

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
(Lehrstuhl für Toxikologie)
Vorstand: Prof. Dr. W .K. Lutz

**Über die Beteiligung der Hitzeschockproteine HSP27 und
HSP70 an einer Resistenz/Resistenzentwicklung unter CMF-
Therapie**

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

vorgelegt von

Veronika Wassermann
aus Stegen bei Freiburg

Würzburg, September 2004

Referentin: Frau Prof. Dr. H. Stopper
Koreferent: Herr Prof. Dr. J. Dietl
Dekan: Herr Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2005

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Hitzeschockproteine	1
1.1.1. Die Familie der kleinen Hitzeschockproteine (HSP27)	2
1.1.2. Die Familie der Hitzeschockproteine 70	3
1.1.3. HSP70/HSP27 und Mamma-Karzinome	5
1.2. Tumorthherapie durch Chemotherapeutika	5
1.2.1. Das CMF-Protokoll in der Therapie des Mamma-Karzinoms	6
1.3. Resistenzen und Hitzeschockproteine	7
2. Zielsetzung der Arbeit	10
3. Material und Methoden	12
3.1. Material	12
3.1.1. Geräte	12
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	13
3.1.3. Chemikalien	14
3.2. Methoden	18
3.2.1. Zellkultur	18
3.2.1.1. Zelllinie: L929-Maus-Fibroblasten	18
3.2.1.2. Routinekultur der L929-Maus-Fibroblasten	19
3.2.1.3. Kryokonservierung von Zellen	19
3.2.1.4. Auftauen von Zellen	20
3.2.1.5. Mykoplasmentest auf Kontamination der Zellkultur	20
3.2.1.6. Zellzählung	20
3.2.1.7. Behandlungsprotokolle der Zellen	21
3.2.2. Gesamtproteingewinnung	22
3.2.2.1. Photometrische Bestimmung der Proteinmenge mit Pyrogallol-Rot (Methode nach van der Heyden)	22
3.2.2.2. Photometrische Bestimmung der Proteinmenge mit BCA	23
3.2.3. Immunoblotting	23
3.2.4. Zytotoxizitätsnachweis: DNA-Bestimmung	25
3.2.5. Zytotoxizitätsnachweis: Laktat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH-Efflux)	26
3.2.6. Statistik	26

4. Ergebnisse	27
4.1. Charakterisierung der Zelllinien	27
4.1.1. HSP27/HSP70-Expressionskontrolle und Expressions-Induzierbarkeit durch Hitzeschock	27
4.1.1.1. <i>hsp27</i> -Expressionkontrolle in L929-Mausfibroblasten	28
4.1.1.2. Untersuchung der HSP70-Expression in L929-Mausfibroblasten	28
4.2. Behandlung der L929-Fibroblasten mit den Substanzen des CMF-Protokolls	29
4.2.1. Zellexposition mit dem Antimetaboliten Methotrexat (Mtx)	30
4.2.1.1. Untersuchung der HSP27/HSP70-Induktion durch Mtx	31
4.2.1.2. Untersuchungen zu Zytoprotektivität gegen Mtx durch HSP27 und/oder HSP70	33
4.2.2. Zellexposition mit dem Pyrimidin-Basen-Antagonisten 5-Fluorouracil	38
4.2.2.1. Untersuchung der HSP27/HSP70-Induktion durch 5-FU	38
4.2.2.2. Untersuchungen zu Zytoprotektivität gegen 5-FU durch HSP27 und/oder HSP70	40
4.2.3. Experimente mit Cyclophosphamid	44
5. Diskussion	45
5.1. Charakterisierung der L929-Mausfibroblasten	45
5.2. Wahl der geeigneten Medikamentenkonzentrationen für die in vitro-Experimente	46
5.3. Untersuchung der HSP27/HSP70-Induzierbarkeit durch Methotrexat und 5-Fluorouracil	47
5.4. Zytoprotektivität gegen Methotrexat/5-FU durch Hitzeschockproteine	50
5.4.1. Schutz durch HSP27	51
5.4.2. Schutz durch HSP70	52
5.4.3. Schutz durch Ko-Expression (HSP27+HSP70)	53
5.5. Substanzabhängige HSP27/HSP70-induzierte Resistenz	54
5.6. Anmerkungen zu den Versuchen mit dem alkylierenden N-Lost-Derivat Cyclophosphamid als Teil des CMF-Protokolls	56
6. Zusammenfassung	57
7. Literaturverzeichnis	60
8. Abkürzungsverzeichnis	74

1. Einleitung

1.1. Hitzeschockproteine

Das Phänomen Hitzeschock wurde das erste Mal zu Beginn der 60er Jahre von Ritossa et al. (1962) an der Taufliege *Drosophila melanogaster* im Rahmen des Studiums sogenannter „Puff-Muster“ des Riesenchromosoms (aufgefalteter Chromosomenbereich, in dem die Gene zur Transkription präsentiert werden) beschrieben. Die Gruppe wies im Anschluß an eine Temperaturerhöhung ein neues Muster solcher Verdickungen nach. Tissieres et al. (1972) fanden heraus, dass gleichzeitig mit diesen „Puffs“ eine bestimmte Gruppe von Proteinen in großer Menge gebildet wurden. Der Hitzeschock zog eine erhöhte Expression einer Reihe von Proteinen nach sich, die zuvor nur in kleinen Mengen synthetisiert wurden und die Zellen vor einem erneuten Hitzeschock schützten („Phänomen der erworbenen Thermotoleranz“). Sie nannten diese Proteine Hitzeschockproteine (HSP). Gleichzeitig wurde die Synthese anderer Proteine reduziert. Es konnte nachgewiesen werden, daß die alleinige Überexpression von HSP27 schon eine ausreichende Bedingung für eine solche Thermotoleranz ist. Neben dem ursprünglich entdeckten Streßfaktor Hitze als Auslöser führen auch eine Reihe anderer Reizzustände zur Expression solcherlei Proteine. Diesbezüglich ist exogener Streß wie beispielsweise UV, Medikamente und Schwermetalle, aber auch physiologische Bedingungen wie Hormonexposition, der Zellzyklus, Wachstumsfaktoren sowie auch pathophysiologische Zustände im Sinne von Infektionen, Entzündungen, Anoxie oder Mangelernährung zu nennen.

Die Hitzeschockproteine wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht benannt. Proteine mit ähnlichen Molekulargewichten und ähnlichen Eigenschaften wurden in Familien zusammengefaßt. So unterscheidet man u.a. HSP90, HSP70/72, HSP20/30 und Ubiquitin (7-8 kD).

Craig (1985) konnte für das HSP70 eine über 50-prozentige Übereinstimmung der Gen-Sequenz in Bakterien, Hefen und der Taufliege finden. Insgesamt handelt es sich bei den HSPs also um eine Gruppe von Proteinen mit hochkonservierter Sequenz. Dies läßt darauf schließen, daß es sich bei der Induktion dieser Proteine um eine in der Evolution (phylogenetisch) konservierte Reaktion verschiedenster Organismen nicht nur auf Hitzeeinwirkung, sondern auch auf andere Formen von subletalem Umgebungsstreß handelt (Brenndorf und Bielka, 1997). Gesichert ist, dass die Synthese von HSPs Teil

einer adaptiven Streßantwort ist (Carper et al., 1987; Ciocca et al., 1995; Morimoto et al., 1990; Morimoto et al., 1994; Tacchini et al., 1993; Bohen et al., 1995), die auch Änderungen in der Zellmorphologie, der Chromatinstruktur und des Zytoskeletts mit einschließt.

Die schnelle und transiente Induktion von Hitzeschockproteinen wird von Hitzeschock-Faktoren (HSF), spezifischen Transkriptions-Faktoren, reguliert (Ciocca et al., 1993). Es werden verschiedene Hitzeschockfaktoren beschrieben: HSF1 kontrolliert die streßabhängige Induktion, HSF2 kontrolliert die entwicklungsspezifische Induktion und HSF3 kommt zelltypspezifisch vor und kontrolliert ebenfalls die streßabhängige Induktion. Diese HSFs binden an Hitzeschock-Elemente (HSE) der DNA, und erst die Bindung HSE/HSF löst die Transkription der *hsp*-Gene aus (Sorger, 1991).

In jeder HSP-Familie gibt es Proteine, die konstitutiv exprimiert, und andere, die nur nach Streßeinwirkung induziert werden.

1.1.1. Die Familie der kleinen Hitzeschockproteine (HSP27)

Für die Hitzeschockproteine 27 mit einer Molekularmasse von 25-30kDa gibt es in der Literatur unterschiedliche Bezeichnungen, so werden sie auch kleine HSPs (small HSP), HSP28 oder HSP24 genannt. Unter physiologischen Bedingungen werden diese Proteine in relativ kleinen Mengen konstitutiv synthetisiert, werden aber nach Streßexposition 10 bis 20fach hochreguliert (Welch, 1992).

Die kleinen HSPs weisen durchgehend eine Sequenzähnlichkeit mit α -Cristallin, einem Protein der Augenlinse auf (Mehlen und Arrigo, 1994; Gaestel et al., 1998). HSP27 wurde im Zytosol und dort zum Teil in der Nähe des Golgi-Apparates gefunden. Nach Hitzeschock, aber auch nach Noxenexposition mit TNF verändert es seine Lokalisation in der Zelle und wird perinukleär oder im Nukleus nachgewiesen (Arrigo et al., 1988; Mehlen und Arrigo 1994; Mehlen et al., 1995). In vitro findet man diese kleinen HSPs bei der Renaturierung denaturierter Polipeptide in einer ATP-unabhängigen Weise involviert (Jakob et al., 1993). Man schließt daraus, dass sie als molekulare Chaperone während Streß agieren und damit eventuell einen anderen Wirkungsbereich haben als beispielsweise die HSP70. Auffällig im Rahmen von Aktivierungs- und Deaktivierungsprozessen ist eine rasche Phosphorylierung der HSP27 als frühe Zellantwort (Arrigo, 1990; Benndorf et al., 1994; Mehlen et al., 1995). Vier Formen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten werden beschrieben, wobei drei der

Isoformen einen unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus repräsentieren (Welch, 1995). Diese Phosphorylierung wird durch die MAPKAP-Kinase 2 katalysiert (Benndorf et al., 1992; Engel et al., 1995; Huot et al., 1995). Bekannt ist des weiteren, dass die HSP27-Regulation durch Transkriptionsfaktoren erfolgt.

In mit dem humanen *hsp27*-Gen transfizierten und somit HSP27 konstitutiv exprimierenden Mauszellen konnte eine signifikant höhere Thermotoleranz gegenüber den nicht transfizierten Kontrollzellen beobachtet werden (Landry et al., 1989; Arrigo und Landry, 1994). In kultivierten Brustkrebszellen wies man eine Regulation des HSP27-Gens durch Estradiol und Hitzeschock nach (Fuqua et al., 1998). In MDA-MB231-Brustkrebszellen, die keine Östrogenrezeptoren besitzen, konnte HSP27 durch Hitze, nicht aber durch Östrogen stimuliert werden.

Allgemein wird für HSP27 eine besondere zytoprotektive Wirkung durch Schutz vor oxidativem Streß postuliert.

HSP27 wurde in verschiedensten Zellen und Krebszellen gefunden, insbesondere Brust, Uterus, Zervix, Haut, Plazenta.

1.1.2. Die Familie der Hitzeschockproteine 70

Hinter dieser Bezeichnung verbirgt sich eine Gruppe von Proteinen aus einer Genfamilie, verschiedene Formen werden beschrieben (Welch, 1992). Bei den zytoplasmatisch und nukleär lokalisierten Formen unterscheidet man zwischen HSP72 als induzierbare und HSP73 als konstitutiv synthetisierte Form. Daneben benennt man das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte HSP78 (BiP=binding Protein oder GrP=Glucose regulated Protein) sowie ein mitochondriales HSP70 (Carbajal et al., 1993).

Aufgrund der besonders guten Induzierbarkeit gehört die HSP70-Familie zu den bestuntersuchten Hitzeschockproteinen. Die zytosolische Form (HSP72/73) ist in die verschiedenen Stadien der Proteinreifung involviert. Weiter assistieren Mitglieder der HSP70-Familie durch Bindungsstabilisierung bei der Proteinfaltung reifender Polypeptide (Velazquez et al., 1984; Ananthan et al., 1986; Frydman et al., 1994; Kabakov und Gabai, 1993) und bei der posttranslationalen Translokation neu synthetisierter Proteine vom Zytosol ins ER oder in die Mitochondrien (Pfanner et al., 1991; Welch 1992; Wickner, 1994; Stuart et al., 1994; Ungermann et al., 1994). Es handelt sich hierbei um ATP-abhängige Prozesse. HSP70 vermögen abnorm gefaltete

Proteine zu erkennen, Komplexe mit ihnen zu bilden, sie in die korrekte Konformation zu bringen oder aber der Lyse zuzuführen, bevor die Zelle Schaden nimmt. Neueste Forschungsergebnisse identifizierten für HSP70 die Funktion der Hemmung von Zelltod-assoziiierter Permeabilisation von Lysosomen (Nylandsted et al., 2004). Beschrieben werden für HSP70 auch Interaktionen mit p53 und c-myc. HSP70 und c-myc akkumulieren im Zellkern, möglicherweise wird c-myc durch HSP70 hier durch Bindung in einem inaktiven Zustand gehalten (Henriksson et al., 1992). In intakten Zellen bildet HSP70 bekanntermassen selektiv Komplexe mit einem mutierten p53 (Hainaut und Milner, 1992). Von Lane et al. (1992) wird eine dauerhafte Bindung an eine solche mutierte Form beschrieben. Durch die Bindung kann p53 nicht aktiviert werden und führt in Folge zur Transformation der Zelle, in der das mutierte p53 mit einer erhöhten Lebensdauer vorliegt.

Diese physiologischen Funktionen als Chaperon erklären die erhöhte Expression von induzierbarem HSP70 nach unterschiedlichen Arten von Streß, neben Hitzeschock auch in Folge anderweitiger Noxenexposition, insbesondere wenn man davon ausgeht, daß es unter Streß zu Proteindenaturierungen und falscher Proteinfaltung kommt.

Von Rabindran et al. (1994) wird postuliert, daß der Spiegel intrazellulären HSPs, speziell HSP70, eine Grundlage für einen autoregulatorischen Mechanismus ist, indem die Zelle den thermalen Streß mißt und so die Synthese der HSPs reguliert.

Patienten mit Brustkrebs ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten, in deren Tumoren eine erhöhte HSP70-Expression nachgewiesen wurde, hatten eine signifikant kürzere krankheitsfreie Überlebensphase (Ciocca et al., 1993a und 1993b), was für eine Aggressivität der HSP70-enhaltenden Tumorzellen und einen konsekutiven Überlebensvorteil dieser Zellpopulation spricht. Des weiteren wurden bei Untersuchungen mit ähnlichem Patientenkollektiv Korrelationen zum einen zwischen im Zytosol vorhanden HSP70 und Überlebensphase/krankheitsfreie Überlebensphase, zum anderen zwischen biologischen Merkmalen maligner Mamma-Karzinome und nukleären HSP70 gefunden (Thanner et al., 2003).

HSP70 wird des weiteren als möglicher Biomarker in Prostata-Karzinomen diskutiert, die klinische Bedeutung ist jedoch ungewiß (Abe et al., 2004).

1.1.3. HSP70/HSP27 und Mamma-Karzinome

Sowohl HSP70 als auch HSP27 werden erheblich hochexprimiert in den Östrogen-abhängigen Geweben des weiblichen Reproduktionstraktes gefunden. Für HSP70 sind signifikante Korrelationen mit Rezidivraten, Rückfallquoten, Malignitätsgrad und DFS in soliden Tumoren beschrieben (Chiocca et al., 1993a; Thanner et al., 2003), es gibt Hinweise für Interaktionen von HSP70 mit c-myc (Transformation c-myc→+HSP70) und p53 (s.o.), in mehr als 60% der Mamma-Ca-Zellen findet sich ein vergleichbarer Spiegel HSP70/c-myc-Genprodukt. Auch HSP27 ist in 70-90% der Östrogen-positiven Tumoren bekanntermaßen ko-lokalisiert, hemmt das Zellwachstum und induziert eine erhöhte Differenzierung. Thor et al. (1991) konnte eine HSP27-Überexpression in Brustkrebszellen und Brustkrebsgewebe mit einer gesteigerten Aggressivität der Tumoren korrelieren. Eine Korrelation bezüglich einer schlechteren Prognose der Subgruppe der ÖR-positiven HSP27-positiven verglichen mit der der ÖR-positiven HSP27-negativen Tumore wird jedoch nur sehr vorsichtig diskutiert. Neben HSP27 und HSP70 scheinen auch andere HSPs wie HSP105 in verschiedenen Tumoren wie auch dem Mamma-Karzinom zu finden zu sein (Kai et al., 2003).

1.2. Tumorthherapie durch Chemotherapeutika

Maligne Neoplasien sind durch infiltratives und destruierendes Wachstum sowie die Gefahr der Metastasierung gekennzeichnet. Tumorzellen unterliegen im Gegensatz zu nicht entarteten Zellen nicht mehr dem normalen Teilungsrhythmus, sondern sind der Wachstumsregulation entzogen, haben eine höhere Zellteilungsrate. Die Ursache für das Versagen der Wachstumssteuerung läßt sich schlagwortartig fassen als „Akkumulation multipler genetischer Läsionen“. Dabei kann es sich um genetische Defekte handeln, die eine gesteigerte Proliferation induzieren und/oder eine unzureichende Elimination von Zellen mit fehlerhafter DNA-Reduplikation nach sich ziehen.

Antineoplastische Substanzen wirken auf Zellen mit schnellem Teilungsrhythmus, in erster Linie wird das Wachstum von Zellen mit hoher Proliferationsgeschwindigkeit auf unterschiedliche Weise gehemmt. Die übliche Bezeichnung ist Zytostatika, obwohl es durchaus auch zu zytoziden Wirkungen kommen kann. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Störungen eines regulären Ablaufs der Mitose den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten können.

Im Laufe der Behandlung mit Zytostatika entwickeln sich regelmäßig zunehmende Resistenzen gegenüber der betreffenden Substanz bzw. Kombination der angewendeten Substanzen. Hierdurch wird die Therapie im Laufe der Anwendung immer weniger wirksam und verliert an Wert. Solcherlei Resistenzentwicklungen treten bei Substanzen unterschiedlicher Wirkungsmechanismen auf, ein einheitlicher Grund ist bislang nicht gesichert. Sie stellen ein großes Problem bei der erfolgreichen Therapie solider Tumoren dar.

Mit dem Ziel, Therapieerfolg-reduktive Resistenzprobleme bei Monotherapien weitmöglichst zu umgehen wird eine zytostatische Therapie häufig als Polychemotherapie (Einsatz von einer Kombination geeigneter Chemotherapeutika unterschiedlicher Wirkungsmechanismen) durchgeführt, um ein Therapieoptimum durch verschiedene Angriffspunkte im Zellteilungsrythmus zu erreichen.

Neue Forschungsbemühungen zielen auf das Heranziehen von Hitzeschockproteinen als Biomarker und Zielmolekül für antitumoröse Immuntherapien (Kai et al., 2003; Abe et al., 2004).

1.2.1. Das CMF-Protokoll in der Therapie des Mamma-Karzinoms

Ein gängiges Standardschema für die zytostatische Therapie des Mamma-Karzinomes ist das sogenannte CMF-Schema, ein Protokoll bestehend aus drei Komponenten verschiedener Substanzklassen: Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluoruracil.

Cyclophosphamid (Endoxan®):

Cyclophosphamid, ein Stickstoff-Lost-Derivat, zählt zu den alkylierenden Zytostatika, deren phasenspezifische Wirkung vor allem auf der Alkylierung von Nukleinsäuren beruht. Nach Aktivierung zu Carbokationen reagieren diese Stoffe außer mit Proteinen unter anderem mit dem Guanin der Desoxyribonukleinsäuren und führen zu multiplen DNA-Veränderungen (cross-links, abnormer Basenpaarung, Spaltung von DNA-Ketten etc.). Dadurch wird die Nukleinsäure-Reduplikation und damit die Zellteilung beeinträchtigt. Die in vitro nahezu unwirksame Verbindung wird erst im Organismus in die eigentliche Wirkform umgewandelt („Giftung“). In der Leber erfolgt die Hydroxylierung zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, das mit der ringoffenen Form, dem Aldophosphamid, im Gleichgewicht steht. Aus diesem entsteht nicht-enzymatisch unter Abspaltung von Acrolein, die am stärksten alkylierende Verbindung, das N, N-Bis(2-

chlorthethyl)-phosphorsäurediamid. Alle weiteren Metaboliten besitzen keine oder nur geringe zytotoxische Aktivität.

Methotrexat:

Methotrexat, ein Antimetabolit, bietet als Folsäureantagonist ein „falsches“ Substrat für das Enzym Dihydrofolsäure-Reduktase. Dieses Enzym ist an der Bildung der Tetrahydrofolsäure beteiligt, die wiederum für die Bildung von Purinkörpern und Thymidin notwendig ist. Anstelle der 4-OH-Gruppe in der Folsäure trägt Methotrexat eine 4-NH₂-Gruppe. Es lagert sich bei wesentlich höherer Affinität an die Dihydrofolsäure-Reduktase an und hemmt damit die Proliferation von Zellen.

5-Fluorouracil (5-FU):

5-FU, ebenfalls eine antimetabolisch wirksame Substanz, muß mit Ribose bzw. Desoxyribose versehen und phosphoryliert werden, um Wirksamkeit zu erlangen. Es interferiert als Pyrimidin-Basen-Antagonist (Uracil bzw. Thymidin) an unterschiedlichen Stellen mit dem Nukleinsäure-Stoffwechsel, so blockiert es nach Umwandlung in 5-Fluor-desoxyuridin-monophosphat die Thymidilatsynthetase und somit die Methylierung von Desoxyuridylsäure zu Thymidylsäure. Die Folge ist eine Hemmung der DNA-Synthese. Daneben wird 5-Fluor-desoxyuridin-monophosphat als falscher Baustein in die RNA eingebaut.

1.3. Resistenzen und Hitzeschockproteine

Die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika stellt ein großes Problem bei der erfolgreichen Therapie solider Tumoren dar. Die Suche nach den molekularen Grundlagen dieser Resistenz zeigt ein komplexes Bild. Beispielsweise kann für Dihydrofolsäure-Reduktase-Hemmstoffe wie Methotrexat die zelluläre Aufnahme herabgesetzt sein oder die Ausstattung mit der Reduktase wesentlich zunehmen. Für alkylierende Substanzen gilt, daß die entarteten Zellen „lernen“, den gesetzten Defekt schneller zu reparieren. Für Purin- und Pyrimidin-Antimetabolite hingegen, die ja erst in der Zelle durch ein Enzym, die Phosphoribosyl-Transferase, in den eigentlichen Wirkstoff umgewandelt werden müssen, gilt, daß Mutanten ohne dieses Enzym übrig bleiben und dann wieder ungehemmt proliferieren (Lüllmann/Mohr, Pharmakologie und Toxikologie, 1999). Offenbar sind auch mehrere Gene, z.B. solche aus der bekannten

Gruppe der *mdr*-Gene (s.u.), wie auch Störungen von Signaltransduktionswegen (Apoptoseinhibition) beteiligt. Besonders interessant ist das Phänomen der Resistenzentwicklung gegen gleich mehrere Zytostatika (Mehrfachresistenz, MDR=multiple drug resistance) (Kasimir-Bauer et al., 2002; Um et al, 2003; Tainton et al, 2004). Grundlage dieser unspezifischen Resistenz scheint ein vermehrter Auswärtstransport zu sein, so daß die intrazelluläre Pharmakumkonzentration unterschwellig bleibt. Verantwortlich ist ein intramembranales Glykoprotein, das infolge von Mutationen mit Genvermehrung („Genamplifikation“) in erhöhter Menge gebildet wird.

Auch einige Vertreter aus der Gruppe der HSP tragen zu diesem Phänomen der Resistenzentwicklung bei. Eine Reihe von Wirkungswegen der Hitzeschockproteine mit dem Ziel Zellschutz sind denkbar, es bieten sich verschiedene Angriffspunkte: So vermögen HSPs in ihrer Funktion als „Chaperon“ (=Begleiter) Proteinstabilisierungen analog DNA-Reparaturenzymen vorzunehmen, Schutz vor fehlerhafter Faltung zu bieten, abnorm gefaltete Proteine zu erkennen, zu renaturieren und zu transportieren. Auch vermögen HSPs bei der Sekretion (interzellulärer Transport) und bei der Präsentation von Proteinen als Antigene auf der Zelloberfläche mitzuwirken. HSPs führen des weiteren Zellmaterial durch Ubiquitin-Bindung und durch Abbau durch Proteasen der Lyse zu (Degradation). Bekannt ist auch, daß HSPs in ihrer Wirkung als oxidativer Puffer Schutz vor oxidativem Stress bieten (Gluthation-S-Transferase hält Gluthation und andere Sulfhydryde in reduziertem Zustand) und durch Actin-Interaktion (bekannt für HSP27) in die Zytoskelettorganisation eingreifen, was möglicherweise eine Wachstumshemmung zur Folge hat. Auch weiß man vom Eingriff in Signaltransduktionswege via MAPKAP-Kinasen. Nicht zu vergessen bei Betrachtung von Zusammenhängen zwischen Hitzeschockproteinen und Resistenzen ist die Interaktion mit Tumorsuppressorgenen (*p53*) und Oncogenen (*c-myc*) und hierdurch möglicherweise ursächliche Beteiligung an der Tumorentstehung. HSP70 interagiert mit Regulatoren des Zellzyklus wie *c-myc* und *p53*; *c-myc* wiederum induziert die Expression von HSP70 (Taira et al. (1992)). Ein wesentlicher Einfluss von HSPs auf die Expansion maligner Zellen während Tumorentstehung und Tumorwachstum ist also durchaus denkbar. Möglicherweise erfolgt also die Vermittlung eines zytoprotektiven Effektes gegenüber verschiedensten toxischen Ereignissen über einen Eingriff in den Zellzyklus und die Interaktion mit zellulären Kinasen.

Da HSP-Expression als ein Überlebensfaktor für „gestreßte“ Zellen interpretiert wird, liegt ein Zusammenhang mit Unterdrückung der Apoptose, des programmierten Zelltods, nahe. So fanden bereits 1992 Miglioratti et al., daß eine Hitzevorbehandlung Thymozyten vor der Glukokortikoid-induzierten Apoptose schützt. *hsp27*-transfizierte Zellen zeigen eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-Induktion durch TNF α und Etoposid (Mairesse et al., 1998). Neuere Arbeiten befaßten sich jetzt auch mit den molekularbiologischen Aspekten. Jäätelä et al. (1998) wiesen nach, daß eine HSP70-Expression die Apoptose downstream der sog. Degradationsphase, also nach Aktivierung der Kaspasen (CPP32) verhindern. Frühe Merkmale der Apoptose waren dabei durchaus noch nachzuweisen. Ein weiterer Brückenschlag zwischen HSPs und Apoptoseregulation gelang mit der Entdeckung von BAG-1 als Kofaktor von HSP70. Dies gilt als ein anti-apoptotisches Protein, welches mit Bcl-2 bei Apoptoserepression kooperiert (Hohfeld (1998), Demand et al., (1998), Townsend et al., 2003)). Substanzen mit kanzeroprotektiven Eigenschaften wie Quercetin, CAPE und etliche pflanzliche Flavonoide erhöhen die Apoptoserate und inhibieren die Induktion von HSPs bzw. interagieren mit dem HSF.

Ein Zusammenhang zwischen der Expression des HSP27 und der Doxorubicin-Resistenz von Tumorzellen ist bereits mehrfach nachgewiesen. Ciocca et al. (2003) fand im Tierversuch Hinweise auf Beteiligung von sowohl HSP70 als auch HSP25 (im Nager homolog dem humanen HSP27) an Resistenzentwicklungen gegen Doxorubicin und Lovastatin.

Eine erhöhte HSP-Expression wurde in verschiedenen Tumoren nachgewiesen, so HSP27 und HSP70 in Hirntumoren (Kato M. et al., (1992), Kato S et al., (1993)), HSP70 in Zervixtumoren (Ralhan R und Kaur J., (1995)) sowie HSP60 (Kimura E. et al., (1993)) und HSP27 (Geisler et al., (1998)) in Ovarialkarzinomen.

Die erhöhte HSP-Expression scheint also eng mit einer erhöhten Zellproliferation bzw. einem hohen Malignitätsgrad assoziiert zu sein. Die Interaktionen von HSPs mit Proto-Oncogenen bzw. Tumorsuppressorgenen deuten mehr auf einen funktionellen Zusammenhang während der Tumorentstehung hin als auf eine bloße Korrelation zwischen den beiden Endpunkten HSP-Expression und Tumor. Mehrere Studien an Brustkrebspatienten deuten die Rolle der HSPs als prognostischen Faktor an, die Aussagen sind jedoch nicht einheitlich.

2. Zielsetzung der Arbeit

Hitzeschockproteine sind Teil eines durch Noxen induzierten Mechanismus, welcher Schutz vor weiterer Noxenexposition verleiht, also die entsprechenden Zellen im Unterschied zu nicht exponierten Kontrollzellen zu überleben befähigt. Es kommt nach einem Streßereignis zu einer Veränderung von Zelltod unter nachfolgenden Bedingungen, z.B. Verhütung von Apoptose (physiologischer Zelltod). Tumorthherapie mittels Zytostatika stellt eine „kontrollierte Apoptose“ dar. Ziel dieser Therapie muß es also folglich sein, eine HSP-Induktion zu vermeiden, da eine solche den Therapieerfolg und Benefit für den Patienten schmälert.

Die Exposition einer Tumorzelle mit einem chemotherapeutisch wirksamen Medikament bedeutet für diese Zelle toxischen/oxidativen Streß, den sie nur durch Induktion entsprechender Abwehrmechanismen überleben kann. Diese Mechanismen haben letztlich einen wesentlichen Einfluß auf die Wirksamkeit des Medikamentes und Profit des Patienten durch die ihm angebotene Therapie. Eine frühe adaptive Zellantwort von Säugerzellen auf toxische Einflüsse stellt die Expression von Hitzeschockproteinen dar. Den Fokus der vorliegenden Untersuchungen stellen einerseits diejenigen Substanzen dar, welche heutzutage in der Therapie des Mamma-Karzinoms eingesetzt werden, den drei Einzelsubstanzen des CMF-Protokolls Methotrexat, 5-Fluorouracil und Cyclophosphamid, andererseits die Hitzeschockproteine mit der höchsten bekannten Bedeutung für Tumorstadium.

In einem ersten Schritt soll *in vitro* mit einem Zellsystem, welches durch Transfektion mit dem humanen *hsp27*-Gen bei bekannter HSP70-Induzierbarkeit als einfaches isoliertes Zellsystem ein gutes Werkzeug zur spezifischen Untersuchung dieser beiden Proteine darstellt, untersucht werden, inwieweit sich diese speziellen Proteine durch die unterschiedlichen Substanzgruppen des CMF-Protokolls induzieren lassen. Es soll also nach einer adaptiven Zellantwort in Form einer Induktion von HSP27 und HSP70 nachfolgend einer Noxenexposition gesucht werden.

In einem zweiten Schritt soll untersucht werden, ob die für diese beiden HSPs postulierte zytoprotektive Eigenschaften auch für Zytostatika gelten. Es soll überprüft werden, inwieweit Chemotherapeutika unter dem Einfluß von HSP70 und HSP27

stehen, also inwieweit die Expression von HSP27 und HSP70 einen Zellschutz gegen toxischen Streß (durch CMF) in den verwendeten L929-Mausfibroblasten darstellen kann. Es soll nach einer Korrelation zwischen Protein und einer Interaktion mit dem Medikament gesucht werden, um die Bedeutung der HSPs bezüglich einer adaptiven protektiven Zellantwort auf toxischen Streß durch Zytostatikabehandlung einschätzen zu können. Ziel ist es, der Frage nach der Ursache-Wirkungs-Beziehung ein Stück näher zu kommen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Elektrophorese-Zubehör

Elektrophoresekammer:	Mighty Small II SE 250/SE; HOEFER Scientific Instruments, San Francisco, CA., USA
Gel-Trockenrahmen	Promega
Gießständer für IEF-Gele	HOEFER Scientific Instruments, San Francisco, CA., USA
Semi-Dry Blotgerät	Trans-Blot Smi-Dry, Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD, München)
Spannungsquellen	1. Electrophoretic Power Supply-EPS 3500 (Pharmacio Biotech AB, Uppsala, S) 2. Power Supply Model 1000/500 (BIO RAD, München)
Inkubationsschüttler	KL2 (Edmund Bühler, Bodelshausen)

Geräte zur Sterilisation

Autoklav	Dampfautoklav (Tecnomat Deutschland GmbH, Fernwald)
Sterilisator	Trockensterilisationsschrank (Mettler GmbH & Co KG, Schwabach)

Photometer

Fluoreszenz-Photometer	Kontron SFM 25 (Kontron Instruments, Eching)
Photometer	Kontron UVIKON 860 (Kontron Instruments, Eching)

Western-Blot: Bildverarbeitung und Dichte-Messung

Scanner, Laser-Densitometer Computing Densitometer	(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA., USA)
Bildscanner	Studio Star, Agfa

Zellkultur-Geräte

Steril- und Sicherheitswerkbank	Anrir ZKB (Anthos Mikrosysteme GmbH, Siegburg)
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus B 5060 EK/CO2 (Heraeus, Hanau)

Zentrifugen

Tisch-Kühlzentrifugen	1. Hettich Micro Rapid/K (Hettich, Tuttlingen) 2. Sigma 2K15 (Braun Diessel Biotech, Melsungen)
Ultrazentrifuge	Beckmann L8-70M (Beckmann, München), Rotor: VTI-65
Zytozentrifuge	Cytospin (Shandon, Astmoor, E)

Sonstige Laborgeräte

Heizblock	Metallblock-Thermostat, Reglertype DA (Gebr. Liebisch, Bielefeld)
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen
PH-Meter	WTW pH 530 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim i. OB)
Waage	Satorius AG, Göttingen
Wärmeschrank	Trockenschrank ohne CO ₂ , Schütt, Incudrive-S

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Kryoröhrchen	Nunc Kryo, 1.5 ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemrk)
Material für die Zellkultur	Greiner GmbH, Nürtingen
Plastikküvetten	Sarsted, Nürnberg-Rommelsdorf
Plastikmaterialien	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Millex-GV 0.22 µm-Filter (Millipore S. A., Molsheim, F)
Transfermembranen	1. Nylon-Membran (Transfermembran 0.45 µm Biodyne B); Nukleinsäure-Transfer 2. Nitrozellulose, Optiran BA-S 83, 0.2 µm Schlchuell, Dassel); Proteintransfer
Zellschaber	Cell Scraper (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)

Parafilm American National Can, Neenah, WI, USA

3.1.3. Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert mit Bezugsquelle aufgeführt sind, wurden von den Firmen Boehringer, Calbiochem, GIBCO BRL, Merck, Santa Cruz, Serva, Sigma und Roth bezogen.

Puffer und Lösungen für die Routinekultur der Zellkulturen:

PBS/CMF	2.7mM	KCl
	1.5mM	KH ₂ PO ₄
	140mM	NaCl
	4.1mM	NaHPO ₄
Nährmedium (Komplett-Medium)	DMEM	(Dulbecco`s Modified Eagle Medium), steril filtriert und Mykoplasmen- und Virusgetestet
	FCS	(Fötales Kälberserum)
	100g/ml	Streptomycin
	100IU/ml	Penicillin

Puffer und Lösungen zur Gesamtproteingewinnung

1x PBS

Trypsin

Homogenisierungspuffer	200mM	Mannitol
	50mM	Sucrose
	10mM	Hepes
	1mM	EDTA
		pH 7.4

Puffer und Lösungen zur Photometrischen Bestimmung der Proteinmenge mit BCA:

BSA	2mg/ml	H ₂ O
BCA-Proteinreagenz	BCA Reagenz A	BCA Reagenz B

Chemikalien zum Immunoblotting

Zusammensetzung der Polycrylamidgele:

	Sammelgel (6%)	Trenngel(10%)
Acrylamid/Bisacrylamid	0.789ml	2.34ml
Tris-HCl-Puffer	2.16M Tris HCl, pH 6.1	2.12M Tris-HCl, pH 9.18
	0.125ml	
10% SDS	0.05ml	0.1ml
H ₂ O bidest	3.98ml	4.6ml
TEMED	0.005ml	0.003ml
Ammoniumpersulfat	0.05ml	0.058ml

Puffer und Lösungen

10x Laufpuffer	250mM	Tris pH 8.3
	2M	Glycin
	1%	SDS
Protein-Stoppuffer	60mM	Tris HCl
	7.5%	SDS
	15%	Glycercin
	15%	β-Mercaptoethanol
	3mM	NaEDTA
	0.015%	Bromphenolblau
Proteinfärbelösung	9%	Essigsäure
	45%	Methanol
	0.25%	Coomassie-Blue
Entfärbelösung	10%	Methanol
	7%	Essigsäure

Dehydratisierungslösung	35%	Ethanol
	0.5-2%	Glycerin

Puffer und Lösungen zum Western-Blotting

Blotpuffer	50mM	Tris
	40mM	Glycin
	20%	Methanol
10x TBST	10mM	Tris HCl (pH 8.0)
	150mM	NaCl
	0.5mg/ml	Tween 20
10x TBS	10mM	Tris HCl (pH 8.0)
	150mM	NaCl
Alkalische-Phosphatase-Puffer	100mM	NaCl
	5mM	MgCl ₂
	100mM	Tris HCl (pH 9.5)
Amido-Black-Färbelösung	0.1%	Amido.Black 10B
	45%	Methanol
	10%	Essigsäure
Amido-Black-Entfärbelösung	90%	Methanol
	2%	Essigsäure
Alkalische-Phosphatase-Färbung	15ml AP-Puffer	
	90µl NBT	
	49.5 BCIP	

Verwendete Erst- und Zweitantikörper :

-Erst-Antikörper für die Immunodetektion:

HSP27 (M-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cat# sc-1049): Bei dem HSP27 (M-20) Antikörper handelt es sich um einen affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper aus der Ziege, der mit den carboxyterminalen Aminosäuren 178-197 der Maus

korrespondiert. HSP27 (M-20) reagiert mit HSP27 der Maus, der Ratte und des Menschen im Western-Blot. Er ist nicht kreuzreaktiv mit anderen Hitzeschockproteinen. **HSP72/73 (W27)** (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cat# sc-24): HSP72/73 ist ein monoklonaler IgG2a Antikörper aus der Maus, der von immunisierten BALB/c Milzzellen abgeleitet wurde, welche mit NS-1 Maus-Myelomzellen fusioniert waren. Der Antikörper wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt und reagiert mit HSP72/73 in Säugerzellen.

-Zweit-Antikörper für die Immunodetektion:

Anti-Ziege IgG, alkalische-Phosphatase (AP) gekoppelt (Santa Cruz Bio-technology, Inc., cat# sc-2037

Anti-Maus IgG, alkalische-Phosphatase (AP) gekoppelt (Santa Cruz Bio-technology, Inc., cat# sc-2047

Puffer und Lösungen zur Bestimmung des DNA-Gehaltes

Extraktionspuffer	62.5mM	NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O (pH 7.4)
	2.2M	NaCl

Puffer und Lösungen zur Bestimmung des LDH-Effluxes

LDH-Puffer	100mM	Triethanolamin
	10mM	Na ₂ x2H ₂ O
	Pyruvat	(20mM)
	NADH	(10mg/ml)
	Triton-X-100	(20µl/ml)

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Als Alternative zu Tierversuchen können bei bestimmten Fragestellungen in vitro Systeme verwendet werden. Es sollte ein Versuchssystem ausgewählt werden, welches Mamma-Karzinomzellen möglichst ähnlich ist.

3.2.1.1. Zelllinie: L929-Maus-Fibroblasten

Die Maus-Fibroblasten-Zelllinie L929 wurde im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise von Frau Dr. N. Mairesse (Freie Universität Brüssel, ULB) zur Verfügung gestellt (Mairesse et al., 1998). Es handelt sich dabei um Maus-Fibroblasten, die ursprünglich aus dem subkutanen Gewebe einer C3H/An Maus isoliert wurden. Sie wurden mittels eines Shuttle-Vektors (pSVL) mit dem humanen 27kDa Hitzeschock-Protein-Gen (*hsp27*) transfiziert und exprimieren dieses HSP in der Folge konstitutiv. Als Selektionsgen wurde ein Neomycin-Resistenzgen (*neo*) mit eingeführt. Es stehen die mit *hsp27*-transfizierten Klone A5, A6, B1 und B4 und die lediglich mit dem leeren Vektor transfizierten Klone Neo1 und Neo2 (Kontrollen) zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überwiegend mit A5 und Neo1 gearbeitet.

L929-Fibroblasten sind von Grund aus in der Lage, HSP70 zu exprimieren und sind HSP70-induzierbar.

	Parental	Neo1	Klone (A5, B4)
HSP70	+	+	+
HSP27	-	-	+

Tab. 1

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde neben der Kontrolle durch Neo1 auch grundsätzlich die parentale Zelllinie zum sicheren Ausschluss einer HSP27-Expression und Veränderungen durch die Transfektion mitgeführt.

Somit steht uns ein einfaches isoliertes Zellsystem als ein Werkzeug zur gezielten Untersuchung einzelner Genprodukte zur Verfügung, zur Untersuchung des

spezifischen Einflusses von HSP70 und HSP27 durch eine *hsp27*-transfizierte und HSP70-induzierbare Zelllinie.

3.2.1.2. Routinekultur der L929-Maus-Fibroblasten

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheits-Werkbank mit vertikalem, laminarem Luftstrom durchgeführt. Als Kulturmedium wurde sogenanntes Komplett-Medium mit 60mg/ml Selektionsantibiotikum Genetecin (G418), 10mM HEPES und 250µg/ml Fungizone ergänzt. Dieses Medium wird im weiteren Text als Klon-Medium bezeichnet. Alle verwendeten Zusätze und das Medium wurden von GIBCO Life Technologies bezogen. Die Kultivierung erfolgte in Kulturflaschen bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen passagiert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Hatten die Zellen eine Subkonfluenz erreicht, wurden sie passagiert. Dazu wurden sie in subkonfluenter Kultur antrypsinisiert und jeweils mit $1-1.4 \times 10^4$ Zellen/cm² in Flaschen oder Petrischalen mit komplettem Medium ausgesät. Die Zellen wurden maximal bis zur 25. Passage für Versuche verwendet, um die Anzahl spontan mutierter Zellen gering zu halten. Frühe eingefrorene Passagen wurden wieder aufgetaut. Versuche konnten nach der zweiten Passage durchgeführt werden.

3.2.1.3. Kryokonservierung von Zellen

Um einer ausreichende Reserve an Zellmaterial sicherzustellen, wurden frühe Zellpassagen tiefgefroren. Dazu wurden subkonfluent wachsende Zellen abtrypsinisiert, in 5ml kaltem, komplettem DMEM suspendiert und 2 Minuten bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet dieser Zentrifugation wurde in 6ml kaltem DMEM mit 10% DMSO resuspendiert und sofort in 4 Kryoröhrchen (Nunc) aliquotiert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach 2 Stunden Lagerung bei -20°C wurden die Zellen für 2 Tage bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie dauerhaft gelagert werden konnten.

3.2.1.4. Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die in flüssigem Stickstoff in Eppendorf-Cups gelagerten Zellen schnell auf 37°C erwärmt. Nach Resuspension wurden sie in zwei mit 5ml komplettem Medium vorbereitete Kulturflaschen (50ml) überführt. Nach 10-12 Stunden wurde das Medium gewechselt, um noch vorhandene DMSO-Reste zu entfernen. Nach Anwachsen wurden die Zellen in der üblichen Weise in Kultur gehalten. Nach der zweiten Passage wurden die Zellen für Versuche eingesetzt.

3.2.1.5. Mykoplasmentest auf Kontamination der Zellkultur

Die Kontamination mit Mykoplasmen ist ein weit verbreitetes Problem in der Zellkulturforschung. Mykoplasmen sind polymorphe Bakterien ohne starre Zellwand, die häufig als Verunreinigung in Zellkulturen tierischer Gewebe vorkommen und das Verhalten der infizierten Zellen verändern können. Mit der DNA-Fluorochrom-Methode steht ein einfacher und schneller Test zur Verfügung. Hierzu wurden suspendierte Zellen mit einer Zytocentrifuge auf Glas-Objektträger aufzentrifugiert, mit eiskaltem Methanol fixiert, für 0.5-1 Minute mit 5µg/ml Bisbenzimid (H33258, Sigma) inkubiert und im Anschluß mit geeignetem Eindeckmittel (Seromed) für die Fluoreszenzmikroskopie eingedeckt. Bisbenzimid bindet an die DNA und färbt damit neben den Kernen der Zellen auch die DNA der Mykoplasmen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde dann nach Kontamination gesucht. Die Zellen wurden zu Beginn der Kultur sowie jede 5. Passage auf Kontamination getestet. Für alle weiteren durchgeführten Versuche wurden nur L929-Fibroblasten-Chargen verwendet, die sich in diesem Test als kontaminationsfrei erwiesen haben.

3.2.1.6. Zellzählung

Bevor die Zellen subkultiviert oder für ein Experiment verwendet wurden, mußte die Zellzahl bestimmt werden. Hierfür wurde ein automatisches Verfahren (Coulter Counter) eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Partikelzähler, der in Suspension befindliche Zellen zählt. Bei dieser Art der Zellzählung ist eine vorausgehende vollständige Vereinzelnung der Zellen von großer Bedeutung, da auch agglomerierte

Zellen nur als eine einzige Zelle gezählt werden. Die Zellzahl pro ml errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = Z \cdot f_{\text{verd}} / V$$

Z	Am Coulter Counter gezählte Zellen
V	Volumen der während des Zählvorgangs durch die Öffnung gesaugten Lösung in ml (meist 0.5ml)
F _{verd}	Faktor, der sich aus der Verdünnung der Zellzählung errechnet. Meist werden 0.2ml Zellsuspension mit IsotonII auf 10ml aufgefüllt. Daraus errechnet sich ein Verdünnungsfaktor 10/0.2 =50

3.2.1.7. Behandlungsprotokolle der Zellen

Die Behandlung der Zellen wurde stets in der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt. Dazu wurden die Zellen ca. 48 Stunden vor Behandlungsbeginn in die entsprechenden Kulturgefäße (Petrischalen oder Sixwell-Platten) ausgebracht und unmittelbar vor Behandlungsbeginn mit frischem Medium versorgt.

Hitzebehandlung der Zellen

Für die Hitzebehandlung, die als Positivkontrolle für die induzierbare HSP-Exprimierung angewendet wurde, wurde zu Versuchsbeginn ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden 1 Stunde in einem Wärmeschrank bei 43°C inkubiert, gefolgt von einer zweistündigen Erholungsphase unter Kulturbedingungen (37°C, 5% CO₂).

Zytostatikabehandlung der Zellen

Mittels Messung des DNA-Gehaltes nach Exposition der Zellen mit den untersuchten Substanzen in Konzentrationen zwischen 1nm und 10µm wurde eine jeweilige optimal zytotoxische Behandlungskonzentration ermittelt, welche für diese Substanz dann in sämtlichen nachfolgenden Versuchen verwendet wurde. Die Lösungen wurden alle unmittelbar vor Versuchsbeginn in geeigneten Konzentrationen angesetzt und mit Medium auf die berechnete Arbeitskonzentration verdünnt.

Messparameter	Behandlungszeit	Testsubstanzen (Konz.)
DNA-Gehalt	(4h), 24h, (32h), 48h, 72h	Mtx (100nM, 1µM) 5-FU (1µM, 4µM)
LDH-Efflux	24h, 48h, (72h)	Mtx (100nM, 1µM) 5-FU (1µM, 4µM)
Western-Blot	(2h, 4h, 6h), 24h, 48h, 72h	Isolierter Hitzeschock Mtx (100nM, 1µM) 5-FU (1µM)

Tab.2: Übersicht über die einzelnen Behandlungszeiten unter Angabe der für die einzelnen Messparameter verwendeten Konzentrationen.

Die Zellen wurden nach gewünschter Behandlungszeit abtrypsiniert und der Zählung oder Messung zugeführt. Die Kultivierung erfolgte auch während eines Experimentes unter Standardbedingungen. Stets erfolgte eine Zwei- oder Dreifachmessung.

3.2.2. Gesamtproteingewinnung

Pro Behandlungszeitraum/Konzentration wurden zwei Petrischalen zu 250 000 Zellen benötigt. Nach Behandlung der Zellen wurde das Medium abgenommen. Anschließend wurden die Platten mit 1x PBS-Puffer gewaschen und abtrypsiniert. Das Zellmaterial wurde in 15ml Zentrifugenröhrchen 3 min bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Um die in den Zellen gelegenen Proteine für das weitere Procedere zugänglich zu machen, wurde das Zellpellet in 500µl hypotonen Homogenisierungspuffer aufgenommen. Durch mehrmaliges Aspirieren durch eine feine Kanüle wurden die Zellen zusätzlich geschert und aufgebrochen. Zur Aufbewahrung wurde das Zellmaterial in beschriftete Eppendorf-Cups überführt und bei 20 °C eingefroren.

3.2.2.1. Photometrische Bestimmung der Proteinmenge mit Pyrogallol-Rot (Methode nach van der Heyden)

Der Proteingehalt von Zellkultur- und Gewebeproben wurde mit „Total Protein Pyrogallol-Rot Reagenz“ bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß Proteine mit Pyrogallol-Rot einen farbigen Komplex bilden, der bei 598nm sein

Absorptionsmaximum hat. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde eine Eichreihe von 0, 2, 4, 6 und 8 µg in 1ml Pyrogallol-Rot aus einer Stammlösung von 2mg/ml Rinderserumalbumin mitgeführt. Die Messung der Eichreihe wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Von jeder zu vermessenden Proteinprobe wurde eine Doppelbestimmung mit je 4 µl in 1ml Reagenz vorbereitet. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 598nm vermessen. Zur Berechnung der Eichreihe wurde einer Regressionsgerade erstellt.

3.2.2.2. Photometrische Bestimmung der Proteinmenge mit BCA

Um gleiche Mengen Protein für das anschließende Immunoblotting einsetzen zu können, wurde zunächst die Proteinmenge in den Lysaten mittels BCA-Proteinreagenz bestimmt. Je 4 µl der aus den Zelle gewonnenen Proteinlösung wurde BCA-Proteinreagenz (Pierce) entweder für 30 Minuten bei 37°C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend bei 562nm photometrisch quantifiziert. Das BCA-Reagenz setzt sich aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B zusammen. Da die Farbentwicklung mit BCA keinen exakten Endpunkt erreicht, sollte die Messung aller Proben innerhalb von 10 Minuten erfolgen. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe einer Eichgeraden berechnet, die aus einer mitgeführten Eichreihe mit bekanntem Proteingehalt an BSA (0/50/100/150/200 µg) erstellt wurde. Für die Eichreihe wurde eine Dreifachbestimmung und für die jeweiligen Proben eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.3. Immunoblotting

Diese Methode dient der Detektion und der Darstellung spezifischer Proteine. Die zunächst in der Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennten Proteine werden mittels eines Western-Blots auf die Oberfläche einer Nitrozellulosemembran übertragen. An die leicht zugänglichen Proteine kann der spezifische Antikörper binden, an den sich wiederum ein Enzym-gekoppelter Zweitantikörper anlagern kann. Mit Hilfe des entsprechenden Substrates wird die Bande durch eine Farbreaktion sichtbar.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel erfolgte mit einem diskontinuierlichen Puffersystem, modifiziert nach Laemmli (Laemmli 1979). Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 bis 2:1 in Protein-Stop-Puffer aufgenommen und kurz aufgeköcht. Dies führte zur Denaturierung der Proteine und zu deren Beladung mit SDS, wodurch alle Ladungen überdeckt wurden. Somit konnte die Auftrennung ausschließlich nach Proteingröße gewährleistet werden. Anschließend konnten die Proben in gleicher Menge auf das Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde in einer Minigelapparatur mit 1xLaufpuffer durchgeführt. Bei 25-35 mA dauerte es ca. 1 Stunde, bis die Bromphenolblau-Front aus dem Gel gewandert war und die Elektrophorese beendet wurde. Für den Nachweis sehr schwerer Proteine (ca 170 kD) wurde der Lauf erst nach ca. 100 min beendet. Als Molekulargewichtsmarker diente die „Protein Test Mixture 4“ (Boehringer Ingelheim) mit folgenden Proteinen: Phosphorylase B (97.4 kD), Rinder-Albumin (67 kD), Ei-Albumin (45 kD), Carboanhydrase (29 kD). Im Anschluss daran wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und der im Gel verbleibende Proteinrest mit Coomassie-Blue in einem Proteinfärbebad angefärbt.

Färben und Trocknen der Gele

Um Beurteilen zu können, ob der Probenauftrag auf die einzelnen Spuren eines Gels gleichmäßig erfolgt war, wurden die Blot-Gele mit einem Proteinfarbstoff gegengefärbt und mit dem Laserdensitometer ausgewertet.

Western-Blotting mit anschließender Proteindetektion

Nach der Gelelektrophorese wurden die Acrylamidgele zunächst für 10 Minuten in Blotpuffer äquilibriert und anschließend in einem Semidry-Blotgerät bei einer Spannung von 20V eine Stunde lang auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Hierfür wurde die in Blotpuffer angefeuchtete Membran auf 16 ebenfalls mit Blotpuffer angefeuchtete Whatman-Papiere gelegt. Das Gel wurde blasenfrei auf die Membran aufgebracht und mit 16 weiteren angefeuchteten Whatman-Papieren bedeckt. Nach Ablauf des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran zunächst für eine Stunde in einer 10% Magermilchsuspension in 1xTBST geblockt, um spezifische Bindungen des Antikörpers an die Membranoberfläche zu verhindern. Das Gegenfärben der Polyacrylamidgele erfolgte wie oben beschrieben. Nach dem einstündigen Blocken

wurde die Membran zweimal mit 1xTBST und einmal mit 1xTBS jeweils für zehn Minuten unter langsamen Rotieren gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran erneut zweimal mit 1xTBST und einmal mit 1xTBS für jeweils zehn Minuten gewaschen. Der zweite Antikörper wurde in einer 5% Magermilchpulverlösung in 1xTBS zugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde unter leichtem Rotieren auf der Membran belassen. Dann wurde die Membran nach dem üblichen Waschvorgang (2x zehn Minuten mit 1xTBST, 1x zehn Minuten mit 1xTBS) in die Färbelösung überführt. Mit Hilfe des Substrates NBT/BCIP (132µl/66µl in 20 ml AP-Puffer) wurde das spezifische Protein als braun-violette Bande durch eine Farbreaktion sichtbar. Die Färbereaktion wurde durch das Abwaschen der Membran mit entionisiertem Wasser gestoppt. Die semiquantitative Auswertung der Banden erfolgte nach dem Einlesen mit einem Bild-Scanner mittels des Programmes NIH-Image basierend auf unterschiedlich intensivem relativem Schwärzungsgrad.

3.2.4. Zytotoxizitätsnachweis: DNA-Bestimmung

Da durch die Zellzählung aufgrund nicht optimal möglicher Vereinzelnung der L929-Zellen keine ausreichende Aussage zum Zellwachstum gemacht werden kann, wurde für das Wachstumsverhalten der Zellen die DNA-Menge bestimmt, die mit der Zellzahl gut korrelierte (Lee et al., 1992). Das Prinzip beruhte dabei auf der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs Bisbenzimid H33258 an DNA. Durch Mitführen einer Eichreihe mit Kalbsthymus-DNA (0-16µg/µl) konnte der jeweilige DNA-Gehalt quantifiziert werden.

Die Zellen wurden zum Ausbringen in Medium aufgenommen und in gleicher Menge in Sechs-Loch-Platten ausgebracht. Die Behandlung der Zellen erfolgte gemäß Behandlungsprotokoll. Zur Messung wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von je 800µl Wasser je Vertiefung für eine Stunde bei 37°C aufgebrochen. Nach diesem Aufarbeitungsschritt wurde eine Kalbsthymus-DNA-Eichreihe (0, 1, 2, 4, 8, 16µg in 400µl H₂O) mitgeführt. Im Anschluß folgte die DNA-Extraktion durch Zugabe von 1500µl Extraktionspuffer (für die Eichreihe 750µl). Die Inkubation erfolgte für weitere 1.5 Stunden bei 37°C. Nach Resuspension wurden die Proben für eine Doppelbestimmung mit je 1150µl auf je zwei Fluoreszenzküvetten verteilt (für die

Eichreihe wurde der ganze Ansatz verwendet) und mit je 750µl Bisbenzimidlösung (2.5µg Bisbenzimid/ml Extraktionspuffer) versetzt. Zehn Minuten lang wurden diese Lösungen im Dunkeln inkubiert. Es wurde eine Emission der Wellenlänge 450nm am Fluorimeter gemessen, nachdem mit UV-Licht der Wellenlänge 360nm angeregt wurde. Anhand der Eichgeraden konnte eine Regressionsformel erstellt und der DNA-Gehalt der Proben quantifiziert werden.

3.2.5. Zytotoxizitätsnachweis: Laktat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH-Efflux)

In Zellen mit intakten Membranen kommt es unter physiologischen Bedingungen nicht zum Austritt von Zytoplasmaenzymen in das umgebende Medium. Durch Behandlung mit zytotoxischen Agenzien kann jedoch eine Membranschädigung auftreten und z. B. den Efflux von Laktat-Dehydrogenase ins Umgebungsmedium bewirken. Dies kann photometrisch über den Umsatz von zugegebenem NADH bei einer Wellenlänge von 340nm in einem Triethanolamin-Puffer quantifiziert werden. Somit kann diese Messung zur Zytotoxizitätsbeurteilung herangezogen werden. Als Substrat der Laktat-Dehydrogenase diente Pyruvat, welches unter Reduktion von NADH mit LDH zu Laktat reduziert wurde.

Die Laktat-Dehydrogenase wurde im Zellkulturmedium und im Lysat der behandelten Zellen und der Kontrollzellen gemessen. Die Gesamtaktivität setzte sich aus der LDH-Aktivität der lysierten Zellen und der Aktivität im Überstand zusammen. Die Menge LDH in % im Überstand wurde als Quotient behandelte Zellen/Kontrollen angegeben.

3.2.6. Statistik

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden als arithmetische Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichungen (+/-SD) angegeben. Signifikanzangaben beziehen sich auf Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen oder von Proteinextrakten auf den Zellen nach unterschiedlichen Behandlungsmustern. Unterschiede eines Einzelparameters wurden mit einem zweiseitigen Student-t-Test verglichen. Für alle statistischen Tests wurde als statistisch relevantes Signifikanzniveau ein p-Wert von ≤ 0.05 angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Zelllinien

Für die *in vitro*-Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit dem humanen *hsp27*-Gen transfizierte L929-Maus-Fibroblasten verwendet, welche HSP70 basal und zudem induzierbar exprimieren. So stand ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem gezielt der Einfluß von HSP27 wie auch HSP70 nach Behandlung mit Hitzeschock und/oder toxischen Substanzen untersucht werden konnte. In den durchgeführten Experimenten wurde in erster Linie der *hsp27*-transfizierte Klon A5 verwendet. Als Kontrollen dienten die mit dem leeren Vektor und dem Resistenzgen „*neo*“ transfizierten Klone Neo1. In der Kultur zeigten die Kontroll-Klone unterschiedliche Wachstumseigenschaften. Sie konnten bis zur subkonfluenten Dichte wachsen. Die *hsp27*-transfizierten Klone A5 hingegen konnten nicht bis zu dieser Zelldichte wachsen, sie kugelten bereits vorher ab. Auf Grund dessen wurden sie bereits früher vereinzelt. Die von einer parentalen Fibroblasten-Zelllinie abstammenden, transfizierten Klone weisen starke morphologische Veränderungen auf, die für diese genveränderten Zellen typisch sind. Es sind Zellen mit asteroiden Zytoplasma-Armen wie auch hypertrophe, mit mehreren Zellkernen ausgestattete Zellen zu finden. Der Zell-Zell-Kontakt ist häufig aufgehoben.

4.1.1. HSP27/HSP70-Expressionskontrolle und Expressions-Induzierbarkeit durch Hitzeschock

Nachdem mittels Mykoplasmentest sichergestellt wurde, daß alle Zelllinien der L929-Zellen frei von Kontamination mit Mykoplasmen waren, wurden diese nach entsprechenden Protokollen Streß-exponiert (subletaler Hitzeschock und/oder nachfolgend Zytostatikum). Nach ausreichender Kultivierung unter Standardbedingungen wurden Gesamtproteine isoliert und nach erfolgter Proteinbestimmung mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet und auf die Proteine HSP70 und HSP27 immunogefärbt. Die laserdensitometrische Analyse der gefärbten Banden zeigten wie im folgenden dargestellt die Proteinmenge. Zur Quantifizierung wurde die relative Blot-

Dichte mit dem Programm NIH-Image ermittelt. Der Schwärzungsgrad der nicht-exponierten Kontrollzellen wurde dabei gleich 100% gesetzt.

4.1.1.1. *hsp27*-Expressionkontrolle in L929-Mausfibroblasten

Das konstitutiv exprimierte HSP27 wurde in einer Expressionskontrolle mittels Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen HSP27 nachgewiesen. Die Zelllinien P (parentale Zellen), Neo1 und die *hsp27*-positive Klone wurden des weiteren auf eine mögliche Induzierbarkeit des Proteins durch Exposition mit einem subletalen Hitzeschock untersucht.

Die erlangten Ergebnisse zeigten, daß HSP27 konstitutiv in den *hsp27*-transfizierten Klonen exprimiert wird und sich die Expression durch Streß (subletaler Hitzeschock) nicht verändert. Auch im Zeitverlauf, untersucht wurden die Proteinmengen nach 2, 6, 24 und 48 Stunden, zeigten sich keine Unterschiede (s. Abb. 1). Die parentale Zelllinie sowie die Neo1-Zellen waren nicht zur Expression dieses Proteins in der Lage. Dargestellt ist ein Western-Blot *hsp27*-transfizierter A5-Klone. Da es sich um eine semiquantitative Auswertung handelte, wurde von einer statistischen Beurteilung abgesehen, das gezeigte Ergebnis wurde in weiteren Western-Blots bestätigt.

A5-Klone, HSP27-Expression:

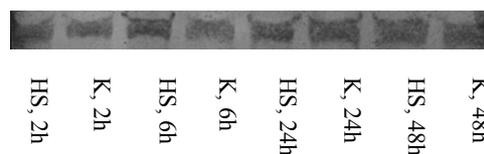


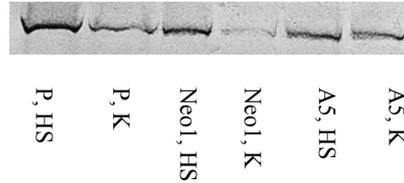
Abb.1: Western-Blot zum Nachweis der Expression des Proteins HSP27 in den *hsp27*-positiven Klonen und Ausschluss einer weiteren Induzierbarkeit von HSP27 durch Stress (ausgelöst durch subletalen Hitzeschock).

4.1.1.2. Untersuchung der HSP70-Expression in L929-Mausfibroblasten

Parentale und Neo1-L929-Fibroblasten sowie *hsp27*-positive A5-Klone wurden auf ihr HSP70-Expressionsverhalten untersucht. Es wurden Hitzeschock-exponierte mit nicht-exponierten Kontrollzellen verglichen. Es konnte eine basale Expression von HSP70 in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, welche durch Zellstreß (Hitzeschock) in allen drei untersuchten Zelllinien deutlich weiter induzierbar ist. Die Expression von HSP70 scheint unabhängig von der HSP27- Expression (betrachtet

wurden diesbezüglich die *hsp27*-positiven Klone) zu sein. Auch im Zeitverlauf ist kein sicherer Maximalpunkt eruierbar (s. Abb. 2). Da es sich um eine semiquantitative Auswertung handelte, wurde von einer statistischen Beurteilung abgesehen, das gezeigte Ergebnis wurde in weiteren Western-Blots bestätigt.

HSP70-Expression (6h):



HSP70-Expression (24h):

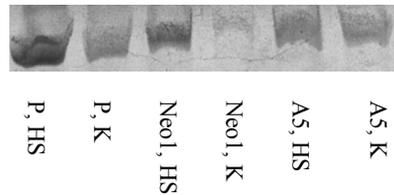


Abb.2: Western-Blots zum Nachweis der basalen HSP70-Expression in allen untersuchten L929-Zelllinien sowie zum Nachweis der Induzierbarkeit durch Hitzeschock, dargestellt sind Western-Blots nach 6 sowie nach 24 Stunden.

4.2. Behandlung der L929-Fibroblasten mit den Substanzen des CMF-Protokolls

Die Zellen wurden den Behandlungsprotokollen entsprechend nach erfolgter Bestimmung der optimalen zytotoxischen Konzentration mit den Einzelsubstanzen und/oder einem subletalen Hitzeschock exponiert, die Auswertung erfolgte zu definierten Zeitpunkten. Stets erfolgten die Untersuchungen an den parentalen L929-Fibroblasten, den Neo1- sowie den A5-Klonen. Grundsätzlich wurden nicht-exponierte Kontrollzellen mitgeführt. Immer wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Im Folgenden werden jeweils nur die für die jeweilige Beweisführung relevanten Daten detailliert vorgestellt.

Drei unterschiedliche Untersuchungsmethoden wurden genutzt, welche sich im direkten Vergleich sehr gut ergänzten:

- Zum semiquantitativen Nachweis der Proteine HSP27 und HSP70 wurde die Immnoblotting-Methode verwandt.

- Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens erfolgte durch eine fluorometrische DNA-Bestimmung, dies entspricht einer indirekten Zytotoxizitätsmessung.
- Mittels LDH-Efflux-Messung wurde die Zytotoxizität direkt quantifiziert. Das Enzym Laktat-Dehydrogenase kommt unter physiologischen Bedingungen nur im Zytoplasma vor. Toxische Agenzien ebenso wie auch andere Formen von Zellstreß (neben vielem anderen auch Hitze) jedoch verursachen Membranschäden, woraus ein Austritt von LDH in das umgebende Medium resultiert. Die Messung der LDH-Aktivität im Überstand und in den lysierten Zellen wurde ins Verhältnis zu der LDH-Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen (gleich 100%) gesetzt.

4.2.1. Zellexposition mit dem Antimetaboliten Methotrexat (Mtx)

In einer Testserie wurden Neo1-L929-Fibroblasten mit Mtx in Konzentrationen von 1nM, 10nM, 100nM, 1µM sowie 10µM behandelt, dann wurde nach 4, 24, 32, 48 und 72 Stunden fluorometrisch der DNA-Gehalt gemessen, aus den Resultaten wurden Wachstumskurven erstellt (s. Abb. 3). Gemäss der Wachstumshemmung erfolgten die nachfolgenden Behandlungen jeweils in den zytotoxischen Konzentrationen von 100nM sowie 1µM.

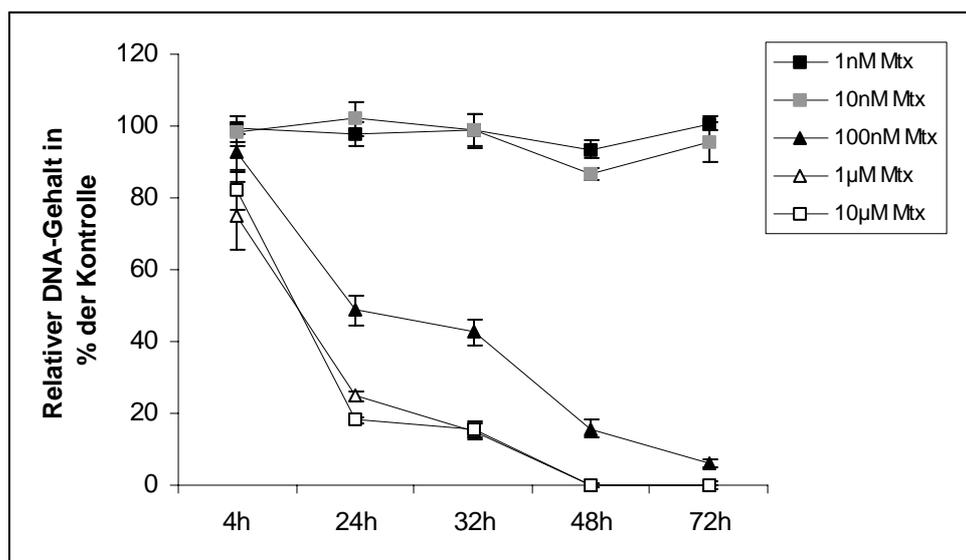


Abb.3: Ermittlung der geeigneten zytotoxischen Mtx-Konzentrationen für die nachfolgenden Versuche durch Detektion der Wachstumshemmung via Bestimmung des DNA-Gehaltes, die exponierten Zellen wurden in Relation zu den als 100% gesetzten nicht-exponierten Kontrollzellen dargestellt.

4.2.1.1. Untersuchung der HSP27/HSP70-Induktion durch Mtx

HSP27:

Alle drei Zelllinien (parentale Zellen, Neo1- sowie A5-Klone) wurden mit den Mtx-Konzentrationen 100nM sowie 1 μ M plus/minus vorangehendem subletalem Hitzeschock exponiert. Nach standardisiertem Versuchsablauf konnte man anhand der resultierenden Banden im Western-Blot ersehen, daß HSP27 in den *hsp27*-positiven A5-Klonen erheblich konstitutiv exprimiert wird und durch das zytotoxische Agens Mtx nicht hochzuregulieren ist (s. Abb. 4). In den *hsp27*-negativen Zellen Neo1 sowie den Parentalzellen ist keinerlei HSP27-Expression nachzuweisen (nicht dargestellt). Da es sich um eine semiquantitative Auswertung handelte, wurde von einer statistischen Beurteilung abgesehen, das gezeigte Ergebnis wurde in weiteren Western-Blots bestätigt.

A5-Klone, HSP27-Expression:

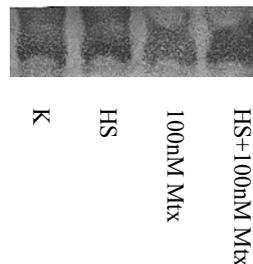


Abb.4: Western-Blot, A5-Klone, exponiert mit 100nM Mtx +/-Hitzeschock (nach 72h).

HSP70:

Wiederum wurden alle drei Zelllinien (Parentale Zellen, Neo1- sowie A5-Klone) mit den Mtx-Konzentrationen 100nM sowie 1 μ M (nicht quantitativ dargestellt) plus/minus vorangehendem subletalem Hitzeschock nach Standard behandelt. Nach bekanntem Versuchsablauf zeigten die Banden der Western-Blots, daß die HSP70-Expression in allen untersuchten L929-Zelllinien klar durch Mtx in zytotoxischer Konzentration ebenso wie durch vorangehenden Hitzeschock induziert wird (s. Abb. 5 u. 7). Eine additive Wirkung von subletalem Hitzeschock plus Mtx-Exposition war nicht zu sichern, der initial nachgewiesene Behandlungseffekt wird durch die bereits durch Hitzeschock erreichte Induktion überlagert, Hitzeschock-Wirkung plus Mtx-Wirkung ergibt keinen supraadditiven Effekt (s. Abb. 6 u. 7). Da es sich um eine semiquantitative

Auswertung handelte, wurde von einer statistischen Beurteilung abgesehen, das gezeigte Ergebnis wurde in weiteren Western-Blots bestätigt.

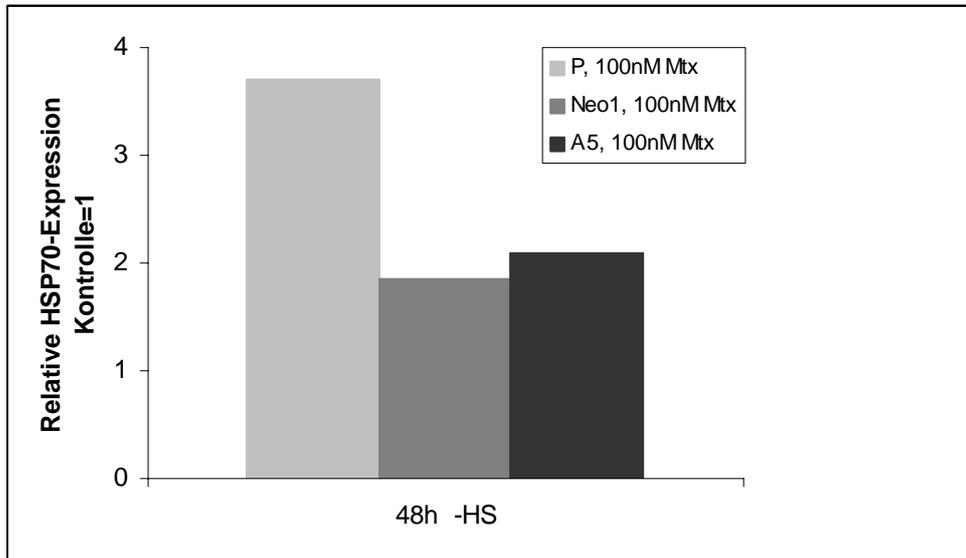


Abb.5: Expression von HSP70 in L929-Fibroblasten nach Exposition mit 100nM Mtx ohne preshock, nicht exponierte Kontrollzellen entsprechen 100%.

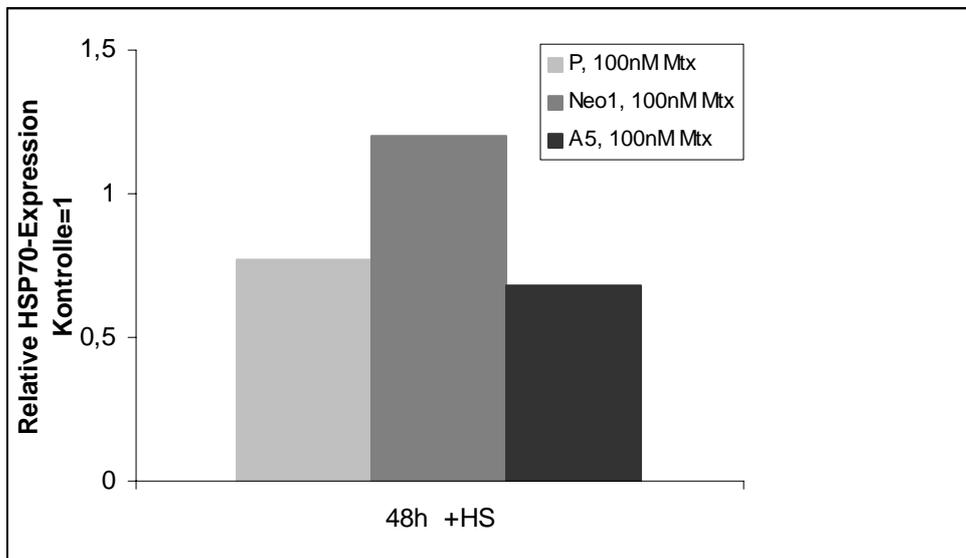


Abb.6: Expression von HSP70 in L929-Fibroblasten nach Exposition mit 100nM Mtx nach erfolgtem subletalem Hitzeshock, vorgeschockte Kontrollzellen entsprechen 100%.

A5-Klone, HSP70-Expression:

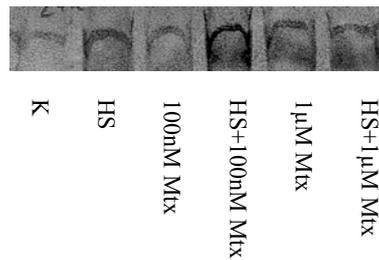


Abb.7: Western-Blot parentaler Zellen, behandelt mit 100nM sowie 1µM Mtx +/- vorangehendem Hitzeschock (nach 24h).

4.2.1.2. Untersuchungen zu Zytotoxizität gegen Mtx durch HSP27 und/oder HSP70

Zur Beantwortung der Frage, ob Hitzeschockprotein 27 und/oder Hitzeschockprotein 70 einen Überlebensvorteil für die exprimierenden Zellen gegenüber nicht exprimierenden Kontrollzellen bedeutet, wurden parentale, Neo1- sowie A5-L929-Fibroblasten gemäß Protokoll mit Hitzeschock und/oder Mtx in den Konzentrationen 100nM und 1µM exponiert und nach definierten Zeitpunkten die resultierende Zytotoxizität einerseits indirekt mittels DNA-Gehaltsmessung und andererseits direkt durch Messung des LDH-Effluxes gemessen und quantifiziert.

A) Suche nach Zytotoxizität durch HSP27:

Zur Beantwortung dieser Frage wurden *hsp27*-negative Zellen (P, Neo1) *hsp27*-positiven Zellen (A5-Klone) vergleichend gegenübergestellt.

Wie der Kurvenverlauf der Wachstumskurve für HSP27-freie Neo1-Zellen zeigt, inhibiert Mtx das Zellwachstum, der Kurvenabfall unter Behandlung mit 1µM Mtx ist schon nach 24 Stunden, nach Behandlung mit 100nM Mtx nach 32 Stunden deutlich. Die *hsp27*-positiven A5-Zellen dagegen zeigen eine steigenden Wachstumskurve bis zu 48 Stunden nach Exposition mit 100nM Mtx, dann erst kommt es zu einem langsamen Abfallen der Kurve (s. Abb. 8). Dies zeigt eine klare protektive Wirkung des HSP27 vor Zell-Zytotoxizität durch 100nM Mtx. Gleiches zeigen die LDH-Efflux-Messungen (s. Abb. 9). Die Zytotoxizität ist 48 und 72 Stunden nach Behandlung am deutlichsten. Bei Exposition mit der höheren Konzentration 1µM Mtx ist der beschriebene Schutz für eine solch hohe Zytotoxizität aus der Wachstumskurve nicht mehr ersichtlich, jedoch in der LDH-Efflux-Messung noch erkennbar.

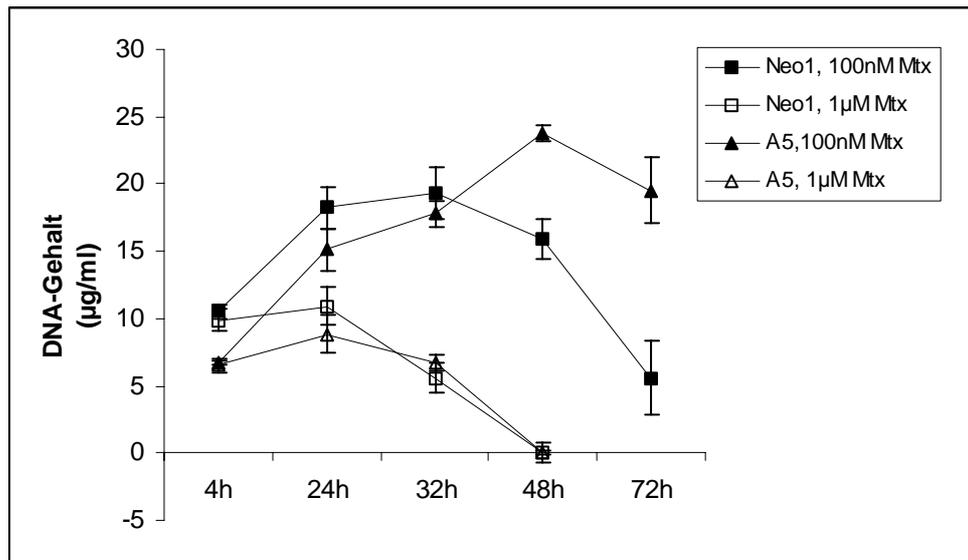


Abb.8: Darstellung des Proliferationsverhaltens von L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 100nM bzw. 1µM Mtx. Vergleichend gegenübergestellt werden *hsp27*-negative (Neo1) *hsp27*-positiven (A5-Klone) Zellen.

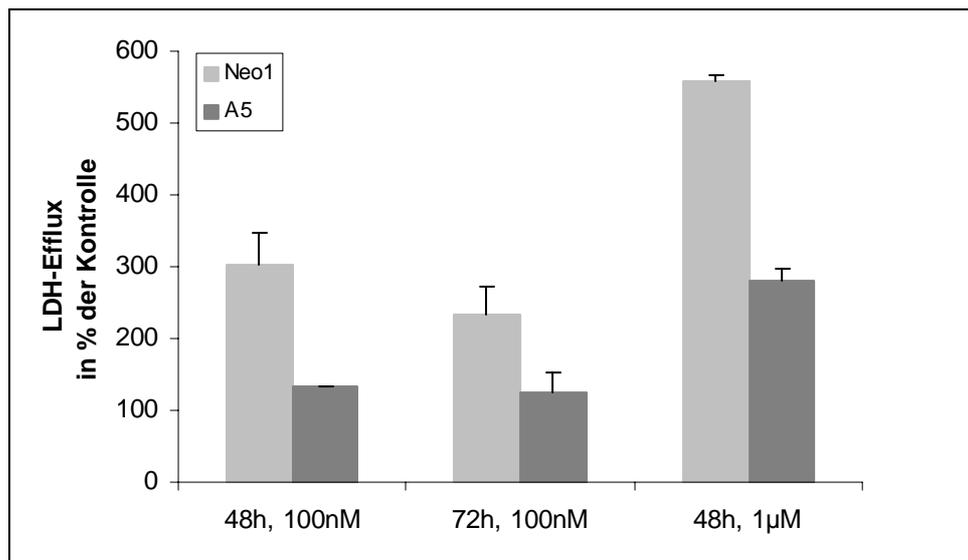


Abb.9: LDH-Efflux aus L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 100nM bzw 1µM Mtx. Vergleichend gegenübergestellt werden *hsp27*-negative (Neo1) *hsp27*-positiven (A5-Klone) Zellen.

B) Suche nach Zytoprotektion durch HSP70-Überexpression:

Zur Beantwortung dieser Frage wurden *hsp27*-negative L929-Fibroblasten (P, Neo1) plus/minus vorangehendem subletalem Hitzeschock einander gegenübergestellt. Wiederum wurde die Zytotoxizität einerseits durch Zellwachstum, andererseits durch LDH-Efflux gemessen. Die Tendenz einer Schutzwirkung hochexprimierten HSP70 (mittels Hitzeschock ausgelöst) ist unter Behandlung mit 100nM durch erniedrigten LDH-Efflux nach 48 und 72 Stunden erkennbar, für die deutlich höhergradig-toxische

Konzentration $1\mu\text{M}$ Mtx jedoch nicht mehr zu eruieren (s. Abb. 11). Die Wachstumskurve zeigt diese Tendenz nicht, weitgehend parallel erfolgt unter Behandlung mit $1\mu\text{M}$ Mtx der Abfall früh, bereits nach 24 Stunden (unabhängig von einem vorausgehenden Hitzeschock), unter Behandlung mit 100nM Mtx nach 32 Stunden (s. Abb. 10).

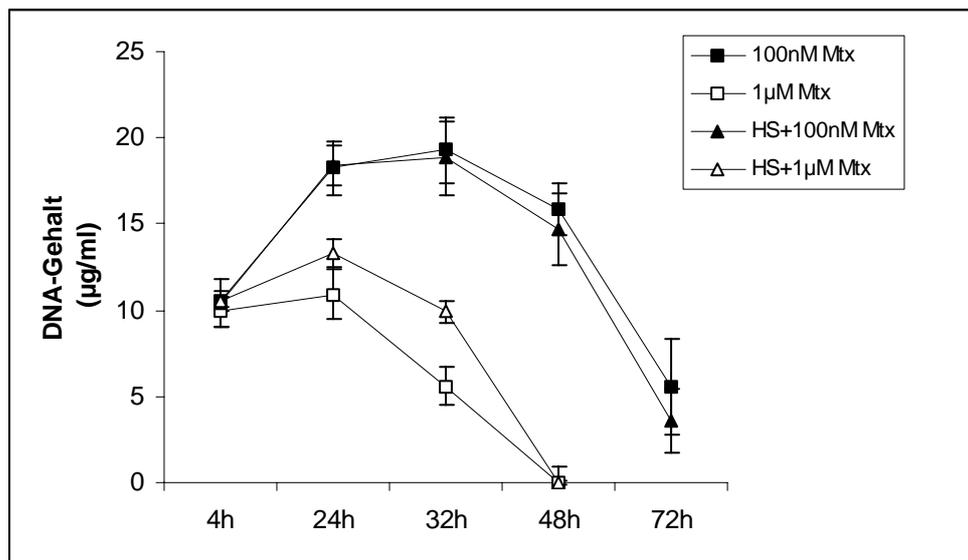


Abb.10: Darstellung des Proliferationsverhaltens von L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 100nM bzw $1\mu\text{M}$ Mtx. Vergleichend gegenübergestellt werden Neo1-Fibroblasten mit und selbige ohne vorangehendem subletalem Hitzeschock.

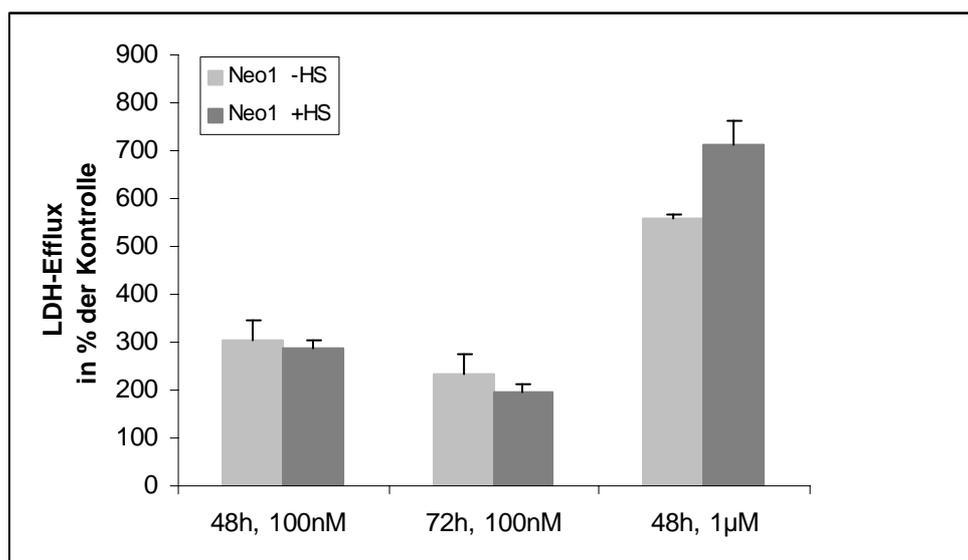


Abb.11: LDH-Efflux aus L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 100nM bzw $1\mu\text{M}$ Mtx. Vergleichend gegenübergestellt werden Neo1-Fibroblasten mit und selbige ohne vorangehendem subletalem Hitzeschock.

C) Suche nach Zytoprotektion durch Ko-Expression von HSP27 und HSP70:

Zur Beantwortung dieser Frage wurden *hsp27*-positive L929-Fibroblasten (A5-Klone) plus/minus vorangehendem subletalem Hitzeschock einander gegenübergestellt. Gemessen wurde jeweils der LDH-Efflux sowie der DNA-Gehalt. Es zeigt sich der Trend einer geringen späten Additivität bei der Ko-Expression beider Proteine. Im Gegensatz zum frühen Abfall der Wachstumskurven unter Behandlung mit 1 μ M Mtx steigen diejenigen der mit 100nM Mtx exponierten Zellen bis 48 Stunden nach Behandlung an, die vorgeschockten gar bis 72 Stunden nach Behandlung (s. Abb. 12). Einen gleichen Effekt zeigt die LDH-Efflux-Messung, nach 72 Stunden weisen die vorgeschockten und mit 100nM behandelten Zellen einen geringeren Efflux auf. Zudem zeigt sich 48 Stunden nach Exposition mit der hochtoxischen Konzentration von 1 μ M Mtx ein deutlich verminderter LDH-Efflux der einem vorangehenden Hitzeschock ausgesetzten Zellen verglichen mit den nicht-vorgeschockten (s. Abb. 13).

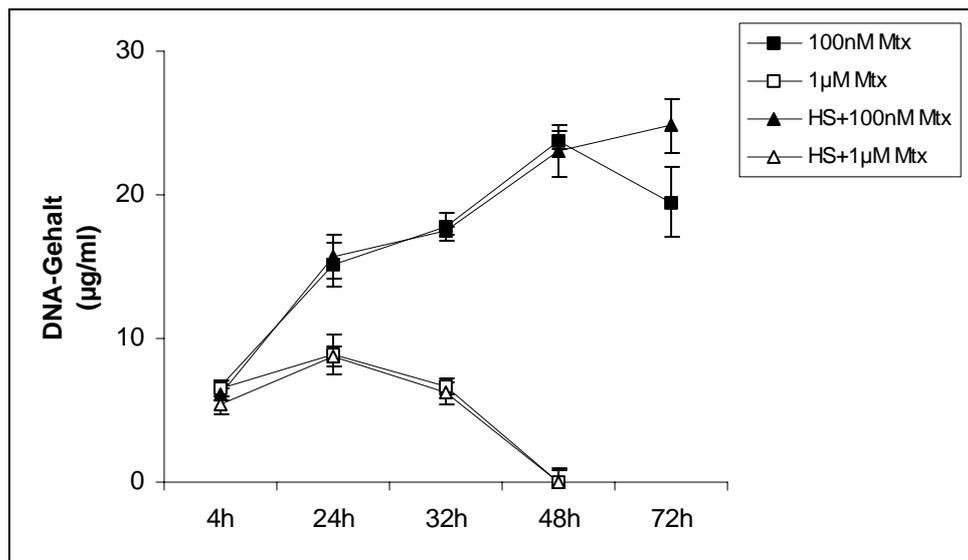


Abb.12: Darstellung des Proliferationsverhaltens von L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 100nM bzw 1 μ M Mtx. Vergleichend gegenübergestellt werden *hsp27*-positive A5-Klone mit mit selbigen ohne vorangehenden subletalem Hitzeschock.

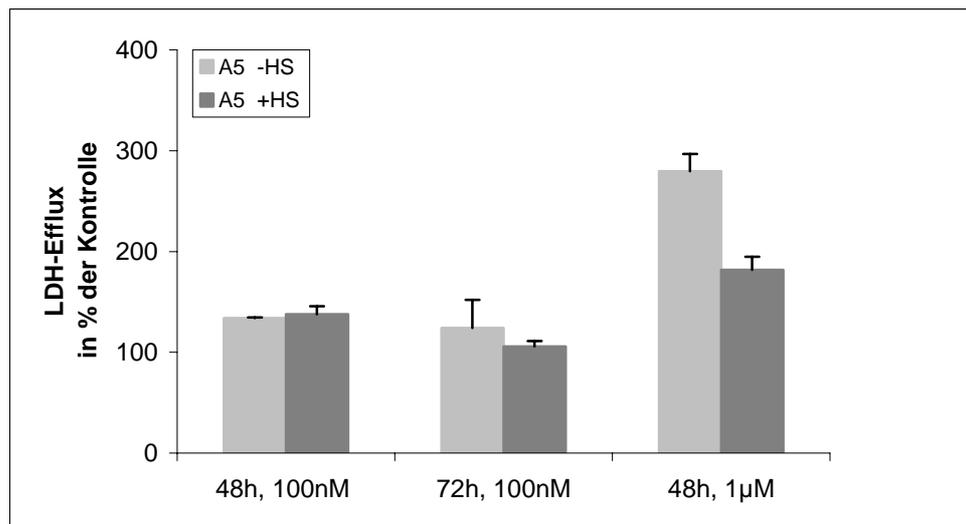


Abb.13: LDH-Efflux aus L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 100nM bzw 1μM Mtx. Vergleichend gegenübergestellt werden *hsp27*-positive A5-Klone mit und selbige ohne vorangehendem subletalem Hitzeschock.

4.2.2. Zellexposition mit dem Pyrimidin-Basen-Antagonisten 5-Fluorouracil

Im Versuchsaufbau identisch mit der Ermittlung der zytotoxischen Konzentration von Mtx wurde in einer weiteren Testserie Neo1-L929-Fibroblasten mit 5-FU in Konzentrationen von 1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M sowie 10 μ M behandelt, dann wurde nach 4, 24, 48 und 72 Stunden fluorometrisch der DNA-Gehalt gemessen und Wachstumskurven erstellt. Gemäß der Wachstumshemmung erfolgten die nachfolgenden Behandlungen jeweils in den zytotoxischen Konzentrationen von 1 μ M sowie 4 μ M.

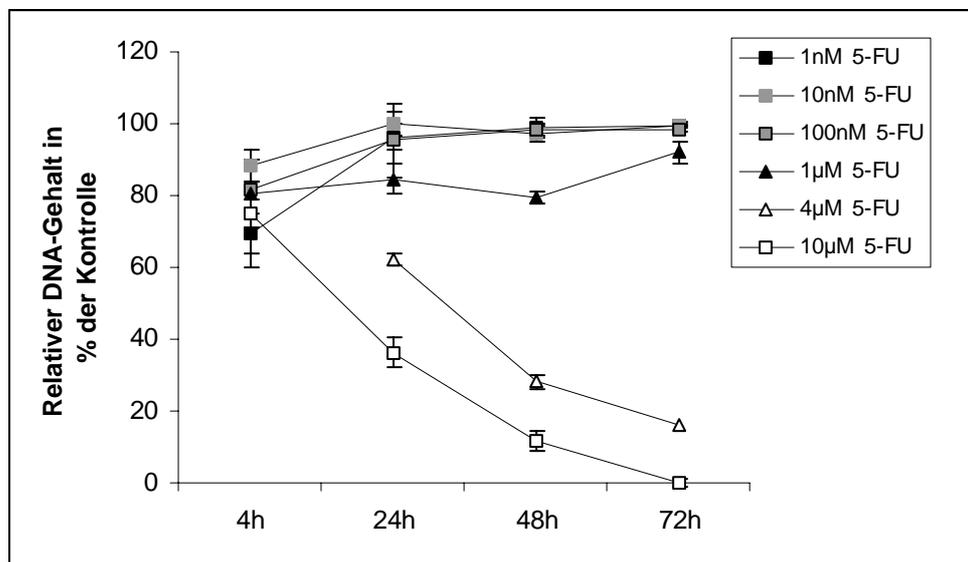


Abb.14: Ermittlung der geeigneten zytotoxischen 5-FU-Konzentrationen für die nachfolgenden Versuche durch Detektion der Wachstumshemmung via Bestimmung des DNA-Gehaltes, die exponierten Zellen wurden in Relation zu den als 100% gesetzten unbehandelten Kontrollzellen dargestellt.

4.2.2.1. Untersuchung der HSP27/HSP70-Induktion durch 5-FU

HSP27:

Alle drei Zelllinien (parentale Zellen, Neo1- sowie A5-Klone) wurden mit den 5-FU-Konzentrationen 1 μ M (nicht mit 4 μ M!) plus/minus vorangehendem subletalem Hitzeschock exponiert. Nach standardisiertem Versuchsablauf konnte man anhand der resultierenden Banden im Western-Blot ersehen, daß HSP27 in den *hsp27*-positiven A5-Klonen konstitutiv exprimiert wird und durch das zytotoxische Agens 5-FU ebenso wie bei Mtx nicht hochzuregulieren ist (s. Abb. 15). In den *hsp27*-negativen Zellen Neo1 sowie den Parentalzellen ist keinerlei HSP27-Expression nachzuweisen. Da es sich um

eine semiquantitative Auswertung handelte, wurde von einer statistischen Beurteilung abgesehen, das gezeigte Ergebnis wurde in weiteren Western-Blots bestätigt.

A5-Klone, HSP27-Expression:

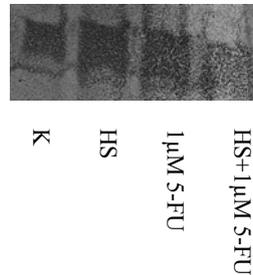


Abb.15: Western-Blot , A5-Klone, exponiert mit 1µM 5-Fu +/-Hitzeschock nach (72h).

HSP70:

Wiederum wurden alle drei Zelllinien (parentale Zellen, Neo1- sowie A5-Klone) mit 1µM 5-FU plus/minus vorangehendem subletalem Hitzeschock standardisiert behandelt. Anhand der Resultate der Western-Blots ließ sich keine Veränderung im Expressionsverhalten bezüglich HSP70 beobachten (s. Abb. 16). Da es sich um eine semiquantitative Auswertung handelte, wurde von einer statistischen Beurteilung abgesehen, das gezeigte Ergebnis wurde in weiteren Western-Blots bestätigt.

Parentalzellen, HSP70-Expression:

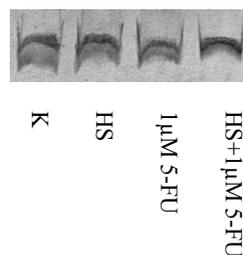


Abb.16: Western-Blot, parentale L929-Fibroblasten, behandelt mit 1µM 5-FU +/- vorangehendem Hitzeschock (nach 24h).

4.2.2.2. Untersuchungen zu Zytoprotektivität gegen 5-FU durch HSP27 und/oder HSP70

Zur Beantwortung der Frage, ob Hitzeschockprotein 27 und/oder Hitzeschockprotein 70 einen Überlebensvorteil für die exprimierenden Zellen gegenüber nicht exprimierenden Kontrollzellen bedeutet, wurden parentale, Neo1- sowie A5-L929-Fibroblasten gemäß Protokoll Hitzeschock und/oder 5-FU in den Konzentrationen 1 μ M und 4 μ M exponiert und nach definierten Zeitpunkten die resultierende Zytotoxizität einerseits indirekt mittels DNA-Gehaltsmessung und andererseits direkt durch Messung des LDH-Effluxes gemessen und quantifiziert.

A) Suche nach Zytoprotektion durch HSP27:

Zur Beantwortung dieser Frage wurden *hsp27*-negative Zellen (P, Neo1) *hsp27*-positiven Zellen (A5-Klone) vergleichend gegenübergestellt. Es zeigt sich weder in den DNA-Gehalts-Messung (ähnlicher Kurvenverlauf der Zelllinien unter identischer Noxenexposition, s. Abb. 17) noch in den LDH-Efflux-Messungen (s. Abb. 18) eine signifikante Zytoprotektivität des HSP27 gegen die zytotoxischen Effekte von 5-FU.

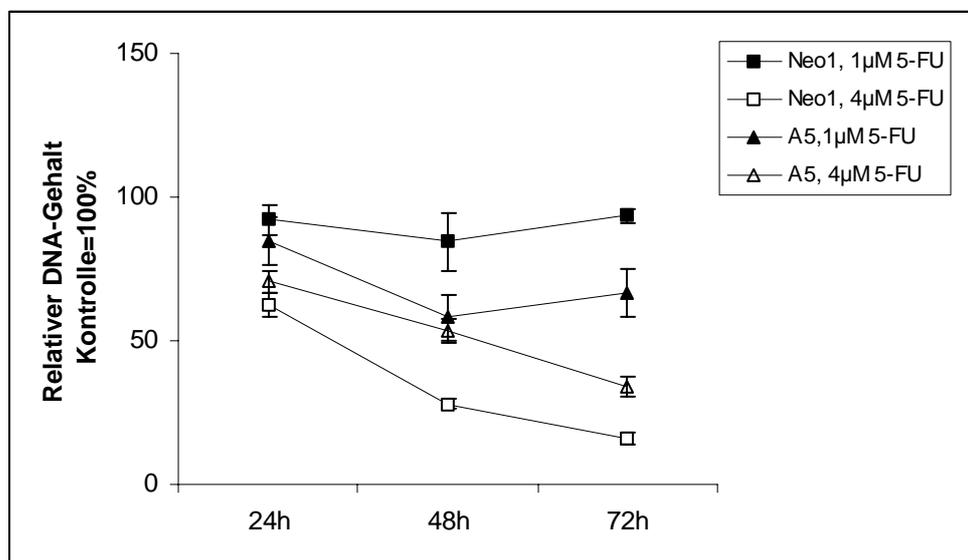


Abb.17: Darstellung des Proliferationsverhaltens von L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 1 μ M bzw. 4 μ M 5-FU. Vergleichend gegenübergestellt werden *hsp27*-negative (Neo1) *hsp27*-positiven (A5-Klone) Zellen.

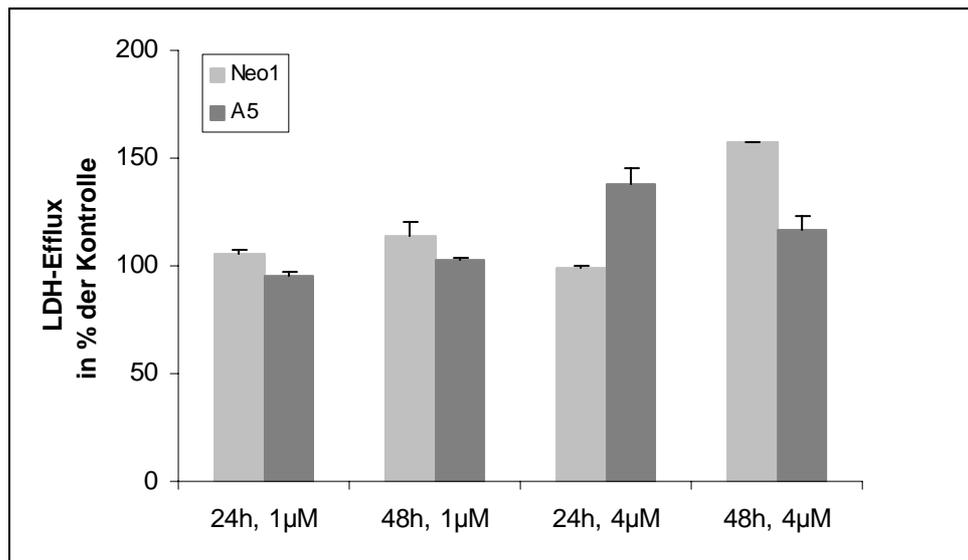


Abb.18: LDH-Efflux aus L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 1µM bzw 4µM 5-FU. Vergleichend gegenübergestellt werden *hsp27*- negative (Neo1) *hsp27*-positiven (A5-Klone) Zellen.

B) Suche nach Zytoprotektion durch HSP70-Überexpression:

Zur Beantwortung dieser Frage wurden *hsp27*-negative L929-Fibroblasten (P, Neo1) plus/minus vorangehendem subletalem Hitzeschock einander gegenübergestellt. Eine Schutzwirkung durch Überexpression von HSP70 ist mittels Erstellen einer Wachstumskurve oder Messung des LDH-Effluxes nicht nachweisbar. Der Kurvenverlauf zeigt sich für die mit identischer Konzentration des Medikamentes behandelten Zellen jeweils weitgehend parallel (s. Abb. 19), der LDH-Efflux jeweils in ähnlichem Ausmaß (s. Abb. 20).

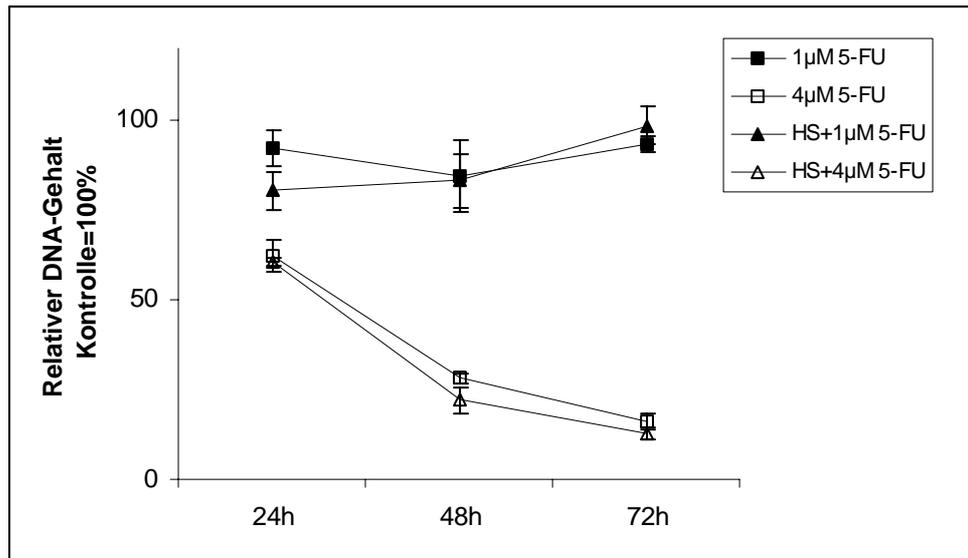


Abb.19: Darstellung des Proliferationsverhaltens von L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 100nM bzw 1µM 5-FU. Vergleichend gegenübergestellt werden Neo1-Fibroblasten mit und selbige ohne vorangehendem subletalen Hitzeschock.

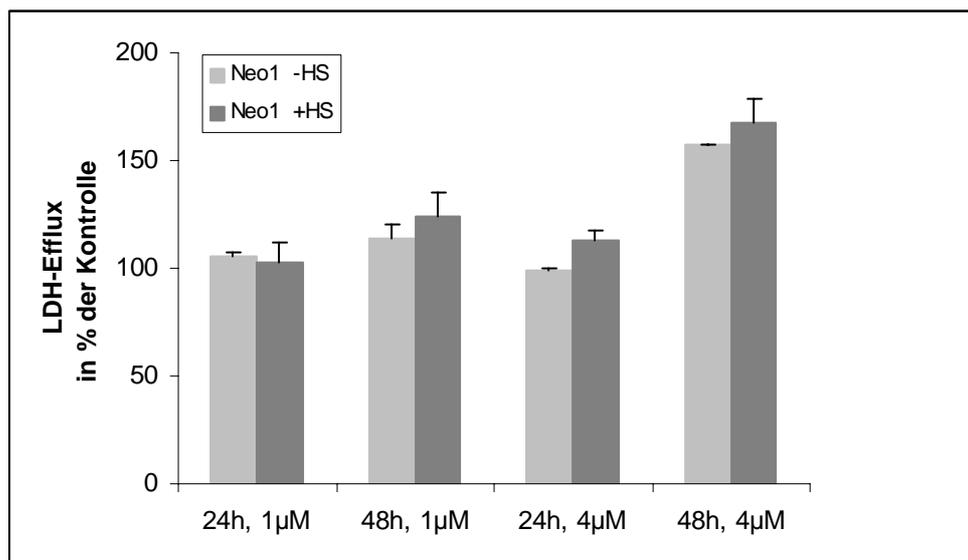


Abb.20: LDH-Efflux aus L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 1µM bzw 4µM 5-FU. Vergleichend gegenübergestellt werden Neo1-Fibroblasten mit und selbige ohne vorangehendem subletalen Hitzeschock.

C) Suche nach Zytoprotektion durch Ko-Expression von HSP27 und HSP70:

Zur Beantwortung dieser Frage wurden *hsp27*-positive L929-Fibroblasten (A5-Klone) plus/minus vorangehendem subletalen Hitzeschock einander gegenübergestellt, wiederum erfolgten Zytotoxizitätsmessungen mittels Erstellen von Wachstumskurven sowie Messungen des LDH-Effluxes. Eine Zytoprotektivität durch HSP27-Überexpression im Sinne eines additiven Effektes läßt sich nicht verzeichnen. Auch hier zeigt sich der Kurvenverlauf für die mit identischer Konzentration des Medikamentes

behandelten Zellen jeweils weitgehend parallel (s. Abb. 21). Die LDH-Efflux-Messung macht die erhöhte Toxizität der höheren 5-FU-Konzentration von 4 μ M insbesondere nach 48 Stunden verglichen mit der gering-toxischen Konzentration von 1 μ M deutlich (s. Abb. 22).

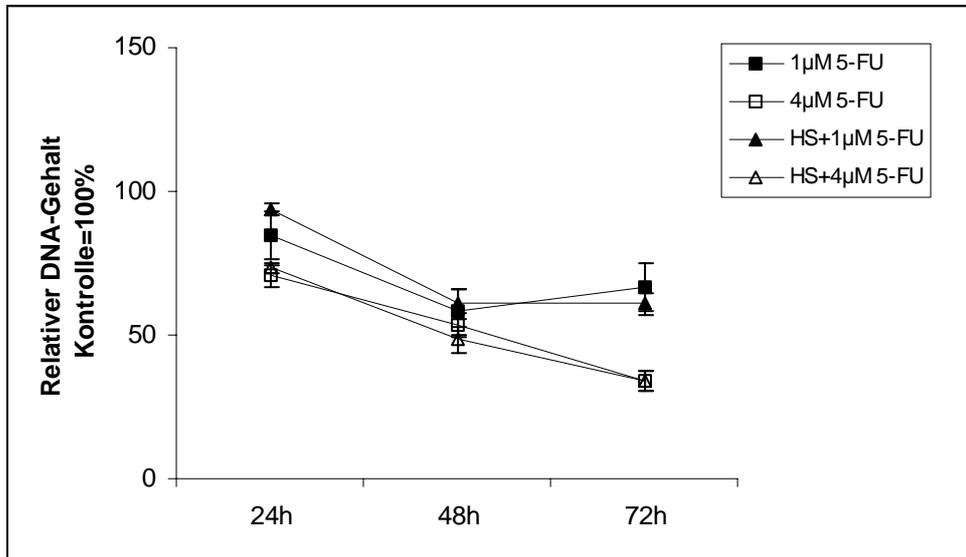


Abb.21: Darstellung des Proliferationsverhaltens von L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 1 μ M bzw 4 μ M 5-FU. Vergleichend gegenübergestellt werden *hsp27*-positive A5-Klone mit mit selbigen ohne vorangehenden subletalem Hitzeschock.

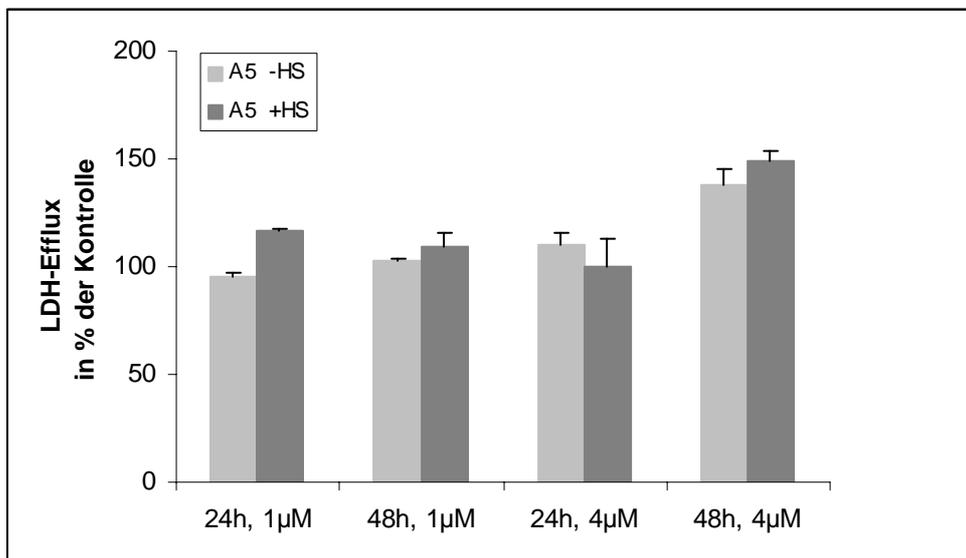


Abb.22: LDH-Efflux aus L929-Fibroblasten unter Behandlung mit 1 μ M bzw 4 μ M 5-FU. Vergleichend gegenübergestellt werden *hsp27*-positive A5-Klone mit mit selbigen ohne vorangehenden subletalem Hitzeschock.

4.2.3. Experimente mit Cyclophosphamid

Die für Methotrexat und 5-Fluorouracil im vorangehenden beschriebenen Versuche wurden als dritte der Einzelsubstanzen auch mit Cyclophosphamid durchgeführt. Es wurden Anstrengungen unternommen, das Problem der notwendigen Aktivierung durch Verwendung entsprechender Metaboliten zu lösen, dies führte jedoch nicht zum erwünschten Erfolg (s. Kapitel 5.6.). Die auf Grund dessen nicht auswertbaren Resultate der durchgeführten Experimente werden nicht weiter beschrieben.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage nach Induktion der Hitzeschockproteine HSP70 und HSP27 in L929-Mausfibroblasten durch die Behandlung mit zytostatisch wirksamen Medikamenten, letztlich als Teil einer möglichen Resistenzentwicklung zu sehen, untersucht, welche routinemäßig in der Therapie des Mamma-Karzinoms eingesetzt werden. Darüber hinaus wurden die aus einer konstitutiven oder induzierbaren HSP-Expression resultierenden Wirkungen auf zytotoxischem Streß ausgesetzten Zellen untersucht.

5.1. Charakterisierung der L929-Mausfibroblasten

Zur in vitro-Untersuchung der Induzierbarkeit spezifischer Proteine durch definierte äußere Einflüsse sowie die Untersuchung spezifischer Wirkungen eben dieser Proteine auf das Gesamtgefüge der Zelle wurde in der vorliegenden Arbeit mit L929-Mausfibroblasten ein Zellsystem gewählt, welches durch stabile Transfektion mit dem humanen *hsp27*-Gen bei bekannter HSP70-Induzierbarkeit ein gutes Werkzeug zur gezielten Untersuchung dieser beiden Proteine darstellt. Infolge der Transfektion durch das *hsp27*-Gen wird das Hitzeschockprotein 27 konstitutiv exprimiert. Endogenes HSP27 scheint nicht vorzuliegen (Arrigo und Landry, 1994; Lee et al., 1992, Lee et al., 1994). HSP70 wird bereits parental exprimiert. Wichtig in diesem Zusammenhang wäre noch zu erwähnen, daß Mehlen et al. (1995) zeigten, daß eine erhöhte HSP27-Synthese erst 20 Stunden nach einer Hitze-Behandlung nachweisbar ist.

Zunächst wurden zur Charakterisierung und Überprüfen des Zellsystems Expressionskontrollen für HSP27 und HSP70 durchgeführt. Zur Untersuchung einer Induzierbarkeit wurden die Zellen einem subletalen Hitzeschock ausgesetzt. Die Ergebnisse der Western-Blots zeigten erwartungsgemäß, daß HSP27 konstitutiv in den *hsp27*-transfizierten Klonen exprimiert wird und sich die Expression durch Streß (subletaler Hitzeschock) nicht hochregulieren läßt. Auch im Zeitverlauf, untersucht wurde die Expression semiquantitativ nach 2h, 6h, 24h und 48h, zeigen sich keine Unterschiede (s. Abb. 1). Die parentale Zelllinie sowie die Neo1-Zellen sind nicht zur Expression des HSP27 in der Lage. Die Aussage von Mehlen konnte mit dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellsystem also nicht untersucht werden.

Für HSP70 konnte eine basale Expression von HSP70 in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, welche durch Zellstreß (subletaler Hitzeschock) in allen drei untersuchten Zelllinien klar induzierbar ist. Die Expression von HSP70 scheint unabhängig von der HSP27- Expression zu sein. Auch im Zeitverlauf, untersucht wurde die HSP70-Expression zu den Zeitpunkten 2h, 4h, 6h, 24h, 48h und 72h, ist für HSP70 kein sicherer Maximalpunkt eruierbar (s. Abb. 2). Im Gegensatz zu Mehlers Befunden für HSP27 ist also in den vorliegenden Experimenten eine frühe Zellreaktion bezüglich der HSP70-Expression nachweisbar.

Diese Ergebnisse korrelieren mit bereits in einer der vorliegenden Arbeit vorangehenden Dissertation der Arbeitsgruppe erhobenen Expressionskontrollen (Jost, 1998) sowie der Gruppe um Mairesse, welche die Zellen für diese Arbeiten zur Verfügung stellte.

Um in den Experimenten Effekte, die durch das Procedere der Transfektion und Selektion entstehen können, zu kontrollieren, sollten stets in allen Versuchen sowohl Transfektionskontrollen als auch die parentale Zelllinie als Kontrolle und Vergleichsparameter mitgeführt werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit stets beachtet.

5.2. Wahl der geeigneten Medikamentenkonzentrationen für die in vitro-Experimente

Bei der polychemotherapeutischen Behandlung des Mamma-Karzinoms wurde zur Zeit unserer Messungen im Rahmen des CMF-Protokolls in der klinischen Anwendung für Methotrexat üblicherweise die Dosierung $40\text{mg}/\text{m}^2$ Körperoberfläche und für 5-Fluorouracil die Dosierung $600\text{mg}/\text{m}^2$ Körperoberfläche angewandt. Bei der Ermittlung der geeigneten Behandlungskonzentrationen erwarteten wir bei der zytotoxischen Wirkung auf unser Zellsystem eine größenordnungsmäßige Äquivalenz mit diesen klinisch am Patienten verwendeten Dosen.

Zur Untersuchung der geeigneten Konzentrationen erstellten wir relativ zur mitgeführten nicht exponierten Kontrolle (entsprechend 100%) Wachstumskurven zur Darstellung der Wachstumshemmung. Mittels DNA-Gehaltsmessung wurden die zytotoxischen Auswirkungen von Methotrexat und in separater Versuchsreihe 5-Fluorouracil jeweils in den Konzentrationen von 1nM in Schritten um den Faktor 10 aufsteigend bis zu $10\mu\text{M}$ gemessen. Verwendet wurden hierfür Neo1-Klone. Unseren

Resultaten gemäß wählten wir für Mtx die mittelgradig-toxische Konzentration 100nM und zusätzlich die stark toxische („knock-out-“) Konzentration 1µM aus. 10nM erwiesen sich als nicht signifikant unterschiedlich zu den mitgeführten nicht-exponierten Kontrollzellen. Für das Medikament 5-FU erachteten wir die Konzentration 4µM als sehr gut geeignet, zusätzlich entschieden wir uns dafür, die sehr gering zytotoxische Konzentration 1µM 5-FU mitzuführen.

Der Abfall der Wachstumskurven (s. Abb. 3 u. 14) zeigte sich für 100nM Mtx und 4µM 5-FU nahezu identisch, die Zytotoxizität war jeweils bereits nach 24 Stunden deutlich, nach 72 Stunden betrug der DNA-Gehalt jeweils weniger als 20% der Ausgangsmengen/der Kontrolle.

In Betrachtung der Größenverhältnisse in der Konzentrationsspreizung ist zu bemerken, daß im klinischen Behandlungsprotokoll zwischen 40mg/m² Mtx und 600mg/m² 5-FU der Faktor 15, zwischen 100nM Mtx und 4µM 5-FU in unseren in vitro-Experimenten der Faktor 40 liegt. Die Gründe für diese geringgradige Differenz sind am ehesten pharmakokinetischer Natur.

Es bleibt zu erwähnen, daß die Expressionsuntersuchungen für 5-Fluorouracil nur für die gering toxische Konzentration von 1µM, nicht jedoch für die eigentlich relevante mittelgradig-toxische Konzentration von 4µM durchgeführt wurden. Die wichtigen Western-Blots für 4µM konnten leider im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden, dies hätte den zeitlichen und finanziellen Rahmen der Arbeit gesprengt. Diese Problematik wird im folgenden beachtet werden.

5.3. Untersuchung der HSP27/HSP70-Induzierbarkeit durch Methotrexat und 5-Fluorouracil

Sowohl HSP70 als auch HSP27 werden erheblich hochexprimiert in den Östrogen-abhängigen Geweben des weiblichen Reproduktionstraktes wie auch in anderen Tumoren gefunden. Eine erhöhte HSP-Expression wurde des weiteren für HSP27 und HSP70 in Hirntumoren (Kato M. et al., (1992); Kato S et al., (1993)), HSP70 in Zervixtumoren (Rahhan R und Kaur J., (1995)) sowie HSP60 (Kimura E. et al., (1993)) und HSP27 (Geisler et al., (1998)) in Ovarialkarzinomen nachgewiesen. In jeder HSP-Familie gibt es Proteine, die konstitutiv exprimiert, und andere, die nur nach Stresseinwirkung induziert werden.

Das Phänomen der Induktion der HSPs durch Noxen soll in der vorliegenden Arbeit für Mtx und 5-FU mittels Western-Blot untersucht werden. Der Nachweis der Induktion wurde immunologisch erfasst und quantifiziert. Hierzu erfolgte die Behandlung aller Zelllinien mit 100nM sowie 1µM Methotrexat und in einer separaten Versuchsreihe mit 1µM 5-Fluorouracil, jeweils mit und ohne vorangehendem subletalem Hitzeschock. Das Gesamtprotein wurde zu den definierten Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden isoliert. HSP27 und HSP70 stellten sich im Western-Blot als spezifische Banden dar.

Wie auch die Gen-Ausstattung erwarten liess, konnte mittels der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente nachgewiesen werden, dass HSP27 im verwendeten Zellsystem nur in den *hsp27*-positiven transfizierten Klonen konstitutiv exprimiert wird und weder durch Hitzeschock noch durch Behandlung mit Mtx oder 5-FU in ihrem Expressionsverhalten signifikant veränderbar sind (s. Abb. 4 u. 15). Diesbezüglich ist jedoch zu beachten, dass das verwendete Zellsystem auch exponiert mit Hitze als Stressfaktor HSP27 nur konstitutiv exprimiert. Die Aussage, keines der beiden Medikamente könne HSP27 hochregulieren, bleibt also auf dieses Zellsystem beschränkt und ist nicht auf andere Zellsysteme übertragbar. Eine Untersuchung müsste an einem Zellsystem, welches nachweislich zur Hochregulation des HSP27 in der Lage ist, überprüft werden.

HSP70 hingegen konnte mittels der durchgeführten Untersuchungen sowohl nach Stressexposition im Sinne eines subletalen Hitzeschocks wie auch nach Behandlung mit 100nM und 1µM Mtx in grösserer Menge als der basalen Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 5, 6 u. 7). Durch 5-FU-Exposition (in der Zytotoxizitätskonzentration im Verhältnis zu Mtx leider wesentlich niedriger dosiert) war eine solche Hochregulation der HSP70-Expression mit Ausnahme einer sehr leichten Tendenz nicht sicher zu beobachten (s. Abb. 16). Es ist also anhand der vorliegenden Experimente nicht sicher auszuschliessen, dass HSP70 nicht auch durch 4µM 5-FU eine Höherregulation erfahren könnte. Lediglich die aus den durchgeführten Zytotoxizitätsmessungen gewonnenen Erkenntnisse (s.u.), dass nur eine sehr geringe Protektion durch 5-FU in zytotoxischer Konzentration erreichbar ist, lassen erwarten, dass auch durch 4µM 5-FU keine oder nur eine geringe Induktion erzielt werden kann. Es wäre sicherlich wichtig, dies in einer zukünftigen Arbeit nachzuprüfen. Sollte HSP70

tatsächlich jedoch nicht durch 5-FU induzierbar sein, ließe dies einen Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus der unterschiedlichen Substanzklassen vermuten.

Ein Maximum der Expression im Zeitverlauf ist mittels der vorliegenden Western-Blots nur bedingt nachweisbar, bereits nach 24 Stunden ist HSP70 deutlich induziert. Verglichen mit den darüber hinaus untersuchten Zeitpunkten 48 und 72 Stunden ergibt sich keine klare Veränderung, lediglich eine Tendenz zu einem Maximum nach 48 Stunden läßt sich vermuten. Dies müßte jedoch in weiteren Versuchen gezielt untersucht werden.

Zu erwähnen wäre noch der wichtige Aspekt, daß stets die mit Hitze exponierten Zellen HSP70 am höchsten exprimierten, dies war auch durch die hochtoxisch-subletale Konzentration von 1µM Mtx nicht erreichbar. Eine additive Wirkung von einer dem subletalen Hitzeschock nachfolgenden Mtx-Exposition konnten wir also nicht definitiv feststellen. Auch hier ist allenfalls ein Trend zu verzeichnen, der aber ebenfalls in gezielten problemorientierten Versuchen gesichert werden müßte. Durch einen subletalen Hitzeschock scheint also das Maximum einer möglichen Induzierbarkeit im vorliegenden Zellsystem bereits erreicht zu werden.

Die Erkenntnisse, die sich aus den durchgeführten Western-Blots ableiten lassen, sind in den folgenden zwei Tabellen übersichtsartig zusammengefasst:

		P			Neo			A5		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Mtx (100nM, 1µM)	HSP70	n↑	↑	n	↑	↑	↑	↑	↑	n
	HSP27	-	-	-	-	-	-	n	n	n
5-FU (1µM)	HSP70	n↑	n	n↑	n↑	n	n	()	n	n
	HSP27	-	-	-	-	-	-	n	n	n
Hitzeschock	HSP70	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	HSP27	-	-	-	-	-	-	n	n	n

Tab.3: n: keine Veränderung, ↑: Erhöhung des Expressionsniveaus, (): kein Resultat

		P			Neo			A5		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
HS+Mtx	HSP70	n	n	n↑	n	n↑	n	n	n	n↑
HS+5-FU	HSP70	n	n	n↑	n	n	n	()	n	n

Tab.4: n: keine Veränderung, ↑: Erhöhung des Expressionsniveaus, (): kein Resultat

5.4. Zytoprotektivität gegen Methotrexat/5-FU durch Hitzeschockproteine

Zytoprotektive Eigenschaften von Hitzeschockproteinen sind vielfach beschrieben worden (Landry et al., 1989; Welch, 1993; Mehlen et al., 1995; Mehlen et al., 1996; Huot et al., 1991; Huot et al., 1996; Jakob et al., 1993; Ciocca et al., 1993b; Jäättelä et al., 1992; Jäättelä 1995; Kabakov et al., 1995). Ihre Überexpression wird in Zusammenhang mit einer Resistenz gegen Zytostatika, verschiedenen Chemikalien und Hitzeschock gebracht, Korrelationen zwischen Induktion von HSPs und Zytoprotektion durch subletalen Hitzeschock deuten drauf hin, daß HSP-Induktion einen wichtigen zellulären Abwehrmechanismus darstellt. So schützt HSP27 unter anderem vor den letalen Folgen durch Hitze oder Chemikalien (Landry et al., 1989; Huot et al., 1991; Ciocca et al., 1992; Jakob et al., 1993).

Es stellte sich die Frage, inwieweit die Expression von HSPs, in diesem Fall der „kleinen HSPs“ (HSP27) sowie der gut untersuchten Familie der HSP70, die exponierte L929-Zelle vor oxidativem Stress, ausgelöst durch Methotrexat und 5-Fluorouracil, schützen kann, inwieweit eine positive HSP-Expression eine Zellantwort auf Zytostatika-induzierte Zytotoxizität verändert. Kann die postulierte zytoprotektive Eigenschaft von HSP27 oder auch HSP70 eine Zelle auch vor Zytostatika bewahren? Gibt es Unterschiede bezüglich der Substanzklassen? Und gibt es schlüssige Korrelationen zu den oben beschriebenen Befunden zur HSP-Induktion?

Zur Klärung dieser Fragen wurden die parentalen L929-Mausfibroblasten, die Neo1- sowie die A5-Klone in jeweils separaten Versuchsreihen und jeweils plus/minus vorangehendem subletalen Hitzeschock mit 100nm Mtx, 1µM Mtx, 1µM 5-FU sowie 4µM 5-FU Langzeit-behandelt. Zu den definierten Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden wurden, um das Ausmaß der akuten Toxizität zu klären, Zytotoxizitätstest durchgeführt. So gibt die Messung der Proliferation Aufschluss über die zytotoxischen Effekte auf die Zellen. Ein besseres Wachstum nach Behandlung mit verschiedenen Noxen wird als Ausdruck eines besseren Schutzes interpretiert. Um dieses Kriterium zu überprüfen wurde der DNA-Gehalt bestimmt. Zudem wurde mittels LDH-Efflux-Messung die direkte Zytotoxizität gemessen. Zur Diskussion der verschiedenen Aspekte wurden zusammenschauend nach Abschluss der Experimente die unterschiedlichen Parameter einander inter- und intra-experimentell vergleichend gegenübergestellt.

5.4.1. Schutz durch HSP27

Zur isolierten Betrachtung der Einflußnahme von HSP27 auf die Integrität des verwendeten Zellsystems nach Exposition mit Mtx und 5-FU in zytotoxisch wirksamen Konzentrationen ist der Vergleich der Ergebnisse der durchgeführten Zytotoxizitätstests der *hsp27*-negativen parentalen Zelllinie oder Neo1-Klone mit denen der *hsp27*-positiven *hsp27*-transfizierten A5-Klonen geeignet.

Die durchgeführten DNA-Gehalts-Messungen zeigten einen eindeutigen Wachstumsvorteil der *hsp27*-positiven gegenüber den *hsp27*-negativen Zellen nach Behandlung mit der mittelgradig-toxischen Mtx-Konzentration von 100nM. Eine Wachstumshemmung setzte bei erstgenannten erst 48 Stunden nach Mtx-Exposition ein, während bei letzteren eine solche bereits nach 32 Stunden zu beobachten war, der Abfall der absoluten DNA-Konzentration war zudem steiler. Bei Betrachtung der entsprechenden Daten für die Versuchsreihe mit der hochtoxischen Konzentration von 1µM Mtx war ein solcher Wachstumsvorteil in den DNA-Gehaltsmessungen hingegen nicht mehr zu beobachten. Die Wachstumshemmung setzte hier gleichermaßen für die *hsp27*-negativen wie *hsp27*-positiven Zellen sehr früh, bereits nach 24 Stunden ein, der Nullpunkt war schon nach 48 Stunden erreicht. Ein Unterschied war mit dieser Zytotoxizitäts-Mess-Methode nicht zu ersehen (s. Abb. 8). Zog man jedoch die Ergebnisse der LDH-Testungen hinzu (s. Abb. 9), erkannte man zum einen wie erwartet einen klar um durchgehend etwa 50% erniedrigten Enzym-Efflux bei den mit 100nM Mtx-exponierten A5-Klonen verglichen mit den *hsp27*-negativen Kontrollen zu den späten Zeitpunkten 48 und 72 Stunden (nach 24 Stunden war noch kein Effekt nachweisbar). Außerdem war interessanterweise für die hochtoxische 1µM-Exposition nach 48 Stunden noch eine Schutzwirkung (ebenfalls bei LDH-Efflux-Reduktion um ca 50%) des HSP27 sichtbar. Nach 72 Stunden waren dann alle Zellen bereits abgekugelt, der LDH-Efflux konnte nicht mehr gemessen werden. Dies zeigte uns intermethodisch die höhere Sensitivität der LDH-Messung gegenüber der DNA-Gehaltsbestimmung.

Ganz anders verhielt es sich hingegen bei der Substanz 5-FU. Die Zytotoxizitätsmessungen zeigten weder für die mit gering- noch für die mit höhertoxischer 5-FU-Konzentrationen (1µM und 4µM) behandelten Zellen einen

Unterschied im Wachstumsverhalten bzw. der akuten Zytotoxizität zwischen den *hsp27*-negativen und den *hsp27*-positiven Zelllinien (s. Abb. 17 u. 18).

Dies ist eine klare Demonstration der mittels *hsp27*-Transfektion erworbenen (späten) zellulären Resistenz gegen das zytostatisch wirksame Medikament Methotrexat in mittelgradig-toxischer Konzentration mit einem Maximum an Schutzwirkung nach 48 Stunden, anhaltend bis zu 72 Stunden. Für das hochtoxische Milieu bei Exposition mit 1 μ M Mtx reicht die Schutzwirkung lediglich noch bis nach 48 Stunden aus.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich das Vorliegen einer Substanzklassen-Abhängigkeit ableiten (s.u.).

5.4.2. Schutz durch HSP70

Mittels der Western-Blots wurde, wie oben ausführlich erläutert, nachgewiesen, daß Mtx eine HSP70-Induktion hervorruft, während eine solche durch die Exposition mit 5-FU (allerdings in wesentlich geringerer zytotoxischer Konzentration) unbeeinflusst bleibt. Dementsprechend würde man in den Zytotoxizitätsmessungen einen Wachstumsvorteil sowie einen erniedrigten LDH-Efflux für die Mtx-exponierten Zellen, nicht hingegen für die 5-FU-exponierten Zellen erwarten.

Zur Klärung dieser Vermutung wurden basal HSP70-exprimierende Zellen solchen gegenübergestellt, deren HSP70-Expression durch einen der Medikamentenexposition vorangehenden subletalen Hitzeschock hochreguliert wurde. Zum Ausschluß einer HSP27-Beteiligung wurden hier ausschließlich *hsp27*-negative Neo1-Klone (plus/minus subletalem Hitzeschock) sowie kontrollierend auch stets parentale Zellen betrachtet.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, nur bedingt die Erwartungen erfüllend, in der DNA-Gehaltsmessung keinen Wachstumsvorteil der vorgeschockten mit 100nM Mtx behandelten Fibroblasten gegenüber den nicht-vorgeschockten, der LDH-Efflux erwies sich als lediglich in der Tendenz nach 48 und 72 Stunden um leichtgradig geringer, was allenfalls eine Interpretation als Trend einer zytoprotektiven Fähigkeit des HSP70 gegen Mtx erlaubt. Für 1 μ M Mtx war im Gegenteil gar eine leicht additive

Toxizität (Hitzeschock+1 μ M Mtx) nach 48 Stunden durch den LDH-Efflux zu erkennen (s. Abb. 10 u. 11).

Den gesetzten Erwartungen jedoch voll entsprechend war für 5-FU kein durch HSP70 geschaffener Überlebensvorteil für die Medikamentenkonzentrationen 1 μ M und 4 μ M zu den untersuchten Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nachweisbar (s. Abb. 19 u. 20).

Resümierend läßt sich durch HSP70 also die Tendenz hin zu einer Protektion vor Mtx in mittelgradig toxischer Konzentration von 100nM zu den identischen Zeitpunkten wie die HSP27-Schutzwirkung, nach 48 und 72 Stunden, zeigen. Für 1 μ M Mtx reicht die geringe Schutzwirkung nicht aus, eine solche besteht ebenfalls nicht für 1 μ M und 4 μ M 5-FU.

5.4.3. Schutz durch Ko-Expression (HSP27+HSP70)

Bisher lag der Fokus der vorliegenden Ausführungen jeweils gezielt auf lediglich einem einzelnen Protein. Offen ist noch die durchaus relevante Frage, ob durch die Ko-Expression beider untersuchten Proteine, HSP27 und HSP70, eine zytoprotektive Wirkung nachweisbar ist. Gesucht wurde nach einer möglicherweise vorliegenden additiven Kooperation hochexprimiert vorliegenden HSP27 und HSP70. Die Antwort wurde mittels Betrachtung der *hsp27*-positiven Klone gesucht, verglichen wurden jeweils hitzebehandelte mit nicht-hitzebehandelten A5-Klonen. Wiederum erfolgte die zytotoxische Behandlung mit 100nM und 1 μ M Mtx sowie 1 μ M und 4 μ M 5-FU. Gemessen wurde die Zytotoxizität jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden, lediglich für den Versuch mit 1 μ M Mtx konnte nach 72 Stunden keine LDH-Messung mehr durchgeführt werden.

Mittels DNA-Gehaltmessung wurde ein geringer später Wachstumsvorteil der mit 100nM Mtx exponierten beide Proteine hochexprimierenden Zellen zwischen 48 und 72 Stunden gefunden(s. Abb. 12). Die LDH-Efflux-Bestimmung zeigte zum Meßzeitpunkt 48 Stunden für 1 μ M sogar noch einen geringen Selektionsvorteil durch Ko-Expression (s. Abb.13). Nichts dergleichen lag für die mit 5-FU behandelten Fibroblasten vor (s. Abb. 21 u. 22).

Wiederum läßt sich also für Methotrexat in den mittel- bis hochtoxischen Behandlungskonzentrationen von 100nM und 1µM eine leichte Protektion durch die Ko-Expression HSP27 und HSP70 nachweisen, wiederum zeigten sich die späten Meßzeitpunkte 48 und 72 Stunden effektrelevant. Wiederum blieb eine Zytoprotektion vor 5-FU aus.

Es bleibt anzumerken, daß möglicherweise im Zeitrahmen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen, also bis maximal 72 Stunden nach Behandlung, für 5-FU *noch* keine Zytoprotektion beobachtet werden kann, das heißt, der zytotoxische Effekt des Medikamentes bereits maximal wird, bevor die HSPs zytoprotektiv eingreifen können, das Nichtansprechen des 5-FU also mit einer Art Zeitfenster erklärt werden kann. Der Schutz der HSPs wäre erst bei einer Folgetoxizität zu erwarten. Dies könnte gezielt in weiteren Versuchen überprüft werden.

5.5. Substanzabhängige HSP27/HSP70-induzierte Resistenz

Bekanntermaßen stellt die Entwicklung von Resistenzen unter Tumortherapie ein großes Problem dar. Die Suche nach den molekularen Grundlagen dieser Resistenz zeigt ein komplexes Bild. Mehrere Gene, z.B. solche aus der bekannten Gruppe der *mdr*-Gene, wie auch Störungen von Signaltransduktionswegen (Apoptoseinhibition) scheinen beteiligt zu sein. Auch einige Vertreter aus der Gruppe der HSP tragen, wie vorangehend ausführlich aufgeführt, bekanntermaßen zu diesem Phänomen bei.

Die erhöhte HSP-Expression scheint eng mit einer erhöhten Zellproliferation bzw. hohem Malignitätsgrad assoziiert zu sein. Für HSP70 sind signifikante Korrelationen mit Rezidivraten, Rückfallquoten, Malignitätsgrad und DFS in soliden Tumoren beschrieben (Chiocca et al., 1993a, Thanner et al., 2003), es gibt Hinweise für Interaktionen von HSP70 mit c-myc und p53 (s. Einleitung). Thor et al. (1991) konnte eine HSP27-Überexpression in Brustkrebszellen und Brustkrebsgewebe mit einer gesteigerten Agressivität der Tumoren korrelieren. Allgemein bekannt ist bereits, daß Zytostatika zu u.a. MDR-Induktion in der Lage sind. In Betrachtung der Funktionsweise der HSPs (s. Einleitung) könnte man sich durchaus ein Eingreifen der HSPs in diese Mechanismen vorstellen.

In Zusammenschau der in den obigen Abschnitten der Diskussion in aller Ausführlichkeit erläuterten Befunde deuten die vorliegenden Resultate also auf eine HSP-induzierte, substanzabhängige zelluläre Resistenz hin. Es gibt Anhaltspunkte, daß Mtx gar ursächlich an Resistenzentwicklungen beteiligt sein kann. Die Fähigkeit dieses Chemotherapeutikums, HSP70 nach Exposition in therapeutischer Konzentration hochzuregulieren, bedeutet möglicherweise, daß das Medikament Anteil hat an Resistenzinduktion und hierdurch selbstinduzierter Wirkungsminde rung in der Therapie. Dies hieße, daß paradoxerweise durch das Medikament selbst einer malignen Zelle eine vermehrte Widerstandsfähigkeit gegen selbiges, aber vermutlich darüber hinaus auch gegen andere Streßfaktoren verliehen würde. Hierdurch würde ein Therapieerfolg durch Mtx geschmälert, auszuschließen ist additiv hierzu leider auch nicht der Erwerb einer Wirkungsminde rung anderer Therapiebausteine, beispielsweise bei Polychemotherapien. Diese Überlegung wird konsolidiert, zieht man die allgemein anerkannte Erkenntnis hinzu, daß die Synthese der HSPs Teil einer allgemeinen adaptiven Zellantwort auf Streß ist, zu der auch Veränderungen der Zellmorphologie und der Struktur von Chromatin und Zytoskelett gehören und als Teil eines Mechanismus, welcher Medikamentenresistenzen verleiht, induziert eben durch dieses Medikament, gesehen wird.

Hiermit liegt ein Hinweis für die zukünftige Bedeutung der Hitzeschockproteine als prognostischer Parameter für die Entwicklung individueller Therapieschemata in der klinischen Tumorthapie vor. Zahlreiche weiterführende Forschungsbemühungen werden zum Erreichen dieses Ziels notwendig sein. Ein nächster Schritt hin zu einer in der Zukunft liegenden möglichen Übertragung auf die in vivo-Situation und Anwendbarkeit im klinischen Alltag wäre sicherlich eine adäquate Vervollständigung durch Cyclophosphamid sowie die Überprüfung einer additiven Kooperation bezüglich Zytotoxizität und HSP-Induktion der drei Substanzen in Kombination angewendet, grundsätzlich ist selbstverständlich eine Erweiterung um andere Chemotherapeutika ebenfalls von Interesse.

In Zukunft wird es möglicherweise interessant sein, verstärkt mittels ELISA Serumspiegel bei Patienten zu messen, weitere immunhistochemische Untersuchungen bei nodal-negativem Mamma-Karzinom-Gewebe durchzuführen und auch den Rezeptorstatus als weiteren Parameter verstärkt in den Fokus der Untersuchungen mit einzubeziehen. Schließlich könnte man aus Patienten-Karzinom-Gewebe eine Zelllinie

etablieren (HSP27-induzierbar) und diese mit den Einzelsubstanzen und auch Kombinationen des CMF-Protokolls behandeln.

Insbesondere die Klärung der offensichtlich vorliegenden Substanzabhängigkeit erscheint von höchstem Interesse zu sein und als grundlegend für das Verständnis der Abläufe bei Resistenzentwicklungen auf molekularer Ebene.

Ziel alldessen könnte sein, die Bedeutung von Hitzeschockproteinen bzw. der Nachweis entsprechender Antikörper als Messparameter, als frühzeitigen prädiktiven und/oder prognostischen Faktor in der Therapie des Mamma-Karzinomes zu nutzen und auf dessen Basis individuelle Therapievorschläge zu erarbeiten.

5.6. Anmerkungen zu den Versuchen mit dem alkylierenden N-Lost-Derivat Cyclophosphamid als Teil des CMF-Protokolls

Die Experimente mit Methotrexat und 5-Fluorouracil wurden auch mit der Substanz Maphosphamid als direkter Metabolit von Cyclophosphamid durchgeführt. Cyclophosphamid selbst ist in vitro unwirksam und benötigt metabolische Aktivierung (Giftung). Die bei in vitro-Experimenten gängige Aktivierung erfolgt üblicherweise durch einen sogenannten S9-Leberenzym-Mix, zusätzlich werden Kofaktoren (NADPH) plus NADP und Glucose-6-Phosphat benötigt. Da die verwendeten Kofaktoren in wirksamen Konzentrationen selbst toxisch sind, konnte mittels der vorliegenden Versuche nicht differenziert werden, ob die beobachteten Effekte auf die Kofaktoren oder aber das Medikament selbst zurückzuführen waren. Hinzu kam, daß auf Grund dieser Kofaktoren lediglich Kurzzeitbehandlungen, keine Langzeitbehandlung (wie bei den Versuchen mit Mtx und 5-FU angewendet, diese waren zu jenem Zeitpunkt bereits abgeschlossen) möglich war. Somit war also zum einen keine Vergleichbarkeit mit den anderen beiden Substanzen gegeben, zum anderen waren die erhobenen Resultate durch die parallele Wirksamkeit der unumgänglichen Kofaktoren nicht valide auswertbar.

6. Zusammenfassung

Eine frühe adaptive Antwort von Säugerzellen auf toxische Einflüsse stellt die Expression von Hitzeschockproteinen dar. Die zytoprotektiven Eigenschaften von Hitzeschockproteinen sind vielfach beschrieben worden (Landry et al., 1989; Welch, 1993; Mehlen et al., 1995; Mehlen et al., 1996; Huot et al., 1991; Huot et al., 1996; Jakob et al., 1993; Ciocca et al., 1993b; Jäättelä et al., 1992; Jäättelä 1995; Kabakov et al., 1995). Zu den physiologischen Aufgaben der HSPs gehört ihre Wirkung als Chaperon, z.B. bei der Proteinreifung, bekannt ist ihre Einflußnahme auf Signaltransduktionswege. Darüber hinaus sind sie aber auch ins Tumorgeschehen involviert, sie interagieren mit Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. HSP27 und HSP70 wurde in verschiedenen Tumoren erhöht gefunden (Chiocca et al., 1990; Thor et al., 1991). Unter Entwicklung von Umgebungsstress wurde eine Expression von Hitzeschockproteinen in relativ hohen Spiegel in verschiedenen, aus Tumoren etablierten Zelllinien nachgewiesen (Benndorf et al., 1988a, Benndorf et al., 1988, Ciocca et al., 1993a, 1993b; Dunn et al., 1993). Sowohl HSP70 als auch HSP27 werden erheblich hochexprimiert in den Östrogen-abhängigen Geweben des weiblichen Reproduktionstraktes gefunden. Die Überexpression verschiedener HSPs wird in Zusammenhang mit Resistenzen gegen Zytostatika, verschiedenen Chemikalien und Hitzeschock beschrieben.

Im Laufe der Behandlung mit Zytostatika entwickelt sich regelmäßig eine zunehmende Resistenz gegenüber der betreffenden Substanz bzw. Kombination der angewendeten Substanzen. Damit wird die Therapie immer weniger wirksam und verliert an Wert. Eine Resistenzentwicklung tritt bei Substanzen unterschiedlicher Wirkungsmechanismen auf, ein einheitlicher Grund ist bislang nicht gesichert. Dies stellt ein großes Problem bei der erfolgreichen Therapie solider Tumoren dar. Diskutiert wird ein Zusammenhang mit der Expression von Hitzeschockproteinen. Insbesondere die in vielen Mamma-Karzinomen stark exprimierten HSP27 und HSP70 scheinen hier beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage nach Induktion der Hitzeschockproteine HSP70 und HSP27 in L929-Mausfibroblasten durch die Behandlung mit den zytostatisch wirksamen Medikamenten untersucht. Es wurde nach einer Antwort darauf

gesucht, ob dies letztlich als Teil einer möglichen Resistenzentwicklung gesehen werden kann. Darüber hinaus wurden die aus einer konstitutiven oder induzierbaren HSP-Expression resultierenden Wirkungen auf zytotoxischem Stress ausgesetzten Zellen untersucht.

Als zytotoxische Agenzien wurden die Einzelsubstanzen des in der klinischen Therapie des Mamma-Karzinoms routinemäßig angewendeten CMF-Protokolls verwendet. Hierunter fallen die aus unterschiedlichen Substanzklassen stammenden Medikamente Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil. Die Daten der vorliegenden Untersuchungen mit Cyclophosphamid waren aufgrund der komplexen metabolischen Aktivierungsmechanismen der Substanz leider nicht verwertbar. Mittels L929-Mausfibroblasten, welche durch Transfektion mit dem humanen *hsp27*-Gen HSP27 konstitutiv exprimieren und außerdem zur basalen Expression wie auch Induzierbarkeit (es wurde hierfür standardisiert ein subletaler Hitzeschock angewandt) von HSP70 in der Lage sind, wurden die protektiven Eigenschaften dieser HSPs sowie deren Induzierbarkeit durch die entsprechenden Medikamente untersucht. Als Parameter für Zytotoxizität wurde die Beeinträchtigung vom Proliferationsverhalten sowie die direkte in LDH-Efflux resultierende Zytotoxizität gemessen. Mittels Western-Blots erfolgte semiquantitativ der Proteinnachweis.

Zusammenfassend lassen sich anhand der vorliegenden Experimente folgende Aussagen machen:

- Es konnte gezeigt werden, daß durch Methotrexat in mittelgradig toxischer Konzentration eine HSP70-Überexpression relevant induzierbar ist. Für 5-FU kann aufgrund der Versuchskonzeptionen hierhingehend keine sichere Aussage gemacht werden.
- HSP27 kann im verwendeten Zellsystem selbst durch subletalen Hitzeschock nicht hochreguliert werden, erwartungsgemäß geschah dies auch nicht durch Exposition mit Mtx oder 5-FU.
- Des weiteren demonstrierten sowohl die erstellten Wachstumskurven als auch die LDH-Efflux-Messungen klar die mittels *hsp27*-Transfektion erworbene zelluläre Resistenz vor Methotrexat.
- HSP70 bedingt eine geringe Protektion vor Mtx-induziertem, keinen Schutz jedoch vor 5-FU-induziertem zellulären Streß.

- Die Ko-Expression beider HSPs ergibt keinen ausgeprägten neuerlichen Schutz, allenfalls eine subadditive Kooperation konnte beobachtet werden.
- Die maximalen Effekte konnten jeweils erst 48 Stunden nach Noxenexposition beobachtet werden, sie persistierten teilweise bis zu 72 Stunden nach Behandlung.

Als Schlußfolgerung kann die Aussage gemacht werden, daß die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten auf eine HSP-induzierte substanzabhängige Resistenz hinweisen, welche in der Zukunft eine große Bedeutung als prognostischer Parameter für die Entwicklung individueller Therapieschemata in der Behandlung des Mamma-Karzinoms haben könnten.

7. Literaturverzeichnis

- Abe, M., Manola, J.B., Oh, W.K., Parslow, D.L., George, D.J., Austin, C.L., Kantoff, P.W., Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer as potential biomarker for prostate cancer. *Clin. Prostate Cancer* 3 (1): 49-53, 2004.
- Atterwill, C.K., Steele, C.E., *In vitro methods in toxicology*. Cambridge University Press, Cambridge, 1. Auflage, 1987.
- Arrigo, A.P., Landry, J., Expression and function of the low-molecular weight heat shock protein; aus: Morimoto, R., Tissieres, A., Georgopoulos (Hrsg.), *Heat Shock Proteins: Structure, Function and Regulation*, Cold Spring Harbor, New York, 335, 1994.
- Arrigo, A.P., Suhan, J.P., Welch, W.J., Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular weight heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5059-5071, 1988.
- Arrigo, A.P., Tumor necrosis factor induces the rapid phosphorylation of the mammalian heat shock protein hsp28. *Mol. Cell. Biol.* 10 (3): 1276-1280, 1990.
- Benndorf, R., Bielka, H., *Cellular Stress Response: Stress Proteins- Physiologie and Implications for Cancer*. *Recent Results in Cancer Res.* 143: 129-144, 1997.
- Benndorf, R., Hayeß, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., Lutsch, G. Phosphorylation and supramolecular organisation of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actinpolymerisation inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* 269: 20780-20784, 1994.
- Benndorf, R., Hayeß, K., Stahl, J., Bielka, H., Cell-free phosphorylation of murine small heat shock protein HSP25 by endogenous kinase from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1136:203-207, 1992.

- Benndorf, R., Kraft, R., Otto, A., Stahl, J., Böhm, H., Bielka, H., Purification of the growth-related protein p25 of Ehrlich ascites tumor and analysis of isoforms. *Biochem. Int.* 17: 225-234, 1988.
- Bohen, S.P., Kralli, A., Yamamoto, K.R., Hold'em and Fold'em: Chaperons and Signaltransduction. *Science* 268: 1303-1304, 1995.
- Bruce, J.L., Price, B.D., Coleman, C.N., Calderwood, S.K., Oxidative injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins. *Cancer Res.* 53: 12-15, 1993.
- Cajone, F., Bernelli-Zazzera, A., Oxidative stress induces a subset of heat shock proteins in rat hepatocytes and MH1C1 cells. *Chem-Biol. Interaction* 65 (3): 235-246, 1988.
- Carbajal, E.M., Beaulieu, J.-F., Nicole, L.M., Tanguay, R.M., Intramitochondrial localisation of the main 70kDa heat-shock cognate protein in *Drosophila* cells. *Experimental Cell Research* 207: 300-309, 1993.
- Carper, S.W., Duffy, J.J., Gerner, E.W., Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes. *Cancer Res.* 47: 5249-5255, 1987.
- Carper, S.W., Rochelau, A., Storm, F.K., cDNA sequence of a human heat shock protein HSP27. *Nucleic Acids Research* 18 (21): 6457, 1990.
- Ciocca, D.R., Clark, G.M., Tandon, A.K., Fuqua, S.A.W., Welch, W.J., McGuire, W.L., Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: Prognostic Implications. *J. Nat. Cancer Inst.* 85 (7): 570-574, 1993.
- Ciocca, D.R., Fuqua, S.A.W., Lock-Lim, S., Toft, D.O., Welch, W.J., McGuire, W.L., Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* 52: 3648-3654, 1992.

- Ciocca, D.R., Oesterreich, S., Chamness, G.C., McGuire, W.L., Fuqua, S.A.W., Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): A Review. *J. Nat. Cancer Inst.* 85 (19): 1558-70, 1993.
- Ciocca, D.R., Rozados, V.R., Cuello Carrion, F.D., Gervasoni, S.I., Matar, P., Scharovsky, O, Hsp25 and Hsp70 in rodent tumors treated with doxorubicin and lovastatin. *Cell Stress Chaperones* 8 (1): 26-36, 2003.
- Ciocca, D.R., Stat, A.O., Amprino de Castro, M.M., Colocalisation of estrogen and progesteron receptors with an estrogen-regulated heat shock protein in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 16: 243-251, 1990.
- Cohen, S.M., Ellwein L.B., Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res.* 51: 6493-6505, 1991.
- Craig, E.A., The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18: 239-280, 1985.
- Creagh, E.M., Cotter, G., Selective protection by hsp 70 against cytotoxicity drug-, but not Fas-induced T-cell apoptosis. *Immunology* 97: 36-44, 1999.
- De-Maio, A., Beck, S.C., Buchman, T.G., Heat shock gene expression and development of translational thermotolerance in human hepatoblastomacells. *Circulatory shock* 40 (3): 177-86, 1993.
- Delhaye, M., Gulbis, B., Galand,P., Mairesse, N., Expression of 27-kDa heat shock protein isoforms in human neoplastic and nonneoplastic liver tissue. *Hepatology* 16 (2): 382-389, 1992.
- Dunn, D.K., Whelan, R.D.H., Hill, B., King, R.J.B., Relationship of HSP27 and estrogen receptor in hormone sensitive and insensitive cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46: 469-479, 1993.

- Ehrenfried, J.A., Herron, B.E., Townsend, C.M. jr., Evers, B.M., Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers. *Surg. Oncol.* 4 (4): 197-203, 1995.
- Eklöw-Lastbom, L., Thor, H., Orrenius, S., Effects of oxidative stress caused by hyperoxia and diquat. A study in isolated hepatocytes. *Free Rad. Res. Comms.* 2: 57-68, 1986.
- Engel, K., Ahlers, A., Brach, M.A., Hermann, F., Gaestel, M., MAPKAP Kinase 2 is activated by heat shock and TNF-alpha in vivo phosphorylation of small heat shock protein results from stimulation of the Mapkinase cascade. *J. Cell Biochem.* 57 (2): 321-330, 1995.
- Engel, K., Plath, K., Gaestel, M., The MAP Kinase activated protein kinase 2 contains a prolinerich SH3-binding domain. *FEBS Lett.* 336: 143-147, 1994.
- Faure, O., Graff-Dubois, S., Bretaudeau, L., Gross, D.A., Alves, P.M., Cornet, S., Duffour, M.T., Chouaib, S., Miconnet, I., Gregoire, M., Jotereau, F., Lemonnier, F.A., Aba, J.P., Kosmatopoulos, K., Inducible Hsp70 as Target of anticancer immunotherapy: Identification of HLA-A*0201-restricted epitopes. *Int. J. Cancer* 108 (6): 863-70, 2004.
- Ford, W., Henschler, D., Rummel, W., (Hrsg.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 5.Auflage, Mannheim-Wien-Zürich, 1987.
- Frydman, J., Nimmegern, E., Ohtsuka, K., Hartl, F.U., Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370 (6485): 111-117, 1994.
- Fuqua, S.A.W., Blum-Salingaros, M., McGuire, W.L., Induction of the estrogen related "24K" protein by heat shock. *Cancer Res.* 49: 4126-4129, 1989.
- Gabai, V.L., Seilanov, A.S., Makarova, Yu.M., Mosin, A.F., Oxidative stress, disturbance of energy balance, and death of ascites tumor cells under menadion (vitamin K3) action. *Biomed. Sci.* 1 (4): 407-413, 1990.

- Gaestel, M., Gross, B., Benndorf, R., Strauss, M., Schunk, W.-H., Kraft, R., Otto, A., Böhm, H., Stahl, J., Drabsch, H., Bielka, H., Molecular cloning, sequencing and expression in *E.coli* of the 25-kDa growth-related protein of Ehrlich ascites tumor and its homology to mammalian stress proteins. *Eur. J. Bioch.* 179: 209-313, 1989.
- Gaestel, M., Schroder, W., Benndorf, R., Identification of phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp25. *J. Biol. Chem.* 266: 14721-14724, 1991.
- Garrido, C., Mehlen, P., Fromentin, A., Hamann, A., Arrigo, A.-P., Chauffert, B., Inconstant association between 27-kDa heat shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur. J. Biochem.* 237: 653-659, 1996.
- Genth-Zotz, S., Bolger, A.P., Kalra, P.R., Von Haehling, S., Doehner, W., Coats, A.J., Volk, Anker, S.D., Heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure: relation disease severity and survival. *Int. J. Cardiol.* 96 (3): 397-401, 2004.
- Giffard, R.G., Xu, L., Zhao, H., Carrico, W., Ouyang, Y., Sapolsky, R., Steinberg, Hu, B., Yenari, M.A., Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J. Exp.Biol.* 207 (Pt 18): 3213-20, 2004.
- Goldstein, P., Controlling cell death. *Science* 275: 1081-1082, 1997.
- Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., Fries, W., Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 8115-8119, 1995.
- Hainaut, P., Milner, J., Interaction of heat-shock protein 70 with p53 translated in vitro : evidence for interaction with dimeric p53 and for a role in the regulation of p53 conformation. *The EMBO Journal* 11(10): 3513-3520, 1992.
- Henriksson, M., Classon, M., Axelson, H., Klein, G., Thyberg, J., Nuclear colocalization of c-myc protein and hsp70 in cells transfected with human wild-type and mutant c-myc genes. *Exp. Cell Res.* 203: 383-394, 1992.

- Hickey, E., Brandon, S.E., Potter, R., Weber, L., Sequence and organisation of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein. *Nucleic Acids Research* 14 (10): 4127-4145, 1986.
- Hohfeld, J., Jentsch, S., Grp-E like regulation of the hsc-70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO* 16: 6209-6216, 1998.
- Horman, S., Galand, P., Mosselmans, R., Legros, N., Leclercq, G., Mairesse, N., Changes in phosphorylation status of the 27 kDa heat shock protein (HSP27) associated with the modulation of growth and/or differentiation in MCF7 cells. *Cell Prolif.* 30: 21-35, 1997.
- Hornhardt, S., Wiebel, F.J., *Catalogue of Cell Lines in Toxicology and Pharmacology.* GSF Bericht 3/96.
- Huot, J., Houle, F., Sitz, D.R., Landry, J., HSP27 Phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.*, 56: 273-279, 1996.
- Huot, J., Roy, G., Lambert, H., Chrétien, P., Landry, J., Increased survival after treatment with anticancer agents of chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Res.* 51: 5245-5252, 1991.
- Huot, J., Roy, G., Lambert, H., Lavoie, J.N., Guimond, A., Landry, J., Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock-protein HSP27. *Eur. J. Biochem.* 227 (1-2): 416-427, 1995.
- Jäättelä, M., Minireview: Escaping cell death-survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* 248: 30-43, 1999.
- Jäättelä, M., Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int. J. Cancer* 60 (5): 689-693, 1995.

- Jäättelä, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., Egeblad, M., HSP70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO* 17: 6124-6134, 1998.
- Jäättelä, M., Wissing, D., Bauer, P.A., Li, G.C., Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *The EMBO Journal* 11 (10): 3507-3512, 1992.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., Buchner, J., Small heat shock proteins are molecular chaperones (Communication). *J. Biol. Chem.* 268 (3): 1517-1520, 1993.
- Jameel, A., Skilton, A., Campbell, T.A., Chander, S.K., Coombes, R.C., Luqman, Y.A., Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 50: 409-415, 1992.
- Jost, M., Expression von Hitzeschockproteinen als adaptive Zellantwort auf zytotoxischen Stress durch das Kanzerogen 2-Acetylaminofluoren. Dissertation, Universität Würzburg, 1998.
- Kabakov, A.E., Gabai, V.L., Heat shock-induced accumulation of 70-kDa stress protein (HSP70) can protect ATP-depleted tumor cells from necrosis. *Exp. Cell Res.* 217: 15-21, 1995.
- Kabakov, A.E., Gabai, V.L., Protein aggregation as primary and characteristic cell reaction to various stresses. *Experientia* 149 (8): 706-713, 1993.
- Kabakov, A.E., Molotkov, A.O., Budagova, K.R., Macarova, Y.M., Mosin, A.F., Gabai, V.L., Adaptation of Ehrlich ascites carcinomas cells to energy deprivation in vivo can be associated with heat shock protein accumulation. *J. Cell Physiol.* 165 (1): 1-6, 1995.
- Kai, M., Nakatsura, T., Egami, H., Senju, S., Nishimura, Y., Ogawa, M., Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol. Rep.* 10 (6): 1777-82, 2003.

- Kasimir-Bauer, S., Beelen, D., Flasshove, M., Noppeney, R., Seeber, S., Scheulen, M. E., Impact of the expression of P glycoprotein, the multidrug resistance-related protein, bcl-2, mutant p53, and heat shock protein 27 on response to induction therapy and long-term survival in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* 30 (11): 1302-8, 2002.
- Kato, M., Herz, F., Kato, S., Hirano, A., Expression of stress-response (heat shock) protein HSP27 in human brain tumors: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 83: 420-422, 1992
- Kato, S., Hirano, A. Kato, M., Herz, F., Comparative study of the expression of stress-response protein (srp) 72, srp 27, α B-crystallin and ubiquitin in brain tumors. An immuno-histochemical study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 19: 436-442, 1993.
- Kimura, E., Enns, R.E., Alcaraz, J.E., Arboleda, J., Salmon, D.J., Howell, S.B., Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA-expression of the 60 kDa heat-shock-protein hsp60. *J. Clin. Oncol.* 11: 891-898, 1993.
- Knaur, P., Welch, W.J., Saklatvala, J., Interleukin1 and tumor necrosis factor increase phosphorylation of the small heat shock protein. Effects in fibroblasts, HepG2 and U937 cells. *FEBS. Lett.* 258 (2): 269-273, 1989.
- Knauf, U., Bielka, H., Gaestel, M., Over-expression of the small heat-shock protein, hsp25, inhibits growth of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS-Lett.* 309 (3): 297-302, 1992.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1979.
- Landry, J., Chrétien, P., Hickey, E., Weber, L.A., Heat shock resistance conferred by expression of human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell Biology* 109: 7-15, 1989.
- Lane, D.P., Midgeley, C., Hupp, T., Tumor suppressor genes and molecular chaperones. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 339 : 369-373, 1993.

- Lazlo, A., Wright, W., Roti Roti, J.L., Initial characterisation of heat-induced excess nuclear proteins in HeLa cells. *J. Cell. Phys.* 151: 519-32, 1992.
- Lee, Y.J., Hou, Z.-Z., Curetty, L.L., Borelli, M.J., Development of acute thermotolerance in L929 cells: lack of hsp28 synthesis and phosphorylation. *J. Cell Physiol.* 152: 118, 1992.
- Lee, Y.J., Hou, Z.-Z., Curetty, L.L., Erdos, G., Stromberg, J.S., Carper, S.W., Cho, J.M., Corry, P.M., Regulation of HSP70 and HSP28 gene expression: absence of compensatory interactions. *Molecular and Cellular Biochemistry* 137: 155-167, 1994.
- Lindemann, B., Skarpen, E., Huitfeldt, H.S., Stress protein expression in rat liver during tumor promotion: Induction of heat shock protein 27 in hepatocytes exposed to 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis* 19: 1559-1563, 1998.
- Lindl, T., Bauer, J., *Zell- und Gewebekultur*. Gustav Fischer-Verlag- Stuttgart- Jena- New York, 242f, 1994.
- Mairesse, N., Bernaert, D., Horman, S., Mosselmans, R., Robaye, B., Galand, P., Increased sensitivity to TNF in L929 cells transfected with the human gene coding for the small heat shock protein HSP27. *Exp. Cell Res.*, 1998.
- Mairesse, N., Horman, S., Mosselmans, R., Galand, P., Antisense inhibition of the 27 kDa heat shock protein production affects growth rate and cytoskeletal organisation in MCF-7 cells. *Cell Biology International* 20 (3): 205-212, 1996.
- Mairesse, N., Bernaert, D., Del Bino, G., Horman, S., Mosselmans, R., Robaye, B., Galand, P., Expression of HSP27 results in increased sensitivity to Tumor Necrosis Factor, Etoposide, and H₂O₂ in an oxidative stress-resistant cell line. *J. of Cell. Physiol.* 177: 606-617, 1998.
- Marzels, E.T., Peters, C.A., Kline, M., Cutler, R.E., Stranmugam, M., Hunzicker, M., Heat shock protein 25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C. *Biochem. J.* 332: 703-713, 1998.

- Mehlen, P., Arrigo, A.-P., The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localisation and levels of oligomerization. *Eur. J. Biochem.* 221: 327-334, 1994.
- Mehlen, P., Kretz-Remy, C., Briolay, J., Fostan, Ph., Mirault, M.-E., Arrigo, A.-P., Intracellular reactive oxygen species as apparent modulators of heat-shock protein 27 (hsp27) structural organisation and phosphorylation in basal and tumor necrosis faktor α -treated T45D human carcinoma cells. *Biochem. J.* 312: 367-375, 1995.
- Mehlen, P., Kretz-Remy, C., Preville, X., Arrigo, A.-P., Human hsp27 and human α B-crystallin expression mediated increase in glutathione is essential for the protective of these proteins against TNF α -induced cell death. *EMBO J.* 15 (11): 2695-2706, 1996.
- Mehlen, P., Mehlen, A., Guillet, D., Preville, X., Arrigo, A.-P., Tumor necrosis factor alpha induces changes in the phosphorylation, cellular localisation and oligomerisation of human HSP27 a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J. Cell. Biochem.* 58 (2): 248-59, 1995.
- Mehlen, P., Preville, X., Chareyron, P., Briolay, J., Klemenz, R., Arrigo, A.-P., Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human α B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stable transfected murine L929 fibroblasts. *The Journal of Immunology* 154 (1): 363-74, 1995.
- Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., Arrigo, A.-P., Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 271 (28): 16510-16514, 1996.
- Miglioratti, G., Nicoletti, I., Crocicchio, F., Pagliacci, C., D'Adamio, F., Riccardi, C., Heat shock induces apoptosis in mouse thymocytes and protects them from glucocorticoid-induced cell death. *Cell. Immunol.* 143: 348-356, 1992.

- Mivechi, N.F., Ouyang, H., Hahn, G., Lower heat shock factor activation and binding and faster rate of HSP-70A messenger RNA turnover in heat sensitive human leukemias. *Cancer Res.* 52: 6815-6822, 1992.
- Morimoto, R.I., Tissières, A., Georgopoulos, C., *Stress proteins in biology and medicine.* Cold Spring Harbour Laboratory Press 1990.
- Morimoto, R.I., Tissières, A., Georgopoulos, C., *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.* Cold Spring Harbour Laboratory Press 1994.
- Müller, E., Munker, R., Issels, R., Willmanns, W., Interaction between tumor necrosis factor- α and HSP70 in human leukemia cells. *Leukemia-Research* 17 (6): 523-526, 1993.
- Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Hoy, Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rhode, M., Jääteäa, M., Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J. Exp. Med.* 200 (4): 425-35, 2004.
- Oesterreich, S., Weng, C.N., Qin, M., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., Fuqua, S.A.W., The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 53: 4443-4448, 1993.
- Pfanner, N., Hartl, F.-U., Ostermann, J., Rassow, J., Neupert, W., Role of stress proteins in the import of proteins into mitochondria. Abstracts of papers presented at the 1991 meeting: Stress proteins & the heat shock response. Cold Spring Harbour Laboratory Press, April 29-May 2, 1991.
- Rabindran, S.K., Wisniewski, J., Li, L., Li, G.C., Wu, C., Interaction between heat shock factor and hsp70 is insufficient to suppress induction of DNA-binding activity in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 6552-6560, 1994.
- Ritossa, F.M., A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia Basel* 18; 571-573, 1962.

- Salminen, W.F., Voellmy, R., Roberts, M., Induction of hsp 70 in HepG2 cells in response to hepatotoxicants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141: 117-123, 1996.
- Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, P. D., Orrenius, S., Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, HSP 60 and HSP 10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *EMBO* 18: 2040-2048, 1999.
- Schiaffonati, L., Pappalardo, C., Tacchini, L., Expression of the HSP70 gene family in rat hepatoma cell lines of different growth rates. *Experimental Cell Research* 196: 330-336, 1991.
- Somasundaram, T., Bhat, S.P., Developmentally dictated expression of heat shock factors: Exclusive expression of HSF4 in the postnatal lens and its specific interaction with alpha B-crystallin heat shock promoter. *J. Biol Chem.* 12 (Epub ahead of print), 2004.
- Sorger, P.K., Heat shock factor and the heat shock response. *Cell.* 25: 363-366, 1991.
- Srivastrava, P.K., Maki, R.G., Stress-induced proteins in immune response to cancer. Aus: Kaufmann, S.H.E. (Hrsg.), Heat shock proteins and immune response. *Current topics in Microbiology and Immunology* 167, Springer-Verlag, 1992.
- Stuart, R.A., Cyr, D.M., Craig, E.A., Neupert, W., Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. *Trends in Biological Science (TIBS)*: 87-92, 1994.
- Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A., Shepard, H.M., Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943, 1985.
- Tacchini, L., Schiaffonati, L., Pappalardo, C., Gatti, S., Bernelli-Zazzera, A., Expression of HSP70, immediate-early response and heme oxygenase genes in ischemic-reperfused rat liver. *Laboratory Investigation* 68 (4): 465-471, 1993.

- Tainton, K.M., Smyth, M. J., Jackson, J. T., Tanner, J. E., Cerruti, L., Jane, S. M., Darcy, P. K., Johnstone, R. W., Mutational analysis of P-glycoprotein: suppression of caspase activation in the absence of ATP-dependent drug-efflux. *Cell Death Differ.* 11 (9): 1028-37, 2004.
- Taira, T., Neggishi, Y., Kihara, F., Iguchi-Agira, S.M.M., Agira, H., C-myc protein complex binds to two sites in human hsp70 promotor region. *BBA* 1130: 166-174, 1992.
- Tauchi, K., Tsutsumi, Y., Hori, S., Yoshimura, S., Osamura, R.Y., Watanabe, K., Expression of heat shock proteine 70 and c-myc in human breast cancer: a histochemical study. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 21 (4) : 256-263, 1991.
- Thanner, F., Sutterlin, M.W., Kapp, M., Rieger, L., Kristen, P., Dietl, J., Gassel, A.M., Müller, T., Heat-shock protein 70 as a prognostic marker in node-negative breast cancer. *Anticancer Res.* 23 (2A): 1057-62, 2003.
- Thor, A., Benz, C., Moore, D., Goldman, E., Edgerton, S., Landry, J., Schartz, L., Mayall, B., Hickey, E., Weber, L.A., Stress response protein (srp27) determination in primary human breast carcinomas: clinical histology, and prognostic correlations. *J. Nat. Cancer Inst.* 83: 170-183, 1991.
- Till, H., Über die Bedeutung des programmierten Zelltodes und seiner Regulation für die tumorpromovierenden Eigenschaften des kompletten Kanzerogens 2-Acetylaminofluoren in Rattenleber. Dissertation, Universität Würzburg, 2001.
- Tissieres, A., Mitchel, H.K., Tracy, U.M., Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84: 389-398, 1974.
- Townsend, P.A., Cutress, R.I., Sharp, A., Brimmell, M., Packham, G., BAG-1 prevents stress-induced long-term growth inhibition in breast cancer cells via a chaperone-dependent pathway. *Cancer Res.* 63 (14): 4150-7, 2003.

- Trautinger, F., Kindas-Mügge, I., Dekrout, B., Metzger, D., Expression of the 27-kDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: an immunohistological study. *Br. J. Dermatol.* 133 (2): 194-202, 1995.
- Um, J. H., Kang, C. D., Hwang, B. W., Ha, M. Y., Hur, J. G., Kim, D. W., Chung, B. S., Kim, S. H., Involvement of DNA-dependent protein kinase in regulation of the mitochondrial heat shock proteins. *Leuk. Res.* 27 (6): 509-16, 2003.
- Ungermann, C., Neupert, W., Cyr, D.M., The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* 266 (5188): 1250-1253, 1994.
- Vassault, A., Lactate dehydrogenase. UV-method with pyruvate and NADH. Aus: Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. und Graßl, M. (Hrsg.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Auflage, Vol.3: 118-126, 1983.
- Velazquez, J.M., Lindquist, S., hsp70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmatic storage during recovery. *Cell* 36: 655-662, 1984.
- Welch, W.J., Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews* 72 (4): 1063-1081, 1992.
- Welch, W.J., Phorbol ester, calcium ionophore, or serum added to quiescent rat embryo fibroblast cells all result in the elevated phosphorylation of two 28,000 dalton mammalian stress proteins. *J. Biol. Chem.* 260: 3058-3065, 1985.
- Welch, W.J., Stress-Proteine. *Spektrum der Wissenschaft*, 40-47, 1993.
- Wiegant, F.A.C., Souren, J.E.M., van-Rijn, J., van-Wijk, R., Stressor-specific induction of heat shock proteins in rat hepatoma cells. *Toxicology* 94: 134-159, 1994.
- Xanthoudakis S., Roy, S., Rasper, D., Hennessey, T., Aubin, Y., Cassady, R., Tawa, P., Ruel, R., Rosen, A., Nicholson, D.W., Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase 3 by upstream proteases during apoptosis. *EMBO* 18,2049-2056, 1999.

8. Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosidtriphosphat
BCA	Biscinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
DFS	Desease free surviving
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
5-FU	5-Fluorouracil
HSE	Hitzeschockelement
HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
IP	Immunräzipitation
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPKAP-Kinase 2	Mitogen-activated Protein Kinase-activated Proteinkinase 2
MDR	Multiple Drug Resistance
Mtx	Methotrexat
NADH/NAD ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid red./ox.
NADPH/NADP ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat red./ox.
NBT	Nitro Blue Tetrazolium

ÖR	Östrogen Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
S9-Mix	Rattenleberhomogenat zur metabolischen Aktivierung
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminoethan
UV	Ultraviolett

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Lehrstuhl für Toxikologie, Direktor: Prof. Dr. W. Lutz) in Kooperation mit der Universitäts-Frauenklinik (Direktor: Prof. Dr. J. Dietl) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. G. Neumann für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Des weiteren gilt mein Dank Frau Dr. A. Bitsch für die Bereitstellung des Themas, ihr wertvoller wissenschaftlicher Rat sowie die stete kritische Diskussionsbereitschaft trugen zu großem Teil zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Frau Prof. Dr. H. Stopper und Herrn Prof. Dr. J. Dietl danke ich sehr für die bereitwillige Übernahme der Betreuung als Erst- und Zweitgutachter.

Mein Dank gilt weiterhin Frau E. Rüb-Spiegel und Frau I. Richter für die gute Zusammenarbeit im Laboralltag, ohne ihre technische und moralische Hilfe wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Meiner Familie danke ich für ihre unersetzliche Unterstützung zu jeder Zeit und in verschiedenster Hinsicht.

CURRICULUM VITAE

Veronika Wassermann, *28.03.1975 in Freiburg im Breisgau, ledig, keine Kinder

Schulausbildung:

1981 – 1985	Grundschule Stegen bei Freiburg
1985 – 1994	Kath. Privatgymnasium Kolleg St. Sebastian, Stegen
08/1994 – 04/1995	Freiwilliges Soziales Jahr am Universitätsklinikum Freiburg, Strahlentherapie

Studium:

05/1995 – 03/1996	Studium der Zahnheilkunde, Universität Würzburg
04/1996 – 04/2002	Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg
30.04.2002	Drittes Staatsexamen

Berufstätigkeit:

07/2002-06/2003	Assistenzärztin am Institut für Neuroradiologie, UniversitätsSpital Zürich (Prof. Dr. A. Valavanis)
07/2003-06/2004	Assistenzärztin an der Klinik für Neurochirurgie, UniversitätsSpital Zürich (Prof. Dr. Y. Yonekawa)
seit 09/2004	Assistenzärztin am Institut für Diagnostische Radiologie, UniversitätsSpital Zürich (Prof. Dr. B. Marincek)