

Aus der Chirurgischen Klinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

Molekulare Onkoimmunologie

Frau Prof. Dr. A. M. Waaga-Gasser

**Über die Effekte von Hyperthermie und Zytostatika auf die
Tumorzellproliferation, Apoptose und Expression von Heat Shock
Proteinen im Kolonkarzinom**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kerstin Kloos

aus Dörrebach

Würzburg, Dezember 2022

Referent: Prof. Dr. Martin Gasser

Koreferent/in: Univ.-Prof. Dr. Michael Hudecek

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.08.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der Peritonealkarzinose	2
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese	2
1.1.2	Krankheitsbild und Diagnose	3
1.1.3	Therapieoptionen.....	4
1.1.3.1	Zytoreduktive Chirurgie.....	5
1.1.3.2	HIPEC	5
2	Molekularbiologische Grundlagen	8
2.1	Heat Shock Proteine	8
2.1.1	HSP27	9
2.1.2	HSP70	11
2.1.3	HSP90	12
2.2	Proliferationsmarker	13
2.2.1	PCNA.....	13
2.2.2	Ki-67	14
2.3	Apoptosemarker.....	15
2.3.1	Bcl-xL.....	15
3	Fragestellung dieser Arbeit	17
4	Material und Methoden	18
4.1	Patientenkollektiv	18
4.2	Material	18
4.2.1	Zellkulturen	18
4.2.2	Zellkulturmedien	19
4.2.3	Chemikalien, Gebrauchsfertige Puffer, Reagenzien.....	19

4.2.4	Selbst hergestellte Puffer.....	21
4.2.5	Kits.....	22
4.2.6	Primär- und Sekundärantikörper.....	22
4.2.7	Primer Assays.....	23
4.2.8	Verbrauchsmaterialien.....	24
4.2.9	Geräte.....	25
4.2.10	Hard-/ Software.....	25
4.3	Methoden	26
4.3.1	Zellkultur	26
4.3.1.1	Auftauen	26
4.3.1.2	Zellkultivierung, Zellpassage	26
4.3.1.3	Zellzählung	27
4.3.2	Zellbiologische Methoden	27
4.3.2.1	<i>In vitro</i> Hyperthermie Modell Aufbau	27
4.3.2.2	MTS-Zellproliferationsassay	28
4.3.3	Proteinbiochemische Methoden	29
4.3.3.1	Herstellung Gesamtzellextrakte von adhären- ten Zellen und Patientenproben	29
4.3.3.2	Messung der Proteinkonzentration nach Bradford	29
4.3.3.3	SDS-Page (Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese).....	30
4.3.3.4	Proteintransfer und Immundetektion.....	30
4.3.4	Molekularbiologische Methoden	31
4.3.4.1	RNA Extraktion von adhären- ten Zellen und Synthese von cDNA	31
4.3.4.2	<i>Real-time</i> quantitative PCR (RT-qPCR)	32
5	Ergebnisse.....	34
5.1	HSP27.....	34
5.1.1	Humanes HT29 Kolonkarzinom	34

5.1.1.1	HSP27 Genexpression	34
5.1.1.2	HSP27 Proteinexpression.....	35
5.1.2	Humanes SW480 Kolonkarzinom.....	37
5.1.2.1	HSP27 Genexpression	37
5.1.2.2	HSP27 Proteinexpression.....	38
5.1.3	Humanes SW620 Kolonkarzinom.....	40
5.1.3.1	HSP27 Genexpression	40
5.1.3.2	HSP27 Proteinexpression.....	41
5.2	HSP70.....	42
5.2.1	Humanes HT29 Kolonkarzinom.....	42
5.2.1.1	HSP70 Genexpression	42
5.2.1.2	HSP70 Proteinexpression.....	44
5.2.2	Humanes SW480 Kolonkarzinom.....	45
5.2.2.1	HSP70 Genexpression	45
5.2.2.2	HSP70 Proteinexpression.....	46
5.2.3	Humanes SW620 Kolonkarzinom.....	47
5.2.3.1	HSP70 Genexpression	47
5.2.3.2	HSP70 Proteinexpression.....	48
5.3	HSP90.....	49
5.3.1	Humanes HT29 Kolonkarzinom.....	49
5.3.1.1	HSP90 Genexpression	49
5.3.1.2	HSP90 Proteinexpression.....	53
5.3.2	Humanes SW480 Kolonkarzinom.....	54
5.3.2.1	HSP90 Genexpression	54
5.3.2.2	HSP90 Proteinexpression.....	56
5.3.3	Humanes SW620 Kolonkarzinom.....	56
5.3.3.1	HSP90 Genexpression	56
5.3.3.2	HSP90 Proteinexpression.....	58
5.4	PCNA.....	59
5.4.1	Humanes HT29 Kolonkarzinom.....	59

5.4.1.1	PCNA Genexpression.....	59
5.4.1.2	PCNA Proteinexpression	61
5.4.2	Humanes SW480 Kolonkarzinom.....	62
5.4.2.1	PCNA Genexpression.....	62
5.4.2.2	PCNA Proteinexpression	63
5.4.3	Humanes SW620 Kolonkarzinom.....	64
5.4.3.1	PCNA Genexpression.....	64
5.4.3.2	PCNA Proteinexpression	65
5.5	Ki-67.....	66
5.5.1	Humanes HT29, SW480, SW620 Kolonkarzinom	66
5.5.1.1	Ki-67 Genexpression	66
5.6	Bcl-xL.....	68
5.6.1	Humanes HT29, SW480, SW620 Kolonkarzinom	68
5.6.1.1	Bcl-xL Proteinexpression	68
5.7	<i>Ex vivo</i> Patientenproben prä und post HIPEC	70
5.7.1	Bcl-xL und PCNA Proteinexpression.....	70
5.8	Zellproliferation nach hyperthermer Chemotherapie.....	71
6	Beantwortung der Fragestellung.....	74
7	Diskussion	79
7.1	Auswirkungen von Hyperthermie und Zytostatika auf die Expression von Hitzeschockproteinen nach HIPEC <i>in vitro</i> in Kolonkarzinomzellen	79
7.2	Einfluss von verschiedenen Temperaturen und Regenerationszeiten auf die Expression von Heat Shock Proteinen	81
7.3	Verstärkte Zellproliferation nach hyperthermer Chemotherapie	83
7.4	Induktion des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-xL.....	84
7.5	Inhibition von Heat Shock Proteinen als Therapiestrategie	85
8	Zusammenfassung	89

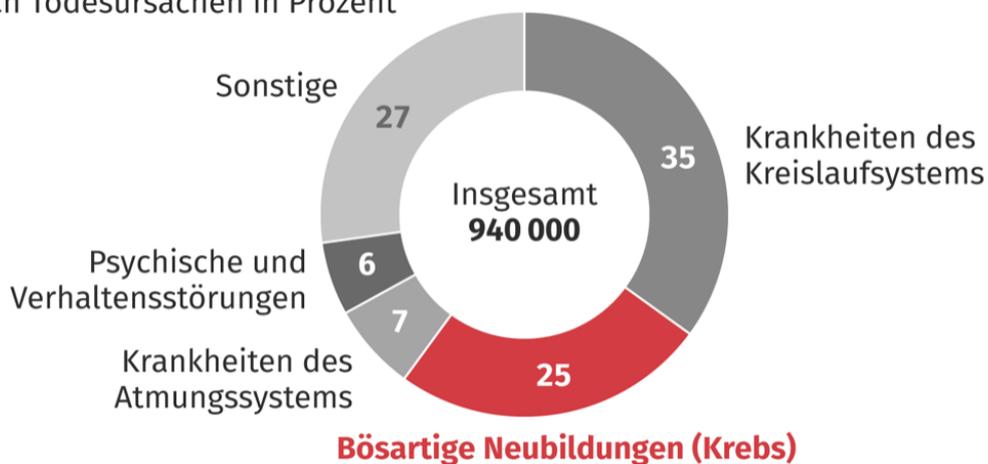
9	Literaturverzeichnis	92
I.	Abkürzungsverzeichnis	100
II.	Abbildungsverzeichnis	102
III.	Tabellenverzeichnis	104
IV.	Anhang	105
V.	Danksagung	106
VI.	Publikationen und Kongressbeiträge	107
VII.	Lebenslauf	108

1 Einleitung

Tumorerkrankungen waren 2019, nach Erkrankungen des Kreislaufsystems, die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Den aktuellen Daten des statistischen Bundesamtes nach zu Folge, sind 2019 von insgesamt 939.520 Todesfällen in Deutschland rund ein Viertel (231.318; 24,6%) an einer Krebserkrankung verstorben (1). Statistiken der letzten Jahre zeigen insgesamt eine Zunahme der Anzahl der neudiagnostizierten bösartigen Neubildungen in der Bevölkerung. Zurückzuführen ist dies besonders auf die demografische Entwicklung. Dem Bericht „Krebs in Deutschland für 2015/2016“ aus dem Jahr 2019 nach zu Folge, ist in Deutschland von 2015 bis 2030 mit einem Anstieg der Krebsneuerkrankungen um ca. 23% zu rechnen (2). Tumorerkrankungen nehmen folglich eine immer bedeutendere Rolle für die Bevölkerung ein.

Sterbefälle in Deutschland 2019

nach Todesursachen in Prozent



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021

Abbildung 1: Sterbefälle in Deutschland nach Todesursachen 2019

Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021 (1).

1.1 Grundlagen der Peritonealkarzinose

Die Peritonealkarzinose ist charakterisiert durch Absiedlungen von Tumorzellen verschiedener abdomineller und pelviner Tumorerkrankungen in das Peritoneum. Das Peritoneum ist eine seröse Membran, unterteilt in zwei Schichten, dem Peritoneum viszerale und dem Peritoneum parietale. Ersteres bedeckt den Großteil der intraabdominellen Organe sowie Teile der Beckenorgane. Das Peritoneum parietale kleidet die Bauchhöhle und Teile der Beckenhöhle von innen aus. Die seröse Membran ermöglicht primär den Austausch von Flüssigkeiten und Zellen innerhalb der Peritonealhöhle. Des Weiteren wird durch die Sezernierung von zirkulierender Peritonealflüssigkeit aus den mesothelialen Zellen des Peritoneums die Verschiebbarkeit der Bauch- und Beckenorgane gegeneinander gewährleistet (3, 4).

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese

Die Peritonealkarzinose tritt, mit Ausnahme der primären Peritonealtumoren wie dem peritonealen Mesotheliom oder dem primär papillär serösen Peritonealkarzinom (5), meist als Dissemination von Tumorzellen im Spätstadium gastrointestinaler oder gynäkologischer Malignome wie dem Pankreas-, Magen-, Kolorektal- oder Ovarialkarzinom auf (6,7). Bei der exploratorischen Laparoskopie zur potenziell kurativen Resektion des Primärtumors wird bei 10-20% der Magenkarzinompatienten bereits eine Peritonealkarzinose festgestellt (6). Unter den Kolorektalkarzinompatienten findet man bei Erstdiagnose bereits ungefähr 10% mit peritonealem Tumorbefall (7, 8). Da der Befall des Peritoneums meist ein fortgeschrittenes Stadium des Primärmalignoms anzeigt, ist die Peritonealkarzinose mit einer schlechten Prognose und geringer medianer Überlebenszeit von weniger als 6 Monaten vergesellschaftet (8-10).

Die Dissemination der Tumorzellen läuft im Sinne einer peritonealen Metastasierungskaskade ab. Im ersten Schritt geht man von einer spontanen Zellablösung aus dem Primärtumor aus, welche auf einem Zusammenspiel mehrerer Prozesse, wie beispielsweise der Herunterregulierung von

Adhäsionsmolekülen (E-Cadherin) auf der Tumoroberfläche oder einem erhöhten interstitiellen Druck im Tumor beruht. Des Weiteren ist eine iatrogene Tumorzellverschleppung im Rahmen der chirurgischen Versorgung des Primarius möglich. Letzteres kann zum Austritt maligner Zellen führen, die über verletzte Blut- oder Lymphgefäße in die Peritonealhöhle gelangen. Darüber hinaus kann der Primärtumor im fortgeschrittenen Stadium spontan rupturieren und ermöglicht somit eine direkte Verschleppung der malignen Zellen in die Peritonealhöhle. Der intraperitoneale Transport der malignen Zellen wird durch verschiedene Faktoren wie die Schwerkraft, gastrointestinale, peristaltische Bewegungen und intraabdominelle Druckschwankungen während der Atmung ermöglicht. Zudem entwickeln die Tumorzellen motilitätsfördernde Aktinfilamente in Form von Lamellipodien und Filopodien, die eine zusätzliche Fortbewegung der Zellen ermöglichen. Die Bindung der Tumorzellen an die peritonealen Mesothelzellen erfolgt auf zwei Wegen. Zum einen transmesothelial über Adhäsionsmoleküle (CAM; *cellular adhesion molecules*) wie ICAM-1, VCAM-1 oder PECAM-1, zum anderen über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, die zu einer weiteren Stimulation der Adhäsionsmolekülen führen und die Invasion der malignen Zellen in subperitoneale Schichten erleichtern (4, 5, 11). Über den translymphatischen Weg erlangen die Tumorzellen Anschluss an submesotheliale Lymphgefäße, wobei sich eine Präferenz des Befalls von sogenannten ‚*milky spots*‘ bevorzugt im Omentum majus zeigt. Diese ‚*milky spots*‘ sind immunkompetente Zellaggregate, vorwiegend bestehend aus Makrophagen, Lymphozyten und einer glomerulärartigen Dichte an Blutkapillaren. Die Produktion von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) in den Mesothelzellen der ‚*milky spots*‘ fördern die Angiogenese, was ein frühes Überleben von Tumorzellen ermöglicht und die bevorzugte Ansiedlung an diesen Orten erklären kann (4, 11-13).

1.1.2 Krankheitsbild und Diagnose

Peritonealkarzinosepatienten zeigen meist zunächst sehr unspezifische Symptome. Darunter zählen diffuse abdominelle Schmerzen, Übelkeit,

Erbrechen, Durchfälle, Blähungen und Gewichtsverlust. Mit fortschreitender Erkrankung entwickelt sich häufig Aszites. Bei kolorektalen Primärtumoren und darauffolgendem peritonealen Befall kann man auch intestinale Obstruktionen beobachten (14). Neben einer ausführlichen Anamneseerhebung, körperlicher Untersuchung des Patienten sowie einer orientierenden Sonographie und der Bestimmung von entitätsspezifischen Tumormarkern, kommt zur Stützung der Verdachtsdiagnose der Peritonealkarzinose bevorzugt die Computertomographie mit Kontrastmittel als bildgebendes Verfahren zum Einsatz. Eine Alternative stellt die kontrastmittelgestützte Magnetresonanztomographie oder auch die Kombination aus Computertomographie und Positronen-Emissions-Tomographie (PET/CT) dar. Um eine direkte Einschätzung des peritonealen Befalls des Patienten treffen zu können, ist häufig jedoch eine exploratorische Laparoskopie von Nöten, die zudem auch histologische Untersuchungen erlaubt (3, 15, 16).

1.1.3 Therapieoptionen

Jahrelang galt die Behandlung mit systemischer Chemotherapie und gegebenenfalls symptomorientierter Chirurgie bei Patienten mit Peritonealkarzinose mit kolorektalem Ursprungstumor als einzige Therapieoption sowie meist ausschließlich zur Symptomlinderung und palliativ (17). Mehrere größere Studien zur palliativen, systemischen Chemotherapie, wie beispielsweise von Chu et al. (18), Sadeghi et al. (10), Jayne et al. (9) oder Verwaal et al. (19), konnten belegen, dass das mediane Überleben bei dieser Behandlungsoption jedoch nur zwischen 5-12 Monaten liegt.

In den letzten Jahrzehnten haben sich die Behandlungsmöglichkeiten indessen verbessert und es hat sich eine Kombination aus zytoreduktiver Chirurgie (CRS, *cytoreductive surgery*) mit angeschlossener hyperthermer, intraperitonealer Chemotherapie (HIPEC, *hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*) etabliert. Die CRS dient dabei der Entfernung der makroskopisch sichtbaren Tumormasse, die HIPEC der Eradikation von verbleibenden Mikrometastasen (17, 20). Studien, wie beispielsweise Verwaal et al. (19) oder Suo et al. (21),

liefern dabei vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf das Überleben nach einer kombinierten Therapie, bestehend aus CRS und HIPEC.

1.1.3.1 Zytoreduktive Chirurgie

Die zytoreduktive Chirurgie dient der Entfernung makroskopisch sichtbarer Tumormassen des Peritoneums. Paul H. Sugarbaker beschreibt in seinen Publikationen diese Art von CRS als ein Konzept der Peritonektomie, mit dem Ziel der maximalen Zytoreduktion, bestehend aus bis zu fünf verschiedenen chirurgischen Prozeduren sowie weiteren viszeralen Resektionen. Ein aggressives Vorgehen in Form der maximalen Zytoreduktion ist im Hinblick auf das Langzeitüberleben der Patienten dabei von essenzieller Bedeutung. Für die erfolgreiche Behandlung der Peritonealkarzinose ist neben der CRS die Kombination mit der HIPEC, die perioperativ im Anschluss an die CRS durchgeführt wird, von großer Bedeutung (22, 23).

1.1.3.2 HIPEC

Um den größten Nutzen der hyperthermen intraperitonealen Chemopfusion zu erlangen, wird sie häufig intraoperativ, unmittelbar im Anschluss an die CRS durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt sind die verbliebenen Tumorzellen noch nicht von Fibrin eingeschlossen und es hat noch keine Kompartimentierung der Peritonealhöhle als Folge des chirurgischen Eingriffs stattgefunden (24). Die HIPEC dient hauptsächlich der Beseitigung von postoperativ verbliebenen Mikrometastasen im Peritoneum. Nicht zu vernachlässigen sind jedoch die mit der Behandlung assoziierten hohen Raten an Morbidität und Mortalität (25-27). Demnach ist eine kritische und individuelle Abschätzung jedes Patienten im Hinblick auf den mit der Therapie verbundenen Nutzen und die Risiken und Komplikationen notwendig.

Die intraperitoneale Chemoperfusion kann bei offenem oder geschlossenem Abdomen durchgeführt werden. Die Zirkulation der Trägerlösung mit Zytostatika wird durch mehrere Zu- und Abflussschläuche in der Peritonealhöhle

gewährleistet, die mit einer Perfusionspumpe verbunden sind. Durch Temperatursonden und einen Wärmetauscher wird eine konstante Temperatur des Perfusats sichergestellt. Die intraabdominell zu erreichende Zieltemperatur liegt zwischen 41-43°C. Die Dauer der Behandlung (30-120 min), Zieltemperatur sowie verwendete Zytostatika variieren je nach Behandlungszentrum und verwendetem Protokoll (28-32).

Ziel der HIPEC-Therapie bei der Peritonealkarzinose sind lokal hohe Konzentrationen an Zytostatikum in der Peritonealhöhle, verbunden mit einer guten Absorption durch die Oberfläche des Peritoneums und geringer systemischer Toxizität. Die in der Behandlung eingesetzten Zytostatika zeichnen sich besonders durch ein hohes Molekulargewicht sowie eine gute Wasserlöslichkeit (Hydrophilie) aus, was ihnen eine verlängerte Retention in der Peritonealhöhle sowie die reduzierte systemische Absorption und damit verbundene Toxizität ermöglicht. Die pharmakokinetischen Eigenschaften der Chemotherapeutika werden zusätzlich durch verschiedene Parameter, wie pH-Wert, Temperatur oder auch das Volumen der Trägerlösung, beeinflusst.

Bevorzugt zum Einsatz kommen in der HIPEC-Therapie der Peritonealkarzinose mit gastrointestinalem Primärtumor Mitomycin C (MMC), Oxaliplatin (OXA) sowie Cisplatin und Doxorubicin. Als Alternativen oder teils auch Kombinationspartner stehen zusätzlich eine ganze Reihe weiterer Chemotherapeutika wie 5-Fluoruracil (5-FU), Carboplatin, Melphalan, Gemcitabine, Mitoxantrone, Etoposide, Irinotecan, Paclitaxel und Docetaxel zur Verfügung (27, 33-37).

Bei ausgewählten Zytostatika, wie beispielsweise Mitomycin C, Oxaliplatin, Cisplatin oder Doxorubicin, können unter hyperthermen Bedingungen synergistische Effekte im Hinblick auf antitumorale Eigenschaften festgestellt werden, die sich in Form von zunehmender Zytotoxizität und einer höheren Konzentration des Chemotherapeutikums im peritonealen Tumorgewebe bemerkbar machen (34, 38, 39).

Zusätzlich induziert Hyperthermie allein bereits zytotoxische Effekte im Sinne einer Denaturierung von Proteinen, antitumoralen Immunreaktionen sowie

Inhibierung von DNA-Reparaturmechanismen und nimmt zudem Einfluss auf die Zellmembran, das Zytoskelett sowie die Synthese von Makromolekülen in neoplastischen Zellen (34, 40-42).

2 Molekularbiologische Grundlagen

2.1 Heat Shock Proteine

Heat shock proteins (HSP, Hitzeschockproteine) fungieren primär als molekulare Chaperone, die auf physikalische und chemische Stressfaktoren in ihrer Umgebung, wie Hitzestress, Zytostatika, oxidativem Stress oder Ischämie, mit einer verstärkten Expression reagieren. Sie wirken dabei als zelluläre Protektoren und begünstigen das Überleben der Zelle unter Stressbedingungen. Eine bedeutende Rolle spielen sie in der Konformationsherstellung von neu synthetisierten sowie fehlgefalteten Proteinen und verhindern damit eine Aggregation dieser Proteine. Darüber hinaus wirken HSPs anti-apoptotisch, indem sie mit Proteinen der apoptotischen Signalkaskade interagieren und die Caspase-Aktivierung der intrinsischen wie auch der extrinsischen Signalwege stören (**Abbildung 2**). Infolgedessen tragen sie zur reduzierten Apoptose und dem Überleben der Zelle bei. Zusätzlich sind sie für die Förderung von Proliferation und Angiogenese mit verantwortlich (43-45).

Die Einteilung der *heat shock proteins* erfolgt anhand ihres Molekulargewichts (Kilodalton, kDa) in die vier Hauptklassen HSP90, HSP70, HSP60 und die kleinen HSPs wie HSP27. Die Expression erfolgt entweder konstitutiv oder wird durch zelluläre Stresszustände getriggert. HSPs mit niedrigem Molekulargewicht arbeiten Adenosintriphosphat (ATP)-unabhängig, wohingegen die größeren Chaperone wie HSP60, 70 und 90 nur ATP-abhängig arbeiten (44, 46). Eine verstärkte Expression von HSPs konnte in verschiedenen Tumorerkrankungen festgestellt werden und ist häufig mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Therapieresistenz assoziiert (47).

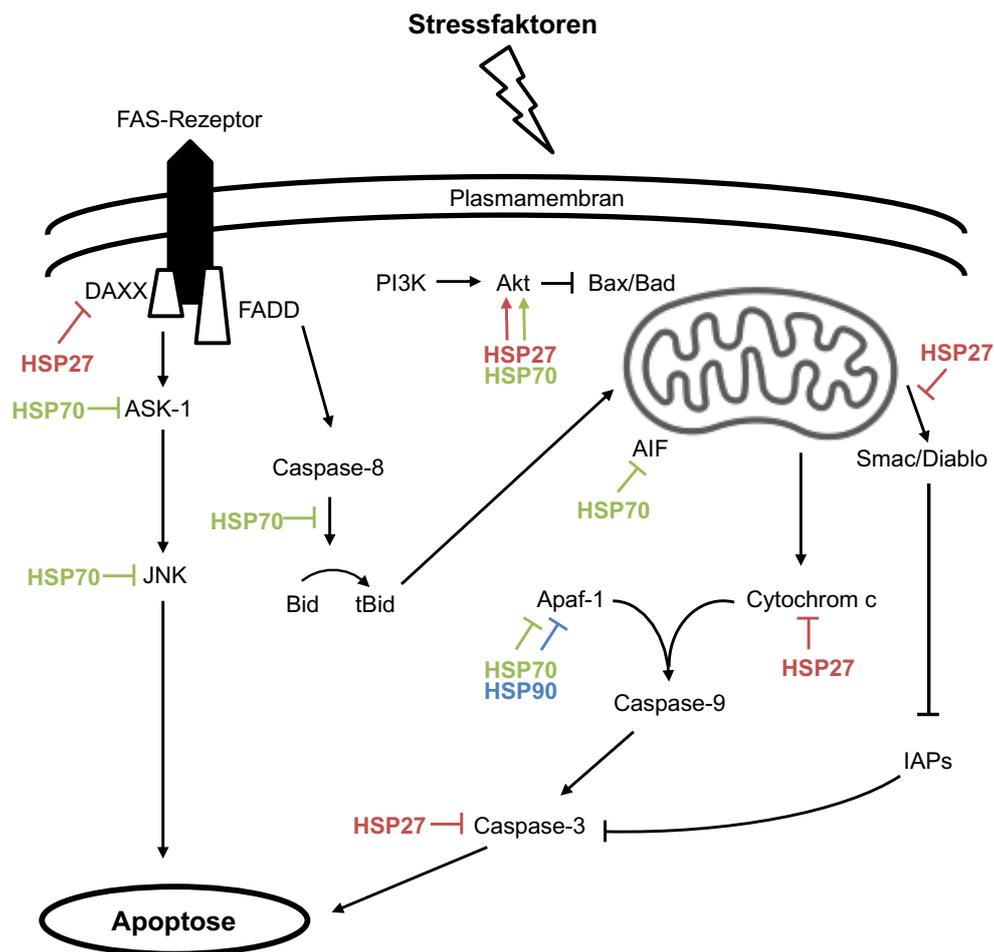


Abbildung 2: Übersicht der Interaktion von HSP27, HSP70 und HSP90 mit Signalwegen der Apoptose

HSP27, HSP70 und HSP90 modulieren über die Interaktion mit verschiedenen Proteinen der intrinsischen und extrinsischen Signalkaskade die Apoptose. (Aktivierung: \longrightarrow ; Inhibierung: \longleftarrow). Modifiziert nach Lanneau et al. (44) und Boudesco et al. (48).

2.1.1 HSP27

Das *heat shock protein 27* gehört zur Familie der kleinen *small HSPs* (sHSPs), deren Molekulargewicht zwischen 15 und 30 kDa liegt. Das Chaperon arbeitet ATP-unabhängig und ist eines der meist untersuchten in der Familie der sHSPs. HSP27 kann abhängig von der Phosphorylierung des Proteins sowie Stresszuständen Oligomere mit einem Molekulargewicht von bis zu 1000 kDa bilden. Seine Dephosphorylierung fördert dabei die Bildung von großen

Oligomeren. Die Phosphorylierung ist an drei Serin-Resten des Chaperons möglich und wird durch die MAPKAP Kinasen 2 und 3 katalysiert (44, 49). Große Oligomere schützen die Zelle besonders vor Aggregation von Proteinen und weisen zusätzlich anti-oxidative Eigenschaften auf. HSP27 ist in der Lage eine erhöhte Konzentration an Glutathion in reduziertem Zustand in der Zelle aufrecht zu erhalten, das reaktive Sauerstoffspezies (Sauerstoffradikale) abfängt, indem es selbst oxidiert wird und damit die Oxidation von Proteinen verhindert. Kleine Oligomere begünstigen, abhängig vom Stressstimulus, die Ubiquitinierung und Degradation von bestimmten Proteinen und sind darüber hinaus für die Stabilisierung von Aktinfilamenten zur Sicherung der zytoskelettalen Stabilität in der Zelle verantwortlich (46, 49, 50). HSP27 wirkt des Weiteren anti-apoptotisch und nimmt dabei direkten Einfluss auf Schlüsselproteine der Apoptosekaskade (**Abbildung 2**). Dabei beeinflusst das Chaperon sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Signalweg (51). Durch die Bindung an Cytochrom c nach dessen Freisetzung aus dem Mitochondrium ins Zytosol, verhindert HSP27 die Interaktion mit Apaf-1 (*apoptotic peptidase-activating factor 1*) und folgender Aktivierung von Caspase-9, was schließlich zur Inhibierung von Caspase-3 führt und den nachfolgenden Apoptoseprozess verhindert (52). Zudem kann HSP27 direkt Einfluss auf die Caspase-3 Aktivierung nehmen, indem es mit dem Pro-Caspase-3-Komplex interagiert (53). Ebenso behindert HSP27 die Freisetzung des Smac/Diablo Proteins (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI*), welches in der Regel durch Bindung an IAPs (*inhibitors of apoptosis*) deren inhibitorische Wirkung auf die Apoptose aufhebt. Infolgedessen liegen die IAPs unter erhöhten HSP27 Expressionsspiegeln in aktiver Form vor und inhibieren die Apoptose (54). Die phosphorylierte Form von HSP27 interagiert mit DAXX (*death domain-associated protein*), welches im Regelfall nachfolgend die Proteinkinase ASK-1 (*apoptosis-signal-regulated-kinase 1*) aktiviert, die wiederum für eine Aktivierung von JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) und die darauffolgende Apoptose verantwortlich ist. Durch die Interaktion wird ASK-1 nicht aktiviert und die nachfolgende Apoptose bleibt aus (55, 56). Zudem nimmt das Chaperon

HSP27 Einfluss auf die Apoptosekaskade, indem es an die Proteinkinase B (Akt) bindet und diese aktiviert. Infolgedessen wird Bax (*Bcl-2-associated X protein*) gehemmt, welches für die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren verantwortlich ist. Folglich wird der Apoptoseprozess verhindert (57, 58). Über die Aktivierung der Proteinkinase Akt interagiert HSP27 außerdem mit dem sogenannten PI3K/Akt (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*) Signalweg, der wiederum Tumorwachstum und Proliferationsprozesse beeinflusst (59, 60).

Da das *heat shock protein 27*, wie oben bereits beschrieben, auf unterschiedliche Weise besonders antiapoptotisch wirkt und somit wesentlich zum Überleben der Zelle beiträgt, ist es nicht verwunderlich, dass unter Stress eine verstärkte Expression von HSP27 stattfindet. Für Tumorzellen ist die Expression des *heat shock proteins* daher von großer Bedeutung, da der zytoprotektive Effekt das Überleben der Tumorzelle sichert. Infolgedessen sind hohe Expressionsspiegel in Tumorzellen keine Seltenheit und werden durch äußere Einflüsse wie Bestrahlung, zytotoxische Behandlung, oxidativer Stress und Hyperthermie zusätzlich verstärkt. Therapieresistenzen und eine schlechtere Prognose erscheinen so vorstellbar (45, 47).

2.1.2 HSP70

Zur *heat shock protein 70* Familie zählen das stressinduzierte HSP70, das konstitutiv exprimierte HSC70, das mitochondriale HSP75 sowie das GRP75, welches im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (55). HSP70 arbeitet im Gegensatz zu HSP27 als ATP-abhängiges Chaperon. Unter normalen Bedingungen kommt ihnen eine bedeutende Rolle bei der Konformationsherstellung neu synthetisierter Proteine, dem Zusammenbau von Multiproteinkomplexen sowie dem Transport von Proteinen über die Zellmembran zu. Das Chaperon verfügt über zwei funktionelle Regionen: eine carboxyterminale peptidbindende Domäne (PBD) und eine aminoternale ATPase Domäne (ABD). Die carboxyterminale Domäne des PBD bindet das Substrat und ist für die Neufaltung des Zielproteins zuständig. Die ABD ist für

die Freilassung des Substrates nach der ATP-Hydrolyse verantwortlich. Eine Expressionssteigerung von HSP70 unter Stressbedingungen hilft der Zelle die ansteigende Zahl von fehlgefalteten und denaturierten Proteinen zu bewältigen und eine Aggregation solcher zu verhindern. Darüber hinaus wirken HSP70 über viele Wege anti-apoptotisch, indem sie mit Proteinen der apoptotischen Signalkaskade interagieren (**Abbildung 2**) (59, 61, 62).

Prämitochondrial verhindert HSP70 durch die Interaktion mit ASK-1 und JNK weitere Schritte in der apoptotischen Signalkaskade (63). Durch die direkte Bindung von HSP70 an Bax, ein Mitglied der proapoptotischen Familie Bcl-2 (*b-cell-lymphoma-protein 2*), wird dessen Translokation und damit die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran verhindert. Folglich wird die Freisetzung von mitochondrialen proapoptotischen Faktoren wie Cytochrom c und AIF (*Apoptosis inducing factor*) blockiert (64).

Des Weiteren ist das Chaperon für die Inhibierung der Spaltung von Bid zu tBid (*truncated Bid*) und die damit ausbleibende Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma verantwortlich (65).

Durch die direkte Interaktion mit Apaf-1 verhindert HSP70 postmitochondrial die Bildung eines funktionellen Apoptosom-Komplexes sowie die Aktivierung von Procaspase-9, was zur Hemmung des apoptotischen Signalweges führt (66).

2.1.3 HSP90

Die *heat shock protein* 90 Familie besteht aus einer Vielzahl an Isoformen, wobei sich die beiden wichtigsten Formen HSP90 alpha und HSP90 beta im Zytoplasma befinden. Beide Isoformen werden konstitutiv exprimiert, wohingegen HSP90 alpha, im Gegensatz zu HSP90 beta, eine stark hitzeinduzierte Expressionssteigerung zeigt (49, 67). Im Normalzustand der Zelle macht HSP90 ca. 1-2% der gesamten zytosolischen Proteine aus. Um die Zelle vor proteotoxischem Stress zu schützen und die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase zu gewährleisten, kommt es unter Stressbedingungen zu einer Expressionssteigerung auf ca. 4-6%. HSP90 spielt dabei eine große Rolle bei der korrekten Faltung, Reifung und funktionalen Stabilität einer Vielzahl von

Zielproteinen, die sogenannten Klientenproteine. Sie regulieren unter anderem die Signaltransduktion, den Proteintransport, die Proliferation sowie das Überleben der Zelle. HSP90 verfügt über drei funktionelle Domänen, von denen die sogenannte N-terminale Domäne mit einer ATPase-Funktion ausgestattet ist und die Aktivierung der HSP90-Klientenproteine ermöglicht (68, 69). Ebenso wie andere HSPs, wirkt auch HSP90 über mehrere Wege antiapoptotisch (**Abbildung 2**). Wie auch HSP70 verhindert es beispielsweise durch die direkte Interaktion mit Apaf-1 die Bildung eines funktionellen Apoptosom-Komplexes sowie die Aktivierung von Procaspase-9 (70). Darüber hinaus führt HSP90 durch das Eingreifen in die Signaltransduktionskaskade von NF- κ B (nukleärer Faktor κ B) über mehrere Zwischenschritte zu vermehrten aktiven Transkriptionsfaktoren von antiapoptotischen Proteinen (71). Als weitere HSP90-Klientenproteine konnten das antiapoptotisch wirkende Protein Bcl-2 sowie mutierte Fusionsproteine wie BCR-ABL identifiziert werden. Über die Interaktion mit HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor-1 α*), VEGF sowie die Regulierung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS, *nitric oxide synthase*) nimmt HSP90 außerdem Einfluss auf die Angiogenese (49). Durch die Interaktion von extrazellulärem HSP90 alpha mit MMP2 (*matrix metalloproteinase 2*), einer Protease, die unter physiologischen Umständen dem Abbau extrazellulärer Matrix dient, wird die Invasion von Tumorzellen und somit die Metastasierung begünstigt (72).

2.2 Proliferationsmarker

2.2.1 PCNA

PCNA (*proliferating-cell-nuclear-antigen*) ist ein ringförmig angeordnetes Protein, bestehend aus drei identischen Untereinheiten (Homotrimer), die wiederum aus je zwei Domänen bestehen. Die sechs Domänen, aufgebaut aus je zwei α -Helices, bilden das Innere des Rings, der von sechs äußeren β -Einheiten umgeben wird. Über die insgesamt zwölf innenliegenden α -Helices kann PCNA mit der DNA (*desoxyribonucleic acid*) interagieren. Durch seine ringförmige Struktur ist es in der Lage die DNA zu umschließen und verhindert

damit die Dissoziation der DNA-Polymerasen während der DNA-Replikation. Als Hilfsprotein für die Polymerase δ sowie ϵ steigert es folglich dessen Aktivität und Prozessivität (73). Neben den genannten Aufgaben während der DNA-Synthese interagiert PCNA mit zahlreichen weiteren Proteinen und ist beispielsweise in eine Reihe von Reparaturmechanismen wie Basen-/Nukleotidexzisions- oder Mismatch-Reparaturen involviert. Durch die Interaktion mit Regulatoren des Zellzyklus, wie zum Beispiel dem Protein p21, kommt es bei DNA-Schäden zum Zellzyklusarrest und die DNA-Replikation wird gestoppt. Dieser Arrest gibt der Zelle die Möglichkeit etwaige Schäden des DNA-Strangs zu beseitigen (74).

Aufgrund der oben beschriebenen Beteiligung von PCNA an zahlreichen Prozessen des Zellzyklus wird das Antigen standardmäßig in der Forschung als Zellproliferationsmarker angewendet. Eine erhöhte Expression von PCNA geht folglich mit einer gesteigerten Proliferation einher. Als prognostischer Marker kommt er zum Beispiel in der Brustkrebsdiagnostik zum Einsatz (75).

2.2.2 Ki-67

Ki-67 ist ein Protein, welches im direkten Zusammenhang mit der Zellproliferation steht. Da Ki-67 ausschließlich in den aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-Phase, Synthese-Phase, G2-Phase und Mitose-Phase) exprimiert wird und in der Ruhephase (G0-Phase) fehlt, eignet es sich besonders zum Nachweis der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation und kommt in der Forschung routinemäßig als Proliferationsmarker zum Einsatz. Während der Interphase (G1-, S- und G2-Phase) findet sich Ki-67 im Zellkern, während es sich in der Mitosephase auf die Oberfläche der Chromosomen verlagert (76). Ki-67 verfügt über mehrere funktionelle Domänen, darunter die sogenannte FHA-Domäne (*forkhead-associated domain*), eine PP1 (*protein-phosphatase 1*)-bindende Domäne sowie eine Chromatin-bindende Domäne (77, 78). Über die Interaktion von Ki-67 mit dem Kinesin-ähnlichen Motorprotein Hklp2 (*human kinesin-like protein 2*) ist das Protein an der Formation und Aufrechterhaltung des Spindelapparates in der Mitose-Phase des Zellzyklus

beteiligt (77, 79). Des Weiteren scheint Ki-67 Einfluss auf die Organisation von nukleolärem Heterochromatin zu nehmen (80) und ist zudem durch die Bindung an PP1 in zelluläre Prozesse während der Anaphase involviert. Viele weitere Funktionsweisen von Ki-67 sind noch immer nicht vollständig erforscht und bleiben Bestand weiterer Untersuchungen (78, 79).

2.3 Apoptosemarker

2.3.1 Bcl-xL

Bcl-xL (*b-cell lymphoma extra-large; BCL2L1*) gehört zur Familie der Bcl-2-Proteine, die als Regulatorproteine der Apoptose fungieren. Die Bcl-2-Familie kann vereinfacht in zwei Gruppen eingeteilt werden, zum einen die anti-apoptotisch, zum anderen die pro-apoptotisch wirkenden Proteine. Wichtige Vertreter der pro-apoptotischen Proteine sind Bad (*Bcl-2-associated death promoter*), PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), Bax und Bak (*Bcl-2 homologous antagonist killer*). Bcl-xL gehört, neben Bcl-2, zu den Hauptvertretern der anti-apoptotisch wirkenden Regulatorproteine und ist in den Mitochondrien lokalisiert (81, 82). Ein Charakteristikum der Bcl-2-Familie sind sogenannte BH-Domänen (*Bcl-2 homology motifs*; konservierte Sequenzmotive), von denen jedes Bcl-2 verwandte Molekül wenigstens eine der vier Bcl-2-Homologiedomänen (BH1-4) enthält. Anti-apoptotisch wirkende Vertreter wie Bcl-xL und Bcl-2 besitzen alle vier BH-Domänen. Über die Domänen BH1, BH2 und BH3 interagieren sie mit pro-apoptotischen Familienmitgliedern der Bcl-2-Familie und regulieren diese, die Inhibierung der Apoptosekaskade ist die Folge. Über die für Bcl-xL und Bcl-2 charakteristische BH4-Domäne haben sie die Möglichkeit an weitere Proteine außerhalb der Bcl-2-Familie zu binden, um neben der klassischen Rolle der Apoptose-Inhibitoren auch Einfluss auf zelluläre Prozesse, wie beispielsweise Proliferation, Zellmigration, DNA-Reparaturmechanismen und Angiogenese zu nehmen (83, 84). Verschiedene zelluläre Stressfaktoren, wie zum Beispiel DNA-Schäden oder Hypoxie führen in gesunden Zellen zur Aktivierung der Apoptosekaskade und regulieren somit die Expressionsspiegel von pro- und anti-apoptotischen

Bcl-2-Proteinen. Somit kann eine Homöostase zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod gewährleistet werden (81, 82). Pro-apoptotisch wirkende Proteine, wie PUMA, Bad oder Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) werden bei oben genannten Stressfaktoren hochreguliert und/oder antiapoptotisch wirkende Proteine herunterreguliert. Nachfolgend kommt es zur Aktivierung der Effektorproteine Bax und Bak, was eine Veränderung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran zur Folge hat. Cytochrom c und Smac, weitere proapoptotische Effektorproteine, werden in das Zytosol freigesetzt. Das freigesetzte Cytochrom c bindet an Apaf-1 und Pro-Caspase 9, was über eine Caspasen-Kaskade letztlich zum Zelltod führt. Die Freisetzung von Smac führt währenddessen zur Antagonisierung von sogenannten Caspase-Inhibitoren (IAPs) und unterstützt somit ebenfalls den Ablauf der Apoptosekaskade. In der Tumorgenese entwickeln Krebszellen die Fähigkeit die Apoptose zu umgehen, indem zum Beispiel anti-apoptotisch wirkende Proteine wie Bcl-xL und Bcl-2 überexprimiert werden (85, 86). Es kommt, wie oben beschrieben, zur Inhibierung der Apoptose sowie zu weiteren zellulären Interaktionen, die die Proliferation, Zellmigration, DNA-Reparaturmechanismen und Angiogenese beeinflussen und damit das Überleben der Krebszelle sichern. Zu einer Überexpression anti-apoptotischer Faktoren kann es durch genetische Veränderungen, wie zum Beispiel einer chromosomalen Translokation wie bei Bcl-2 kommen (87).

3 Fragestellung dieser Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, anhand eines bereits etablierten *in vitro* HIPEC-Modells sowohl Fragen zu Auswirkungen der äußeren Stressoren Hyperthermie und Zytostatika auf die Expression von Hitzeschockproteinen als auch Effekte der hyperthermen Chemotherapie auf die Tumorzellproliferation und Apoptose zu untersuchen.

1. Welchen Einfluss hat die isolierte Hyperthermie sowie die Kombination mit verschiedenen Zytostatika auf die Expression von Hitzeschockproteinen *in vitro* in den humanen Kolonkarzinomen HT29, SW480 und SW620? Sind Unterschiede in der Expression von Hitzeschockproteinen bei verschiedenen Temperaturstufen und Regenerationszeiten zu erkennen?
2. Welchen Effekt haben Hyperthermie und verschiedene Zytostatika auf die Zellproliferation in den untersuchten Kolonkarzinomen?
3. Welche Auswirkungen haben die gewählten Zytostatika sowie die Hyperthermie auf die Expression von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen wie Bcl-xL?
4. Welchen Einfluss hat die hypertherme Chemotherapie auf Proliferation und Apoptose in Peritonealkarzinoseherden, entnommen aus Patienten nach HIPEC? Können die Beobachtungen aus den *in vitro* Untersuchungen der humanen Kolonkarzinome anhand der *ex vivo* untersuchten Patientenproben bestätigt werden?
5. Welche Schlussfolgerungen lassen sich aus den Untersuchungen für die Klinik ableiten?

4 Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Aus einem Patientenkollektiv von 63 Patienten mit Peritonealkarzinose eines metastasierten Kolonkarzinoms oder anderem Primärtumor, die im Zeitraum von Oktober 2008 bis April 2011 im Sinne eines multimodalen Behandlungskonzepts (CRS und HIPEC) therapiert wurden, wurden 24 in die Studie eingeschlossen. Nach Aufklärung und Einverständniserklärung der Patienten zur Teilnahme an der Studie, sowie Zustimmung der Ethikkommission (EK 8/11), wurden intraoperativ vor und nach der HIPEC Therapie Biopsien des Peritonealkarzinoms entnommen. Dabei wurde die HIPEC-Therapie stets nach definiertem Konzept, sprich einstündiger Perfusion der Bauchhöhle mit erwärmter chemotherapeutischer Flüssigkeit (41°C) über eine externe Pumpe, bei zuvor durchgeführter Resektion der Tumormassen, durchgeführt.

Die entnommenen Proben wurden zur späteren Gewinnung von Proteinen sofort in flüssigem Stickstoff konserviert, jene zur RNA (*ribonucleic acid*) Extraktion in RNAlater Tissue Protect tubes aufbewahrt. Zur späteren Herstellung von Kryostatschnitten wurde das Gewebe in Tissue-Tek® OCT Compound eingebettet.

4.2 Material

4.2.1 Zellkulturen

Tabelle 1: Zellkulturen

Zelllinie	Zelltyp	Hersteller
HT-29	humanes kolorektales Adenokarzinom	ATCC® (Manassas, Virginia, USA)
SW480	humanes kolorektales Adenokarzinom, Dukes' Typ B	ATCC® (Manassas, Virginia, USA)

SW620	humanes kolorektales Adenokarzinom, Dukes' Typ C, Lymphknotenmetastase	ATCC® (Manassas, Virginia, USA)
-------	--	---------------------------------

4.2.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Zellkulturmedien

Nährmedium	Zusammensetzung	Hersteller
McCoy's 5A Medium mit L-Glutamin	10 % fetales Kälberserum (FCS, Fetal Calf Serum), 1% Penicillin / Streptomycin	ATCC® (Manassas, Virginia, USA)
RPMI Medium 1640	10 % fetales Kälberserum (FCS, Fetal Calf Serum), 1% Penicillin / Streptomycin	Gibco® by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)

4.2.3 Chemikalien, Gebrauchsfertige Puffer, Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien, Gebrauchsfertige Puffer, Reagenzien

Chemikalien, Gebrauchsfertige Puffer, Reagenz	Hersteller
5-Fluoruracil (5-FU)	Medac (Wedel, Deutschland)
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)
Mitomycin C (MMC)	Medac (Wedel, Deutschland)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
MTS-Reagenz CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega (Mannheim, 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)
Oxaliplatin (OXA)	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Penicillin / Streptomycin	Gibco® by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
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 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)
Roti®-Quant	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SuperSignal® West Pico Chemilumineszenzsubstrate	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
SuperSignal® West Femto Chemilumineszenzsubstrate	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
Tissue-Tek® OCT Compound	Sakura (Torrance, Kalifornien, USA)
Trypanblau Lösung (0.4 %)	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO)
Trypsin / EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Lösung 0,05 % / 0,02 % (w/v) in PBS	Biochrom (Berlin, Deutschland)

4.2.4 Selbst hergestellte Puffer

Tabelle 4: Selbst hergestellte Puffer

Selbst hergestellte Puffer	Zusammensetzung
Lösungen zum Blocken	5 % (m/v) Magermilchpulver in TBS-T 0,1 % 5 % (m/v) BSA in TBS-T 0,1 %
RIPA-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 1 % (m/v) NaDOC 1 % (m/v) SDS 5 mM (m/v) NaF vor Verwendung zugefügt: 1 mM DTT 5 mM Proteaseinhibitor-Cocktail
0.05% TBS-T (<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>)	500 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 pH 7,4

4.2.5 Kits

Tabelle 5: 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)

4.2.6 Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 6: Primäre Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
HSP27 (Maus)	monoklonaler Antikörper (mAk)	1:1000 in 5 % (m/v) Magermilchpulver in TBS-T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)
HSP70 (Maus)	mAk	1: 3000 in 5 % (m/v) Magermilchpulver in TBS-T 0,1 %	Abcam® (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
HSP90 (Hase)	mAk	1:2000 in 5 % (m/v) BSA in TBS-T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)
Bcl-xL (Hase)	mAk	1:1000 in 5 % (m/v) BSA in TBS-T 0,1 %	Abcam® (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
PCNA (Hase)	mAk	1:1500 in 5 % (m/v) BSA in TBS-T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)

PCNA (Maus)	mAk	1:500 in 5 % (m/v) BSA in TBS-T 0,1 %	Abcam® (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
β-Aktin (Hase)	mAk	1:1500 in 5 % (m/v) BSA in TBS- T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Goat anti-mouse IgG- HRP (Ziege)	1:3000 in 5 % (m/v) Magermilchpulver in TBS- T 0,1 %	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
Goat anti-rabbit IgG- HRP (Ziege)	1:2000 in 5 % (m/v) Magermilchpulver in TBS- T 0,1 %	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
HRP- conjugated β-Aktin	1:1500 in 5 % (m/v) BSA in TBS-T 0,1 %	Cell Signaling TECHNOLOGY® (Danvers, Massachusetts, USA)

4.2.7 Primer Assays

Tabelle 8: RT² Primer Assays

Primer	Assey ID	Hersteller
ACTB	330001 PPH00073G	Qiagen (Hilden, Deutschland)
TBP	330001 PPH01091G	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp27 Protein 1	330001 PPH00165F	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp70 Protein 1A	330001 PPH01193B	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hsp70 Protein 1B	330001 PPH01216B	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)

4.2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Zellkulturtestplatten (6-Well)	Bio-Rad (Hercules, Californien, USA)
Zellkulturtestplatten (96-Well)	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Einmal-Küvetten 70 µl	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, Californien, 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, Californien, USA)
Pipettenspitzen mit Filter (1250 µl): Safeseals-Tips® professional	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen mit und ohne Filter (0,1-20 µl; 2-100 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
RNA ^{later} TissueProtect Tubes	Qiagen (Hilden, 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)
Zentrifugen-Röhrchen steril Cell Star® (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

4.2.9 Geräte

Tabelle 10: Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank Function Line	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Brutschrank Heracell 150i CO ₂ Incubator	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Cellometer Auto T4 Plus	Peqlab (Erlangen, Germany)
C1000 Touch™ Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
FluorChem® FC2 Scanner	Proteinsimple (San Jose, California, USA)
Gelkammer XCell Sure Lock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Invitrogen by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
iBlot® dry Blotting System	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)
Schüttelwasserbad (Typ SV2945)	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Spektrophotometer Nanodrop 2000C	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Sterilwerkbank Herasafe	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
TissueLyser	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge fresco	Kendro (Langenselbold, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge 1 S-R	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

4.2.10 Hard-/ Software

Tabelle 11: Hard-/ Software

Hard- und Software	Hersteller
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)

4.3 Methoden

4.3.1 Zellkultur

Die für das *in vitro* HIPEC-Modell verwendeten Zelllinien SW480 und HT29 wurden aus einem Primärtumor des Kolonkarzinoms gewonnen, die der Zelllinie SW620 einer regionalen Lymphknotenmetastase des Primärtumors der Zelllinie SW480.

4.3.1.1 Auftauen

Die im Stickstofftank konservierten Zellen wurden in einem 37°C Wasserbad kurz angetaut und anschließend in ein 50 mL Falconröhrchen mit vorgewärmtem Medium überführt. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension bei 311 x g für zehn Minuten (min) zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet mit 2 mL vorgewärmtem Medium aufgenommen und in die mit 15 mL Medium vorgelegte Kulturflasche überführt.

4.3.1.2 Zellkultivierung, Zellpassage

Als Nährmedium für die Kolonkarzinomzellen der Zelllinie SW480 und SW620 wurde RPMI 1640 verwendet, was zusätzlich um 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin ergänzt wurde. Zur Kultivierung von HT29 Zellen wurde McCoy's 5A Medium mit L-Glutamin, ebenfalls mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin angereichert, benutzt. Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Sobald eine Konfluenz von 70-90% erreicht war, wurde das Nährmedium aus den Kulturflaschen abgesaugt, die adhärenen Zellen mit 10 mL DPBS

gewaschen und anschließend unter drei bis achtminütiger Inkubation mit 5 mL Trypsin aus der Kulturflasche herausgelöst. Nachfolgend wurden 10 mL des der Zelllinie entsprechenden Mediums hinzugegeben und die Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen zur zehnminütigen Zentrifugation überführt. Das dabei entstandene Pellet wurde in Medium resuspendiert und auf die jeweils benötigte Anzahl an Kulturflaschen mit Nährmedium in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:15 oder in definierter Zellzahl (siehe 4.3.1.3) überführt.

4.3.1.3 Zellzählung

Zur Zellzählung wurden 20 µl der Zellsuspension zu 20 µl Trypanblau Lösung hinzugegeben und davon 20 µl auf eine Zählkammer des Cellometers pipettiert. Gemessen wurde die Gesamtzellzahl sowie die Viabilität anhand der Trypanblau Färbung toter Zellen. Dabei nehmen Zellen mit defekter Membran oder abgestorbene Zellen den Farbstoff auf und färben sich blau, wohingegen die lebenden Zellen mit intakter Membran farblos bleiben.

4.3.2 Zellbiologische Methoden

4.3.2.1 *In vitro* Hyperthermie Modell Aufbau

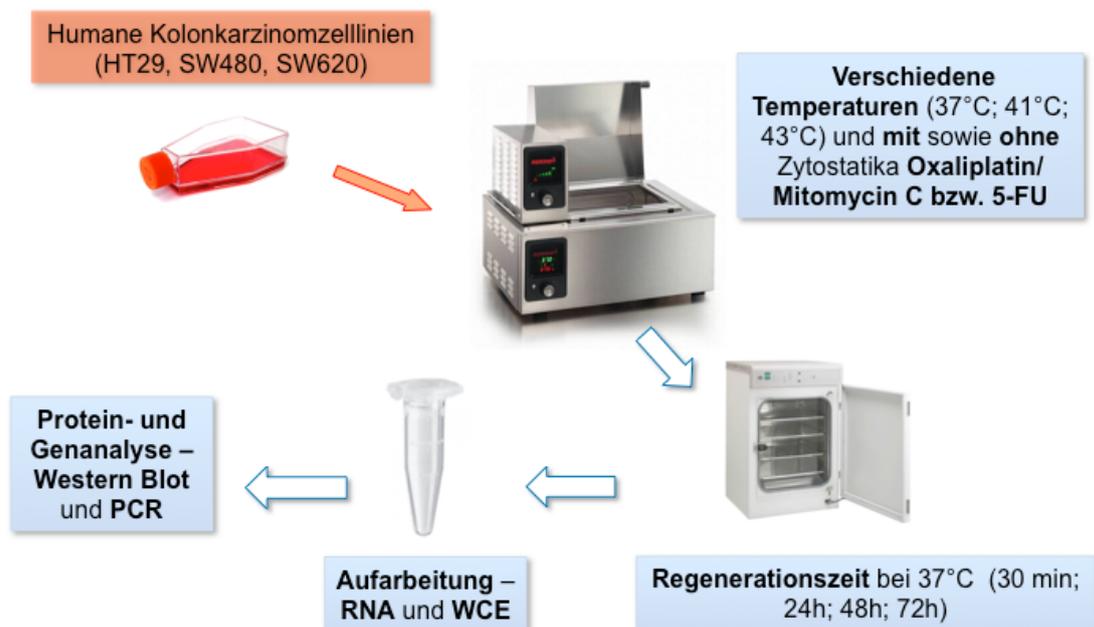


Abbildung 3: In-Vitro Hyperthermie Modellaufbau

Analog zu den *in vivo* Bedingungen während der HIPEC Therapie wurden die Kolonkarzinomzellen jeweils mit und ohne Zytostatikum (Oxaliplatin 150 µm, Mitomycin C 25 µm, 5-FU 11,5 µm) für eine Stunde einem Schüttelwasserbad mit drei verschiedenen Temperaturstufen von 37°C, 41°C und 43°C ausgesetzt. Damit die hyperthermen Bedingungen der jeweiligen Temperaturstufe kontinuierlich sichergestellt werden konnten, wurde das Nährmedium vor der Hinzugabe auf die Zellen auf die entsprechende Temperatur vorgewärmt. Im Anschluss an die einstündige hypertherme Phase wurde das Nährmedium erneut gegen frisches 37°C-warmes Medium ausgetauscht und die Zellkulturflaschen für eine definierte Regenerationszeit (30 min, 24 h, 48 h, 72 h) im Brutschrank inkubiert.

4.3.2.2 MTS-Zellproliferationsassay

Um Aussagen über die Proliferation der Tumorzellen im *in vitro* Hyperthermie Modell machen zu können, wurden MTS *proliferation assays* (MTS-Test) durchgeführt. Das Prinzip des MTS-Tests beruht auf der Bestimmung der metabolischen Aktivität lebender Zellen einer Population (Zellviabilität). Ausschließlich metabolisch aktive Zellen sind in der Lage über NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen das Tetrazoliumsalz (MTS), ein gelblich wasserlöslicher Farbstoff, in Formazan, einen bläulich wasserunlöslichen Farbstoff zu reduzieren. Die Intensität des Farbstoffs kann im Anschluss spektroskopisch bei 490 nm erfasst werden und ist direkt proportional zum Anteil lebender Zellen in einer Kultur.

In dieser Arbeit wurden zur Durchführung des MTS *proliferation assays* pro Well einer 96-Well-Platte 2500 Zellen der jeweiligen Zelllinie HT29, SW480 oder SW620 ausgesät und für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Behandlung der Kolonkarzinomzellen entsprechend der *In vitro* Hyperthermie Modellbeschreibung in Absatz 4.3.2.1. Die spektroskopische Vermessung erfolgte dann nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Regenerationszeit.

4.3.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.3.1 Herstellung Gesamtzellextrakte von adhärennten Zellen und Patientenproben

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten (*Whole Cell Extract, WCE*) der adhärennten Zellen HT29, SW480 und SW620, wurde nach definierter Regenerationszeit (30 min, 24 h, 48 h, 72 h) das Medium abgesaugt und die Kulturzellen zwei Mal mit phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate buffered saline, PBS*) gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Hilfe von 800 µl selbst hergestelltem RIPA-Puffer aus der Zellkulturplatte herausgelöst, in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und danach auf Eis gelagert.

Zum Zellaufschluss wurden die Proben zunächst für 30 Sekunden sonifiziert und im zweiten Schritt zur vollständigen Lyse auf einem Drehrad eingespannt und bei 4°C für 30 min bewegt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 13.000 x g wurde das Lysat (*WCE*) erneut in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80°C zur späteren Gelelektrophorese und Immundetektion gelagert.

Zur Aufbereitung der prä und post HIPEC entnommenen Gewebeproben wurden diese zunächst in kleine Teile geschnitten und anschließend in RIPA-Puffer für 10 min im TissueLyser homogenisiert. Nachfolgend wurden die Proben für 30 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, bevor das Lysat bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit für 20 min zentrifugiert wurde. Zur Aufbewahrung und Weiterverarbeitung der Gesamtzellextrakte wurde der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

4.3.3.2 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur genauen Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysats wurde der Bradford Test angewandt.

Dabei wurde das verwendete Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:5 aus Roti®-Quant in dH₂O hergestellt. Zur Messung wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß 39 µl dH₂O und 1 µl des zu testenden Proteinlysats (*WCE*) vorgelegt und kurz vor Absorptionmessung 160 µl der Bradford-Reagenz hinzugefügt. Nach

dreiminütiger Inkubation und sorgfältiger Durchmischung mittels eines Vortexgeräts wurde die Probe anschließend in einer Küvette im Photometer vermessen. Als Referenzwert wurde der zur Herstellung der *WCE* verwendete RIPA-Puffer genutzt.

4.3.3.3 SDS-Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Zur Proteindetektion mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die zuvor vermessenden Proben nach Herstellerangaben mit NuPAGE LPS Sample Buffer und NuPAGE Sample Reducing Agent versetzt und je nach Proteinkonzentration auf 10, 20 beziehungsweise 30 μl verdünnt. Zur Proteindenaturierung wurden die Proben für 10 min bei 70°C inkubiert, bevor sie im Anschluss zur Auftrennung auf gebrauchsfertige NuPAGE 4-12% Bis-Tris 1,5 mm Gele beladen wurden. Um im weiteren Verlauf das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurde die erste Tasche des Gels jeweils mit 6 μl eines Proteinmarkers beladen. Um die Auftrennung der Proteine innerhalb des Gels zu ermöglichen, wurde bei einer Umgebungstemperatur von 4°C für 90-120 min eine elektrische Spannung von 200 V (Volt) und eine Stromstärke von 113 mA (Milliampere) angelegt.

4.3.3.4 Proteintransfer und Immundetektion

Zum Proteintransfer wurden die zuvor separierten Proteine mittels iBlot® dry Blotting System und dem System zugehörigen Transfergelen entsprechend Herstellerangaben auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Um die erfolgreiche Proteinübertragung sicherzustellen, wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt und anschließend mit TBS-T (*tris-buffered saline with Tween20*) gewaschen.

Zur Immundetektion wurde die Nitrozellulosemembran zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % (m/v) Magermilchpulver in TBS-T 0,1 % geblockt, sodass die noch freien Proteinbindungsstellen gesättigt werden konnten. Die im Anschluss verwendeten Primärantikörper wurden wie in Tabelle 6 aufgelistet verdünnt und über Nacht (12-20 h) bei 4°C auf dem Schüttler (80-90

Umdrehungen pro Minute; *revolutions per minute, rpm*) inkubiert. Dabei kamen Primärantikörper gegen humanes HSP27, HSP70, HSP90, β -Aktin, Bcl-xL und PCNA zum Einsatz. Im darauffolgenden Schritt wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den in Tabelle 7 entsprechend aufgeführten Sekundärantikörpern inkubiert. Überschüssige Antikörper auf der Membran wurden im Anschluss durch einen erneuten Waschvorgang mit TBS-T entfernt. Um die Proteinbanden auf der Trägermembran detektieren zu können, wurden SuperSignal® West Pico bzw. Femto Chemilumineszenzsubstrate verwendet, dessen Chemilumineszenzlösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und für fünf Minuten inkubiert wurden. Im letzten Schritt wurden die untersuchten Proteine mittels Röntgenfilm in der Dunkelkammer entwickelt und optisch als schwarze Banden dargestellt.

4.3.4 Molekularbiologische Methoden

4.3.4.1 RNA Extraktion von adhärennten Zellen und Synthese von cDNA

Zur RNA (Extraktion der adhärennten Zellen HT29, SW480 und SW620, wurde nach definierter Regenerationszeit (30 min, 24 h, 48 h, 72 h) das Medium abgesaugt und die Kulturzellen zwei Mal mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Hilfe von 400 μ l des RNeasy® Mini Kit zugehörigen RLT Buffer aus der 6-Well Zellkulturplatte herausgelöst, in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und danach auf Eis gelagert.

Zur RNA-Isolation der Proben im QIAcube wurde das RNeasy® Mini Kit entsprechend der Angaben des Herstellers Qiagen verwendet. Zur weiteren Analyse mittels RT-qPCR (*real-time quantitative polymerase chain reaction*) wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

Um die cDNA (*complementary DNA*) für die im Verlauf folgende quantitative *real-time* PCR synthetisieren zu können, wurde die zuvor gewonnene RNA, unter Verwendung des ImProm-II™ Reverse Transcription Systems und dem Mastercycler von Eppendorf, transkribiert. Dafür wurde zunächst mithilfe des

Nanodrop 2000c die RNA-Konzentration bestimmt und dann entsprechend der ermittelten Absorptionswerte 1 µg der totalen RNA in 11,6 µl Ribonuklease-freiem Wasser verdünnt. Des Weiteren wurden 1 µl Random Primer, 4 µl 5x Puffer, 1,2 µl MgCl₂, 0,2 µl RNAsin®, 1 µl reverse Transkriptase und 1 µl Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) als Reaktionsmix vorbereitet und je 8,4 µl zur RNA-Verdünnung hinzugefügt. Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte dann in drei Temperaturschritten (5 min bei 25°C, 60 min 42°C, 15 min bei 70°C) im Mastercycler. Die hergestellten cDNA-Proben wurden bei -20°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

4.3.4.2 *Real-time* quantitative PCR (RT-qPCR)

Um Aussagen zu Veränderungen der Genexpression durch Einflüsse wie Hyperthermie und Zytostatika in den untersuchten Zellen machen zu können, wurde die *real-time* quantitative PCR verwendet. Dabei kommt die herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion (PCR), sprich die Vervielfältigung (Amplifikation) bestimmter DNA-Abschnitte zum Einsatz, wobei gleichzeitig zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA in Echtzeit ermöglicht wird. Die Quantifizierung findet nach jedem Durchgang während der exponentiellen Phase der PCR statt. Durch einen DNA-Farbstoff (SYBR® Green I), der mit der amplifizierten DNA interkaliert, können anhand der proportional zur Menge des Amplifikats zunehmenden Fluoreszenzsignale, Aussagen über Veränderungen der PCR-Produkte getroffen werden. Der Zeitpunkt, an dem das Fluoreszenzsignal der Amplifikate das Hintergrundsignal signifikant überschreitet, wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) angegeben. Dieser stellt den Beginn der exponentiellen Phase in der PCR dar. Zur relativen Quantifizierung wird dann unter Verwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Formel: $2^{-\Delta\Delta C_t}$), die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen (*housekeeping gene*), in dieser Arbeit β -Aktin und TBP (*TATA-box binding protein*), bezogen.

Zur praktischen Durchführung der RT-qPCR wurde zunächst mithilfe des Nanodrop 2000c die cDNA-Konzentration der Proben bestimmt und dann entsprechend der ermittelten Absorptionswerte 7,5 µg der cDNA in 150 µl

Ribonuklease-freiem Wasser verdünnt. Im Anschluss wurden 2 µl der verdünnten cDNA zusammen mit 12,5 µl MESA GREEN qPCR™ Mastermix Plus für SYBR® Assay-No ROX (Meteor*Taq* DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂ (4mM), SYBR® Green I, Stabilisatoren), 1 µl RT² Primer Assay und 9,5 µl Ribonuklease-freiem Wasser in ein Reaktionsgefäß der PCR Platte pipettiert und mit der Klebefolie Microseal® 'C' Film verschlossen. Im Anschluss erfolgte die PCR im C1000 Touch™ Thermal Cycler (CFX96™ Real-Time System) in folgender Reihenfolge:

- 10 min bei 95°C: Meteor*Taq* DNA Polymerase Aktivierung
- 15 sec bei 95°C (Denaturierung): Spaltung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge
- 30 sec bei 58°C (Annealing): Anlagerung der Primer an komplementäre DNA
- 30 sec bei 72°C (Elongation): Synthese der Ziel-DNA durch *Taq* DNA Polymerase

Die beschriebenen Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation wurden insgesamt 40-mal wiederholt. Um die Reproduzierbarkeit der Proben bestätigen zu können, wurden diese jeweils als Duplikate in drei unabhängigen Läufen analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 HSP27

5.1.1 Humanes HT29 Kolonkarzinom

5.1.1.1 HSP27 Genexpression

Zur Analyse der Genexpression von HSP27 (HSPB1) nach einstündiger *in vitro*-induzierter Hyperthermie (41°C, 43°C) und Zytostatika (MMC, OXA) Exposition, wurden HT29 Zellen mittels RT-qPCR untersucht. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (=fold difference, FD). Der Ct-Wert, als Ausdruck der Menge des vervielfältigten Zielgens, wurde mit den konstitutiv exprimierten Referenzgenen (*housekeeping gene*) β -Aktin und TBP verglichen und konnte schließlich unter Anwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (= fold difference, FD) quantifiziert werden. Als Kontrolle dienten normotherme HT29 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum. Erhöhte Expressionsprofile wurden nach 24 h, besonders aber nach 48h Regenerationszeit, bei MMC-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen bei 37°C (FD=4,3), 41°C (FD=4,1) und 43°C (FD=5,0), beobachtet. Auch nach 72 h konnte bei MMC-behandelten Zellen noch eine Expressionssteigerung bei allen Temperaturstufen beobachtet werden (37°C: FD=1,9; 41°C: FD=1,6; 43°C: FD=1,9) (**Abbildung 4A**).

Tumorzellen, die während der *in vitro* HIPEC-Behandlung für eine Stunde dem Zytostatikum OXA ausgesetzt waren, zeigten insbesondere nach 48 h bei 37°C (FD=4,4) sowie nach 72 h bei allen Temperaturstufen stark erhöhte Genexpressionen (37°C: FD=2,5; 41°C: FD=3,0; 43°C: FD=3,6) (**Abbildung 4B**).

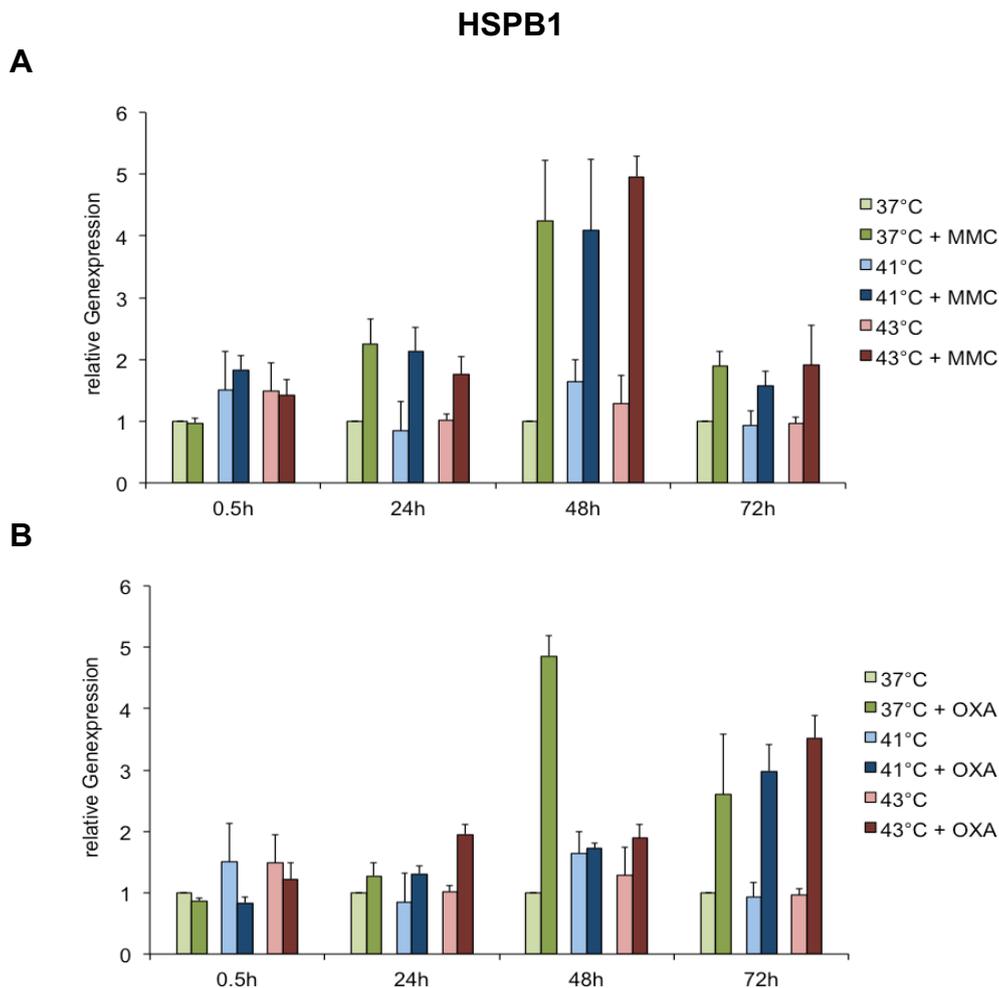


Abbildung 4: HSP27 Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

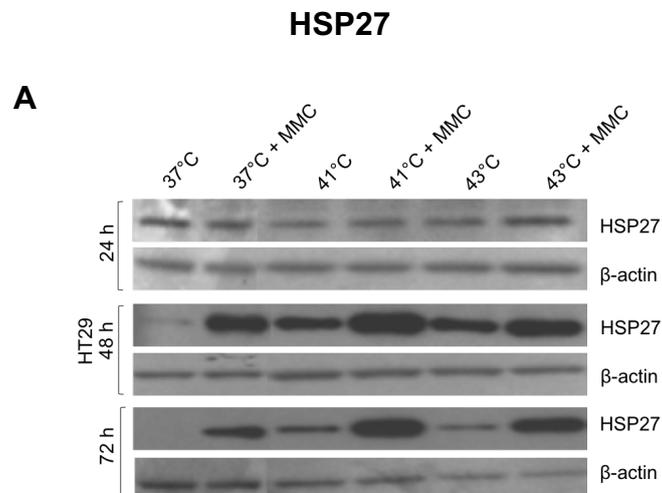
Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 30 min, 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme HT29 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB (β -Aktin) durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte (Daten nicht gezeigt). Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (=fold difference, FD) (88).

5.1.1.2 HSP27 Proteinexpression

Auf Proteinebene wurden die Tumorzellen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. In Korrelation zu den Ergebnissen auf Genebene wurde auch hier eine erhöhte Proteinexpression von HSP27 nach 48 h, und selbst nach 72 h Regenerationszeit bei normotherm und hypertherm inkubierten Zellen kombiniert mit zytotoxischem Stress (MMC)

beobachtet. Insbesondere hypertherme MMC Behandlung im Vergleich zu normothermen Bedingungen führte zu stärker ausgeprägten HSP Expressionen. Auffallend war zudem ein isolierter Hyperthermie-Effekt auf die Zellen, der besonders nach 48 h erhöhte HSP27 Expressionen bei 41°C und 43°C im Vergleich zu 37°C zur Folge hatte (**Abbildung 5A**).

Tumorzellen, die mit OXA behandelt wurden, zeigten analog zu MMC-behandelten Zellen, erhöhte Proteinexpressionen nach 48 h bei normothermen sowie hyperthermen Temperaturbedingungen, während nach 72 h eine solche Steigerung bei normothermen Bedingungen ausblieb und nur bei 41°C und 43°C beobachtet werden konnte (**Abbildung 5B**).



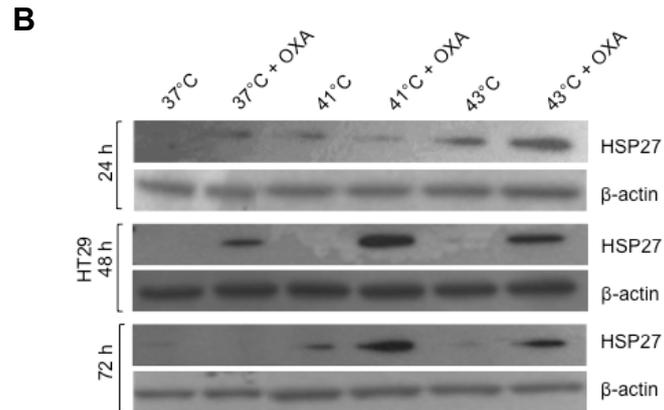


Abbildung 5: HSP27 Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet (88).

5.1.2 Humanes SW480 Kolonkarzinom

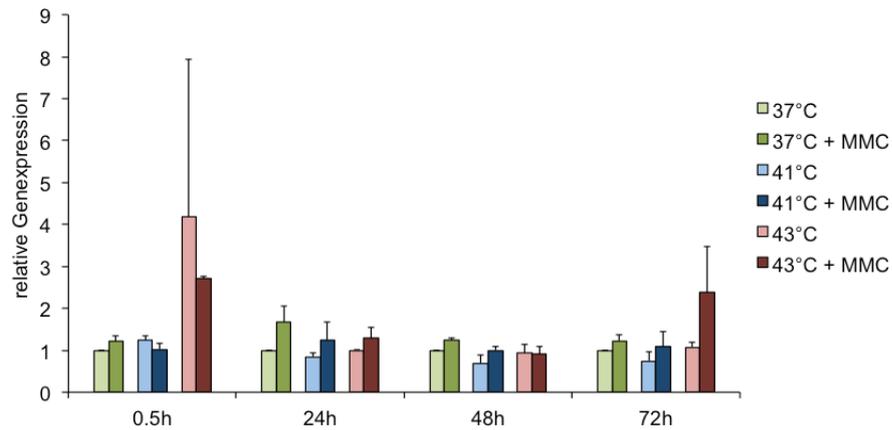
5.1.2.1 HSP27 Genexpression

Verstärkte Genexpressionen von HSP27 (HSPB1) zeigten sich, im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien, bei MMC-behandelten SW480 Zellen nur nach 30 min und 72 h bei 43°C (FD=2,7 und FD=2,5). Nach 24 h und 48 h wurde keine relevante Erhöhung der HSPB1 Expression beobachtet. Zudem zeigte sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte unter normothermer MMC Exposition eine erhöhte HSP27 Genexpression (**Abbildung 6A**).

Bei der einstündigen *in vitro* HIPEC Behandlung mit OXA ließen sich nur nach 30 min Regenerationszeit und hyperthermer Behandlung der Zellen relevante Änderungen der Genexpression gegenüber der Zellkontrollen erkennen (43°C: FD=2,9), wohingegen nach 24 h, 48 h und 72 h keine Steigerung mehr sichtbar war (**Abbildung 6B**).

HSPB1

A



B

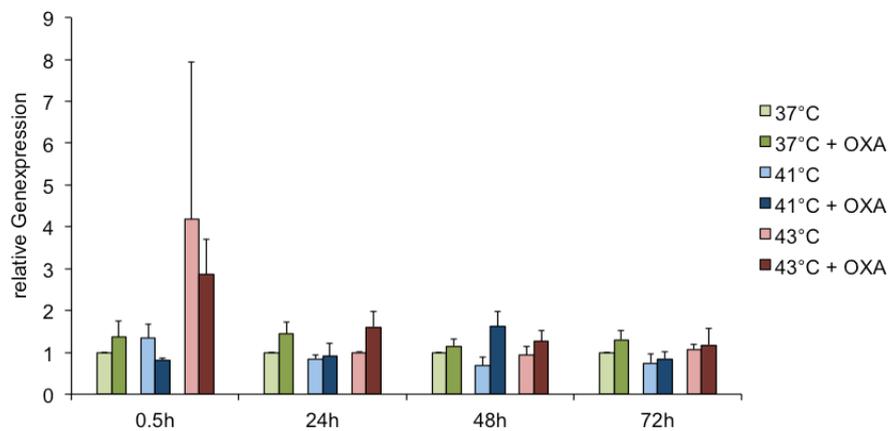


Abbildung 6: HSP27 Genexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 30 min, 24 h, 48 h und 72 h Regenerationszeit mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienen normotherme SW480 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB (siehe vorherige Abb) durchgeführt. Mittels TBP (siehe vorherige Abb) normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (=fold difference, FD).

5.1.2.2 HSP27 Proteinexpression

Die Proteinexpression von HSP27 nach hyperthermer MMC Behandlung in SW480 Zellen wurde mittels Western Blot untersucht. Dabei zeigte sich nach 48 h sowohl eine durch Hyperthermie induzierte Steigerung der Proteinexpression bei 43°C ohne MMC, als auch eine durch Zytostatikum induzierte, stärker

ausgeprägte Proteinexpression bei allen Temperaturstufen. Zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h wurden vergleichsweise konstante HSP27 Expressionen beobachtet (**Abbildung 7A**).

Entsprechend den Ergebnissen der hyperthermen MMC Behandlung wurden vergleichbare Beobachtungen bei OXA Exposition gemacht (**Abbildung 7B**).

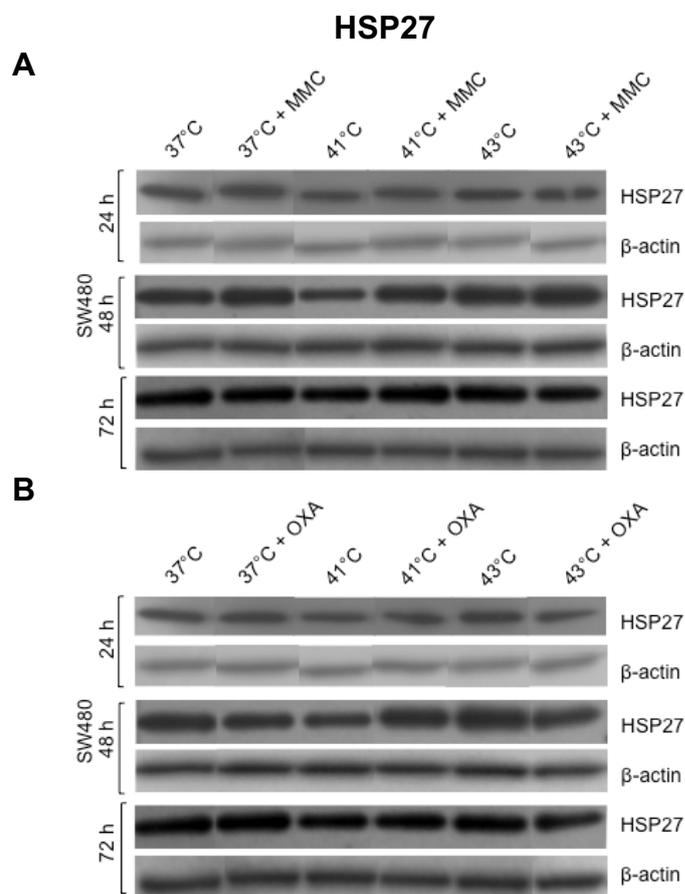


Abbildung 7: HSP27 Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet (88).

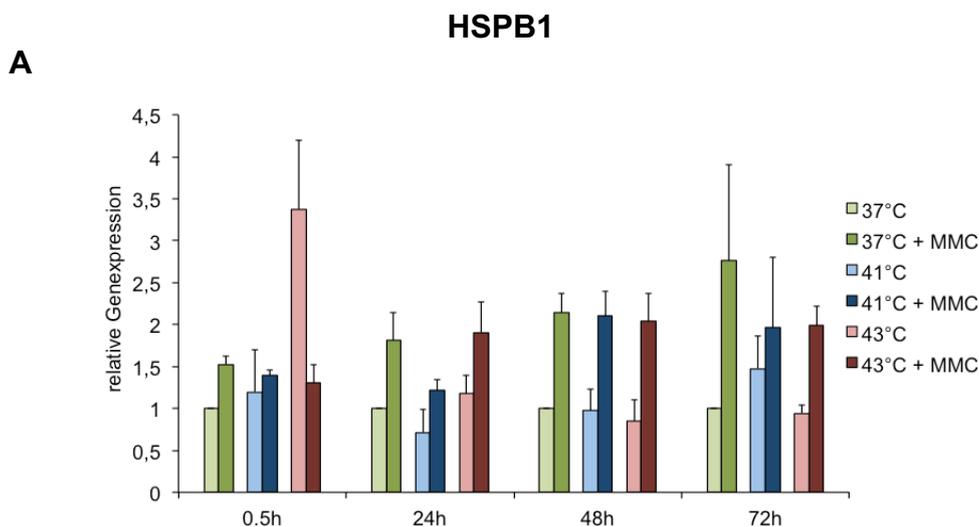
5.1.3 Humanes SW620 Kolonkarzinom

5.1.3.1 HSP27 Genexpression

In SW620 Zellen ließ sich bereits nach 30 min Regenerationszeit erkennen, dass hypertherme Bedingungen bei 43°C (FD=3,4) im Gegensatz zu niedrigeren Temperaturstufen bei 37°C zu erhöhten mRNA-Transkriptionsraten von HSP27 führt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus HT29 Zellen (**Abbildung 4A**), wurden auch hier erhöhte Expressionen nach einer Ruhezeit von 48 h und selbst noch nach 72 h bei Zellen mit MMC Behandlung bei allen untersuchten Temperaturstufen beobachtet (37°C: FD=2,1 und 2,8; 41°C: FD=2,1 und 2,0; 43°C: FD=2,0 und 2,0; **Abbildung 8A**).

Tumorzellen, die mit OXA behandelt wurden, zeigten ähnliche Effekte wie MMC-behandelte Zellen (**Abbildung 8B**).



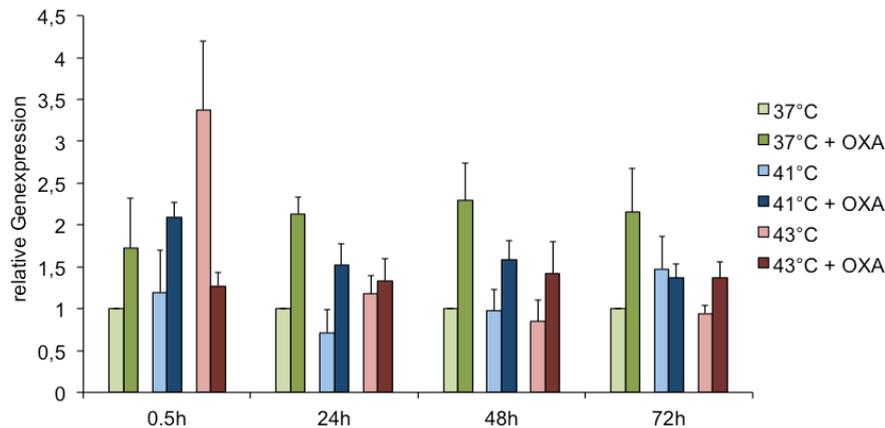
B

Abbildung 8: HSP27 Genexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (A) oder Oxaliplatin (B) wurden die Tumorzellen nach 30 min, 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienen normotherme SW620 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (=fold difference, FD) (88).

5.1.3.2 HSP27 Proteinexpression

Verstärkte HSP27 Proteinexpression zeigte sich 24 h sowie auch in der Spätphase der Regeneration nach 48 h und 72 h nach hyperthermer MMC Behandlung bei allen untersuchten Temperaturstufen. Neben diesem Zytostatikum-induzierten Effekt konnte entsprechend den Ergebnissen aus SW480 und HT29 Zellen auch eine allein durch Hyperthermieexposition (41°C) verursachte Proteinexpression nach 24 h und bei 43°C zu allen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) beobachtet werden. Diese beiden beschriebenen Effekte zeigten sich besonders deutlich ausgeprägt nach 24 h und 48 h Regenerationszeit (**Abbildung 9A**).

Übereinstimmend mit den Beobachtungen bei MMC-behandelten Zellen, stellten sich auch die Proteinexpressionen bei OXA Behandlung dar (**Abbildung 9B**).

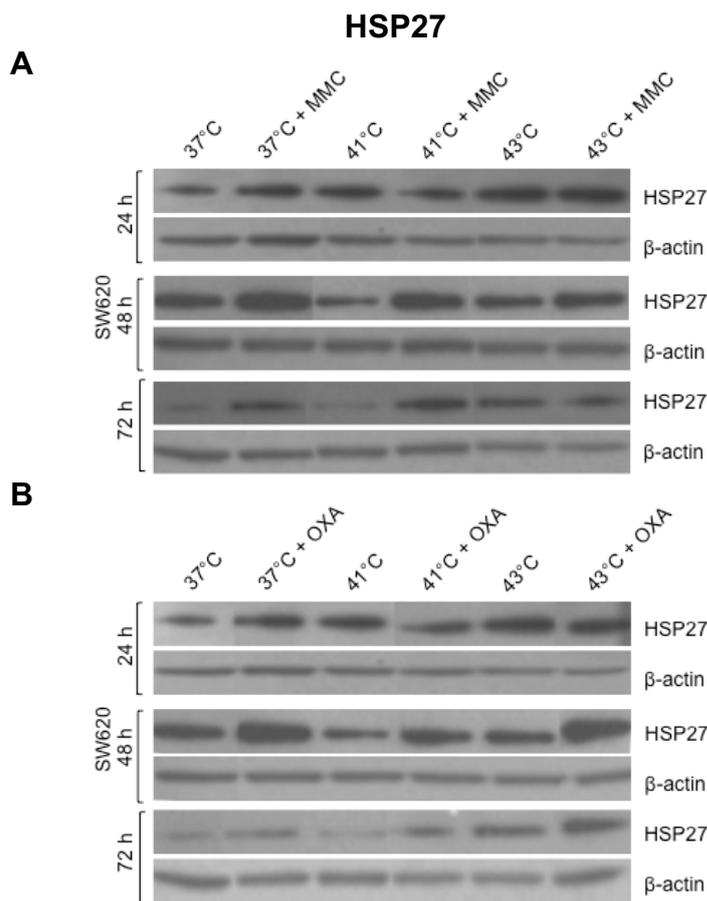


Abbildung 9: HSP27 Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (A) oder Oxaliplatin (B) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet (88).

5.2 HSP70

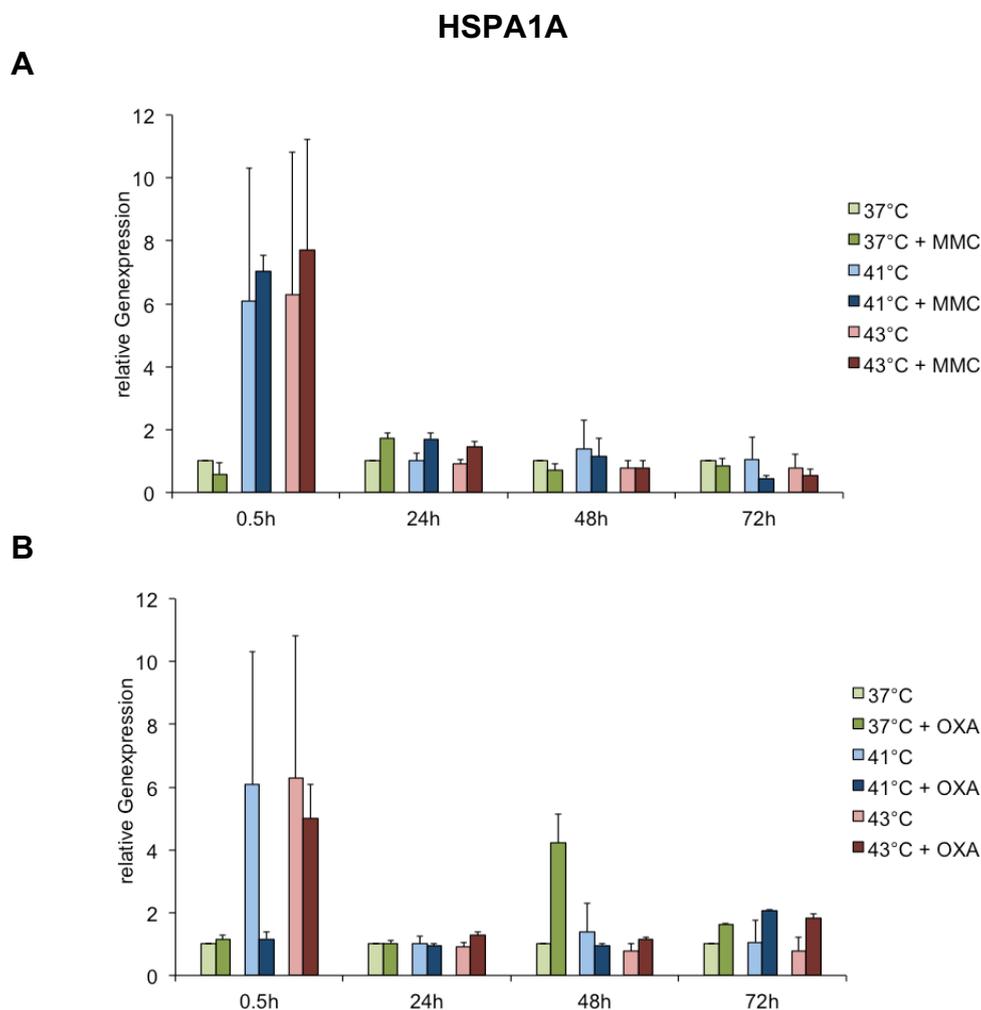
5.2.1 Humanes HT29 Kolonkarzinom

5.2.1.1 HSP70 Genexpression

Zur Analyse der Genexpression von HSP70 Protein 1A (HSPA1A/HSP72) und HSP70 Protein 1B (HSPA1B) nach einstündiger *in vitro*-induzierter Hyperthermie (41°C, 43°C) und Zytostatika Exposition (MMC, OXA), wurden HT29 Zellen mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme HT29 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum.

Eine hypertherme Behandlung führte bereits nach 30 min zu erhöhten Expressionen von HSP70 Protein 1A und HSP70 Protein 1B (41°C: FD=6,1 und 4,4; 43°C: FD=6,3 und 4,4) im Vergleich zu den Zellkontrollen. Insbesondere hypertherme MMC-behandelte Tumorzellen führten zu stärker ausgeprägten HSP Expressionen (41°C: FD=7,0 und 5,2; 43°C: FD=7,7 und 5,8). Im Gegensatz zur initialen Expressionssteigerung blieb eine solche zu späteren Untersuchungszeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) aus (**Abbildung 10A,C**).

OXA-behandelte HT29 Zellen zeigten initial 30 min nach Exposition dagegen nur bei 43°C verstärkte Genexpressionen beider Isoformen HSP70 Protein 1A und HSP70 Protein 1B (43°C: FD=5,0 und 3,9). Ein isolierter Hyperthermie-Effekt auf die Zellen im Vergleich zu normothermen Bedingungen ließ sich nach 30 min bei 41°C und 43°C beobachten (**Abbildung 10B,D**).



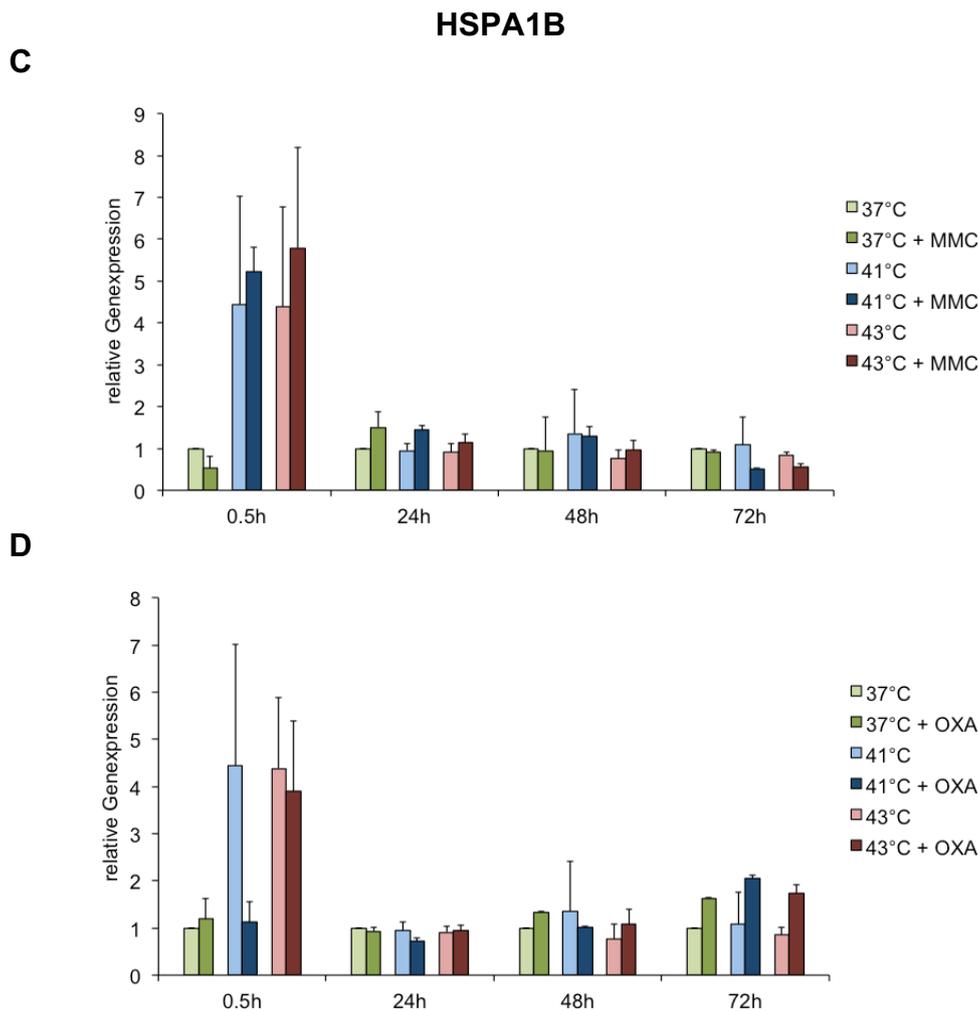


Abbildung 10: HSP70 Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin oder Oxaliplatin wurden die Tumorzellen hinsichtlich der Genexpression von HSPA1A (**A,B**) (88) und HSPA1B (**C,D**) nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h, 72 h mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme HT29 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (=fold difference, FD).

5.2.1.2 HSP70 Proteinexpression

HT29 Zellen, die mit MMC oder OXA behandelt wurden, zeigten an keinem der analysierten Zeitpunkte (24 h, 48 h, 72 h), weder durch Hyperthermie, noch durch Zytostatikum verursachte Veränderungen der HSP70 Proteinexpression (**Abbildung 11**).

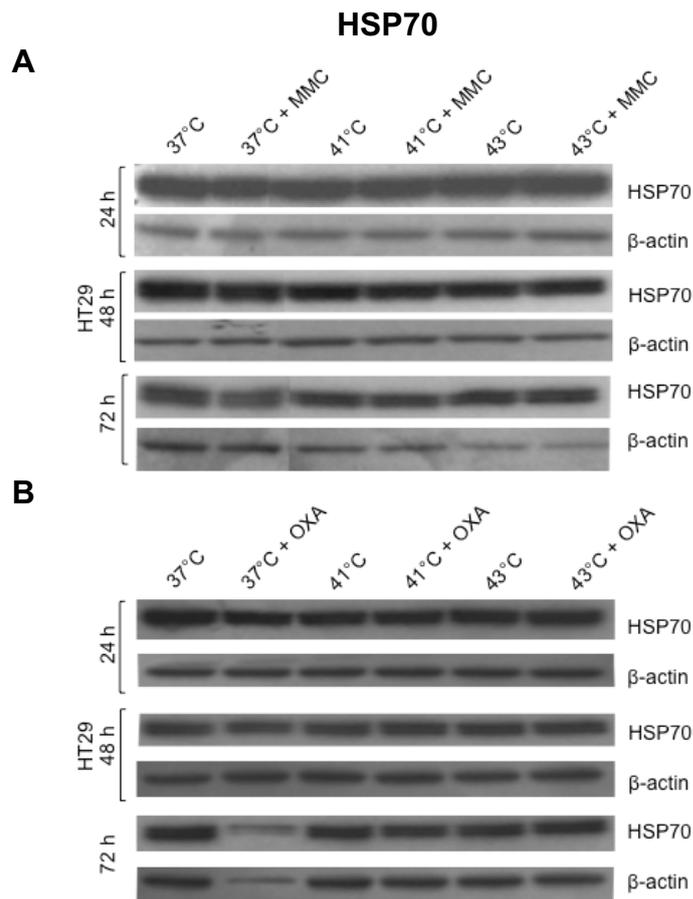


Abbildung 11: HSP70 Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (A) (88) oder Oxaliplatin (B) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet .

5.2.2 Humanes SW480 Kolonkarzinom

5.2.2.1 HSP70 Genexpression

In SW480 Zellen ließen sich verstärkte Expressionen von HSP70 (HSPA1A und HSPA1B) insbesondere nach 30 min Regenerationszeit beobachten, wohingegen die *in vitro* HIPEC Behandlung an den anderen untersuchten Zeitpunkten keinen Einfluss auf die Genexpression hatte. Es zeigte sich, dass hypertherme Bedingungen bei 43°C im Gegensatz zur Zellkontrolle nach 30 min bei 37°C, 30-fach erhöhte mRNA-Transkriptionsraten von HSPA1A zur Folge

hatte. Zusätzlich mit MMC behandelte Zellen zeigten darüber hinaus eine 43,9-fach erhöhte Expression (**Abbildung 12**).

Vergleichbare Effekte konnten bei der Isoform HSPA1B, sowie der Exposition der SW480 Tumorzellen mit OXA beobachtet werden (Daten hier nicht dargestellt).

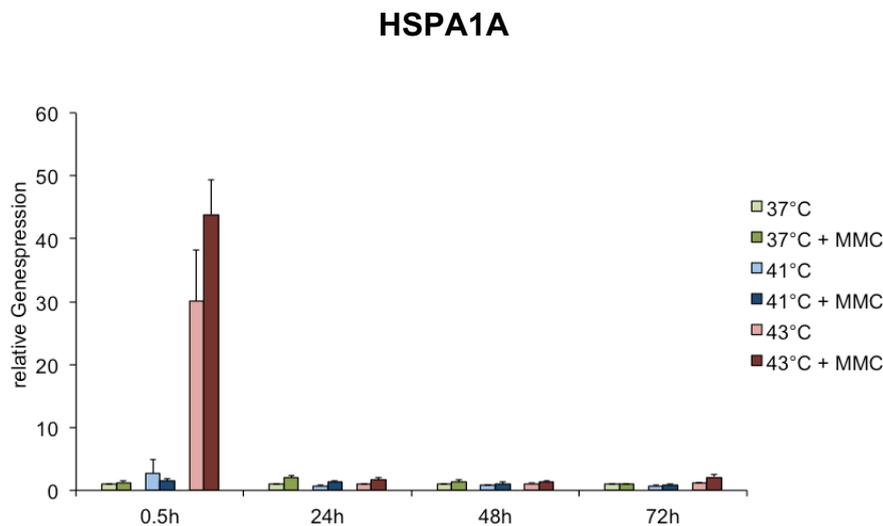


Abbildung 12: HSP70 Genexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin wurden die Tumorzellen nach 30 min, 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme SW480 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (=fold difference, FD) (88).

5.2.2.2 HSP70 Proteinexpression

Bei hypertherm MMC- und OXA-behandelten Tumorzellen (41°C und 43°C) ließen sich gegenüber der Zellkontrollen nach 48 h verstärkte HSP70 Expressionen erkennen. Auffallend war zudem eine allein durch Hyperthermieexposition (43°C) verursachte Proteinexpression nach 48 h, wohingegen nach 24 h und 72 h keine Veränderung der HSP Expression durch Hyperthermie oder Chemotherapie (MMC, OXA) ersichtlich war (**Abbildung 13**).

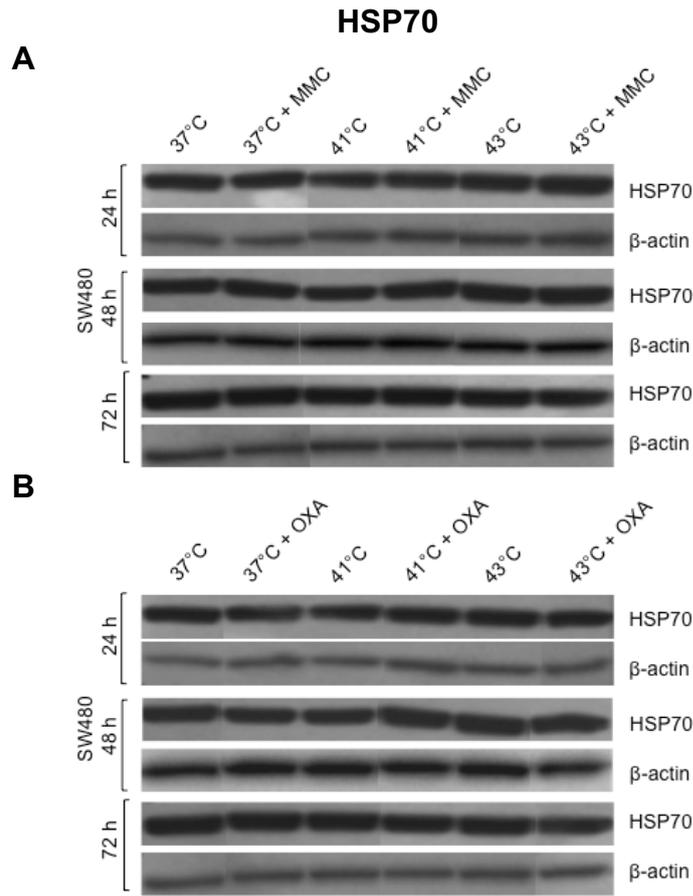


Abbildung 13: HSP70 Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet.

5.2.3 Humanes SW620 Kolonkarzinom

5.2.3.1 HSP70 Genexpression

Verstärkte HSP70 Protein 1A Genexpressionen zeigten sich in SW620 Zellen initial 30 min nach isoliert hyperthermer Behandlung bei 41°C und 43°C (41°C: FD=1,9; 43°C: FD=8,2), sowie einer zusätzlichen Chemoexposition mit MMC bei 43°C (FD=3,2). Zudem wurde nach 24 h Ruhezeit eine Zytostatikum-induziert erhöhte HSP70 Expression bei allen drei untersuchten Temperaturenstufen beobachtet (37°C: FD=4,4; 41°C: FD=2,8; 43°C: FD=4,2). Der Effekt der isoliert Hyperthermie induzierten Expressionssteigerung von

HSPA1A zeigte sich ebenso nach 72 h bei 41°C (FD=3,0) im Vergleich zu der normothermen Zellkontrollen (**Abbildung 14**).

Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der Isoform HSPA1B, sowie der Exposition der SW620 Zellen mit dem Zytostatikum OXA beobachtet werden (Daten hier nicht dargestellt; Verweis auf Grimmig et al. (88) Zusatzmaterial 2/B.)

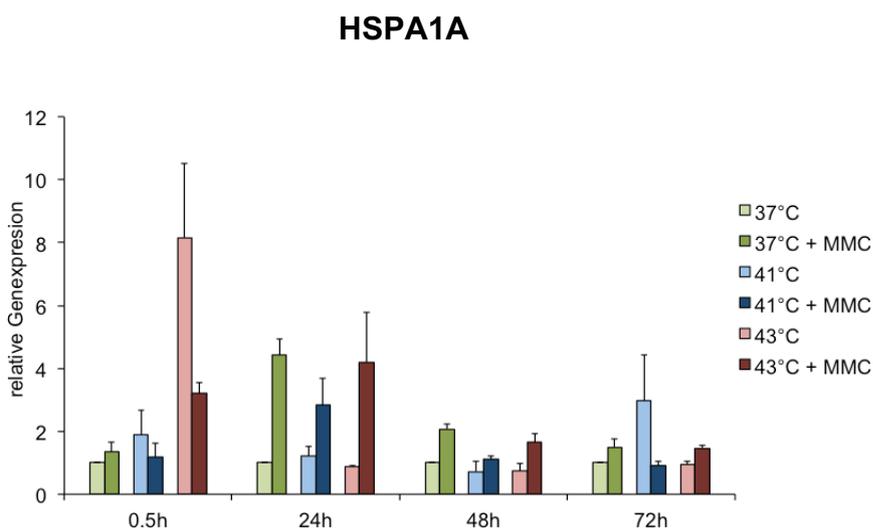


Abbildung 14: HSP70 Genexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin wurden die Tumorzellen nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h, 72 h mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme SW620 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (=fold difference, FD) (88).

5.2.3.2 HSP70 Proteinexpression

Im Gegensatz zu den auf Genebene beobachteten Veränderungen durch Einflüsse wie Hyperthermie- oder Zytostatikumbehandlung, zeigten sich bei MMC- und OXA-behandelten Tumorzellen auf Proteinebene vergleichsweise konstante Expressionen (**Abbildung 15**). Generell fiel aber eine stark ausgeprägte Proteinexpression auf, sodass vermutet werden kann, dass

zusätzliche Zu- oder Abnahmen der Proteinmenge in dieser Form schwer zu detektieren sind.

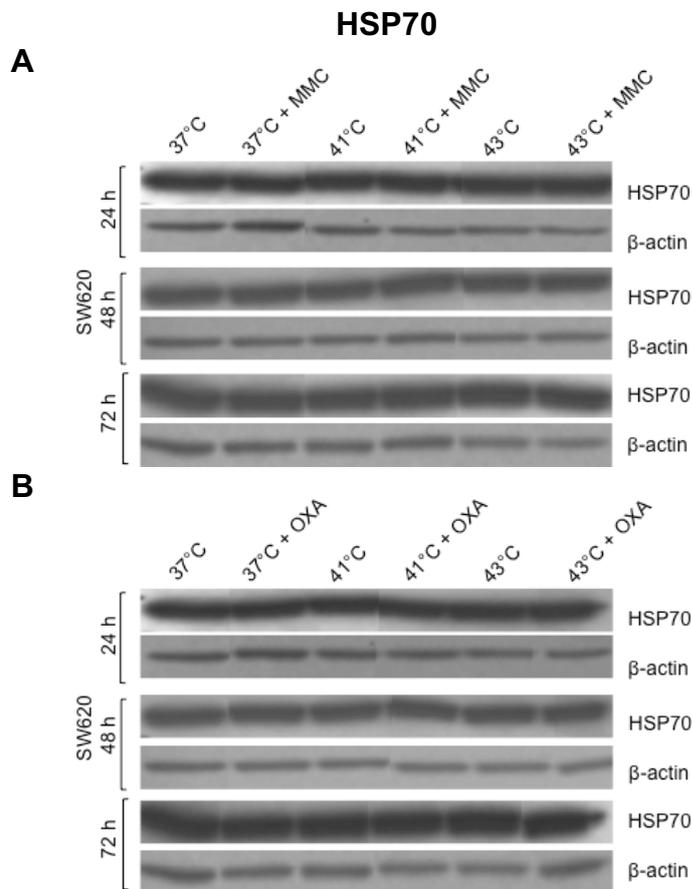


Abbildung 15: HSP70 Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) (88) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet.

5.3 HSP90

5.3.1 Humanes HT29 Kolonkarzinom

5.3.1.1 HSP90 Genexpression

Zur Analyse der HSP90 Genexpression (HSP90B1, HSP90AB1, HSP90AA1, HSP90AA2) nach einstündiger *in vitro*-induzierter Hyperthermie (41°C, 43°C) und Zytostatika Exposition (MMC, OXA), wurden HT29 Zellen mittels RT-qPCR

untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme HT29 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum.

MMC-behandelte Zellen zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach 30 min (43°C: FD=1,9) und 72 h (37°C: FD=1,9) verstärkte Genexpressionen von HSP90B1 bei normothermen und hyperthermen Bedingungen (**Abbildung 16A**).

Nach 30 min ließ sich bei Hyperthermie- (41°C und 43°C) und MMC-behandelten Tumorzellen eine erhöhte Genexpression von HSP90AA1 beobachten (FD=2,7 und FD=2,7) die selbst nach 48 h Regenerationszeit bei hypertherm MMC-behandelten Zellen (41°C) noch eine 2,3-fach erhöhte mRNA Transkriptionsraten zur Folge hatte (**Abbildung 16C**).

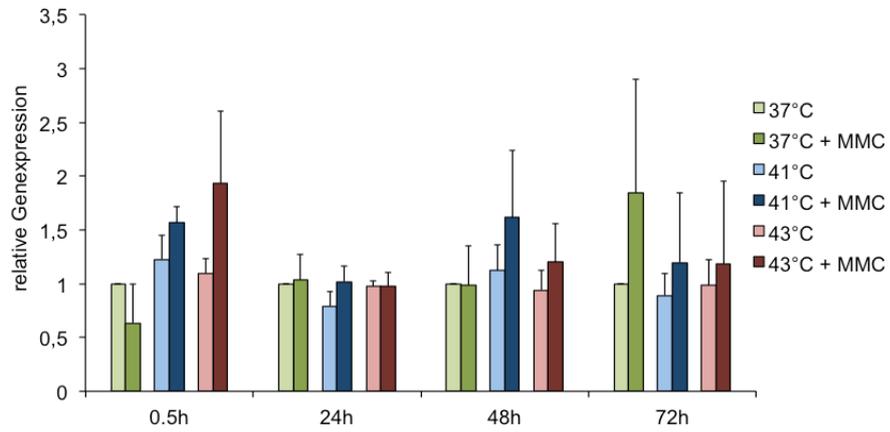
Ähnliche Ergebnisse konnten für HSP90AA2 beobachten werden (Daten hier nicht dargestellt). HSP90AB1 hingegen zeigte keine wesentliche Veränderung der Genexpression nach Hyperthermie- oder Zytostatika Exposition (**Abbildung 16F**).

Tumorzellen, die mit OXA behandelt wurden, zeigten besonders nach 48 h und 72 h erhöhte Genexpressionen. Bei normothermer OXA Behandlung ließ sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach 48 h Regenerationszeit eine 4,6-fach erhöhte HSP90B1 Genexpression beobachten (**Abbildung 16B**). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach gleicher Regenerationszeit auch bei HSP90AA1 und HSP90AA2 (37°C: FD=2,5 und 4,0) (**Abbildung 16D,E**).

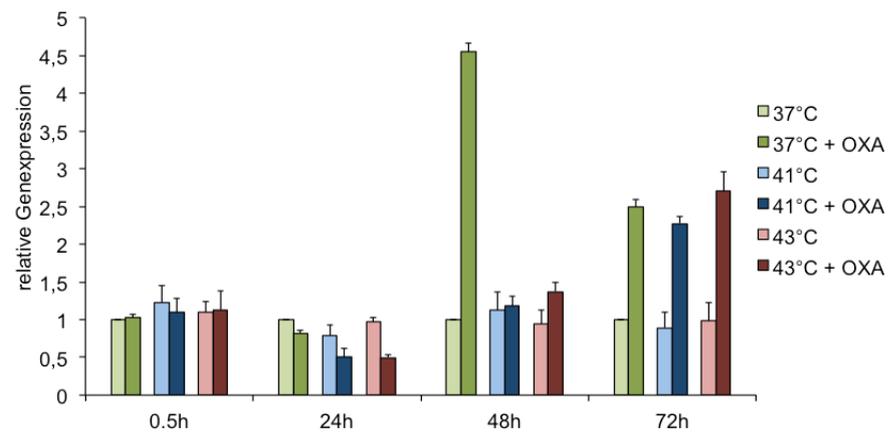
72 h nach Exposition ließen sich bei OXA-behandelten Zellen bei allen untersuchten Temperaturstufen stärker ausgeprägte Expressionen von HSP90B1 (37°C: FD=2,5; 41°C: FD=2,3; 43°C: FD=2,7) sowie HSP90AA2 feststellen (37°C: FD=2,1; 41°C: FD=2,0; 43°C: FD=2,1) (**Abbildung 16B,E**). Analog zu den Ergebnissen der MMC-behandelten Zellen zeigte sich keine wesentliche Veränderung der HSP90AB1 Expression nach Hyperthermie- oder Zytostatika Exposition (Daten hier nicht dargestellt).

HSP90B1

A

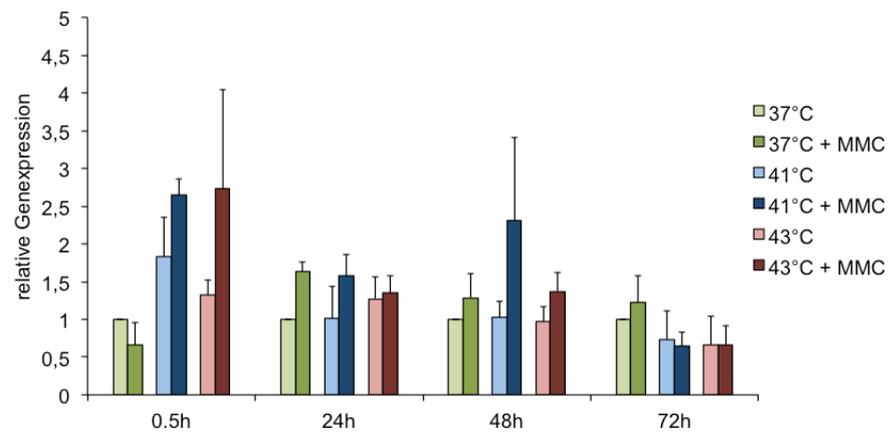


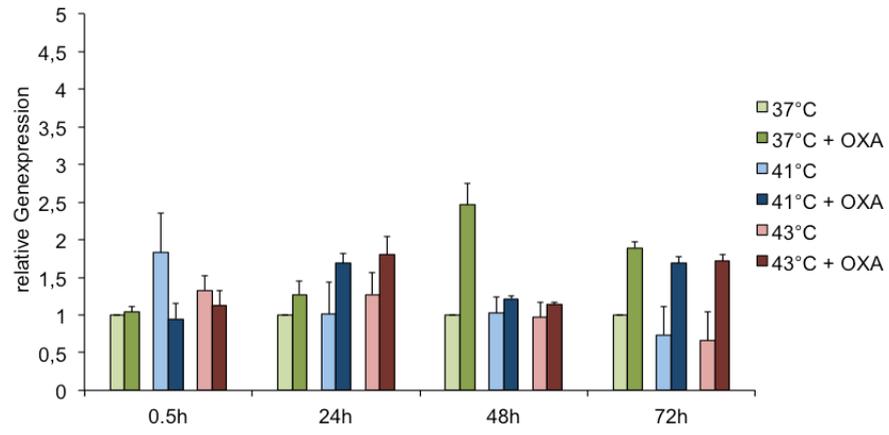
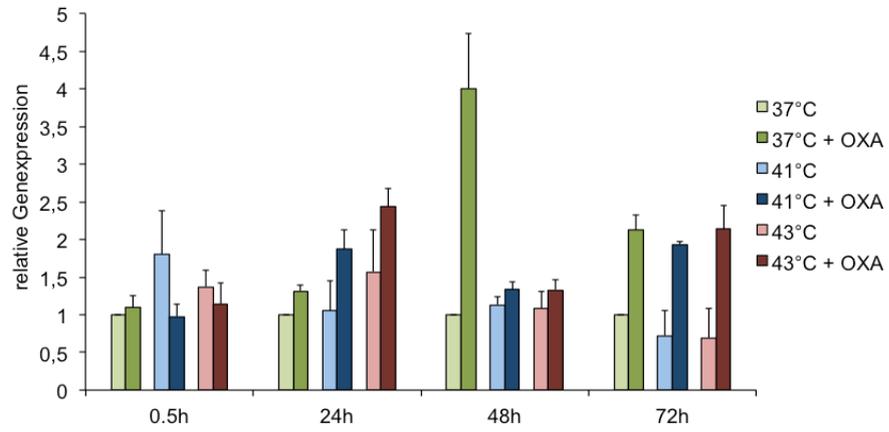
B



HSP90AA1

C



D**HSP90AA2****E**

HSP90AB1

F

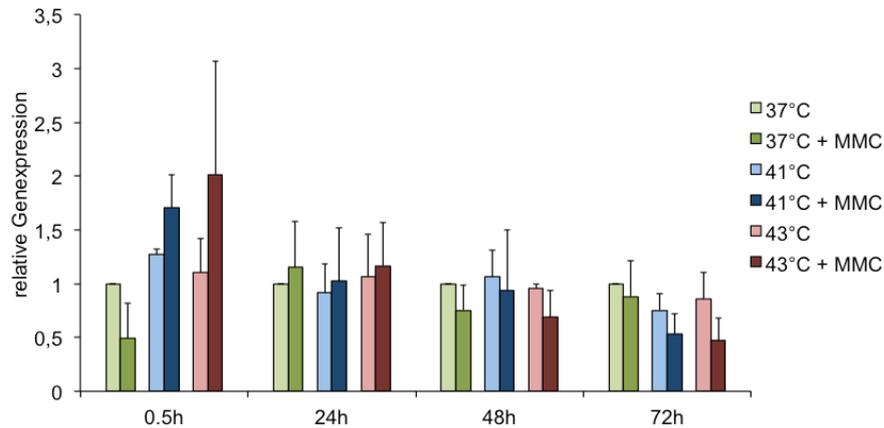


Abbildung 16: HSP90 Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin oder Oxaliplatin wurden die Tumorzellen hinsichtlich der Genexpression von HSP90B1 (A,B), HSP90AA1 (C,D) (88), HSP90AA2 (OXA) (E) und HSP90AB1 (MMC) (F) nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h, 72 h mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme HT29 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (=fold difference, FD).

5.3.1.2 HSP90 Proteinexpression

HT29 Zellen, die während der einstündigen *in vitro* HIPEC-Behandlung dem Zytostatikum MMC ausgesetzt waren, zeigten nach 24 h eine sowohl durch isolierte Hyperthermie induzierte Steigerung der Proteinexpression bei 43°C ohne MMC, als auch durch Zytostatikum induzierte Expression bei 43°C mit MMC, im Vergleich zu Zellkontrollen bei 37°C.

Nach 48 h und 72 h wurden vergleichsweise konstante Proteinexpressionen beobachtet (Abbildung 17A).

Zellen, die mit OXA behandelt wurden, zeigten hingegen bei keinem der untersuchten Zeitpunkte relevante Veränderungen der Proteinexpression durch Einflüsse wie Hyperthermie oder Zytostatika (Abbildung 17B).

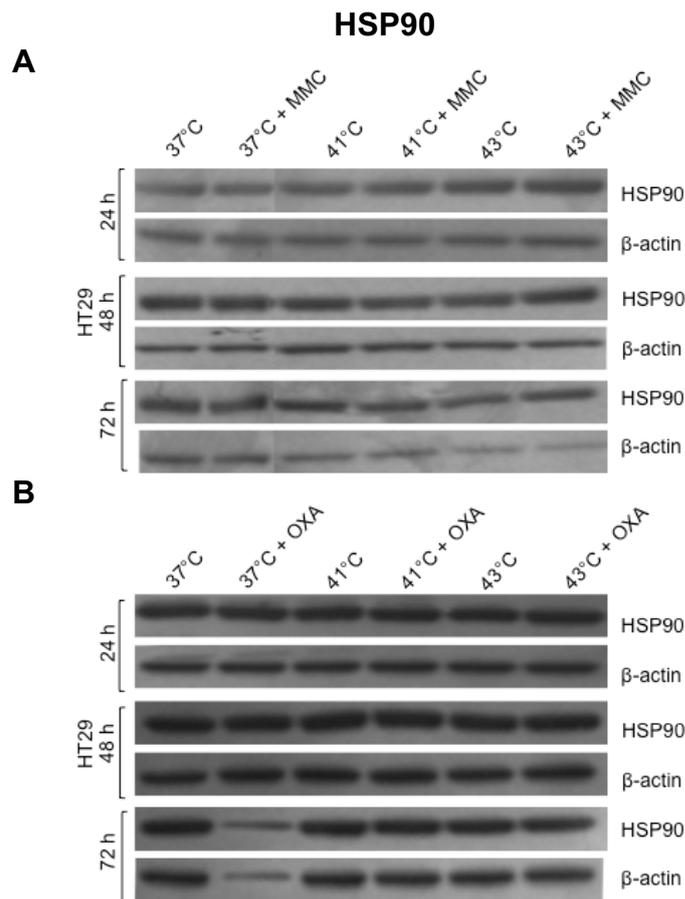


Abbildung 17: HSP90 Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) (88) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet.

5.3.2 Humanes SW480 Kolonkarzinom

5.3.2.1 HSP90 Genexpression

SW480 Zellen, die während der einstündigen Behandlung MMC ausgesetzt waren, zeigten nach 30 min und 72 h bei 43°C erhöhte HSP90AA1 Genexpressionen (FD=1,9 und FD=2,7) (**Abbildung 18A**). Für HSP90AA2 wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet. Eine relevante Steigerung der Genexpression von HSP90B1 und HSP90AB1 war hingegen nicht sichtbar. (Daten hier nicht dargestellt).

Verstärkte HSP90AA1 Expressionen OXA-behandelter SW480 Zellen zeigten sich nach 48 h bei 41°C (FD=2,4) und nach 72 h bei 37°C (FD=2,0) (**Abbildung 18B**). Bei der Isoform HSP90AA2 ließen sich ähnliche Effekte erkennen, während eine verstärkte Hyperthermie- und Zytostatikum induzierte HSP90B1 und HSP90AB1 Expression ausblieb. (Daten hier nicht dargestellt).

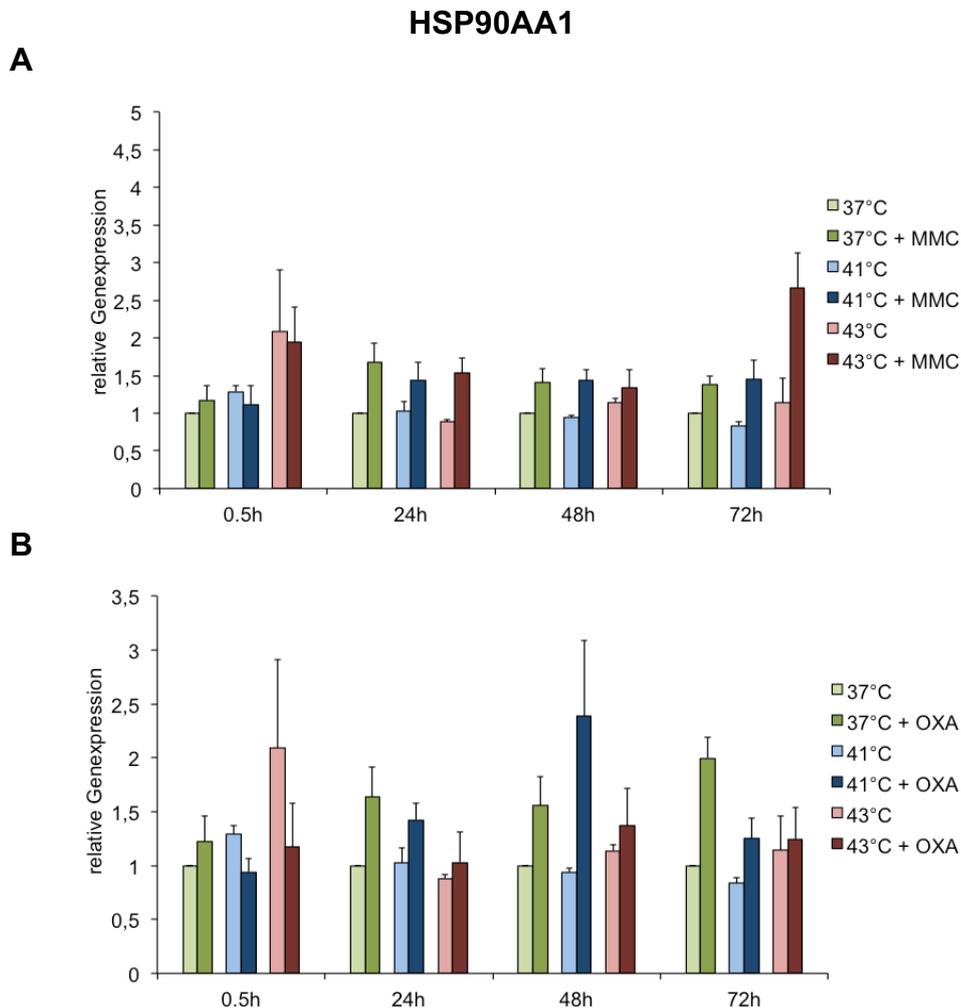


Abbildung 18: HSP90 Genexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h, 72 h mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme SW480 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (=fold difference, FD) (88).

5.3.2.2 HSP90 Proteinexpression

Verstärkte Proteinexpressionen zeigten sich bei normothermen MMC- und OXA-behandelten SW480 Zellen nach 24 h im Vergleich unbehandelten Zellkontrollen. Vergleichsweise konstante Expressionen zeigten sich nach 48 h und 72 h (**Abbildung 19**).

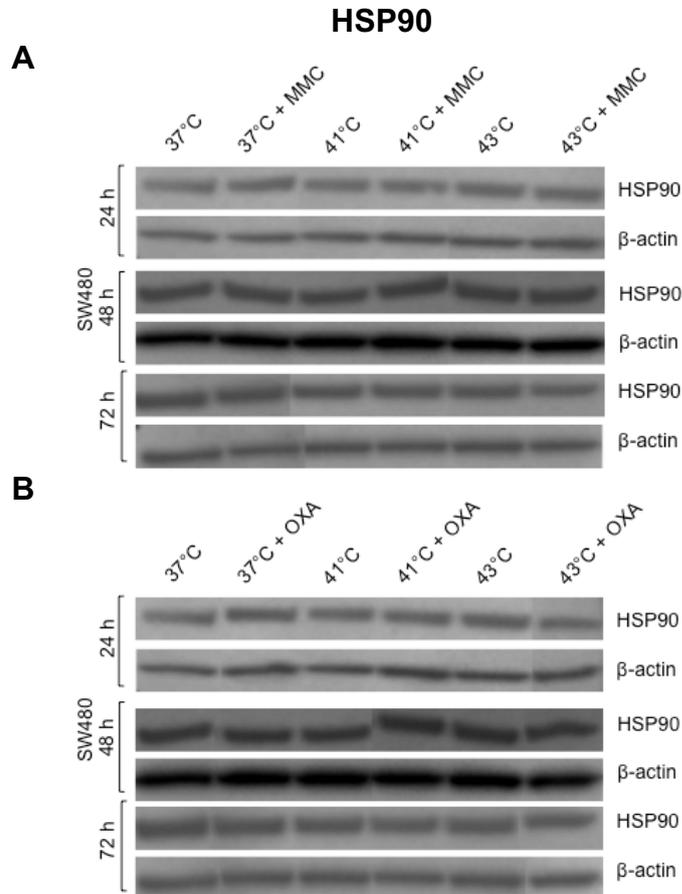


Abbildung 19: HSP90 Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet.

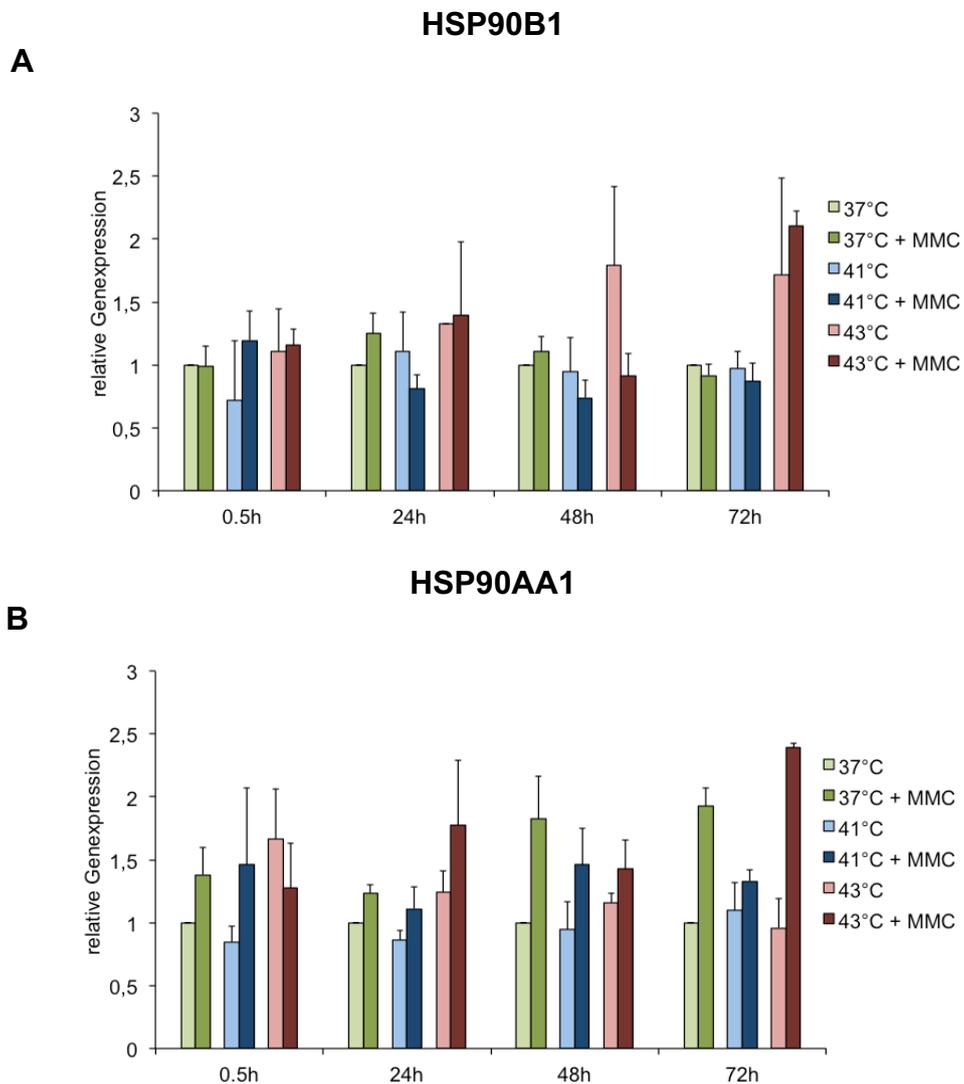
5.3.3 Humanes SW620 Kolonkarzinom

5.3.3.1 HSP90 Genexpression

Eine hypertherme MMC Behandlung der Zellen bei 43°C führte nach 72 h zu erhöhten Expressionen von HSP90B1, als auch von HSP90AA1 (FD=2,1 und

FD=2,4) (**Abbildung 20A,B**). Eine verstärkte HSP90AA2 Expression zeigte sich 24 h und 48 h nach Behandlung mit MMC bei normothermen Bedingungen (37°C:FD=2,0 und FD=2,0) und nach 72 h bei allen untersuchten Temperaturstufen (37°C: FD=2,5; 41°C: FD=2,2; 43°C: FD=2,0) (**Abbildung 20C**). Wie bereits bei HT29 und SW480 Zellen beschrieben, wurde auch bei SW620 Zellen keine Veränderung hinsichtlich der HSP90AB1 Expression beobachtet (**Abbildung 20D**).

Entsprechend den Ergebnissen MMC-behandelter Zellen wurden vergleichbare Beobachtungen bei OXA Exposition gemacht (Daten hier nicht dargestellt; Verweis auf Grimmig et al. (88) Zusatzmaterial 3/B).



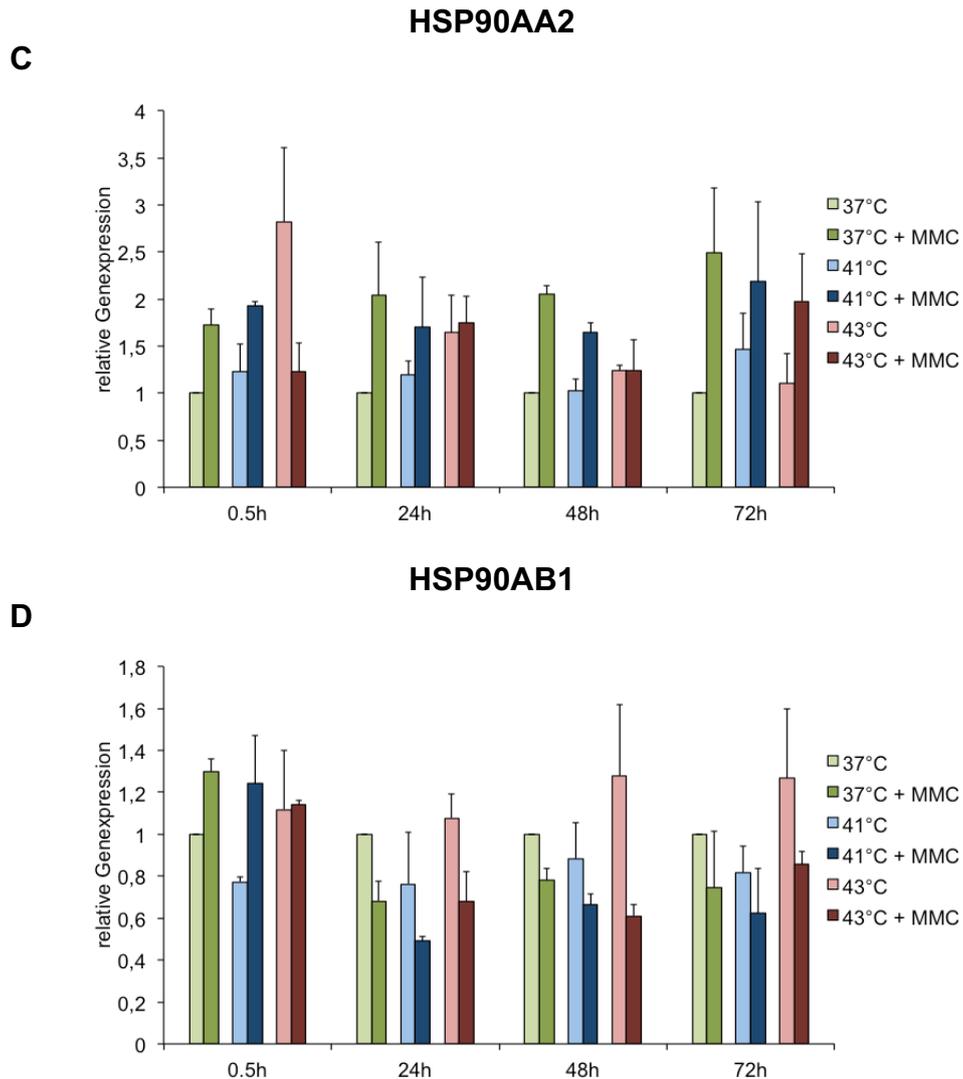


Abbildung 20: HSP90 Genexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin wurden die Tumorzellen hinsichtlich der Genexpression von HSP90B1 (A), HSP90AA1 (B), HSP90AA2 (C) und HSP90AB1 (D) nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h, 72 h mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme SW620 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (=fold difference, FD).

5.3.3.2 HSP90 Proteinexpression

Entsprechend den Beobachtungen der HT29 und SW480 Tumorzellen, zeigten sich auch bei SW620 Zellen, unbeeinflusst von Hyperthermie oder Zytostatikum, konstante HSP90 Expressionen. Generell fiel eine stark

ausgeprägte Proteinexpression auf, sodass vermutet werden kann, dass zusätzliche Zu- oder Abnahmen der Proteinmenge in dieser Form schwer zu detektieren sind (**Abbildung 21**).

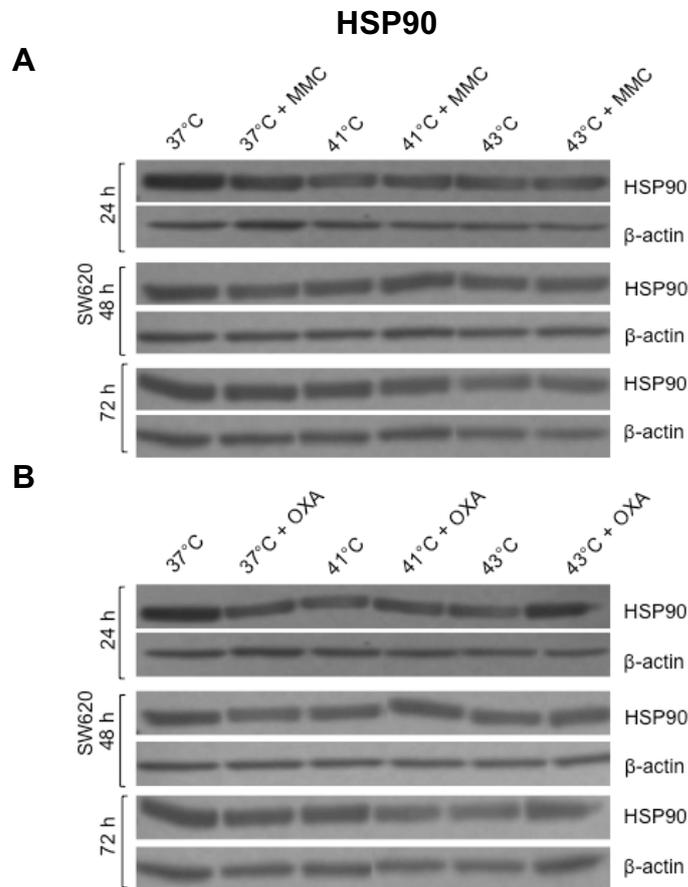


Abbildung 21: HSP90 Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) (88) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet.

5.4 PCNA

5.4.1 Humanes HT29 Kolonkarzinom

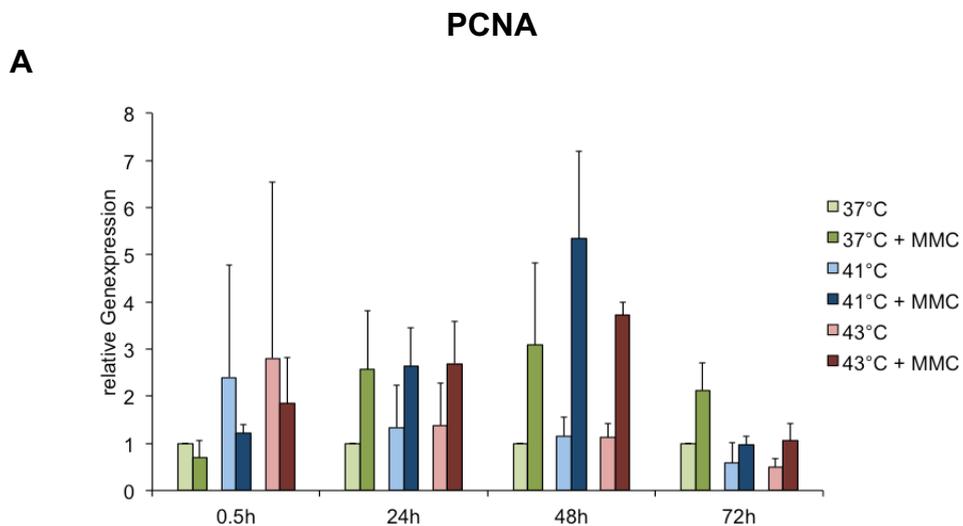
5.4.1.1 PCNA Genexpression

Um den Einfluss von Hyperthermie und Zytostatikum auf die Tumorzellproliferation während der *in vitro* HIPEC bei HT29 Zellen zu untersuchen,

wurden Expressionsprofile des Proliferationsmarkers PCNA mittels RT-qPCR analysiert.

Verstärkte Genexpressionen wurden nach 24 h und 48 h Regenerationszeit, bei MMC-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen bei 37°C (FD=2,6 und FD=3,1), 41°C (FD=2,6 und FD=5,3) und 43°C (FD=2,7 und FD=3,7), beobachtet. Auch nach 72 h Regenerationszeit ließen sich bei normotherm MMC-behandelten Zellen eine 2,1-fache Expressionssteigerung des Proliferationsmarker PCNA beobachten (**Abbildung 22A**).

HT29 Zellen, die einer hyperthermen Behandlung mit OXA ausgesetzt waren, zeigten nach 48 h bei 41°C (FD=2,0) sowie nach 72 h bei allen Temperaturstufen (37°C: FD=1,9; 41°C: FD=2,0; 43°C: FD=2,1) erhöhte Genexpressionen (**Abbildung 22B**).



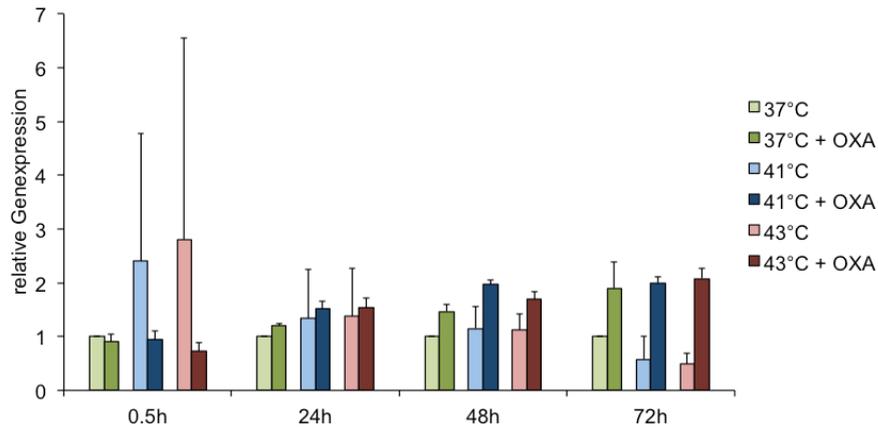
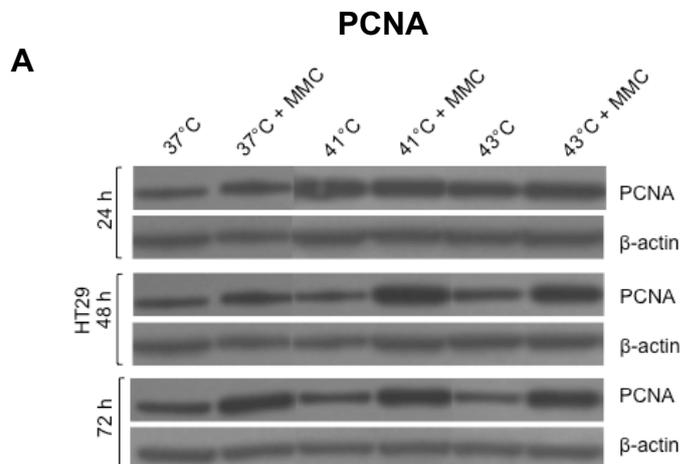
B

Abbildung 22: PCNA Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h, 72 h mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme HT29 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (=fold difference, FD) (88).

5.4.1.2 PCNA Proteinexpression

Verstärkte PCNA Proteinexpressionen wurden nach 24 h, 48 h und selbst nach 72 h Regenerationszeit bei normotherm und hypertherm MMC- und OXA-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellkontrollen beobachtet (**Abbildung 23**).



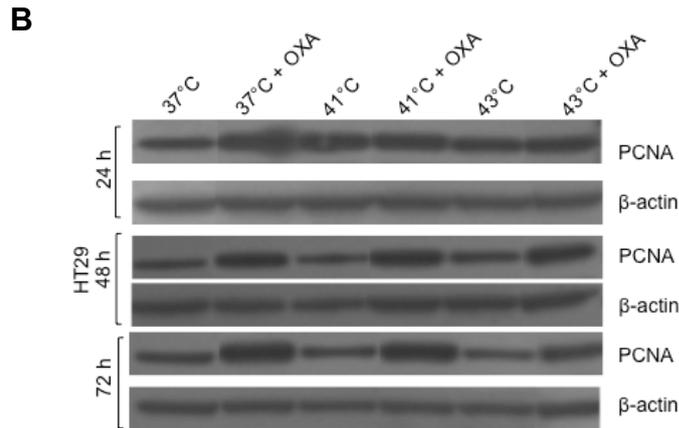


Abbildung 23: PCNA Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet (88).

5.4.2 Humanes SW480 Kolonkarzinom

5.4.2.1 PCNA Genexpression

In hypertherm MMC-behandelten SW480 Zellen zeigten sich verstärkte Genexpressionen von PCNA nach 48 h (41°C: FD=2,2) und 72h (43°C: FD=2,9), wohingegen initial nach 30 min sowie 24 h keine Steigerung sichtbar war (**Abbildung 24**).

Tumorzellen, die mit OXA behandelt wurden, zeigten ähnliche Effekte wie MMC-behandelte Zellen (Daten hier nicht dargestellt).

PCNA

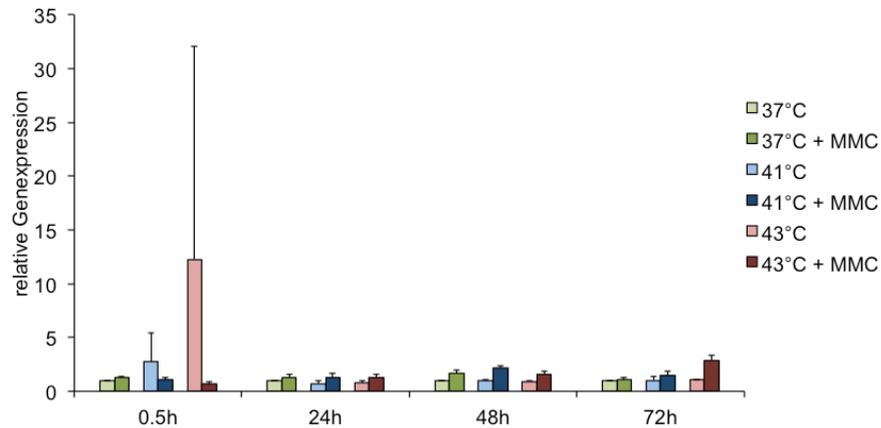


Abbildung 24: PCNA Genexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin wurden die Tumorzellen nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h, 72 h mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme SW480 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (=fold difference, FD).

5.4.2.2 PCNA Proteinexpression

Hypertherm MMC- und OXA-behandelte Tumorzellen zeigten, analog zu den Ergebnissen der HT29 Zellen, verstärkte Proteinexpressionen bei 24 h, 48 h sowie selbst nach 72 h (**Abbildung 25A,B**). Dabei führte sowohl normotherme (37°C) wie auch hypertherme (41°C, 43°C) MMC Behandlung zu erhöhten Expressionsprofilen.

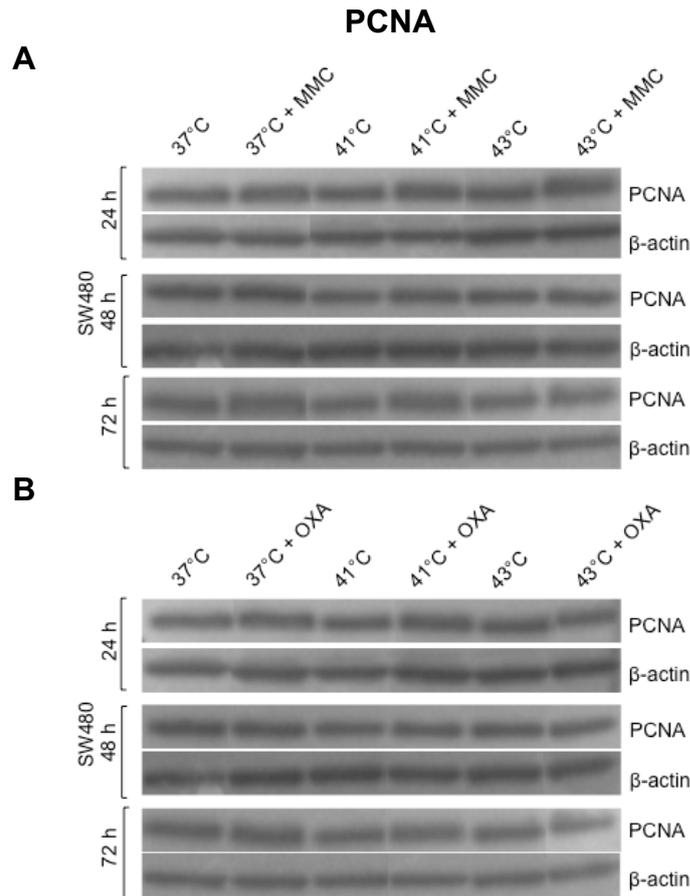


Abbildung 25: PCNA Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet (88).

5.4.3 Humanes SW620 Kolonkarzinom

5.4.3.1 PCNA Genexpression

In SW620 Zellen ließ sich nach 24 h, 48 h und 72 h Regenerationszeit erkennen, dass sowohl normotherme Bedingungen (37°C: FD=2,4, FD=3,0 und FD=3,4) als auch hypertherme Bedingungen (41°C: FD=2,5, FD=4,3 und FD=3,4; 43°C: FD=2,7, FD=3,0 und FD=3,2) bei MMC behandelten Zellen zu erhöhter PCNA Genexpression führte (**Abbildung 26**).

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei MMC Exposition, zeigten sich ähnliche Effekte bei OXA-behandelten Zellen (Daten hier nicht dargestellt).

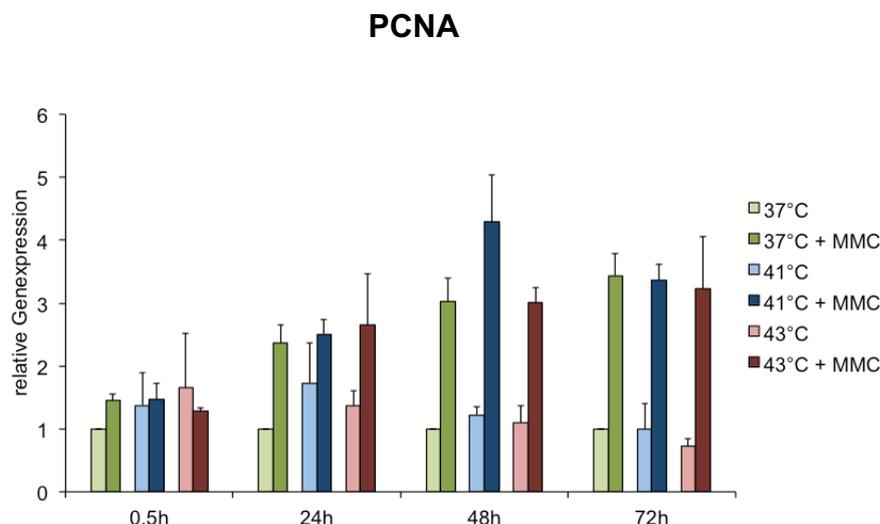


Abbildung 26: PCNA Genexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin wurden die Tumorzellen nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h, 72 h mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme SW620 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (=fold difference, FD) (88).

5.4.3.2 PCNA Proteinexpression

Übereinstimmend mit den Ergebnissen auf Genebene ließ sich auch in den durchgeführten Western Blots auf Proteinebene eine verstärkte Expression nach 24 h, 48 h und selbst 72 h nach Regenerationszeit bei normotherm und hypertherm inkubierten Zellen kombiniert mit zytotoxischem Stress (MMC/OXA) erkennen (**Abbildung 27**).

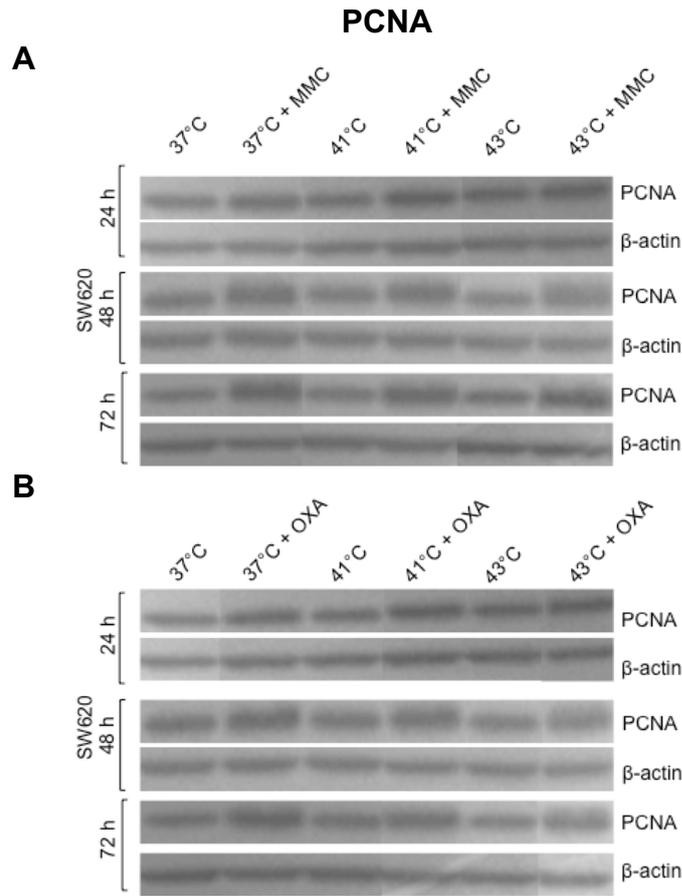


Abbildung 27: PCNA Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (A) oder Oxaliplatin (B) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet (88).

5.5 Ki-67

5.5.1 Humanes HT29, SW480, SW620 Kolonkarzinom

5.5.1.1 Ki-67 Genexpression

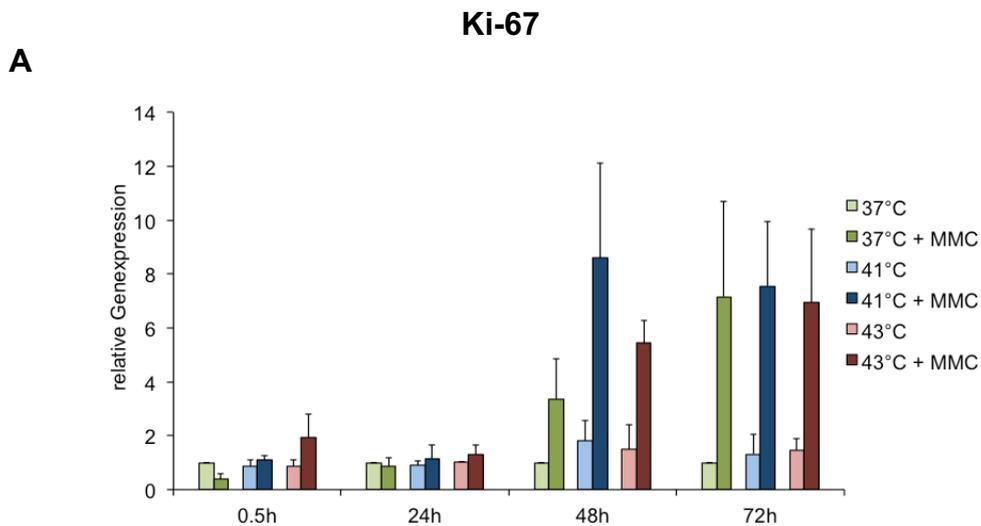
Zusätzlich zur Analyse der Genexpression von PCNA wurden mittels RT-qPCR die Expression des Proliferationsmarker Ki-67 in HT29, SW480 und SW620 Zellen untersucht.

HT29 Tumorzellen, die mit MMC behandelt wurden, zeigten gegenüber der Zellkontrollen verstärkte Genexpressionen nach 48 h und 72 h bei normothermen (37°C: FD=3,4 und FD=7,2) sowie insbesondere bei

hyperthermen Temperaturbedingungen (41°C: FD=8,6 und FD=7,5; 43°C: FD=5,4 und FD=6,9) (**Abbildung 28A**).

OXA-behandelte Zellen zeigten, analog zur MMC Behandlung, nach 48 h sowie nach 72 h Regenerationszeit bei allen Temperaturstufen stark erhöhte Genexpressionen (37°C: FD=3,3 und FD=5,1; 41°C: FD=2,2 und FD=4,1; 43°C: FD=2,1 und FD=4,2) (**Abbildung 28B**).

Entsprechend den Beobachtungen in HT29 Zellen, wurden bei Zytostatika-behandelten SW480 und SW620 Zellen vergleichbare Beobachtungen nach 48 h und 72 h gemacht (Daten hier nicht dargestellt, Verweis auf Grimmig et al. (88) Zusatzmaterial 7/B und 8/B).



B

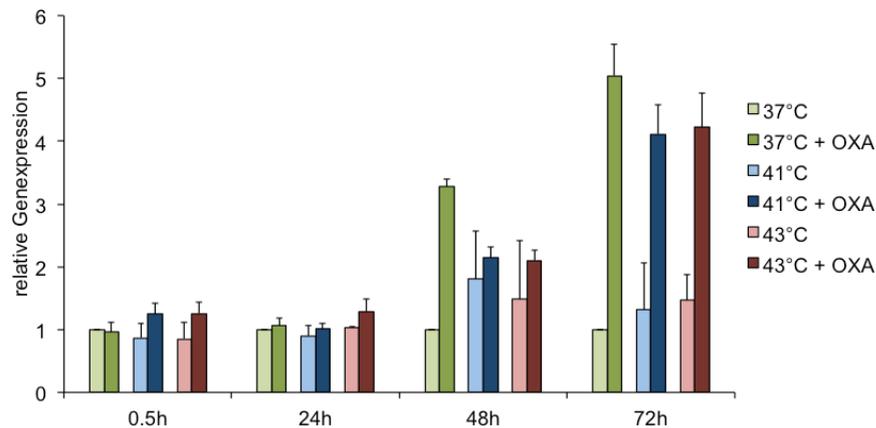


Abbildung 28: Ki-67 Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (A) oder Oxaliplatin (B) wurden die Tumorzellen nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h, 72 h mittels RT-qPCR untersucht. Als Kontrolle dienten normotherme HT29 Zellen (37°C) ohne Zytostatikum (FD=1). Die Normalisierung der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Referenzgen ACTB durchgeführt. Mittels TBP normalisierte Ergebnisse zeigten ähnliche Effekte. Die Angabe der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (=fold difference, FD) (88).

5.6 Bcl-xL

5.6.1 Humanes HT29, SW480, SW620 Kolonkarzinom

5.6.1.1 Bcl-xL Proteinexpression

Um den Einfluss der *in vitro* HIPEC Behandlung auf die Tumorzellapoptose veranschaulichen zu können, wurde die Proteinexpression von Bcl-xL in HT29, SW480 und SW620 Zellen in Western Blots untersucht. Verstärkte Expressionen zeigten sich nach 24 h, 48 h und selbst nach 72 h Regenerationszeit bei normotherm und hypertherm inkubierten Zellen kombiniert mit zytotoxischem Stress (MMC). Insbesondere hypertherme MMC Behandlung bei 41°C führte im Vergleich zu normothermen Bedingungen zu stärker ausgeprägter Bcl-xL Expression. Auffallend war zudem ein isolierter Hyperthermie-Effekt auf die Zellen, der besonders nach 24 h erhöhte Bcl-xL Expressionen bei 41°C und 43°C im Vergleich zu 37°C zur Folge hatte. (Abbildung 29A).

Entsprechend den Beobachtungen in HT29 Zellen, zeigten sich bei MMC- und OXA-behandelten SW480 und SW620 Tumorzellen vergleichbare Effekte nach 48 h und 72 h. (Daten hier nicht dargestellt).

Die OXA-Behandlung führte auch hier bei allen Untersuchungszeitpunkten sowie Temperaturstufen (37°C, 41°C, 43°C) zu verstärkter Proteinexpression des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-xL. Der Effekt der isolierten Hyperthermie-induzierten Expressionssteigerung zeigte sich deutlich nach 24 h bei 41°C (**Abbildung 29B**).

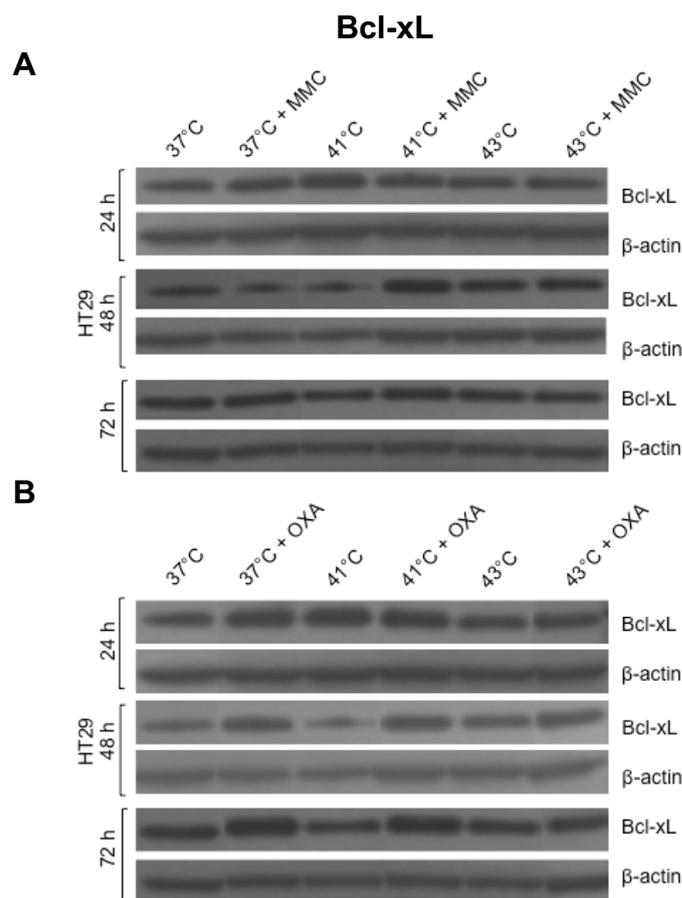


Abbildung 29: Bcl-xL Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen

Nach einstündiger Hyperthermie mit und ohne Zytostatikum Mitomycin (**A**) oder Oxaliplatin (**B**) wurden die Tumorzellen nach 24 h, 48 h, 72 h Regenerationszeit mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet (88).

5.7 Ex vivo Patientenproben prä und post HIPEC

5.7.1 Bcl-xL und PCNA Proteinexpression

Um den Einfluss der hyperthermen Chemotherapie auf Apoptose und Proliferation in Peritonealkarzinoseherden zu veranschaulichen, wurde die Proteinexpression von Bcl-xL und PCNA in *ex vivo* Proben, entnommen von Patienten nach HIPEC (MMC oder OXA +/- einer Kombination mit 5-FU), in Western Blots untersucht.

Verstärkte Expressionen des Proteins Bcl-xL gegenüber der Kontrollprobe vor HIPEC wurden in sechs der acht untersuchten *ex vivo* Proben von Patienten nach hyperthermer Chemotherapie beobachtet (**Abbildung 30A**), stärker ausgeprägte PCNA Expressionen in vier der acht *ex vivo* Patientenproben (**Abbildung 30B**).

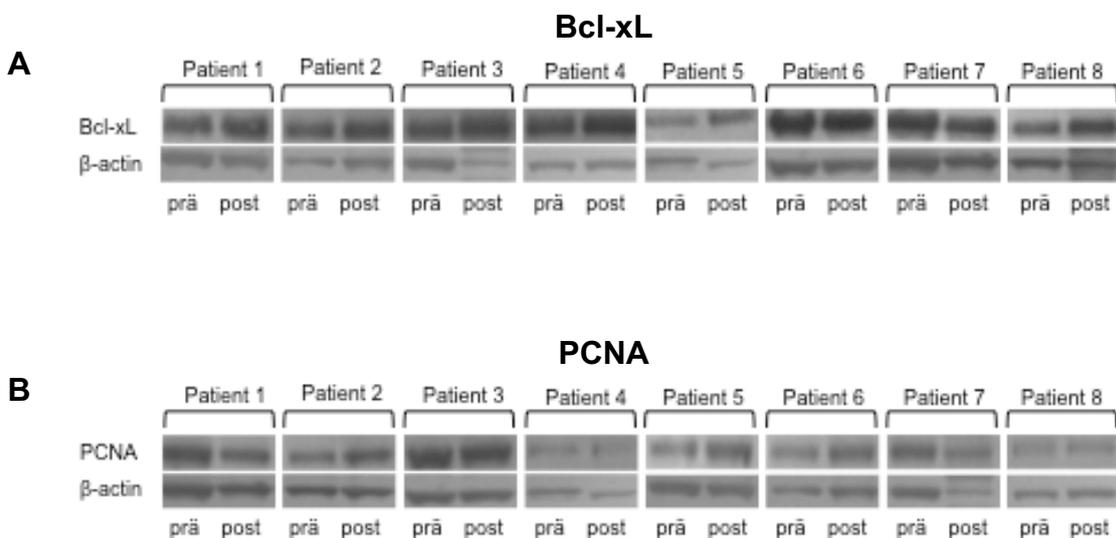


Abbildung 30: Bcl-xL und PCNA Proteinexpression in *ex vivo* Patientenproben prä und post HIPEC

Die intraoperativ entnommenen Tumorproben vor (prä) und nach (post) HIPEC Behandlung wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Als Proteinladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet (88).

5.8 Zellproliferation nach hyperthermer Chemotherapie

Um Aussagen über die Zellproliferation der Tumorzellen nach der Hyperthermiebehandlung und nach zusätzlicher Chemotherapie (5-FU, MMC, OXA) treffen zu können, wurden die Zellen mittels MTS-Tests untersucht. Die Behandlung der HT29, SW480 und SW620 Zellen erfolgte entsprechend der *In vitro* Hyperthermie Modellbeschreibung in Absatz 4.3.2.1. Die spektroskopische Vermessung erfolgte dann nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Regenerationszeit.

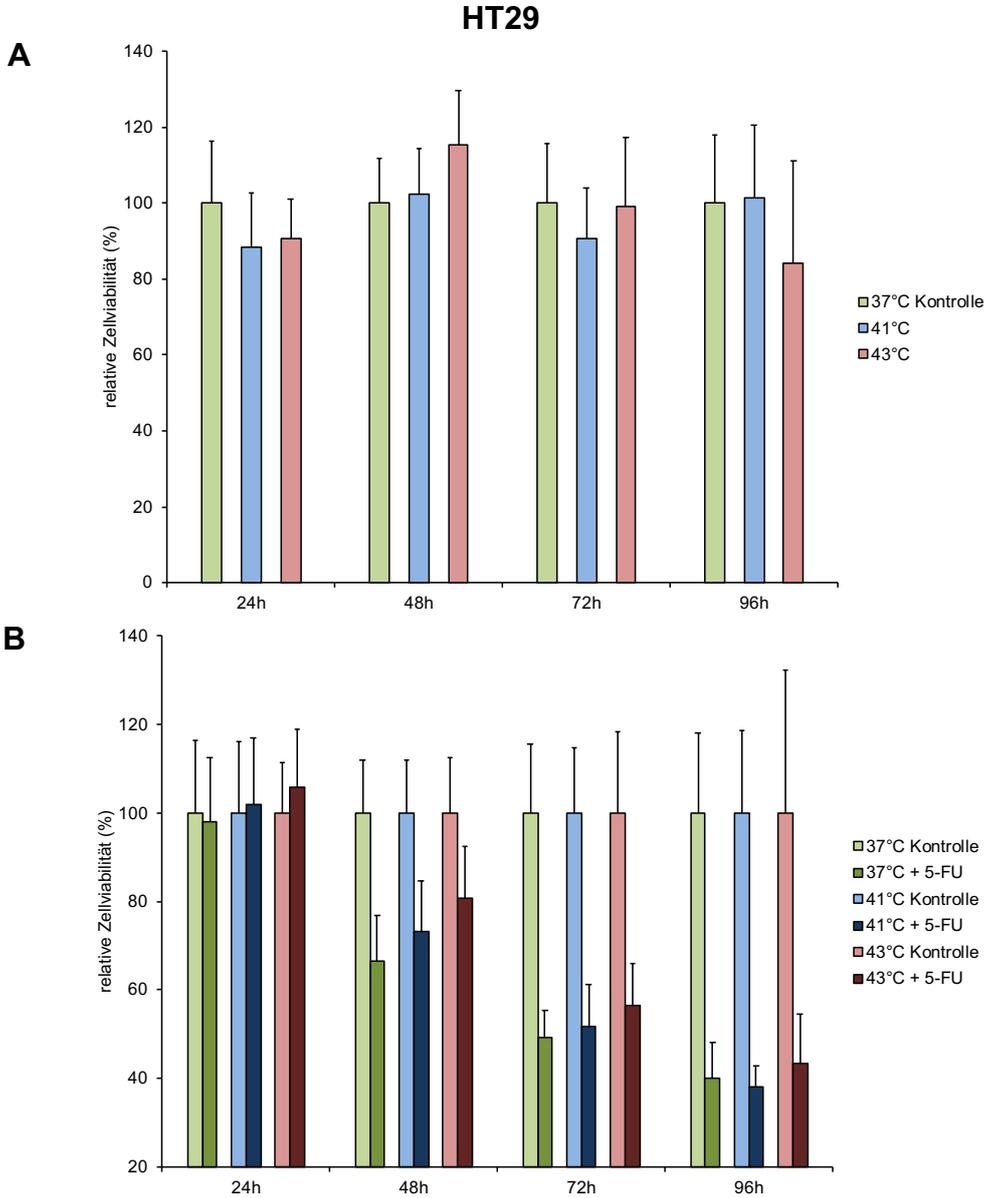
HT29 Zellen zeigten nach isolierter Hyperthermieexposition bei 41°C und 43°C nach 24 h zunächst eine reduzierte Zellproliferation (41°C: 88%, 43°C: 91%) gegenüber der normothermen Referenzprobe bei 37°C (100%). Dahingegen konnte nach 48 h ein deutlicher Anstieg der Zellviabilität unter hyperthermen Konditionen beobachtet werden (41°C: 102%, 43°C: 115%). Nach 72 h und 96 h Regenerationszeit stellte sich anschließend eine Normalisierung ein (**Abbildung 31A**).

Zusätzliche Zytostatikaexposition mit 5-FU führte insbesondere nach 48 h zu einer deutlich erhöhten Zellviabilität bei hypertherm (41°C und insbesondere 43°C) behandelten Zellen im Vergleich zu Zellen unter normothermen Bedingungen bei 37°C (41°C: 73%, 43°C: 81% versus 37°C: 66%) und konnte selbst nach 3 Tagen noch beobachtet werden (**Abbildung 31B**).

Hypertherm MMC-behandelte HT29 Zellen zeigten gegenüber normotherm behandelten Zellen bei 37°C ebenfalls eine erhöhte Zellproliferation, die nach 72 h noch beobachtet werden konnte (41°C: 37%, 43°C: 32% versus 37°C: 27%) (**Abbildung 31C**).

Tumorzellen, die mit OXA behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Zellproliferation unter hyperthermen Bedingungen bei 43°C verglichen mit 37°C bereits nach 24 h (43°C: 93% versus 37°C: 85%). Zudem zeigte sich eine erhöhte Viabilität unter hyperthermen Bedingungen nach 48 h und 72 h (nach 48 h: 41°C: 79%, 43°C: 80% versus 37°C: 71%; nach 72 h: 41°C: 76%, 43°C: 77% versus 37°C: 74%) (**Abbildung 31D**).

Entsprechend den Ergebnissen der HT29 Zellen wurden vergleichbare Beobachtungen bei SW480 und SW620 Zellen gemacht. (Daten hier nicht dargestellt, Verweis auf Grimmig et al. (88) Zusatzmaterial 6 A/B/C).



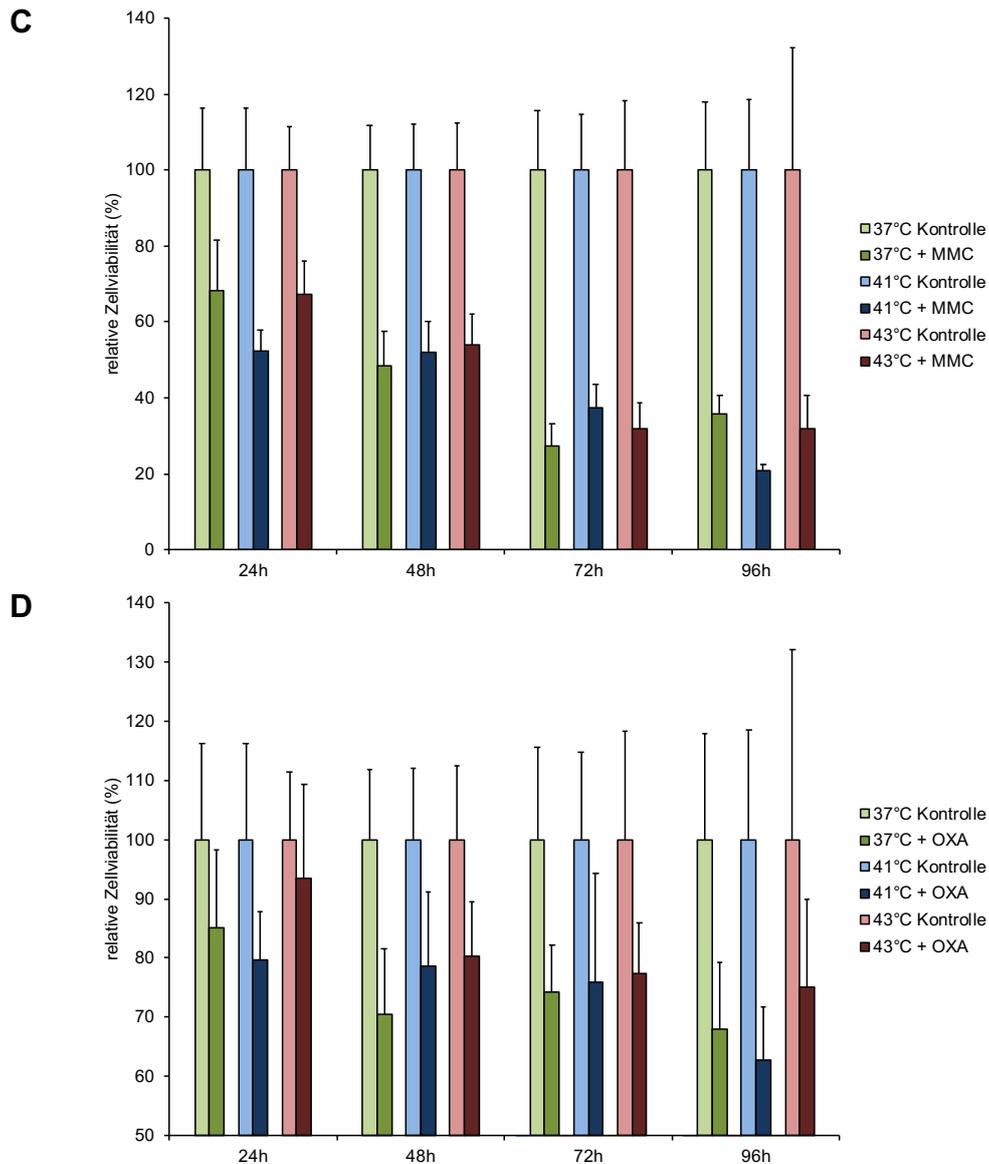


Abbildung 31: MTS-Proliferationstest in HT29 Kolonkarzinomzellen

MTS-Proliferationstests von HT29 Kolonkarzinomzellen nach einstündiger isolierter Hyperthermie (A), nach einstündiger Hyperthermie und Zytostatikum 5-FU (B), Mitomycin C (C) oder Oxaliplatin (D). Die Tumorzellen wurden nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Regenerationszeit untersucht. Als Kontrolle dienen in Grafik A Zellen bei 37°C, sie wurden mit 100% gleichgesetzt; in Grafiken B/C/D dienen Zellen ohne Zytostatikum bei 37°C, 41°C und 43°C als Kontrolle, sie wurden mit 100% gleichgesetzt (88).

6 Beantwortung der Fragestellung

1. Welchen Einfluss haben verschiedene, in klinischer Anwendung befindliche Zytostatika sowie isolierte Hyperthermie auf die Expression von Hitzeschockproteinen *in vitro* in den humanen Kolonkarzinomen HT29, SW480 und SW620? Sind Unterschiede in der Expression von Hitzeschockproteinen bei verschiedenen Temperaturstufen und Regenerationszeiten zu erkennen?

Kolonkarzinomzellen aller drei untersuchten Zelllinien, die während des *in vitro* HIPEC-Modells der zytostatischen Behandlung mit Oxaliplatin oder Mitomycin C ausgesetzt waren, zeigten eine deutlich verstärkte Genexpression aller drei untersuchten Heat Shock Proteine (HSP27, HSP70 und HSP90). Insbesondere die Zytostatika-Gabe in Kombination mit Hyperthermie (41°C und 43°C) führte im Vergleich zu normothermen Bedingungen bei 37°C zu signifikant erhöhter Genexpression von HSP27, HSP70 und HSP90 aller untersuchter Tumorzellen. Erhöhte Expressionsspiegel der HSPs konnten selbst drei Tage nach HIPEC-Behandlung noch nachgewiesen werden. Tumorzellen, die einer isolierten Hyperthermie ohne zusätzliche Chemotherapeutika ausgesetzt waren, zeigten insbesondere bei HSP70 initial 30 min nach Hyperthermie-Behandlung (41° und 43°C) gesteigerte Expressionsprofile. Verstärkte Expressionsspiegel von HSP27 fanden sich in allen drei untersuchten Zelllinien analog zur Genexpression auch auf Proteinebene im Western Blot. Dabei konnte eine gesteigerte Proteinexpression, sowohl Zytostatika- als auch isoliert Hyperthermie-induziert, nachgewiesen werden. Die stärkste Proteinexpression von HSP27 zeigten Zellen mit kombinierter hyperthermer Chemotherapie. Diese konnte selbst drei Tage nach der Behandlung noch nachgewiesen werden. Bei HSP70 und HSP90 zeigte sich im Gegensatz zu HSP27 bereits in normothermen Kontrollen eine hohe Grundexpression der Proteine. Nur in einer der drei untersuchten Zelllinien (SW480) ließ sich eine induzierbare Proteinexpressionssteigerung durch Zytostatika bzw. Hyperthermie bei HSP70 nachweisen. Eine temperaturabhängige Expressionsverstärkung auf Genebene durch Hyperthermie bei 41°C als auch bei 43°C zeigte sich bei HSP70 in allen

drei Zelllinien, insbesondere initial nach 30 min. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten konnte keine weitere Expressionssteigerung beobachtet werden. HSP90 zeigte Zytostatika-induziert erhöhte mRNA-Expressionsspiegel vor allem zu späteren Untersuchungszeitpunkten (48 h und 72 h). Im Gegensatz dazu konnten auf Proteinebene in allen drei Kolonkarzinomzelllinien überwiegend konstante Proteinexpressionsspiegel ohne signifikante Veränderungen infolge von Hyperthermie- oder Zytostatikabehandlung beobachtet werden. Diese Diskrepanz der HSP90-Expression zwischen Gen- und Proteinebene könnte beispielsweise durch posttranslationale Regulationen von HSP90 mRNA bedingt sein.

2. Welchen Effekt haben Hyperthermie und verschiedene Zytostatika auf die Zellproliferation in den untersuchten Kolonkarzinomen?

Um Aussagen über die Zellproliferation in Kolonkarzinomzellen treffen zu können, wurde die Genexpression zweier Proliferationsmarker (Ki-67, PCNA) untersucht sowie die Expression von PCNA auf Proteinebene mittels Western Blot in allen drei Zelllinien und in *ex vivo* Patientenproben prä und post HIPEC bestimmt. Zusätzlich wurden MTS-Proliferationsassays durchgeführt. Beide Proliferationsmarker - Ki-67 und PCNA - zeigten deutlich eine durch Hyperthermie sowie Chemotherapie (OXA und MMC) induzierte Genexpressionssteigerung in allen drei Zelllinien, die selbst drei Tage nach einstündiger Behandlung noch nachweisbar war. Analog dazu war eine verstärkte Proteinexpression des zusätzlich mittels Western Blot untersuchten Proliferationsmarker PCNA in allen drei untersuchten Zelllinien nach Zytostatikagabe bei 37°C, 41°C und 43°C festzustellen. Im Falle von PCNA konnten diese Beobachtungen darüber hinaus in *ex vivo* Patientenproben nach HIPEC bestätigt werden. Zusätzlich durchgeführte MTS-Tests zeigten initial (24 h) post HIPEC zunächst in allen drei untersuchten Zelllinien eine reduzierte Zellproliferation der hypertherm sowie mit Zytostatika behandelten Zellen im Vergleich zu normotherm behandelten Zellen. Dahingegen konnte 48 h und 72 h post HIPEC, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Proliferationsmarker

auf Gen- und Proteinebene, überraschenderweise eine erhöhte Zellviabilität nach hyperthermer Chemotherapie (5-FU, MMC und OXA) im Vergleich zu normothermer Chemotherapie im Modellansatz beobachtet werden, was einen Rebound-Effekt überlebender Karzinomzellen vermuten lässt. Antiproliferative Effekte der Hyperthermie waren in überlebenden Tumorzellen mutmaßlich aufgehoben. Zu späterer Regenerationszeit (96 h) stellte sich wieder eine Normalisierung der Zellviabilität ein.

3. Welche Auswirkungen haben die gewählten Zytostatika sowie die Hyperthermie auf die Expression von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen wie Bcl-xL?

Sowohl die isolierte Hyperthermie bei 41°C und 43°C als auch die Kombination mit dem Zytostatikum MMC oder OXA führte zu allen Untersuchungszeitpunkten in den drei untersuchten Zelllinien zu deutlich verstärkter Proteinexpression des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-xL. Diese Beobachtungen konnten in den *ex vivo* Proben von Patienten nach HIPEC bestätigt werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass insbesondere hypertherme Chemotherapie (MMC und OXA unter 41°C Temperatureinwirkung), im Vergleich zu normothermer Chemoexposition bei 37°C zu stärker ausgeprägter Proteinexpression führte. Hohe Temperaturen (> 41°C) allein sowie in Kombination mit in der HIPEC gängigen Zytostatika scheinen unerwünschte, anti-apoptotische Prozesse in überlebenden Tumorzellen in Gang zu setzen und könnten somit negativen Einfluss auf den klinischen Erfolg der HIPEC haben.

4. Welchen Einfluss hat die hypertherme Chemotherapie auf Proliferation und Apoptose in Peritonealkarzinoseherden, entnommen aus Patienten nach HIPEC? Können die Beobachtungen aus den *in vitro* Untersuchungen der humanen Kolonkarzinome anhand der *ex vivo* untersuchten Patientenproben bestätigt werden?

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus den Untersuchungen der drei Kolonkarzinomzelllinien konnten in vier der acht untersuchten *ex vivo* Proben von Patienten nach hyperthermer Chemotherapie eine verstärkte Expression des Proteins PCNA sowie in sechs der acht *ex vivo* Patientenproben eine verstärkte Expression des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-xL detektiert werden. Auf Basis der erhobenen Daten lässt sich vermuten, dass die Induktion von Heat Shock Proteinen nach hyperthermem, zytotoxischem Stress in überlebenden Tumorzellen zu einem erhöhten Proliferationspotential führt sowie anti-apoptotische Schutzmechanismen das Überleben der Zellen sichern.

5. Welche Schlussfolgerungen lassen sich aus den Untersuchungen für die Klinik ableiten?

Die Kombination aus zytoreduktiver Chirurgie und einer anschließenden hyperthermen intraperitonealen Chemoperfusion stellt sich, wie in Absatz 1.1.3 beschrieben, als vielversprechende Therapiestrategie bei ausgesuchten Patienten mit Peritonealkarzinose dar. Hitzeschockproteinen kommt dabei eine bedeutende Rolle zu, da sie infolge von zellulären Stressfaktoren wie Hitze oder Zytostatika-bedingter Chemotoxizität induziert werden.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals zeigen konnten, werden durch die Induktion von HSP27, HSP70 und HSP90 infolge von hyperthermem und zytotoxischem Stress in überlebenden Zellen nach hyperthermer Chemotherapie unerwünschte antiapoptische sowie proliferative Effekte im Sinne von Reparatur- und Zellschutzmechanismen induziert und vermindern so in einzelnen überlebenden Tumorzellen möglicherweise den gewünschten Therapieerfolg der HIPEC. Als Folge erscheinen unerwünschte Tumorrezidive mit resistenteren Tumorzellen vorstellbar. Auffällig war, dass die beobachteten Prozesse insbesondere ab einer Temperatur von 41°C in Gang gesetzt zu werden scheinen. Da die aktuell klinisch angewandte Zieltemperatur des Perfusats während der HIPEC-Therapie je nach Behandlungsprotokoll- und zentrum zwischen 41°C und 43°C variiert, scheint in Zusammenschau mit den hier gezeigten Ergebnissen eine Reevaluation des Zieltemperaturfensters

während der klinischen HIPEC, unter Beachtung von erwünschten und unerwünschten Effekten der Hyperthermie, sinnvoll.

Um die beschriebenen, unerwünschten Zellmechanismen zu verhindern und somit Therapieeffekte der HIPEC weiter zu verbessern, wäre zudem die kombinierte Gabe von bereits verfügbaren HSP-Inhibitoren mehrerer HSP-Familien zu überprüfen.

7 Diskussion

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich eine Kombination aus zytoreduktiver Chirurgie (CRS) mit angeschlossener hyperthermer, intraperitonealer Chemoperfusion (HIPEC) als vielversprechende Therapieoption bei Patienten mit Peritonealkarzinose etabliert. Die CRS dient dabei der Entfernung der makroskopisch sichtbaren Tumormasse, die HIPEC der Eradikation von verbleibenden Mikrometastasen (17, 20). Publizierte Studien, wie die von Verwaal et al. (19) oder Esquivel (89) zeigten, dass durch die Kombination aus CRS und HIPEC bei Patienten mit Peritonealkarzinose bei kolorektalem Primärtumor eine verbesserte mittelfristige Überlebenschance erreicht werden konnte.

Hitzeschockproteine scheinen im Rahmen der HIPEC eine große Rolle zu spielen. Sie fungieren primär als molekulare Chaperone, die auf physikalische sowie chemische Stressfaktoren, wie Hitzestress oder Zytostatika, mit einer verstärkten Expression reagieren. Diese Beobachtungen konnten bereits in *in vitro* Studien der eigenen Arbeitsgruppe durch Exposition von Kolonkarzinomzellen mit Hyperthermie und Zytostatika nach kurzer Regenerationszeit (30 min und 12 h) sowie selbst mehrere Tage (72 h) nach Behandlung bestätigt werden (88, 90).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, neben Auswirkungen von Hyperthermie und in der klinischen Anwendung der HIPEC gängigen Zytostatika auf die Expression von Hitzeschockproteinen, auch Effekte der HIPEC-Behandlung auf die Tumorzellproliferation sowie die Apoptose *in vitro* in humanen Kolonkarzinomzelllinien sowie in *ex vivo* Patientenproben prä und post HIPEC untersucht.

7.1 Auswirkungen von Hyperthermie und Zytostatika auf die Expression von Hitzeschockproteinen nach HIPEC *in vitro* in Kolonkarzinomzellen

Kolonkarzinomzellen aller drei untersuchten Zelllinien, die während des *in vitro* HIPEC-Modells der einstündigen, hyperthermen Chemotherapie mit Oxaliplatin

oder Mitomycin C ausgesetzt waren, zeigten eine deutlich verstärkte Genexpression aller drei untersuchten HSPs (HSP27, HSP70 und HSP90). Zytostatika in Kombination mit Hyperthermie (41°C und 43°C) führten dabei zelllinienübergreifend, im Vergleich zu normothermen Bedingungen bei 37°C, zu signifikant erhöhter Genexpression der HSPs. Erhöhte Expressionsspiegel konnten selbst drei Tage nach HIPEC-Behandlung noch nachgewiesen werden. Bei HSP27 fanden sich auf Proteinebene im Western Blot analog zur mRNA-Ebene verstärkte Expressionsmuster, wohingegen HSP70 und HSP90 bereits unter normothermen Kontrollbedingungen eine hohe Grundexpression der Proteine zeigten. Eine Induktion des Proteins HSP70 durch Hyperthermie bzw. Zytostatika ließ sich nur in einer der drei untersuchten Zelllinien nachweisen, HSP90 zeigte zelllinienübergreifend konstante Proteinexpressionsspiegel. Die Diskrepanz der HSP90-Expression zwischen Gen- und Proteinebene könnte möglicherweise durch posttranslationale Regulationen von HSP90 mRNA bedingt sein.

Eine vermehrte Expression von HSPs konnte bereits in verschiedenen Tumorerkrankungen festgestellt werden und geht häufig mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Therapieresistenz einher (47). Heat Shock Proteine wirken über verschiedene Interaktionen, wie in Absatz 2.1 beschrieben, als zelluläre Protektoren und begünstigen das Überleben einer Zelle unter Stressbedingungen. Die erzielten Ergebnisse deuten folglich daraufhin, dass in überlebenden Tumorzellen nach der HIPEC durch die Hochregulierung von HSPs verstärkt Reparaturvorgänge induziert werden und somit ein Überleben der verbliebenen Tumorzellen gesichert werden würde. Erhoffte zytotoxische Effekte während der hyperthermen Chemotherapie würden also gemindert, das Ergebnis der Therapie demzufolge negativ beeinflusst.

7.2 Einfluss von verschiedenen Temperaturen und Regenerationszeiten auf die Expression von Heat Shock Proteinen

Obwohl die HIPEC-Therapie bereits ein weltweit gängiges Verfahren darstellt, hat sich bis heute kein standardisiertes Verfahren bezüglich verschiedener Parameter wie Zytostatikakonzentration, Trägerlösung, Perfusatvolumen, Dauer der Behandlung und Temperatur des Perfusats etabliert. Die aktuell klinisch angewandte Zieltemperatur des Perfusats während der HIPEC-Therapie variiert stark je nach Behandlungsprotokoll- und -zentrum und bewegt sich zwischen 41°C und 43°C (27, 32). Mehrere Studien beschreiben synergistische Effekte zwischen Zytostatika und hyperthermen Bedingungen. Daraus resultiert eine erhöhte Zytotoxizität und Konzentration des Chemotherapeutikums im peritonealen Tumorgewebe. Die Hyperthermie trägt zudem zu einer verbesserten Permeabilität des Gewebes bei und begünstigt die Penetration des Zytostatikums in die Tumorzellen. Darüber hinaus induziert Hyperthermie allein bereits zytotoxische Effekte im Sinne von antitumoralen Immunreaktionen sowie der Denaturierung von Proteinen (32, 34). Daten der zuletzt angefertigten *in vitro* Studie der Arbeitsgruppe (88) sowie die vorliegenden Ergebnisse der aktuellen Arbeit zeigen, dass insbesondere die Zytostatika-Gabe (MMC, OXA) in Kombination mit Hyperthermie bei 41°C und 43°C im Vergleich zu normothermen Bedingungen bei 37°C zu signifikant erhöhter Gen- sowie auch Proteinexpression von HSP27 und HSP70 in allen untersuchten Kolonkarzinomzelllinien führte. Diese Effekte ließen sich selbst zu späten Untersuchungszeitpunkten bis drei Tage nach HIPEC noch nachweisen. Einzig HSP90 zeigte eine Diskrepanz zwischen der Expression auf mRNA- und Proteinebene. So ließen sich signifikant verstärkte Genexpressionsmuster von HSP90 zu späteren Zeitpunkten bis drei Tage nach HIPEC nachweisen, auf Proteinebene konnten hingegen überwiegend konstante Proteinexpressionsspiegel ohne signifikante Veränderungen infolge von Hyperthermie- oder Zytostatikabehandlung beobachtet werden. Eine Hypothese könnte sein, dass durch eine verzögerte Transkription und Translation von HSP90 mRNA zu den in dieser Arbeit gewählten Untersuchungszeitpunkten noch keine verstärkten Proteinmengen im Western Blot messbar waren und die

Expression der Proteine womöglich erst zu einem späteren Zeitpunkt detektiert werden kann. Isolierte Hyperthermie von 41°C sowie insbesondere von 43°C führte zelllinien-übergreifend besonders nach 48 h zu deutlich verstärkter Expression von HSP27 im Western Blot. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen von HSP70 in RT-qPCR-Analysen. Bei HSP90 ließ sich hingegen kein eindeutiges Hyperthermie-induziertes Expressionsschema erkennen.

Zusammenfassend deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass Temperaturen über 41°C dazu führen, dass überlebende Tumorzellen nach HIPEC-Behandlung über eine signifikante Hochregulierung von verschiedenen Heat Shock Protein-Familien im Sinne einer Stressantwort reagieren und durch Ingangsetzung von Zellschutz- und Reparaturmechanismen zum Überleben der Tumorzellen beitragen. Je nach HSP-Familie konnten unterschiedlich langanhaltende Schutzmechanismen beobachtet werden. Bei HSP70 zeigten sich insbesondere initial 30 min sowie 24 h nach hyperthermer Chemotherapie mithilfe des *in vitro* Hyperthermie Modells deutlich erhöhte Expressionsmuster auf mRNA-Ebene, wohingegen die Expressionsspiegel zu späteren Untersuchungszeitpunkten (48 h, 72 h) auf Normalniveau abfielen. Genexpressionsmaxima von HSP27 sowie HSP90 ließen sich überwiegend zu späteren Zeitpunkten detektieren und konnten selbst drei Tage nach Behandlung noch nachgewiesen werden. Auf Basis der erhobenen Daten kann davon ausgegangen werden, dass durch induzierte Zellschäden kurz sowie länger andauernde Zellschutzmechanismen vermittelt werden. In der Annahme, dass die beschriebenen Effekte ebenso *in vivo* nach der HIPEC-Behandlung ablaufen könnten, lässt darauf schließen, dass Temperaturen über 41°C unerwünschte Zellschutzmechanismen in überlebenden Tumorzellen induzieren und damit den erhofften Therapieerfolg der HIPEC negativ beeinflussen. Da erwünschte, synergistische Effekte bei einer Kombination von Zytostatika und Hyperthermie ab 39°C einsetzen (32) und oben beschriebene, unerwünschte Zellschutzmechanismen der überlebenden Tumorzellen ab Temperaturen über 41°C beobachtet werden konnten, sollte in der HIPEC ein niedrigeres Zieltemperaturfenster zwischen 39°C und 41° angestrebt werden. Im Rahmen

weiterführender Studien müssen erwünschte und unerwünschte Effekte der Hyperthermie-Behandlung weiter ermittelt und abgewogen werden.

7.3 Verstärkte Zellproliferation nach hyperthermer Chemotherapie

Um den Einfluss von Hyperthermie und Zytostatika auf die Zellproliferation nach hyperthermer Chemotherapie zu untersuchen, wurde die Expression zweier Proliferationsmarker (Ki-67 und PCNA), zum einen in Kolonkarzinomzelllinien, zum anderen in *ex vivo* Patientenproben nach HIPEC (PCNA), analysiert. Beide Proliferationsmarker zeigten eine, insbesondere durch Zytostatika induziert, verstärkte Genexpression, die selbst drei Tage nach Behandlung in allen Zelllinien noch nachweisbar war. Analog zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene konnten bei PCNA ähnliche Effekte auf Proteinebene beobachtet werden. Im Falle von PCNA konnte eine Proteinexpressionssteigerung in *ex vivo* Patientenproben nach klinisch durchgeführter HIPEC bestätigt werden. In ergänzenden MTS-Tests konnte initial 24 h nach isolierter Hyperthermie zunächst ein reduziertes Zellüberleben beobachtet werden, wohingegen sich zu späteren Untersuchungszeitpunkten ein erhöhter Lebendzellanteil zeigte. Unter zusätzlichem Einfluss der Chemotherapeutika 5-FU, MMC und OXA konnte unter hyperthermen Bedingungen im Vergleich zu normothermer Zytostatikabehandlung ein deutlich erhöhtes Zellüberleben beobachtet werden. Zusammenfassend weisen die erhobenen Daten darauf hin, dass überlebende Tumorzellen im Modellansatz durch Hyperthermieexposition initial nach Behandlung, wie zuvor in Absatz 1.1.3.2 beschrieben, erwünschte zytotoxische und antiproliferative Effekte aufzeigen, diese jedoch vermutlich durch Hochregulierung und Interaktion von Heat Shock Proteinen im Sinne einer Stressreaktion bereits kurz darauf blockiert werden und nachfolgend sogar ein erhöhtes Proliferationspotential beobachtet werden kann. Wie bereits erläutert, interagieren HSPs mit der Proteinkinase Akt und beeinflussen darüber den PI3K/Akt Signalweg, der maßgeblich an Tumorwachstums- und Proliferationsprozessen beteiligt ist (59, 60). Darüber hinaus nimmt beispielsweise HSP90 durch die Interaktion mit VEGF Einfluss auf die

Angiogenese, was wiederum das Tumorzellwachstum fördert und das hier beobachtete erhöhte Zellüberleben erklären könnte. In weiterführenden Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte eine erhöhte Expression des Proliferationsmarkers PCNA nach klinischer HIPEC Behandlung auch in *ex vivo* Patientenproben mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (88).

7.4 Induktion des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-xL

Entgegen den Erwartungen einer Apoptoseinduktion durch eine Behandlung mit hyperthermer Chemotherapie führte diese interessanterweise zu einer Expressionsinduktion des anti-apoptotisch wirkenden Regulatorproteins Bcl-xL in allen drei untersuchten Kolonkarzinomzelllinien. Dabei führten insbesondere isoliert hypertherme Bedingungen bei 41°C und 43°C sowie die Kombination aus Hyperthermie mit Mitomycin C oder Oxaliplatin zu besonders verstärkten Proteinexpressionsmustern. Diese Beobachtungen konnten darüber hinaus in *ex vivo* Proben von Patienten, die sich einer HIPEC unterzogen hatten, überraschenderweise bestätigt werden. Die Inhibition erwünschter apoptoseinduzierender Effekte durch die hypertherme Chemotherapie könnten durch die Interaktion von HSPs mit Signalwegen der Apoptose zu erklären sein (**Abbildung 2**). HSP27 nimmt dabei direkten Einfluss auf Schlüsselproteine der Apoptosekaskade und verhindert beispielsweise durch Bindung an Cytochrom c oder die Interaktion mit dem Pro-Caspase-3-Komplex nachfolgende Apoptoseprozesse (52, 53). Wie bereits zuvor unter Absatz 2.1 beschrieben, wirken auch HSP70 und HSP90 über viele Wege anti-apoptotisch. Zum Beispiel wird über die direkte Bindung von HSP70 an Bax, ein Mitglied der proapoptotischen Familie Bcl-2, dessen Translokation und damit die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran verhindert. Die weiterführende Apoptosekaskade kommt zum Erliegen (64). Da HSP90 besonders unter Stressbedingungen eine deutliche Expressionssteigerung erfährt, ist es naheliegend, dass eine Hochregulierung von Bcl-xL auch durch diese HSP-Familie bedingt sein könnte. Dabei greift HSP90 beispielsweise in die

Signaltransduktionskaskade von NF- κ B ein, was über mehrere Zwischenschritte zu vermehrten, aktiven Transkriptionsfaktoren von antiapoptotischen Proteinen führt (68, 69, 71). Wie bereits andere Studien belegen konnten, können mittels Bcl-xL als klassischer Apoptose-Inhibitor jedoch nicht nur Aussagen über die Apoptose von Tumorzellen getroffen werden, sondern durch die Interaktion mit anderen intrazellulären Signalkaskaden weitere Mechanismen wie Proliferation, Zellmigration und DNA-Reparaturmechanismen beeinflusst werden und somit das Überleben der Krebszelle gesichert werden (83, 84). Infolgedessen ist anzunehmen, dass eine wie in dieser Arbeit beobachtete Proliferationstendenz überlebender Tumorzellen nach HIPEC, neben direkten Einflüssen von HSPs auf Proliferationsprozesse, auch indirekt über die Induktion von Bcl-xL durch hochregulierte HSPs zu erklären wäre. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass induzierte Zellschäden durch Hyperthermie, insbesondere bei höheren Temperaturen ($> 41^{\circ}\text{C}$) und Zytostatika in überlebenden Tumorzellen nach HIPEC, durch die Induktion von HSPs, unerwünschte, anti-apoptotische Prozesse im Sinne eines vermittelten Zellschutzes in Gang setzen und somit negativen Einfluss auf den Therapieerfolg nehmen könnten, folglich also zu vermeiden wären.

7.5 Inhibition von Heat Shock Proteinen als Therapiestrategie

Aufgrund der bekannten Überexpression von Heat Shock Proteinen in vielen verschiedenen Tumorentitäten sowie Interaktionen von HSPs mit Signalwegen der Apoptose sind die Proteinfamilien im Laufe der letzten Jahrzehnte zu einem interessanten Angriffspunkt in der Krebstherapie geworden. Die Inhibitoren sollen dabei die Aktivität der HSPs herabsetzen und somit antitumoröse Effekte der Chemotherapie verbessern. In der Krebstherapie wurden viele der potenziellen Inhibitoren bereits getestet, einige davon in klinischen Studien. Die Entwicklung von HSP90 Inhibitoren begann zunächst mit natürlich vorkommenden Derivaten Geldanamycin und Radicol sowie Geldanamycin-Derivaten wie 17-AAG (Tanespimycin). Die Inhibitoren zeigten in mehreren Studien antiproliferative und zytotoxische Effekte durch die Bindung der ATP-

bindenden Domäne von HSP90, wurden aber letztlich aufgrund ihrer strukturellen Instabilität, schlechten Bioverfügbarkeit sowie im Falle von Geldanamycin einer signifikanten Hepatotoxizität nicht mehr weiter für den klinischen Einsatz verfolgt. In der Zwischenzeit ist die Entwicklung von HSP90 Inhibitoren vorangeschritten und Inhibitoren wie NVP-AUY922 (Luminespib) oder STA-9090 (Ganetespib) sind in klinischen Studien eingebunden (43, 91, 92). Studien mit AUY922 konnten eine Inhibition des Tumorwachstums von NSCLC (*non-small cell lung cancer*) Zelllinien *in vitro* sowie die antitumoröse Aktivität von AUY922 in einer klinischen Phase-II-Studie bei Patienten mit NSCLC bestätigen (93). Moser et al. konnte in seiner Studie darstellen, dass die Inhibition von HSP90 durch NVP-AUY922 das Tumorwachstum sowie die Angiogenese in Pankreastumoren reduzierte (94). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie von Ganji et al.. Diese zeigte, dass die Inhibition von HSP90 durch STA-9090 zur Suppression von Angiogenese und Tumorwachstum in Xenotransplantaten von humanen Pankreaskarzinomen führte (95). Arbeiten von Lee et al. konnten nachweisen, dass die Kombination aus NVP-AUY922 mit Zytostatika wie Oxaliplatin oder 5-FU, die auch in der klinischen HIPEC Anwendung finden, zu synergistischen Effekten führte (96).

Die Inhibition von HSP90 führt jedoch zur Induktion einer HSP70-Expression, sodass eine Co-Inhibition beider HSPs sinnvoll erscheint (97). VER-155008, ein HSP70 Inhibitor, zeigte in durchgeführten Studien bereits eine gesteigerte Zytotoxizität in Kombination mit HSP90 Inhibitoren. *In vitro* Studien konnten nachweisen, dass VER-155008 Einfluss auf die Induktion des Zelltods und Apoptose nimmt sowie die Proliferation inhibiert (98, 99). Neben VER-155008 gibt es zahlreiche weitere Inhibitoren von HSP70, wie Aptamer A17 oder MKT-077, die antitumoröse Aktivitäten in Tumorzellen zeigten. Aufgrund teils erheblicher Nebenwirkungen in Phase-I-Studien sind bis zum aktuellen Stand nur sehr wenige HSP70-Inhibitoren im klinischen Einsatz (61, 100). Einen vielversprechenden Therapieansatz könnten jedoch monoklonale Antikörper wie cmHSP70.1 liefern, die mit membrangebundenem HSP70 interagieren und im Maus-Modell bereits zu signifikant reduzierter Tumorgröße geführt haben (43, 61, 101).

Als Vertreter der HSP27-Inhibitoren befinden sich aktuell Quercetin und RP101 (*Bromovinyldeoxyuridine, Brivudine*), ein Nukleosid welches an HSP27 bindet und somit seine Effekte moduliert, in der Entwicklung. Studien zeigten, dass RP101 und Quercetin, wie auch der zuvor beschriebene HSP90-Inhibitor NVP-AUY922, Krebszellen für gängige Zytostatika wie Cisplatin, Gemcitabine oder Doxorubicin sensibilisieren und folglich ihre Effizienz steigern (102, 103). Heinrich und Fahrig et al. konnten darüber hinaus *in vivo* nachweisen, dass eine kombinierte Behandlung aus RP101 mit Chemotherapeutika wie Gemcitabine und Cisplatin zu einer verlängerten Überlebenszeit in Pankreaskarzinompatienten im Endstadium geführt hat (102, 104). Ein weiterer vielversprechender HSP27-Inhibitor, OGX-427, führte in mehreren Phase-I- und Phase-II-Studien verschiedener Tumorentitäten und in Kombination mit Zytostatika zu reduzierter Tumorgröße und verlängertem progressionsfreien Intervall (105, 106).

Die Entwicklung von neuen HSP-Inhibitoren gilt als eine interessante Möglichkeit die Effizienz der im klinischen Einsatz gängigen Zytostatika zu steigern und somit einen positiven Einfluss auf den Erfolg der Therapie und die Überlebenszeit von Krebspatienten zu nehmen (104, 105). In Bezug auf die aktuelle Arbeit könnten möglicherweise zeitgleich oder unmittelbar vor einer HIPEC verabreichte HSP-Inhibitoren die hyperthermie- sowie zytostatikainduzierten, unerwünschten Reparatur- und Zellschutzmechanismen der überlebenden Tumorzellen limitieren und antitumoröse Effekte weiter fördern. Infolge der in dieser Arbeit beobachteten, bis zu drei Tagen anhaltenden Überexpression von HSP27, HSP70 und HSP90 nach hyperthermer Chemotherapie, könnte insbesondere die kombinierte Gabe von HSP-Inhibitoren mehrerer HSP-Familien im Rahmen weiterer klinischer Studien von Interesse sein und zur Maximierung eines Therapieerfolges beitragen.

Weiterführende Studien der eigenen Arbeitsgruppe mit kombinierten HSP70/HSP90-Inhibitoren zeigten bereits eine signifikant reduzierte Zellviabilität in Kolonkarzinomzellen, die zuvor der hyperthermen

Chemotherapie unterzogen wurden und direkt im Anschluss mit der Kombination aus VER-155008 (HSP70-Inhibitor) und 17-AAG (HSP90-Inhibitor) behandelt wurden (88). Um weitergehende Aussagen über einen potenziellen Nutzen von HSP-Inhibitoren in der klinischen Anwendung treffen zu können, sind weitere *in vivo* Studien notwendig.

8 Zusammenfassung

Die Kombination aus zytoreduktiver Chirurgie (*cytoreductive surgery*, CRS), das heißt chirurgisch vertretbarer, sichtbarer Tumormassenreduktion im Bereich des Peritoneums, und einer anschließenden hyperthermen intraperitonealen Chemoperfusion (*hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*, HIPEC) stellt sich als vielversprechende Therapiestrategie bei ausgesuchten Patienten mit Peritonealkarzinose, z. B. des kolorektalen Karzinoms, dar. Die intraperitoneale Chemoperfusion kombiniert eine lokale Hochdosis-Chemotherapie mit einer Hyperthermie. Hitzeschockproteinen (*heat shock proteins*, HSP) kommt dabei eine bedeutende Rolle zu, da sie infolge von zellulären Stressfaktoren wie Hitze oder Zytostatika-bedingter Chemotoxizität induziert werden. HSPs setzen Reparatur- und Zellschutzmechanismen in Gang und vermindern so in einzelnen überlebenden Tumorzellen möglicherweise den gewünschten Therapieerfolg der HIPEC. Das würde wiederum zu unerwünschten neuen Tumorrezidiven mit resistenteren Tumorzellen führen.

Ziel der Arbeit war es, mithilfe eines bereits etablierten *in vitro* HIPEC-Modells die Auswirkungen der äußeren Stressoren Hyperthermie und Zytostatika auf die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP27, HSP70 und HSP90) in drei humanen Kolonkarzinomzelllinien zu untersuchen. Dazu wurden die Zelllinien HT29, SW480 und SW620 jeweils mit und ohne Zytostatika (Mitomycin C, MMC und Oxaliplatin, OXA) für eine Stunde drei verschiedenen Temperaturstufen von 37°C als Normothermie, 41°C und 43°C als Hyperthermie ausgesetzt und nach einer Regenerationszeit von 30 min, 24 h, 48 h und 72 h mit Hilfe von RT-qPCR-Analysen und Western Blots untersucht. Überdies wurden nach gleichem Ablauf Effekte der hyperthermen Chemotherapie auf die Tumorzellproliferation und Apoptose mittels Proliferationsmarkern Ki-67, PCNA und MTS-Tests sowie dem antiapoptotischen Protein Bcl-xL in *in vitro* Tumorzellansätzen sowie in *ex vivo* Patientenproben vor und nach HIPEC analysiert.

Sowohl die einstündige Chemotherapie mit Mitomycin C oder Oxaliplatin unter hyperthermen Bedingungen als auch die isolierte Hyperthermiebehandlung führte im Vergleich zu normothermen Kontrollbedingungen bei 37°C zu einer signifikanten Überexpression der untersuchten HSPs in RTq-PCR-Analysen

aller drei Kolonkarzinomzelllinien. Interessanterweise wurden vermehrte HSP Genexpressionsmuster noch drei Tage nach Behandlung beobachtet. Eine verstärkte Proteinexpression zeigte sich bestätigend insbesondere für HSP27 und HSP70 unter zytostatischer Behandlung mit MMC oder OXA und führte zu einer bis zu 3-fachen Expressionssteigerung wenn die Zellen hyperthermen Bedingungen ausgesetzt waren. Die Gen-Überexpression von HSP90 nach hyperthermer Chemotherapie konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden, was für dieses Heat Shockprotein auf eher kurzfristige Effekte hindeutete. Tumorzellen, die zuvor der hyperthermen Chemotherapie unterzogen wurden, zeigten interessanterweise zudem proliferative anstelle von anti-proliferativen Effekten. Dies allerdings unter den Bedingungen der Zellkultur, was nicht unbedingt mit den *in vivo* vorliegenden, teils sauren und hypoxischen Bedingungen gleichzusetzen ist. In durchgeführten MTS-Tests führte sowohl die Hyperthermie allein als auch die zusätzliche Zytostatikagabe zu einer deutlich erhöhten Zellviabilität im Vergleich zu normothermer Chemotherapie im Modellansatz. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der MTS-Tests konnte eine Induktion der Proliferationsmarker PCNA und Ki-67 durch Hyperthermie und Chemotherapie auf Gen- und Proteinebene beobachtet werden. Im Falle von PCNA ließ sich eine verstärkte Proteinexpression in *ex vivo* Proben von Patienten nach klinisch durchgeführter HIPEC bestätigen. Zusätzliche Untersuchungen des anti-apoptotisch wirkenden Regulatorproteins Bcl-xL in *in vitro* Tumorzellansätzen sowie in *ex vivo* Proben von Patienten nach hyperthermer Chemotherapie, zeigten zudem eine deutlich gesteigerte Proteinexpression unter alleiniger Hyperthermie sowie insbesondere in Kombination mit Zytostatika.

Nach den hier erstmals beschriebenen Ergebnissen antiapoptotischer und proliferativer Effekte durch die Induktion von HSPs nach hyperthermer Chemotherapie, insbesondere ab einer Temperatur von 41°C, lässt eine Reevaluation des Zieltemperaturfensters während der klinischen HIPEC, unter Beachtung von erwünschten und unerwünschten Effekten der Hyperthermie, sinnvoll erscheinen. Infolge der hier gezeigten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine verstärkte Expression von HSPs auch *in vivo*

nach HIPEC stattfindet. Durch die Induktion von HSP27, HSP70 und HSP90 infolge von hyperthermem und zytotoxischem Stress werden in überlebenden Zellen nach hyperthermer Chemotherapie, unerwünschte antiapoptische sowie proliferative Effekte im Sinne von Reparatur- und Zellschutzmechanismen induziert und nehmen negativen Einfluss auf den Therapieerfolg der HIPEC. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass das Proliferationsverhalten der untersuchten Tumorzellansätze unter optimalen Medienbedingungen mit konstanten Temperaturen und pH-Werten möglicherweise nicht mit dem der Zellen *in vivo* in einem teils hypoxischen und nutritiv mangelversorgten Tumorbett gleichzusetzen ist.

Schlussfolgernd wäre der Einsatz von HSP-Inhibitoren um die beschriebenen, unerwünschten Zellmechanismen zu verhindern, zu überprüfen. Diese bieten eine interessante Möglichkeit die Effizienz der im klinischen Einsatz gängigen Zytostatika zu steigern und somit einen positiven Einfluss auf den Erfolg der Therapie und die Überlebenszeit von Patienten mit Peritonealkarzinose zu nehmen. Weiterführende Studien der eigenen Arbeitsgruppe mit kombinierten HSP70/HSP90-Inhibitoren zeigten bereits eine signifikant reduzierte Zellviabilität in Kolonkarzinomzellen, die zuvor der hyperthermen Chemotherapie unterzogen wurden.

9 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt D. Sterbefälle in Deutschland 2019 nach Todesursachen; 2021:
https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_N010_231.html.
2. Robert-Koch-Institut ZfKuGdeKiDeV. Krebs in Deutschland für 2015/2016; 2019:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile.
3. Levy AD, Shaw JC, Sobin LH. Secondary tumors and tumorlike lesions of the peritoneal cavity: imaging features with pathologic correlation. *Radiographics* : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc. 2009;29(2):347-73.
4. Lemoine L, Sugarbaker P, Van der Speeten K. Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(34):7692-707.
5. Kusamura S, Baratti D, Zaffaroni N, Villa R, Laterza B, Balestra MR, et al. Pathophysiology and biology of peritoneal carcinomatosis. *World journal of gastrointestinal oncology*. 2010;2(1):12-8.
6. Sugarbaker PH, Yonemura Y. Clinical pathway for the management of resectable gastric cancer with peritoneal seeding: best palliation with a ray of hope for cure. *Oncology*. 2000;58(2):96-107.
7. Verwaal VJ, van Ruth S, Witkamp A, Boot H, van Slooten G, Zoetmulder FA. Long-term survival of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Annals of surgical oncology*. 2005;12(1):65-71.
8. Al-Shammaa HA, Li Y, Yonemura Y. Current status and future strategies of cytoreductive surgery plus intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal carcinomatosis. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(8):1159-66.
9. Jayne DG, Fook S, Loi C, Seow-Choen F. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *The British journal of surgery*. 2002;89(12):1545-50.
10. Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer*. 2000;88(2):358-63.
11. Yonemura Y, Endo Y, Obata T, Sasaki T. Recent advances in the treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal cancers by nucleoside antimetabolites. *Cancer science*. 2007;98(1):11-8.
12. Liu J, Geng X, Li Y. Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(5):5715-26.
13. Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE, Lugade AA, Foster TH, Frelinger JG, et al. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *The American journal of pathology*. 2006;169(5):1739-52.

14. Piso P, Arnold D. Multimodal treatment approaches for peritoneal carcinosis in colorectal cancer. *Deutsches Arzteblatt international*. 2011;108(47):802-8.
15. Yan TD, Morris DL, Shigeki K, Dario B, Marcello D. Preoperative investigations in the management of peritoneal surface malignancy with cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: Expert consensus statement. *Journal of surgical oncology*. 2008;98(4):224-7.
16. Yan TD, Sim J, Morris DLJAoSO. Selection of Patients with Colorectal Peritoneal Carcinomatosis for Cytoreductive Surgery and Perioperative Intraperitoneal Chemotherapy. 2007;14(6):1807-17.
17. Mirnezami R, Moran BJ, Harvey K, Cecil T, Chandrakumaran K, Carr N, et al. Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy for colorectal peritoneal metastases. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(38):14018-32.
18. Chu DZ, Lang NP, Thompson C, Osteen PK, Westbrook KC. Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. *Cancer*. 1989;63(2):364-7.
19. Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Sloothen GW, van Tinteren H, Boot H, et al. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(20):3737-43.
20. Simkens GA, Rovers KP, Nienhuijs SW, de Hingh IH. Patient selection for cytoreductive surgery and HIPEC for the treatment of peritoneal metastases from colorectal cancer. *Cancer management and research*. 2017;9:259-66.
21. Suo T, Mahteme H, Qin XY. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for gastric and colorectal cancer in Mainland China. *World journal of gastroenterology*. 2011;17(8):1071-5.
22. Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Annals of surgery*. 1995;221(1):29-42.
23. Sugarbaker PH. Cytoreductive surgery using peritonectomy and visceral resections for peritoneal surface malignancy. *Translational Gastrointestinal Cancer*. 2013;2(2):54-74.
24. Losa F, Barrios P, Salazar R, Torres-Melero J, Benavides M, Massuti T, et al. Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy for treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal origin. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2014;16(2):128-40.
25. Moran BJ, Mukherjee A, Sexton R. Operability and early outcome in 100 consecutive laparotomies for peritoneal malignancy. *The British journal of surgery*. 2006;93(1):100-4.
26. Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, Takabe K. Current treatment options for colon cancer peritoneal carcinomatosis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(35):12493-500.
27. Sommariva A, Pilati P, Rossi CR. Cyto-reductive Surgery combined with Hyperthermic Intra-peritoneal Chemotherapy for Peritoneal Surface

- Malignancies: current treatment and results. *Cancer treatment reviews*. 2012;38(4):258-68.
28. Glehen O, Cotte E, Kusamura S, Deraco M, Baratti D, Passot G, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: nomenclature and modalities of perfusion. *Journal of surgical oncology*. 2008;98(4):242-6.
 29. Cashin PH, Graf W, Nygren P, Mahteme H. Intraoperative hyperthermic versus postoperative normothermic intraperitoneal chemotherapy for colonic peritoneal carcinomatosis: a case-control study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23(3):647-52.
 30. Esquivel J, Sticca R, Sugarbaker P, Levine E, Yan TD, Alexander R, 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. Annals of surgical oncology*. 2007;14(1):128-33.
 31. Pelz JO, Germer CT. [Morbidity and mortality of hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen*. 2013;84(11):957-61.
 32. Helderman R, Löke DR, Kok HP, Oei AL, Tanis PJ, Franken N, et al. Variation in Clinical Application of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy: A Review. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1).
 33. Kusamura S, Dominique E, Baratti D, Younan R, Deraco M. Drugs, carrier solutions and temperature in hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Journal of surgical oncology*. 2008;98(4):247-52.
 34. Van der Speeten K, Stuart OA, Sugarbaker PH. Using pharmacologic data to plan clinical treatments for patients with peritoneal surface malignancy. *Current drug discovery technologies*. 2009;6(1):72-81.
 35. Hompes D, D'Hoore A, Wolthuis A, Fieuws S, Mirck B, Bruin S, et al. The use of Oxaliplatin or Mitomycin C in HIPEC treatment for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a comparative study. *Journal of surgical oncology*. 2014;109(6):527-32.
 36. Rampone B, Schiavone B, Martino A, Confuorto G. Current role of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(11):1299-302.
 37. Emoto S, Sunami E, Yamaguchi H, Ishihara S, Kitayama J, Watanabe TJST. Drug development for intraperitoneal chemotherapy against peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. 2014;44(12):2209-20.
 38. Murono K, Kawai K, Hata K, Emoto S, Kaneko M, Sasaki K, et al. Regimens of Intraperitoneal Chemotherapy for Peritoneal Carcinomatosis from Colorectal Cancer. *Anticancer research*. 2018;38(1):15-22.
 39. Piché N, Leblond FA, Sidéris L, Pichette V, Drolet P, Fortier L-P, et al. Rationale for Heating Oxaliplatin for the Intraperitoneal Treatment of Peritoneal Carcinomatosis: A Study of the Effect of Heat on Intraperitoneal Oxaliplatin Using a Murine Model. 2011;254(1):138-44.
 40. Webb CA, Weyker PD, Moitra VK, Raker RK. An overview of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion for the anesthesiologist. *Anesthesia and analgesia*. 2013;116(4):924-31.

41. Stewart JHt, Shen P, Levine EA. Intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal surface malignancy: current status and future directions. *Annals of surgical oncology*. 2005;12(10):765-77.
42. de Jong LAW, Elekonawo FMK, de Reuver PR, Bremers AJA, de Wilt JHW, Jansman FGA, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis: a clinical pharmacological perspective on a surgical procedure. *British journal of clinical pharmacology*. 2018.
43. Chatterjee S, Burns TF. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(9).
44. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(3):743-61.
45. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(3):164-72.
46. Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters*. 2013;332(2):275-85.
47. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress & chaperones*. 2005;10(2):86-103.
48. Boudesco C, Cause S, Jego G, Garrido C. Hsp70: A Cancer Target Inside and Outside the Cell. *Methods Mol Biol*. 2018;1709:371-96.
49. Wang X, Chen M, Zhou J, Zhang X. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review). *International journal of oncology*. 2014;45(1):18-30.
50. Kostenko S, Moens U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(20):3289-307.
51. Beere HM. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 13):2641-51.
52. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature cell biology*. 2000;2(9):645-52.
53. Concannon CG, Gorman AM, Samali AJA. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. 2003;8(1):61-70.
54. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood*. 2003;102(9):3379-86.
55. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2006;5(22):2592-601.
56. Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(20):7602-12.

57. Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), alphaB-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(10):1622-31.
58. Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, et al. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(18):12305-13.
59. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(1):15-27.
60. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:51.
61. Goloudina AR, Demidov ON, Garrido C. Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer letters*. 2012;325(2):117-24.
62. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2005;62(6):670-84.
63. Park HS, Cho SG, Kim CK, Hwang HS, Noh KT, Kim MS, et al. Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(22):7721-30.
64. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(46):38729-39.
65. Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(10):3415-24.
66. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature cell biology*. 2000;2(8):476-83.
67. Biebl MM, Buchner J. Structure, Function, and Regulation of the Hsp90 Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019;11(9).
68. Garg G, Khandelwal A, Blagg BS. Anticancer Inhibitors of Hsp90 Function: Beyond the Usual Suspects. *Adv Cancer Res*. 2016;129:51-88.
69. Den RB, Lu B. Heat shock protein 90 inhibition: rationale and clinical potential. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2012;4(4):211-8.
70. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO journal*. 2000;19(16):4310-22.
71. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;304(3):505-12.
72. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nature cell biology*. 2004;6(6):507-14.
73. Boehm EM, Gildenberg MS, Washington MT. The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. *Enzymes*. 2016;39:231-54.

74. Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot.* 2011;107(7):1127-40.
75. Juríková M, Danihel L, Polák Š, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem.* 2016;118(5):544-52.
76. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
77. Sueishi M, Takagi M, Yoneda Y. The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(37):28888-92.
78. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018;127(2):175-86.
79. Takagi M, Nishiyama Y, Taguchi A, Imamoto N. Ki67 antigen contributes to the timely accumulation of protein phosphatase 1γ on anaphase chromosomes. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289(33):22877-87.
80. Sobecki M, Mrouj K, Camasses A, Parisi N, Nicolas E, Llères D, et al. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife.* 2016;5:e13722.
81. Zheng JH, Viacava Follis A, Kriwacki RW, Moldoveanu T. Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis. *Febs j.* 2016;283(14):2690-700.
82. Choi S, Chen Z, Tang LH, Fang Y, Shin SJ, Panarelli NC, et al. Bcl-xL promotes metastasis independent of its anti-apoptotic activity. *Nat Commun.* 2016;7:10384.
83. Gabellini C, Trisciuglio D, Del Bufalo D. Non-canonical roles of Bcl-2 and Bcl-xL proteins: relevance of BH4 domain. *Carcinogenesis.* 2017;38(6):579-87.
84. D'Aguanno S, Del Bufalo D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. *Cells.* 2020;9(5).
85. Hata AN, Engelman JA, Faber AC. The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer Discov.* 2015;5(5):475-87.
86. Placzek WJ, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed JC, Pellecchia M. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death & Disease.* 2010;1(5):e40-e.
87. Davids MS, Letai A. Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2012;30(25):3127-35.
88. Grimmig T, Moll EM, Kloos K, Thumm R, Moench R, Callies S, et al. Upregulated Heat Shock Proteins After Hyperthermic Chemotherapy Point to Induced Cell Survival Mechanisms in Affected Tumor Cells From Peritoneal Carcinomatosis. *Cancer Growth Metastasis.* 2017;10:1179064417730559.
89. Esquivel J. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for colorectal cancer: survival outcomes and patient selection. *J Gastrointest Oncol.* 2016;7(1):72-8.

90. Pelz JO, Vetterlein M, Grimmig T, Kerscher AG, Moll E, Lazariotou M, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis: role of heat shock proteins and dissecting effects of hyperthermia. *Annals of surgical oncology*. 2013;20(4):1105-13.
91. Shrestha L, Bolaender A, Patel HJ, Taldone T. Heat Shock Protein (HSP) Drug Discovery and Development: Targeting Heat Shock Proteins in Disease. *Curr Top Med Chem*. 2016;16(25):2753-64.
92. Boroumand N, Saghi H, Avan A, Bahreyni A, Ryzhikov M, Khazaei M, et al. Therapeutic potency of heat-shock protein-90 pharmacological inhibitors in the treatment of gastrointestinal cancer, current status and perspectives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017;70(2):151-8.
93. Felip E, Barlesi F, Besse B, Chu Q, Gandhi L, Kim SW, et al. Phase 2 Study of the HSP-90 Inhibitor AUY922 in Previously Treated and Molecularly Defined Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13(4):576-84.
94. Moser C, Lang SA, Hackl C, Wagner C, Scheiffert E, Schlitt HJ, et al. Targeting HSP90 by the novel inhibitor NVP-AUY922 reduces growth and angiogenesis of pancreatic cancer. *Anticancer research*. 2012;32(7):2551-61.
95. Ganji PN, Diaz R, El-Rayes B. Antiangiogenic activity of the HSP90 inhibitor ganetespib in pancreatic cancer models. *Wiley Online Library*; 2013.
96. Lee KH, Lee JH, Han SW, Im SA, Kim TY, Oh DY, 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 science*. 2011;102(7):1388-95.
97. Schilling D, Garrido C, Combs SE, Multhoff G. The Hsp70 inhibiting peptide aptamer A17 potentiates radiosensitization of tumor cells by Hsp90 inhibition. *Cancer letters*. 2017;390:146-52.
98. Massey AJ, Williamson DS, Browne H, Murray JB, Dokurno P, Shaw T, 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):535-45.
99. Chatterjee M, Andrulis M, Stühmer T, Müller E, Hofmann C, Steinbrunn T, et al. The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma. *Haematologica*. 2013;98(7):1132-41.
100. Rérole AL, Gobbo J, De Thonel A, Schmitt E, Pais de Barros JP, Hammann A, et al. Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer Res*. 2011;71(2):484-95.
101. Stangl S, Gehrmann M, Riegger J, Kuhs K, Riederer I, Sievert W, et al. Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(2):733-8.
102. Fahrig R, Quietzsch D, Heinrich JC, Heinemann V, Boeck S, Schmid RM, et al. RP101 improves the efficacy of chemotherapy in pancreas carcinoma cell lines and pancreatic cancer patients. *Anticancer Drugs*. 2006;17(9):1045-56.

103. Staedler D, Idrizi E, Kenzaoui BH, Juillerat-Jeanneret L. Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(5):1161-72.
104. Heinrich JC, Tuukkanen A, Schroeder M, Fahrig T, Fahrig R. RP101 (brivudine) binds to heat shock protein HSP27 (HSPB1) and enhances survival in animals and pancreatic cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(9):1349-61.
105. McConnell JR, McAlpine SR. Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2013;23(7):1923-8.
106. Choi S-K, Kam H, Kim K-Y, Park SI, Lee Y-S. Targeting Heat Shock Protein 27 in Cancer: A Druggable Target for Cancer Treatment? *Cancers.* 2019;11(8):1195.

I. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
AIF	Apoptosis-inducing factor
Akt	Proteinkinase B
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bcl-2	B-cell-lymphoma-protein 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma extra-large; BCL2L1
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bad	Bcl-2-associated death promoter
BSA	Bovine serum albumin/Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	Complementary DNA/komplementäre DNS
CRS	Cytoreductive surgery/zytoreduktive Chirurgie
DNA	Deoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline / phosphatgepufferte Salzlösung
DTT	Dithiothreitol
FCS	Fetal Calf Serum/ Fetales Kälberserum
FD	Fold difference
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HIPEC	Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy/ hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion
HRP	Horseradish peroxidase/Meerrettichperoxidase
HSP	Heat shock protein/Hitzeschockprotein
IAP	Inhibitors of apoptosis proteins
JNK	C-Jun-N-terminal Kinasen

kDa	Kilodalton
mAk	Monoklonaler Antikörper
min	Minute
ml	Milliliter
MMC	Mitomycin C
m/V	Masse pro Volumen
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
OXA	Oxaliplatin
PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung/Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PUMA	P53 upregulated modulator of apoptosis
RIPA	Buffer Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction/ quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
Smac	Second-mitochondria derived activator of caspases
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TBP	TATA-box binding protein
μl	Mikroliter
VEGF	Vascular endothelial growth factor receptor
WCE	Whole Cell Extract/Gesamtzellextrakt
w/V	Weight per volume/Gewicht pro Volumen

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sterbefälle in Deutschland nach Todesursachen 2019.....	1
Abbildung 2: Übersicht der Interaktion von HSP27, HSP70 und HSP90 mit Signalwegen der Apoptose	9
Abbildung 3: In-Vitro Hyperthermie Modellaufbau.....	27
Abbildung 4: HSP27 Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen	35
Abbildung 5: HSP27 Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen	37
Abbildung 6: HSP27 Genexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen	38
Abbildung 7: HSP27 Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen	39
Abbildung 8: HSP27 Genexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen	41
Abbildung 9: HSP27 Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen	42
Abbildung 10: HSP70 Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen	44
Abbildung 11: HSP70 Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen	45
Abbildung 12: HSP70 Genexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen	46
Abbildung 13: HSP70 Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen	47
Abbildung 14: HSP70 Genexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen	48
Abbildung 15: HSP70 Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen	49
Abbildung 16: HSP90 Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen	53
Abbildung 17: HSP90 Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen	54
Abbildung 18: HSP90 Genexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen	55
Abbildung 19: HSP90 Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen	56
Abbildung 20: HSP90 Genexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen	58
Abbildung 21: HSP90 Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen	59
Abbildung 22: PCNA Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen	61
Abbildung 23: PCNA Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen.....	62
Abbildung 24: PCNA Genexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen	63
Abbildung 25: PCNA Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen.....	64
Abbildung 26: PCNA Genexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen	65
Abbildung 27: PCNA Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen.....	66
Abbildung 28: Ki-67 Genexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen	68
Abbildung 29: Bcl-xL Proteinexpression in HT29 Kolonkarzinomzellen.....	69

Abbildung 30: Bcl-xL und PCNA Proteinexpression in <i>ex vivo</i> Patientenproben prä und post HIPEC	70
Abbildung 31: MTS-Proliferationstest in HT29 Kolonkarzinomzellen	73

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkulturen	18
Tabelle 2: Zellkulturmedien	19
Tabelle 3: Chemikalien, Gebrauchsfertige Puffer, Reagenzien	19
Tabelle 4: Selbst hergestellte Puffer	21
Tabelle 5: Kits.....	22
Tabelle 6: Primäre Antikörper.....	22
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper	23
Tabelle 8: RT ² Primer Assays	23
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 10: Geräte.....	25
Tabelle 11: Hard-/ Software	25

IV. Anhang

Publikationsgenehmigung des Statistischen Bundesamt (Destatis), Wiesbaden:
Sterbefälle in Deutschland 2019 nach Todesursachen (**Abbildung 1**);
Pressemitteilung Nr. N 010 vom 3. Februar 2021

Copyright-Bedingungen, Statistisches Bundesamt, GZ 489728 / 714443



Vollansicht



Von: info@destatis.de

19.04.2022 um 11:33 Uhr

Zentraler Auskunftsdienst
Statistisches Bundesamt (Destatis)

Tel. +49 611 75 2405

<https://www.destatis.de/kontakt>
www.destatis.de

www.dashboard-deutschland.de

Sehr geehrte Frau Kloos,

vielen Dank für Ihre Anfrage vom 12. April 2022.

Für die Standard-Veröffentlichungen des Statistischen Bundesamtes in gedruckter und elektronischer Form sowie für die Inhalte auf unserer Website www.destatis.de einschließlich Grafiken sowie der zum Download bereitgestellten Produkte gilt, soweit bei dem jeweiligen Produkt/Internetseite keine ergänzenden oder anderslautenden Angaben ausgewiesen sind:

© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2022

Vervielfältigung und Verbreitung, auch auszugsweise, mit Quellennachweis gestattet.

Diese Regelung gilt für jede Art der Weiterverbreitung von Texten, Daten und Grafiken durch Dritte, soweit das Statistische Bundesamt Inhaber des Urheberrechts ist und die alleinigen Herausgeberrechte besitzt. Die Weiterverwendung ist sowohl für nicht gewerbliche als auch gewerbliche Zwecke erlaubt. Auch die Verbreitungsform elektronisch, via Internet oder als Print ist nicht eingeschränkt. Es bedarf keiner ausdrücklichen Genehmigung durch unser Haus. Eine Quellenangabe ist jedoch erforderlich. Das Statistische Bundesamt, Wiesbaden, ist als Herausgeber in den Quellennachweis aufzunehmen. Bei Verwendung / Weiterverbreitung von Inhalten aus GENESIS-Online gelten ergänzende Bestimmungen.

Weitere Hintergrundinformationen zu den Copyright-Bedingungen entnehmen Sie bitte von der folgenden DESTATIS-Webseite:

<https://www.destatis.de/DE/Service/Impressum/copyright-allgemein.html?nn=206200>

Bei weiteren Fragen stehen wir Ihnen gern zur Verfügung.

Bitte nutzen Sie dafür unser Kontaktformular <https://www.destatis.de/kontakt/>

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Jutta Hiemer

V. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer, Klinikdirektor der Chirurgie I des Universitätsklinikums Würzburg, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Ana-Maria Waaga-Gasser und Herrn Professor Dr. Martin Gasser, Abteilung für Molekulare Onkologie und Immunologie, für die Bereitstellung des spannenden Themas, die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während des Verfassens der Arbeit, die stetigen Ratschläge, ihre Geduld und Herzlichkeit.

Bei Frau Dr. Tanja Grimmig möchte ich mich für die hervorragende Betreuung und fachliche Unterstützung meiner Arbeit, das Lesen meines Manuskripts sowie ihre Herzlichkeit bedanken. Weiter möchte ich Frau Dr. Romana Mönch herzlich für die Einarbeitung in die Labortätigkeit sowie Ihre stete Hilfsbereitschaft danken. Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die herzliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bei den Labortätigkeiten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die stetige Unterstützung während meines Medizinstudiums und der Erstellung der Promotionsarbeit. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann und ihr jederzeit für mich da seid.

VI. Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

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.