 37 °C mit 5 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml frischem Medium wurde die Trypsinierung beendet, die Zellsuspension in 50 ml fassende Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 311 x g zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands erfolgte die Resuspension des Pellets in 7,5 ml Medium, von denen 500 µl zur Subkultivierung in eine weitere Kulturflasche mit 15 ml Medium überführt wurden (entspricht einem Passagieren von 1:16).

4.3. Zellbiologische Methoden

4.3.1. Das Hyperthermie *in vitro* Modell

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 70-80 % wurden die herangezogenen Monolayer anschließend, angelehnt an die intraoperativen *in vivo* Bedingungen während einer HIPEC-Therapie, vier verschiedenen Temperaturstufen für eine Stunde ausgesetzt (37 °C, 39 °C, 41 °C und 43 °C). Um die definierte Hyperthermie während der gesamten Zeit zu gewährleisten, wurde das Kulturmedium auf die gewünschte Temperatur vorgewärmt und unmittelbar vor Beginn der hyperthermen Phase im Schüttelwasserbad auf die Zellen gegeben. Auch nach der einstündigen Hyperthermiephase erfolgte jeweils ein Wechsel des Mediums, um etwaige Verbrauchseffekte des Mediums auszuschließen. Um ein Eindringen von Wasser aus dem Schüttelbad in die Kulturflasche und somit die Kontamination der Zellen zu verhindern, wurden die Schraubverschlüsse der Flaschen mit Parafilm® versiegelt. Die Inkubation wurde dann in einem temperaturkontrollierten Schüttelbad durchgeführt (Schüttelstufe 2). Nach der hyperthermen Inkubation wurden die Zellen für eine 30-minütige oder 12-stündige regenerative Periode zurück in den 37 °C warmen Inkubator in 5 % CO₂-Atmosphäre gestellt. Als Kontrolle wurden Zellen aus derselben Passage verwendet, die weder der Hitzebehandlung noch dem zusätzlichen physikalischen Stress durch Schütteln ausgesetzt wurden. Nach dem jeweiligen Ablauf der Regenerationszeit erfolgte die Weiterverarbeitung der Zellen für die anschließenden Protein- und RNA-Analysen.

4.3.2. MTS-Zytotoxizitätstest

Der MTS-Test dient der Bestimmung der Gesamtaktivität, d.h. der Viabilität, der Zellen einer Population und beruht auf der enzymatischen Aktivität lebender Zellen. So lässt sich die Wachstumsrate der mit Hyperthermie behandelten Zellen charakterisieren. Lediglich in metabolisch aktiven Zellen werden zugegebene Tetrazoliumsalze (MTS) von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums gespalten. Durch die Reduktion entsteht der wasserunlösliche dunkelblaue Farbstoff Formazan, der bei einem Extinktionsmaximum von 492 nm spektroskopisch quantitativ erfasst werden kann. Die gemessene

Farbintensität des Formazans steht schließlich in direkt proportionalem Verhältnis zur Anzahl der metabolisch aktiven respektive noch lebenden Zellen. Auch die Proliferation von HT-29 Zellen aus dem Hyperthermie *in vitro* Modell wurde mittels MTS-Zytotoxizitätstest bestimmt.

Pro Kalotte einer 96-Well-Platte wurden etwa 3000 Zellen mit einem Gesamtvolumen von 100 µl ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Anschließend wurde das Medium vorsichtig ausgeklopft und durch die gleiche Menge frischen Mediums ausgetauscht. Nach dem Einschweißen der 96-Well-Platten in Folie erfolgte die Inkubation der Zellen analog dem Hyperthermie *in vitro* Modell im Schüttelwasserbad bei je 37 °C, 39 °C, 41 °C und 43 °C für jeweils eine Stunde. Jeder Ansatz wurde in Triplets durchgeführt. Nach der hyperthermen Phase wurde das Medium abgeklopft und durch frisches Medium ersetzt. Auch hier betrug die nun folgenden Regenerationszeiten 30 min und 12 h. Nach der jeweiligen Regenerationszeit wurde jeweils 20 µl des MTS-Reagenz in eine Kalotte pipettiert, bei 37 °C für eine Stunde inkubiert und dann ausgelesen. Zellfreies Medium wurde hierbei als spektroskopischer Nullwert verwendet. Als Kontrollwert diente das Zellwachstum der Zellen, die im Medium bei 37 °C zwar inkubiert, nicht jedoch der mechanischen Belastung im Schüttelwasserbad ausgesetzt wurden. Alle Mittelwerte der Proliferationsmessungen wurden dann auf diesen mit 100 % gleichgesetzten Kontrollwert bezogen. Folglich ist eine Aussage sowohl über die Proliferation der Zellen bei verschiedenen Temperaturen sowie eine Kinetik mit Regenerationszeiten 30 min und 12 h möglich. Für die Berechnung der Standardabweichung wurde folgende Formel verwendet:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Dabei ist x der Stichprobenmittelwert und n der Stichprobenumfang.

4.3.3. Apoptose-Test und Durchflusszytometrie

Der Annexin-V-Test basiert auf der hohen Affinität des Ca²⁺-abhängigen Proteins Annexin V zu Phosphatidylserin (PS), einem zytoplasmatischen

Phosphoglycerid auf der Innenseite der Zellmembran. Im Rahmen der Zellapoptose kommt es zu einer Verlagerung von PS an die Zellmembranaußenseite, so dass Annexin V daran binden kann. Wird Annexin V nun zusätzlich mit dem fluoreszierenden Farbstoff FITC markiert, können die apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch detektiert und quantifiziert werden. Weiterhin lassen sich auch nekrotische Prozesse analysieren, da es während der Nekrose zu einer Permeabilisierung der Zelle kommt und Annexin V an die zytoplasmatische Innenseite gelangt und dort an PS bindet. Die Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Prozessen erfolgt mittels Propidiumiodid (PI), einem Farbstoff, der die DNA von Zellen anfärbt. Dabei kann PI ausschließlich bei toten Zellen durch die permeabilisierte Membran in den Zellkern gelangen. Um neben den Zytotoxizitätsanalysen der HT-29 Zellen aus dem *in vitro* Hyperthermie Modell auch Aussagen zur Zellapoptose unter hyperthermen Bedingungen machen zu können, wurden die Zellen wie unter 4.2.2 beschrieben kultiviert. Nach Abgießen des Mediums wurden die noch am Flaschenboden haftenden Zellen mit DPBS gewaschen und die Bodenhaftung mit 3 ml enzymfreier Dissoziationslösung aufgehoben. Für den Apoptose-Test wurden die Zellen dann anfangs 2x mit kaltem PBS gewaschen, danach in kaltem Annexin V Bindungspuffer (1x) resuspendiert und die Zellzahl auf 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Je 100 μ l der Zellsuspension wurden nun in je ein FACS-Röhrchen überführt, 10 μ l Annexin V-FITC hinzugegeben, auf dem Vortexmixer vermischt und für 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden jeweils 380 μ l kalter Annexin V Bindungspuffer hinzugegeben, 10 μ l PI zugesetzt und die Röhrchen erneut auf dem Vortexmixer durchmischt. Die folgende Bestimmung der Apoptoseraten erfolgte an einem Durchflusszytometer. Annexin V positive aber PI negative Zellen wurden als apoptotisch, Annexin V und PI positive Zellen als nekrotisch und Annexin V und PI negative Zellen als viabel klassifiziert.

4.4. Proteinbiochemische Methoden

4.4.1. Gewinnung von Gesamtzellextrakten

4.4.1.1. Adhärenzte HT-29 Zellen

Für die Herstellung von Proteinzellextrakten zur Analyse der HSP auf finaler Ebene der Proteinexpression wurden die HT-29 Zellen aus dem Hyperthermie *in vitro* Modell mit 10 ml DPBS gewaschen, mit einem Zellschaber vorsichtig vom Flaschenboden abgekratzt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Auffüllen mit PBS auf 50 ml erfolgte die Sedimentierung in der Zentrifuge bei 311 x g für 10 min. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet, je nach Größe, in 500-1000 µl RIPA-Puffer resuspendiert. Die Inkubation wurde anschließend auf Eis für mindestens 10 min durchgeführt. Nach der Zentrifugation des Lysats für 15 min bei 13 000 rpm und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und in der Gelelektrophorese weiterverwendet bzw. bei -80 °C für die Weiterverarbeitung aufbewahrt.

4.4.1.2. Gefrorenes Gewebe aus den *in vivo* HIPEC-Biopsien

Das Biopsiegewebe wurde in kleine Stücke geschnitten, in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt und je nach Gewebemenge mit 500-1500 µl RIPA-Puffer sowie rostfreien Stahlkugeln (3-7 mm im Durchmesser) in einem TissueLyser für 2 x 2 min homogenisiert. Vor der Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C für 15 min erfolgte die Inkubation auf Eis für mindestens 5 min. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen für die weiteren Analysen der Proteinexpression überführt bzw. bei -80 °C gelagert.

4.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die weiteren Proteinexpressionsanalysen ist eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Tumorzellen vonnöten. Der Proteingehalt des jeweiligen Überstands wurde mit Hilfe des Bradford-Tests bestimmt. Dieser Test beruht auf einer Bindung des Farbstoffs Coomassie-

Brillant-Blau G-250 (CBBG) an die kationischen, unpolaren Seitenketten von Proteinen. Bei dieser Komplexbindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm. Aufgrund des zusätzlich viel höheren Extinktionskoeffizienten der zu untersuchenden Protein-Farbstoff-Verbindung kann die Proteinkonzentration anhand der Zunahme der Absorption bei 595 nm gegenüber dem freien Farbstoff bei 470 nm photometrisch bestimmt werden. Vor Beginn der Messungen wurde das Photometer mit einer BSA-Verdünnungsreihe kalibriert. Bradford-Reagenz wurde 1:5 in dH₂O verdünnt und in jede Küvette 39 µl dH₂O vorgelegt. Anschließend wurden 160 µl der Bradford-Verdünnung dazu pipettiert. Nach gründlichem Mischen auf dem Vortexmixer wurde jeweils 1 µl des Gesamtzellextrakt in die Küvette gegeben. Als Nullwert diente hierbei der RIPA-Puffer. Die Messung im Photometer erfolgte schließlich nach 5 minütiger Inkubation und nachfolgendem Mischen auf dem Vortexmixer, hierbei wurde jede Probe dreimal vermessen. Für die endgültige Konzentration wurde der Mittelwert bestimmt.

4.4.3. SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Um definierte Proteinbanden aus Proteinlysaten aufzutrennen, wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Für die Proteinauftrennung wurden gebrauchsfertige Novex® 4-12 % Bis-Tris Gele (1 mm) aus dem NuPAGE® Elektrophoresesystem verwendet. Die Probenaufbereitung wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Proben mit der vorher bestimmten Proteinkonzentration von 50 µl in NuPAGE® *LDS Sample Buffer* (4x) sowie NuPAGE® *Reducing Agent* (10x) aufgenommen und auf insgesamt 10, 20 oder 30 µl Gesamtvolumen verdünnt, je nach Menge des vorab bestimmten Proteingehalts der Proben. Für die vollständige Proteinreduktion und -denaturierung in den Proben wurden die Probenansätze nach deren Zusammenstellung für 10 min bei 70 °C erhitzt. Anschließend wurden die Gele in Gelkammern gespannt und diese mit dem Laufpuffer aufgefüllt. Es erfolgte nun das vorsichtige Beladen der Geltaschen sowie die zusätzliche Auftragung von 5 µl des Proteinmarkers SeeBlue® *Plus2 Pre-Stained Standard* (Trennbereich 191-14 kDa), um das Molekulargewicht der getrennten Proteine bestimmen zu können. Die elektrophoretische

Proteinseparierung wurde für 90-120 min bei 4 °C durchgeführt, hierbei wurde bei einer Stromstärke von 113 mA eine Spannung von 200 V angelegt.

4.4.4. Western Blot

Nachdem die Proteine wie unter 4.4.3 beschrieben separiert wurden, erfolgte der Western Blot Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit 0,45 µm Porengröße. Nachdem das Gel vorsichtig aus der Verschaltung gelöst wurde, erfolgte die Beladung des Gelkammer XCell II™ Blot Moduls gemeinsam mit in Transferpuffer getränkten Schwämmen und Filterpapier. Der Proteintransfer erfolgte für 120 min bei 4 °C, 60 V und 340 mA, sofern zwei Gele gleichzeitig transferiert wurden. Beim Transfer von nur einem Gel auf die Nitrozellulose wurden Spannung und Stromstärke auf 30 V bzw. 170 mA halbiert. Um den erfolgreichen Proteintransfer zu kontrollieren, erfolgte die Anfärbung der Nitrozellulose mit Ponceau S. Die Proteinbanden der Marker wurden zur Übersicht nachgezeichnet. Anschließend erfolgte die Entfärbung der Membran mit PBS-Tween.

4.4.5. Immundetektion fixierter Proteine

Um sämtliche Proteinbindungsstellen der Proben zu sättigen, wurde in PBS-Tween verdünntes 5 % bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Das Blocken der Proteinbindungsstellen wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Nach der Inkubation mit BSA wurde die Membran in PBS-Tween gewaschen. Die Konzentrationen von Primär- und Sekundärantikörper wurden wie in Tabelle 4 beschrieben eingesetzt.

Tabelle 4. Eingesetzte Antikörper mit Verdünnungen zur Detektion fixierter Proteine auf Nitrozellulosemembranen sowie in immunhistologischen Färbungen.

Primärantikörper	Wirt	Verdünnung
HSP27	Maus	1:1000
HSP70/72	Maus	1:1000
HSP90	Maus	1:200
β-Aktin	Kaninchen	1:7000
Sekundärantikörper	Wirt	Verdünnung
Anti-Maus IgG HRP-konjugiert	Ziege	1:10000
Anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert	Ziege	1:10000

Sämtliche Antikörper wurden in 0,5 % BSA in PBS-Tween verdünnt. Der Primärantikörper wurde bei 4 °C für 60 min auf einem Schüttler inkubiert. Die zu den Primärantikörpern komplementären Sekundärantikörper wurden ebenfalls für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Membranen jeweils dreimal für 10 min mit PBS-Tween gewaschen, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Nach einem finalen Waschgang folgte dann die Detektion der Proteine mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion. Hierfür wurden jeweils Lösung A und B der verwendeten Chemilumineszenzlösungen im Verhältnis 1:1 vermischt und lichtgeschützt mit der Nitrozellulosemembran für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die behandelten Membranen in eine Filmkassette gelegt und in der Dunkelkammer mit zugeschnittenen Filmen bedeckt. Die Belichtungszeiten betragen 5-10 min für das SuperSignal West Pico bzw. 15-30 sec für das SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrat. Die Chemilumineszenz wurde nach dem Entwickeln als schwarzgefärbter Bereich auf dem Film sichtbar.

4.5. Molekularbiologische Methoden

4.5.1. Totale RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Um die Tumorzellen der *ex vivo*-Biopsien wie unter 4.1 und der *in vitro* Proben wie unter 4.3.1 beschrieben auch auf Genomebene zu untersuchen und gewünschte Informationen in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) quantifizieren zu können, ist es vorerst erforderlich, die zu untersuchenden Zellbestandteile, in diesem Fall die RNA, aus der Zelle zu extrahieren. Für diese Extraktion wurden die *ex vivo* Tumorproben zuerst in 1 ml TRIzol Reagenz in einem TissueLyser für 2 x 2 min. homogenisiert. Die Zellen, die aus der Zellkultur gewonnen worden waren, wurden behutsam mit DPBS gewaschen, vorsichtig mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und anschließend für 5 min bei 300 x g sedimentiert. Für die folgende RNA-Isolation wurde das Pellet nun in 1 ml TRIzol Reagenz aufgelöst. Die Total-RNA aus den Tumorproben und aus den kultivierten Zellen wurde aus den TRIzol-Lysaten entsprechend der Instruktionen des Herstellers aufgereinigt. Nach der

Ausfällung wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die für die Amplifizierung der gewünschten Genominformationen benötigte cDNA wurde aus 1 µg totaler zellulärer RNA mit Oligo-dT-Nukleotid- und *random* Hexamer-Oligonukleotid-Primern sowie der iScript Reverse Transkriptase entsprechend der Herstellerangaben synthetisiert. Zur Konzentrationsbestimmung von RNA und cDNA wurde der NanoDrop verwendet. Die cDNA-Lösungen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C, die RNA-Stocks bei -80 °C verwahrt.

4.5.2. Methodik der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein hochakkurates Verfahren, um vorab definierte Abschnitte der DNA gezielt zu amplifizieren. Genau wie bei der Replikation *in vivo* sorgt eine DNA-Polymerase für die Synthetisierung des Komplementärstrangs zum gewünschten DNA-Abschnitt. Die extrem hohe Vervielfältigungsrate wird durch mehrfache Wiederholungen der einzelnen Teilschritte erreicht. Spezifische Oligonukleotid-Primer als Startpunkte für die DNA-Polymerase definieren Anfang und Ende des gewünschten Bereichs. Um die Polymerisation zu gewährleisten, müssen zudem Substrate, also die desoxydierten Nukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP, hinzugefügt werden. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) sorgt schließlich für die Polymerisation der Nukleotide zum komplementären Strang des DNA-Abschnitts. In aufeinanderfolgenden Schritten bei unterschiedlichen Temperaturen wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten (Denaturierung), werden die Oligonukleotid-Primer an ihre Bindungsstellen hybridisiert (*Annealing*) und die komplementären Stränge in Richtung 5'-Ende synthetisiert (Elongation). Der gewünschte DNA-Abschnitt ist somit verdoppelt und der Zyklus kann von vorne beginnen, bis genügend DNA vervielfältigt wurde.

4.5.3. Real-Time-quantitative-PCR

Für die Durchführung der RT-qPCR wurden jeweils 100 ng cDNA mit dem entsprechenden Qiagen Primer Assay sowie dem MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay vermischt. Als Qualitätskontrolle und *housekeeping gene* wurde β -Aktin verwendet. Die Laufbedingungen für die

Aktivierung der MeteorTaq lagen bei 95 °C für 5 min, gefolgt von der Denaturierung bei 95 °C für 15 sec, Primerhybridisierung bei 60 °C für 20 sec und der Elongation bei 72 °C mit 40 Zyklen à 40 sec. Die RT-qPCR wurde mit Hilfe des Bio-Rad DNA Engine Opticon 2 Two-Color Real-Time PCR Detection System durchgeführt, die HSP-Expression wurde semiquantitativ mit Hilfe der Ratio des Expressionsgrades in der Probe gegen die durchschnittliche Expression in allen Proben ermittelt. Der *fold change*, der relative Quantifikationswert, wurde als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ausgedrückt. Humane Kolon PCR Ready First Strand cDNA wurde von BioChain bezogen und als Kontrolle für die Patientenbiopsien verwendet.

4.6. Immunhistochemie und Immunzytochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Kryo-Schnitte der in Tissue-Tek® konservierten Proben hergestellt. Für die Zytospinaufbereitung wurden die Zellen nach der jeweiligen Regenerationszeit (30 min oder 12 h) abgeerntet. Dies erfolgte atraumatisch mittels Inkubation der Zellen mit 1 % EDTA in PBS für 15 min bei Raumtemperatur sowie der anschließenden Inkubation mit enzymfreier Zelldissoziationslösung für 10 min bei 37 °C. Die Zytospin-Präparate wurden durch Zentrifugation von je 50 µl Zellsuspension (1×10^5 Zellen/ml) bei 550 rpm für 1 min in einer Zytocentrifuge hergestellt. Die Objektträger wurden nach Zentrifugation luftgetrocknet für mindestens 1 h und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung zwischengelagert. Die *slides* und Schnitte wurden im nächsten Arbeitsschritt für 10 min in Aceton fixiert, nachfolgend mit PBS gewaschen und dann in 0,3 % H₂O₂ für 5 min inkubiert. Die HSP-Primärantikörper wurden in den in Tabelle 4 dargestellten Verdünnungen über Nacht bei 4 °C appliziert, der an Meerrettichperoxidase gebundene Sekundärantikörper wurde am folgenden Tag für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die finalen Färbungen der Objektträger wurden dann mit 3,3'-Diaminobenzidin für 8 min durchgeführt. Als Gegenfärbung diente Hämatoxylin. Die Fixierung erfolgte schließlich mit Deckplättchen und Glycergel® Deckmedium.

5. Ergebnisse

5.1. Ex vivo Analysen der Patienten mit Peritonealkarzinose

In ex vivo Voruntersuchungen wurden Biopsien vor (prä) und nach (post) HIPEC-Therapie von Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht. Jeweils unmittelbar vor und nach der HIPEC wurde das Tumorgewebe entnommen. Bei Temperaturen von 41-43 °C betrug die Dauer der hyperthermen Perfusion mit Zytostatika jeweils ca. 60 min. In verschiedenen Untersuchungen wurden sowohl die Gen- als auch die Proteinexpression von HSP27, HSP72 und HSP90 sowohl vor als auch nach der HIPEC analysiert.

5.1.1. Veränderte HSP-Genexpression post HIPEC-Therapie

Mithilfe der RT-qPCR wurde das Expressionsniveau von HSP27, HSP72 und HSP90 analysiert. Die Normalisierung erfolgte anhand der Werte aus Kolon-Normalgewebe.

HSP90 zeigte bereits vor der HIPEC eine Überexpression in sämtlichen Biopsien. Die relative Expression von HSP90 stieg in allen Tumorentitäten nach der HIPEC auf ein hohes Niveau an, in vier von acht Tumoren auf über das 20-fache der Kontrollprobe (Abbildung 4).

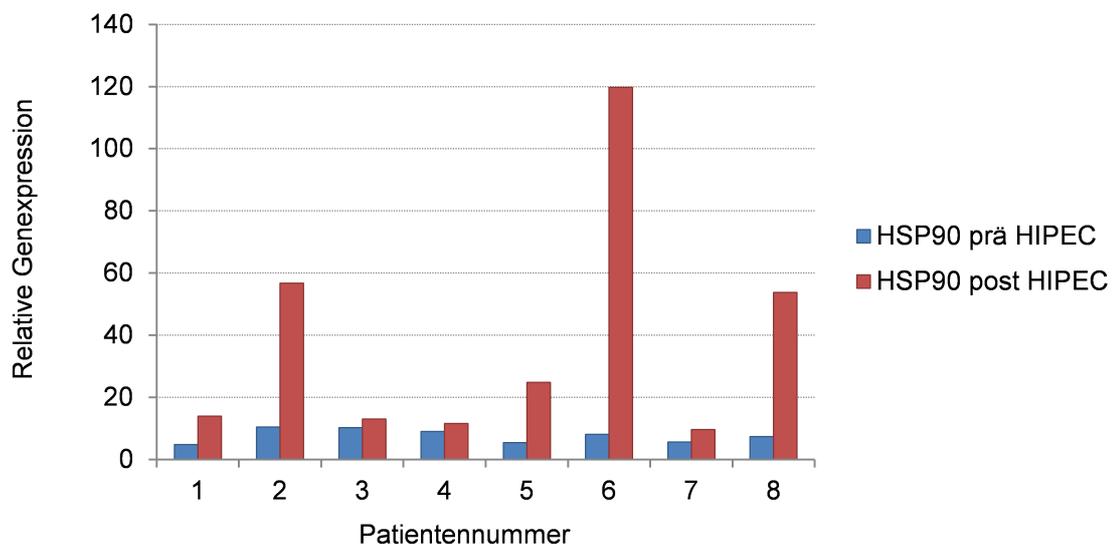


Abbildung 4. Relative Genexpression von HSP90 prä und post HIPEC-Therapie.

Im Gegensatz zu HSP90 wurden HSP27 und HSP72 vor der HIPEC auf mRNA-Ebene nur schwach exprimiert. Nach der HIPEC zeigte sich ein Anstieg der Expression von HSP27 nur in der Hälfte der untersuchten Tumoren, verglichen mit der Genexpression vor der HIPEC-Therapie (Abbildung 5).

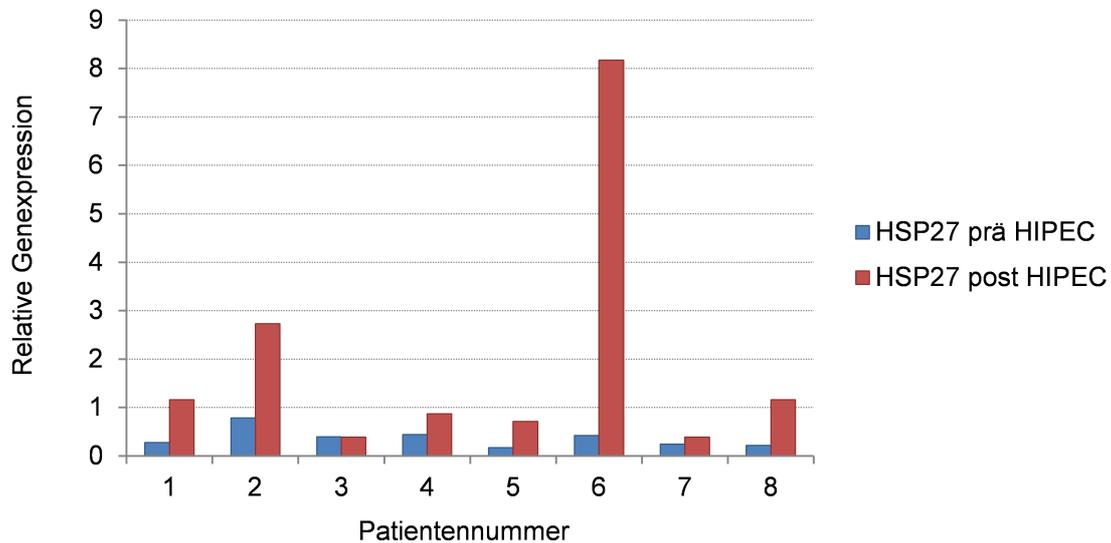


Abbildung 5. Relative Genexpression von HSP27 prä und post HIPEC-Therapie.

Auch HSP72 wurde vor der HIPEC in sämtlichen Proben nur schwach exprimiert, nach der HIPEC zeigten sich jedoch stark erhöhte Level von HSP72 mRNA in fast allen untersuchten Tumorentitäten (Abbildung 6).

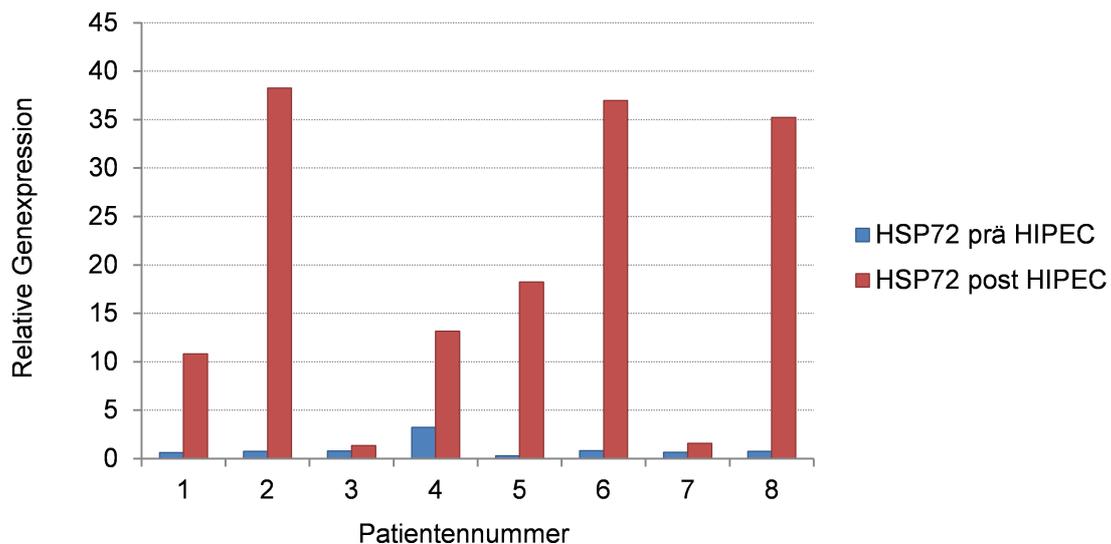


Abbildung 6. Relative Genexpression von HSP72 prä und post HIPEC-Therapie.

In einer Übersicht mit einer Skalierung der relativen HSP-Expression zeigen sich also stark erhöhte mRNA-Expressionslevel nach der HIPEC bei HSP72 und HSP90 sowie nur mäßige oder nahezu keine Erhöhung der Expression bei HSP27 (Tabelle 5).

Tabelle 5. Patienten mit Peritonealkarzinose und unterschiedlichen Primärtumoren, die sich einer CRS und anschließender HIPEC unterzogen. Die HSP-Expression wurde prä und post HIPEC-Therapie bestimmt.

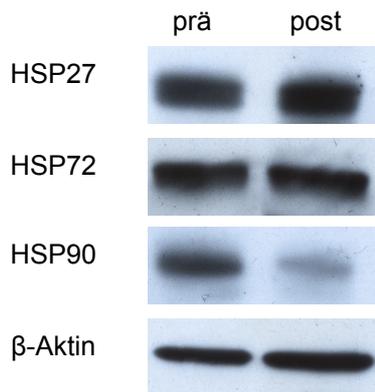
Patientennummer	Primärtumor	HSP27		HSP72		HSP90	
		prä	post	prä	post	prä	post
		HIPEC		HIPEC		HIPEC	
1	Appendix	-	+	-	+++	+	+++
2	Mesotheliom	-	+	-	++++	+++	++++
3	Magen	-	-	-	+	+++	+++
4	Ovar	-	-	+	+++	++	+++
5	Appendix	-	-	-	+++	++	++++
6	Pankreas	-	++	-	++++	++	++++
7	Appendix	-	-	-	+	++	++
8	Mesotheliom	-	+	+	++++	++	++++

Relative HSP-Expression: - ≤ 1; + > 1; ++ > 5; +++ > 10; ++++ > 20.

5.1.2. Veränderte HSP-Proteinexpression post HIPEC-Therapie

In Western Blot Analysen wurden die intraoperativ entnommenen Biopsien prä und post HIPEC bezüglich ihrer HSP-Expressionen untersucht. Es wurden wie in den Genanalysen die drei HSP27, HSP72 und HSP90 hinsichtlich ihrer Expressionsunterschiede analysiert. β -Aktin diente hierbei als Laufkontrolle. In allen untersuchten Tumoren zeigten sich mit wenigen Ausnahmen deutliche Expressionsänderungen im Vergleich prä und post HIPEC-Therapie. Eine einheitliche Tendenz bezüglich Expressionsverstärkung oder -abschwächung war nicht zu beobachten (Abbildungen 7-10).

Patient 1 (Appendix, Adenokarzinom)



Patient 2 (Peritoneales Mesotheliom)

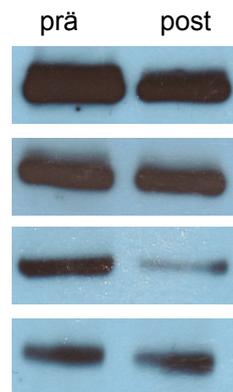
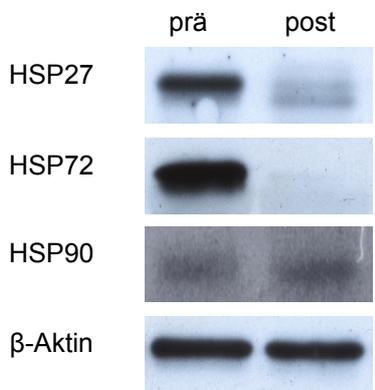


Abbildung 7. Proteinexpressionen (Western Blot) *ex vivo* prä und post HIPEC-Therapie bei Patienten 1 und 2.

Patient 3 (Magen, Siegelringzellkarzinom)



Patient 4 (Ovarialkarzinom)

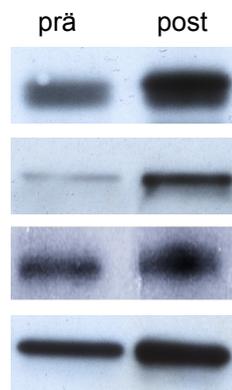
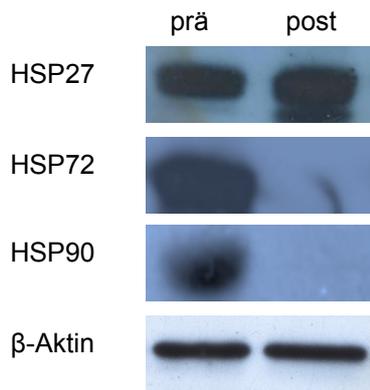


Abbildung 8. Proteinexpressionen (Western Blot) *ex vivo* prä und post HIPEC-Therapie bei Patienten 3 und 4.

Patient 5 (Appendix, Adenokarzinom)



Patient 6 (Pankreas, Adenokarzinom)

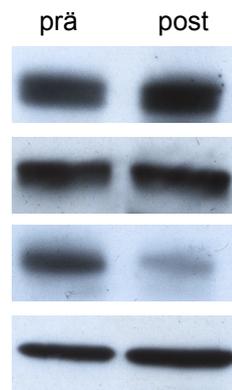
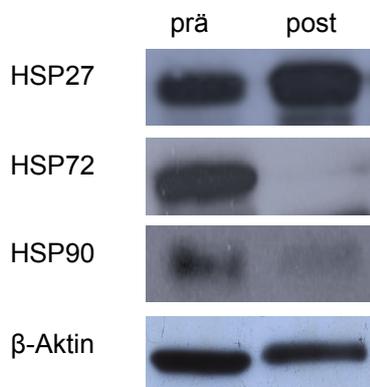


Abbildung 9. Proteinexpressionen (Western Blot) *ex vivo* prä und post HIPEC-Therapie bei Patienten 5 und 6.

Patient 7 (Karzinoid der Appendix)



Patient 8 (Peritoneales Mesotheliom)

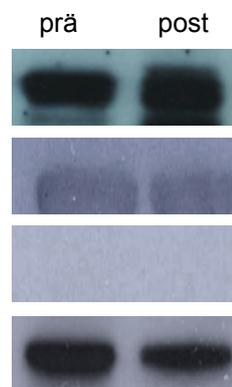


Abbildung 10. Proteinexpressionen (Western Blot) *ex vivo* prä und post HIPEC-Therapie bei Patienten 7 und 8.

5.2. Das Hyperthermie *in vitro* Modell

Basierend auf den *in vivo* Bedingungen der HIPEC-Therapie und zu deren möglichst genauer Imitation wurde das Hyperthermie *in vitro* Modell entwickelt und etabliert. Um die reinen Hyperthermieeffekte auf die Tumorzellen zu analysieren, wurden diese, analog den Bedingungen während der HIPEC, für 1 h mit dem erwärmten Zellmedium in einem Schüttelwasserbad und anschließend mit Normalmedium bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Aufgrund der Möglichkeit einer Temperaturmodifizierung kann der Effekt dieser Temperaturerhöhung isoliert betrachtet werden. Da ebenfalls die Regenerationszeiten im Brutschrank nach der Hyperthermieexposition verändert werden können, lassen sich außerdem kurz- und langfristige Effekte der Temperaturerhöhung auf die HSP-Expression beobachten und beschreiben.

5.2.1. Veränderte HSP-Genexpression in HT-29 Zellen nach *in vitro* induzierter Hyperthermie

Um den Einfluss der Hyperthermie während der HIPEC-Therapie isoliert zu analysieren und von den Effekten der zytostatischen Behandlung zu differenzieren, wurden die Expressionsprofile von HSP27, HSP72 und HSP90 *in vitro* bei HT-29 Zellen vor und nach der Exposition mit verschiedenen Temperaturstufen (37, 39, 41, 43 °C) untersucht.

Schon nach einer Regenerationszeit von 30 min im Brutschrank konnten nach hyperthermem Stress mit 41 und 43 °C über 1 h gegenüber den niedrigeren Temperaturstufen 37 und 39 °C deutlich gesteigerte Transkriptionsspiegel von HSP27, HSP72 und HSP90 in der RT-qPCR-Analyse von Tumorzellen gezeigt werden (Abbildung 11). Interessanterweise waren bei allen untersuchten Temperaturen die mRNA-Spiegel von HSP72 und HSP90 auch nach 12 h Regeneration noch immer hochreguliert. Die Transkriptionsspiegel von HSP27 in den Tumorzellen zeigten sich deutlich erhöht bei allen Temperaturen in beiden Regenerationsphasen (30 min und 12 h; Abbildungen 11-13).

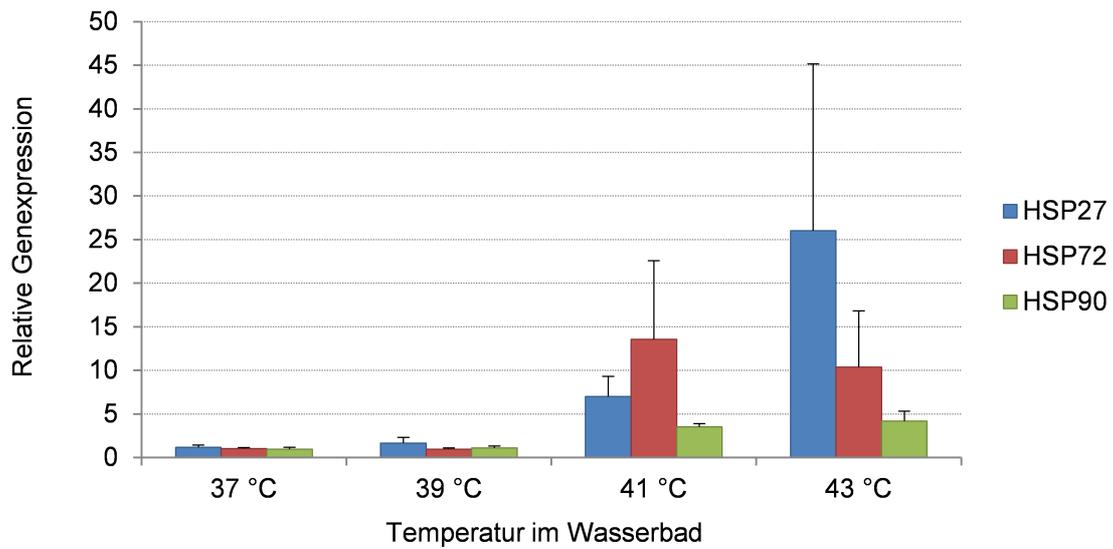


Abbildung 11. mRNA-Expression von HSP27, HSP72 und HSP90 in HT-29 Zellkulturen unter einstündiger Hyperthermie mit Temperaturen zwischen 37 und 43 °C nach einer Regenerationszeit von 30 min.

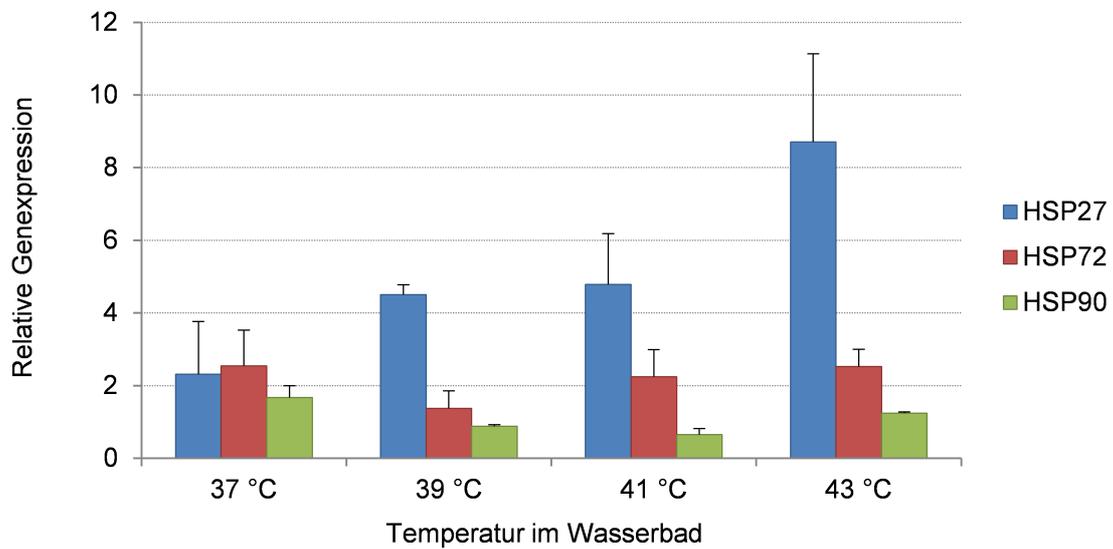


Abbildung 12. mRNA-Expression von HSP27, HSP72 und HSP90 in HT-29 Zellkulturen unter einstündiger Hyperthermie mit Temperaturen zwischen 37 und 43 °C nach einer Regenerationszeit von 12 h.

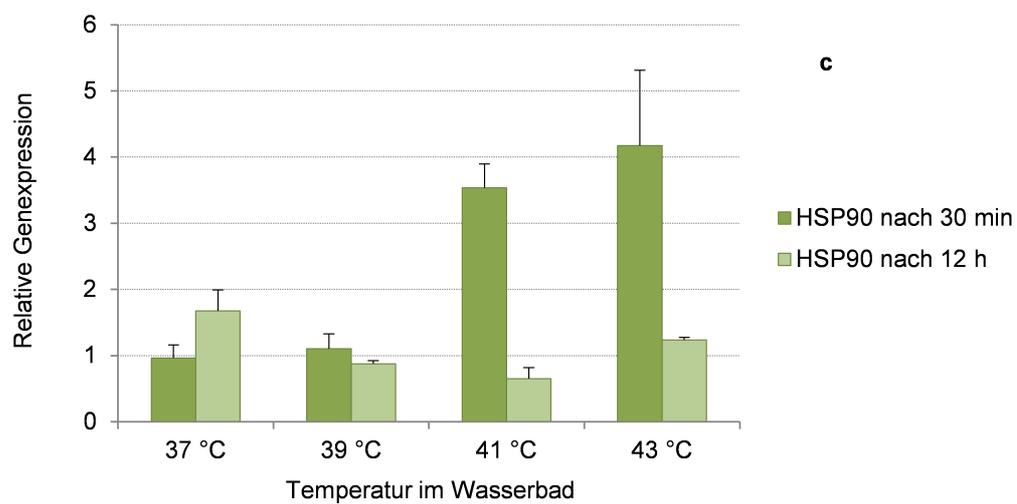
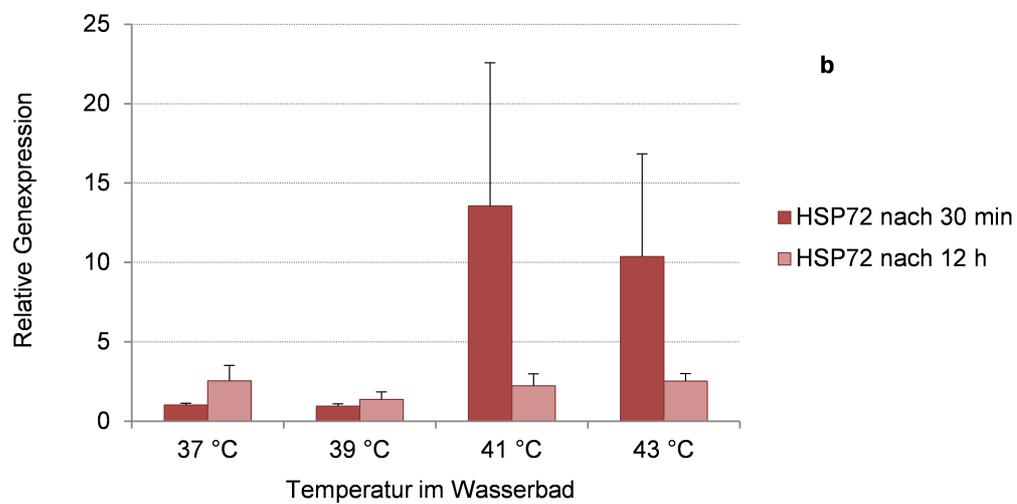
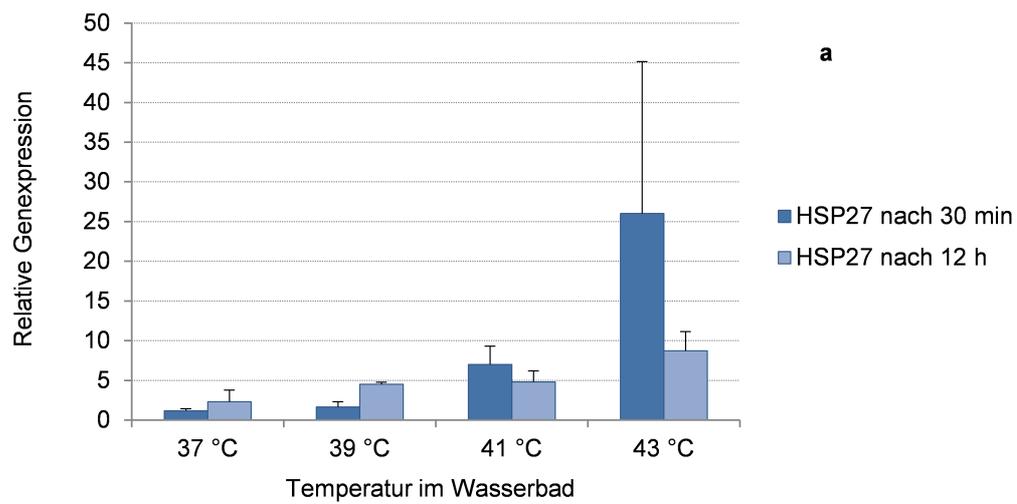


Abbildung 13. Alternative Darstellung. Temperaturinduzierte Genexpression nach 1 h Hyperthermie und Regeneration von 30 min und 12 h von HSP27 (a), HSP72 (b) und HSP90 (c).

5.2.2. Veränderte HSP-Proteinexpression in HT-29 Zellen nach *in vitro* induzierter Hyperthermie

Um auch auf Proteinebene Veränderungen der HSP-Expression bei unterschiedlichen Temperatureinflüssen zu zeigen, wurden HT-29 Zellen ebenfalls in Western Blot Analysen und immunzytochemischen Färbungen in Zytospins analysiert. In der Frühphase nach der Hyperthermieexposition (30 min nach dem hyperthermen Stress) zeigte sich HSP27 bei allen Temperaturen auf ähnlichem Proteinexpressionsniveau (Abbildung 16a). Diese Ergebnisse konnten in einer immunzytochemischen Färbung in Zytospins bestätigt werden (37 und 43 °C; Abbildung 14). Im Kontrast dazu zeigten die Western Blot Analysen bei 12 h Regenerationszeit im Brutschrank nach hyperthermem Stress deutlich gesteigerte HSP27 Proteinexpression bei 41 °C bei noch stärkerer Proteinbandenbildung bei 43 °C (Abbildung 16b). Der Vergleich der immunzytochemischen Färbungen von Tumorzellen nach 12 h Regeneration zeigten außerdem moderate bis größere Anteile HSP27-positiver Zellen bei 43 °C (Abbildung 15). Auch wenn weder im Western Blot noch in der Immunzytochemie Veränderungen bei den untersuchten HSP90 Expressionsspiegeln zu den untersuchten Zeitpunkten auszumachen waren, so zeigten sich gesteigerte HSP72-Proteinexpressionen sowohl nach 30 min als auch nach 12 h Zellregeneration bei vorherigem hyperthermen Stress (1 h bei 43 °C; Abbildungen 14-16).

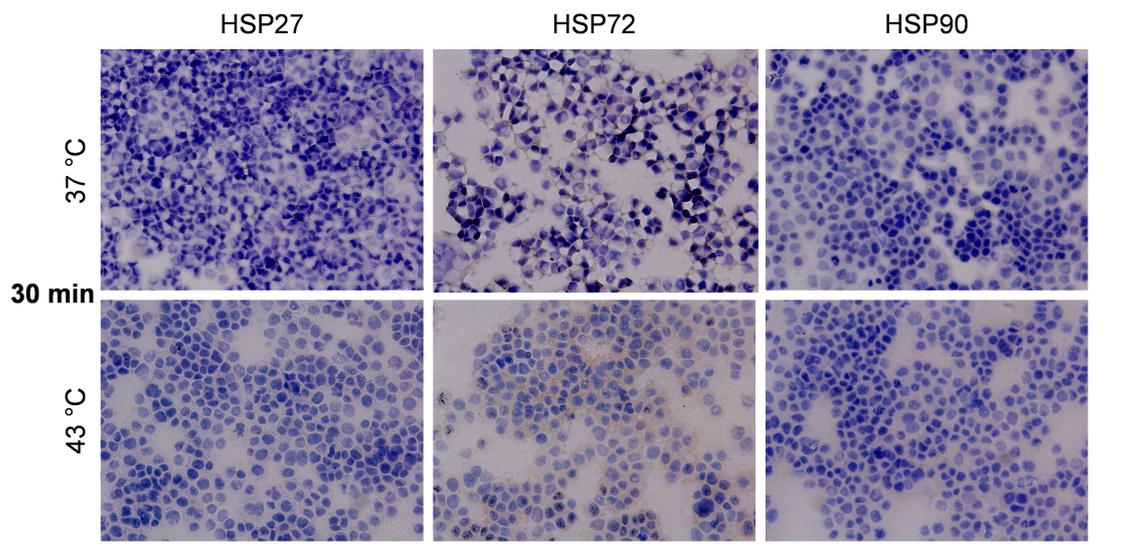


Abbildung 14. Immunzytochemische Färbungen zur Darstellung der Proteinexpressionen von HSP27, HSP72 und HSP 90 nach 30 min Regenerationsphase nach einstündiger Inkubation bei 37 versus 43 °C.

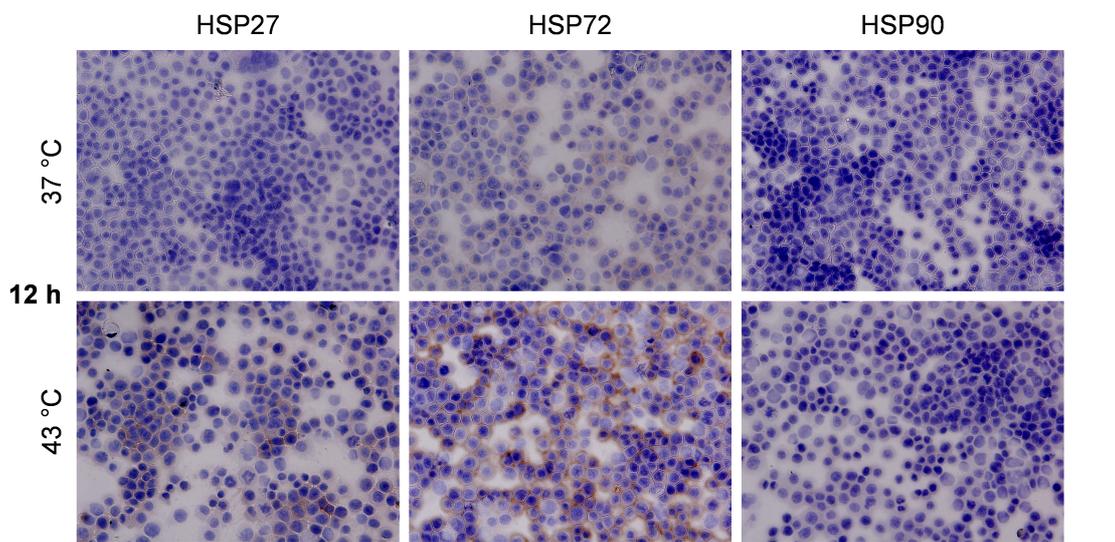


Abbildung 15. Immunzytochemische Färbungen zur Darstellung der Proteinexpressionen von HSP27, HSP72 und HSP 90 nach 12 h Regenerationsphase nach einstündiger Inkubation bei 37 versus 43 °C.

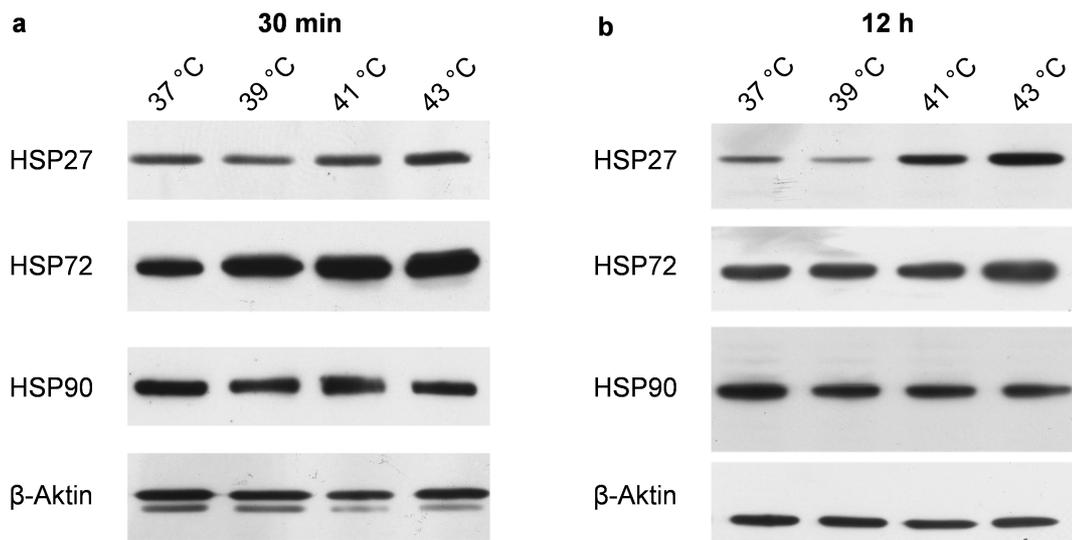


Abbildung 16. Western Blot Analysen zur Quantifizierung der Proteinexpressionen von HSP27, HSP72 und HSP 90 nach einstündiger Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (a) nach 30 min und (b) 12 h Regenerationsphase.

5.2.3. Zellproliferation und Apoptose in HT-29 Zellen nach *in vitro* induzierter Hyperthermie

Der Einfluss hyperthermen Stresses auf die Zellproliferation von Tumorzellen wurde mithilfe des MTS-Tests untersucht. Hierbei wurde die Viabilität von HT-29 Zellen in der Früh- (30 min) und Spätphase (12 h) nach Hyperthermieexposition analysiert. Zellen, die Temperaturen von 41 und 43 °C ausgesetzt wurden, zeigten eine reduzierte Zellproliferation 30 min nach hyperthermem Stress (45 vs. 60 %; Abbildung 17). Diese Abweichungen der Zellviabilität zeigte sich nicht 12 h nach Hyperthermieexposition, hier erreicht die Zellproliferation ähnliche Werte bei allen untersuchten Temperaturen (Abbildung 17).

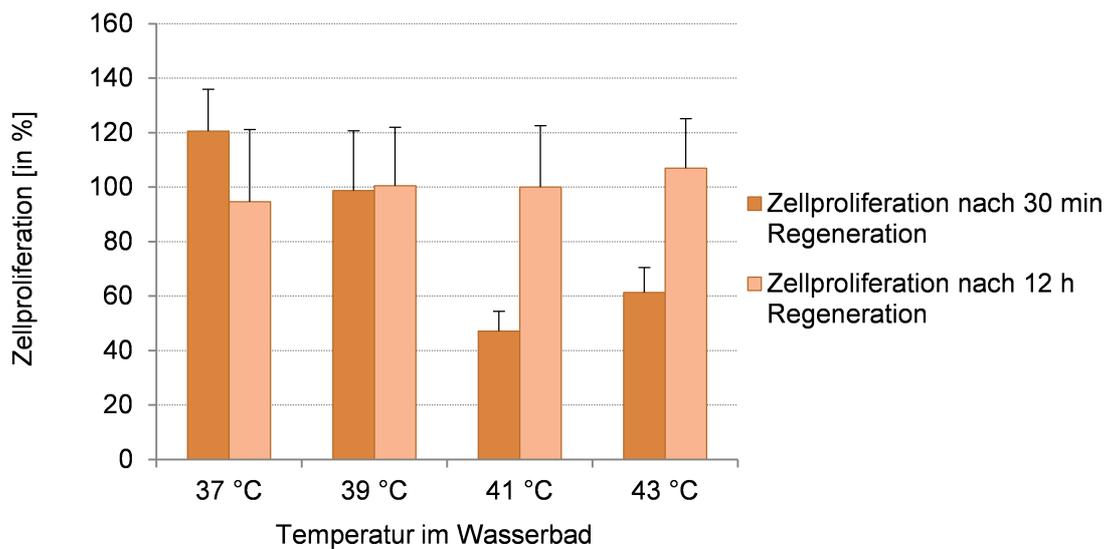


Abbildung 17. MTS-Zytotoxizitäts-Test nach einstündiger Hyperthermieexposition bei unterschiedlichen Temperaturen (37, 39, 41 und 43 °C) und nach 30 min bzw. 12 h Regenerationszeit.

Um weiterführend die Charakteristika der beobachteten Verminderung der Zellproliferationskapazität früh und spät nach hyperthermem Stress zu untersuchen, wurden zusätzlich Annexin V Apoptose-Tests durchgeführt. Verglichen mit den Kontrollen bei 37 °C wurden mehr nekrotische (34,0 vs. 45,3 %) und apoptotische Zellen (9,0 vs. 11,3 %) bei 41 °C beobachtet (Abbildung 18). Nekrose- und Apoptoserate der Tumorzellen nahmen nach kurzzeitiger Regeneration (30 min) bei 43 °C im direkten Vergleich mit 41 °C wieder ab (nekrotische Zellen 41,0 vs. 45,3 % und apoptotische Zellen 2,9 vs. 11,3 %; Abbildung 18). Die höchste Apoptose- und Nekroserate der Tumorzellen zeigte sich somit bei 41 °C nach kurzer Regenerationsphase von 30 min (Abbildung 18, Tabelle 6). Die Untersuchungen nach langzeitiger (12 h) Regenerationsphase der Tumorzellen zeigten sogar eine weitere Verschiebung der Apoptose- und Nekrosemaxima auf 39 °C. Mit einer Nekroserate von 42,1 % und Apoptoserate von 7,8 % wurden die Werte der höheren Temperaturen deutlich übertroffen (29,4 % Nekrose und 2,9 % Apoptose bei 41 °C respektive 35,7 % Nekrose und 4,3 % Apoptose bei 43 °C; Abbildung 19, Tabelle 7).

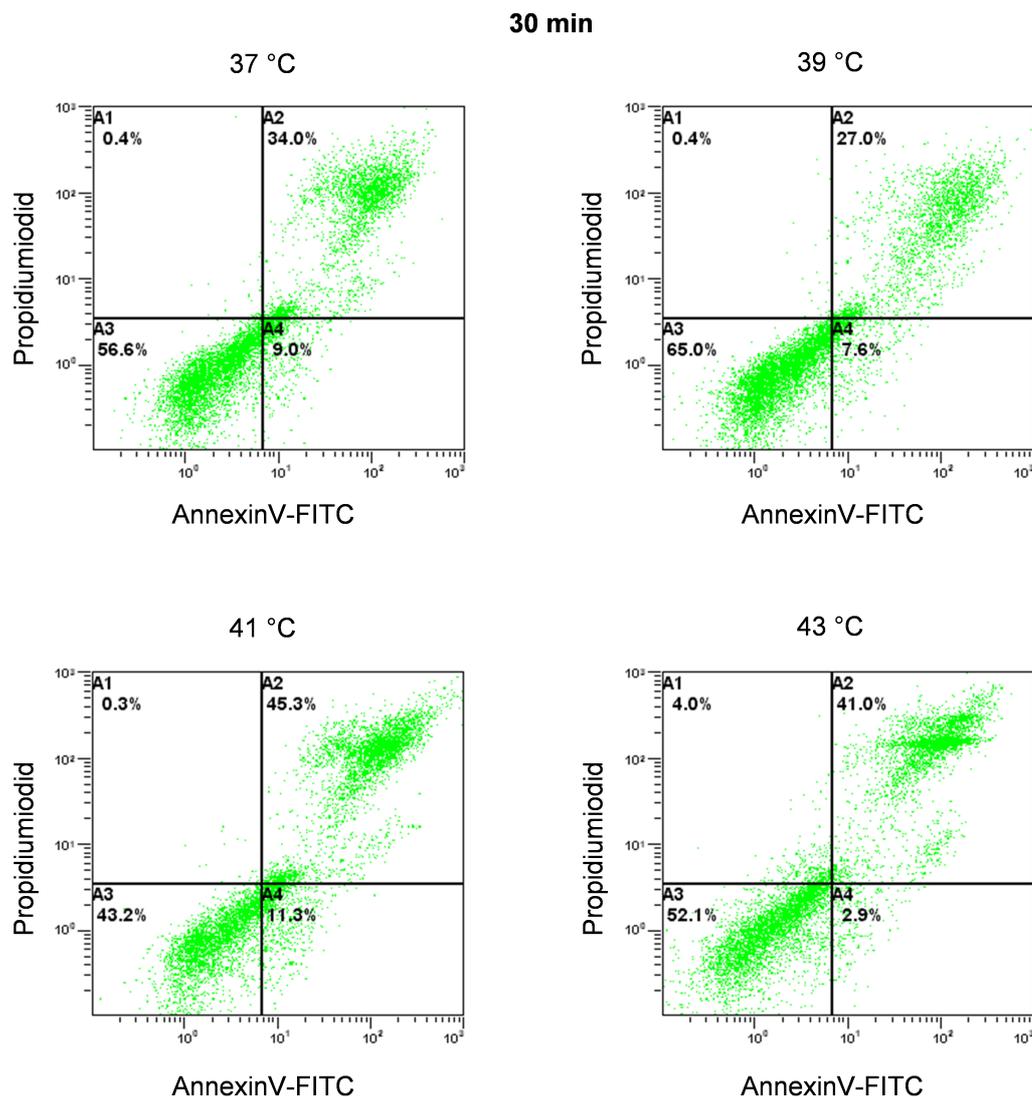


Abbildung 18. Apoptose-Tests in HT-29 Zellen 30 min nach Hyperthermieexposition in der Färbung mit AnnexinV und Propidiumiodid. AnnexinV-positive Zellen werden als apoptotisch (unten rechts), AnnexinV- und PI-positive Zellen als nekrotisch (oben rechts) und AnnexinV- und PI-negative Zellen als viabel identifiziert (unten links).

Tabelle 6. Übersicht der Apoptose- und Nekroseraten von HT-29 Kolonkarzinomzellen nach 1 h Hyperthermie unter verschiedenen Temperaturen (37, 39, 41, 43 °C) und nach 30 min Regenerationszeit im Brutschrank.

	1 h Hyperthermie	Anteil apoptotischer Zellen	Anteil nekrotischer Zellen	Gesamtanteil geschädigter Zellen
30 min Regeneration	37 °C	9,0 %	34,0 %	43 %
	39 °C	7,6 %	27,0 %	34,6 %
	41 °C	11,3 %	45,3 %	56,6 %
	43 °C	2,9 %	41,0 %	43,9 %

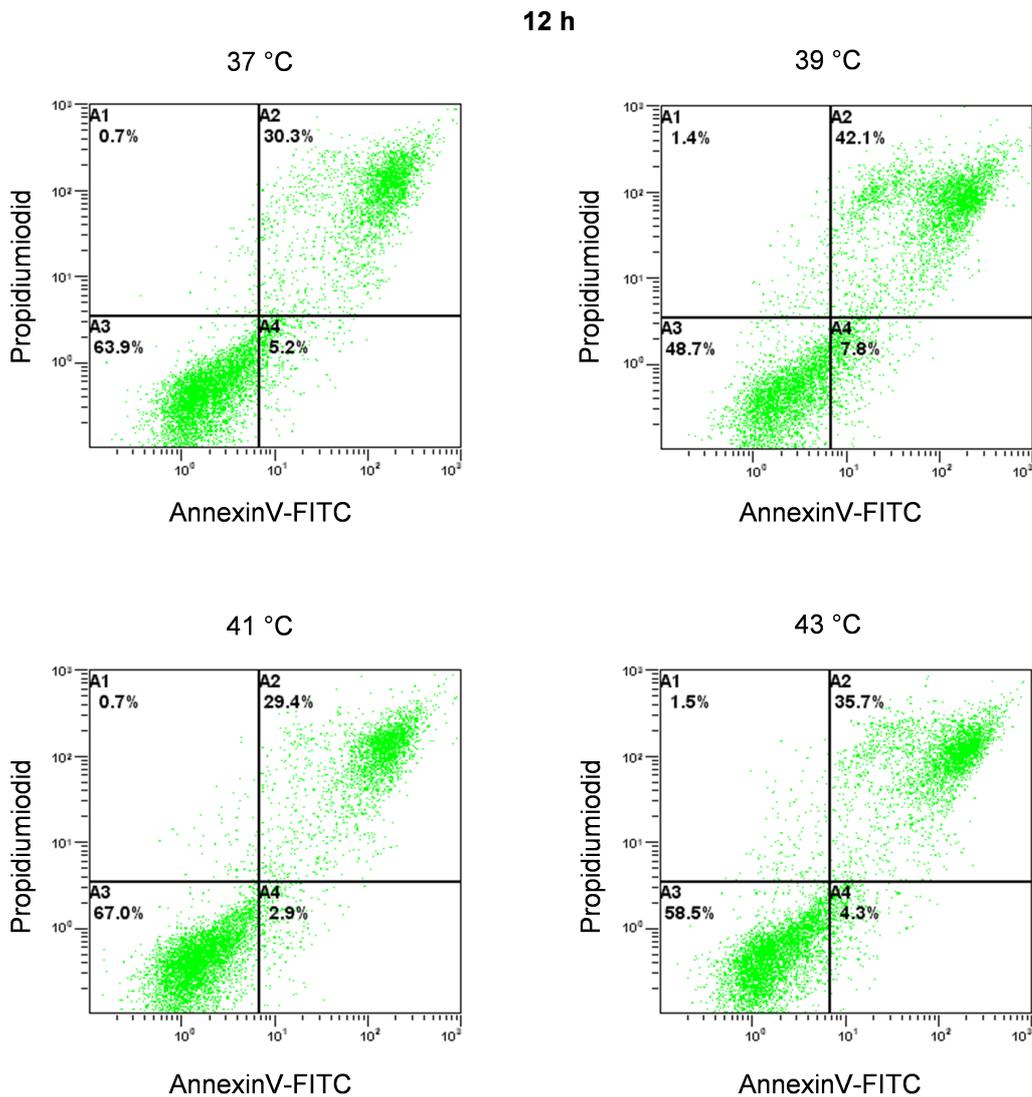


Abbildung 19. Apoptose-Tests in HT-29 Zellen 12 h nach Hyperthermieexposition in der Färbung mit AnnexinV und Propidiumiodid. AnnexinV-positive Zellen werden als apoptotisch (unten rechts), AnnexinV- und PI-positive Zellen als nekrotisch (oben rechts) und AnnexinV- und PI-negative Zellen als viabel identifiziert (unten links).

Tabelle 7. Übersicht der Apoptose- und Nekroseraten von HT-29 Kolonkarzinomzellen nach 1 h Hyperthermie unter verschiedenen Temperaturen (37, 39, 41, 43 °C) und nach 12 h Regenerationszeit im Brutschrank.

	1 h	Anteil	Anteil	Gesamtanteil
	Hyperthermie	apoptotischer Zellen	nekrotischer Zellen	geschädigter Zellen
12 h Regeneration	37 °C	5,2 %	30,3 %	35,5 %
	39 °C	7,8 %	42,1 %	49,9 %
	41 °C	2,9 %	29,4 %	32,3 %
	43 °C	4,3 %	35,7 %	40,0 %

6. Beantwortung der Fragen

1. Kommt es bei Peritonealkarzinose-Patienten nach HIPEC zu einer Veränderung der HSP-Expression in verschiedenen Tumorentitäten?

Insbesondere bei den Heat Shock Proteinen HSP72 und HSP90 kommt es bereits eine Stunde nach der HIPEC-Therapie nachweisbar zu einer deutlich erhöhten Genexpression auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Tumorentitäten. Bei HSP27 kommt es in der Hälfte der untersuchten Tumorproben zu einer Genexpressionssteigerung.

Auf Proteinebene im Western Blot konnte keine einheitliche regelmäßige Expressionsveränderung beobachtet werden, vermutlich bedingt durch den erst verzögerten Einsatz von Translation und Transkription der HSP sowie Hyperthermie-bedingte direkte Denaturierung von Proteinen.

2. Welchen Einfluss hat der isolierte Hyperthermieeffekt auf die HSP-Expression im Kolonkarzinom *in vitro*?

Bei Hyperthermieexposition von HT-29 Zellen *in vitro* kommt es sowohl nach kurzer (30 min) als auch nach längerer (12 h) Regenerationsphase zu einer gesteigerten HSP-Expression aller drei untersuchter Heat Shock Proteine HSP27, HSP72 und HSP90.

3. Sind bezüglich der gewählten Temperatur der einstündigen Hyperthermie *in vitro* unterschiedliche Effekte auf die HSP-Expression zu erkennen und ist eine zeitliche Kinetik sichtbar?

Mit Ausnahme der HSP72-Expression nach 30 min Regeneration liegen die Expressionsmaxima der untersuchten HSP bei kurzer und längerer Regenerationszeit bei der höchsten gewählten Temperatur von 43 °C, sofern grundsätzlich eine Expressionsveränderung mit Temperaturerhöhung stattfand.

Es kommt also folglich bei unterschiedlich gewählten Temperaturen auch zu unterschiedlichen Expressionsspiegeln.

Am deutlichsten wirkt sich der Hyperthermieeffekt auf HSP27 aus. Hier kommt es nach 30 min und 12 h Regeneration zur stärksten Expressionssteigerung mit Erhöhung der Temperatur im Vergleich aller untersuchter Proteine. HSP72 und HSP90 reagieren insbesondere nach kurzer Regenerationszeit ebenfalls mit einer Expressionssteigerung bei ansteigenden Temperaturen, jedoch in geringerem Ausmaße als HSP27. Während HSP27 auch nach 12 h Regeneration noch immer mit einer deutlichen Expressionssteigerung auf die Temperaturerhöhungen reagiert, kommt es bei HSP72 und HSP90 nur noch zu einer minimalen Steigerung der Expression.

4. Welchen Effekt haben die gewählten Temperaturen und Regenerationszeiten nach der Hyperthermie auf die Proliferation und Apoptose von HT-29 Kolonkarzinomzellen?

Der höchste antiproliferative Effekt auf die HT-29 Tumorzellen zeigt sich nach kurzer (30 min) Regeneration bei 41 °C. Hier ist die Proliferationsaktivität der Zellen im Vergleich zur Normothermie auf ca. 45 % abgesenkt. Auch bei 43 °C zeigt sich nach kurzer Regeneration noch eine Minderung der Proliferation, jedoch mit ca. 60 % interessanterweise wieder aktiver als im Vergleich mit 41 °C.

Bereits nach 12 h Regeneration befinden sich die Zellen bezüglich der Proliferation wieder auf Normalniveau. Sämtliche antiproliferativen Effekte der Hyperthermie scheinen sich unter optimalen Kulturbedingungen wieder zu normalisieren.

Die apoptose- und nekroseinduzierenden Effekte der Hyperthermie zeigen sich in ihrem größten Ausmaß interessanterweise nicht bei der höchstgewählten Temperatur von 43 °C. Nach kurzer Regenerationszeit von 30 min liegen die höchsten Apoptose- und Nekroseraten, wie aufgezeigt, bei 41 °C, und nach 12 h Zellregeneration überraschend bei nur mäßiger Temperaturerhöhung von 39 °C.

7. Diskussion

7.1. Verstärkte Expression von Heat Shock Proteinen in peritoneal metastasierten Tumoren nach HIPEC-Therapie

In den Expressionsanalysen vor und insbesondere nach der HIPEC-Therapie wurden deutliche Veränderungen der Genexpression von Heat Shock Proteinen bei allen drei untersuchten Stressproteinen festgestellt (5.1.1). Insbesondere HSP72 und HSP90 zeigten bei den meisten der fünf untersuchten Tumorentitäten deutlich verstärkte Expressionsmuster nach der hyperthermen Chemoperfusion. Hierbei kommt es interessanterweise entitätsübergreifend zu einer teils massiv verstärkten Genexpression der HSP nach einer definierten Stresseinwirkung in Form von Hyperthermie und Zytostatika, was für eine konstitutive Zellschutzreaktion der Tumorzellen spricht.

Die Proteinanalysen im Western Blot zeigten anders als die Untersuchungen auf mRNA-Ebene eine weitgehend unregelmäßige und unsystematische Veränderung der HSP-Expressionen nach der HIPEC-Therapie. Hierbei kam es in einigen Tumorentitäten zu einer Verminderung der Proteinexpression nach HIPEC, andere Tumorproben wiesen eine verstärkte Expression in den Biopsien nach HIPEC auf, während ebenfalls Gewebe untersucht wurde, das keine Veränderung im HSP-Expressionsmuster zeigte (5.1.2). Auch innerhalb einer HSP-Familie ließ sich kein eindeutiges Expressionsschema vor und nach HIPEC-Therapie erkennen. Bis ein intrazelluläres Protein funktionsfähig und in Proteinanalysen suffizient nachweisbar ist, muss das entsprechende Gen erst transkribiert und translatiert werden. Da die Biopsien verfahrensbedingt unmittelbar nach der HIPEC entnommen werden mussten, war zu diesem Zeitpunkt möglicherweise noch nicht der gesamte Zellschutz im Sinne einer vollständigen oder verstärkten HSP-Synthese möglich, so dass eine erhöhte Expression der Proteine vermutlich erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar wäre. Eine andere Ursache für den teilweise fehlenden Nachweis einer verstärkten Proteinexpression unmittelbar nach HIPEC-Therapie könnte

ebenfalls die durch die Hyperthermie induzierte direkte Denaturierung von extra- und intrazellulären Proteinen sein.

Mehrere Studien belegen eine Korrelation zwischen einer HSP-Überexpression und einer schlechteren klinischen Prognose sowie der Ausbildung von Chemotherapieresistenzen in Tumorzellen.^{74,80-83} In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumorbiopsien vor und nach HIPEC-Therapie konnte keine eindeutige Evidenz für eine Korrelation zwischen klinischem Outcome und der durch die HIPEC induzierten HSP-Überexpression gefunden werden. In Anbetracht der Vielfalt der untersuchten Tumorentitäten, der ausgewählten Patientenfälle und der eingesetzten unterschiedlichen Chemotherapeutika erscheint dies jedoch wenig verwunderlich. Eindeutig gezeigt werden konnte jedoch die durch HIPEC induzierte Hochregulierung der HSP auf mRNA-Ebene in der RT-qPCR und somit die Tatsache, dass die Tumorzellen unmittelbar auf den durch die HIPEC vermittelten externen Stress durch Hyperthermie und Zytostase reagieren. Um die hyperthermen Effekte isoliert von dem Wirken der Zytostatika zu betrachten, wurde basierend auf den Untersuchungen an humanem Gewebe vor und nach einer HIPEC das Hyperthermie *in vitro* Modell entwickelt.

7.2. Vergleich der temperaturinduzierten HSP- Expressionsänderung nach kurzer und längerer Regenerationsphase

Die intrazelluläre Hochregulierung der HSP-Expression beeinträchtigt nicht selten unabhängige thermotheapeutische Effekte wie die Induktion von Apoptose oder eine Proliferationshemmung, was die klinische Bedeutsamkeit im Rahmen einer potentiellen Tumorthherapie erklärt.⁸⁴ Die HSP27-, HSP70- und die HSP90-Familie spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der onkogenen Proteinhomöostase, indem sie ihre Funktion als Chaperone beibehalten und somit Thermotoleranz und antiapoptotische Effekte vermitteln können.^{85,86} HSP72 und HSP90 sind bedeutsam für den Apoptoseschutz von Krebszellen, folglich führt die Inhibition dieser Proteine zu verstärkter Mortalität *in vitro*.⁸⁷⁻⁹⁰ Bereits gesichert ist ebenso die Erkenntnis,

dass die Chaperone der HSP70-Familie antiapoptotische Funktionen vermitteln und zwar völlig unabhängig von HSP90. Dies geschieht zum einen über die zytosolische Verminderung der Kalziumkonzentration sowie durch die Stabilisierung von Lysosomen.^{84,91}

Im unter 4.3.1 vorgestellten Hyperthermie *in vitro* Modell zeigte sich bei denjenigen HT-29 Zellen, welche die Hyperthermie überlebten, eine initiale kurzfristige Steigerung der HSP-Genexpression nach einer Regenerationszeit von 30 min. Die Expression aller drei untersuchter HSP auf mRNA-Ebene verstärkte sich hierbei mit ansteigenden Temperaturen. Betrachtet man die Werte der relativen Genexpression, so variieren die Expressionsmaxima der untersuchten HSP im Vergleich untereinander. Den stärksten Expressionsanstieg nach 30 min Regeneration erfuhr HSP27, gefolgt von HSP72 und HSP90 mit niedrigeren Werten, eine Verstärkung der Expression mit steigenden Temperaturen war dennoch bei allen drei HSP deutlich zu erkennen. Nach 12 h Regeneration fielen die Expressionsspiegel von HSP72 und HSP90 auf Normalniveau bzw. sogar knapp darunter ab. Lediglich HSP27 zeigt weiterhin eine deutlich erhöhte Expressionssteigerung mit Erhöhung der einwirkenden Temperaturen auch noch nach 12 h (Abbildung 13). Auf Basis der beobachteten Expressionsmuster lassen sich also kurzfristige von längerfristigen Zellschutzmechanismen beschreiben. Die Zellen nutzen demnach möglicherweise verstärkte Reparaturmechanismen im Sinne einer Erhöhung der HSP-Expression, indem nach hyperthermer Stresseinwirkung intrazelluläre Signalkaskaden induziert werden. Je nach Zugehörigkeit zur HSP-Familie halten diese Schutzmechanismen unterschiedlich lange an. Am Beispiel von HSP72 und HSP90 zeigt sich ein vorübergehender kurzfristiger Zellschutz der Tumorzelle vor externer Stresseinwirkung. HSP27 ist auch nach 12 h Regeneration auf mRNA-Ebene weiterhin deutlich über dem Normalniveau exprimiert (Abbildung 13), was darauf hindeuten könnte, dass dieses Protein auch längerfristigen Zellschutz vermittelt.

Betrachtet man die Expressionsveränderungen auf Proteinebene, so ließ sich insbesondere nach 12 h eine in Assoziation mit dem Temperaturanstieg verstärkte Proteinexpression beobachten. HSP27 und HSP72 wurden als

Protein auch nach 12 h mit steigenden Temperaturen verstärkt exprimiert, lediglich bei HSP90 zeichnet sich keine deutliche Expressionssteigerung ab. Proteine sind wesentlich stabiler als mRNA und verbleiben deshalb auch länger in und auf der Zelle. In Zusammenschau mit dem Proliferationsverhalten der Tumorzellen nach Hyperthermie lässt sich dies veranschaulichen. Die Reparatur der induzierten Zellschäden dauert bis 12 h nach Hyperthermie an, korreliert in gewisser Weise also mit der Anwesenheit der verstärkt exprimierten HSP.

Der Verlust und das Absterben von Tumorzellen wird in der Regel durch die Induktion der Apoptose über verschiedene Signalwege erklärt. Der in den eigenen Versuchen beobachtete Kurzeiteffekt bei HSP90 kann der Triggerung dieser Apoptose entgegenwirken, indem temporär Zytoprotektions- und Proliferationsmechanismen in den mit Hyperthermie behandelten Krebszellen stimuliert werden. Einen maßgeblichen Effekt auf das Überleben der Tumorzellen kann außerdem die prolongierte Hochregulation von HSP27 bewirken, da diese sowohl kurzfristig zytoprotektiv als auch langfristig zellstabilisierend über eine Aktinpolymerisation bei erweiterter Zellmigration wirkt.⁷⁰

Die geschilderten sekundären Zellschutzeffekte, verursacht durch eine Hyperthermiebehandlung, öffnen das Tor zur Bildung einer zunehmend resistenten Tumorzellsubpopulation, die möglicherweise eine durch die HIPEC induzierte Tumorzellapoptose in der Mehrzahl der behandelten Zellen durch robuste, überlebende Tumorzellen wieder zu neutralisieren und auszugleichen vermag.

7.3. Effekt von Temperaturerhöhungen auf HSP-Expression, Proliferation und Apoptose in Tumorzellen

Während der HIPEC-Therapie wird das Perfusat mit dem Chemotherapeutikum in der Regel bei hyperthermen Temperaturen in einer Bandbreite von 39 °C bis hin zu 43 °C verabreicht. Die genaue Temperatur ist abhängig von den Protokollen der verschiedenen operativen Zentren, in denen die HIPEC-Prozedur durchgeführt wird.³⁷ Ausgeweitete präklinische Studien beschreiben

unabhängige Hyperthermie-assoziierte Effekte in Tumorzellen, wie eine hyperthermische Zytotoxizität, die verstärkte Sensibilisierung der Zellen auf eine zytostatische Therapie sowie die Stimulation von Signalwegen der Immunantwort.⁹² Auch wenn diese Effekte zumeist abhängig von der Tumorbilologie und Tumorentität zu sein scheinen, so gibt es stets Abweichungen im Tumormikromilieu, die sowohl die Perfusion des Tumorgewebes als auch dessen Oxygenierung betreffen. Die vorliegenden Ergebnisse aus den eigenen Proliferations- und Apoptosetests in Zusammenhang mit der HSP-Expression gebracht, stellen ein niedrigeres Temperaturfenster von 39-41 °C als optimalen Bereich für die Zytotoxizität der Tumorzellen in den Fokus. Bei 41 °C zeigt sich nach 30 min Regeneration die Zellproliferationsrate minimiert und synergistisch die Anzahl apoptotischer Zellen maximiert. Im Gegensatz dazu liegen die Maxima der HSP-Überexpressionen sowohl nach kurzer (30 min) als auch langer (12 h) Regeneration in der Regel bei der maximal applizierten Temperatur von 43 °C. Diese Ergebnisse sprechen für die maximale Zellschutz-Antwort durch induzierte Heat Shock Protein Expression der Tumorzellen bei 43 °C. Bei dieser Temperatur sind die Abschwächung der Apoptose und die Steigerung der Proliferationsaktivität, also die Tumorwachstum-begünstigenden Effekte, am größten. Eine derart ausgeprägte Tumorproliferationsantwort ist bei 41 °C und 39 °C nicht zu beobachten. Diese Tumorzell-spezifischen Reaktionsmechanismen bei 43 °C sind im Rahmen einer Tumorthherapie gerade nicht erwünscht. Folglich legen die Ergebnisse dieser Arbeit eine induzierte Stressantwort in Kolonkarzinomzellen bei höheren Temperaturen wie 43 °C nahe, die durch die induzierten HSP-Mechanismen repräsentiert wird. Eine Hyperthermie von 41 °C stellt sich somit in der hier vorgelegten Arbeit als eine Schwellentemperatur dar, oberhalb derer die zellulären Heat Shock Mechanismen mit ihrer größten Wirkung einsetzen. Diese Mechanismen sind deutlich weniger effektiv bei niedrigeren Temperaturen wie 39 °C, die Tumorzellen haben bei verringerter thermischer Belastung weniger Möglichkeiten, antiapoptotische oder proliferationsfördernde Mechanismen auszubilden. Um die gezeigte Stressantwort, die während einer hyperthermen

Therapie in Tumorzellen initiiert werden kann, zu verhindern bzw. zumindest einzuschränken, erscheint es aus den eigenen Ergebnissen schlussfolgernd sinnvoll, das während der HIPEC verwendete Temperaturzielfenster auf 39-41 °C zu senken. Während die in dieser Arbeit erstmalig auf zellulärer/molekularer Ebene beschriebenen durchaus erwünschten Hyperthermie-assoziierten Effekte beibehalten würden, könnten die Schutzmechanismen der Tumorzelle, die letzten Endes das zelluläre Überleben sichern, somit auf ein Minimum reduziert werden. Sogar nach 12 h zeigten sich bereits verminderte hypertherme Effekte auf die Tumorzellproliferation, was möglicherweise über prolongierte HSP-Überexpression, wie in der RT-qPCR sowie im Western Blot gezeigt, vermittelt wird. Betrachtet man die Protokolle der HIPEC-Prozedur *in vivo* nun kritisch, so erscheint es besonders bemerkenswert, dass Tumorzellen offensichtlich bereits 12 h nach der Hyperthermie regenerationsfähig sind und antiproliferative Effekte durch die intrazellulären HSP-Mechanismen außer Kraft gesetzt werden.

Basierend auf den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen muss in Zukunft im Rahmen weiterer Untersuchungen die additive Einwirkung einer zytostatischen Therapie zusätzlich zur Hyperthermie geklärt werden. Sobald Chemotherapeutika eingesetzt werden, wird es jedoch schwieriger, die zu beobachtenden Effekte bezüglich ihrer auslösenden Faktoren zu differenzieren, bzw. zu definieren, welche Effekte durch die Hyperthermie und welche durch eine zytostatische Therapie bewirkt wurden. Gerade in Fragen der Resistenzbildung von Tumorzellen und mikroskopisch residuellen Tumorresten spielt gerade dieser Hintergrund eine entscheidende Rolle. Chemotherapie-resistente Tumorzellen, die eine kombinierte hypertherme und hochdosierte lokale Chemotherapie peritoneal überleben, können über stärkere intrazelluläre Reparaturmechanismen und Möglichkeiten der Zellreparatur wie die Hochregulierung der in dieser Studie gezeigten HSP verfügen. Um das Selektionieren von stress- und therapieresistenten Zellen zu vermeiden, sollte dem begleitenden therapeutischen Einsatz von spezifischen HSP-Inhibitoren, wie unter 7.4 diskutiert, zukünftig Bedeutung beigemessen werden.

7.4. Heat Shock Proteine als Zielstrukturen: Einführung von HSP-Inhibitoren

Neue therapeutische Ansätze in der Krebstherapie implementieren derzeit die Heat Shock Proteine als molekulare Zielstruktur, um die Rezidivrate zu senken und das tumorbedingte Überleben weiter zu verbessern. Diese Strategie beruht auf der Erkenntnis, dass zytoprotektive Funktionen der HSP essentielle Voraussetzung für die Integrität der Tumorzelle zu sein scheinen. Infolge dessen fokussieren diverse Studien auf spezifische HSP-Inhibitoren. *In vitro* Studien konnten bereits therapeutische Effekte der HSP90-Inhibition auf das Tumorwachstum, die Angiogenese und nachfolgendes metastatisches Verhalten von kolorektalen Karzinomzellen präsentieren.⁹³ Der Wirkmechanismus dieser Inhibitoren basiert auf einer Herabsetzung der Aktivität von HSP90 und sukzessive auf der Blockade zahlreicher Signalkaskaden in maligne entarteten Zellen.⁹⁴ Die pharmakologische Inhibition destabilisiert die Proteine und führt zur proteasomalen Degradation.⁹⁵ Das bis zu zweifach häufigere Vorkommen von HSP90 in Tumorzellen gegenüber gesundem Gewebe⁹⁶ sowie eine Hochregulierung der HSP90-Expression nach hyperthermem Stress unterstreicht die Bedeutung einer therapeutischen HSP90-Inhibition.⁹⁷ Die klinische Anwendbarkeit des in den 1990er Jahren entdeckten natürlich vorkommenden Geldanamycin sowie dessen Derivats 17-Allyl-17-Demethoxygeldanamycin (17-AAG) wurde aufgrund von schlechter Löslichkeit, schwacher *in vivo* Aktivität, Problemen bei der Herstellung sowie einer signifikanten Hepatotoxizität nicht mehr weiter verfolgt.^{85,98} Diese Limitierungen werden von neuartigen synthetischen HSP90-Inhibitoren überwunden. Neue intravenös applizierbare Derivate wie NVP-AUY922 oder STA-9090 konnten bereits antitumoröse Aktivität in Tiermodellen in Dosierungen unterhalb der maximal tolerablen Dosis zeigen.^{99,100}

Neben HSP90 ist auch bereits eine Verstärkung des zytotoxischen Effekts der Hyperthermie durch die Blockierung von HSP27 bei HT-29 Kolonkarzinomzellen bekannt. Die Blockierung von Proteasomen führt zu inhibierter HSP-Expression und verstärkt somit auch die durch die Hyperthermie bedingten Effekte auf die behandelten Zellen.¹⁰¹ Dennoch können einige konträre Interaktionen

verschiedener HSP gezeigt werden, sowohl in synergistischem als auch in antagonistischem Sinne. Die alleinige Inhibition von HSP70 führt zu einer Überexpression von HSP90, auf der anderen Seite wird die HSP70-Expression durch eine HSP90-Blockade getriggert. Die Sensibilisierung von Karzinomzellen auf die Hyperthermie ist demzufolge abhängig von einer Co-Inhibition von HSP70 und HSP90.^{102,103}

Im Rahmen des neuen Therapieansatzes einer HSP-Inhibition verbleiben viele ungelöste Fragen. Besonders in Frage für einen derartigen Therapiezusatz kommen Tumoren, deren bereits entdecktes kritisches Schlüsselprotein ein Klientenprotein von HSP darstellt, so wie c-Kit in gastrointestinalen Stromatumoren, mutierter EGFR im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom oder HER-2 im Mammakarzinom.⁵⁷ Bringt man nun die hier vorliegenden Ergebnisse der HSP-Expression bei Patienten, bei denen eine HIPEC durchgeführt wurde, mit den eigenen *in vitro* Ergebnissen aus dem Hyperthermie-Modell zusammen, so könnte die Applikation eines spezifischen HSP-Inhibitors additiv zur intraperitonealen Chemotherapie ein vielversprechender Ansatz sein, um Tumorwachstum und Metastasierung zu minimieren, indem antitumoröse Effekte wie Apoptose und Sensibilisierung auf die Hyperthermie gezielt verstärkt werden. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigten des Weiteren eine prolongierte Überexpression von HSP27 in HT-29 Kolonkarzinomzellen. Folglich könnte ebenso eine additive HSP27-Inhibition wertvoll sein, um zelluläre Protektionsmechanismen auszuschalten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Gabe von Interferon- γ zu einer Herunterregulation von HSP27 führt und sowohl einen Hyperthermie-induzierten Tumorzelltod als auch die Tumorsuppression *in vitro* bzw. *in vivo* begünstigt.¹⁰⁴ Schlussfolgernd stehen ebenfalls die Behandlung mit IFN- γ sowie eine HSP27-Inhibition im Speziellen als vielversprechende therapeutische Ansätze zur Diskussion, um langfristige Tumorzellschutzmechanismen in verbliebenen malignen Zellen im Tumorbett nach der HIPEC auf ein Minimum zu reduzieren oder sogar zu verhindern. Eine kombinierte Gabe von HSP27-, HSP70- und HSP90-Inhibitoren könnte von großem Untersuchungswert im Rahmen einer klinischen Studie im Sinne einer Erfolgsmaximierung der HIPEC-Therapie sein. Um eindeutige Aussagen in

Bezug auf die klinische Machbarkeit und spezifische Empfehlungen im Hinblick auf HSP-Inhibitoren machen zu können, sind in Folge der hier gezeigten Grundlagenuntersuchungen weiterführende Untersuchungen im Mausmodell *in vivo* notwendig.

8. Zusammenfassung

Die hypertherme Chemoperfusion der Bauchhöhle (HIPEC) in Kombination mit einer vorangestellten ausgedehnten zytoreduktiven chirurgischen Therapie stellt eine vielversprechende Methode der Krebsbehandlung für Patienten dar, die an einer Peritonealkarzinose auf dem Boden gastroenterologischer oder gynäkologischer Primärtumore erkrankt sind. Da bislang wenige Standards bezüglich der angewendeten klinischen Bedingungen im Rahmen der HIPEC existieren und um jene zu optimieren, wurden *ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen mit Tumorzellen durchgeführt. Ziel dieser Experimente war die Identifizierung von zellulären Schutzmechanismen in Reaktion auf Hyperthermie als externen Stressor sowie deren Auswirkung auf prognostisch relevante tumorphysiologische Vorgänge wie Zellproliferation und Apoptose. Um die zellulären Vorgänge während einer HIPEC-Therapie vollends zu verstehen, müssen die beiden einflussnehmenden Größen Hyperthermie und Zytostase getrennt voneinander untersucht werden, um die therapeutischen Konsequenzen zu verbessern und gezielte Pharmaka einsetzen zu können.

In Voruntersuchungen an repräsentativen Tumorgeweben vor und nach HIPEC konnten deutliche Veränderungen der HSP-Expressionen der onkologisch relevanten Heat Shock Proteine HSP27, HSP70 und HSP90 im Vergleich vor und nach HIPEC-Therapie dargestellt werden. Diese Veränderungen zeigten sich in dieser Form erstmalig entitätsübergreifend sowohl auf mRNA-Ebene in der RT-qPCR als auch in der Proteinexpression in Western Blot Analysen.

Auf Basis dieser Beobachtungen wurden in einem neu etablierten Hyperthermie *in vitro* Modell humane HT-29 Kolonkarzinomzellen unter HIPEC-ähnlichen Bedingungen für 60 min verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Nach Regenerationszeiten von 30 min bzw. 12 h wurden anschließend Protein- und Genexpressionsanalysen mit Hilfe von Western Blot, Immunhistochemie und RT-qPCR durchgeführt. Veränderungen im Tumorwachstum wurden 30 min sowie 12 h nach der Hyperthermieeinwirkung mittels MTS- und AnnexinV-Apoptose-Tests detektiert. Ziel des *in vitro* Modells war die isolierte Betrachtung

des Einflusses von Hyperthermie auf die zellulären Reparaturmechanismen vermittelt durch HSP sowie deren Auswirkung auf Zellproliferation und Apoptose.

Der isolierte Einfluss der Hyperthermie auf die humanen HT-29 Kolonkarzinomzellen verursachte eine kurzfristige Hochregulierung der Gen- und Proteinexpression von HSP27 und HSP72, auch HSP90 zeigte sich kurzfristig erhöht, wenngleich in geringerem Ausmaße. Bereits nach 12 h war eine Schwächung der Hochregulierung bei allen drei HSP zu beobachten, lediglich HSP27 zeigte nach wie vor eine deutliche Expressionssteigerung mit Erhöhung der einwirkenden Temperaturen.

Der für die Tumorthapie essenzielle Apoptose-induzierende und antiproliferative Effekt auf die Tumorzellen war nach kurzer und längerfristiger Zellregeneration in einem Temperaturfenster von 39-41 °C zu beobachten.

Assoziiert man die Ergebnisse der unterschiedlichen HSP-Expressionen mit den Proliferations- und Apoptoseraten der Tumorzellen, so liegt die Schlussfolgerung nahe, dass bei hohen Temperaturen (43 °C) die Initiierung der intrazellulären Zellschutzmechanismen, repräsentiert durch die HSP, für eine erhebliche Abschwächung der gewünschten Tumorzellapoptose und Proliferationsminimierung verantwortlich sein könnten.

Die eigenständigen Effekte einer Hyperthermie in der Malignomtherapie wie die Zytotoxizität, Veränderungen im Tumormikromilieu und die steigende Sensibilität der Tumorzellen auf chemotherapeutische Agenzien sollten folglich hinsichtlich der zielorientierten therapeutischen Betrachtung streng von den Mechanismen des induzierten Zellschutzes separiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten ausgeprägte Heat Shock Protein-Antworten in der Tumorzelle, die gewünschte antiproliferative und apoptotische Effekte beeinträchtigen und Tumorzellschutzmechanismen induzieren könnten. Ferner legen die Ergebnisse nahe, dass die Effekte der HIPEC-Therapie unter Umständen in Bezug auf die Höhe der Temperatur der induzierten Hyperthermie bei den Patienten mit Peritonealkarzinose aufgrund der relevanten HSP-Überexpression gegebenenfalls einer Reevaluierung bedürfen.

Der nächste Schritt der Untersuchungen führt zwangsläufig zum Einbezug verschiedener Chemotherapeutika in die *in vitro* Experimente, um die Rolle der Chemotherapie und Zytostase in Kombination mit der Hyperthermie zu klären. Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse stellen erstmalig eine klinisch potentiell hochrelevante Ergänzung zur Optimierung der vorhandenen HIPEC-Protokolle vor. Sowohl die Temperaturanpassung des applizierten Chemotherapeutikums als auch der additive Einsatz von HSP-Inhibitoren könnte einen vielversprechenden Ansatz zur langfristigen Verbesserung des tumorbedingten Überlebens für Peritonealkarzinose-Patienten bedeuten und sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen in Zellkultur, Mausmodell und klinischen Studien darstellen.

9. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AWD	<i>Alive with disease</i>
Bax	BCL-2-assoziiertes Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau
CCR	<i>Completeness of cyto-reduction</i>
cDNA	Komplementäre DNA
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
CPT	Carboplatin
CRS	Zytoreduktive Chirurgie
CT	Computertomographie
dH ₂ O	Aquadest
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOD	<i>Dead of disease</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
ECOG	<i>Eastern cooperative oncology group</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPIC	<i>Early postoperative intraperitoneal chemotherapy</i>
FACS	Durchflusszytometrie/ <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum/ <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
h	Stunde
HCl	Salzsäure/Chlorwasserstoff
HIPEC	Hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion

HRP	Meerrettichperoxidase/ <i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Heat Shock Proteine
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
l	Liter
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Lig.	Ligamentum
LS	<i>Lesion size</i>
mA	Milliampere
mAK	Monoklonaler Antikörper
M	Mol/l
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MMC	Mitomycin C
mmol	Millimol
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
m/v	Gewichtsprozent
n.a.	Nicht angegeben
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NED	<i>No evidence of disease</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Nonoxinol 40
OX	Oxaliplatin
pAK	Polyklonaler Antikörper
PCD	<i>Programmed cell death</i>

PCI	<i>Peritoneal cancer index</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion/ <i>polymerase chain reaction</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung/ <i>phosphate buffered saline</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI	Propidiumiodid
PMP	Pseudomyxoma peritonei
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
R1-Resektion	Mikroskopische Tumoranteile bleiben erhalten
R2-Resektion	Makroskopische Tumoranteile bleiben erhalten
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT-qPCR	Real-Time-quantitative-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
v/v	Volumenprozent

10. Literaturverzeichnis

1. Sugarbaker PH. Surgical management of peritoneal carcinosis: diagnosis, prevention and treatment. *Langenbecks Arch Chir.* 1988;373:189-196.
2. Sugarbaker PH. Observations concerning cancer spread within the peritoneal cavity and concepts supporting an ordered pathophysiology. *Cancer Treat Res.* 1996;82:79-100.
3. Meyers MA. Distribution of intra-abdominal malignant seeding: dependency on dynamics of flow of ascitic fluid. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1973;119:198-206.
4. Lindberg U, Karlsson R, Lassing I, Schutt CE, Hoglund AS. The microfilament system and malignancy. *Semin Cancer Biol.* 2008;18:2-11.
5. Ceelen WP, Bracke ME. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol.* 2009;10:72-79.
6. Hansen E, Wolff N, Knuechel R, Ruschoff J, Hofstaedter F, Taeger K. Tumor cells in blood shed from the surgical field. *Arch Surg.* 1995;130:387-393.
7. Ziprin P, Alkhamesi NA, Ridgway PF, Peck DH, Darzi AW. Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumourmesothelial cell adhesion. *Biol Chem.* 2004;385:755-761.
8. Cannistra SA, Kansas GS, Niloff J, DeFranzo B, Kim Y, Ottensmeier C. Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Res.* 1993;53:3830-3838.
9. Klein CL, Bittinger F, Skarke CC, et al. Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells. *Pathobiology.* 1995;63:204-212.
10. Yang XJ, Li Y, al-shammaa Hassan AH, et al. Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves survival in selected

- patients with peritoneal carcinomatosis from abdominal and pelvic malignancies: results of 21 cases. *Ann Surg Oncol*. 2009;16:345-351.
11. Hioki M, Gotohda N, Konishi M, Nakagohri T, Takahashi S, Kinoshita T. Predictive factors improving survival after gastrectomy in gastric cancer patients with peritoneal carcinomatosis. *World J Surg*. 2010;34:555-562.
 12. Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer*. 2000;88:358-363.
 13. Holm-Nielsen P. Pathogenesis of ascites in peritoneal carcinomatosis. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1953;33:10-21.
 14. Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res*. 1996;82:359-374.
 15. Folprecht G, Kohne CH, Lutz MP. Systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Cancer Treat Res*. 2007;134:425-440.
 16. Bozzetti F, Yu W, Baratti D, Kusamura S, Deraco M. Locoregional treatment of peritoneal carcinomatosis from gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2008;98:273-276.
 17. Cotte E, Glehen O, Mohamed F, et al. Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemo-hyperthermia for chemo-resistant and recurrent advanced epithelial ovarian cancer: prospective study of 81 patients. *World J Surg*. 2007;31:1813-1820.
 18. Esquivel J, Elias D, Baratti D, Kusamura S, Deraco M. Consensus statement on the loco regional treatment of colorectal cancer with peritoneal dissemination. *J Surg Oncol*. 2008;98:263-267.
 19. Harmon RL, Sugarbaker PH. Prognostic indicators in peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. *Int Semin Surg Oncol*. 2005;2:3.
 20. Moran B, Baratti D, Yan TD, Kusamura S, Deraco M. Consensus statement on the loco-regional treatment of appendiceal mucinous

- neoplasms with peritoneal dissemination (pseudomyxoma peritonei). *J Surg Oncol*. 2008;98:277-282.
21. Glehen O, Gilly FN. Quantitative prognostic indicators of peritoneal surface malignancy: carcinomatosis, sarcomatosis, and peritoneal mesothelioma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2003;12:649-671.
 22. Gilly FN, Cotte E, Brigand C, et al. Quantitative prognostic indices in peritoneal carcinomatosis. *Eur J Surg Oncol*. 2006;32:597-601.
 23. Elias D, Delperro JR, Sideris L, et al. Treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: impact of complete cytoreductive surgery and difficulties in conducting randomized trials. *Ann Surg Oncol*. 2004;11:518-521.
 24. Sugarbaker PH, Jablonski KA. Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg*. 1995;221:124-132.
 25. Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, et al. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:3737-3743.
 26. Glehen O, Kwiatkowski F, Sugarbaker PH, et al. Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study. *J Clin Oncol*. 2004;22:3284-3292.
 27. Elias D, Lefevre JH, Chevalier J, et al. Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *J Clin Oncol*. 2009;27:681-685.
 28. Esquivel J, Sticca R, Sugarbaker P, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of peritoneal surface malignancies of colonic origin: a consensus statement. Society of Surgical Oncology. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:128-133.

29. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5:649-655.
30. Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Ann Surg.* 1995;221:29-42.
31. Moran BJ, Mukherjee A, Sexton R. Operability and early outcome in 100 consecutive laparotomies for peritoneal malignancy. *Br J Surg.* 2006;93:100-104.
32. Glockzin G, Ghali N, Lang SA, Agha A, Schlitt HJ, Piso P. [Peritoneal carcinomatosis. Surgical treatment, including hyperthermal intraperitoneal chemotherapy]. *Chirurg.* 2007;78:1100, 1102-1106, 1108-1110.
33. Cashin PH, Graf W, Nygren P, Mahteme H. Intraoperative hyperthermic versus postoperative normothermic intraperitoneal chemotherapy for colonic peritoneal carcinomatosis: a case-control study. *Ann Oncol.* 2011.
34. Klaver YL, Hendriks T, Lomme RM, Rutten HJ, Bleichrodt RP, de Hingh IH. Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis in an experimental model. *Br J Surg.* 2010;97:1874-1880.
35. Suo T, Mahteme H, Qin XY. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for gastric and colorectal cancer in Mainland China. *World J Gastroenterol.* 2011;17:1071-1075.
36. Sugarbaker PH. Laboratory and clinical basis for hyperthermia as a component of intracavitary chemotherapy. *Int J Hyperthermia.* 2007;23:431-442.
37. Glehen O, Cotte E, Kusamura S, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: nomenclature and modalities of perfusion. *J Surg Oncol.* 2008;98:242-246.
38. Sommariva A, Pilati P, Rossi CR. Cyto-reductive Surgery combined with Hyperthermic Intra-Peritoneal Chemotherapy for Peritoneal Surface Malignancies: Current treatment and results. *Cancer Treat Rev.* 2011.

39. Kusamura S, Baratti D, Younan R, et al. Impact of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy on systemic toxicity. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:2550-2558.
40. Glehen O, Cotte E, Schreiber V, Sayag-Beaujard AC, Vignal J, Gilly FN. Intraperitoneal chemohyperthermia and attempted cytoreductive surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Br J Surg*. 2004;91:747-754.
41. Shen P, Hawksworth J, Lovato J, et al. Cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C for peritoneal carcinomatosis from nonappendiceal colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2004;11:178-186.
42. Mahteme H, Hansson J, Berglund A, et al. Improved survival in patients with peritoneal metastases from colorectal cancer: a preliminary study. *Br J Cancer*. 2004;90:403-407.
43. Kecmanovic DM, Pavlov MJ, Ceranic MS, Sepetkovski AV, Kovacevic PA, Stamenkovic AB. Treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer by cytoreductive surgery and hyperthermic perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31:147-152.
44. Elias D, Goere D, Blot F, et al. Optimization of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin plus irinotecan at 43 degrees C after complete cytoreductive surgery: mortality and morbidity in 106 consecutive patients. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:1818-1824.
45. Elias D, Benizri E, Di Pietrantonio D, Menegon P, Malka D, Raynard B. Comparison of two kinds of intraperitoneal chemotherapy following complete cytoreductive surgery of colorectal peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:509-514.
46. Piche N, Leblond FA, Sideris L, et al. Rationale for heating oxaliplatin for the intraperitoneal treatment of peritoneal carcinomatosis: a study of the effect of heat on intraperitoneal oxaliplatin using a murine model. *Ann Surg*. 2011;254:138-144.

47. Song CW. Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review. *Cancer Res.* 1984;44:4721s-4730s.
48. Multhoff G. Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *Int J Hyperthermia.* 2002;18:576-585.
49. Shah A, Unger E, Bain MD, et al. Cytokine and adhesion molecule expression in primary human endothelial cells stimulated with fever-range hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 2002;18:534-551.
50. Franklin TB, Krueger-Naug AM, Clarke DB, Arrigo AP, Currie RW. The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *Int J Hyperthermia.* 2005;21:379-392.
51. Latchman DS. HSP27 and cell survival in neurones. *Int J Hyperthermia.* 2005;21:393-402.
52. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med.* 2008;12:743-761.
53. Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* 2010.
54. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.* 2006;31:164-172.
55. Schlesinger MJ. How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins. *Pediatr Res.* 1994;36:1-6.
56. Hut HM, Kampinga HH, Sibon OC. Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Mol Biol Cell.* 2005;16:3776-3785.
57. Den RB, Lu B. Heat shock protein 90 inhibition: rationale and clinical potential. *Therapeutic advances in medical oncology.* 2012;4:211-218.
58. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J.* 2000;19:4310-4322.
59. Hur E, Kim HH, Choi SM, et al. Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-

- 1alpha/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Mol Pharmacol.* 2002;62:975-982.
60. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:38-47.
61. Neckers L, Ivy SP. Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol.* 2003;15:419-424.
62. Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med.* 1999;31:261-271.
63. Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *Embo J.* 2001;20:446-456.
64. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.* 2005;280:38729-38739.
65. Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2000;2:469-475.
66. Guo F, Sigua C, Bali P, et al. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood.* 2005;105:1246-1255.
67. Sakahira H, Nagata S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem.* 2002;277:3364-3370.
68. Chauhan D, Li G, Hideshima T, et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood.* 2003;102:3379-3386.
69. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 3):357-368.

70. Doshi BM, Hightower LE, Lee J. The role of Hsp27 and actin in the regulation of movement in human cancer cells responding to heat shock. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14:445-457.
71. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*. 2007;1:53-60.
72. Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, et al. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*. 2003;23:5790-5802.
73. Isaacs JS, Xu W, Neckers L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2003;3:213-217.
74. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*. 2006;5:2592-2601.
75. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415:530-536.
76. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10:86-103.
77. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer*. 1998;79:468-475.
78. Young JC, Moarefi I, Hartl FU. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol*. 2001;154:267-273.
79. Gyrd-Hansen M, Nylandsted J, Jaattela M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle*. 2004;3:1484-1485.
80. Yu Z, Zhi J, Peng X, Zhong X, Xu A. Clinical significance of HSP27 expression in colorectal cancer. *Mol Med Report*. 2010;3:953-958.
81. Lee HW, Lee EH, Kim SH, Roh MS, Jung SB, Choi YC. Heat shock protein 70 (HSP70) expression is associated with poor prognosis in

- intestinal type gastric cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2013.
82. Wang J, Cui S, Zhang X, Wu Y, Tang H. High expression of heat shock protein 90 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer. *PLoS One*. 2013;8:e62876.
 83. Chen WS, Lee CC, Hsu YM, Chen CC, Huang TS. Identification of heat shock protein 90alpha as an IMH-2 epitope-associated protein and correlation of its mRNA overexpression with colorectal cancer metastasis and poor prognosis. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26:1009-1017.
 84. Dudeja V, Mujumdar N, Phillips P, et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms. *Gastroenterology*. 2009;136:1772-1782.
 85. Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2009;100:1523-1529.
 86. Nylandsted J, Brand K, Jaattela M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;926:122-125.
 87. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:761-772.
 88. Noonan E, Giardina C, Hightower L. Hsp70B' and Hsp72 form a complex in stressed human colon cells and each contributes to cytoprotection. *Exp Cell Res*. 2008;314:2468-2476.
 89. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev*. 2005;19:570-582.
 90. Watanabe G, Behrns KE, Kim JS, Kim RD. Heat shock protein 90 inhibition abrogates hepatocellular cancer growth through cdc2-mediated G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;64:433-443.
 91. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell*. 2008;14:250-262.

92. Repasky E, Issels R. Physiological consequences of hyperthermia: heat, heat shock proteins and the immune response. *Int J Hyperthermia*. 2002;18:486-489.
93. Moser C, Lang SA, Kainz S, et al. Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:2868-2878.
94. Xu W, Neckers L. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2007;13:1625-1629.
95. Sepp-Lorenzino L, Ma Z, Lebwohl DE, Vinitzky A, Rosen N. Herbimycin A induces the 20 S proteasome- and ubiquitin-dependent degradation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1995;270:16580-16587.
96. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer*. 1992;51:613-619.
97. Neckers L. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *Journal of biosciences*. 2007;32:517-530.
98. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:8324-8328.
99. Barluenga S, Wang C, Fontaine JG, et al. Divergent synthesis of a pochonin library targeting HSP90 and in vivo efficacy of an identified inhibitor. *Angewandte Chemie*. 2008;47:4432-4435.
100. Lin TY, Bear M, Du Z, et al. The novel HSP90 inhibitor STA-9090 exhibits activity against Kit-dependent and -independent malignant mast cell tumors. *Experimental hematology*. 2008;36:1266-1277.
101. Chen F, Rezavi R, Wang CC, Harrison LE. Proteasome inhibition potentiates the cytotoxic effects of hyperthermia in HT-29 colon cancer

- cells through inhibition of heat shock protein 27. *Oncology*. 2007;73:98-103.
102. Cui X, Yu ZY, Wang W, Zheng YQ, Liu W, Li LX. Co-Inhibition of HSP70/HSP90 Synergistically Sensitizes Nasopharyngeal Carcinoma Cells to Thermotherapy. *Integr Cancer Ther*. 2011.
103. Guo F, Rocha K, Bali P, et al. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res*. 2005;65:10536-10544.
104. Oba M, Yano S, Shuto T, Suico MA, Eguma A, Kai H. IFN-gamma down-regulates Hsp27 and enhances hyperthermia-induced tumor cell death in vitro and tumor suppression in vivo. *Int J Oncol*. 2008;32:1317-1324.

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Behandlungsalgorithmus für das Kolonkarzinom mit bekannter peritonealer Dissemination (nach Esquivel et al., 2008). ¹⁸	4
Abbildung 2. Peritoneal Cancer Index-Score (nach Jacquet, Sugarbaker, 1996). ¹⁴	6
Abbildung 3. Modulierung von Apoptose und Zelldifferenzierung durch HSP27, HSP70 und HSP90 (nach Lanneau et. al, 2007). ⁷¹	20
Abbildung 4. Relative Genexpression von HSP90 prä und post HIPEC-Therapie.....	42
Abbildung 5. Relative Genexpression von HSP27 prä und post HIPEC-Therapie.....	43
Abbildung 6. Relative Genexpression von HSP72 prä und post HIPEC-Therapie.....	43
Abbildung 7. Proteinexpressionen (Western Blot) ex vivo prä und post HIPEC-Therapie bei Patienten 1 und 2.....	45
Abbildung 8. Proteinexpressionen (Western Blot) ex vivo prä und post HIPEC-Therapie bei Patienten 3 und 4.....	45
Abbildung 9. Proteinexpressionen (Western Blot) ex vivo prä und post HIPEC-Therapie bei Patienten 5 und 6.....	46
Abbildung 10. Proteinexpressionen (Western Blot) ex vivo prä und post HIPEC-Therapie bei Patienten 7 und 8.....	46
Abbildung 11. mRNA-Expression von HSP27, HSP72 und HSP90 in HT-29 Zellkulturen unter einstündiger Hyperthermie mit Temperaturen zwischen 37 und 43 °C nach einer Regenerationszeit von 30 min.....	48
Abbildung 12. mRNA-Expression von HSP27, HSP72 und HSP90 in HT-29 Zellkulturen unter einstündiger Hyperthermie mit Temperaturen zwischen 37 und 43 °C nach einer Regenerationszeit von 12 h.....	48
Abbildung 13. Alternative Darstellung. Temperaturinduzierte Genexpression nach 1 h Hyperthermie und Regeneration von 30 min und 12 h von HSP27 (a), HSP72 (b) und HSP90 (c).....	49

Abbildung 14. Immunzytochemische Färbungen zur Darstellung der Proteinexpressionen von HSP27, HSP72 und HSP 90 nach 30 min Regenerationsphase nach einstündiger Inkubation bei 37 versus 43 °C.	51
Abbildung 15. Immunzytochemische Färbungen zur Darstellung der Proteinexpressionen von HSP27, HSP72 und HSP 90 nach 12 h Regenerationsphase nach einstündiger Inkubation bei 37 versus 43 °C.	51
Abbildung 16 Western Blot Analysen zur Quantifizierung der Proteinexpressionen von HSP27, HSP72 und HSP 90 nach einstündiger Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (a) nach 30 min und (b) 12 h Regenerationsphase.	52
Abbildung 17. MTS-Zytotoxizitäts-Test nach einstündiger Hyperthermieexposition bei unterschiedlichen Temperaturen (37, 39, 41 und 43 °C) und nach 30 min bzw. 12 h Regenerationszeit.....	53
Abbildung 18. Apoptose-Tests in HT-29 Zellen 30 min nach Hyperthermieexposition in der Färbung mit AnnexinV und Propidiumiodid. AnnexinV-positive Zellen werden als apoptotisch (unten rechts), AnnexinV- und PI-positive Zellen als nekrotisch (oben rechts) und AnnexinV- und PI-negative Zellen als viabel identifiziert (unten links).....	54
Abbildung 19. Apoptose-Tests in HT-29 Zellen 12 h nach Hyperthermieexposition in der Färbung mit AnnexinV und Propidiumiodid. AnnexinV-positive Zellen werden als apoptotisch (unten rechts), AnnexinV- und PI-positive Zellen als nekrotisch (oben rechts) und AnnexinV- und PI-negative Zellen als viabel identifiziert (unten links).....	55

Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Ana Maria Waaga-Gasser und Herrn Prof. Martin Gasser für die Bereitstellung des Themas, die kontinuierliche Motivation und stetige Weiterentwicklung unseres Projekts sowie für die intensive Begleitung und Förderung während meiner Laborzeit. Herrn Prof. Michael Scheurlen gilt mein besonderer Dank für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Christoph-Thomas Germer, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie (Chirurgie I) des Universitätsklinikums Würzburg, danke ich für die Möglichkeit die Promotionsarbeit an seiner Klinik zu erstellen. Weiterhin danke ich Frau Dr. Tanja Grimmig und Frau Dr. Romana Mönch, die mir über die gesamte Zeit auch an langen Labortagen stets hilfsbereit und unterstützend zur Seite standen. Wir haben gemeinsam Erfolge gefeiert und Misserfolge hingenommen, um daraus neue Herangehensweisen für die Weiterarbeit entwickeln zu können.

Ich danke außerdem allen Mitarbeiterinnen unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Ingrid Strauß, Sabine Müller, Mariola Dragan und Alexia Witchen für stetige Hilfestellungen bei den Versuchen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die zahlreichen Hinweise aus klinischer Perspektive und die Einordnung der Ergebnisse in den klinischen Kontext danke ich Herrn Prof. Jörg Pelz sehr herzlich.

Dem Dekanat der Medizinischen Fakultät danke ich darüber hinaus für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich über den gesamten Zeitraum meines Studiums und insbesondere auch während der Erstellung dieser Arbeit zu jeder Zeit unterstützt und motiviert hat.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Malte Wolfram Vetterlein
Geburtsdatum/-ort: 17. Juni 1986 in Düsseldorf

Studium der Humanmedizin:

10/2006-05/2013 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2013 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2013 Approbation

Praktisches Jahr:

02/2012-06/2012 Klinik und Poliklinik für Urologie
06/2012-08/2012 Klinik für Orthopädie, Unfall- und Handchirurgie
Universitätsklinikum Würzburg
08/2012-10/2012 Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
Klinikum Aschaffenburg
10/2012-01/2013 Department of Medicine
Victoria Hospital Wynberg
University of Cape Town, South Africa

Schulische Ausbildung:

1992-1996 Städt. katholische Grundschule Königshof, Krefeld
1996-2005 Maria-Sibylla-Merian-Gymnasium Krefeld
2005 Abitur

Stipendien:

2009-2013 Studienstiftung des deutschen Volkes
2011 Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Beruf:

seit 12/2013 Klinik und Poliklinik für Urologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Publikationen

Originalartikel

Pelz JO, **Vetterlein M**, Grimmig T, Kerscher AG, Moll E, Lazariotou M, Matthes N, Faber M, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Gasser M.

Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis: role of heat shock proteins and dissecting effects of hyperthermia. Ann Surg Oncol. 2013;20(4):1105-13. DOI: 10.1245/s10434-012-2784-6.

Kongressbeiträge

Vetterlein M, Lazariotou M, Frank M, Frank N, Germer CT, Pelz JO, Waaga-Gasser AM, Gasser M.

Heat Shock Protein (HSPs) and Multidrug Resistance (MDR) gene upregulation in different adenocarcinomas—characteristics in patients with peritoneal carcinosis assigned to HIPEC therapy. Langenbecks Arch Surg (2010) 395: 769. DOI: 10.1007/s00423-010-0676-4.

14. Chirurgische Forschungstage. Rostock, 23.-25.09.2010.

Gasser M, **Vetterlein M**, Lazariotou M, Grimmig T, Germer CT, Pelz JO, Waaga-Gasser AM.

Hsp and MDR gene upregulation during hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinosis. J Clin Oncol. 2011;29(15_suppl):e21072-e. DOI: 10.1200/jco.2011.29.15_suppl.e21072.

American Society of Clinical Oncology Annual Meeting. Chicago, 03.-07.06.2011.

Vetterlein M, Lazariotou M, Germer CT, Pelz JO, Waaga-Gasser AM, Gasser M.

Preisträgersitzung „Otto Goetze-Preis“.

Untersuchung der molekularen Veränderungen bei der hyperthermen isolierten intraperitonealen Chemoperfusion (HIPEC) zur Behandlung der Peritonealkarzinose. Unter: http://www.mcn-nuernberg.de/vbc2011/88vbc-abstracts/V_Freie_Vort_00023.pdf (abgerufen am 03.03.2017).

88. Jahrestagung Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V. – 100 jähriges Jubiläum des VBC, München, 20.-23.07.2011.

Vetterlein M, Lazariotou M, Grimmig T, Germer CT, Pelz JO, Waaga-Gasser AM, Gasser M.

Untersuchung der molekularen Veränderungen bei der hyperthermen isolierten intraperitonealen Chemoperfusion (HIPEC) zur Behandlung der Peritonealkarzinose. Z Gastroenterol. 2011;49(08):V111. DOI: 10.1055/s-0031-1285247.

66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie – 5. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft – für Allgemein- und Viszeralchirurgie gemeinsam – mit den Arbeitsgemeinschaften der DGAV – Viszeralmedizin 2011, Leipzig, 14.-17.09.2011.

Vetterlein M, Grimmig T, Lazariotou M, Matthes N, Faber M, Pelz JO, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Gasser M.

Hyperthermia induces upregulated heat-shock proteins and multidrug resistance in patients with peritoneal carcinosis of different tumor origin assigned to HIPEC therapy. Langenbecks Arch Surg (2011) 396: 881. DOI: 10.1007/s00423-011-0830-7.

15. Chirurgische Forschungstage. Dresden, 22.-24.09.2011.

Vetterlein M, Lazariotou M, Grimmig T, Matthes N, Faber M, Germer CT, Pelz JO, Waaga-Gasser AM, Gasser M.

Abstract 0230. Molecular repair mechanisms and chemoresistance in hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinosis. J Cancer Res Clin Oncol 2012;138(Suppl 1):43. DOI: 10.1007/s00432-011-1144-4.

30. Deutscher Krebskongress. Berlin, 22.-25.02.2012.

Vetterlein M, Lazariotou M, Grimmig T, Germer CT, Pelz JO, Waaga-Gasser AM, Gasser M.

Definierte Hyperthermie entscheidend für zytotoxische Effekte bei der hyperthermen intraperitonealen Chemoperfusion (HIPEC) bei Patienten mit isolierter Peritonealkarzinose. Z Gastroenterol. 2012;50(08):K361. DOI: 10.1055/s-0032-1324295.

67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie – 6. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie gemeinsam mit den Arbeitsgemeinschaften der DGAV – Viszeralmedizin 2012. Hamburg, 19.-22.09.2012.

Moll EM, **Vetterlein M**, Grimmig T, Lazariotou M, Pelz JO, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Gasser M.

HIPEC induces different cytotoxic effects on tumor cells dependent on hyperthermic conditions.

16. Chirurgische Forschungstage. Regensburg, 04.-06.10.2012.

Gasser M, **Vetterlein M**, Moll E, Grimmig T, Lazariotou M, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Pelz JO.

Effect of perfusion temperature and chemotherapy on tumor cell death after HIPEC for treatment of patients with peritoneal carcinomatosis. DOI: 10.3205/13dgch308.

Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 130. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. München, 30.04.-03.05.2013.

Gasser M, Lazariotou M, **Vetterlein M**, Grimmig T, Germer CT, Pelz JO, Waaga-Gasser AM.

Abstract 881: Hyperthermic isolated intraperitoneal chemoperfusion (HIPEC) for treatment of patients with peritoneal carcinosis - Analysing negative influencing cellular mechanisms in the tumor cells. Cancer Research. 2014;73(8 Supplement):881. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2013-881.

American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting. Washington D.C., 06.-10.04.2014.