

Aus der Chirurgischen Klinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer
Molekulare Onkoimmunologie
Leiterin: Frau Professor Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

Über den Einfluss von hyperthermer Chemotherapie auf die
Expressionsprofile von Hitzeschockproteinen und
Proliferationsmarkern im humanen Kolonkarzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Rebecca Thumm
aus Steinheim an der Murr

Würzburg, Februar 2019

Referent: Professor Dr. Martin Gasser

Korreferent / Korreferentin: Professor Dr. Ralf C. Bargou

Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	
1 Einleitung	
1.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen	1
1.2 Peritonealkarzinose	2
1.3 HIPEC.....	3
1.4 Hitzeschockproteine und Tumorerkrankungen	4
2 Fragestellung	6
3 Grundlagenteil	7
3.1 Hsp27	7
3.2 Hsp70	9
3.3 Hsp90	12
3.4 Proliferationsmarker Ki-67	15
3.5 Proliferationsmarker PCNA.....	15
4 Material und Methoden	17
4.1 Material.....	17
4.1.1 Zelllinien	17
4.1.2 Nährmedien	17
4.1.3 Chemikalien, Puffer, Reagenzien	17
4.1.4 Selbst hergestellte Puffer.....	19
4.1.5 Kits.....	20
4.1.6 Primer	20
4.1.7 Primär- und Sekundärantikörper.....	21
4.1.8 Verbrauchsmaterialien	22
4.1.9 Geräte.....	23
4.1.10 Software	24
4.2 Methoden.....	25
4.2.1 Zellkultur	25
4.2.2 Zellpassage	25
4.2.3 <i>In vitro</i> -HIPEC-Modell	26
4.2.4 Aufarbeitung der Zellen	27

4.2.4.1	Gewinnung von Gesamtzell-Extrakt	28
4.2.4.2	RNA-Isolierung	28
4.2.5	Molekularbiologische Analyse	28
4.2.5.1	cDNA-Synthese.....	28
4.2.5.2	RT-qPCR.....	29
4.2.5.3	Datenanalyse	29
4.2.6	Proteinanalyse.....	30
4.2.6.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
4.2.6.2	Western Blot und Immundetektion	30
5	Ergebnisse	32
5.1	Hsp27	32
5.1.1	Genexpression von Hsp27	32
5.1.1.1	Hsp27 Protein 1.....	32
5.1.1.2	Hsp27 Protein 2.....	34
5.1.2	Proteinexpression von Hsp27	36
5.2	Hsp70	38
5.2.1	Genexpression von Hsp70	38
5.2.1.1	Hsp70 Protein 1A.....	38
5.2.1.2	Hsp70 Protein 1B.....	40
5.2.1.3	Hsp70 Protein 4.....	42
5.2.2	Proteinexpression von Hsp70.....	44
5.3	Hsp90	46
5.3.1	Genexpression von Hsp90	46
5.3.1.1	Hsp90 α class A member 1	46
5.3.1.2	Hsp90 α class A member 2	48
5.3.1.3	Hsp90 α class B member 1	50
5.3.1.4	Hsp90 β member 1.....	52
5.3.2	Proteinexpression von Hsp90.....	52
5.4	Ki-67	54
5.4.1	Genexpression von Ki-67	54
5.4.2	Proteinexpression von Ki-67	56

5.5	PCNA.....	58
5.5.1	Genexpression von PCNA.....	58
5.5.2	Proteinexpression von PCNA	60
6	Beantwortung der Fragestellung.....	62
7	Diskussion.....	65
7.1	Effekte von Hyperthermie und Chemotherapie auf die HSP- Expression im Kolonkarzinom	65
7.2	Verringerte Chemosensitivität durch erhöhte HSP-Expression	66
7.3	Der Einsatz von HSP-Inhibitoren bei der HIPEC	66
7.4	Vergleich der verschiedenen Temperaturstufen auf die Expression von HSPs und Proliferationsmarkern und Bedeutung für die HIPEC.	69
7.5	Induktion der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA.....	69
8	Zusammenfassung	72
II.	Tabellenverzeichnis.....	74
III.	Abbildungsverzeichnis.....	75
IV.	Literaturverzeichnis.....	77
V.	Publikationen
VI.	Danksagung

I. Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis-inducing factor
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
BSA	Bovine serum albumin / Rinderserumalbumin
cDNA	Complementary DNA / komplementäre DNS
CRS	Cytoreductive surgery / zytoreduktive Chirurgie
DNA	Deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline / phosphatgepufferte Salzlösung
DTT	Dithiothreitol
5-FU	5-Fluoruracil
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HIPEC	Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy / hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion
HSP	Heat shock protein / Hitzeschockprotein
kDa	Kilodalton
mAk	Monoklonaler Antikörper
min	Minute
ml	Milliliter
mmol/l	Millimol / Liter
m/V	Mass per volume / Masse pro Volumen
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
RIPA buffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction / quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
WCE	Whole Cell Extract / Gesamtzellextrakt
w/V	Weight per volume / Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen

Maligne Tumorerkrankungen zählen in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen. Nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems waren Krebsleiden 2013 laut des Statistischen Bundesamts die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Über 223 000 Menschen starben 2013 an den Folgen von Tumorerkrankungen, wobei Tumore der Verdauungsorgane bei Männern und Frauen ungefähr ein Drittel der Todesfälle durch Krebs ausmachten. Dazu gehören unter anderem Tumore des Darms (kolorektales Karzinom), des Magens, der Bauchspeicheldrüse und der Leber (siehe Abb. 1) [1]. Zwischen den Jahren 2000 und 2010 stieg die Zahl der Neuerkrankungen bei Männern um 21 % und bei Frauen um 14 % an. Somit nehmen Tumorerkrankungen eine immer bedeutendere Rolle ein [2].

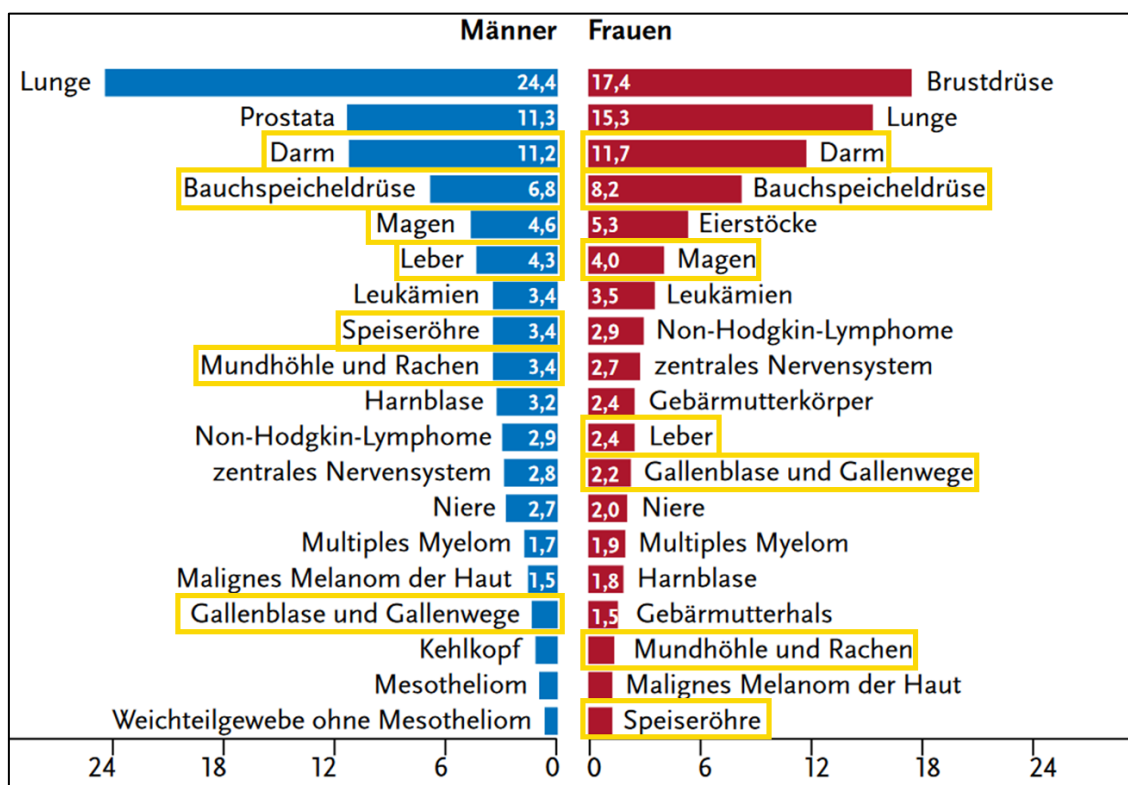


Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014

Die Krebssterbefälle durch maligne Tumore der Verdauungsorgane sind gelb umrandet. Modifiziert nach Robert Koch Institut, „Krebs in Deutschland für 2013/2014“, 11. Ausgabe (2017) [3].

1.2 Peritonealkarzinose

Insbesondere bei fortgeschrittenen Stadien von Tumoren im Bauchraum kann es durch Absiedelung (Metastasierung) von Tumorzellen in das Bauchfell (Peritoneum) zur Peritonealkarzinose kommen. Das Peritoneum ist eine seröse Haut, welche die Bauchhöhle von innen auskleidet und die meisten inneren Organe umgibt. Aufgabe des Peritoneums ist die Sezernierung und Resorption von Peritonealflüssigkeit. Damit gewährleistet es die Verschiebbarkeit der Bauchorgane gegeneinander [4].

Primärtumore des Peritoneums wie das peritoneale Mesotheliom treten sehr selten auf (weniger als 1 000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland) [5, 6]. Meist ist die Peritonealkarzinose dagegen Folge einer Metastasierung einer primären Tumorerkrankung eines anderen Organs im Bauchraum. Kolorektale Karzinome beispielsweise metastasieren häufig ins Peritoneum. Eine Peritonealkarzinose wird hier bei 7 % der Patienten bei erstmaliger Operation des primären Tumors entdeckt, bei 4 bis 19 % tritt sie nach kurativer Operation auf und bis zu 44 % der Patienten mit rezidivierendem kolorektalem Karzinom sind betroffen [7]. Der Altersgipfel von Patienten, die von einer Metastasierung des kolorektalen Karzinoms ins Peritoneum betroffen sind, liegt zwischen 62 und 65 Jahren [8].

Es gibt zwar keine genauen Angaben über die Zahl der Neuerkrankungen an Peritonealkarzinose in Deutschland, allerdings kann man anhand der Inzidenzraten häufiger Primärtumore mit Tendenz ins Peritoneum zu metastasieren, von ungefähr 20 000 bis 30 000 Neuerkrankungen pro Jahr ausgehen [5, 9, 10]. Wird die Peritonealkarzinose nicht therapiert, so beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit ab Diagnosezeitpunkt 6 Monate und das mediane Überleben 3,1 Monate [11]. Diese Tatsache verdeutlicht die Schwere der Erkrankung und die Wichtigkeit erfolgreicher Therapiekonzepte.

Als bislang einzige Behandlungsoption für eine Peritonealkarzinose galt eine systemische Chemotherapie. Aber auch damit ist das mediane Überleben auf 12 bis 16 Monate beschränkt [12-14]. In jüngerer Zeit wurde daher eine alternative Therapie mit zytoreduktiver Chirurgie (*cytoreductive surgery*, CRS) und

anschließender hyperthermer intraperitonealer Chemoperfusion (*hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*, HIPEC) entwickelt. Diese lassen sich anwenden, wenn die Peritonealkarzinose in einem limitierten Stadium vorliegt. Ziel des kombinierten Vorgehens ist es, den makroskopischen Tumor durch die CRS zu entfernen und mit der HIPEC im Anschluss auch die verbleibenden mikroskopischen peritonealen Tumorreste mit einer lokalen, hochkonzentrierten Chemotherapie zu eliminieren [15]. Damit konnte eine deutliche Steigerung der medianen Überlebenszeit auf bis zu 35 Monate erreicht werden [12, 13, 16].

1.3 HIPEC

Bei der HIPEC wird eine mit Chemotherapeutika versetzte Trägerlösung unter erhöhter Temperatur durch die Bauchhöhle gespült [17]. Das heißt, der Körper wird lokal künstlich überwärmt und ist dadurch einer Hyperthermie ausgesetzt. Für die Dauer der Perfusion und die Höhe der angewendeten Temperatur gibt es bislang keine ubiquitär angewandten Standards. Je nach Protokoll liegt die Dauer der Zirkulation zwischen 30 und 120 Minuten (min) und die Temperatur in der Peritonealhöhle zwischen 39°C und 43°C [17-20].

Zu den dafür häufig verwendeten Chemotherapeutika zählen Mitomycin C, Oxaliplatin und Cisplatin [20-22]. Oxaliplatin kann mit einer intravenösen 5-FU-Gabe kombiniert werden [23]. Alternativ werden Doxorubicin, Melphalan, Gemcitabine, Mitoxantrone, Etoposide, Irinotecan, Paclitaxel, Docetaxel, 5-Fluoruracil (5-FU) und Carboplatin verwendet [24]. Die zusätzlich verwendete Hyperthermie hat ebenfalls zytotoxische Effekte. Bereits ab 41°C kommt es zur Denaturierung von Proteinen, Aktivierung von Lysosomen, einer erhöhten Apoptoserate sowie fehlerhafter DNA-Reparatur [25]. Des Weiteren wirkt Hyperthermie fördernd auf die Zytotoxizität einiger Chemotherapeutika. Vermutet wird hier etwa ein Hyperthermie-bedingter Funktionsverlust von ABC-Transportproteinen, welche wiederum in der Lage sind die Chemotherapeutika aus der Zelle zu befördern. Außerdem könnten weitere intrazelluläre Entgiftungsvorgänge durch Hyperthermie gehemmt werden [26]. Eine durch Hyperthermie erhöhte Zytotoxizität wurde beispielsweise bei Oxaliplatin [27], Mitomycin C [28], Bleomycin [29], Platinkomplexen [30], Docetaxel, Irinotecan

und Gemcitabin gefunden [31]. Chemotherapeutika können mithilfe von Hyperthermie auch leichter ins Gewebe eindringen, was beispielsweise bei Doxorubicin beobachtet wurde [32]. Allerdings initialisiert die Hyperthermie auch eine erhöhte Expression von verschiedenen Hitzeschockproteinen (*Heat shock protein*, HSP), die den zytotoxischen Effekten der HIPEC entgegenwirken können [33].

1.4 Hitzeschockproteine und Tumorerkrankungen

HSPs sind Proteine, die vermehrt bei zellulären Stresssituationen wie durch Hyperthermie und Chemotherapeutika gebildet werden. Eingeteilt werden die HSPs anhand ihres Molekulargewichts in vier Klassen: kleine HSPs von 15 - 30 Kilodalton (kDa), zu denen Hsp27 gehört sowie Hsp60, Hsp70 und Hsp90 [34]. Sie dienen als Chaperone, helfen also sowohl neu synthetisierten Proteinen als auch akkumulierten oder falsch gefalteten Proteinen, die korrekte Tertiärstruktur einzunehmen. Außerdem sind sie in der Lage, der Bildung von Proteinaggregaten vorzubeugen. Zudem interagieren sie mit zahlreichen Faktoren der zellulären Signalübertragung, die zum Beispiel beim programmierten Zelltod beteiligt sind und können so die Apoptose verhindern. Im Allgemeinen begünstigen sie den Schutz und das Überleben von Zellen und sind für intrazelluläre Reparaturmechanismen zuständig [35, 36].

Dies gilt auch für viele bösartige Tumore. Werden HSPs von Tumorzellen gebildet, steigt deren Überlebenschancen. Daher korreliert eine hohe Expression von HSPs in Tumoren mit einer schlechten Prognose. Über diesen Zusammenhang wurde unter anderem beim kolorektalen Karzinom berichtet. Zudem werden HSPs in vielen Tumorzellen konstitutiv vermehrt gebildet [37-39].

Auch bei der klinisch eingesetzten Therapie zur Behandlung der Peritonealkarzinose mittels lokaler Chemotherapie unter erhöhten Temperaturbedingungen könnten verstärkt exprimierte HSPs limitierend auf den Therapieerfolg Einfluss nehmen. Allerdings sind die intrazellulären Reparaturmechanismen, die in den Tumorzellen durch eine hypertherme Chemoperfusion induziert werden können, bisher nur teilweise erforscht. HSP-

vermittelte Mechanismen stellen hierbei einen bislang wenig untersuchten Prozess der Stress-vermittelten Reparaturvorgänge in Tumorzellen dar.

Ebenso wenig erforscht sind proliferative Effekte, die in den Tumorzellen durch eine hypertherme Chemotherapie hervorgerufen werden könnten. Um eine Aussage über die Proliferation von Zellen zu treffen, sind Proliferationsmarker wie Ki-67 und PCNA geeignet, die sich teilende Zellen markieren.

Ziel dieser Arbeit war es verschiedenen Fragen zum Einfluss der HIPEC auf Reparaturvorgänge und proliferative Effekte in Tumorzellen des Kolonkarzinoms nachzugehen. Dafür wurden mithilfe eines *in vitro*-HIPEC-Modells entsprechend den klinischen Bedingungen die Effekte von alleiniger Hyperthermie und in Kombination mit einer Chemotherapie auf die Expressionen von HSPs und Proliferationsmarkern in Tumorzellen des Kolonkarzinoms untersucht.

2 Fragestellung

Folgende Fragen wurden untersucht:

1. Welche Effekte haben eine Hyperthermie mit und ohne 5-Fluoruracil auf die Expression von Hitzeschockproteinen? Wie entwickelt sich die Expression der Reparaturproteine im Zeitverlauf nach einer hyperthermen Chemoperfusion? Wie unterscheiden sich diese Effekte in Abhängigkeit verschiedener humaner Kolonkarzinome?
2. Welche Auswirkungen haben eine Hyperthermie mit und ohne 5-Fluoruracil auf die Expression der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA?
3. Gibt es Unterschiede des Einflusses einer Hyperthermie von 41°C gegenüber 43°C auf die Expression der Hitzeschockproteine und die weitere Zellproliferation in den Kolonkarzinomen?
4. In welchem Zusammenhang stehen die Ergebnisse mit dem gegenwärtigen klinischen Vorgehen?

3 Grundlagenteil

Um die Auswirkungen der Hyperthermie und der Chemotherapeutika interpretieren zu können, ist es essentiell die mikroskopische Struktur und Funktionsweise der Hitzeschockproteine und der Proliferationsmarker zu kennen. Diese werden daher im Folgenden erläutert.

3.1 Hsp27

Hsp27 gehört zu den kleinen Hitzeschockproteinen, die strukturell eine konservierte α -kristalline Domäne am C-Terminus gemeinsam haben [40]. Vermutlich interagieren kleine HSPs darüber und können sich zu Oligomeren zusammenschließen [40]. Die Oligomerisierung wiederum wird über die Phosphorylierung von Hsp27 reguliert [41]. Der Status der Oligomerisierung ist für die Funktion als Chaperon bedeutsam [40, 42].

Hsp27 greift in die Signaltransduktionskaskade der Apoptose ein, wodurch es antiapoptotisch wirkt (siehe Abb. 2). Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie (TNF-Rezeptorfamilie) initiiert. Daraufhin kommt es unter anderem zur Aktivierung von Daxx, einem Adapterprotein von CD95, das wiederum zur TNF-Rezeptorfamilie gehört. Daxx aktiviert die *Apoptosis signal-regulating Kinase 1* (ASK1), was letztlich zur Apoptose führt. Phosphorylierte Dimere von Hsp27 können mit Daxx interagieren, sodass dessen Translokation vom Zellkern ins Zytoplasma und dessen Interaktion mit ASK1 und CD95 unterbunden wird [43].

Beim intrinsischen Weg der Apoptose kommt es zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus dem Mitochondrium wie Cytochrom c, *Apoptosis-inducing factor* (AIF) und Smac/DIABLO. In den intrinsischen Weg greift Hsp27 ein, indem es Akt aktiviert, welches Bax hemmt. Bax sorgt für die Freisetzung der proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum des Mitochondriums. Somit kommt es durch das Eingreifen von Hsp27 zur verminderten Freisetzung dieser Faktoren aus dem Mitochondrium und so zur Hemmung der

Apoptose [44]. Nachdem Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium ins Zytoplasma gelangen, inhibieren sie antiapoptotische Faktoren und sorgen für die Aktivierung der Procaspase 9, die die Procaspase 3 aktiviert, was wiederum zur Apoptose führt. Hsp27 blockiert die Freisetzung von Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium [45]. Außerdem hemmt Hsp27 die Procaspase 3, indem es diese komplexiert [46]. Hsp27 hemmt zudem Cytochrom c, welches nach Freisetzung aus dem Mitochondrium den *Apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) aktiviert, wodurch die Procaspase 9 aktiviert und so die Kaspasenkaskade der Apoptose in Gang gesetzt wird [47].

Darüber hinaus kann Hsp27 die intrazelluläre Konzentration von Glutathion in seinem reduzierten Zustand hochhalten. Glutathion fängt reaktive Sauerstoffspezies ab, indem es selbst oxidiert wird und schützt so Proteine vor Oxidation [48, 49].

Hsp27 schützt die Struktur der Zelle, indem es die Stabilität des Zytoskeletts aufrechterhält und die Depolymerisation von Aktin verhindert [50]. Beim Hitzeschock kommt es zur Akkumulation von noch nicht gefalteten Proteinen. Um dies zu verhindern bindet Hsp27 während eines solchen Hitzeschocks an den *eukaryotic translation initiation factor 4 gamma* (eIF4G), eine Struktur am Ende der mRNA, die für die Initiation der Translation von Bedeutung ist. Dadurch wird die Proteinbiosynthese unterbrochen und kann nach dem Hitzeschock fortgesetzt werden [51]. Darüber hinaus fördert Hsp27 nach einem Hitzeschock die Regeneration von RNAs und die Proteinbiosynthese [52].

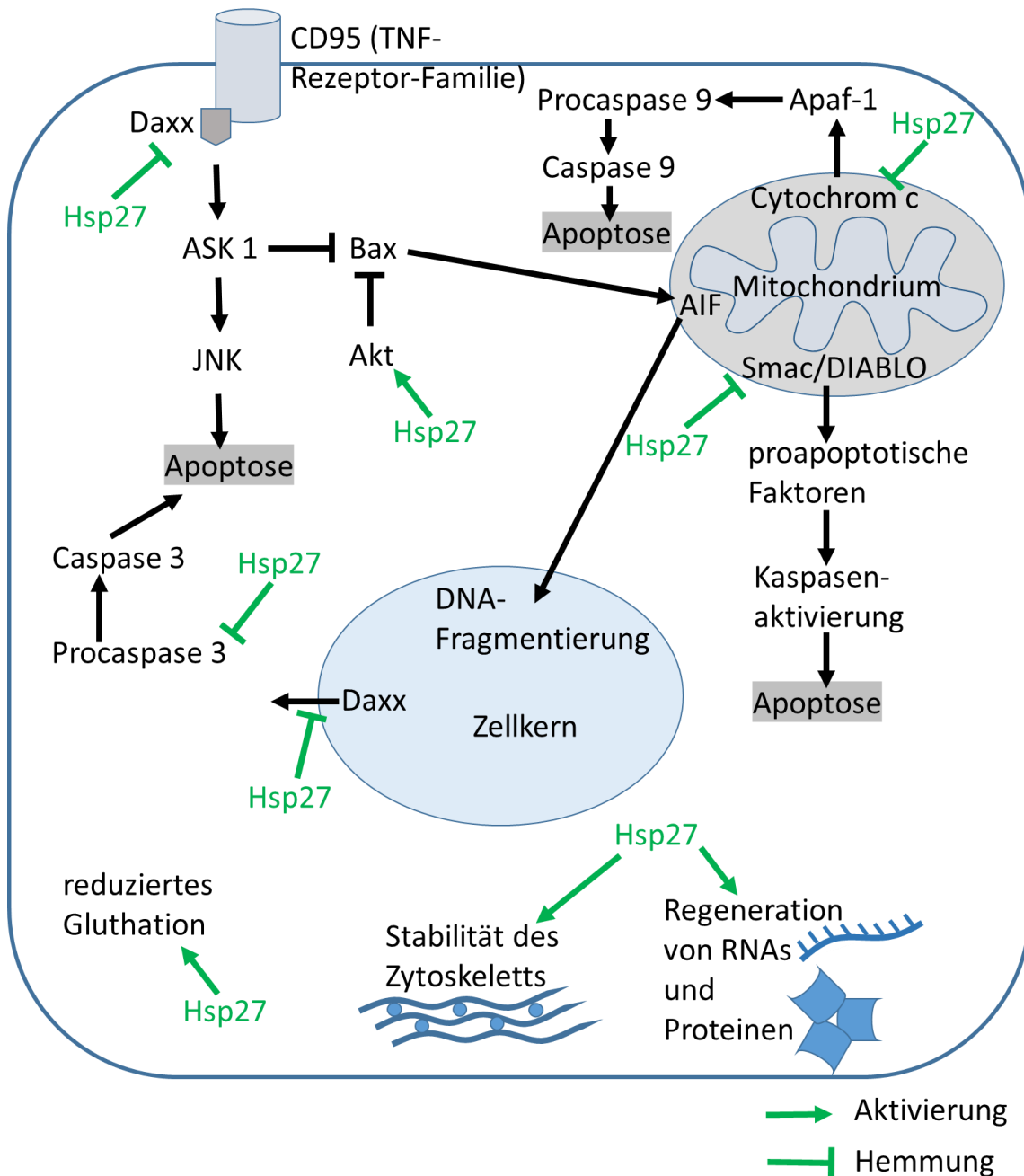


Abb. 2: Übersicht der Funktionen von Hsp27

Hsp27 wirkt antiapoptotisch, indem es an unterschiedlichen Stellen mit in den Signalwegen der Apoptose beteiligten Faktoren interagiert. Nach einem Hitzeschock fördert Hsp27 die Regeneration von RNAs und Proteinen und wirkt im Allgemeinen zytotoxisch. Basierend auf Garrido *et al.* (2006) [49].

3.2 Hsp70

Strukturell besteht Hsp70 aus zwei Domänen: Die aminoterminal Domäne ist die ATPase-Domäne und besteht aus einer 44 kDa-ATPase [53]; die carboxyterminale Domäne ist die Substrat-bindende Domäne und besteht aus

einer β -Subdomäne und helikalen α -Segmenten [54]. ATPase-Domäne und Substrat-bindende Domäne hängen voneinander ab und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Konformation [55]. Ist ATP gebunden, so ist die Substrat-bindende Domäne in einer offenen Konformation, in der das Substrat binden kann [56]. Durch Hydrolyse von ATP zu ADP ändert sich die Konformation, sodass es zu einer stabilen Bindung zum Substrat kommt [54] (siehe Abb. 3).

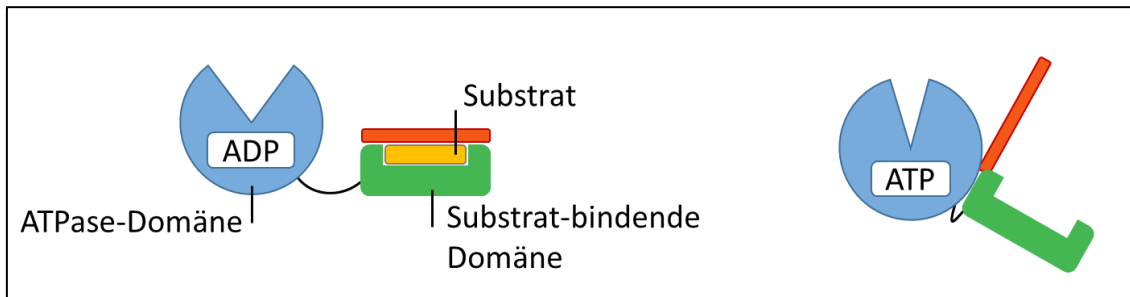


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von Hsp70 und dessen Konformationsänderung durch Bindung von ATP

Im ADP-gebundenen Zustand von Hsp70 ist das Substrat stabil an die Substratbindungsstelle gebunden [54]. Ist ATP gebunden, so befindet sich die Substrat-bindende Domäne in der offenen Konformation [56]. Durch Substratbindung und Substratfreisetzung werden Proteine in ihre korrekte dreidimensionale Struktur gebracht oder abgebaut. Modifiziert nach Saibil *et al.* (2013) [36].

In seiner Funktion von Hsp70 als Chaperon können Proteine durch Bindung und Freisetzung von Peptiden in die korrekte dreidimensionale Struktur gebracht und somit aktiviert werden.

Die Aktivität von Hsp70 beruht auch auf Co-Chaperonen und Nukleotidaustauschfaktoren (*Nucleotide exchange factors*, NEFs) [36, 57, 58]. Neben der Faltung von Proteinen kann Hsp70 zusammen mit dem Co-Chaperon Hsp40 und einem NEF, zum Beispiel Hsp110, Proteinaggregate lösen und die Proteine zurück in die richtige Proteinstruktur bringen [59-61].

Werden Zentrosomen, die bei der Zellteilung eine Rolle spielen, durch Hyperthermie geschädigt, so schützt Hsp70 die Zelle vor einer fehlerhaften Zellteilung [62]. Außerdem greift Hsp70 ebenso wie Hsp27 an verschiedenen Stellen des extrinsischen und intrinsischen Wegs der Apoptose ein, wodurch es antiapoptotisch wirkt (siehe Abb. 4). Hsp70 interagiert mit ASK1 und verhindert die Aktivierung der *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), wodurch es zur Hemmung der Apoptose kommt [63]. Auch die Aktivierung von Bid in tBid wird von Hsp70

gehemmt, wodurch die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren wie Cytochrom c aus dem Mitochondrium verhindert wird [64]. Hsp70 unterdrückt Signale, die Bax, ein Mitglied der proapoptotischen Bcl-2 Familie, aktivieren [65]. Bax wiederum sorgt für die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum des Mitochondriums. Hsp70 inhibiert zudem den AIF, dessen Freisetzung aus dem Intermembranraum des Mitochondriums unter anderem zur Fragmentierung von DNA führt [66]. Wenn Cytochrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt wird, aktiviert es Apaf-1, dieser Faktor wiederum aktiviert die Procaspase 9 und es kommt zur Bildung des Apoptosoms. Hsp70 inhibiert Apaf-1 und verhindert so die Bildung des Apoptosoms, wodurch die Kaspasenkaskade der Apoptose gehemmt wird [67]. Auch die Permeabilität von Lysosomen, die proapoptotische Faktoren freisetzen können, wird durch Hsp70 herabgesetzt [68].

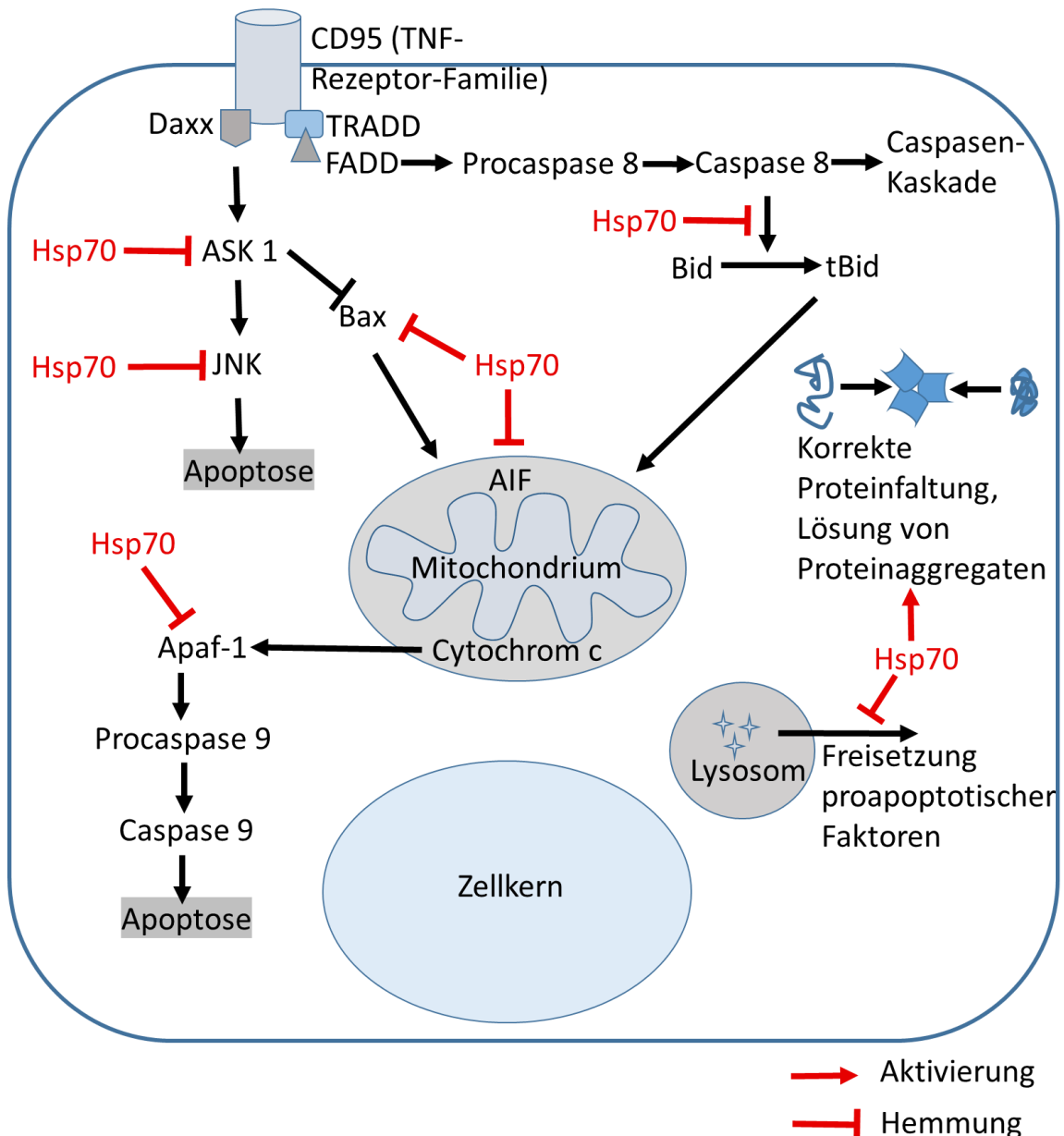


Abb. 4.: Übersicht der Funktionen von Hsp70

Als Chaperon fördert Hsp70 die korrekte Faltung von Proteinen und dient der Lösung von Proteinaggregaten. Darüber hinaus wirkt Hsp70 antiapoptotisch, indem es mit zahlreichen in die Apoptose involvierten Faktoren interagiert. Basierend auf Garrido *et al.* (2006) [49].

3.3 Hsp90

Die Hsp90-Familie enthält mindestens 17 Gene, die in vier Klassen eingeteilt wurden. Die Proteine der Klassen HSP90AA und HSP90AB befinden sich im Zytosol, die Proteine der Klasse HSP90B im endoplasmatischen Retikulum und die der Klasse TRAP im Mitochondrium [69]. Auch eine Freisetzung von Hsp90

in den Extrazellulärraum wird beschrieben [70]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression von Hsp90 α class A member 1 und 2 und Hsp90 α class B member 1 untersucht, die im Zytosol vorkommen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der Hsp90-Familie und Einordnung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene

Modifiziert nach Chen *et al.* (2005) [69].

Klasse	Vorkommen	In dieser Arbeit untersuchte Genexpression
HSP90AA	Zytosol	Hsp90 α class A member 1 Hsp90 α class A member 2
HSP90AB	Zytosol	Hsp90 α class B member 1
HSP90B	Endoplasmatisches Retikulum	
TRAP	Mitochondrium	

Strukturell ist Hsp90 ein Homodimer, wobei jedes Monomer aus drei Domänen besteht: einer N-terminalen Domäne, einer Mitteldomäne und einer C-terminalen Domäne [71, 72]. Die N-terminale Domäne besitzt eine ATPase [73]. Durch Hydrolyse von ATP ändert sich die Konformation von Hsp90, was für dessen Funktion essentiell ist [74] (siehe Abb. 5).

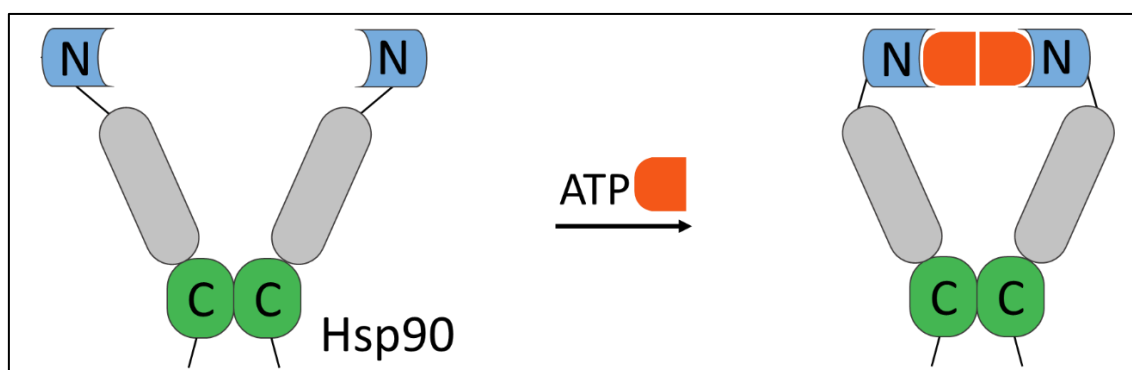


Abb. 5: Schematische Darstellung der Struktur von Hsp90 und dessen Konformationsänderung durch Bindung von ATP

Durch Bindung von ATP geht Hsp90 von seiner offenen in die geschlossene Konformation über. N = N-terminale Domäne, C = C-terminale Domäne. Modifiziert nach Pearl *et al.* (2000) [75].

Die Mitteldomäne kann mit Co-Chaperonen interagieren, wodurch die ATPase-Domäne beeinflusst wird [76]. Die C-terminale Domäne stellt die Dimerisierungsdomäne dar [71]. Zudem besitzt sie eine alternative ATP-Bindungsstelle und interagiert mit verschiedenen Cofaktoren [77, 78]. Die Cofaktoren dienen unter anderem dazu, die ATPase-Funktion zu beschleunigen [79].

Hsp90 interagiert mit einer Vielzahl von Faktoren, von denen im Folgenden eine Auswahl beschrieben ist [80]. Als Chaperon ist Hsp90 an der Aktivierung von Zielproteinen beteiligt, wobei dabei die ATPase-Funktion benötigt wird [75, 81]. Hsp90 unterdrückt die Aggregation von Proteinen, z.B. der *Casein kinase II*, indem Hsp90 diese bindet und dadurch die Proteine in ihrer funktionellen Form hält [82, 83]. Auch während eines Hitzeschocks stabilisiert Hsp90 Proteine und verhindert damit deren Aggregation und Inaktivierung [84]. Hsp90 stabilisiert zudem mutierte Proteine wie die Tyrosinkinase BCR-ABL [85, 86]. Extrazelluläres Hsp90 interagiert mit der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2), die in der Lage ist, die extrazelluläre Matrix abzubauen, was einen Schritt der Invasion von Tumorzellen darstellt. So begünstigt die Interaktion von Hsp90 mit MMP2 die Invasion von Tumorzellen [87].

Des Weiteren wirkt Hsp90 antiapoptotisch. Es ist an der Aktivierung des Proteins Akt beteiligt, welches letztlich die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum des Mitochondriums unterbindet und in Zusammenhang mit erhöhter Proliferation steht [88, 89]. Apaf-1 ist bei der Initiation der Kaspasenkaskade der Apoptose von Bedeutung. Hsp90 inhibiert Apaf-1, wodurch die Apoptose gehemmt wird [90]. Hsp90 induziert die Expression von *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), ein Protein, welches in der Regulation der Apoptose eine bedeutende Rolle spielt. So werden durch Bcl-2 antiapoptotische Mechanismen in Gang gesetzt [91].

Am Ende des Signalweges der Nekroptose, einer Form der regulierten Nekrose, wird *Mixed Lineage Kinase Domain-Like* (MLKL) aktiviert und begünstigt durch eine Destabilisierung der Zellmembran den Zelltod. Hsp90 hemmt die Aktivität von MLKL und begünstigt damit das Überleben der Zelle [92]. Auch in der

Progression von Tumorerkrankungen scheint Hsp90 eine bedeutende Rolle zu spielen. So fand man eine zwei- bis zehnmal höhere Expression von Hsp90 in Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen [93].

3.4 Proliferationsmarker Ki-67

Ki-67 ist ein Protein, das in der Synthese- (S), Gap2- (G2) und Mitosephase (M-Phase) des Zellzyklus exprimiert wird. Zudem wird es in der Gap1-Phase (G1-Phase) exprimiert, wenn diese auf die M-Phase folgt. Ruhende Zellen, Zellen die sich also in der G0-Phase befinden, sind Ki-67-negativ [94, 95]. In dieser Arbeit dient Ki-67 daher als Marker für sich teilende Zellen. Die Halbwertszeit beträgt ungefähr eine Stunde und somit ist der Ki-67-Spiegel repräsentativ für dessen *de-novo*-Synthese [96]. Die Konzentration von Ki-67 steigt während der S-Phase an bis sie während der Mitose ihren maximalen Wert erreicht [95, 96]. Während der G1-, S- und G2-Phase ist Ki-67 perinukleolär und im Karyoplasma lokalisiert, während der Mitose ist Ki-67 auf die Chromosomen, das Karyoplasma und Zytoplasma verlagert [97].

Die Primärstruktur von Ki-67 wurde 1993 entschlüsselt und es wurde herausgefunden, dass zwei Isoformen des Proteins existieren: Eine mit einem Molekulargewicht von 395 kDa und eine zweite mit einem Molekulargewicht von 345 kDa [98]. Der Genlokus von Ki-67 besteht aus ca. 30 000 Basenpaaren [99]. Zur Funktion von Ki-67 ist bisher bekannt, dass Ki-67 Phosphatase-1 bindet und in der Phosphoregulation des nukleolären Proteins B23 / *Nucleophosmin* involviert ist [100]. Vermutlich ist Ki-67 an der Kontrolle der Struktur des Chromatins beteiligt [101]. Auch einige weitere Interaktionen sind bekannt, jedoch ist die Funktion von Ki-67 noch nicht gänzlich verstanden [102, 103].

3.5 Proliferationsmarker PCNA

Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 36 kDa [104]. Strukturell ist es aus drei Untereinheiten aufgebaut, die wiederum aus je zwei Domänen bestehen. Jede Domäne besteht aus zwei α -Helices, die den inneren Ring des Proteins bilden und neun β -Einheiten, die

die α -Helices ringförmig umgeben. PCNA bildet somit einen Ring, der doppelsträngige DNA umgeben kann [105] (siehe Abb. 6).

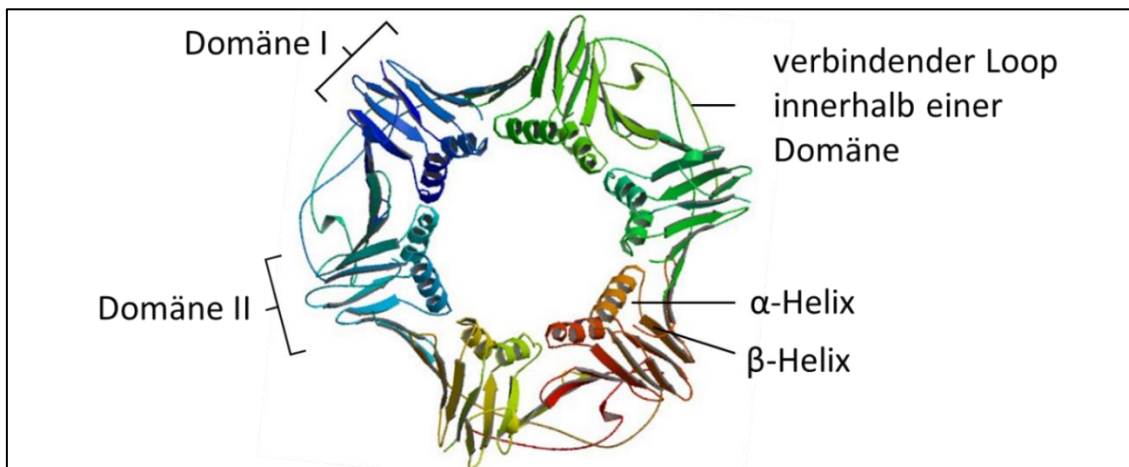


Abb. 6: Schematische Darstellung der Struktur von PCNA

Abgebildet ist die Vorderansicht von humaner PCNA. Die drei Untereinheiten sind in blau, grün und gelb / rot dargestellt. Jede Untereinheit besteht aus zwei Domänen. Modifiziert nach Protein Data Bank (2017) [106].

PCNA spielt bei der DNA-Replikation, also innerhalb des Zellzyklus, eine bedeutende Rolle und wird daher als Proliferationsmarker verwendet. Dazu diente er bei dieser Arbeit. Dabei spricht eine erhöhte Expression von PCNA für eine erhöhte Proliferation [107, 108].

Während der DNA-Replikation ist PCNA an die Polymerase δ gebunden [109]. PCNA dient als Faktor der Polymerase δ , der die Prozessivität erhöht und die Polymerase am DNA-Strang hält [110]. Bei Zellschäden kann p21 an PCNA binden, was zur Unterbrechung des Zellzyklus führt und der Zellschaden kann behoben werden [111]. Auch bei der Nukleotidexzisionsreparatur ist PCNA beteiligt, etwa bei der Aktivierung der Exzisionsreparaturenzyme [112]. Darüber hinaus interagiert PCNA mit zahlreichen anderen Proteinen, die in die Replikation der DNA involviert sind oder an den Kontrollpunkten des Zellzyklus entscheidende Rollen spielen [113].

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

Tabelle 2: Zelllinien

Zelllinie	Entität	Firma
HT-29	humanes kolorektales Adenokarzinom	ATCC® (American Type Culture Collection) (Manassas, Virginia, USA)
SW480	humanes kolorektales Adenokarzinom, Dukes' Typ B	ATCC® (Manassas, Virginia, USA)
SW620	humanes kolorektales Adenokarzinom, Dukes' Typ C	ATCC® (Manassas, Virginia, USA)

4.1.2 Nährmedien

Tabelle 3: Nährmedien

Nährmedium	Zusätze	Firma
McCoy's 5A Medium mit L-Glutamin	10 % fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS), 1 % Penicillin / Streptomycin	ATCC® (Manassas, Virginia, USA)
RPMI Medium 1640	10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin	Gibco® by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)

4.1.3 Chemikalien, Puffer, Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien, Puffer, Reagenzien

Chemikalie, Puffer, Reagenz	Firma
Accutase®	Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)

Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
Fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
5-Fluoruracil (5-FU)	Medac (Wedel, Deutschland)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
NuPAGE® Antioxidans	Invitrogen by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer	Novex® by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Novex® by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Penicillin / Streptomycin	Gibco® by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Phosphataseinhibitor-Cocktail	Calbiochem® by Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)	Gibco® by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween® 20 BioChemica)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ponceau S 0,1 % weight per volume (w/V) in 5 % Essigsäure	Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
Proteaseinhibitorcocktail: Protease Inhibitor Cocktail Set III, Animal Free	Calbiochem® by Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)

Proteinmarker HiMark™ Prestained High Molecular Weight Protein Standard	Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Proteinmarker Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA)	Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
RLT-Puffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SuperSignal® West Pico Chemilumineszenzsubstrat	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
Roti®-Quant	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin / EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Lösung 0,05 % / 0,02 % (w/V) in PBS	Biochrom (Berlin, Deutschland)

4.1.4 Selbst hergestellte Puffer

Tabelle 5: Selbst hergestellte Puffer

Selbst hergestellter Puffer	Zusammensetzung
Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer)	20 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5) 150 mmol/l NaCl 1 mmol/l EDTA 1 % (V/V) IGEPAL CA-630 1 % (m/V) NaDOC 1 % (m/V) SDS 5 mmol/l (m/V) NaF vor Verwendung zugefügt: 1 mmol/l DTT 10 mmol/l PMFS 5 mmol/l Proteaseinhibitor-Cocktail 20 mmol/l Phosphataseinhibitor-Cocktail
0,05 % Tris-buffered saline with Tween20 (TBS-T)	500 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl 0,05 % (V/V) Tween 20 pH 7,4

Blockerlösungen	5 % (m/V) Magermilchpulver in TBS-T 0,1 % 5 % (m/V) BSA in TBS-T 0,1 %
-----------------	---

4.1.5 Kits

Tabelle 6: Kits

Kit	Firma
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega (Mannheim, Deutschland)
MESA GREEN qPCR™ Mastermix Plus für SYBR® Assay-No ROX	Eurogentec Deutschland GmbH (Köln, Deutschland)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

4.1.6 Primer

Tabelle 7: Primer

Primer	Katalognummer	Firma
β-Aktin	330001 PPH00073G	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp27 Protein 1	330001 PPH00165F	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp27 Protein 2	330001 PPH01204A	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp70 Protein 1A	330001 PPH01193B	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp70 Protein 1B	330001 PPH01216B	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp70 Protein 4	330001 PPH01188C	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp90 alpha class A member 1	330001 PPH63391B	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp90 alpha class A member 2	330001 PPH00166E	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Hsp90 alpha class B member 1	330001 PPH01201C	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp90 beta member 1	330001 PPH05569A	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Ki-67	330001 PPH001024E	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PCNA	330001 PPH00216B	Qiagen (Hilden, Deutschland)

4.1.7 Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 8: Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Wirt	Verdünnung	Firma
β-Aktin monoklonaler Antikörper (mAk)	Hase	1:1500 in 5 % (m/V) BSA in TBS-T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)
Hsp27 mAk	Maus	1:1500 in 5 % (m/V) Magermilch in TBS-T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)
Hsp70/72 mAk	Maus	1:1000 bis 1:2000 in 5 % (m/V) Magermilch in TBS-T 0,1 %	Abcam® (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Hsp90 mAk	Hase	1:1000 bis 1:2000 in 5 % (m/V) BSA in TBS-T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)
PCNA mAk	Hase	1:1000 bis 1:1500 in 5 % (m/V) BSA in TBS-T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)
Ki-67 mAk	Hase	1:1000 in 5 % (m/V) BSA in TBS-T 0,1 %	Abcam® (Cambridge, Vereinigtes Königreich)

Sekundär-antikörper			
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Ziege	1:2000 bis 1:2500 in 5 % (m/V) Magermilch in TBS-T 0,1 %	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
Goat anti-mouse IgG-HRP	Ziege	1:3000 in 5 % (m/V) Magermilch in TBS-T 0,1 %	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
Gekoppelte Antikörper			
HRP β -Aktin mAk	Hase	1:1000 in 5 % (m/V) BSA in TBS-T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)

4.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialie	Firma
Einmal-Küvetten 70 μ l	Brand (Wertheim, Deutschland)
iBlot® Gel Tranfer Stacks Nitrocellulose, Regular	Novex® by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Klebefolie Microseal® 'C' Film für PCR-Platten	Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA)
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel 1,5 mm	Novex® by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
PCR-Platten Hard-Shell® PCR Plates	Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA)
Pipettenspitzen mit Filter (1250 μ l): Safeseals-Tips® professional	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen mit und ohne Filter (0,1-20 μ l; 2-100 μ l)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Reaktionstube Safe-Lock Tube (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Serologische Pipetten (2 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Verschlussfolie Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, Illinois, USA)
Zellkulturflaschen T175 Cell Star®	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zellschaber	SPL Life Sciences (Korea)
Zentrifugen-Röhrchen steril Cell Star® (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

4.1.9 Geräte

Tabelle 10: Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank Function Line	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Brutschrank Heracell 150i CO ₂ Incubator	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
C1000 Touch™ Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA)
Gelkammer XCell Sure Lock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Invitrogen by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
iBlot®	Invitrogen by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten (0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
QIAcube	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Scanner zum Einscannen der Western Blots: FluorChem® FC2	Proteinsimple (San Jose, Kalifornien, USA)
Schüttelwasserbad (Typ SV2945)	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Spektrophotometer Nanodrop 2000C	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Sterilwerkbank Herasafe	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge fresco	Kendro (Langenselbold, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge 1 S-R	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

4.1.10 Software

Tabelle 11: Software

Software	Firma
CFX-Manager	Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA)
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation® (Redmond, Washington, USA)
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation® (Redmond, Washington, USA)
Software Nano Drop 2000/2000C	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Um ausreichend Kolonkarzinomzellen für die Versuche zur Verfügung zu haben, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen vermehrt und dort auf Vorrat gehalten. Verwendet wurden drei Zelllinien des humanen kolorektalen Adenokarzinoms: HT-29, SW480 und SW620. Sie wurden in den Zellkulturflaschen Cell Star® T175 für adhärenente Zellen bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5 % im Brutschrank kultiviert. Zur Aufrechterhaltung der Zellkulturen und deren Wachstum wurden die Zellen jeder Zellkulturflasche mit 15 ml Nährmedium kultiviert, das zwei- bis dreimal pro Woche gegen frisches Nährmedium ausgetauscht wurde. Die HT-29 Tumorzellen wurden mit dem Nährmedium McCoy's 5A Medium mit L-Glutamin angezüchtet, das mit 10 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) und 1 % Penicillin und Streptomycin versetzt wurde. Zur Anzucht der SW480 und SW620 Tumorzellen wurde das Nährmedium RPMI Medium 1640 verwendet, das ebenfalls mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin versetzt wurde.

4.2.2 Zellpassage

Bei einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Tumorzellen einer Zellkulturflasche auf mehrere neue Zellkulturflaschen aufgeteilt, bis 24 Zellkulturflaschen jeder Zelllinie mit 2,8 bis 3 x 10⁶ Zellen für die späteren Versuche vorhanden waren. Dazu wurden nach dem Absaugen des Nährmediums die in einer Zellkulturflasche wachsenden Tumorzellen mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (*Dulbecco's phosphate buffered saline*, DPBS) gespült. Dann wurden sie mit 5 ml Trypsin / EDTA-Lösung (Ethyldiamintetraacetat) 3 bis 8 min bei 37°C inkubiert und 10 ml frisches Nährmedium zugegeben. Eventuell noch anhaftende Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und dann der Überstand abgegossen. Das verbleibende Pellet mit den Tumorzellen wurde in Nährmedium suspendiert und die Zellen in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

4.2.3 *In vitro*-HIPEC-Modell

Sobald jeweils 24 Zellkulturflaschen der drei humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen (HT-29, SW480, SW620) vorhanden waren, wurden die kultivierten Tumorzellen - angelehnt an das Verfahren der HIPEC - eine Stunde lang einer definierten Temperaturstufe (37°C, 41°C oder 43°C) ausgesetzt. Die Zellen jeder Temperaturstufe wurden jeweils mit und ohne 5-FU getestet (siehe Abb. 7). Für die Versuche wurde das Nährmedium einer Zellkulturflasche gegen 15 ml auf 37°C, 41°C oder 43°C gewärmtes Medium ausgetauscht. Jeweils acht Zellkulturflaschen einer Zelllinie wurden einer der drei Temperaturstufen ausgesetzt. Davon wurde in jeweils vier der Zellkulturflaschen jeder Temperaturstufe zusätzlich 5-FU gegeben, sodass die Konzentration von 5-FU im Nährmedium 11,6 µmol/l betrug. Die Zellkulturflaschen wurden mit luftundurchlässigen Deckeln und Parafilm verschlossen und eine Stunde lang einer der Temperaturstufen (37°C, 41°C, 43°C) in einem Schüttelwasserbad ausgesetzt (siehe Abb. 8). Danach wurde das Nährmedium mit oder ohne 5-FU durch 20 ml auf 37°C vorgewärmtes Nährmedium ausgetauscht und die Zellkulturflaschen wurden für eine bestimmte Regenerationszeit (30 min, 24 h, 48 h, 72 h) zurück in den Brutschrank gelegt.

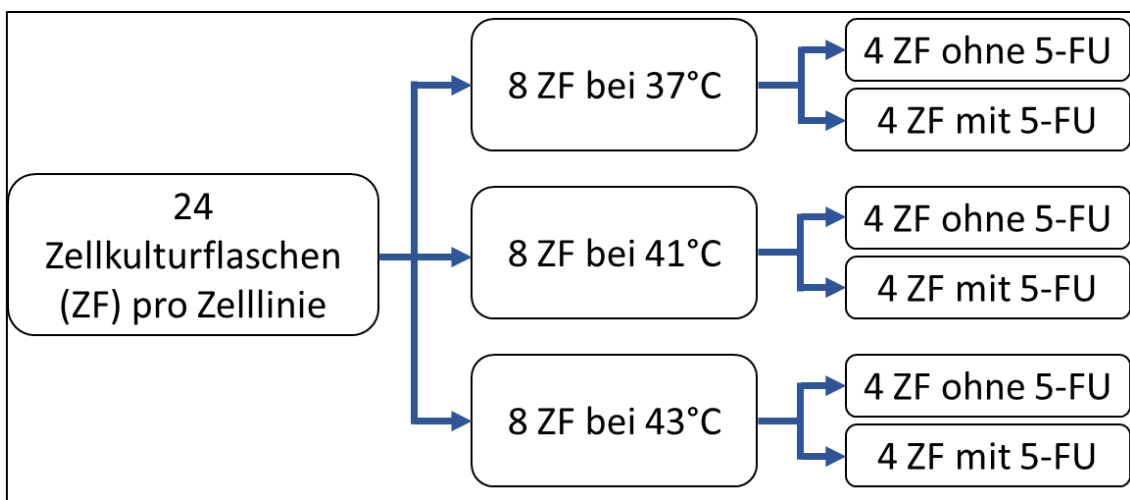


Abb. 7: Aufteilung der Zellkulturflaschen pro Zelllinie

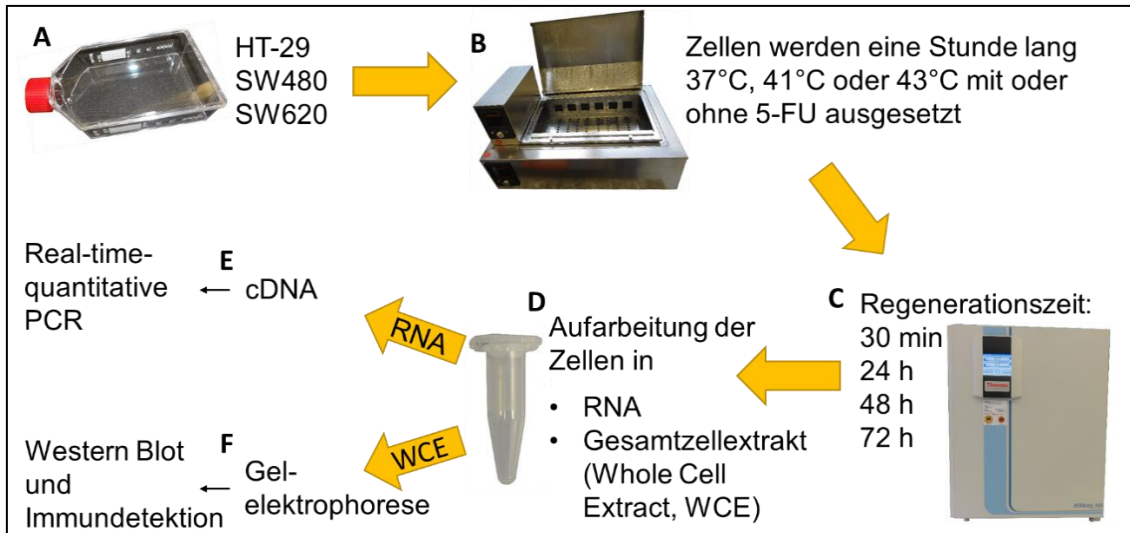


Abb. 8: Versuchsdurchführung

(A) Die Zellen dreier humaner kolorektaler Adenokarzinom-Zelllinien (HT-29, SW480, SW620) wurden in Zellkulturflaschen in einem Brutschrank kultiviert. (B) In einem Schüttelwasserbad wurden die Zellen eine Stunde unterschiedlichen Temperaturen (37°C, 41°C, 43°C) ohne oder mit 5-FU ausgesetzt. (C) Danach wurden sie für unterschiedliche Regenerationszeiten (30 min, 24 h, 48 h, 72 h) zurück in den Brutschrank gelegt. (D) Nach der Regenerationszeit erfolgte die Isolation von RNA und die Herstellung von Gesamtzellextrakten (*Whole Cell Extract*, WCE) aus den Tumorzellen. (E) Die RNA wurde in komplementäre DNS (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben, welche in der RT-qPCR (*Real-time quantitative polymerase chain reaction*, quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) vervielfacht und quantifiziert wurde. (F) Die Proteine des Gesamtzellextrakts wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Mithilfe von Antikörper-Reaktionen wurden Targetproteine auf der Nitrocellulose-Membran sichtbar gemacht (Immundetektion).

4.2.4 Aufarbeitung der Zellen

Nach den Regenerationszeiten von 30 min, 24 h, 48 h und 72 h wurde aus den Tumorzellen RNA zur Analyse der Genexpression und Gesamtzellextrakt zum Nachweis von Proteinen gewonnen. Zu jedem der vier Zeitpunkte wurden Zellen jeder Versuchsbedingung aufgearbeitet.

Dafür wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit Accutase® bei 37°C vom Boden abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert.

Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 311 x g (Erdbeschleunigung) und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets wurden in jeweils 10 ml DPBS suspendiert. Von jeder Suspension wurden 1,5 ml in 15 ml-

Zentrifugenröhrchen für die RNA-Isolierung überführt. Die in den 50 ml-Zentrifugenröhrchen verbleibende Suspension wurde für die Gewinnung von Gesamtzell-Extrakt (*Whole Cell Extract*, WCE) genutzt.

4.2.4.1 Gewinnung von Gesamtzell-Extrakt

Die 50 ml-Zentrifugenröhrchen wurden erneut bei 311 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das verbleibende Pellet wurde in RIPA buffer suspendiert, dem vor Gebrauch Dithiothreitol (DTT), Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), Protease- und Phosphataseinhibitor-Cocktails zugefügt wurden. Die Suspension wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert, bei 4°C für 15 min auf dem Lyserad inkubiert und dann bei 4°C für 10 min und 13 000 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*, rpm) zentrifugiert. Der Überstand, der den Gesamtzell-Extrakt darstellt, wurde zur Aufbewahrung in Eppendorf-Gefäße pipettiert und bei -80°C eingefroren.

4.2.4.2 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurden die 15 ml-Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (311 x g, 4°C, 5 min) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 400 µl RLT-Lyse-Puffer (Bestandteil des RNeasy® Mini Kits) suspendiert und lysiert. Dann wurde die Suspension in 2 ml-Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung des RNeasy® Mini Kit im QIAcube. Die isolierte RNA wurde anschließend bei -80°C eingefroren.

4.2.5 Molekularbiologische Analyse

4.2.5.1 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird RNA durch eine reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde die RNA-Konzentration der Proben zunächst durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm mithilfe des Spektrophotometers Nanodrop 2000C bestimmt. 1 µg der RNA in insgesamt 11,6 µl RNase-freiem Wasser wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Zu den RNA-Verdünnungen wurden jeweils 8,4 µl eines Reaktionsmixes von ImProm-II™ Reverse Transcription System von Promega gegeben. Dieser bestand aus 1 µl Random Primer, 4 µl 5X Puffer, 1,2 µl MgCl₂, 0,2 µl RNasin®, 1 µl reverse Transkriptase und 1 µl Desoxynukleotid-

triphosphate (dNTPs). Die cDNA-Synthese erfolgte im Mastercycler von Eppendorf: Zuerst erfolgte die Anlagerung der Primer bei 25°C für 5 min, dann die reverse Transkription bei 42°C für 60 min und zum Schluss die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 70°C für 15 min. Gelagert wurden die cDNA-Proben bei -20°C.

4.2.5.2 RT-qPCR

Die cDNA-Abschnitte wurden mithilfe der RT-qPCR (*Real-time quantitative polymerase chain reaction*, quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) vervielfältigt. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR werden die Produkte bei der RT-qPCR durch Fluoreszenzfarbstoffe in Echtzeit erfasst und können quantifiziert werden.

Mithilfe des Programms Nano Drop 2000 und einer Absorptionsmessung bei 260 nm wurden zunächst die Konzentrationen der cDNA-Proben ermittelt und anhand dessen Verdünnungen hergestellt. 2 µl der cDNA-Verdünnung (entspricht 100 ng) jeder Probe wurden jeweils in ein Reaktionsgefäß der PCR-Platte pipettiert. Dazugefügt wurden 12,5 µl Reaktionsmix, bestehend aus MESA GREEN qPCR™ Mastermix Plus für SYBR® Assay-No, RT² Primer Assay, Nuklease-freiem Wasser und 1 µl eines Primers. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte im Thermocycler (C1000 Touch™ Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System). Zur Amplifikation wurden nach Aktivierung der Taq-Polymerase (5min, 95°C) insgesamt 40 Zyklen der folgenden Schritte durchgeführt: 95°C für 15 s, 55°C für 30 s und 72°C für 30 s.

Die RT-qPCR jeder Probe erfolgte sechsmal in drei unabhängigen Läufen jeweils als Doppelbestimmung, um Reproduzierbarkeit und Pipettiergenauigkeit zu überprüfen.

4.2.5.3 Datenanalyse

Die Daten der RT-qPCR wurden mit dem Programm „CFX-Manager“ von Bio-Rad analysiert; die weitere Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2010.

Die Bestimmung der relativen Genexpressionen der amplifizierten cDNA-Abschnitte wurde vorgenommen, indem die Menge der gewünschten cDNA-Abschnitte relativ zur Menge der cDNA des konstitutiven Gens β-Aktin berechnet

wurde. Konstitutive Gene sind Gene, die unabhängig von äußeren Einflüssen konstant exprimiert werden. Die relative Genexpression der amplifizierten cDNA-Abschnitte wurde mithilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode bestimmt.

Die Standardabweichung der relativen Genexpression wurde ermittelt und der jeweilige p-Wert mithilfe des t-Tests berechnet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die Genexpression wurde mithilfe von Microsoft Excel 2010 grafisch dargestellt.

4.2.6 Proteinanalyse

4.2.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gesamtzellextrakt-Proben wurden aufgetaut und deren Proteinkonzentration mithilfe der Bradford-Messung im Photometer ermittelt. Die Proteine wurden dann in einem elektrischen Feld mittels SDS-PAGE nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

Zunächst wurden dafür zu 30 µg Protein 2,5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer, 1 µl NuPAGE® Sample Reducing Agent und destilliertes Wasser gegeben, sodass das Volumen 10 µl betrug. Die Proben wurden dann 10 min bei 70°C in einem Thermomixer inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Für die Gelelektrophorese wurden NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gele in Western-Blot-Kammern gestellt. Die Kammern wurden mit NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer gefüllt.

4.2.6.2 Western Blot und Immundetektion

Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mithilfe des iBlot® und iBlot® Transfergelen. Die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend mit dem Azofarbstoff Ponceau S (Ponceau S 0,1 % (w/V) in 5 % Essigsäure) angefärbt, um die Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen und mit TBS-T 0,1 % gewaschen. Dann wurde sie eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch in TBS-T 0,1 % geblockt, um freie Proteinbindungen zu sättigen. Es folgten zwei Waschschriffe für jeweils 5 min mit TBS-T 0,1 % und die Membran wurde 12 bis 20 Stunden mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 8) bei 4°C inkubiert. Die Primärantikörper

waren dabei 1:1000 bis 1:2000 in TBS-T 0,1 % und Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) verdünnt (5 g BSA in 100 ml TBS-T 0,1 %).

Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal 15 min mit TBS-T 0,1 % gewaschen. Der Sekundärantikörper (siehe Tabelle 8) wurde in einer Konzentration von 1:2000 bis 1:3000 in 5 %igem Magermilchpulver in TBS-T 0,1 % auf die Membran gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Membranen dreimal 10 min mit TBS-T 0,1 % gewaschen. Die Proteinbanden wurden mithilfe von SuperSignal® West Pico Chemilumineszenzsubstraten sichtbar gemacht. Die Substrate wurden im Verhältnis 1:1 für 5 min lichtgeschützt inkubiert und dann die Membranen 5 min damit eingewirkt. Anschließend wurden die Proteinbanden auf den Membranen mithilfe von Röntgenfilmen in einer Dunkelkammer sichtbar gemacht.

5 Ergebnisse

5.1 Hsp27

5.1.1 Genexpression von Hsp27

5.1.1.1 Hsp27 Protein 1

1. In HT-29 Zellen

Humane HT-29 Kolonkarzinomzellen steigerten ihre Genexpression von Hsp27 Protein 1 bereits 30 min nach einstündiger Behandlung unter Hyperthermie ohne 5-FU verglichen mit Zellen ohne Behandlung (bei 37°C gehalten) auf das 2,2-Fache bei 41°C bzw. 1,7-Fache bei 43°C (jeweils $p < 0,0001$) (siehe Abb. 9A). Nach der zusätzlichen Behandlung mit 5-FU fand sich eine Steigerung der Genexpression sogar auf das 3,8-Fache bei 41°C bzw. das 11,7-Fache bei 43°C (jeweils $p < 0,0001$). 24 h bis 72 h nach der Behandlung zeigten sich in den Zellen nach Hyperthermie ohne 5-FU-Behandlung keine relevanten Veränderungen der Genexpression. In allen 5-FU ausgesetzten Zellen hingegen war die Genexpression von Hsp27 Protein 1 nach einer Regenerationszeit von 48 h und 72 h 2,6-fach bis 6,4-fach erhöht (jeweils $p < 0,001$).

2. In SW480 Zellen

Nach 30 min war Hsp27 Protein 1 in den SW480 Tumorzellen, die 41°C und 5-FU ausgesetzt waren bereits 2,0-fach erhöht und in den Tumorzellen, die 43°C ohne und mit 5-FU ausgesetzt waren sogar 5,2-fach bzw. 5,6-fach erhöht (jeweils $p > 0,05$) (siehe Abb. 9B). Nach 24 h zeigten sich im Vergleich zu den Tumorzellen, die bei 37°C ohne 5-FU gehalten wurden nur unwesentliche Genexpressionsunterschiede. 48 h und 72 h nach der Behandlung war Hsp27 Protein 1 in allen mit 5-FU behandelten Zellen bis auf das 2,6-Fache hoch signifikant erhöht (jeweils $p < 0,0001$), während alle Zellen ohne 5-FU-Behandlung keine erhöhte Genexpression mehr aufwiesen.

3. In SW620 Zellen

Bereits nach 30 min fand sich in den SW620 Tumorzellen, die unter 43°C ohne und mit 5-FU behandelt wurden eine hoch signifikant erhöhte Genexpression auf das 2,4-Fache bzw. 11,9-Fache im Vergleich zur Kontrolle unter Normothermie

(jeweils $p < 0,0001$) (siehe Abb. 9C). Nach 24 h gab es keine relevanten Unterschiede der Genexpression. Im weiteren Zeitverlauf war die Genexpression aller mit 5-FU behandelten Kolonkarzinomzellen wieder hoch signifikant 1,3-fach bis 2,1-fach erhöht (jeweils $p < 0,001$). Die Zellen ohne 5-FU-Behandlung wiesen dagegen keine wesentlich erhöhte Genexpression mehr auf.

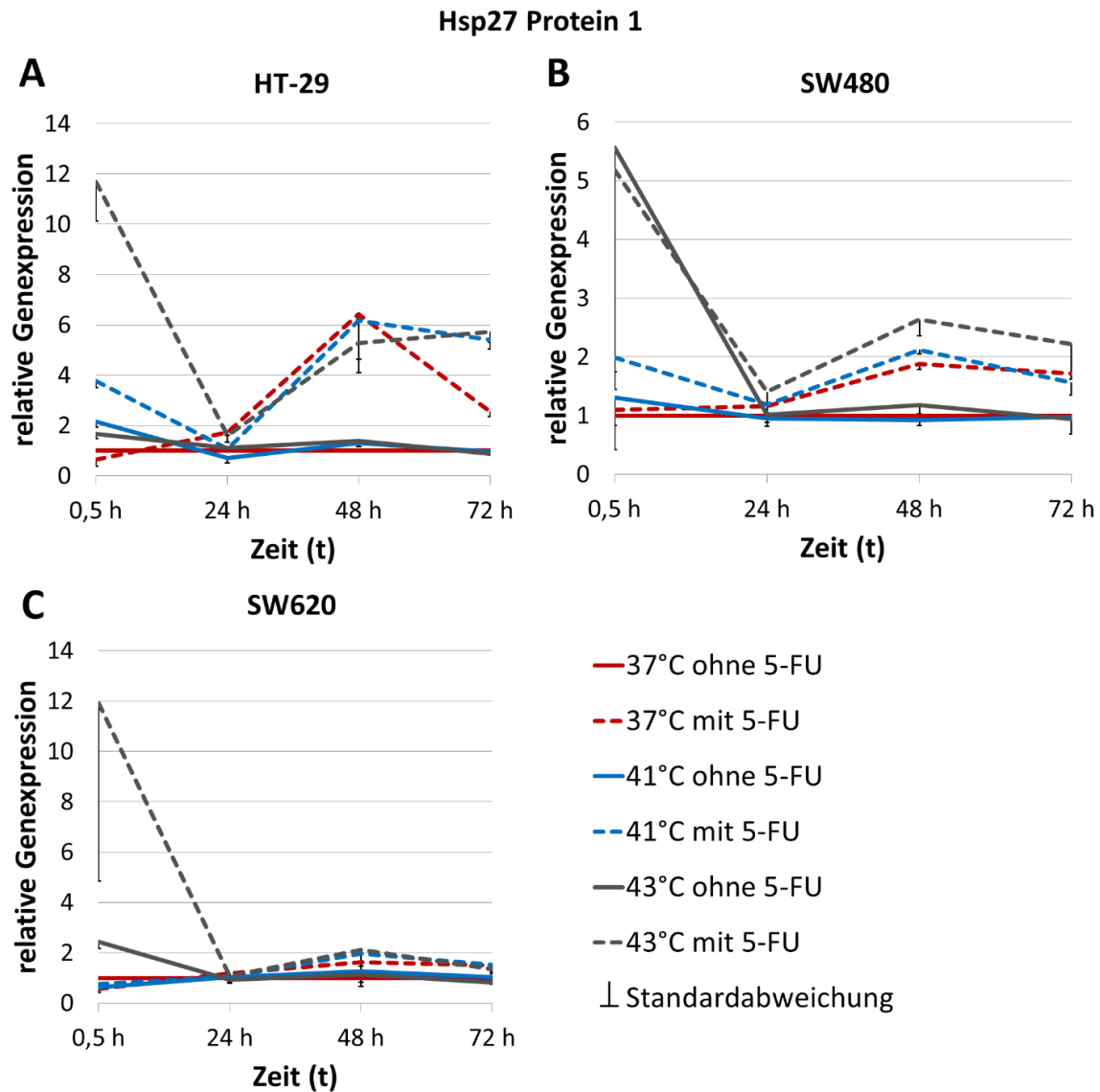


Abb. 9: Relative Genexpression von Hsp27 Protein 1 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A-C: In allen Zelllinien zeigte sich nach 30 min eine erhöhte Genexpression durch Hyperthermie. Nach einer Regenerationszeit von 72 h war Hsp27 Protein 1 in allen mit 5-FU behandelten Zellen signifikant erhöht. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.1.1.2 Hsp27 Protein 2

1. In HT-29 Zellen

Nach einer Regenerationszeit von 30 min zeigte sich in den humanen HT-29 Kolonkarzinomzellen eine mit höherer Temperatur und mit Zugabe von 5-FU zunehmende Genexpression von Hsp27 Protein 2 (siehe Abb. 10A): Verglichen mit der Kontrolle unter Normothermie war die Genexpression nach Hyperthermie von 43°C ohne 5-FU 4,0-fach und mit 5-FU sogar 19,0-fach erhöht (jeweils $p > 0,05$). Nach 24 h, 48 h und 72 h fanden sich keine wesentlichen Veränderungen durch Behandlung unter Hyperthermie ohne 5-FU. Nach einer Regenerationszeit von 48 h war Hsp27 Protein 2 in den unter 41°C mit 5-FU behandelten Zellen 2,6-fach erhöht ($p < 0,05$). Die Zellen, die 5-FU ausgesetzt waren, wiesen nach 72 h eine 2,0-fach bis 3,2-fach geringere Genexpression im Vergleich zu den Zellen ohne 5-FU-Behandlung der jeweils gleichen Temperaturstufe auf (jeweils $p < 0,05$).

2. In SW480 Zellen

Nach 30 min war die Genexpression in den SW480 Tumorzellen, die unter 43°C behandelt wurden bis auf das 4,6-Fache erhöht (jeweils $p > 0,05$). In den restlichen Tumorzellen war Hsp27 Protein 2 nach 30 min nicht bedeutend verändert (siehe Abb. 10B). Nach 24 h zeigten sich keine relevanten Veränderungen durch die Behandlung. In den Tumorzellen unter 41°C mit 5-FU und unter 43°C ohne 5-FU war die Genexpression nach 48 h 3,0-fach bzw. 2,6-fach erhöht ($p < 0,0001$ nach 48 h, 41°C und 5-FU; $p > 0,05$ nach 48 h, 43°C ohne 5-FU). Durch die Behandlung mit 5-FU war Hsp27 Protein 2 nach 72 h verglichen mit den Zellen ohne 5-FU-Behandlung der jeweils gleichen Temperaturstufe 2,2-fach bis 4,8-fach erniedrigt (jeweils $p > 0,05$).

3. In SW620 Zellen

In den humanen SW620 Kolonkarzinomzellen war die Genexpression 24 h nach der Behandlung unter 37°C und 5-FU 5,1-fach erhöht ($p > 0,05$) (siehe Abb. 10C). Eine Suppression der Genexpression durch 5-FU wurde nach 48 h und 72 h beobachtet (jeweils $p > 0,05$). Sonst zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen durch Hyperthermie oder 5-FU.

Hsp27 Protein 2

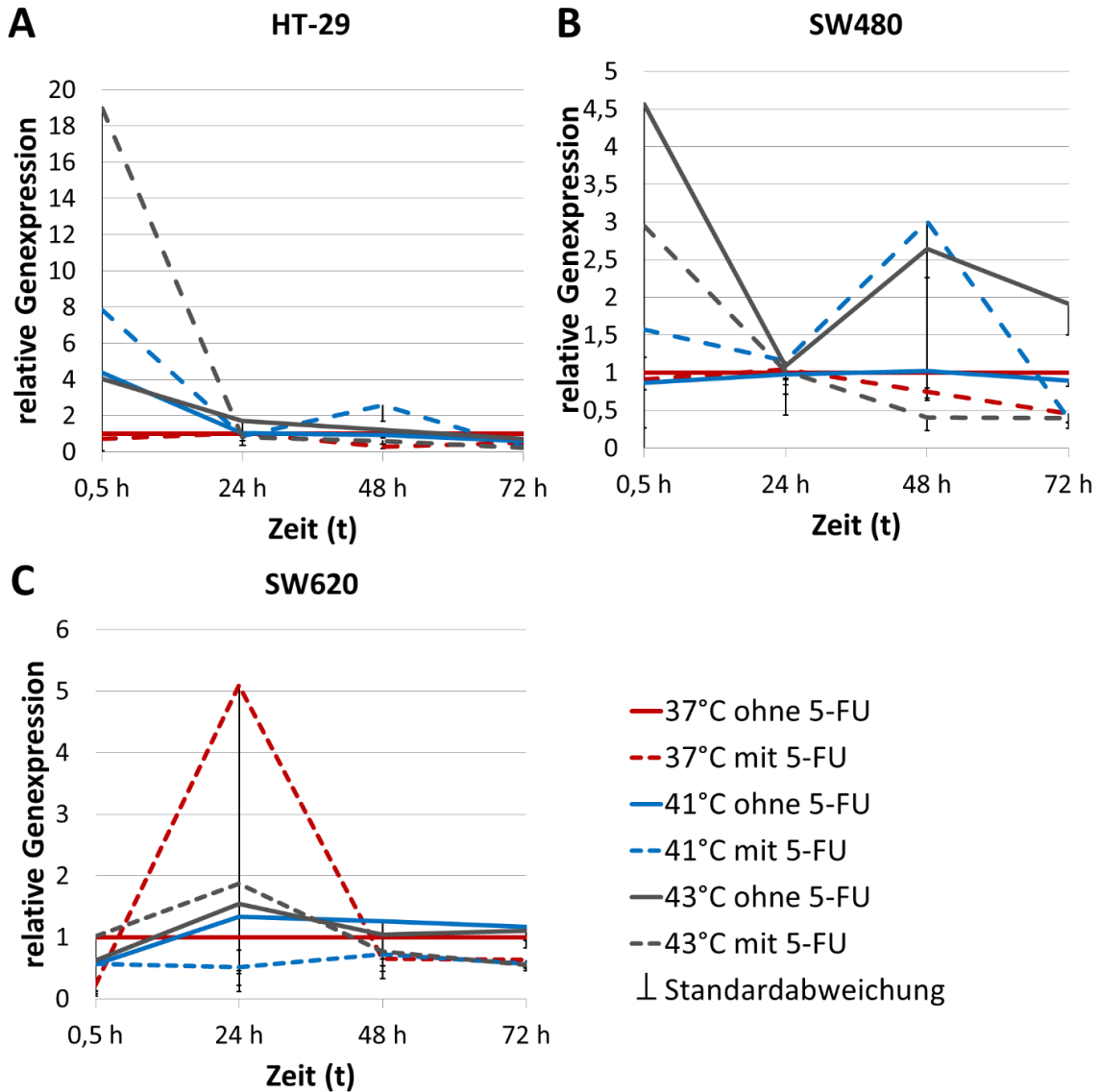


Abb. 10: Relative Genexpression von Hsp27 Protein 2 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A-C: In den Zelllinien HT-29 und SW480 war Hsp27 Protein 2 nach 30 min in den hypertherm behandelten Zellen erhöht; in den SW620 Zellen wurde die Genexpression nach 30 min nicht beeinflusst. Nach 72 h war die Genexpression der mit 5-FU behandelten Zellen erniedrigt. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.1.2 Proteinexpression von Hsp27

1. In HT-29 Zellen

Im Western Blot zeigte sich in den HT-29 Kolonkarzinomzellen nach 24 h eine erhöhte Proteinexpression von Hsp27 nach Behandlung unter Hyperthermie ohne 5-FU verglichen mit der Kontrolle bei 37°C ohne 5-FU (siehe Abb. 11A). Hyperthermie in Kombination mit 5-FU bewirkte nach 24 h eine gleichbleibende oder verminderte Proteinexpression von Hsp27. Nach einer Regenerationszeit von 48 h und 72 h war Hsp27 in allen mit 5-FU behandelten Zellen deutlich erhöht - besonders in Kombination mit Hyperthermie. Die Proteinexpression von Hsp27 in den Zellen nach Hyperthermie-Behandlung ohne 5-FU zeigte nach 72 h keinen relevanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

2. In SW480 Zellen

Nach 24 h, 48 h und 72 h fand sich in den SW480 Tumorzellen meist eine gesteigerte Proteinexpression von Hsp27 mit zunehmender Temperatur (siehe Abb. 11B). Während sich 5-FU nach 24 h noch nicht auf die Proteinexpression auswirkte, kam es 48 h und 72 h nach Behandlung unter Hyperthermie und 5-FU zu einer im Vergleich zu den Zellen der gleichen Temperaturstufe gesteigerten Proteinexpression.

3. In SW620 Zellen

Nach 72 h war die Proteinexpression von Hsp27 in den SW620 Zellen nach Behandlung unter 41°C in Kombination mit 5-FU sowie nach 43°C ohne und mit 5-FU geringfügig erhöht (siehe Abb. 11C). Sonst zeigte sich in den Western Blots eine konstante Proteinexpression von Hsp27 zu den untersuchten Zeitpunkten.

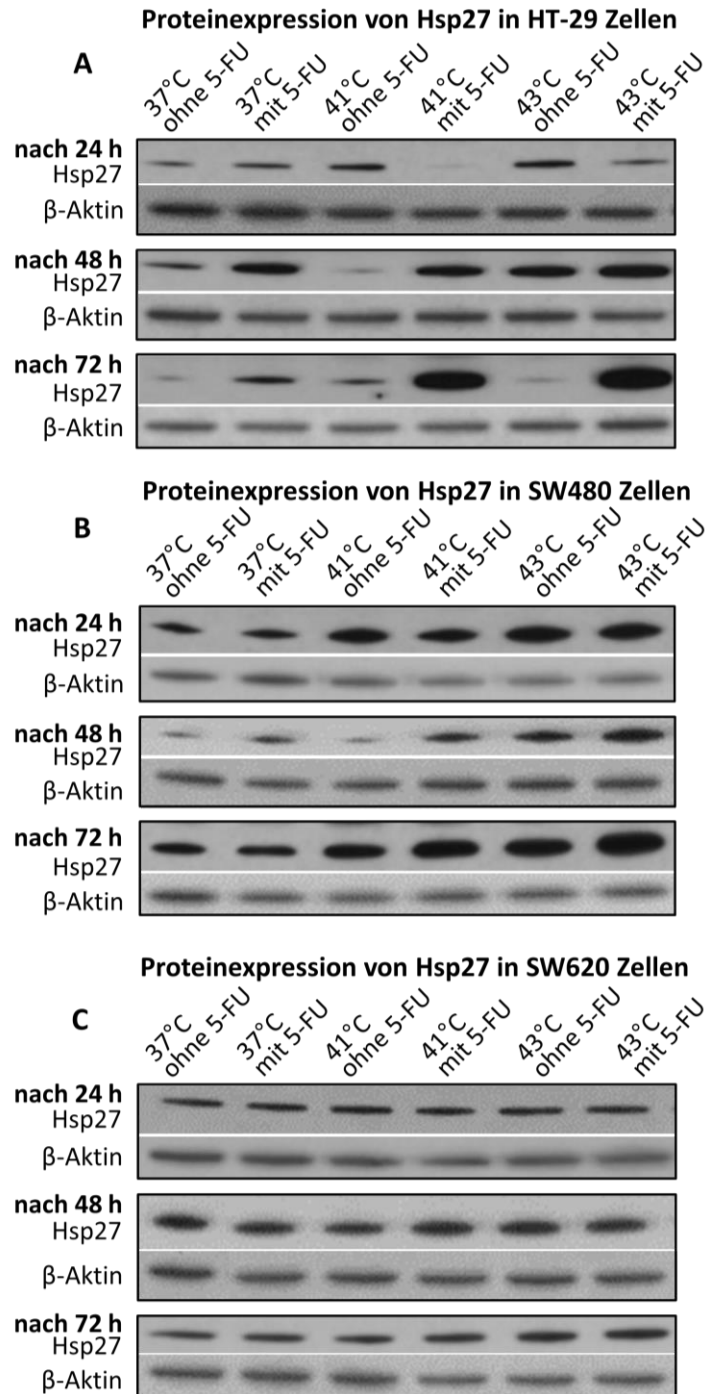


Abb. 11: Western Blots der Proteinexpression von Hsp27 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A: Nach 24 h zeigte sich in den HT-29 Zellen eine gesteigerte Proteinexpression in den Zellen, die Hyperthermie ohne 5-FU ausgesetzt waren. Nach 72 h war die Proteinexpression in den mit 5-FU behandelten Zellen stark erhöht. B: Die SW480 Zellen zeigten eine hauptsächlich temperaturabhängige Erhöhung von Hsp27. C: Die SW620 Zellen wiesen nach 72 h in den unter 41°C mit 5-FU sowie 43°C behandelten Zellen eine erhöhte Proteinexpression auf. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin. Zur besseren Darstellung wurden die Western Blots bearbeitet.

5.2 Hsp70

5.2.1 Genexpression von Hsp70

5.2.1.1 Hsp70 Protein 1A

1. In HT-29 Zellen

30 min nach der Behandlung zeigte sich in den HT-29 Kolonkarzinomzellen eine mit höherer Temperaturstufe zunehmende Genexpression von Hsp70 Protein 1A bis auf das 11,5-Fache nach Hyperthermie unter 43°C ($p < 0,0001$) (siehe Abb. 12A). Nach der Behandlung unter Hyperthermie mit zusätzlich 5-FU war die Genexpression hoch signifikant (17,5-fach bei 41°C bzw. 29,9-fach bei 43°C) gegenüber der Kontrolle erhöht (jeweils $p < 0,0001$). Nach 24 h zeigten sich in allen Zellen keine wesentlichen Veränderungen der Genexpression. Nach 48 h und 72 h war die Genexpression in den mit 5-FU behandelten Zellen gegenüber den Zellen ohne 5-FU-Exposition bis auf das 3,1-Fache erhöht ($p > 0,05$ nach 48 h, 41°C und 5-FU, ansonsten jeweils $p < 0,05$).

2. In SW480 Zellen

Nach 30 min war Hsp70 Protein 1A in allen unter Hyperthermie ohne und mit 5-FU behandelten SW480 Tumorzellen erhöht (jeweils $p > 0,05$), wobei die Genexpression mit steigender Temperaturstufe sogar bis auf das 33,5-Fache bei 43°C ohne 5-FU zunahm (siehe Abb. 12B). Zwischen 24 h und 72 h nach der Behandlung war Hsp70 Protein 1A in allen mit 5-FU behandelten Zellen hoch signifikant zwischen 1,9-fach und 3,7-fach erhöht (jeweils $p < 0,0001$); die Zellen ohne 5-FU-Behandlung zeigten keine relevanten Genexpressionsunterschiede.

3. In SW620 Zellen

Die Genexpression in den SW620 Tumorzellen war 30 min nach Behandlung unter 41°C und 5-FU sowie nach Behandlung unter 43°C ohne und mit 5-FU hoch signifikant bis auf das 67-Fache erhöht (jeweils $p < 0,0001$) (siehe Abb. 12C). Nach 24 h gab es keine wesentlichen Veränderungen der Genexpression. Nach 48 h und 72 h war die Genexpression der mit 5-FU behandelten Zellen bis auf das 2,5-Fache erhöht (jeweils $p < 0,0001$).

Hsp70 Protein 1A

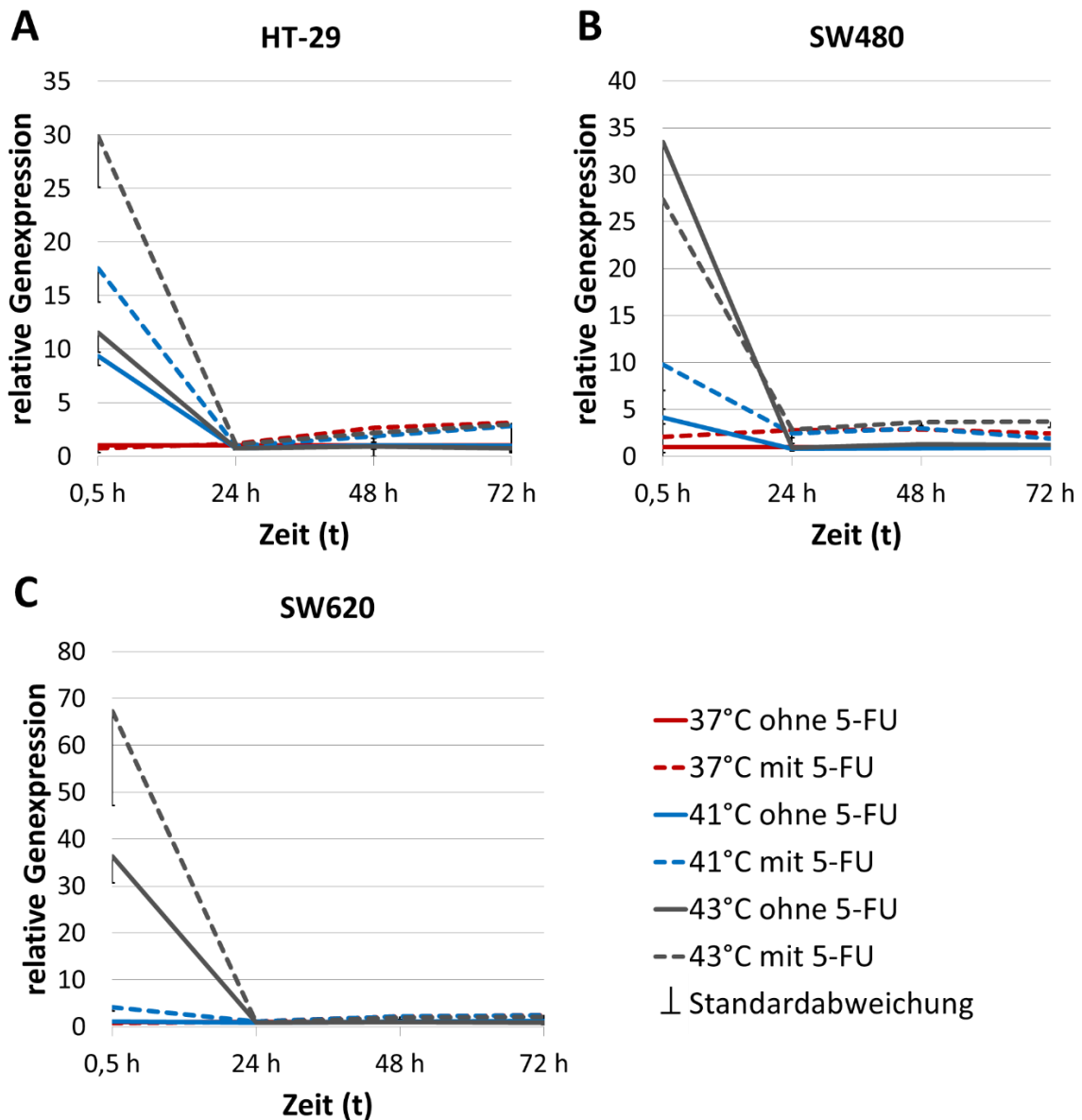


Abb. 12: Relative Genexpression von Hsp70 Protein 1A in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A-C: Es zeigte sich meist eine nach 30 min durch Hyperthermie bzw. 5-FU erhöhte Genexpression. Nach einer Regenerationszeit von 72 h war Hsp70 Protein 1A in allen mit 5-FU behandelten Tumorzellen signifikant erhöht. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.2.1.2 Hsp70 Protein 1B

1. In HT-29 Zellen

Nach 30 min war die Genexpression der unter Hyperthermie ohne 5-FU behandelten HT-29 Zellen 5,0-fach erhöht (jeweils $p < 0,05$) (siehe Abb. 13A). Die unter Hyperthermie mit zusätzlich 5-FU behandelten Zellen zeigten sogar eine 9,3-fache bzw. 17,8-fache Genexpression bei 41°C bzw. 43°C gegenüber der Referenz (jeweils $p < 0,05$). Alle Zellen, die ohne 5-FU behandelt wurden, wiesen nach 24 h, 48 h und 72 h keine relevanten Unterschiede der Genexpression auf. In den 5-FU ausgesetzten Zellen war Hsp70 Protein 1B nach 24 h, 48 h und 72 h 1,4-fach bis 5,0-fach erhöht, wobei die Genexpression mit der Zeit zunahm (jeweils $p < 0,05$ nach 24 h, jeweils $p > 0,05$ nach 48 h und 72 h).

2. In SW480 Zellen

Nach einer Regenerationszeit von 30 min war die Genexpression aller unter Hyperthermie ohne und mit 5-FU behandelten SW480 Zellen signifikant 5,0-fach bis 27,0-fach erhöht (jeweils $p < 0,05$), wobei die Genexpression unter höherer Temperatur stärker war (siehe Abb. 13B). 24 h, 48 h und 72 h nach der Behandlung war keine wesentliche Auswirkung von Hyperthermie ohne 5-FU auf die Genexpression zu erkennen. Die Genexpression der mit 5-FU behandelten Zellen war nach 24 h, 48 h und 72 h 1,7-fach bis 2,7-fach erhöht ($p > 0,05$ nach 48 h, 41°C und 5-FU, ansonsten jeweils $p < 0,05$).

3. In SW620 Zellen

Nach 30 min war Hsp70 Protein 1B in den unter 41°C mit 5-FU behandelten SW620 Tumorzellen 8,2-fach erhöht; in den unter 43°C ohne 5-FU behandelten Zellen 54,4-fach und in Kombination mit 5-FU sogar 247,1-fach (jeweils $p < 0,0001$) (siehe Abb. 13C). 24 h nach der Behandlung zeigten sich in allen Zellen keine relevanten Unterschiede der Genexpression. Nach 48 h und 72 h waren in den Tumorzellen, die 5-FU nicht ausgesetzt waren, keine wesentlichen Auswirkungen der Hyperthermie auf die Genexpression festzustellen. Die Zellen mit 5-FU-Behandlung zeigten nach 48 h und 72 h jedoch eine 1,5-fach bis 2,3-fach hoch signifikant gesteigerte Genexpression (jeweils $p < 0,001$).

Hsp70 Protein 1B

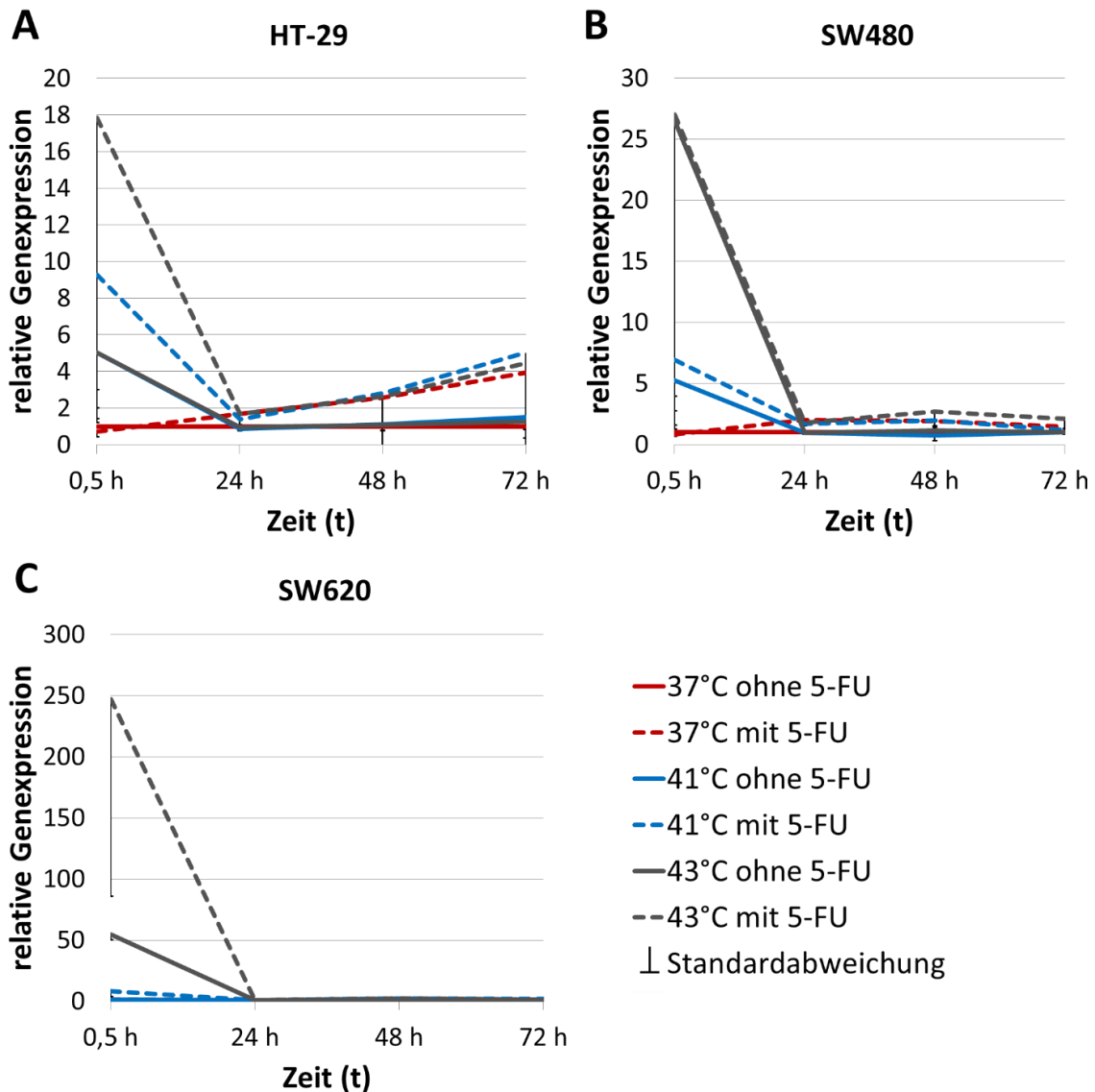


Abb. 13: Relative Genexpression von Hsp70 Protein 1B in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A-C: Nach 30 min fand sich eine durch Hyperthermie erhöhte Genexpression – besonders in Kombination mit 5-FU. Nach einer Regenerationszeit von 72 h war die Genexpression in den 5-FU ausgesetzten Kolonkarzinomzellen erhöht. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.2.1.3 Hsp70 Protein 4

1. In HT-29 Zellen

Nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturstufen zeigten alle HT-29 Kolonkarzinomzellen ohne 5-FU-Behandlung in der RT-qPCR nach Regenerationszeiten von 30 min, 24 h, 48 h und 72 h eine nicht wesentlich (zwischen 0,8- und 1,3-fach) veränderte Genexpression (siehe Abb. 14A). Nach 30 min war die Genexpression in den Tumorzellen, die unter Hyperthermie mit 5-FU behandelt wurden 2,0-fach bei 41°C bzw. 2,5-fach bei 43°C erhöht (jeweils $p > 0,05$). Zwischen 24 h und 72 h nach der Behandlung wiesen alle mit 5-FU behandelten Zellen eine zwischen 1,5-fach und 3,1-fach signifikant erhöhte Genexpression von Hsp70 Protein 4 auf (jeweils $p < 0,05$).

2. In SW480 Zellen

Nach 30 min war Hsp70 Protein 4 nach Behandlung unter 43°C ohne und mit 5-FU in den SW480 Tumorzellen 3,3-fach bis 3,6-fach erhöht (jeweils $p > 0,05$) (siehe Abb. 14B). Ab 24 h wiesen alle ohne 5-FU behandelten Zellen keine relevanten Unterschiede der Genexpression mehr auf. In den mit 5-FU behandelten Zellen war Hsp70 Protein 4 nach 24 h und 48 h bis 2,2-fach erhöht ($p > 0,05$ nach 24 h; $p < 0,0001$ nach 48 h). Nach 72 h zeigte sich nur noch in den unter 43°C mit 5-FU behandelten Zellen eine 1,9-fach erhöhte Genexpression ($p < 0,0001$).

3. In SW620 Zellen

30 min nach Hyperthermie unter 43°C und 5-FU war die Genexpression in den SW620 Kolonkarzinomzellen 7,2-fach erhöht ($p < 0,001$) (siehe Abb. 14C). Nach einer Regenerationszeit von 48 h war die Genexpression der unter 37°C mit 5-FU behandelten Zellen 1,4-fach und der unter 43°C mit 5-FU behandelten Zellen 1,6-fach erhöht (jeweils $p < 0,0001$). Nach 72 h war die Genexpression aller mit 5-FU behandelten Zellen hoch signifikant 1,3-fach bis 1,5-fach erhöht (jeweils $p < 0,0001$). Ansonsten zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen durch Hyperthermie und 5-FU auf die Genexpression.

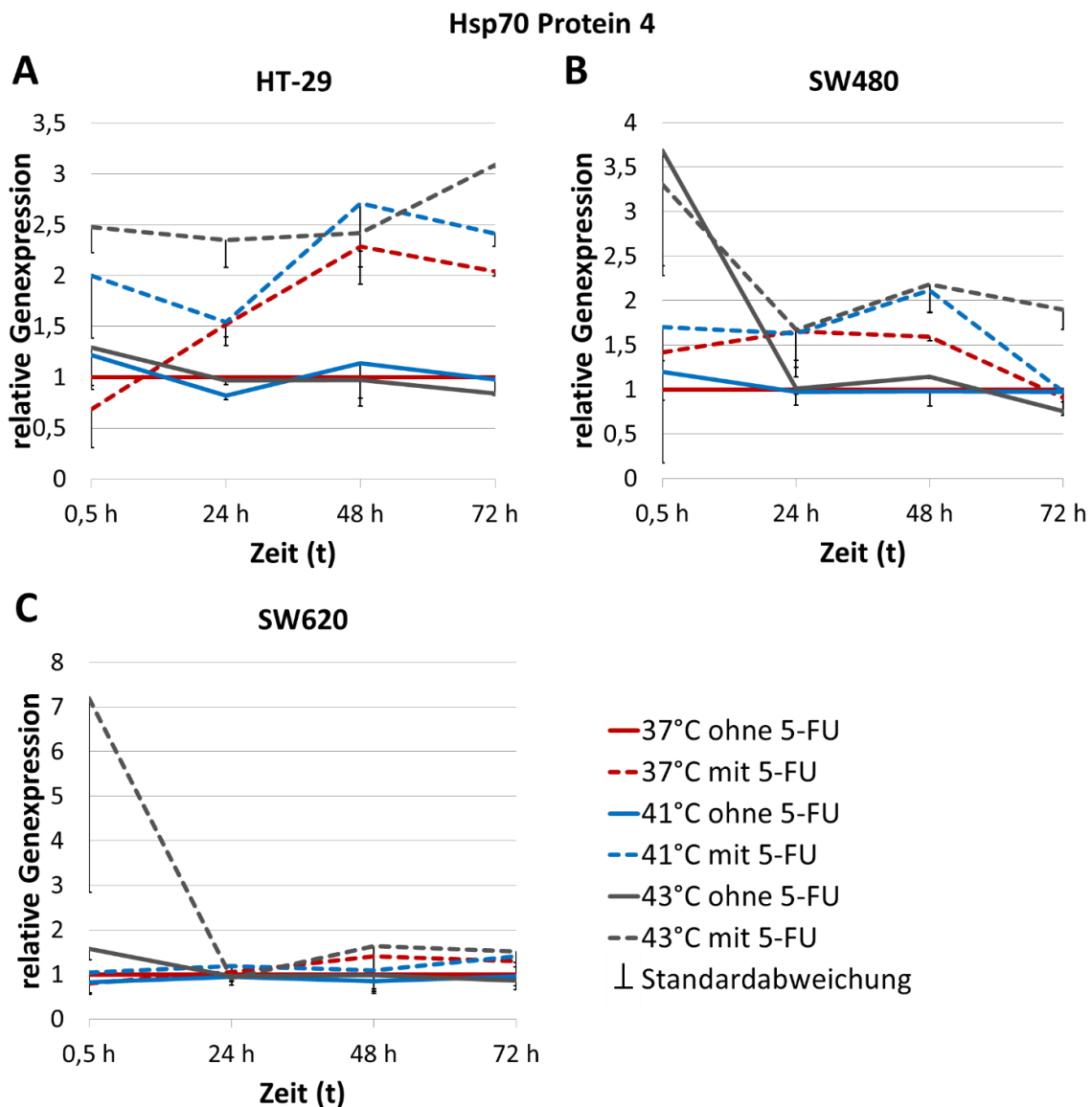


Abb. 14: Relative Genexpression von Hsp70 Protein 4 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A-C: Nach 30 min war Hsp70 Protein 4 in allen Zellen durch 43°C mit 5-FU erhöht. A, C: Nach 72 h zeigte sich in den mit 5-FU behandelten HT-29 und SW620 Tumorzellen eine signifikant erhöhte Genexpression. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.2.2 Proteinexpression von Hsp70

1. In HT-29 Zellen

Hyperthermie und 5-FU hatten zu allen untersuchten Zeitpunkten keine relevante Auswirkung auf die Proteinexpression von Hsp70 in den HT-29 Tumorzellen (siehe Abb. 15A). Es fällt jedoch eine generell starke Basisexpression von Hsp70 in den untersuchten Tumorzellen auf.

2. In SW480 Zellen

Nach Regenerationszeiten von 24 h, 48 h und 72 h zeigte sich eine gesteigerte Proteinexpression in den unter 41°C und 43°C mit und ohne 5-FU behandelten SW480 Kolonkarzinomzellen (siehe Abb. 15B). Dabei nahm die Proteinexpression mit höherer Temperaturstufe zu und war in den mit 5-FU behandelten Zellen jeweils höher als in den ohne 5-FU behandelten Zellen.

3. In SW620 Zellen

Nach 24 h und 48 h zeigten die Western Blots keine wesentlichen Unterschiede der Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen (siehe Abb. 15C). 72 h nach der Behandlung war die Proteinexpression in den unter 43°C behandelten Zellen geringfügig erhöht.

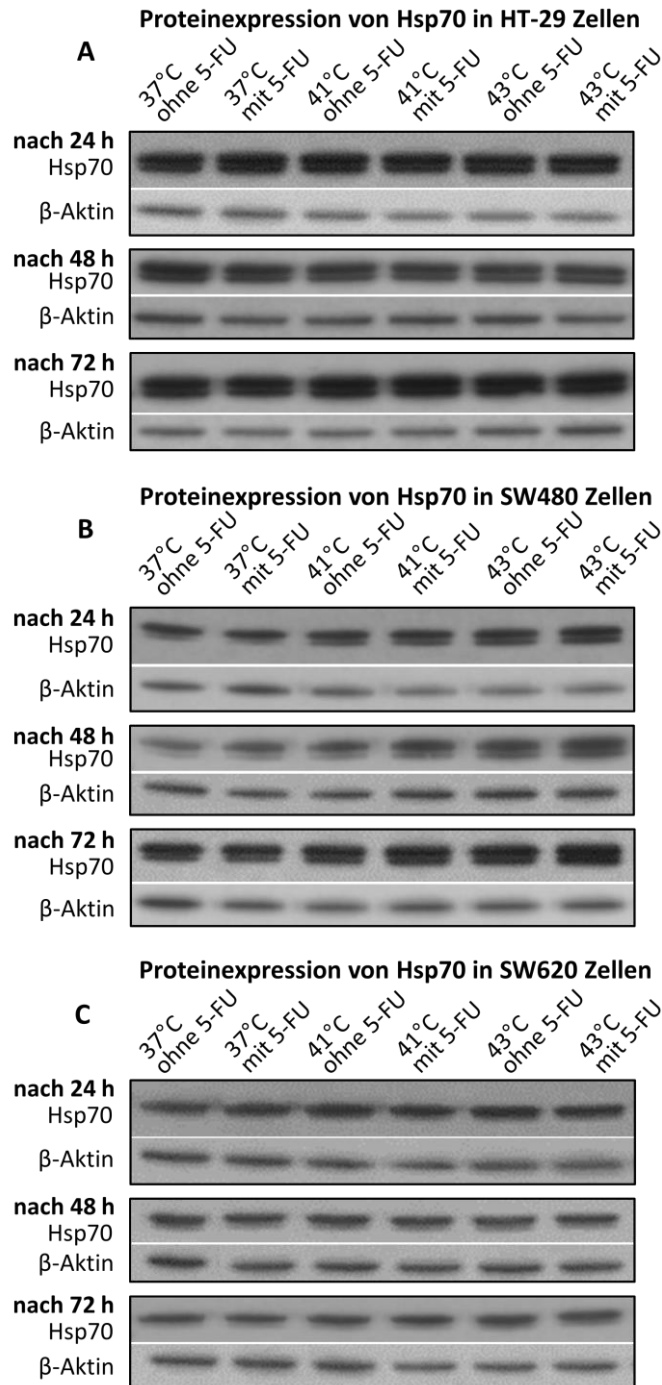


Abb. 15: Western Blots der Proteinexpression von Hsp70 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A: Die HT-29 Zellen wiesen zu den untersuchten Zeitpunkten keine relevanten Unterschiede der Proteinexpression auf. B: Hsp70 war in den unter Hyperthermie behandelten SW480 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h erhöht, wobei die zusätzliche 5-FU-Behandlung die Proteinexpression steigerte. C: In den SW620 Zellen war Hsp70 nach 72 h in den unter 43°C mit und ohne 5-FU behandelten Zellen erhöht. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin. Zur besseren Darstellung wurden die Western Blots bearbeitet.

5.3 Hsp90

5.3.1 Genexpression von Hsp90

5.3.1.1 Hsp90 α class A member 1

1. In HT-29 Zellen

Die Genexpression von Hsp90 α class A member 1 zeigte sich nach 30 min und Hyperthermie ohne 5-FU-Behandlung in den HT-29 Tumorzellen 1,9-fach bei 41°C bzw. 1,6-fach bei 43°C erhöht (jeweils $p < 0,0001$) (siehe Abb. 16A). Die Zellen, die Hyperthermie und zusätzlich 5-FU ausgesetzt waren, wiesen sogar eine auf das 2,8-Fache bei 41°C bzw. 3,6-Fache bei 43°C hoch signifikant erhöhte Genexpression auf (jeweils $p < 0,0001$). In den unter 37°C und 5-FU behandelten Zellen war die Genexpression auf das 0,7-Fache im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt ($p < 0,0001$). 24 h bis 72 h nach der Behandlung wiesen alle Zellen ohne 5-FU-Behandlung keine relevanten Genexpressionsunterschiede mehr auf. In allen mit 5-FU behandelten Tumorzellen zeigten sich nach 24 h bis 72 h dagegen zwischen 1,5-fach und 5,1-fach hoch signifikant erhöhte Genexpressionen (jeweils $p < 0,0001$), die tendenziell im Zeitverlauf zunahmen.

2. In SW480 Zellen

Nach 30 min war Hsp90 α class A member 1 in den unter Hyperthermie ohne 5-FU behandelten SW480 Zellen 1,4-fach bei 41°C bzw. 3,0-fach bei 43°C erhöht (jeweils $p > 0,05$). Nach 24 h bis 72 h zeigten sich keine relevanten Veränderungen der Genexpression durch Hyperthermie mehr (siehe Abb. 16B). Alle mit 5-FU behandelten Zellen wiesen zu den untersuchten Zeitpunkten eine 1,8-fach bis 4,6-fach gesteigerte Genexpression auf ($p > 0,05$ nach 30 min, 37°C und 5-FU, ansonsten jeweils $p < 0,05$).

3. In SW620 Zellen

Nach einer Regenerationszeit von 30 min war die Genexpression in den unter 43°C behandelten SW620 Tumorzellen 2,1-fach ohne 5-FU bzw. 2,3-fach mit 5-FU erhöht (jeweils $p < 0,001$). Sonst zeigten sich nach 30 min keine wesentlichen Unterschiede der Genexpression (siehe Abb. 16C). Nach 24 h wiesen alle Zellen keine relevanten Genexpressionsunterschiede auf. In den Zellen ohne 5-FU-Behandlung war die Genexpression von Hsp90 α class A

member 1 auch nach 48 h und 72 h nicht bedeutend verändert. Die 5-FU ausgesetzten Zellen wiesen 48 h und 72 h nach der Behandlung eine zwischen 2,0-fach und 2,3-fach erhöhte Genexpression auf (jeweils $p < 0,0001$).

Hsp90 α class A member 1

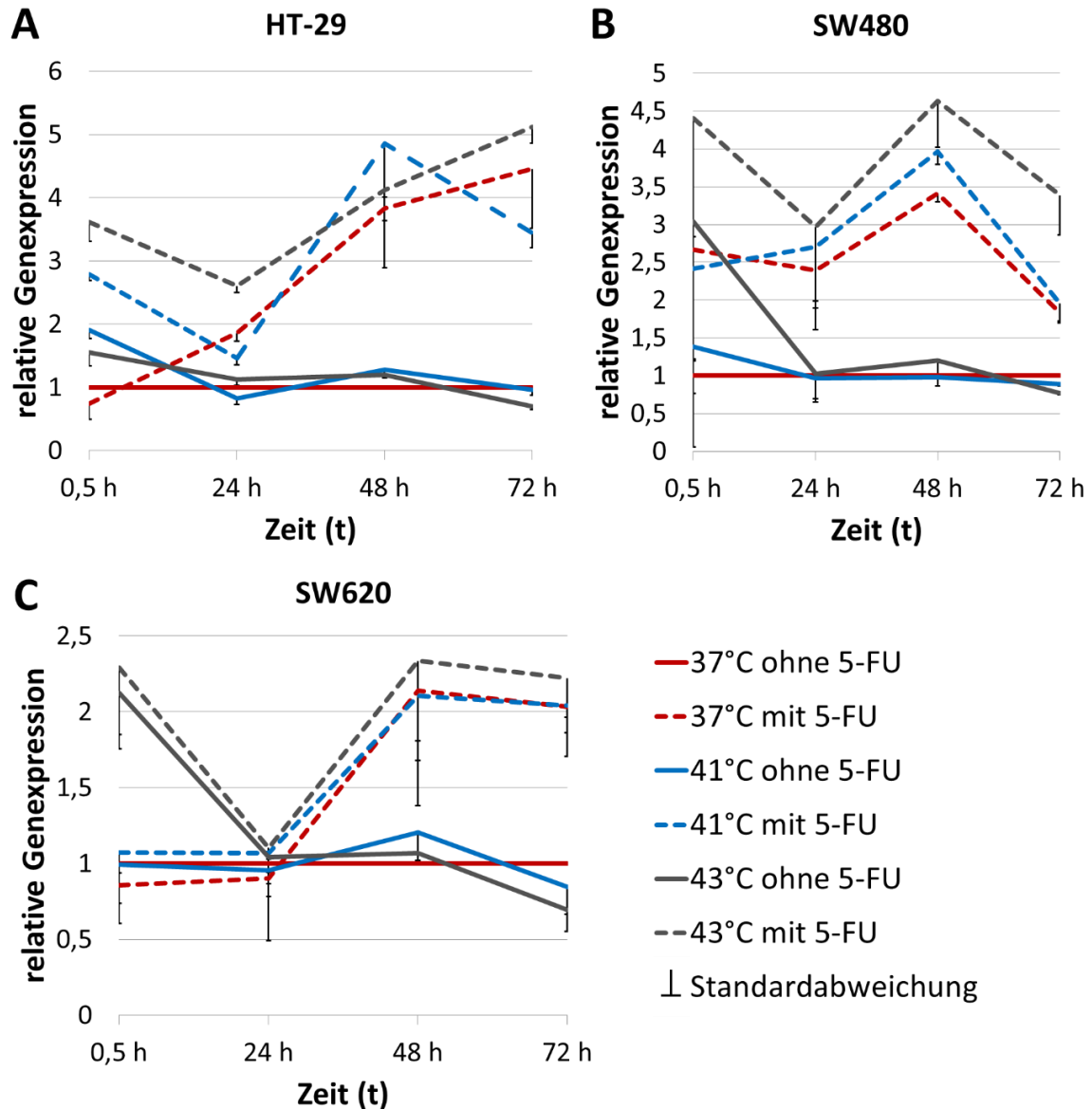


Abb. 16: Relative Genexpression von Hsp90 α class A member 1 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A-C: Nach 30 min zeigte sich meist eine durch Hyperthermie erhöhte Genexpression, die durch zusätzliche 5-FU-Behandlung nochmals verstärkt wurde. Nach 72 h war Hsp90 α class A member 1 in allen mit 5-FU behandelten Zellen signifikant erhöht. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.3.1.2 Hsp90 α class A member 2

1. In HT-29 Zellen

Die Genexpression von Hsp90 α class A member 2 war nach einer 30-minütigen Regenerationszeit in den unter Hyperthermie ohne 5-FU behandelten HT-29 Zellen hoch signifikant 1,8-fach bei 41°C bzw. 2,1-fach bei 43°C erhöht (jeweils $p < 0,0001$). Die Behandlung unter Hyperthermie mit 5-FU bewirkte sogar eine auf das 2,7-Fache bei 41°C bzw. 5,0-Fache bei 43°C gesteigerte Genexpression (jeweils $p < 0,0001$) (siehe Abb. 17A). Zwischen 24 h und 72 h nach der Behandlung zeigten sich in den ohne 5-FU behandelten Tumorzellen keine wesentlichen Unterschiede der Genexpression. In allen mit 5-FU behandelten Zellen war Hsp90 α class A member 2 nach 24 h bis 72 h hoch signifikant 1,4-fach bis 6,2-fach erhöht (jeweils $p < 0,0001$).

2. In SW480 Zellen

Nach 30 min war die Genexpression in den unter Hyperthermie ohne und mit 5-FU behandelten SW480 Zellen hoch signifikant 1,6-fach bis 5,5-fach erhöht (jeweils $p < 0,001$) (siehe Abb. 17B). Dabei war die Genexpression mit steigender Temperaturstufe höher. Die Zellen ohne 5-FU-Behandlung wiesen nach 24 h bis 72 h keine wesentlichen Unterschiede der Genexpression mehr auf, während die Genexpression in den mit 5-FU behandelten Zellen nach 24 h bis 72 h 1,9-fach bis 6,0-fach erhöht war (jeweils $p < 0,0001$).

3. In SW620 Zellen

Nach einer Regenerationszeit von 30 min war die Genexpression in den unter 43°C ohne 5-FU behandelten SW620 Tumorzellen 1,9-fach und in den unter 43°C mit 5-FU behandelten Zellen 6,7-fach erhöht (jeweils $p < 0,05$) (siehe Abb. 17C). Nach 24 h zeigten sich in allen Tumorzellen keine relevanten Genexpressionsunterschiede. Die Zellen ohne 5-FU-Behandlung wiesen auch nach 48 h und 72 h keine bedeutenden Unterschiede der Genexpression auf. Die mit 5-FU behandelten Zellen zeigten nach 48 h und 72 h jedoch eine hoch signifikante 2,0-fach bis 3,2-fach erhöhte Genexpression (jeweils $p < 0,0001$).

Hsp90 α class A member 2

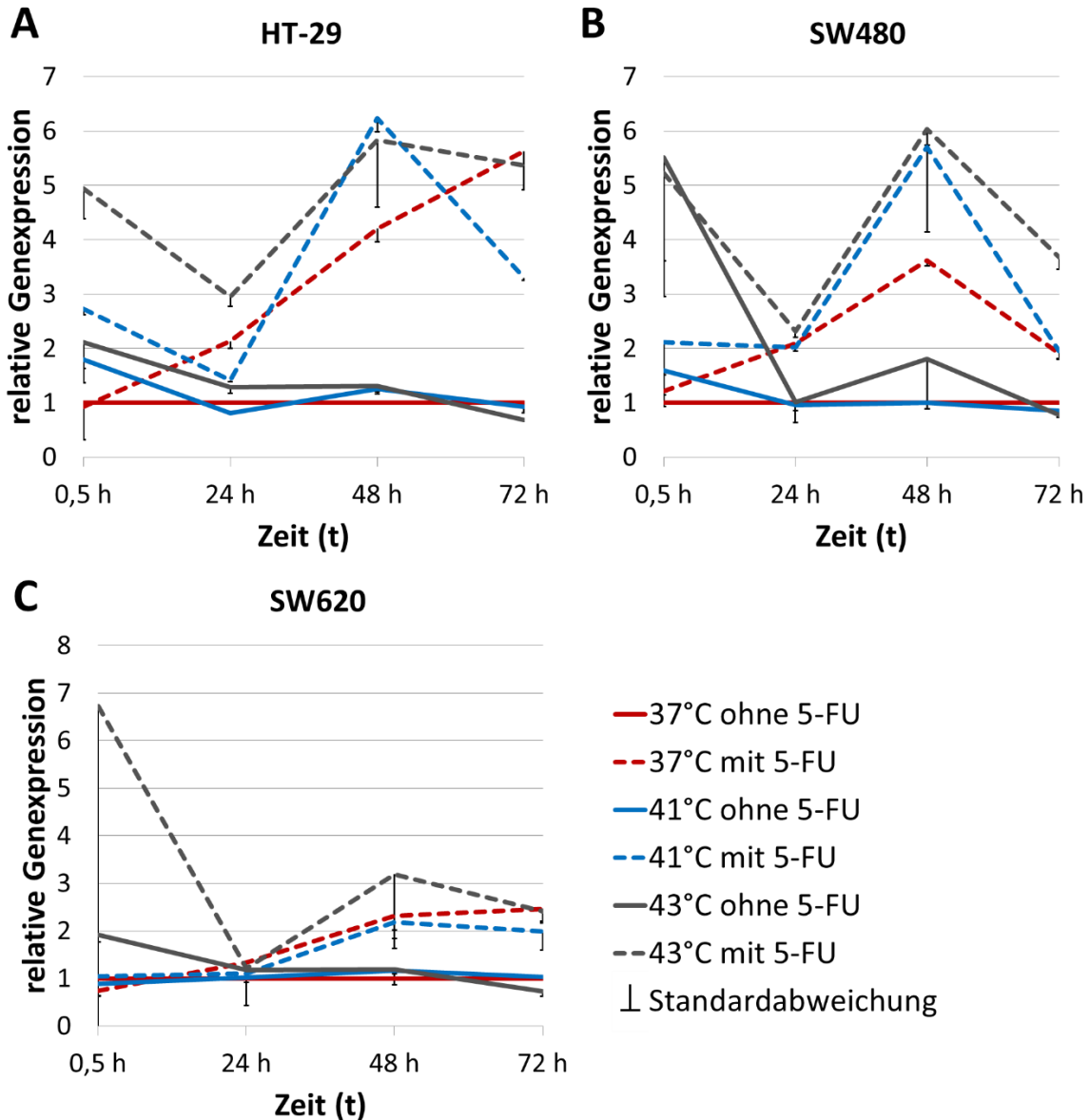


Abb. 17: Relative Genexpression von Hsp90 α class A member 2 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A-C: Nach 30 min zeigte sich tendenziell eine gesteigerte Genexpression in den unter Hyperthermie behandelten Tumorzellen, die mit höherer Temperaturstufe zunahm. Nach einer Regenerationszeit von 72 h war die Genexpression in den mit 5-FU behandelten Tumorzellen hoch signifikant erhöht. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.3.1.3 Hsp90 α class B member 1

1. In HT-29 Zellen

Nach einer 30-minütigen Regenerationszeit wiesen die HT-29 Tumorzellen eine mit steigender Temperaturstufe und Zugabe von 5-FU zunehmende Genexpression auf (siehe Abb. 18A). In den unter Hyperthermie ohne 5-FU behandelten Zellen war Hsp90 α class B member 1 gegenüber der Kontrolle 2,9-fach bei 41°C bzw. 3,3-fach bei 43°C erhöht ($p > 0,05$ bei 41°C ohne 5-FU, $p < 0,05$ bei 43°C ohne 5-FU). In den unter Hyperthermie mit 5-FU behandelten Zellen war die Genexpression sogar 5,7-fach bei 41°C bzw. 10,6-fach bei 43°C gesteigert ($p < 0,05$ bei 41°C und 5-FU, $p > 0,05$ bei 43°C und 5-FU). Im Zeitverlauf zwischen 24 h und 72 h nach der Behandlung zeigten sich keine relevanten Veränderungen durch Hyperthermie oder 5-FU auf die Genexpression.

2. In SW480 Zellen

Die Genexpression war in den SW480 Tumorzellen 30 min nach Behandlung unter 43°C auf das 2,7-Fache ohne 5-FU bzw. das 2,3-Fache mit 5-FU erhöht (jeweils $p < 0,001$) (siehe Abb. 18B). Ansonsten zeigten sich über den untersuchten Zeitraum keine wesentlichen Veränderungen der Genexpression.

3. In SW620 Zellen

Nach 30 min war die Genexpression in den unter 43°C ohne 5-FU behandelten SW620 Zellen gegenüber der Kontrolle 1,4-fach und in den mit 5-FU behandelten Zellen 7,2-fach erhöht (jeweils $p < 0,001$) (siehe Abb. 18C). Zwischen 24 h und 72 h nach der Behandlung war die Genexpression der 5-FU ausgesetzten Zellen tendenziell niedriger als die der Zellen der gleichen Temperaturstufe ohne 5-FU-Behandlung ($p < 0,05$ nach 24 h, 37°C und 5-FU sowie 41°C und 5-FU; $p < 0,0001$ nach 48 h, 43°C und 5-FU; $p < 0,001$ nach 72 h, 37°C und 5-FU sowie 43°C und 5-FU; ansonsten jeweils $p > 0,05$).

Hsp90 α class B member 1

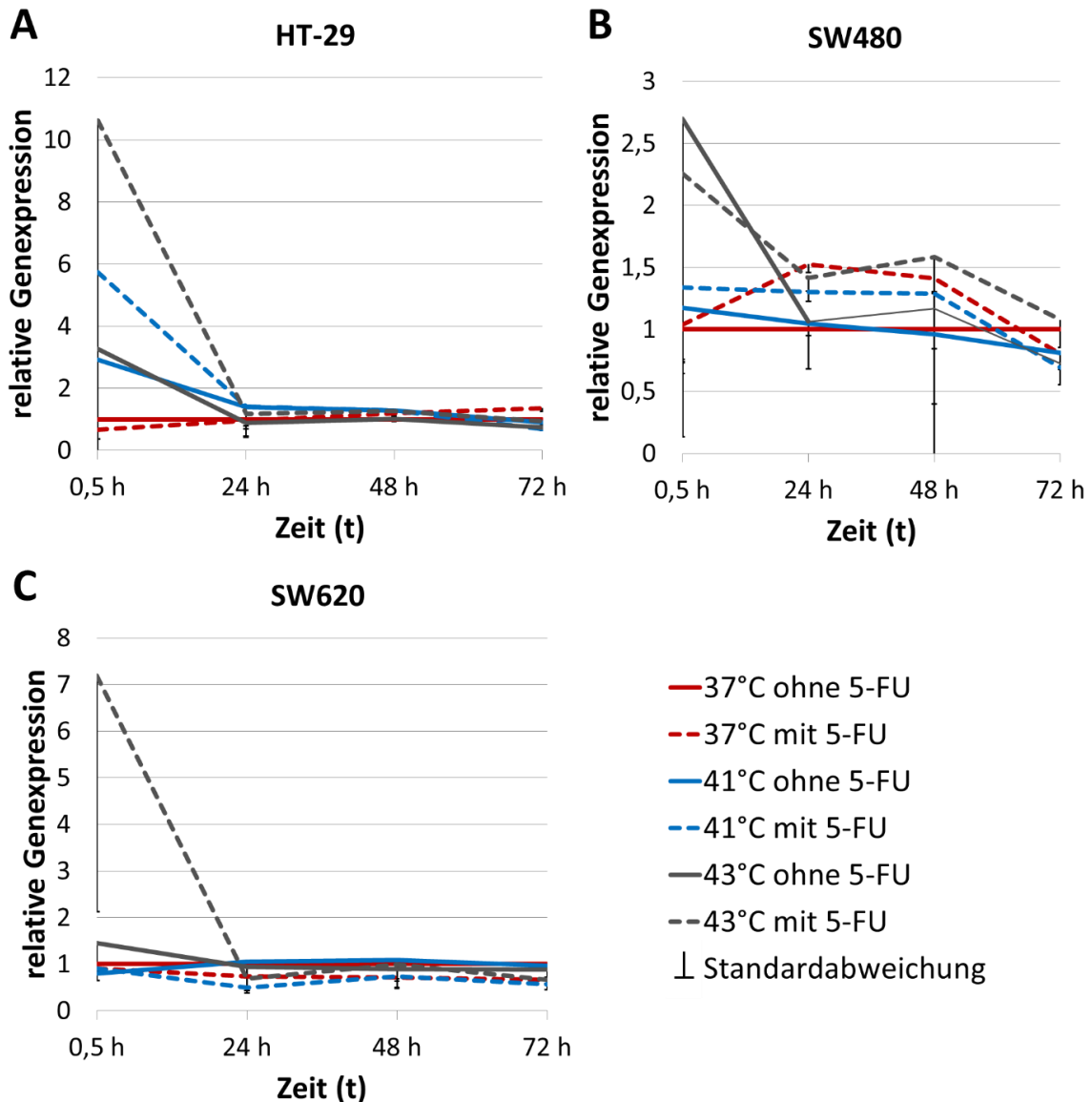


Abb. 18: Relative Genexpression von Hsp90 α class B member 1 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A-C: In allen Zelllinien zeigte sich eine durch 43°C mit und ohne 5-FU erhöhte Genexpression nach 30 min. Im weiteren Zeitverlauf gab es keine wesentlichen Einflüsse durch Hyperthermie und 5-FU. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.3.1.4 Hsp90 β member 1

Aufgrund der unwesentlichen Veränderungen von Hyperthermie und 5-FU auf die Genexpression von Hsp90 β member 1 wird auf die Darstellung dieser Daten verzichtet.

5.3.2 Proteinexpression von Hsp90

1. In HT-29 Zellen

Nach 24 h und 48 h zeigten sich in den HT-29 Kolonkarzinomzellen nur unwesentlich veränderte Proteinexpressionen von Hsp90 durch Behandlung unter Hyperthermie mit und ohne 5-FU (siehe Abb. 19A). 72 h nach der Behandlung war in allen unter Hyperthermie behandelten Zellen eine erhöhte Proteinexpression zu erkennen und die zusätzliche Behandlung mit 5-FU bewirkte gegenüber den Zellen der gleichen Temperaturstufe wiederum eine gesteigerte Proteinexpression von Hsp90.

2. In SW480 Zellen

In den SW480 Tumorzellen war nach 24 h und 48 h in den Western Blots keine relevant veränderte Proteinexpression zu erkennen (siehe Abb. 19B). 72 h nach der Behandlung nahm Hsp90 mit steigender Temperatur zu und in den Tumorzellen, die 5-FU ausgesetzt waren, war die Proteinexpression nach 72 h verglichen mit den Zellen der jeweils gleichen Temperaturstufe erhöht. Generell zeigte sich eine starke Basisexpression von Hsp90 zu den untersuchten Zeitpunkten.

3. In SW620 Zellen

Die Proteinexpression in den SW620 Kolonkarzinomzellen wurde im Zeitverlauf nicht wesentlich durch Hyperthermie oder 5-FU beeinflusst (siehe Abb. 19C).

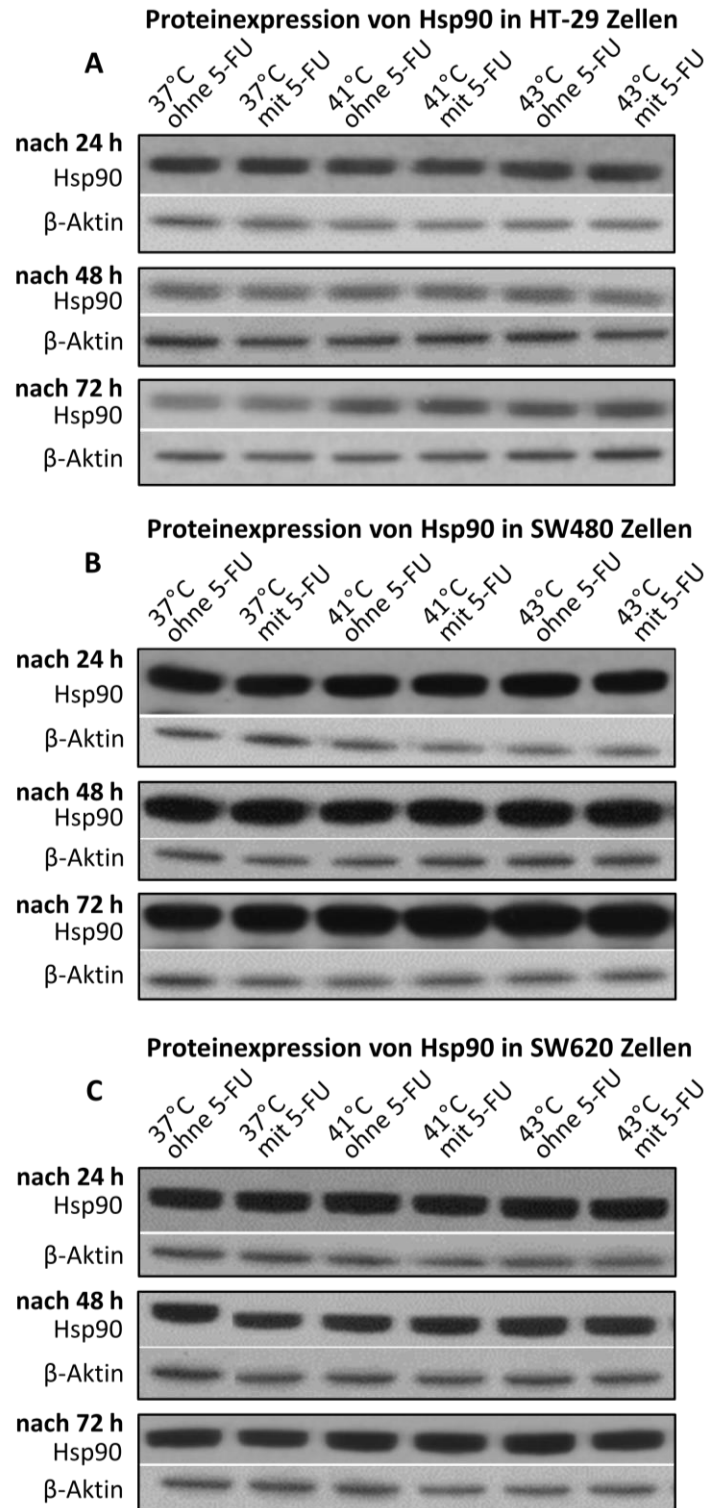


Abb. 19: Western Blots der Proteinexpression von Hsp90 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A, B: In den HT-29 und SW480 Tumorzellen nahm die Proteinexpression von Hsp90 nach 72 h mit steigender Temperatur und Zugabe von 5-FU zu. C: In den SW620 Zellen zeigten sich nur unwesentlich veränderte Proteinexpressionen. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin. Zur besseren Darstellung wurden die Western Blots bearbeitet.

5.4 Ki-67

5.4.1 Genexpression von Ki-67

1. In HT-29 Zellen

Nach einer Regenerationszeit von 30 min war die Genexpression von Ki-67 in allen behandelten HT-29 Tumorzellen im Vergleich zur Kontrolle bei 37°C ohne 5-FU 1,2-fach bis 1,5-fach erniedrigt (jeweils $p < 0,05$) (siehe Abb. 20A). Nach 24 h fand sich eine nicht wesentlich (zwischen 0,7- und 1,3-fach) veränderte Genexpression. Die Zellen unter Hyperthermie ohne 5-FU zeigten nach 48 h keine relevanten Genexpressionsunterschiede und nach 72 h einen Genexpressionsanstieg bis auf das 2,1-Fache bei 41°C bzw. das 1,6-Fache bei 43°C (jeweils $p < 0,05$). Die Zellen, die 5-FU ausgesetzt waren, wiesen nach 48 h eine bis zu 4,5-fach und nach 72 h sogar eine bis zu 11,8-fach hoch signifikant erhöhte Genexpression auf (jeweils $p < 0,001$).

2. In SW480 Zellen

In den SW480 Kolonkarzinomzellen zeigten sich nach 30 min und 24 h keine wesentlichen Einflüsse von Hyperthermie und 5-FU auf die Genexpression von Ki-67 (siehe Abb. 20B). In den mit 5-FU behandelten Zellen war Ki-67 nach 48 h bis zu 2,1-fach erhöht (jeweils $p < 0,0001$); Zellen, die Hyperthermie ohne 5-FU ausgesetzt waren, wiesen keine wesentlich veränderte Genexpression auf. Nach 72 h war keine relevante Veränderung durch Hyperthermie oder 5-FU auf die Genexpression zu erkennen.

3. In SW620 Zellen

30 min und 24 h nach der Behandlung war die Genexpression von Ki-67 in den SW620 Tumorzellen im Vergleich zur Kontrolle nur unwesentlich verändert (siehe Abb. 20C). In den mit 5-FU behandelten Tumorzellen war die Genexpression nach 48 h bis 4,0-fach und nach 72 h bis 6,7-fach hoch signifikant erhöht (jeweils $p < 0,0001$). Unter Hyperthermie ohne 5-FU blieb die Genexpression von Ki-67 dagegen unwesentlich verändert.

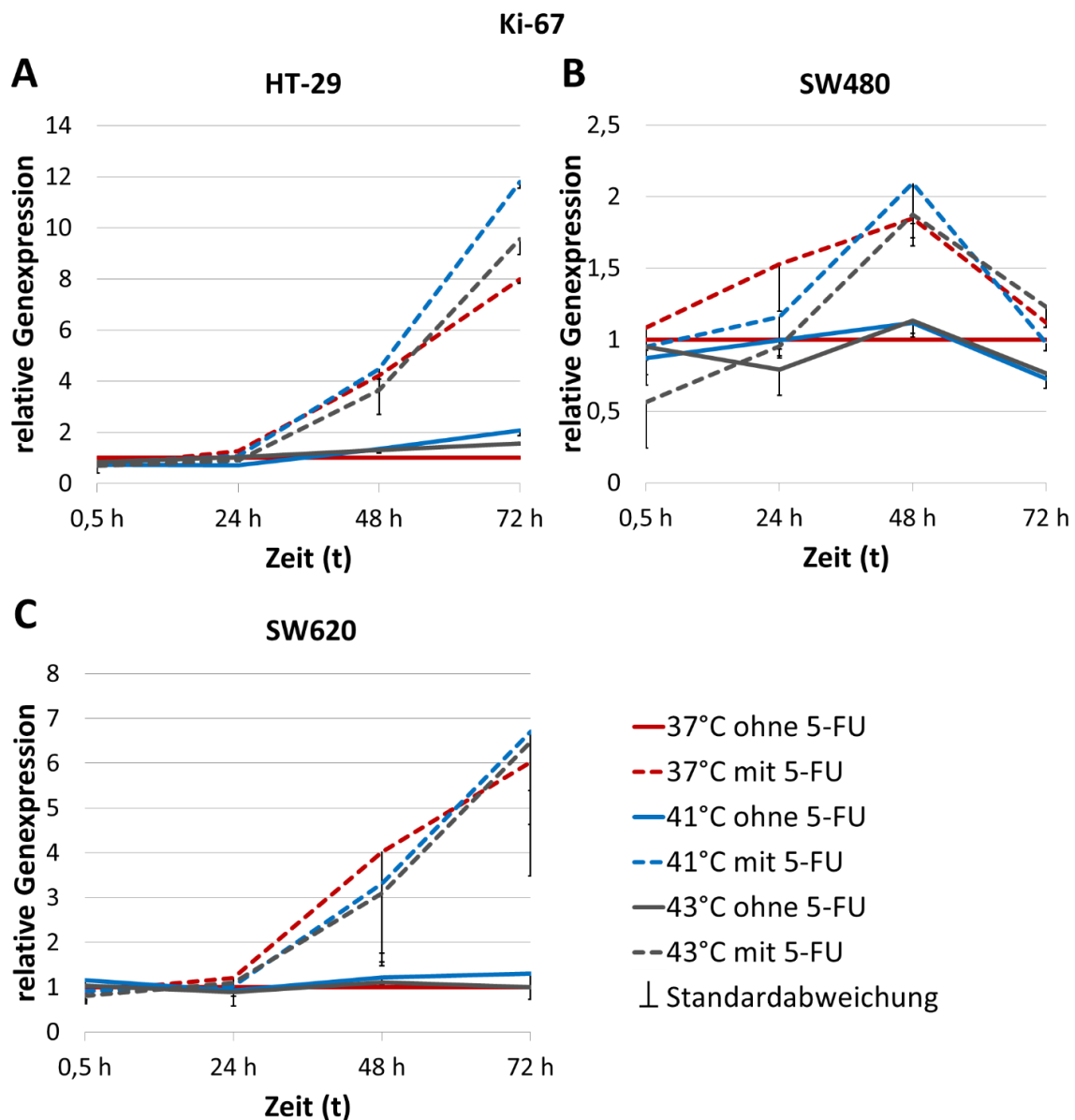


Abb. 20: Relative Genexpression von Ki-67 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A, C: In allen mit 5-FU behandelten HT-29 und SW620 Tumorzellen war Ki-67 nach 48 h bis 4,5-fach und nach 72 h bis 11,8-fach hoch signifikant erhöht. B: Die mit 5-FU behandelten SW480 Zellen wiesen nach 48 h eine erhöhte Genexpression auf; sonst zeigten sich hier nur unwesentliche Veränderungen der Genexpression. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.4.2 Proteinexpression von Ki-67

1. In HT-29 Zellen

Nach 24 h und 48 h war die Proteinexpression von Ki-67 in den HT-29 Tumorzellen, die Hyperthermie ohne und mit 5-FU ausgesetzt waren, gegenüber der Kontrolle erniedrigt (siehe Abb. 21A). Nach 48 h und 72 h zeigte sich eine erhöhte Proteinexpression in den Zellen, die 5-FU ausgesetzt waren, im Gegensatz zu den Zellen ohne 5-FU-Behandlung der gleichen Temperaturstufe.

2. In SW480 Zellen

Nach 24 h wiesen alle SW480 Kolonkarzinomzellen keine relevanten Unterschiede der Proteinexpression auf (siehe Abb. 21B). Nach 48 h und 72 h war die Proteinexpression der mit 5-FU behandelten Zellen gegenüber denen ohne 5-FU-Behandlung erhöht. Nach 72 h war die Proteinexpression von Ki-67 in den Hyperthermie ausgesetzten Zellen erniedrigt.

3. In SW620 Zellen

Im Western Blot war Ki-67 in allen unter Hyperthermie mit und ohne 5-FU behandelten SW620 Tumorzellen nach 24 h erniedrigt (siehe Abb. 21C). Nach 48 h und 72 h war die Proteinexpression in den mit 5-FU behandelten Tumorzellen jeweils höher als in den Zellen ohne 5-FU-Behandlung der gleichen Temperaturstufe.

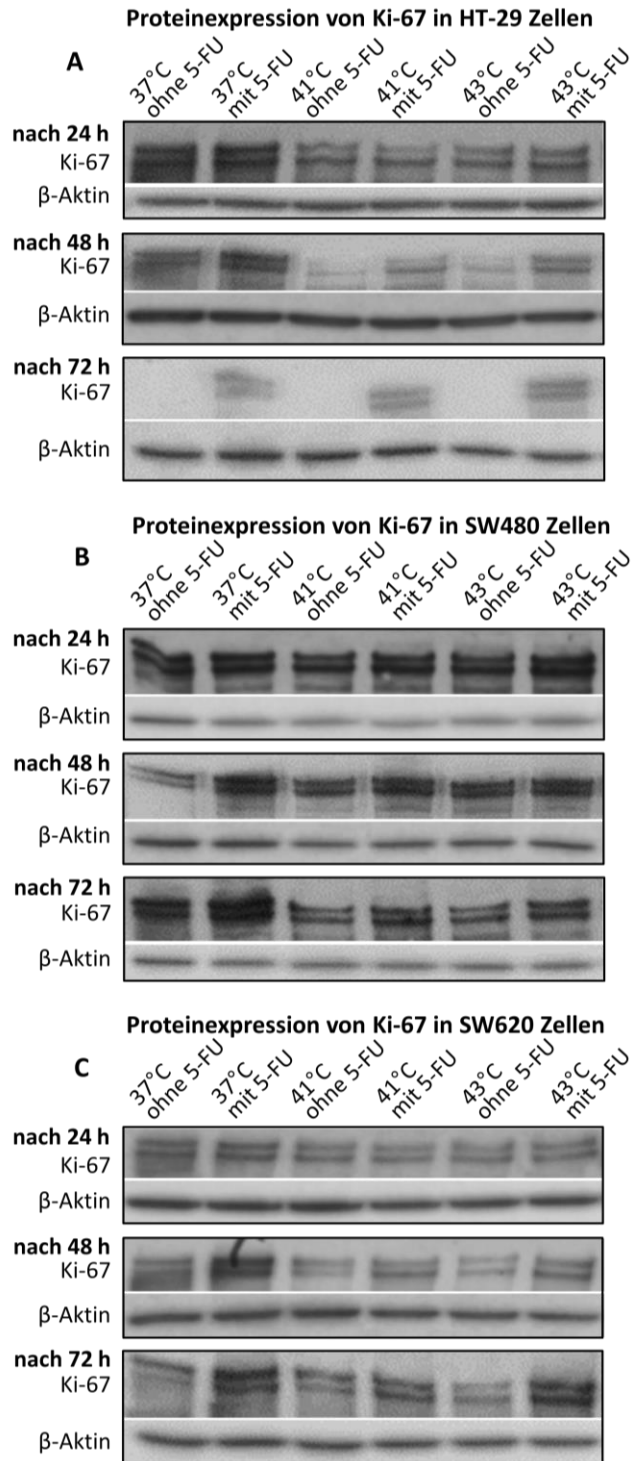


Abb. 21: Western Blots der Proteinexpression von Ki-67 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A, C: Nach 24 h zeigte sich in allen hypertherm behandelten HT-29 und SW620 Tumorzellen eine verminderte Proteinexpression. A-C: Nach 72 h war Ki-67 in allen mit 5-FU behandelten Zellen gegenüber den Zellen ohne 5-FU-Behandlung der gleichen Temperaturstufe erhöht. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin. Zur besseren Darstellung wurden die Western Blots bearbeitet.

5.5 PCNA

5.5.1 Genexpression von PCNA

1. In HT-29 Zellen

Nach 30 min war die Genexpression von PCNA in den HT-29 Tumorzellen nach Behandlung unter Hyperthermie ohne 5-FU signifikant 4,3-fach bei 41°C bzw. 4,9-fach bei 43°C erhöht (jeweils $p < 0,05$) (siehe Abb. 22A). Tumorzellen, die Hyperthermie mit 5-FU ausgesetzt waren, zeigten eine gesteigerte Genexpression sogar auf das 8,4-Fache bei 41°C bzw. das 14,0-Fache bei 43°C ($p < 0,05$ bei 41°C und 5-FU; $p > 0,05$ bei 43°C und 5-FU). Nach 24 h waren in allen Zellen keine relevanten Unterschiede der Genexpression erkennbar. Nach einer Regenerationszeit von 48 h und 72 h waren in den Zellen ohne 5-FU-Behandlung keine wesentlichen Unterschiede der Genexpression von PCNA zu sehen. Die mit 5-FU behandelten Tumorzellen wiesen nach 48 h und 72 h eine 2,5-fach bis 4,7-fach gesteigerte Genexpression auf, die im Zeitverlauf zunahm ($p > 0,05$ nach 48 h, 41°C und 5-FU, ansonsten jeweils $p < 0,05$).

2. In SW480 Zellen

In allen unter Hyperthermie mit und ohne 5-FU behandelten SW480 Kolonkarzinomzellen zeigte sich nach 30 min eine mit höherer Temperaturstufe zunehmende Genexpression von PCNA zwischen 5,3-fach und 35,2-fach (jeweils $p < 0,05$) (siehe Abb. 22B). Nach einer Regenerationszeit von 24 h war die Genexpression in allen Zellen nur unwesentlich verändert. In den mit 5-FU behandelten Zellen war PCNA nach 48 h und 72 h 1,7-fach bis 2,7-fach erhöht ($p > 0,05$ nach 48 h, 41°C und 5-FU, ansonsten jeweils $p < 0,05$). Die Zellen ohne 5-FU-Behandlung zeigten nach 48 h und 72 h keine relevanten Unterschiede der Genexpression.

3. In SW620 Zellen

Nach einer 30-minütigen Regenerationszeit fanden sich keine wesentlichen Unterschiede der Genexpression in den SW620 Tumorzellen (siehe Abb. 22C). Nur in den Zellen, die mit 5-FU behandelt wurden, stieg PCNA im weiteren Zeitverlauf bis 72 h immer weiter an: Nach 24 h war PCNA bis 1,5-fach erhöht

($p > 0,05$ bei 37°C und 5-FU, ansonsten jeweils $p < 0,001$), nach 48 h bis 2,4-fach (jeweils $p < 0,05$) und nach 72 h bis auf das 3,1-Fache (jeweils $p < 0,001$).

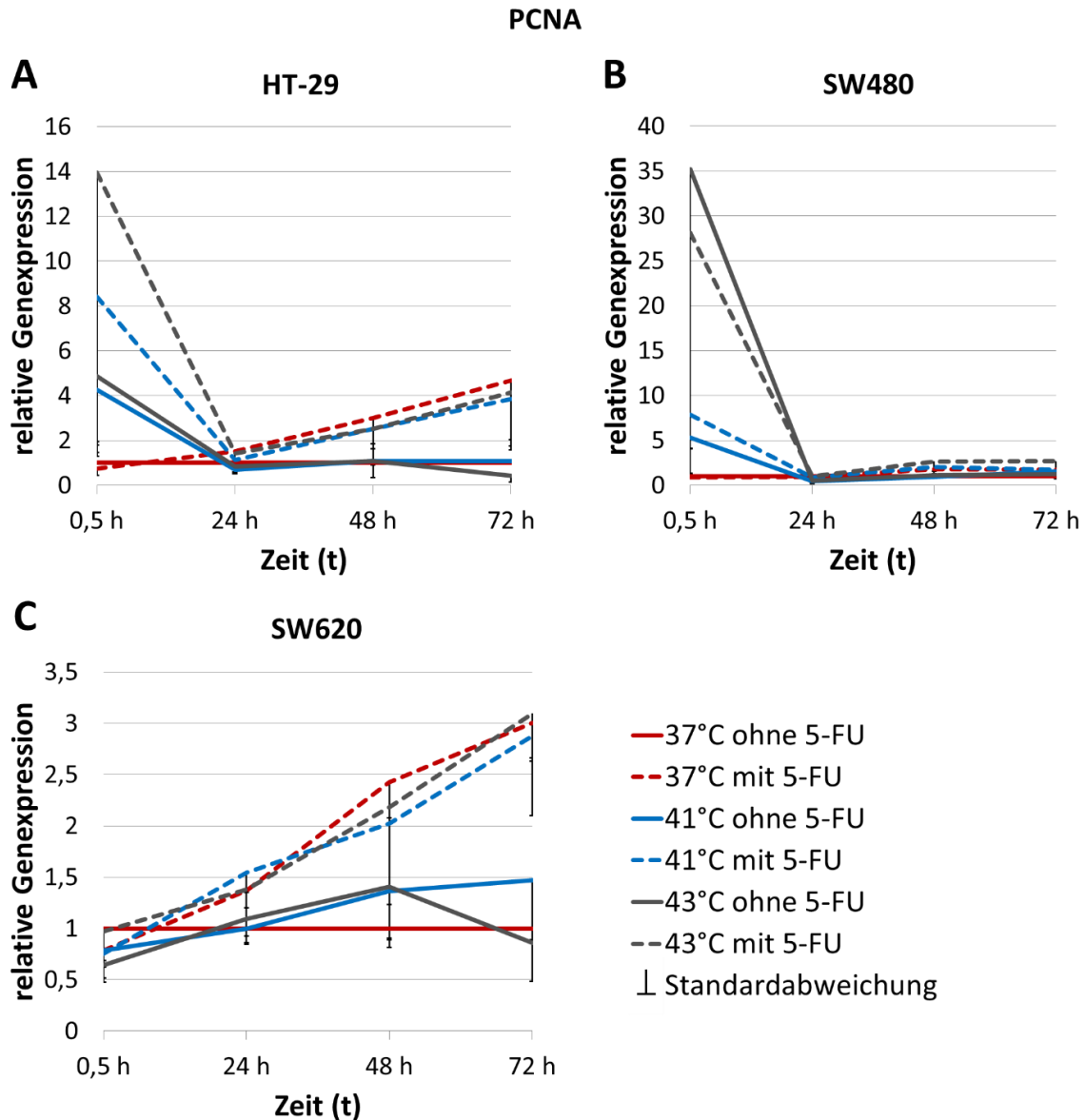


Abb. 22: Relative Genexpression von PCNA in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A, B: Nach 30 min war PCNA in den HT-29 und SW480 Zellen mit steigender Temperatur erhöht. A-C: Nach Regenerationszeiten von 24 h, 48 h und 72 h war PCNA in allen mit 5-FU behandelten Zellen mit voranschreitender Zeit zunehmend erhöht. Die Genexpression wurde auf das konstitutive Gen β -Aktin normalisiert. Als Kontrolle der relativen Genexpression dienten Zellen, die bei 37°C gehalten wurden und 5-FU nicht ausgesetzt waren. Die relative Genexpression wurde durch $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben.

5.5.2 Proteinexpression von PCNA

1. In HT-29 Zellen

Nach 24 h zeigte sich eine Erhöhung der Proteinexpression in den HT-29 Zellen, die unter 43°C und 5-FU behandelt wurden (siehe Abb. 23A). Nach 48 h und 72 h wiesen alle Zellen, die 5-FU ausgesetzt waren im Vergleich zur Referenz eine erhöhte Proteinexpression auf.

2. In SW480 Zellen

Zu allen untersuchten Zeitpunkten wurden in den SW480 Tumorzellen keine wesentlichen Unterschiede der Proteinexpression beobachtet (siehe Abb. 23B).

3. In SW620 Zellen

Nach 24 h war die Proteinexpression in allen mit 5-FU behandelten SW620 Tumorzellen erhöht (siehe Abb. 23C). 48 h nach der Behandlung zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede der Proteinexpression. Nach 72 h war die Expression in den Tumorzellen, die 43°C ausgesetzt waren, erhöht.

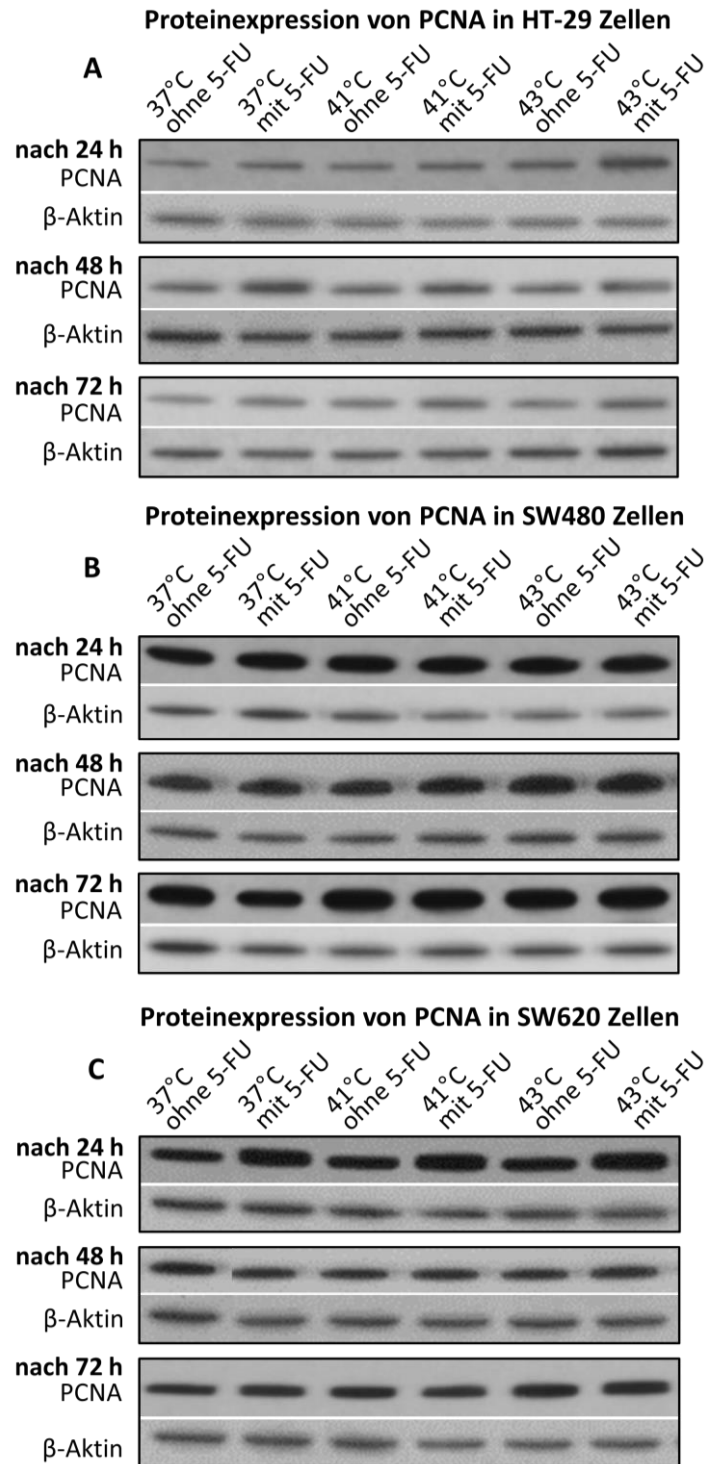


Abb. 23: Western Blots der Proteinexpression von PCNA in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU

A: Die mit 5-FU behandelten HT-29 Zellen wiesen nach 48 h und 72 h eine erhöhte Proteinexpression von PCNA auf. B: Die SW480 Zellen zeigten keine relevanten Unterschiede der Proteinexpression. C: In den mit 5-FU behandelten SW620 Zellen war PCNA nach 24 h erhöht. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin. Zur besseren Darstellung wurden die Western Blots bearbeitet.

6 Beantwortung der Fragestellung

1. Welche Effekte haben eine Hyperthermie mit und ohne 5-Fluoruracil auf die Expression von Hitzeschockproteinen? Wie entwickelt sich die Expression der Reparaturproteine im Zeitverlauf nach einer hyperthermen Chemoperfusion? Wie unterscheiden sich diese Effekte in Abhängigkeit verschiedener humaner Kolonkarzinome?

Alleinige Hyperthermie über 60 min wie bei der klinischen Anwendung der HIPEC führte *in vitro* in allen drei untersuchten humanen Kolonkarzinomen zu einer deutlichen Genexpression von Hsp27, Hsp70 und Hsp90, die sich nach 30 min nachweisen ließ und nach 24 h wieder auf dem ursprünglichen Niveau war. In Folge der verstärkten Genexpression fand sich mittels Western Blot für Hsp27, Hsp70 und Hsp90 eine ebenso deutlich gesteigerte Proteinexpression. Diese war selbst am letzten Untersuchungszeitpunkt, drei Tage nach der Hyperthermie, noch für alle drei HSPs nachweisbar.

Um zu unterscheiden, inwieweit die Expression der HSPs auf die alleinige Hyperthermie-Behandlung zurückzuführen ist respektive welchen Einfluss 5-FU auf die Expression von HSPs hat, wurden die Versuche sowohl unter alleiniger Hyperthermie als auch in Kombination mit dem Chemotherapeutikum 5-FU durchgeführt. Nach zusätzlicher Behandlung mit 5-FU in einer den klinischen Dosierungen adaptierten Konzentration zeigte sich eine erhöhte Expression von Hsp27, Hsp70 und Hsp90 in allen drei untersuchten humanen Kolonkarzinomen. Diese war im Vergleich zu den mit alleiniger Hyperthermie behandelten Kolonkarzinomen nach 30 min im Mittel um das 2,0-Fache signifikant gesteigert. Auch nach drei Tagen ließ sich noch eine deutlich gesteigerte Expression nachweisen, die im Durchschnitt drei- bis viermal höher im Vergleich zu den nur mit Hyperthermie behandelten Kolonkarzinomen war. Insgesamt fanden sich in den verschiedenen Kolonkarzinomzellen vergleichbare Expressionen.

2. Welche Auswirkungen haben eine Hyperthermie mit und ohne 5-Fluoruracil auf die Expression der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA?

Nach der Behandlung mit 5-FU fand sich eine signifikant erhöhte Genexpression von Ki-67 in zwei der drei untersuchten Kolonkarzinome, insbesondere zum letzten untersuchten Zeitpunkt nach drei Tagen (durchschnittlich 8,1-fach erhöht). Passend dazu zeigte sich eine deutlich erhöhte Proteinexpression von Ki-67, die sich zwei und drei Tage nach der Behandlung entsprechend den Bedingungen der klinischen HIPEC nachweisen ließ. PCNA zeigte sich ebenfalls in der Mehrzahl der Kolonkarzinome nach 5-FU-Behandlung signifikant erhöht. Eine verstärkte Genexpression von PCNA fand sich auch 30 min nach alleiniger Hyperthermie. Im Gegensatz dazu war Ki-67 nach alleiniger Hyperthermie-Behandlung über eine Stunde in den Kolonkarzinomen nicht signifikant verändert.

3. Gibt es Unterschiede des Einflusses einer Hyperthermie von 41°C gegenüber 43°C auf die Expression der Hitzeschockproteine und die weitere Zellproliferation in den Kolonkarzinomen?

Insbesondere 30 min nach der Behandlung unter 43°C waren die Expressionen der HSPs und die des Proliferationsmarkers PCNA in den untersuchten Kolonkarzinomen stark erhöht (durchschnittlich um das 8,3-Fache gegenüber dem 5,2-Fachen nach 41°C). Auch auf Proteinebene waren die HSPs und PCNA in den mit 43°C gegenüber 41°C behandelten Kolonkarzinomen tendenziell erhöht. Der Effekt war jedoch weniger deutlich ausgeprägt als auf Genebene. Es fand sich kein einheitlicher temperaturabhängiger Effekt auf die Expression von Ki-67.

Die hochregulierten HSPs und der verstärkt exprimierte Proliferationsmarker PCNA insbesondere unter Temperaturen über 41°C weisen damit auf unerwünschte Effekte bei der hyperthermen Chemoperfusion unter diesen hohen Temperaturen hin. Diese könnten sich negativ auf den Erfolg der HIPEC auswirken, indem sie Reparaturvorgänge der überlebenden Tumorzellen fördern.

4. In welchem Zusammenhang stehen die Ergebnisse mit dem gegenwärtigen klinischen Vorgehen?

Die hypertherme Chemoperfusion zusammen mit einer zytoreduktiven chirurgischen Therapie wird heutzutage bei ausgesuchten Patienten mit

limitierter Peritonealkarzinose eingesetzt, um so zum einen eine überaus wichtige Tumorfreiheit zurückzugewinnen und zum anderen eine verbesserte mittelfristige Überlebenschance für die Patienten zu erreichen. Hierzu gibt es ermutigende klinische Ergebnisse.

Die sämtlich erhöht exprimierten Hitzeschockproteine sowie die verstärkt nachweisbaren Proliferationsmarker PCNA und Ki-67 nach einer hyperthermen Chemotherapie im hier untersuchten *in vitro*-Modell weisen erstmals darauf hin, dass im Rahmen der HIPEC nicht nur positive, sondern auch negative Effekte induziert werden können. Diese beschränken je nach Temperatureinstellung durch hochregulierte intrazelluläre Mechanismen vermutlich den günstigen Einfluss der hyperthermen Chemoperfusion. Um die Therapieeffekte der HIPEC weiter zu verbessern, wären somit die Effekte einer HSP-Inhibition durch bereits verfügbare HSP-Inhibitoren zu überprüfen. Hochregulierte HSP-vermittelte Reparaturvorgänge in den Tumorzellen zum Zeitpunkt der HIPEC würden darunter potenziell unterdrückt und die Apoptose der Tumorzellen im Gegenzug weiter gefördert werden. Dies könnte sich positiv auf die Prognose der Patienten auswirken.

Die typisch eingesetzten Temperaturen während der HIPEC liegen zwischen 39°C und 43°C. Die hier gezeigten Ergebnisse weisen erstmals darauf hin, dass sich insbesondere Temperaturen über 41°C durchaus negativ auf die gewünschten HIPEC-Effekte auswirken können. Deutlich hochregulierte HSPs und verstärkt induzierte Proliferationsvorgänge bzw. antiapoptische Signaleffekte bei zunehmenden Temperaturen sorgen in einigen wenigen Tumorzellen vermutlich für deren Überleben und eine verstärkte Resistenz dieser Tumorzellen. Damit wäre unter diesen hohen Temperaturen einem Tumorrezidiv aus überlebenden und vermutlich resistenteren Tumorzellen Vorschub geleistet.

7 Diskussion

Die kombinierte Therapie von HIPEC mit einer zytoreduktiven chirurgischen Behandlung stellt bei ausgewählten Patienten mit limitierter Peritonealkarzinose eine vielversprechende Therapie dar. Hierdurch wurde etwa bei Patienten mit einer Peritonealkarzinose, die vom kolorektalen Karzinom ausging, eine für sie verbesserte mittelfristige Überlebenschance erreicht [23]. Bei der HIPEC wird eine Hyperthermie mit einer lokalen hochdosierten Chemotherapie kombiniert. HSPs spielen dabei vermutlich eine bedeutende Rolle. Sie werden durch physikalische und chemische Stressfaktoren wie hier die Hyperthermie und Chemotherapeutika induziert. Proliferative Effekte, die während einer hyperthermen Chemotherapie induziert werden könnten, sind bislang kaum erforscht. Im hier verwendeten *in vitro*-HIPEC-Modell wurde daher der Einfluss einer hyperthermen Chemotherapie entsprechend den klinischen Bedingungen der HIPEC auf die Expressionsprofile von HSPs und Proliferationsmarkern in Kolonkarzinomen untersucht.

7.1 Effekte von Hyperthermie und Chemotherapie auf die HSP-Expression im Kolonkarzinom

Sowohl direkt nach der alleinigen Behandlung mit Hyperthermie als auch in Kombination mit einer Chemotherapie über eine Stunde wurde eine deutliche Genexpression der untersuchten HSPs Hsp27, Hsp70 und Hsp90 in allen untersuchten Kolonkarzinomen nachgewiesen. Auch die zugehörigen Proteine wurden nachfolgend verstärkt synthetisiert und exprimiert. Im Vergleich zur alleinigen Hyperthermie-Behandlung bewirkte die Kombination mit dem Chemotherapeutikum eine höhere Genexpression.

Unter der Annahme, dass diese Effekte ebenso bei einer klinisch durchgeführten HIPEC-Therapie auftreten, würde dies bedeuten, dass durch die Hochregulierung von Hsp27, Hsp70 und Hsp90 zeitlich über die HIPEC hinaus andauernde Schutz- und Reparaturvorgänge in den überlebenden Tumorzellen induziert werden könnten. Diese trügen dazu bei, dass einige Tumorzellen den zellulären Stress durch die Hyperthermie und Chemotherapeutika überleben.

Die Reparaturvorgänge und antiapoptotischen Wirkungen durch die induzierten HSPs werden diesen Ergebnissen nach im Vergleich zur Behandlung mit alleiniger Hyperthermie durch die Chemotherapie nochmals verstärkt. Somit werden die zytotoxischen Effekte der hyperthermen Chemotherapie durch hochregulierte intrazelluläre Mechanismen negativ beeinflusst. Das ließe schlussfolgern, dass sich hochregulierte HSPs in einigen wenigen überlebenden Tumorzellen nach einer HIPEC beschränkend auf den Erfolg der Therapie und somit auf die Prognose der Patienten mit Peritonealkarzinose insgesamt auswirken könnten.

7.2 Verringerte Chemosensitivität durch erhöhte HSP-Expression

Mehrere Studien legen nahe, dass eine hohe Expression von HSPs in Tumorzellen außerdem eine geringere Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika bedingt. Gezeigt wurde dieser Zusammenhang in Kolonkarzinomzellen (unter anderem HT-29 und SW480 Zellen), die bei hoher Expression von Hsp27 weniger empfindlich gegenüber 5-FU waren [114]. Auch eine hohe Expression von Hsp70 in Tumorzellen steht im Zusammenhang mit einem verminderten Ansprechen gegenüber einer Chemotherapie [115]. Ebenso geht eine hohe Expression von Hsp90, etwa in Kolonkarzinomen, mit einer Unempfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika wie 5-FU einher [116, 117].

Die in dieser Arbeit gezeigten hochregulierten HSPs bei der HIPEC induzieren folglich nicht nur Reparaturmechanismen, sondern machen Tumorzellen gegenüber den zytotoxischen Effekten einer Chemotherapie auch resistenter. In Bezug auf beide Mechanismen ist daher anzunehmen, dass ein besseres Therapieansprechen durch eine Inhibition der HSPs erreicht werden kann.

7.3 Der Einsatz von HSP-Inhibitoren bei der HIPEC

HSPs sind aufgrund ihrer antiapoptotischen Wirkungsweise bereits eine interessante Zielstruktur in der Krebstherapie geworden. Einige potentielle HSP-Inhibitoren, insbesondere Hsp90-Inhibitoren, wurden schon bei malignen Tumoren getestet.

Die meisten Hsp90-Inhibitoren greifen an der ATP-bindenden Domäne an. So wird verhindert, dass Hsp90 zwischen dem ATP- und ADP-Zustand wechseln kann, wodurch dessen Funktion beeinträchtigt wird [34]. Auch die C-terminale Domäne ist Angriffspunkt von Hsp90-Inhibitoren, etwa von Novobiocin [118].

Einer der ersten identifizierten Hsp90-Inhibitoren war Geldanamycin [119-121]. Inzwischen gibt es einige synthetisch hergestellte Hsp90-Inhibitoren, von denen bis 2013 bereits 17 in klinischen Studien getestet wurden [122]. Für AUY922 wurden synergistische Effekte mit Chemotherapeutika wie 5-FU und Oxaliplatin nachgewiesen [123]. Durch den Einsatz von HDN-1 *in vitro* wurden in Lungenkarzinomzellen Onkoproteine abgebaut, die normalerweise von Hsp90 stabilisiert werden [124]. Ganetespib ist ein Hsp90-Inhibitor, durch dessen Anwendung das Wachstum von Kolonkarzinomen gehemmt wurde [125].

Im klinischen Einsatz wurde der Hsp90-Inhibitor KW-2478 bei 25 Patienten mit Multiplem Myelom oder Non-Hodgkin-Lymphom eingesetzt, die zuvor mindestens zwei Therapieregimes erhalten hatten und darunter kein Ansprechen zeigten oder ein Rezidiv der Erkrankung erlitten. Unter der Therapie zeigten 96 % der Patienten kein Voranschreiten der Erkrankung, wobei acht Patienten mindestens drei Monate und fünf Patienten mindestens sechs Monate kein Voranschreiten der Erkrankung zeigten [126]. Unter der Therapie mit dem Hsp90-Inhibitor AT13387 wurde bei Patienten mit refraktären soliden Tumoren in 34 % der Fälle ein stabiler Zustand der Tumorerkrankung erreicht. Bei 11 % der Patienten hielt dieser stabile Zustand für mindestens 120 Tage an [127].

Allerdings wird durch die Hsp90-Inhibition auch die Expression von Hsp70 induziert. Daher könnte eine zusätzliche Inhibition von Hsp70 vorteilhaft sein [128]. Durch eine Inhibition von sowohl Hsp90 als auch von Hsp70 mit kleinen Molekülen wie VER155008 wurde auch bereits eine verstärkte Zytotoxizität nachgewiesen [129].

Zielstrukturen der Hsp70-Inhibitoren sind die ATPase-Domäne oder die Substrat-bindende Domäne von Hsp70 [130, 131]. Unter der Behandlung mit Hsp70-Inhibitoren wie Apoptozole und ADD70 wurde über ein reduziertes Tumorwachstum berichtet. Zudem stieg die Sensitivität von Chemotherapeutika an [132, 133].

Jedoch ist nicht außer Acht zu lassen, dass bislang wenige Hsp70-Inhibitoren im klinischen Einsatz sind und unter der Therapie auch unerwünschte Wirkungen auftraten. MKT-077 etwa ist ein Hsp70-Inhibitor, unter dessen Einsatz es zu schweren renalen Dysfunktionen kam [34, 134]. Es bedarf also weiterer Suche nach geeigneten Hsp70-Inhibitoren.

Zu den sich in der Entwicklung befindenden Hsp27-Inhibitoren zählen Quercetin und RP101 [135]. Quercetin verstärkt die Wirkung von Chemotherapeutika wie 5-FU [136]. OGX-427 ist ein Hsp27-Inhibitor, der bereits in der klinischen Behandlung von Patienten mit Prostata-, Mamma-, Ovarial-, Bronchial- und Urothelkarzinom getestet wurde. Dabei wurde bei 10 % der Patienten mit Prostatakarzinom ein Rückgang von über 50 % des Tumormarkers PSA beobachtet. Alle Patienten litten jedoch unter unerwünschten Nebenwirkungen wie Pruritus, Lymphopenie oder Anämie [137]. Insgesamt erschwert die strukturelle Komplexität von Hsp27 die Suche nach Inhibitoren, die für den klinischen Einsatz geeignet sind [34].

Möglicherweise kann die zeitlich über wenige Tage befristete Anwendung von HSP-Inhibitoren um den Termin der lokal durchgeführten hyperthermen Chemotherapie herum die negativen Effekte durch die induzierten HSPs limitieren. Antiapoptotische Effekte und Reparaturmechanismen in den Tumorzellen würden durch eine Inhibition der HSPs limitiert werden, wodurch es zu einer Optimierung der HIPEC kommen würde. Infolgedessen könnte es zu besseren Überlebenschancen für die betroffenen Patienten mit Peritonealkarzinose kommen.

In weiterführenden Studien der eigenen Arbeitsgruppe wurde mittlerweile durch den Einsatz von HSP90- und HSP70-Inhibitoren bei der HIPEC *in vitro* erstmals über ein vermehrtes Tumorzellsterben berichtet [138]. Diese präklinischen Ergebnisse ermutigen zu weitergehenden Untersuchungen auf diesem Gebiet.

7.4 Vergleich der verschiedenen Temperaturstufen auf die Expression von HSPs und Proliferationsmarkern und Bedeutung für die HIPEC

Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Optimierung der Temperatureinstellungen bei der hyperthermen Chemotherapie zu einer weiteren Verbesserung des Therapieerfolges führen könnte. Zum jetzigen Zeitpunkt liegt noch keine evidenzbasierte Empfehlung bezüglich der optimalen Temperatur für die HIPEC vor. Die momentan angewendeten Temperaturen in der Peritonealhöhle liegen zwischen 39°C und 43°C [19, 20]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expressionen der HSPs und Proliferationsmarker insbesondere nach 43°C stark erhöht waren. Diese hochregulierten Proteine unter Temperaturen über 41°C in den überlebenden Tumorzellen könnten deren Überleben begünstigen und ihnen Resistenzen verleihen, was wiederum ein Tumorrezidiv fördern würde. Allerdings müssen erwünschte und unerwünschte Effekte der Hyperthermie abgewogen werden. Die *in vitro*-Ergebnisse deuten zusammenfassend darauf hin, Temperatureinstellungen bis maximal 41°C anzustreben.

7.5 Induktion der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA

Um proliferative Effekte in Tumorzellen durch eine hypertherme Chemoperfusion zu analysieren, wurden im *in vitro*-HIPEC-Modell auch die Expressionen der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA untersucht.

Eine Hochregulierung von PCNA fand sich nach alleiniger Hyperthermie in allen untersuchten Kolonkarzinomen. Durch die zusätzliche Behandlung mit dem Chemotherapeutikum 5-FU zeigte sich bis auf wenige Ausnahmen sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene eine deutliche Expression der Proliferationsmarker, insbesondere von Ki-67.

Diese Ergebnisse deuten erstmals darauf hin, dass wenige überlebende Tumorzellen nach den schädigenden Einflüssen der Hyperthermie und Chemotherapie mit einer vermehrten Zellteilungsrate reagieren könnten und somit vermutlich widerstandsfähiger in ihrem Wachstumsverhalten werden. Die erhöhten Expressionsprofile der Proliferationsmarker sind möglicherweise auch

Folge vermehrt auftretender HSPs nach 5-FU-Behandlung, da diese antiapoptotisch wirken. Hsp27 und Hsp90 hemmen beispielsweise Akt, was mit einer erhöhten Proliferation einhergeht und sich in der hohen Ki-67-Expression widerspiegeln könnte [44, 88, 89]. PCNA dient als Proliferationsmarker, trägt aber auch zur Behebung von DNA-Schäden bei, wie sie während der HIPEC auftreten können [111, 112]. Die Reparatur von DNA-Schäden unterstützt wiederum die Proliferation der Tumorzellen.

Eine erhöhte Proliferationsrate der Tumorzellen ist in erster Linie ein unerwünschter Effekt. Diese bedeutet nämlich, dass das Tumorwachstum voranschreitet, was mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden ist. Der Zusammenhang zwischen der Expression von Ki-67 und der Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom wird jedoch kontrovers diskutiert. Zum einen fand man in kolorektalen Tumoren eine Korrelation zwischen einer hohen Expression von Ki-67 und verkürztem Überleben [139]. Andererseits heißt es, dass sich eine hohe Ki-67-Expression positiv bei Patienten auswirkt, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten, negativ dagegen bei Patienten, die allein durch eine chirurgische Therapie behandelt werden [140]. Da die meisten Tumortherapeutika zyklusspezifisch wirken, also Zellen angreifen, die sich nicht in der G0-Phase befinden, könnten Tumorzellen mit einer erhöhten Proliferationsrate tatsächlich empfindlicher gegenüber einer Chemotherapie sein. Folglich stellt sich die Frage, ob nach erfolgter HIPEC eine adjuvante Chemotherapie bzw. eine wiederholte HIPEC mit zyklusspezifischen Chemotherapeutika sinnvoll wäre. Damit könnten möglicherweise die überlebenden, in ihrem Wachstumsverhalten aggressiven Tumorzellen abgetötet werden. Dieser Frage sollte im Sinne einer Verbesserung der HIPEC für die betroffenen Patienten nachgegangen werden.

Mittlerweile wurde in weiterführenden Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe die Chemosensitivität im Kolonkarzinom nach erfolgter *in vitro*-HIPEC untersucht. Nach hyperthermer Chemotherapie wurde in den Tumorzellen eine erhöhte Chemotherapieresistenz gegenüber 5-FU, Mitomycin C und Oxaliplatin nachgewiesen [138]. Die überlebenden Tumorzellen sprachen also weniger auf

die nachfolgenden zyklusspezifischen Chemotherapeutika an als die Tumorzellen ohne Vorbehandlung mit einer hyperthermen Chemotherapie. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Tumorzellen nach der Behandlung mit hyperthermer Chemotherapie Mechanismen entwickeln, die sie gegenüber weiteren schädigenden Einflüssen resistenter machen.

Zusammenfassend zeigen die eigenen Ergebnisse sämtlich hochregulierte HSPs in den untersuchten Kolonkarzinomen durch eine hypertherme Chemotherapie. Die dadurch induzierten intrazellulären antiapoptotischen Effekte und Reparaturmechanismen sowie die sich andeutende zunehmende Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in den überlebenden Tumorzellen wirken sich vermutlich beschränkend auf den Therapieerfolg der HIPEC aus und somit auf die Prognose von einer Peritonealkarzinose betroffener Patienten. Zudem wurde in den überlebenden Tumorzellen eine erhöhte Proliferationstendenz nach einer hyperthermen Chemotherapie nachgewiesen.

8 Zusammenfassung

Die hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion (*hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*, HIPEC) ist ein vielversprechendes Verfahren bei Patienten mit limitierter Peritonealkarzinose. Bei der HIPEC werden eine Hyperthermie und eine lokale hochdosierte Chemotherapie kombiniert. Ein limitierender Faktor bei dieser Therapie sind jedoch Hitzeschockproteine (*heat shock proteins*, HSPs). Sie werden durch die zellschädigenden Einflüsse induziert und wirken der Behandlung durch intrazelluläre Reparaturmechanismen und eine verringerte Chemotherapeutikasensitivität entgegen. Ziel dieser Arbeit war es, solche intrazellulären Mechanismen durch Hyperthermie und Chemotherapeutikum im Kolonkarzinom zu untersuchen, um durch ein verbessertes Verständnis die HIPEC-Therapie zu optimieren. Hierfür wurden in einem etablierten *in vitro*-HIPEC-Modell die Auswirkungen von Hyperthermie und Chemotherapeutikum auf die Expression von HSPs untersucht. Zudem wurde der Einfluss von Hyperthermie und Chemotherapie auf proliferative Effekte mithilfe von Ki-67 und PCNA untersucht.

Dafür wurden Zellen der drei humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien HT-29, SW480 und SW620 eine Stunde jeweils mit und ohne dem Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil (5-FU) verschiedenen Temperaturstufen (37°C, 41°C, 43°C) ausgesetzt. Nach Regenerationszeiten von 30 min, 24 h, 48 h und 72 h wurde die Expression von Hsp27, Hsp70, Hsp90, Ki-67 und PCNA mittels RT-qPCR und Western Blot ermittelt.

In der RT-qPCR zeigten sich erhöhte Expressionen der HSPs direkt nach der Behandlung unter Hyperthermie in allen Kolonkarzinomen. Erstmals wurde durch die zusätzliche Behandlung mit 5-FU eine zusätzliche Steigerung der Genexpression beobachtet. Diese ließ sich auch noch zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach drei Tagen nachweisen. Infolge der erhöhten Genexpression fand sich eine ebenso deutlich gesteigerte Proteinexpression der HSPs. PCNA als Proliferationsmarker war nach der Behandlung unter alleiniger Hyperthermie und in Kombination mit 5-FU in den Tumorzellen erhöht. Erstmals zeigte sich auch eine starke Erhöhung von Ki-67 als weiteren Indikator für

induzierte Tumorzellproliferation nach 5-FU-Exposition insbesondere nach drei Tagen sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch bei der HIPEC *in vivo* vermehrt HSPs und PCNA exprimiert werden könnten. Diese Proteine besitzen antiapoptotische, zellstabilisierende Wirkungsweisen und setzen Reparaturmechanismen in Gang. Somit könnten sie das Überleben der Tumorzellen fördern und so limitierend auf den Erfolg der HIPEC Einfluss nehmen. Erstmalig zeigen die Untersuchungen eine 5-FU-abhängige erhöhte Expression von Ki-67, die auf eine erhöhte Proliferationsrate der überlebenden Tumorzellen und antiapoptotische Resistenzmechanismen in den Tumorzellen hindeutet.

Diese Erkenntnisse werfen die Frage nach dem klinischen Einsatz von bereits verfügbaren HSP-Inhibitoren bei der HIPEC auf. HSP-Inhibitoren könnten die induzierten unerwünschten Mechanismen minimieren und somit die Therapieeffekte der HIPEC weiter verbessern.

Zudem weisen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals darauf hin, dass sich insbesondere Temperaturen über 41°C durch verstärkt exprimierte HSPs und Proliferationsmarker negativ auf die hypertherme Chemoperfusion auswirken könnten. Hochregulierte HSPs und Proliferationsmarker in den überlebenden Tumorzellen unter solchen hohen Temperaturen könnten diese resistenter machen und würden so eine rezidivierende Tumorerkrankung begünstigen. Jedoch müssen erwünschte und unerwünschte Effekte der Hyperthermie differenziert und noch weiter abgewogen werden.

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Hsp90-Familie und Einordnung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene.....	13
Tabelle 2: Zelllinien	17
Tabelle 3: Nährmedien	17
Tabelle 4: Chemikalien, Puffer, Reagenzien	17
Tabelle 5: Selbst hergestellte Puffer.....	19
Tabelle 6: Kits.....	20
Tabelle 7: Primer	20
Tabelle 8: Primär- und Sekundärantikörper.....	21
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 10: Geräte.....	23
Tabelle 11: Software	24

III. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014.....	1
Abb. 2: Übersicht der Funktionen von Hsp27.....	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von Hsp70 und dessen Konformationsänderung durch Bindung von ATP.....	10
Abb. 4.: Übersicht der Funktionen von Hsp70.....	12
Abb. 5: Schematische Darstellung der Struktur von Hsp90 und dessen Konformationsänderung durch Bindung von ATP.....	13
Abb. 6: Schematische Darstellung der Struktur von PCNA.....	16
Abb. 7: Aufteilung der Zellkulturflaschen pro Zelllinie.....	26
Abb. 8: Versuchsdurchführung.....	27
Abb. 9: Relative Genexpression von Hsp27 Protein 1 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	33
Abb. 10: Relative Genexpression von Hsp27 Protein 2 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	35
Abb. 11: Western Blots der Proteinexpression von Hsp27 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	37
Abb. 12: Relative Genexpression von Hsp70 Protein 1A in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	39
Abb. 13: Relative Genexpression von Hsp70 Protein 1B in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	41
Abb. 14: Relative Genexpression von Hsp70 Protein 4 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	43
Abb. 15: Western Blots der Proteinexpression von Hsp70 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	45

Abb. 16: Relative Genexpression von Hsp90 α class A member 1 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	47
Abb. 17: Relative Genexpression von Hsp90 α class A member 2 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	49
Abb. 18: Relative Genexpression von Hsp90 α class B member 1 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU.....	51
Abb. 19: Western Blots der Proteinexpression von Hsp90 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU	53
Abb. 20: Relative Genexpression von Ki-67 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU	55
Abb. 21: Western Blots der Proteinexpression von Ki-67 in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU	57
Abb. 22: Relative Genexpression von PCNA in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU	59
Abb. 23: Western Blots der Proteinexpression von PCNA in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach einstündiger Behandlung unter verschiedenen Temperaturen mit oder ohne 5-FU	61

IV. Literaturverzeichnis

1. *Krebs war 2013 die zweithäufigste Todesursache*. Statistisches Bundesamt, Pressestelle, 2015.
https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2015/02/PD15_034_232.html [Zugriff 31.08.17].
2. *Neue Daten zu Krebs in Deutschland, Pressemitteilung des Robert Koch-Instituts*. Robert Koch Institut, 2013.
http://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2013/14_2013.html [Zugriff 08.11.16].
3. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., et al., *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. Robert Koch Institut, 2017(11): 17.
4. Schünke, M., Schulte, E. und Schumacher, U., *Prometheus Innere Organe*. Thieme, 2009: 201.
5. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2015.
http://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe2_form.html [Zugriff 21.11.15].
6. Tannapfel, A., Brücher, B. und Schlag, P.M., *Peritoneales Mesotheliom - ein seltener Tumor der Bauchhöhle*. Springer Medizin Verlag, 2009: 2.
7. Koppe, M.J., Boerman, O.C., Oyen, W.J., et al., *Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies*. *Ann Surg*, 2006. 243(2): 212-222.
8. Jayne, D.G., Fook, S., Loi, C., et al., *Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer*. *Br J Surg*, 2002. 89(12): 1545-1550.
9. Müller, H., *Die Hyperthermie im Gesamtkonzept der Behandlung des Bauchfellkrebs*. 2016. <http://www.natum.de/151-0-die-hyperthermie-im-gesamtkonzept-der-behandlung-des-bauchfellkrebs.html> [Zugriff 28.04.16].
10. Piso, P. und Arnold, D., *Multimodal treatment approaches for peritoneal carcinosis in colorectal cancer*. *Dtsch Arztebl Int*, 2011. 108(47): 802-808.
11. Sadeghi, B., Arvieux, C., Glehen, O., et al., *Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study*. *Cancer*, 2000. 88(2): 358-363.
12. Franko, J., Ibrahim, Z., Gusani, N.J., et al., *Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion versus systemic chemotherapy alone for colorectal peritoneal carcinomatosis*. *Cancer*, 2010. 116(16): 3756-3762.
13. Verwaal, V.J., Bruin, S., Boot, H., et al., *8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2008. 15(9): 2426-2432.

14. Pelz, J.O., Chua, T.C., Esquivel, J., et al., *Evaluation of best supportive care and systemic chemotherapy as treatment stratified according to the retrospective peritoneal surface disease severity score (PSDSS) for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin*. BMC Cancer, 2010. 10(1): 689.
15. Cao, C., Yan, T.D., Black, D., et al., *A systematic review and meta-analysis of cytoreductive surgery with perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin*. Ann Surg Oncol, 2009. 16(8): 2152-2165.
16. Elias, D., Blot, F., El Otmany, A., et al., *Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy*. Cancer, 2001. 92(1): 71-76.
17. Glehen, O., Mithieux, F., Osinsky, D., et al., *Surgery combined with peritonectomy procedures and intraperitoneal chemohyperthermia in abdominal cancers with peritoneal carcinomatosis: a phase II study*. J Clin Oncol, 2003. 21(5): 799-806.
18. Vaira, M., Cioppa, T., D'Amico, S., et al., *Treatment of peritoneal carcinomatosis from colonic cancer by cytoreduction, peritonectomy and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). Experience of ten years*. In Vivo, 2010. 24(1): 79-84.
19. Elias, D., Raynard, B., Boige, V., et al., *Impact of the extent and duration of cytoreductive surgery on postoperative hematological toxicity after intraperitoneal chemohyperthermia for peritoneal carcinomatosis*. J Surg Oncol, 2005. 90(4): 220-225.
20. Esquivel, J., Sticca, R., Sugarbaker, P., et al., *Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of peritoneal surface malignancies of colonic origin: a consensus statement. Society of Surgical Oncology*. Ann Surg Oncol, 2007. 14(1): 128-133.
21. Hompes, D., D'Hoore, A., Wolthuis, A., et al., *The use of Oxaliplatin or Mitomycin C in HIPEC treatment for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a comparative study*. J Surg Oncol, 2014. 109(6): 527-532.
22. Glockzin, G., von Breitenbuch, P., Schlitt, H.J., et al., *Treatment-related morbidity and toxicity of CRS and oxaliplatin-based HIPEC compared to a mitomycin and doxorubicin-based HIPEC protocol in patients with peritoneal carcinomatosis: a matched-pair analysis*. J Surg Oncol, 2013. 107(6): 574-578.
23. Esquivel, J., *Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for colorectal cancer: survival outcomes and patient selection*. J Gastrointest Oncol, 2016. 7(1): 72-78.
24. Kusamura, S., Dominique, E., Baratti, D., et al., *Drugs, carrier solutions and temperature in hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*. J Surg Oncol, 2008. 98(4): 247-252.
25. Van der Speeten, K., Stuart, O.A. und Sugarbaker, P.H., *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Perioperative Cancer Chemotherapy in Peritoneal Surface Malignancy*. Cancer Journal, 2009. 15(3): 216-224.

26. Kampinga, H.H., *Cell biological effects of hyperthermia alone or combined with radiation or drugs: a short introduction to newcomers in the field*. Int J Hyperthermia, 2006. 22(3): 191-196.
27. Urano, M. und Ling, C.C., *Thermal enhancement of melphalan and oxaliplatin cytotoxicity in vitro*. Int J Hyperthermia, 2002. 18(4): 307-315.
28. Barlogie, B., Corry, P.M. und Drewinko, B., *In vitro thermochemotherapy of human colon cancer cells with cis-dichlorodiammineplatinum(II) and mitomycin C*. Cancer Res, 1980. 40(4): 1165-1168.
29. Hahn, G.M., Braun, J. und Har-Kedar, I., *Thermochemotherapy: synergism between hyperthermia (42-43 degrees) and adriamycin (of bleomycin) in mammalian cell inactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. 72(3): 937-940.
30. Kusumoto, T., Holden, S.A., Ara, G., et al., *Hyperthermia and platinum complexes: time between treatments and synergy in vitro and in vivo*. Int J Hyperthermia, 1995. 11(4): 575-586.
31. Mohamed, F., Marchettini, P., Stuart, O.A., et al., *Thermal enhancement of new chemotherapeutic agents at moderate hyperthermia*. Ann Surg Oncol, 2003. 10(4): 463-468.
32. Jacquet, P., Averbach, A., Stuart, O.A., et al., *Hyperthermic intraperitoneal doxorubicin: pharmacokinetics, metabolism, and tissue distribution in a rat model*. Cancer Chemother Pharmacol, 1998. 41(2): 147-154.
33. Pelz, J.O., Vetterlein, M., Grimmig, T., et al., *Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis: role of heat shock proteins and dissecting effects of hyperthermia*. Ann Surg Oncol, 2013. 20(4): 1105-1113.
34. Jegou, G., Hazoume, A., Seigneuric, R., et al., *Targeting heat shock proteins in cancer*. Cancer Lett, 2013. 332(2): 275-285.
35. Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., et al., *Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation*. J Cell Mol Med, 2008. 12(3): 743-761.
36. Saibil, H., *Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. 14(10): 630-642.
37. Chen, W.S., Lee, C.C., Hsu, Y.M., et al., *Identification of heat shock protein 90alpha as an IMH-2 epitope-associated protein and correlation of its mRNA overexpression with colorectal cancer metastasis and poor prognosis*. Int J Colorectal Dis, 2011. 26(8): 1009-1017.
38. Lee, H.W., Lee, E.H., Kim, S.H., et al., *Heat shock protein 70 (HSP70) expression is associated with poor prognosis in intestinal type gastric cancer*. Virchows Arch, 2013. 463(4): 489-495.
39. Yu, Z., Zhi, J., Peng, X., et al., *Clinical significance of HSP27 expression in colorectal cancer*. Mol Med Rep, 2010. 3(6): 953-958.

40. MacRae, T.H., *Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas*. Cell Mol Life Sci, 2000. 57(6): 899-913.
41. Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., et al., *Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation*. J Biol Chem, 1999. 274(27): 18947-18956.
42. Giese, K.C. und Vierling, E., *Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro*. J Biol Chem, 2002. 277(48): 46310-46318.
43. Charette, S.J. und Landry, J., *The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis*. Ann N Y Acad Sci, 2000. 926: 126-131.
44. Havasi, A., Li, Z., Wang, Z., et al., *Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2008. 283(18): 12305-12313.
45. Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., et al., *Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance*. Blood, 2003. 102(9): 3379-3386.
46. Concannon, C.G., Orrenius, S. und Samali, A., *Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c*. Gene Expr, 2001. 9(4-5): 195-201.
47. Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., et al., *Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c*. Nat Cell Biol, 2000. 2(9): 645-652.
48. Mehlen, P., Kretz-Remy, C., Preville, X., et al., *Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death*. EMBO J, 1996. 15(11): 2695-2706.
49. Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., et al., *Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties*. Cell Cycle, 2006. 5(22): 2592-2601.
50. Lavoie, J.N., Gingras-Breton, G., Tanguay, R.M., et al., *Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization*. J Biol Chem, 1993. 268(5): 3420-3429.
51. Cuesta, R., Laroia, G. und Schneider, R.J., *Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes*. Genes Dev, 2000. 14(12): 1460-1470.
52. Carper, S.W., Rocheleau, T.A., Cimino, D., et al., *Heat shock protein 27 stimulates recovery of RNA and protein synthesis following a heat shock*. J Cell Biochem, 1997. 66(2): 153-164.

53. Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C. und McKay, D.B., *Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein*. Nature, 1990. 346(6285): 623-628.
54. Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., et al., *Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK*. Science, 1996. 272(5268): 1606-1614.
55. Zhuravleva, A., Clerico, E.M. und Gierasch, L.M., *An interdomain energetic tug-of-war creates the allosterically active state in Hsp70 molecular chaperones*. Cell, 2012. 151(6): 1296-1307.
56. Kityk, R., Kopp, J., Sinning, I., et al., *Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones*. Mol Cell, 2012. 48(6): 863-874.
57. Ahmad, A., Bhattacharya, A., McDonald, R.A., et al., *Heat shock protein 70 kDa chaperone/DnaJ cochaperone complex employs an unusual dynamic interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(47): 18966-18971.
58. Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., et al., *Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK*. Science, 1997. 276(5311): 431-435.
59. Sharma, S.K., De los Rios, P., Christen, P., et al., *The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase*. Nat Chem Biol, 2010. 6(12): 914-920.
60. Shorter, J., *The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system*. PLoS One, 2011. 6(10): e26319.
61. Mattoo, R.U., Sharma, S.K., Priya, S., et al., *Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates*. J Biol Chem, 2013. 288(29): 21399-21411.
62. Hut, H.M., Kampinga, H.H. und Sibon, O.C., *Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities*. Mol Biol Cell, 2005. 16(8): 3776-3785.
63. Park, H.S., Cho, S.G., Kim, C.K., et al., *Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1*. Mol Cell Biol, 2002. 22(22): 7721-7730.
64. Gabai, V.L., Mabuchi, K., Mosser, D.D., et al., *Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis*. Mol Cell Biol, 2002. 22(10): 3415-3424.
65. Stankiewicz, A.R., Lachapelle, G., Foo, C.P., et al., *Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation*. J Biol Chem, 2005. 280(46): 38729-38739.
66. Gurbuxani, S., Schmitt, E., Cande, C., et al., *Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor*. Oncogene, 2003. 22(43): 6669-6678.

67. Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., et al., *Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70*. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(8): 476-483.
68. Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., et al., *Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization*. *J Exp Med*, 2004. 200(4): 425-435.
69. Chen, B., Piel, W.H., Gui, L., et al., *The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution*. *Genomics*, 2005. 86(6): 627-637.
70. Eustace, B.K. und Jay, D.G., *Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90*. *Cell Cycle*, 2004. 3(9): 1098-1100.
71. Li, J. und Buchner, J., *Structure, function and regulation of the hsp90 machinery*. *Biomed J*, 2013. 36(3): 106-117.
72. Ali, M.M., Roe, S.M., Vaughan, C.K., et al., *Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex*. *Nature*, 2006. 440(7087): 1013-1017.
73. Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., et al., *Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone*. *Cell*, 1997. 90(1): 65-75.
74. Graf, C., Stankiewicz, M., Kramer, G., et al., *Spatially and kinetically resolved changes in the conformational dynamics of the Hsp90 chaperone machine*. *EMBO J*, 2009. 28(5): 602-613.
75. Pearl, L.H. und Prodromou, C., *Structure and in vivo function of Hsp90*. *Curr Opin Struct Biol*, 2000. 10(1): 46-51.
76. Meyer, P., Prodromou, C., Liao, C., et al., *Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery*. *EMBO J*, 2004. 23(6): 1402-1410.
77. Young, J.C., Obermann, W.M. und Hartl, F.U., *Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90*. *J Biol Chem*, 1998. 273(29): 18007-18010.
78. Marcu, M.G., Chadli, A., Bouhouche, I., et al., *The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone*. *J Biol Chem*, 2000. 275(47): 37181-37186.
79. Hessling, M., Richter, K. und Buchner, J., *Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. 16(3): 287-293.
80. Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y.C., et al., *Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone*. *Cell*, 2005. 120(5): 715-727.
81. Grenert, J.P., Johnson, B.D. und Toft, D.O., *The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes*. *J Biol Chem*, 1999. 274(25): 17525-17533.

82. Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., et al., *Hsp90 chaperones protein folding in vitro*. Nature, 1992. 358(6382): 169-170.
83. Miyata, Y. und Yahara, I., *The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity*. J Biol Chem, 1992. 267(10): 7042-7047.
84. Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I., et al., *Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo*. J Biol Chem, 1995. 270(13): 7288-7294.
85. Nimmanapalli, R., O'Bryan, E. und Bhalla, K., *Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts*. Cancer Res, 2001. 61(5): 1799-1804.
86. Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B., et al., *Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis*. Trends Biochem Sci, 2006. 31(3): 164-172.
87. Eustace, B.K., Sakurai, T., Stewart, J.K., et al., *Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness*. Nat Cell Biol, 2004. 6(6): 507-514.
88. Sato, S., Fujita, N. und Tsuruo, T., *Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(20): 10832-10837.
89. Ye, Y., Ge, Y.M., Xiao, M.M., et al., *Suppression of SHIP2 contributes to tumorigenesis and proliferation of gastric cancer cells via activation of Akt*. J Gastroenterol, 2016. 51(3): 230-240.
90. Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., et al., *Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90*. EMBO J, 2000. 19(16): 4310-4322.
91. Dias, S., Shmelkov, S.V., Lam, G., et al., *VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition*. Blood, 2002. 99(7): 2532-2540.
92. Jacobsen, A.V., Lowes, K.N., Tanzer, M.C., et al., *HSP90 activity is required for MLKL oligomerisation and membrane translocation and the induction of necroptotic cell death*. Cell Death Dis, 2016. 7(1): e2051.
93. Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, M.R., et al., *Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells*. Int J Cancer, 1992. 51(4): 613-619.
94. Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., et al., *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol, 1984. 133(4): 1710-1715.
95. Lopez, F., Belloc, F., Lacombe, F., et al., *Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes*. Cytometry, 1991. 12(1): 42-49.

96. Bruno, S. und Darzynkiewicz, Z., *Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells*. Cell Prolif, 1992. 25(1): 31-40.
97. Braun, N., Papadopoulos, T. und Muller-Hermelink, H.K., *Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1988. 56(1): 25-33.
98. Schluter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., et al., *The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins*. J Cell Biol, 1993. 123(3): 513-522.
99. Duchrow, M., Schluter, C., Wohlenberg, C., et al., *Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67*. Cell Prolif, 1996. 29(1): 1-12.
100. Booth, D.G., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., et al., *Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery*. Elife, 2014. 3: e01641.
101. Scholzen, T., Endl, E., Wohlenberg, C., et al., *The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure*. J Pathol, 2002. 196(2): 135-144.
102. Sueishi, M., Takagi, M. und Yoneda, Y., *The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2*. J Biol Chem, 2000. 275(37): 28888-28892.
103. Takagi, M., Sueishi, M., Saiwaki, T., et al., *A novel nucleolar protein, NIFK, interacts with the forkhead associated domain of Ki-67 antigen in mitosis*. J Biol Chem, 2001. 276(27): 25386-25391.
104. Ogata, K., Ogata, Y., Nakamura, R.M., et al., *Purification and N-terminal amino acid sequence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin and development of ELISA for anti-PCNA antibodies*. J Immunol, 1985. 135(4): 2623-2627.
105. Krishna, T.S., Kong, X.P., Gary, S., et al., *Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA*. Cell, 1994. 79(7): 1233-1243.
106. *1AXC Human PCNA*. Protein Data Bank, 2017.
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1AXC> [Zugriff 18.09.17].
107. Dietrich, D.R., *Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation*. Crit Rev Toxicol, 1993. 23(1): 77-109.
108. Kubben, F.J., Peeters-Haesevoets, A., Engels, L.G., et al., *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation*. Gut, 1994. 35(4): 530-535.

109. Johansson, E., Garg, P. und Burgers, P.M., *The Pol32 subunit of DNA polymerase delta contains separable domains for processive replication and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) binding*. J Biol Chem, 2004. 279(3): 1907-1915.
110. Prelich, G., Tan, C.K., Kostura, M., et al., *Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein*. Nature, 1987. 326(6112): 517-520.
111. Cayrol, C., Knibiehler, M. und Ducommun, B., *p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells*. Oncogene, 1998. 16(3): 311-320.
112. Nichols, A.F. und Sancar, A., *Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein*. Nucleic Acids Res, 1992. 20(13): 2441-2446.
113. Kelman, Z., *PCNA: structure, functions and interactions*. Oncogene, 1997. 14(6): 629-640.
114. Tsuruta, M., Nishibori, H., Hasegawa, H., et al., *Heat shock protein 27, a novel regulator of 5-fluorouracil resistance in colon cancer*. Oncol Rep, 2008. 20(5): 1165-1172.
115. Ding, X., Li, H., Xie, H., et al., *A novel method to assay molecular chaperone activity of HSP70: evaluation of drug resistance in cancer treatment*. Biosens Bioelectron, 2013. 47: 75-79.
116. Ahn, J.Y., Lee, J.S., Min, H.Y., et al., *Acquired resistance to 5-fluorouracil via HSP90/Src-mediated increase in thymidylate synthase expression in colon cancer*. Oncotarget, 2015. 6(32): 32622-32633.
117. Jhaveri, K. und Modi, S., *HSP90 inhibitors for cancer therapy and overcoming drug resistance*. Adv Pharmacol, 2012. 65: 471-517.
118. Allan, R.K., Mok, D., Ward, B.K., et al., *Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90: evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization*. J Biol Chem, 2006. 281(11): 7161-7171.
119. Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., et al., *Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(18): 8324-8328.
120. Tatokoro, M., Koga, F., Yoshida, S., et al., *Heat shock protein 90 targeting therapy: state of the art and future perspective*. EXCLI J, 2015. 14: 48-58.
121. Yamaki, H., Suzuki, H., Choi, E.C., et al., *Inhibition of DNA synthesis in murine tumor cells by geldanamycin, an antibiotic of the benzoquinoid ansamycin group*. J Antibiot (Tokyo), 1982. 35(7): 886-892.
122. Neckers, L. und Trepel, J.B., *Stressing the development of small molecules targeting HSP90*. Clin Cancer Res, 2014. 20(2): 275-277.

123. Lee, K.H., Lee, J.H., Han, S.W., et al., *Antitumor activity of NVP-AUY922, a novel heat shock protein 90 inhibitor, in human gastric cancer cells is mediated through proteasomal degradation of client proteins*. *Cancer Sci*, 2011. 102(7): 1388-1395.
124. Song, X., Zhao, Z., Qi, X., et al., *Identification of epipolythiodioxopiperazines HDN-1 and chaetocin as novel inhibitor of heat shock protein 90*. *Oncotarget*, 2015. 6(7): 5263-5274.
125. He, S., Smith, D.L., Sequeira, M., et al., *The HSP90 inhibitor ganetespib has chemosensitizer and radiosensitizer activity in colorectal cancer*. *Invest New Drugs*, 2014. 32(4): 577-586.
126. Yong, K., Cavet, J., Johnson, P., et al., *Phase I study of KW-2478, a novel Hsp90 inhibitor, in patients with B-cell malignancies*. *Br J Cancer*, 2016. 114(1): 7-13.
127. Shapiro, G.I., Kwak, E., Dezube, B.J., et al., *First-in-human phase I dose escalation study of a second-generation non-ansamycin HSP90 inhibitor, AT13387, in patients with advanced solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(1): 87-97.
128. Schilling, D., Garrido, C., Combs, S.E., et al., *The Hsp70 inhibiting peptide aptamer A17 potentiates radiosensitization of tumor cells by Hsp90 inhibition*. *Cancer Lett*, 2017. 390: 146-152.
129. Massey, A.J., Williamson, D.S., Browne, H., et al., *A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010. 66(3): 535-545.
130. Leu, J.I., Pimkina, J., Frank, A., et al., *A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70*. *Mol Cell*, 2009. 36(1): 15-27.
131. Williamson, D.S., Borgognoni, J., Clay, A., et al., *Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design*. *J Med Chem*, 2009. 52(6): 1510-1513.
132. Ko, S.K., Kim, J., Na, D.C., et al., *A small molecule inhibitor of ATPase activity of HSP70 induces apoptosis and has antitumor activities*. *Chem Biol*, 2015. 22(3): 391-403.
133. Schmitt, E., Maingret, L., Puig, P.E., et al., *Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma*. *Cancer Res*, 2006. 66(8): 4191-4197.
134. Britten, C.D., Rowinsky, E.K., Baker, S.D., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of the mitochondrial-specific rhodacyanine dye analog MKT 077*. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(1): 42-49.
135. McConnell, J.R. und McAlpine, S.R., *Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013. 23(7): 1923-1928.

136. Xavier, C.P., Lima, C.F., Rohde, M., et al., *Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011. 68(6): 1449-1457.
137. Chi, K.N., Yu, E.Y., Jacobs, C., et al., *A phase I dose-escalation study of apatorsen (OGX-427), an antisense inhibitor targeting heat shock protein 27 (Hsp27), in patients with castration-resistant prostate cancer and other advanced cancers*. *Ann Oncol*, 2016.
138. Grimmig, T., Moll, E., Kloos, K., et al., *Upregulated Heat Shock Proteins After Hyperthermic Chemotherapy Point to Induced Cell Survival Mechanisms in Affected Tumor Cells From Peritoneal Carcinomatosis*. *Cancer Growth and Metastasis*, 2017. 10: 1-19.
139. Oshima, C.T., Iriya, K. und Forones, N.M., *Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer*. *Neoplasma*, 2005. 52(5): 420-424.
140. Fluge, O., Gravdal, K., Carlsen, E., et al., *Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis*. *Br J Cancer*, 2009. 101(8): 1282-1289.

V. Publikationen

Originalartikel

Tanja Grimmig, Eva-Maria Moll, Kerstin Kloos, **Rebecca Thumm**, Romana Moench, Simone Callies, Jennifer Kreckel, Malte Vetterlein, Joerg Pelz, Buelent Polat, Sudipta Tripathi, Roberta Rehder, Carmen M Ribas, Anil Chandraker, Christoph-T Germer, Ana Maria Waaga-Gasser, Martin Gasser.

Upregulated Heat Shock Proteins After Hyperthermic Chemotherapy Point to Induced Cell Survival Mechanisms in Affected Tumor Cells From Peritoneal Carcinomatosis. Cancer Growth and Metastasis, 2017. 10: 1-19. DOI: 10.1177/1179064417730559.

Kongressbeiträge

Tanja Grimmig, Kerstin Kloos, **Rebecca Thumm**, Romana Moench, Christoph T. Germer, Ana Maria Waaga-Gasser, Martin Gasser.

Cell stress during HIPEC causes heat shock protein induction and reduced chemosensitivity in human colon cancer. 2016. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-2945.

19. Chirurgische Forschungstage, Würzburg, 08.-10.10.2015.

VI. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer, Klinikdirektor der Chirurgie I des Universitätsklinikums Würzburg, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Ana Maria Waaga-Gasser und Herrn Professor Dr. Martin Gasser für die Überlassung des interessanten Themas und die intensive Betreuung. Insbesondere danke ich für die kontinuierliche Unterstützung und Förderung der Arbeit, die anregende Kritik, die vielen Ratschläge und ihre Herzlichkeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Tanja Grimmig für die zuverlässige und vorbildliche Betreuung meiner Arbeit. Insbesondere danke ich für die gute Einarbeitung in die Labortätigkeiten, die Beantwortung meiner Fragen und die stets raschen Korrekturen beim Schreiben des Manuskripts. Frau Dr. Romana Mönch möchte ich herzlich für die Unterstützung bei den Labortätigkeiten und ihre stete Hilfsbereitschaft danken. Weiter möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei den Labortätigkeiten und die nette Atmosphäre bedanken - besonders bei Sabine Müller, Ingrid Strauß und Mariola Dragan.

Großer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden für die großzügige Unterstützung während des gesamten Studiums und der Erstellung der Promotionsarbeit.

Würzburg, 18. Februar 2019