

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**Einfluss der qualitativen und quantitativen
HSP27-Expression auf die *in vitro* Chemo- und
Radiosensitivität von Pankreaskarzinomzellen**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von:

Denise Buchner

aus
Heppenheim

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2014

Für meine Liebsten

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Pankreaskarzinom	- 1 -
1.1.1	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	- 1 -
1.1.1.1	Epidemiologie	- 1 -
1.1.1.2	Risikofaktoren	- 2 -
1.1.1.3	Pathophysiologie und Molekularbiologie	- 3 -
1.1.1.4	Symptome	- 4 -
1.1.1.5	Diagnostik	- 4 -
1.1.1.6	Stadienbestimmung	- 5 -
1.1.1.7	Management	- 6 -
1.2	Biomarker	- 9 -
1.2.1	Anforderungen an einen Biomarker	- 9 -
1.2.2	Diagnostische Tumormarker	- 9 -
1.2.3	Prognostische Tumormarker	- 10 -
1.2.4	Prädiktive Tumormarker	- 11 -
1.3	HSP27	- 12 -
1.3.1	Hitzeschockproteine	- 12 -
1.3.2	Kleine Hitzeschockproteine	- 12 -
1.3.3	HSP27	- 13 -
1.3.3.1	Expression von HSP27	- 13 -
1.3.3.2	Funktionen von HSP27	- 13 -
1.3.3.3	HSP27-Phosphorylierung	- 14 -
1.3.3.4	HSP27 in Tumoren	- 15 -
1.3.3.5	HSP27 im Pankreas und Pankreaskarzinom	- 15 -
1.4	Fragestellung	- 17 -
2	Material und Methoden	- 18 -
2.1	Material	- 18 -
2.1.1	Chemikalien	- 18 -
2.1.2	Reaktionslösungen und Enzyme	- 19 -
2.1.3	Antikörper	- 20 -
2.1.4	Verbrauchsartikel	- 20 -
2.1.5	Geräte, Ausstattung	- 21 -
2.1.6	Zytostatika und Medikamente	- 21 -
2.1.7	Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen	- 22 -
2.1.8	Plasmide	- 22 -
2.1.8.1	HSP27-Konstrukte	- 23 -
2.1.9	Zelllinien	- 24 -
2.1.10	Software	- 25 -
2.2	Methoden	- 26 -

2.2.1	Zellkultur	- 26 -
2.2.1.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen	- 26 -
2.2.1.2	Zellzählung	- 26 -
2.2.1.3	Herstellung von Zelllysaten	- 27 -
2.2.2	Behandlung von Zellen mit verschiedenen Therapieverfahren	- 28 -
2.2.2.1	Zellbehandlung mit diversen Chemotherapeutika für Westernblot	- 28 -
2.2.2.2	Behandlung der Zellen mit Chemotherapie und Chemosensitivitätsmessung mittels Zellproliferationstest	- 28 -
2.2.2.3	Behandlung der Zellen mit γ -Strahlung und Messung der Radiosensitivität mittels Koloniebildungstest	- 30 -
2.2.2.4	Behandlung der Zellen mit Hitzeschock	- 30 -
2.2.3	Plasmidamplifikation und -präparation	- 30 -
2.2.3.1	Transformation von kompetenten Bakterien	- 30 -
2.2.3.2	Amplifikation	- 31 -
2.2.3.3	Plasmidisolierung aus Bakterien	- 31 -
2.2.3.4	DNS-Quantifizierung und Qualitätsbestimmung	- 32 -
2.2.3.5	DNS-Agarosegelektrophorese	- 32 -
2.2.4	Transfektion	- 33 -
2.2.4.1	Transiente Transfektion zur Transfektionsoptimierung	- 33 -
2.2.4.2	Stabile Transfektion	- 34 -
2.2.4.3	Generieren von Einzelzellklonen mittels Endpunkt titration	- 35 -
2.2.5	Proteinchemische Methoden	- 36 -
2.2.5.1	Quantifizierung von Proteinen	- 36 -
2.2.5.2	SDS-PAGE	- 36 -
2.2.5.3	Westernblot	- 38 -
2.2.5.4	Immundetektion und Auswertung	- 39 -
2.2.6	Immunfluoreszenzmikroskopie	- 40 -
3	Ergebnisse	- 42 -
3.1	Quantitative und qualitative Expression von HSP27 und p-HSP27 in Pankreaskarzinomzelllinien	- 42 -
3.1.1	Western Blotting zum quantitativen Nachweis von HSP27- und p-HSP27 in Pankreaskarzinomlinien	- 42 -
3.1.2	Immunfluoreszenz zum Nachweis der räumlichen Verteilung von Gesamt-HSP27 und p-HSP27 in Pankreaskarzinomzelllinien	- 44 -
3.2	Etablierung stabil HSP27-transfizierter PL5-Zellklone	- 44 -
3.2.1	Etablierung und Optimierung der Transfektionsbedingungen	- 45 -
3.2.2	Zelllinien-spezifische Genitcin-Sensitivitätstestung	- 46 -
3.2.3	Stabile Transfektion und Selektion resisternter Klone	- 46 -
3.2.4	Endpunkt titration zur Identifikation HSP27-hochexprimierender Einzelklone	- 48 -
3.3	Einfluss stabiler HSP27- und p-HSP27-Überexpression auf die zelluläre Sensitivität gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika	- 48 -
3.3.1	Gemcitabin/Paclitaxel/5-Fluorouracil/Cisplatin	- 49 -
3.3.2	Ausschluss klonaler Variabilität	- 50 -
3.3.3	Reversibilität der HSP27-bedingten Gemcitabin-Sensitivität	- 51 -

3.4 Einfluss stabiler HSP27- bzw. p-HSP27-Überexpression auf die zelluläre Sensitivität gegenüber γ -Bestrahlung	- 52 -
3.5 Induzierbarkeit der HSP27-Expression durch Hitzeschock	- 53 -
3.5.1 Induzierbarkeit der HSP27-Expression durch Hitzeschock in PL5 und PL11	- 53 -
3.5.2 Induzierbarkeit der HSP27-Expression durch Hitzeschock in neu etablierten kurzzeitkultivierten Pankreaskarzinomlinien	- 55 -
3.6 Mechanistische Untersuchungen zur HSP27-modulierten Gemcitabin-Sensitivität in PL5 Zellen	- 55 -
3.6.1 Einfluss der Behandlung mit Chemotherapeutika auf die (p-)HSP27-Expression	- 55 -
3.6.2 Einfluss von Gemcitabin auf die räumliche Verteilung von (p-)HSP27 und die Beziehung zum Aktinskelett	- 56 -
3.6.2.1 Darstellung der räumliche Korrelation zwischen Gesamt-HSP27 und p-HSP27, Aktin mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	- 56 -
3.6.2.2 Phasenauf trennung zur quantitativen Analyse der HSP27-Verteilung mittels Westernblot	- 60 -
4 Diskussion	- 62 -
4.1 Das nicht-isogene HSP27-Pankreaskarzinommodell	- 62 -
4.2 Das isogene HSP27-Pankreaskarzinommodell	- 63 -
4.2.1 Evaluation des gewählten Zellmodells	- 64 -
4.3 Einfluss von HSP27 auf die Therapiesensitivität	- 65 -
4.3.1 Einfluss von HSP27 auf die Sensitivität gegenüber konventionellen Chemotherapeutika	- 65 -
4.3.2 Einfluss von HSP27 auf die Radiosensitivität	- 68 -
4.4 Induzierbarkeit der HSP27-Expression	- 69 -
4.5 Mechanismus der Gemcitabinsensitivität	- 70 -
4.5.1 Verteilungsstruktur von HSP27	- 70 -
4.5.2 Interaktion von HSP27 mit dem Aktinfilament	- 71 -
4.6 HSP27 als Tumormarker	- 71 -
4.7 Ausblick	- 73 -
5 Zusammenfassung	- 75 -
6 Literaturverzeichnis	- 76 -
7 Danksagung	- 88 -
8 Anhang	- 89 -
8.1 Publikationen	- 89 -

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
CDKN2A/p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CEA	karzinoembryonales Antigen
CTX	Chemotherapie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPC4/SMAD4	Deletion im Pankreaskarzinom, Locus 4
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethyldiamin-Tetraacetat
EGTA	Ethylene glycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid
FCS	fetal calf serum
FOLFIRINOX	Chemotherapienkombination aus 5-Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin
H ₂ O	Aqua dest. Bidest
H ₂ PO ₄	Dihydrogenphosphat
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSP	Hitzeschockprotein
Hu	human
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPMN	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth
LK	Lymphknoten
L-PEI 22	linear-polyethylenimine 22 kDa
MCN	muzinös-zystische Neoplasie
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
NaOH	Natriumhydroxid
NEJM	New England Journal of Medicine
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
P53	Tumorsuppressoren, welches für das Phosphoprotein 53 kodiert
PA	proliferation assay
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PBS	phosphate-buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p-HSP	phospho-HSP
PMSF	Phenylmethylsulfonylfuorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R0	makroskopisch/mikroskopisch kein Nachweis eines Residualtumors

R1/R2	mikroskopischer/makroskopischer Nachweis eines Residualtumors
Ras	Protoonkogen, Abkürzung für Rat Sarcoma
ROTG	Radiation Therapy Oncology Group
RT	Raumtemperatur
RTx	Radiotherapie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super Optimal Broth + Glukose
TBS	tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF	tumor necrosis factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenanteile
w/v	Gewichtsanteile

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

Der häufig genutzte Begriff des Pankreaskarzinoms bezieht sich in der Regel auf das duktale Adenokarzinom des Pankreas. Dieses hat einen Anteil an den exokrinen Tumoren des Pankreas von ca. 92 % [1]. Weitere exokrine Pankreastumore sind das benigne seröse Zystadenom (1 %), die maligne intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) (2 %), die maligne muzinös-zystische Neoplasie (MCN) (1 %) und das Azinuszellkarzinom (1 %). Darüber hinaus gibt es neuroendokrine Tumore des Pankreas (z. B. Insulinome, Gastrinome, VIPome, Glukagonome und hormonell inaktive nichtfunktionelle Tumore), die mit einer Prävalenz von 1/100.000 sehr selten sind [1].

1.1.1 Duktales Adenokarzinom des Pankreas

1.1.1.1 Epidemiologie

1.1.1.1.1 Inzidenz und Mortalität

Das Pankreaskarzinom zählt zu den Karzinomen mit der höchsten Letalität und stellt auch heute noch eine schlecht zu therapierende Krankheit dar.

Im Jahr 2008 lag die geschätzte Zahl der Neuerkrankungen in Europa bei 96.000 und die Zahl der Todesfälle durch das Pankreaskarzinom bei 95.200 [2]. Man schätzt, dass allein in den USA im Jahr 2010 36.800 Menschen daran gestorben sind und ca. 43.100 neue Fälle aufgetreten sind. Dabei sind nur ca. 3 % der neu auftretenden Krebserkrankungen Pankreaskarzinome und dennoch verantwortlich für ca. 6 % der Todesfälle nach Krebserkrankungen bei Männern und ca. 7 % bei Frauen [3]. Bedingt durch die schlechte Prognose ist das Pankreaskarzinom für beide Geschlechter die vierhäufigste krebsbedingte Todesursache [4].

Bisher bietet nur die operative Therapie einen kurativen Behandlungsansatz des Pankreaskarzinoms. Trotz der Weiterentwicklung in der Chemotherapie, Radiotherapie oder der Kombination dieser Möglichkeiten können diese zwar den Verlauf dieser aggressiven Neoplasie beeinflussen, bleiben aber in ihrer Intention palliativ. 1930 lag die altersbereinigte Sterberate des Pankreaskarzinoms für Männer und Frauen bei ca. 4 aus 100.000 und ist bis heute stetig auf ca. 12 aus 100.000 bei Männern und 10 aus 100.000 bei Frauen gestiegen [3]. 2008 lag die Sterberate bei 12,1 für Männer und 8,4 für Frauen in Westeuropa und deutlich niedriger für Männer und Frauen in Südeuropa mit 10,7 und 7,2 (altersbereinigt auf 100.000 Personenjahre) [2]. Das Alter mit der höchsten Inzidenz liegt zwischen 60 und 80 Jahren [5].

1.1.1.1.2 Prognose

Die Prognose der Patienten mit Pankreaskarzinom ist eine der schletesten unter allen Karzinomarten. Das ist hauptsächlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass weniger als 10 % der Pankreaskarzinome in frühen, potentiell heilbaren Stadien diagnostiziert werden [4]. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befinden sich 8 % der Pankreaskarzinome im lokalisierten Stadium, 26 % im lokal fortgeschrittenen Stadium und 53 % haben bereits Fernmetastasen gebildet [6]. Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate für alle Stadien liegt je nach Quelle zwischen 1 und 5 % [3, 5] und das mittlere Überleben bei ca. 6 Monaten [7]. Nach Stadien aufgeteilt, hat das lokalisierte Stadium ein 5-Jahres-Überleben von 22,5 %, das lokal fortgeschrittene Stadium von 8,8 % und das metastasierte Stadium von 1,9 % [6].

1.1.1.2 Risikofaktoren

Es wurden viele Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms diskutiert, allerdings gibt es nur für den Einfluss des Rauchens eindeutige Beweise [5, 8]. Das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, ist für Raucher 2,5 bis 3,6-fach höher als für Nichtraucher und steigt mit der Menge an konsumiertem Tabak und der Expositionszeit [8]. Es wird geschätzt, dass 25 % der Pankreaskarzinomneuerkrankungen mit Zigarettenrauchen in Verbindung stehen. Zusätzlich tritt das Pankreaskarzinom bei Rauchern im Mittel 10 Jahre früher als bei Nichtrauchern auf. Wie bei anderen Karzinomen, deren Entartungsrisiko durch Rauchen erhöht wird (z. B. Blasenkarzinom), obwohl sie auf Grund ihrer Lokalisation nicht direkt den inhalierten oder geschluckten Inhaltsstoffen ausgesetzt sind, könnten N-Nitro-Verbindungen potentiell eine Hyperproliferation der Zellen auslösen und so zu Adenokarzinomen führen [5].

Die Daten in Bezug auf Alkoholkonsum, Kaffeekonsum und die Nutzung von Aspirin weisen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang auf [9, 10]. Eine 1981 im New England Journal of Medicine veröffentlichte Studie zeigte den Zusammenhang zwischen Kaffeekonsum und der Zunahme der Pankreaskarzinominzidenz [11], wurde aber im Folgenden mehrfach widerlegt [12, 13].

Einzelne Studien zeigen eine gestiegerte Inzidenz von Pankreaskarzinomen bei Patienten mit Diabetes mellitus oder chronischer Pankreatitis, und es gibt schwache Hinweise, dass chronische Leberzirrhose, eine fett- und cholesterinreiche Diät und die Entfernung der Gallenblase mit einer höheren Inzidenz assoziiert sind [14-18]. Außerdem wurde in neuerer Zeit ein höheres Risiko für Patienten mit Blutgruppe A, B und AB im Vergleich zur Blutgruppe 0 beobachtet [18].

Zwischen 5 und 10 % der Patienten mit Pankreaskarzinom weisen eine positive Familienanamnese für die Erkrankung auf [19]. In Studien, die das familiär gehäufte Auftreten von Pankreaskarzinomen untersucht haben, wurde immer wieder gezeigt, dass eine positive Familienanamnese für das Pankreaskarzinom ein 2,8 bis 13-fach höheres

Risiko im Vergleich zur Kontrollgruppe darstellt. Dies gilt auch dann, wenn man die Ergebnisse für Umfeld bedingte Risikofaktoren und Diabetes mellitus bereinigt [20-22]. Bei einigen Patienten entwickelt sich ein Pankreaskarzinom als Teil einer definierten genetischen Prädisposition, wie z. B. im Rahmen der hereditären Pankreatitis mit *PRSS1*-Mutation (26 bis 70-fach erhöhtes Risiko), des hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinoms (HNPCC) mit Mutationen von *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* und *hPMS2* (8,6-fach erhöhtes Risiko), der Ataxia telangiectasia mit *ATM*-Genmutation (2 bis 3-fach erhöhtes Risiko), des Peutz-Jeghers-Syndroms mit *STK11*-Mutation (132-fach erhöhtes Risiko), des hereditären Mamma- und Ovarialkarzinoms mit *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation (3 bis 10-fach erhöhtes Risiko bei Vorliegen einer *BRCA2*-Genmutation) und des familiären atypischen multiplen Muttermal- und Melanom-Pankreaskarzinom-Syndroms (FAMMM-PC-Syndroms) mit *CDKN2*-Mutation (13 bis 22-fach erhöhtes Risiko) [23-25].

Alle bekannten Mutationen zusammen genommen machen allerdings nur einen kleinen Teil der Patienten mit positiver Familienanamnese aus. Dies zeigt, dass bislang nur ein Teil der Gendefekte entdeckt wurde, die eine familiäre Disposition bewirken.

Als protektiv gilt eine Obst- und Gemüse-reiche Diät [26, 27]. Es wird angenommen, dass dieser Effekt mit der Aufnahme von Folsäure und anderen Methylgruppendonoren in Verbindung steht [28].

1.1.1.3 Pathophysiologie und Molekularbiologie

Die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms aus dysplastischem Epithel über schwere Dysplasien zu einem invasiven Karzinom wird parallel begleitet von der schrittweisen Akkumulation von Genmutationen, wie z. B. der Aktivierung des *K-ras2*-Onkogens, der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *CDKN2A/p16*, der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *TP53* und der Inaktivierung von *DPC4/SMAD4* [29, 30].

Zu den bekannten Präkanzerosen des Pankreaskarzinoms zählen die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) [31], aber auch weniger gut charakterisierte Läsionen des Pankreas wie die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) und die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) [32].

Fast alle Patienten mit einem Pankreaskarzinom tragen mindestens einen von vier genetischen Defekten [33]. Über 90 % der Tumore haben eine aktivierende Mutation in dem *K-ras2*-Onkogen. Dabei verursacht die Transkription des mutierten *K-ras*-Gens ein abnormales Ras-Protein, welches sich unabhängig von äußeren Einflüssen im aktivierte Zustand befindet und zu einer abnormalen Aktivierung der Proliferations- und Überlebenssignalwege führt [34].

Ebenso zeigen 95 % der Tumore eine Inaktivierung des *CDKN2A/p16*-Gens und einen daraus resultierenden Verlust des p16-Proteins, welches als Regulator für den Übergang der

Zellen von der G1- zur S-Phase dient. Durch den Mangel an p16-Protein könnte es deshalb zu einem Anstieg der Zellproliferation kommen [35, 36].

TP53 ist in bis zu 85 % der Pankreaskarzinome inaktiviert. *TP53* ist ein wichtiger Regulator vieler verknüpfter Zellprozesse, wie Apoptose, Zellzyklus und DNS-Reparatur [34]. So kommt es beispielsweise als Reaktion auf eine Schädigung der DNS durch *TP53* zu einer *p21*-Transkription und über den Cyclin-CDK-Komplex zu einem Zellzyklusarrest. Die Inaktivierung von *TP53* führt insgesamt zu einer Instabilität der DNS, da sie den Zellen auch bei schwerwiegenden DNS-Schäden die Proliferation ermöglicht [37].

DPC4/SMAD4 ist in 55 % der Pankreaskarzinome inaktiviert [38]. *SMAD4* ist ein essentieller Bestandteil des TGF- β -Signalwegs. Seine Inaktivierung führt zu einem Verlust der TGF- β -induzierten Wachstumshemmung [34] und korreliert mit einer schlechten Prognose und ausgeprägten Metastasierung [39].

Eine kürzlich durchgeführte umfassende genetische Analyse von 24 Pankreaskarzinomen hat gezeigt, dass die genetische Basis des Pankreaskarzinoms sehr heterogen und vielschichtig ist. Es zeigten sich durchschnittlich 63 genetische Veränderungen pro Tumor [40]. Dabei können die Mutationen 12 zellulären Signalwegen zugeordnet werden, die in 67 bis 100 % der Fälle verändert waren [40].

1.1.1.4 Symptome

Die Symptome des Patienten hängen stark von der Lokalisation des Tumors und dem Stadium der Erkrankung ab. Patienten stellen sich oft mit eher unspezifischen Symptomen wie Bauch- oder Rückenschmerzen, unerklärbarem Gewichtsverlust, Ikterus und Pruritus vor. 70 % der Patienten haben einen Diabetes mellitus und häufig liegt dessen Diagnose weniger als zwei Jahre zurück [41]. Manchmal werden Patienten auch mit akuter Pankreatitis, Phlebitis migrans, Malabsorption, Hypoglykämie oder Hyperkalzämie vorstellig [42, 43].

Die Mehrzahl der Pankreastumore entwickelt sich im Pankreaskopf. In Folge einer Tumorobstruktion des Ductus choledochus kann es deshalb zur Cholestase oder durch eine Kompression des Pankreasgangs zur Pankreatitis kommen [44].

1.1.1.5 Diagnostik

Die Diagnostik bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom dient der Stadieneinteilung und Entscheidungsfindung, ob ein Tumor operabel ist, ob durch eine neoadjuvante Therapie eine sekundäre Operabilität erreicht werden könnte oder ob ein palliatives Vorgehen gewählt werden muss.

Bei Vorliegen einer potentiell resektablen, karzinomverdächtigen Raumforderung im Pankreas sollte primär die Resektion erfolgen. Eine endosonographisch-gesteuerte Biopsie

kann dann durchgeführt werden, wenn Differentialdiagnosen möglich sind, die das Vorgehen ändern würden [45].

Die Frage der Resektabilität wird mittels bildgebender Diagnostik geklärt, zum Beispiel durch Sonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie, endoskopische Ultraschalldiagnostik oder einer Kombination dieser Methoden.

In der transkutanen Ultraschalluntersuchung des Oberbauches sind eine echoarme Raumforderung und eine Dilatation des Ductus pancreaticus und des Ductus choledochus communis (double-duct sign) Zeichen eines Pankreastumors [46, 47]. Eine weitere Charakterisierung einer verdächtigen Pankreasraumforderung ist mittels Kontrastmittel-Doppler-Ultraschall möglich [46]. Darüber hinaus wird die Diagnostik mittels Kontrastmittel-gestützter CT zum lokalen Staging empfohlen, da diese mit 80 bis 90 %iger Genauigkeit die Resektabilität des Tumors vorhersagen kann [48]. Allerdings zeigen sich einige Schwierigkeiten bei der Identifizierung von Lebermetastasen und von befallenen Lymphknoten [49, 50].

Zum Ausschluss einer systemischen Metastasierung sollten in jedem Fall ein Röntgenthorax und eine Sonographie des gesamten Abdomens erfolgen. Dies kann auch durch eine adäquate CT-Diagnostik ersetzt werden [45].

Vor der Durchführung einer palliativen Chemotherapie muss die Diagnose zytologisch oder histologisch gesichert sein, um mögliche Fehlbehandlungen auf Grund anderer Differentialdiagnosen auszuschließen [51]. Außerdem sollte dabei immer die am einfachsten zugängliche Läsion punktiert werden [45].

Es gibt potentielle Serumbiomarker zur Diagnose, Prognose oder Verlaufskontrolle des Pankreaskarzinoms [52], von denen allerdings nur CA 19-9 und CEA eine gewisse klinische Bedeutung zukommt. So wurde in viele Studien der Nutzen von CA 19-9 zur Therapiekontrolle oder als Marker bei einem Rezidiv nachgewiesen [53-55]. Im Gegensatz zu CA 19-9 ist die Datenlage bei CEA nicht eindeutig. Es gibt Hinweise, dass CEA als prognostischer Marker für Patienten in fortgeschrittenem Stadium gelten kann [56, 57].

Allerdings gibt es auch Einschränkungen bei der Nutzung von CA 19-9 (siehe Abschnitt Biomarker).

1.1.1.6 Stadienbestimmung

Die Klassifikation des Pankreaskarzinoms erfolgt auf der Basis der TNM-Einteilung und wird nach der neusten Version der Empfehlungen der *Union internationale contre le cancer* (UICC) und des American Joint Committee on Cancer (AJCC) in 4 Stadien (siehe Tabelle 1) unterteilt [58]. T1, T2 und T3 Tumore werden als potentiell resektabel eingestuft. Dabei werden Tumore, welche durch Resektion und ggf. Rekonstruktion von umliegenden Strukturen z. B. Vena mesenterica superior, Portalvene oder Vena splenica, vollständig

entfernt werden können, als T3 klassifiziert. Tumore, welche großflächig Strukturen involvieren, die nicht reseziert werden können, wie z. B. die Arteria mesenterica superior oder den Truncus coeliacus gelten als nicht-resektable und werden damit als T4 klassifiziert.

Stadium	T-Status	N-Status	M-Status	Mittleres Überleben [Monaten]	Merkmale
IA	T1	N0	M0	24,1	Tumor begrenzt auf das Pankreas längster Durchmesser \leq 2 cm
IB	T2	N0	M0	20,6	Tumor begrenzt auf das Pankreas längster Durchmesser $>$ 2 cm
IIA	T3	N0	M0	15,4	Ausbreitung des Tumors über das Pankreas, keine Infiltration der A. mesenterica sup. oder des Truncus celiacus
IIB	T1, T2 oder T3	N1	M0	12,7	Regionale Lymphknotenmetastasen
III	T4	jedes N	M0	10,6	Tumor involviert die A. mesenterica sup. oder den Truncus celiacus (nicht-resektable)
IV	jedes T	jedes N	M1	4,5	Fernmetastasen

Tab. 1: Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms nach Hidalgo et al. [44]; Daten zum mittleren Überleben nach Bilimoria et al. [59]

1.1.1.7 Management

Wichtige patientenabhängige Prognosefaktoren für den Erfolg der Behandlung bei Erstdiagnose sind Allgemeinzustand, Gewichtsverlust, Schmerzen und laborchemische Inflammationszeichen [60].

1.1.1.7.1 Resektables, lokalisiertes Stadium

Die Behandlung der Wahl für Patienten mit lokalisiertem, resektablem Pankreaskarzinom ist die radikale Operation mit kurativem Ansatz [61]. Ziel der Operation ist eine Resektion ohne mikroskopischen Nachweis von Tumorzellen im Schnittrand (R0). Je nach Tumorlokalisation wird dazu eine radikale Operation mit Magenresektion und partieller Duodenopankreatektomie (klassische Operation nach Kausch/Whipple), die pyloruserhaltende Operation (Operation nach Traverso), die totale Duodenopankreatektomie oder eine subtotale Pankreaslinksresektion durchgeführt. Dabei haben Datenbankanalysen gezeigt, dass die Mortalität der Operation in Zentren mit hohen Fallzahlen signifikant geringer ist als in Krankenhäusern, in denen die Operation nur unregelmäßig durchgeführt wird [62].

Daten zeigen auch, dass eine möglichst radikale Operation die Überlebenswahrscheinlichkeit nicht verbessert, jedoch die perioperative Mortalität erhöht. Wichtige Prognosefaktoren sind Lymphknotenmetastasen, Differenzierungsgrad des Tumors,

Tumorgröße, R1/R2-Resektion und hohe oder nach der Operation nicht fallende Serumspiegel von CA 19-9 [54, 63, 64].

In mehreren Studien wurde der Nutzen adjuvanter (Radio-)Chemotherapie für das Überleben der Patienten nachgewiesen. Dabei zeigten die ESPAC-1-Studie und die CONKO-001-Studie einen deutlichen Nutzen der adjuvanten Chemotherapie mit 5-Fluorouracil/Folinsäure bzw. Gemcitabin für das Überleben der Patienten [65, 66].

1.1.1.7.2 *Lokal fortgeschrittenes Stadium*

Bei der Erstdiagnose befinden sich ca. 26 % der Patienten in einem lokal fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Weitere 30 % der Patienten haben ein lokales Rezidiv nach Behandlung eines Karzinoms im lokalisierten Stadium [44]. Die aktuellen S3-Leitlinien empfehlen für diese Patientengruppe ein sequentielles Behandlungskonzept, um in einigen Fällen die Resektabilität des Tumors zu erreichen. Dabei sollte zuerst eine Chemotherapie und im Anschluss eine Radiochemotherapie der Patienten erfolgen. Nach der Therapie sollte die Frage der sekundären Operabilität beurteilt werden [45]. Der Nutzen der kombinierten Radiochemotherapie im Vergleich zur Chemotherapie alleine ist noch nicht ausreichend untersucht [67] und sollte deshalb nur im Rahmen von Studien angewendet werden [45].

1.1.1.7.3 *Metastasiertes Stadium*

Die Mehrzahl der Patienten leidet bei Erstdiagnose bereits an einem metastasierten Karzinom. Derzeit gibt es für dieses Tumorstadium keinen kurativen Therapieansatz. Das mittlere Überleben mit Behandlung liegt bei ca. 5 Monaten. Bisher ist eine Monotherapie mit Gemcitabin die Therapie der ersten Wahl [68]. Alle Therapieentscheidungen sollten leitliniengerecht durch ein interdisziplinäres Tumorboard erfolgen [45].

In neuerer Zeit gibt es viele Studien, die neue Einzel- oder Kombinationstherapien untersuchen. Metaanalysen bestätigen die Rolle von Gemcitabin als Standardtherapeutikum, allerdings sind auch Kombinationen von Gemcitabin mit Platinanalogen oder Fluoropyrimidinen effektiv [69-71].

Zusätzlich wurde für die Kombination von Gemcitabin mit Erlotinib, einem selektiven Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors (Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor), ein kleiner, aber statistisch signifikanter Vorteil im Überleben nachgewiesen [72]. Insbesondere haben aber Studien auch gezeigt, dass die Behandlung bei Patienten, die ein medikamenten-induziertes Exanthem (Rash) unter Therapie entwickeln, einen deutlich größeren Therapieerfolg aufweisen [72, 73]. Allerdings kam es unter Kombinationstherapie zu einer höheren Rate an Nebenwirkungen als unter der Monotherapie mit Gemcitabin.

Ein deutlicher Fortschritt bei der medikamentösen Behandlung des Pankreaskarzinoms wurde durch die Kombination und Weiterentwicklung von etablierten Chemotherapeutika erzielt.

So wurden vielversprechende Daten über die Wirksamkeit von FOLFIRINOX veröffentlicht. Dabei zeigt sich ein deutlich verbessertes Überleben im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin [74]. Allerdings kann dabei eine gewisse Vorselektion der Patienten anhand des Allgemeinzustandes nicht sicher ausgeschlossen werden.

In einer 2013 im NEJM veröffentlichten Studie zeigte sich, bei der Kombinationstherapie mit Albumin-gebundenem Paclitaxel (Abraxane) und Gemcitabin ein besseres Gesamtüberleben, ein verlängertes progressionsfreies Überleben und eine bessere Ansprechraten als bei der Monotherapie mit Gemcitabin bei vertretbar erhöhten Nebenwirkungen [75].

Für den Fall der Progression der Erkrankung unter Chemotherapie gibt es keine einheitlichen Therapieempfehlungen mehr. Für Patienten in einem guten Allgemeinzustand (ECOG ≤ 2) kann eine Zweitlinientherapie empfohlen werden [45].

Zusätzlich sollten alle Patienten mit einer Erkrankung im fortgeschrittenen Stadium durch ein interdisziplinäres Palliativteam betreut werden. Dabei steht die Symptomkontrolle von Schmerzen, Kachexie, tumorbedingter Cholestase, Peritonealkarzinose und Aszites im Vordergrund.

1.2 Biomarker

Ein Biomarker ist eine Substanz, Struktur oder ein Prozess, welcher im Körper oder seinen Produkten gemessen oder in den Zellen und Geweben nachgewiesen werden kann und ein Zeichen für einen physiologischen oder pathologischen Prozess oder eine Erkrankung ist. Außerdem kann ein Biomarker darüber Auskunft geben, wie gut das Ansprechen auf eine Behandlung ist [76, 77].

Ein Tumormarker ist ein Molekül, das in Tumorgewebe nachgewiesen werden kann oder vom Tumor in das Blut oder andere Körperflüssigkeiten abgegeben wird und dort detektiert wird. Tumormarker können diagnostischen, prognostischen oder prädiktiven Wert, z.B. für das Therapieansprechen, haben [78].

1.2.1 Anforderungen an einen Biomarker

Damit Biomarker in der klinischen Routine eingesetzt werden können, müssen diese verschiedene Kriterien erfüllen.

Für den Einsatz in der Diagnostik oder als Screeningmethode ist es notwendig, dass der Biomarker eine hohe Trennschärfe zwischen Gesunden, Erkrankten und an einer anderen Krankheit Erkrankten aufweist. Außerdem muss evaluiert werden, ob ein Biomarker überhaupt abbildet, was gemessen werden soll [76].

Das Probenmaterial zur Bestimmung des Biomarkers sollte möglichst einfach zugänglich sein. Für das Pankreaskarzinom kann bisher auf eine invasive Diagnostik mittels Biopsie nicht verzichtet werden. Aus diesem Grund wird in Studien die Untersuchung von Blut, Pankreassekret und Stuhl auf Biomarker für die Diagnostik des Pankreaskarzinoms evaluiert [79].

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Standardisierung der Messmethodik eines Biomarkers. Um eine hohe Vergleichbarkeit zu erreichen, dürfen die Ergebnisse nicht durch Analyseverfahren signifikant beeinflusst und es sollte ein allgemeingültiges Referenzsystem etabliert werden [80].

1.2.2 Diagnostische Tumormarker

Diagnostische Tumormarker werden eingesetzt, um aus einer Population die Individuen herauszufinden, die an einer Krankheit leiden [78]. Dabei ist es wichtig, dass man die Erkrankung eines Patienten aus einer Gruppe ähnlicher Erkrankungen genau differenzieren kann.

Der einzige diagnostische Tumormarker für das Pankreaskarzinom, der bedingt in der klinischen Routine eingesetzt wird, ist CA 19-9. In einer Metaanalyse mit insgesamt 2.282 Patienten wurde gezeigt, dass CA 19-9 eine mittlere Sensitivität von 79 % und eine mittlere

Spezifität von 82 % für das Pankreaskarzinom hat [81]. Dabei muss man jedoch betonen, dass CA 19-9 derzeit bei der Primärdiagnose nur als zusätzliche Hilfe bei der Differentialdiagnostik gewertet werden kann und nicht als alleiniges Diagnosekriterium [45]. Allerdings kann der CA 19-9-Verlauf zur Diagnostik eines Rezidives herangezogen werden [44].

Einschränkung in der Nutzung von CA 19-9 als diagnostischer Marker ergeben sich, da es auch bei anderen benignen und malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes zu Erhöhungen der CA 19-9-Blutwerte kommen kann [82]. Außerdem wird CA 19-9, die sialisierte Form des Lewis A-Blutgruppenantigen, von Patienten, die genotypisch Lewis-Antigen a-b-Phenotyp sind (ca. 10 % der Patienten mit Pankreaskarzinom) nicht exprimiert. Diese Patientengruppe weist somit auch bei fortgeschrittener Erkrankung keine erhöhten Serumspiegel von CA 19-9 auf [44].

Nach den Richtlinien der "European Group on Tumor Marker" von 2009 kann CA 19-9 als ergänzender diagnostischer Marker empfohlen werden, wenn ein radiologischer Karzinomverdacht besteht, jedoch eine Tumogröße unter 3 cm und kein Ikterus vorliegt [83].

Es wurden auch viele weitere Serumtumormarker, z. B. CA 242, CEA, TPA und K-ras, und Analysen von Mucinen und microRNA für das Pankreaskarzinom als potentielle diagnostische Tumormarker getestet [84-86]. Bisher hat sich im Vergleich zu CA 19-9 keiner der getesteten Biomarker als überlegen erwiesen. Aus diesem Grund werden sie nicht routinemäßig eingesetzt [86, 87].

1.2.3 Prognostische Tumormarker

Prognostische Tumormarker sollen helfen, patientenbezogene Aussagen über den Verlauf der Erkrankung zu treffen und damit die Entscheidung für die passende Behandlungsoption unterstützen [78].

Bisher konnte nur für CA 19-9 eine überzeugende Rolle als prognostischer Tumormarker für das Pankreaskarzinom belegt werden. Studien zeigen, dass ein prätherapeutisch hoher CA 19-9-Serumspiegel mit einer schlechteren Prognose und einem schlechteren postoperativen Überleben korreliert [88, 89]. Ähnlich scheint auch der Abfall des CA 19-9-Serumspiegel durch eine Operation, eine systemische Chemotherapie oder Radiotherapie einen sogar noch stärkeren prognostischen Wert für das weitere posttherapeutische Überleben der Patienten zu haben [54, 88]. Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass eine regelmäßige Messung von CA 19-9 zur Früherkennung von lokalen Rezidiven oder dem Auftreten von Metastasen genutzt werden kann [82].

Die Nutzung von K-ras als prognostischer Biomarker kann bisher nicht empfohlen werden [87]. In einer großen Metaanalyse konnte auf Grund mangelnder Teststärke, Studiendesign und Testmethoden keine einheitliche Aussage gefunden werden [90].

1.2.4 Prädiktive Tumormarker

Prädiktive Tumormarker dienen dazu, eine Vorhersage über das Ansprechen eines Patienten auf eine Therapie zu treffen und können dabei helfen, diese zu individualisieren und für den einzelnen Patienten zu optimieren. Ein bestimmter Tumorgenotyp (Mutationen oder Polymorphismen) oder ein spezielles Genexpressionsprofil kann dabei ein Hinweis für die Chemo- oder Radiosensitivität eines Tumors sein [78].

Zur Identifizierung chemotherapeutisch-nutzbarer Angriffspunkte wurden in einer Studie 24 Pankreaskarzinome sequenziert. Dabei zeigte sich, dass außer den vier vorbekannten, häufig mutierten Genen (*TP53*, *K-ras*, *CDK2NA* und *SMAD4*) kein weiteres der mehr als 200 neu identifizierten Gene in mehr als 7 % der Tumore mutiert war [40].

1.3 HSP27

1.3.1 Hitzeschockproteine

F. Ritossa beschrieb 1962 zum ersten Mal eine Veränderung des Genexpressionsmusters durch Hitzeschock bei Drosophila [91]. In den folgenden Jahren wurden die durch Hitze vermehrt exprimierten Gene und die dazugehörigen Proteine identifiziert [92] und der Begriff Hitzeschockproteine (HSP) geprägt.

Die HSPs sind eine Gruppe hochkonservierter Proteine, die nach ihrer Größe in fünf Gruppen unterteilt werden. Man unterscheidet HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 und die kleinen Hitzeschockproteine, zu denen HSP27 gehört [93].

Die Hitzeschockproteine fungieren hauptsächlich als Chaperone in Zellen, die Stress, z. B. Hitzeschock, ausgesetzt sind. So führen auch Zellstressoren, wie oxidativer Stress, Schwermetalle, Ethanol und andere toxische Substanzen zu einer charakteristischen Antwort der Zelle [93, 94]. Dabei scheint die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen und nicht die Hitze an sich ein Trigger für die Zellen zu sein, Gegenmaßnahmen einzuleiten. Bei Zellstress verhindern die Hitzeschockproteine die Fehlfaltung von Proteinen und fördern deren korrekte Neufaltung [95].

Wenn der Hitzestress für die Zellen nicht letal ist, führt er zu einer erhöhten Toleranz gegenüber stärkerem Zellstress. Für diesen Effekt sind die erhöhten Expressionslevel der HSPs verantwortlich [96]. Interessanterweise konnte man beobachten, dass die Induktion der HSPs durch einen Stressor auch zu einer erhöhten Toleranz gegenüber anderen Stressoren führt [96].

1.3.2 Kleine Hitzeschockproteine

Die kleinen Hitzeschockproteine sind eine heterogene Gruppe von Hitzeschockproteinen. Sie kommen in vielen Arten von Lebewesen in sehr unterschiedlichen Formen und Größen von 12 bis 43 kDa vor [97]. Allerdings besitzen alle Vertreter dieser Gruppe einen gemeinsamen konservierten Bereich, die so genannte α -Crystallin-Domäne [98]. Weniger gut konserviert ist die so genannte WDPF-Region im N-terminalen Bereich der Proteine. Beide Bereiche scheinen eine Rolle bei der Oligomerisierung und der Anlagerung an Zielproteine zu spielen [99].

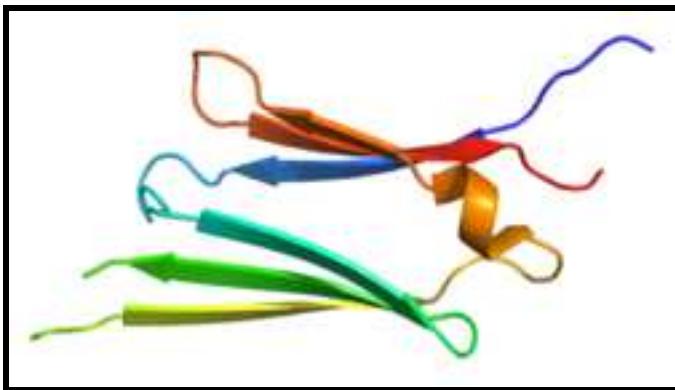


Abb. 1: Heat Shock Protein Beta-1

1.3.3 HSP27

HSP27 wird in einer Vielzahl von humanen Zellen und Geweben in bestimmten Stadien der Differenzierung und auch während der Embryonalentwicklung exprimiert [100]. HSP27 kann sich zu Oligomeren mit einer Molekülgröße bis zu 800 kDa zusammenlagern und auch heteromere Strukturen mit anderen Proteinen bilden. Diese Oligomere werden hauptsächlich von unphosphoryliertem HSP27 gebildet [99].

1.3.3.1 Expression von HSP27

Die Expression von HSP27 wird stark durch Hitzeschock und verschiedene andere physikalische und chemische Zellstressoren, wie z. B. Strahlung, oxidativen Stress und verschiedene Chemotherapeutika induziert [93, 101]. Zusätzlich variiert die HSP27-Expression während der Embryogenese und Differenzierung in manchen Geweben [101]. Außerdem ist HSP27 im Zytoplasma mancher normaler Gewebe und in malignen Zellen vieler verschiedener Tumorentitäten auch in der Abwesenheit von Zellstress konstitutiv z.T. hoch exprimiert. Dabei kann jedoch das basale Expressionsniveau sehr unterschiedlich sein [93, 102].

1.3.3.2 Funktionen von HSP27

HSP27 erfüllt eine große Bandbreite an Funktionen in der Zelle. Zytoprotektiv wirkt es vor allem durch seine Rolle als molekulares Chaperon, durch seinen direkten Einfluss auf die Caspaseaktivität, durch Modulation von oxidativem Stress und durch Regulation des Zytoskeletts [103].

HSP27 dient als Regulator und Stabilisator des Zytoskeletts, vor allem der Aktinfilamente. In Studien wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression von HSP27 die Stabilität der Aktinfilamente bei Belastung durch Stressoren wie Hyperthermie und Oxidanzien erhöht [104, 105] und so die Aggregation der Filamente verhindert.

Aggrierte Filamente oder durch Zellstress beschädigte Proteine, welche Aggregate bilden, sind für die Zelle ein Signal, die Apoptose einzuleiten. HSP27 hilft, die Aggregation der Proteine und damit die Zellapoptose zu verhindern [103], indem es als molekulares Chaperon Komplexe mit entfalteten Proteinen bildet und unspezifische Proteinbindungen unterbindet. Um die Wiederherstellung der Proteinfaltung zu erreichen, bildet es Komplexe mit ATP-abhängigen HSPs, wie z. B. HSP70 [106]. Zusätzlich verlangsamt HSP27 unter Stressbedingungen die Proteinsynthese der Zelle, in dem es an den Translations-initiationsfaktor eIF4G bindet und damit verhindert, dass eIF4G die Translation initiieren kann [107].

HSP27 hat direkten Einfluss auf die Apoptosekaskade der Zelle. Zum Beispiel beeinflusst es die Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 und modelliert dadurch die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien [103]. Außerdem interagiert HSP27 mit DAXX, einem Mediator der Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptose und kann dessen Kopplung sowohl mit dem Rezeptor als auch mit der Ask1-Kinase blockieren [108].

Zusätzlich zu den zytoprotektiven Eigenschaften spielt HSP27 eine Rolle bei vielen weiteren physiologischen und pathologischen Prozessen in der Zelle.

1.3.3.3 HSP27-Phosphorylierung

Der Hauptregulationsmechanismus der HSP27-Aktivität scheint auf Transkriptions-ebene stattzufinden, dennoch spielt auch die posttranskriptionale Regulation durch Phosphorylierung von HSP27 eine gewisse Rolle [109]. Für das humane HSP27 sind drei Phosphorylierungsstellen an Position Ser-15, Ser-78 und Ser-82 bekannt [110]. Es gibt eine Vielzahl von Trigger, welche die Phosphorylierung von HSP27 auslösen, darunter Hitzechock, Zytokine, Mitogene, Lipopolysaccharide und viele andere [99]. Die Phosphorylierung von HSP27 wird durch verschiedene Kinasen katalysiert. Sowohl die MAPKAP-Kinase-2 als auch die MAPKAP-Kinase-3, welche beide durch die p38-MAP-Kinase aktiviert werden, scheinen HSP27 zu phosphorylieren [111]. Ebenso scheinen PKC, PKD, MAPKAP-Kinase-5 undPKG HSP27 direkt oder indirekt über MAPKAP-Kinase-2 zu phosphorylieren [99, 112, 113].

Die Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung des HSP27-Moleküls und dadurch zu einer veränderten Interaktion mit anderen HSP27-Molekülen und zu einer vermehrten Dimerisierung von HSP27 [114].

In der phosphorylierten Form ist HSP27 ein wichtiger Regulator der strukturellen Integrität und Membranstabilität der Zelle. Es bewirkt die Aktinpolymerisation, die Formation der Intermediärfilamente und Zell-Zell-Kontakte. Außerdem spielt es eine Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion, der mRNS-Stabilisierung, der Differenzierung und der Apoptose. Dennoch bleibt die genaue Funktion der verschiedenen phosphorylierten Formen nur unvollständig verstanden [99].

1.3.3.4 HSP27 in Tumoren

Die Fähigkeit von HSP27, Zelltod, hervorgerufen durch unterschiedliche Stimuli z. B. Chemotherapie, zu verhindern, legt die Theorie nahe, dass HSP27 die Karzinogenität steigern und das Ansprechen auf Chemotherapie vermindern kann [115]. In vielen Tumorentitäten, z. B. im Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Magenkarzinom, Ovarialkarzinom und im Hodgkin-Lymphom, wurde eine höhere HSP27-Expression als in nicht transformierten Zellen nachgewiesen [116-120].

Da HSP27 in vielen verschiedenen Karzinomgeweben exprimiert wird, kann es nicht zuverlässig als Marker für die Zuordnung von Karzinomgewebe zu seinem Ursprungsgewebe genutzt werden. Aus diesem Grund hat HSP27 keine Bedeutung als singulärer diagnostischer Marker. Allerdings kann es in manchen Tumorentitäten zur Einschätzung des Grades der Entdifferenzierung genutzt werden. So nimmt die Expression von HSP27 im Barett-Ösophagus im Vergleich zum Normalgewebe deutlich ab [102]. Ähnlich scheint die HSP27-Expression einen Marker für eine erhaltene Differenzierung im Endometriumkarzinom und Plattenepithelkarzinomen (Uterus, Cervix und Mundhöhle), aber auch einen Marker für eine schlechte Differenzierung beim Astrozytom darzustellen [121].

Ein ebenso uneinheitliches Bild bietet sich bei der Frage, welche Bedeutung die HSP27-Expression als prognostischer Marker in den verschiedenen Tumorentitäten hat. So ist beispielsweise eine hohe HSP27-Expression mit einer guten Prognose für Patienten mit Adenokarzinom des Endometriums, Ösophaguskarzinom und malignem fibrösem Histozytom, aber mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Ovarial-, Magen-, Leber- und Prostatakarzinom sowie Osteosarkom verbunden [121].

Hinsichtlich seiner potentiellen Bedeutung als prädiktiver Marker scheint HSP27 in vielen Tumorentitäten eine Resistenz gegenüber Chemotherapie zu vermitteln. Dies wurde im Mammakarzinom für die Behandlung mit einer 5-Fluorouracil/Cyclophosphamid-basierten Chemotherapie [122], im Ovarialkarzinom für die Behandlung mit Cisplatin/Doxorubicin-basierter Chemotherapie [123], im Ösophaguskarzinom für die Behandlung mit 5-Fluorouracil/Cisplatin-basierter Radiochemotherapie [124] und für das Plattenepithelkarzinom in Behandlung mit Cisplatin [125] gezeigt. Eine prätherapeutische Bestimmung der HSP27-Expression könnte somit als prädiktiver Marker hinsichtlich des Therapieansprechens dienen. Allerdings ergibt sich in den verschiedenen Tumorentitäten insgesamt ein sehr uneinheitliches Bild. So finden auch viele Studien keinen Zusammenhang zwischen der HSP27-Expression und dem Ansprechen auf Chemotherapie. Ebenso ist bislang der Einfluss von HSP27-Expression auf die Radiosensitivität nicht ausreichend untersucht [121].

1.3.3.5 HSP27 im Pankreas und Pankreaskarzinom

In vielen Studien wurde die Rolle der Hitzeschockproteine und im Besonderen von HSP27 im Pankreas untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt jedoch meist auf dessen Rolle

bei entzündlichen Prozessen z. B. der akuten Pankreatitis [126-128] und nur wenige und teilweise widersprüchliche Ergebnisse wurden über die Rolle von HSP27 im Pankreaskarzinom veröffentlicht.

Zum Beispiel zeigten Proteinexpressionsanalysen in neun Patientenproben eine deutlich höhere Expression von HSP27 in normalem Pankreasgewebe im Vergleich mit Pankreaskarzinomgewebe [129]. Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Studie mittels Proteinexpressionsanalyse und Immunhistochemie in neun Gewebeproben, dass HSP27 in mikrodisseziertem Pankreaskarzinomgewebe im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe deutlich hoch reguliert war [130]. In einer großen Tissue-Microarray-Analyse mit 86 Patientenproben konnte gezeigt werden, dass im Pankreaskarzinomgewebe im Vergleich zum Normalgewebe signifikant häufiger HSP27 exprimiert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte HSP27-Expression einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Überleben der Patienten darstellt und dass Patienten mit einer hohen HSP27-Expression ein besseres Ansprechen auf eine Therapie mit Gemcitabin zeigen [131].

Darüber hinaus wurde HSP27 als Serumtumormarker für das Pankreaskarzinom vorgeschlagen, da in einer Studie mit 35 Fällen mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 84 % zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit Pankreaskarzinom differenziert werden konnte [130]. Allerdings scheint der Serumspiegel von HSP27 nicht zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit chronischer Pankreatitis zu differenzieren, da der HSP27-Serumspiegel bei der chronischen Pankreatitis ähnlich ansteigt wie im Pankreaskarzinom [132].

Darüber hinaus gibt es Proteinexpressionsanalysen, die die Rolle von HSP27 als Modulator der Chemosensitivität gegenüber Gemcitabin im Pankreaskarzinom unterstützen, dabei allerdings zeigen, dass HSP27 eine Gemcitabinresistenz der Zellen bedingt [133-135]. Diese Daten stehen im Gegensatz zu der oben angeführten Publikation von Schaefer et al., welche zeigt, dass eine vermehrte HSP27-Expression zu einer Sensitivierung gegenüber der Behandlung mit Gemcitabin führt [131].

1.4 Fragestellung

Als Ziel der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund dieser diskrepanten Befunde die Etablierung eines geeigneten HSP27-Überexpressionsmodells humaner Pankreaskarzinomzellen sowie die konsekutive Charakterisierung des Einflusses von HSP27 auf das Therapieansprechen hinsichtlich Chemo- und Radiotherapie im Pankreaskarzinom definiert.

Diese Fragestellung wurde mittels folgender Teilschritte bearbeitet:

- Etablierung eines geeigneten humanen *in vitro* Tumorzellmodells zur
- Untersuchung des Einflusses von (p-)HSP27 auf die Chemo- und Radiosensitivität von Pankreaskarzinomzellen *in vitro*.
- mechanistischen Charakterisierung der identifizierten Effekte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Firma</u>
Acrylamid/Bisacrylamid Mix (30 %)	Bio-Rad (München)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
APS	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Blotting grade Blocker Non-fat Dry Milk (Milchpulver)	Bio-Rad (München)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
BSA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Crystal Violet	Implen GmbH (München)
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
DMSO	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
EGTA	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol (96 %)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd (37 %)	Roth (Karlsruhe)
Glukose	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt (Select Yeast Extract)	Voigt (Lawrence, KS)
HEPES	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
IPEGAL CA-630	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumacetat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
LB Both Base powder	Invitrogen (Karlsruhe)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Methanol (99 %)	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Natronlauge	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
PMSF	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Saccharose	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (37 %)	Roth (Karlsruhe)
SDS	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
TEMED	Bio-Rad (München)
Tris-Base	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Tris-HCl	Applichem (Darmstadt)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Trypton	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Vectashield Fluoromount	Biozol (Echingen)

2.1.2 Reaktionslösungen und Enzyme

Alexa Fluor 546 phalloidin	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Bradford Reagenz	Bio-Rad (München)
Benzonase	Roche (Mannheim)
ECL-Westernblot Substrat	Fischer Scientific (Schwerthe)
Proteinase-Inhibitor-Cocktail Set I	Merck (Darmstadt)
SYBR Green I nucleir acid	Roche (Mannheim)
6x DNA Loading Dye	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Für WB	Für IF	Hersteller
anti-HSP27 SPA-800 oder SPA-803	1:1.000	1:100	Stressgen/Enzo (Lörrach)
anti-phospho-Ser78 HSP27 SPA-523	1:1.000	1:100	Stressgen/Enzo (Lörrach)
anti-β-ACTIN antibody AC-15	1:10.000		Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-mouse HRP-conjugated antibody	1:10.000		GE Healthcare (Freiburg)
anti-rabbit HRP-conjugated antibody	1:10.000		GE Healthcare (Freiburg)
Alexa 488 goat anti-rabbit IgG secondary antibody		1:200	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab. 2: Übersicht über die Verwendeten Antikörper und deren Konzentrationen

2.1.4 Verbrauchsartikel

Material	Hersteller
Pipettenspitzen (1 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Glaspipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated (Corning, NY, USA)
Mehrkanalpipettenspitzen	Mettler-Toledo (Gießen)
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagenzgefäß (15 ml, 50 ml)	B&D (Heidelberg)
10 cm-Zellkulturschalen	B&D (Heidelberg)
Wellplatten für Zellkultur	B&D (Heidelberg)
T10-Zellkulturflaschen	B&D (Heidelberg)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)
Einfrierröhrchen	Greiner bio-one (Frickenhausen)
PVDF-Membran	Millipore (Schwalbach)
Röntgenfilm	Fischer Scientific (Schwerte)
Polystyrol Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Deckgläschchen	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Super Frost Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter (Krefeld)

2.1.5 Geräte, Ausstattung

	Bezeichnung	Hersteller
„semi-dry-blot“-Kammer		Peqlab (Erlangen)
Cäsium 137-Gammabestrahlungsanlage	HWM-D 2000	Wälischmiller Engineering (Markdorf)
Fluoreszenz-Mikroskop mit Digitalkamera	Zeiss Axiovert 135 Axio Cam MRm	Carl Zeiss (Jena) Carl Zeiss (Jena)
Fluorometer	Cytofluor Series 4000	AB (Darmstadt)
Gammabestrahl器	Gammacell 40 Exactor	MDS Nordion (Ontario, Kanada)
Gelelektrophoresekammer		Bio-Rad (München)
Inkubator	Hera Cell 240	Heraeus (Hanau)
Lichtmikroskop	Olympus CK2	Olympus (Hamburg)
Mehrkanalpipetten	Rainin	Mettler-Toledo (Gießen)
Milli-Q Advance		Millipore (Schwalbach)
Neubauer-Zählkammer	neubauer improved	Labor Optik (Friedrichsdorf)
Photometer	Ultrospec 3100 pro	GE Healthcare (Freiburg)
Sterilbank	Herasafe	Heraeus (Hanau)
Tischwaage	SPO52	Scaltech (Göttingen)
Wasserbad	medinger	P-D (Wilsdruff)
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge	Airfuge	Beckman Coulter (Krefeld)
Zellzentrifuge	Rotanta/S	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge	Allegra 25R Centrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Geräte

2.1.6 Zytostatika und Medikamente

	Hersteller
5-Fluoruracil	TEVA (Mörfelden-Walldorf)
cis-Diammineplatinum(II)-dichloride	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Gemcitabin	Lilly (Homburg)
Paclitaxel	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
TRAIL	Roche (Mannheim)

2.1.7 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin)	PAA (Cölbe)
DMSO-Lösung (20 %)	Roth (Karlsruhe)
Dulbecco's PBS	PAA (Cölbe)
FCS Gold	PAA (Cölbe)
100 x PS (10000 U/ml Penicillin; 10 mg/ml Streptomycin)	PAA (Cölbe)
Trypanblau (4 %)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trypsin-EDTA	PAA (Cölbe)
OptiMem	Invitrogen (Karlsruhe)
G-418 (Geneticin)	Roth (Karlsruhe)
L-PEI 22 (linear-polyethylenimine 22 kDa)	PD Dr. Manfred Ogris, Department of Pharmacy Pharmaceutical Biotechnology LMU München [136]
Lipofectamin 2000	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.8 Plasmide

eGFP (pEGFP-N1-Vektor)	PD Dr. Manfred Ogris, Department of Pharmacy Pharmaceutical Biotechnology LMU München
------------------------	--

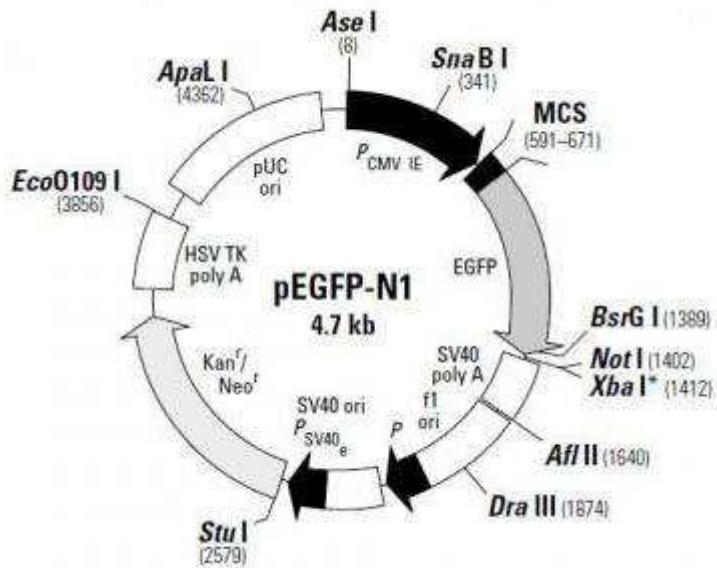


Abb. 2: Vektorkarte des Plasmid pEGFP-N1

pEGFP-N1 kodiert für das Enhanced Grün Fluoreszierende Protein (eGFP). Das Gen für eGFP steht unter der Kontrolle des CMV-Promoters und wird daher in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiert. Wenn GFP optisch angeregt wird, fluoresziert es grün. Das Protein wird für nahezu alle eukaryotischen Zellen als nicht-toxisch eingestuft und eignet sich daher für *in vitro* Studien. eGFP fluoresziert mit einer kürzeren Wellenlänge als GFP und wird von den Zellen stärker exprimiert.

2.1.8.1 HSP27-Konstrukte

Alle HSP27-Konstrukte wurden in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. Dieser kodiert darüber hinaus für ein Protein, das Neomycin-Geneticin-Resistenz vermittelt. Diese Fähigkeit wurde bei der Erzeugung stabil-transfizierter Klone zur Selektion der transfizierten Zellen verwendet.

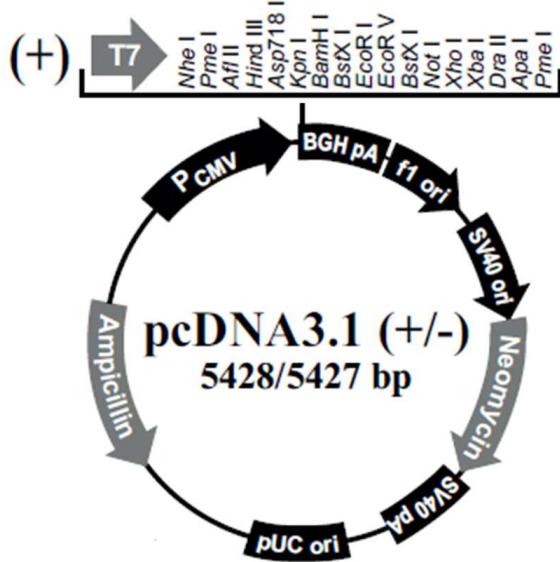


Abb. 3: Vektorkarte des Plasmids pcDNA3.1(+)

Die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten von HSP27 wurden ebenfalls über den Vektor pcDNA3.1 unter der Kontrolle des CMV-Promoters exprimiert. Verglichen wurden HSP27 Wildtyp (hu) oder Mutanten, bei denen Serin 15, 78 und 82 entweder durch Alanin (3A) oder durch Aspartat (3D) ersetzt wurden. Die Mutante 3A stellt die nicht-phosphorylierbare Form von HSP27 dar, während die negativ-geladenen Aspartat-Ketten in der 3D-Mutante eine dauerhaft phosphorylierte Form von HSP27 imitieren [137, 138]. Die Alanin- und Aspartat-Reste wurden durch direkte Mutagenese der Oligonukleotide erzeugt [139]. Diese Plasmide wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. Lee Weber (University of Nevada, Reno) zur Verfügung gestellt. Um eine Kontrollzelllinie zu erzeugen, wurden die Zellen mit dem unveränderten pcDNA3.1-Vektor transfiziert (empty vector, EV).

2.1.9 Zelllinien

Folgende humane Pankreaskarzinomzelllinien wurden verwendet: AsPC-1; BxPC-3; Capan-1; Capan-2; CFPAC-1; MIA PaCa-2; Panc-1; PL5; PL11; Su.86.86.

Die Zellenlinien PL5 und PL11 wurden dankenswerterweise von S.E. Kern (Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland) zur Verfügung gestellt. Die verbleibenden Zelllinien wurden entweder von der „European Collection of Cell Cultures“ (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) oder der „American Type Culture Collection“ (LGC Standards, Wesel) erworben.

Zusätzlich wurde eine kurzzeit-kultivierte Primärtumorzelllinie aus einem humanen Pankreaskarzinom (PPC) verwendet. Diese wenig passagierte Zelllinie entspricht besser als langzeitkultivierte, etablierte Pankreaskarzinomzelllinien den Tumorzellen im menschlichen

Körper. Die Gewinnung dieser Zellen aus Pankreaskarzinomgewebe wurde im eigenen Labor etabliert.

2.1.10 Software

1. ImageJ: plattformunabhängiges Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm, Entwickler: Wayne Rasband und weitere Mitarbeiter des National Institutes of Health [140].

2. AxiovisionSoftware 3.1: Analyseprogramm für Immunfluoreszenzmikroskopie, Hersteller: Carl Zeiss AG (Jena)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in DMEM (10 % FCS v/v; 100 U/ml Penicillin; 100 µl/ml Streptomycin (P/S)) kultiviert.

Bei Erreichen von ca. 95 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Zum Passagieren wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA überschichtet. Sobald sich die Zellen vom Boden der Petrischale abgelöst hatten, wurden sie in Medium aufgenommen und in ein Reagenzgefäß überführt. Das Medium wurde bei 1.200 U/min für 5 min abzentrifugiert und die Zellen in neuem Medium resuspendiert. Anschließend standen die Zellen für Versuche zur Verfügung oder wurden in der gewünschten Menge wieder in Petrischalen ausplattiert und das Medium auf 10 ml ergänzt.

2.2.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in Medium + 5 % DMSO v/v in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem Flüssigstickstoff in ein Wasserbad bei 37°C überführt und erwärmt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Einfriermedium in ein Reagenzgefäß mit 5 ml DMEM unter sterilen Bedingungen überführt. Die Zellen wurden bei 1.200 U/min für 2 min abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale ausplattiert. Nach dem Adhärieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und neues Medium auf die Zellen gegeben.

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren in der adäquaten Menge Medium + 5 % DMSO v/v aufgenommen und in Einfrierröhrchen verteilt. Anschließend wurden die Zellen bei - 80°C um 1°C pro min abgekühlt und zum Lagern in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.2 Zellzählung

Die Zellen wurden wie oben beschrieben von der Petrischale gelöst, zentrifugiert und in Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie in einer 96-Wellplatte mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt, zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer gegeben und für kurze Zeit inkubiert. Anschließend wurden 4 Großquadrate ausgezählt. Tote Zellen wurden durch die Trypanblaufärbung identifiziert und von der Zählung ausgeschlossen. Die Ergebnisse wurden gemittelt und die Zellzahl pro Mikroliter daraus wie folgt berechnet:

Zellen / μl = Mittelwert aus den Großquadraten x 2 (aus der Verdünnung mit Trypanblau) x 10 (aus dem Volumen der Zählkammer)

2.2.1.3 Herstellung von Zelllysaten

2.2.1.3.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten für Westernblot

Zur Herstellung der Lysate für Westernblots wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet oder abgeschabt, anschließend mit PBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (1200 U/min für 2 min). Der PBS-Puffer wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 100 μl RIPA-Puffer + 1 μl Proteinase-Inhibitor-Cocktail durch kurzes Vortexen aufgelöst. Die Lösung wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Um die Viskosität zu verringern, wurden 0,5 μl Benzonase pro Lysat hinzugegeben und durch kurzes Vortexen in der Probe verteilt. Die Benzonase ist eine rekombinante Endonuklease, die sowohl doppelsträngige als auch einzelsträngige RNS und DNS spaltet. Durch die DNS-Degradation wird die Viskosität der Proben herabgesetzt. Nach 10 min Inkubation wurden die restlichen Zelltrümmer abzentrifugiert.

Ripa-Puffer:	150 mM	NaCl
	1 %	IPEGAL
	0,1 %	SDS
	50 mM	TRIS

2.2.1.3.2 Trennung der Zellkompartimente mittels Extraktion-Lysaten

PL5-Zellen wurden in 6-Wellplatten ausgesät und am folgenden Tag bei 80 % Konfluenz mit Gemcitabin behandelt (0 nM, 3 nM, 6 nM). Die Behandlungszeit betrug 24 h. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Krebs-Henseleit-Puffer (4°C) gewaschen. Pro Well wurde dann 200 μl Lysispuffer zugegeben, die Proben kurz auf Eis inkubiert und anschließend die Zellen in dem Lysispuffer vorsichtig mit einem Zellkratzer abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Der erste Zentrifugierschritt trennt die nukleäre Fraktion (Pellet) vom Überstand. Dieser wurde bei 1.000 g und 4°C für 5 min ausgeführt. Das Pellet wurde für die spätere Weiterverarbeitung bei - 20°C aufbewahrt.

Der Überstand wurde im zweiten Zentrifugierschritt weiter aufgetrennt. Dazu wurde der Überstand in ein spezielles Ultrazentrifugenrörchen überführt und in einer Ultrazentrifuge bei 100.000 g und RT für 8 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugierung befindet sich die triton-lösliche Phase (membrangebundene HSP27-Fraktion) oben und die triton-unlösliche

Phase (lösliches HSP27-Fraktion) unten. Die obere Phase konnte mit einer Pipette von der unteren Phase abgehoben werden.

Anschließend wurde die Probe mit der triton-löslichen Phase wie die Zelllysate für den Westernblot weiterverarbeitet. Die nukleäre Phase und die triton-unlösliche Phase wurden in adäquater Menge mit Lämmlip-Puffer vermischt, durch Erhitzen auf 95°C für 5 min denaturiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gestellt.

Anschließend wurden alle Proben wie oben beschrieben durch Westernblot analysiert.

Krebs-Henseleit-Puffer:	110 mM	NaCl
	2,6 mM	KCl
	1,2 mM	H ₂ PO ₄
	1,2 mM	MgSO ₄
	11 mM	Glukose
	10 mM	HEPES
	pH 7,4	
Lysispuffer:	10 mM	TRIS
	250 mM	Saccharose
	0,1 mM	PMSF in Methanol
	1 µM	Leupeptin
	1 %	Triton X-100 w/w

2.2.2 Behandlung von Zellen mit verschiedenen Therapieverfahren

2.2.2.1 Zellbehandlung mit diversen Chemotherapeutika für Westernblot

Die Zellen wurden in 6-Wellplatten ausgesät (1,5 ml Medium) und am folgenden Tag bei einer Konfluenz von ca. 80 % mit Chemotherapeutika behandelt.

Paclitaxel:	1 nM und 2 nM
Gemcitabin	3 nM und 6 nM

Die Behandlungszeit betrug jeweils 24 h. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Westernblot analysiert oder für die Immunfluoreszmikroskopie weiterverarbeitet.

2.2.2.2 Behandlung der Zellen mit Chemotherapie und Chemosensitivitätsmessung mittels Zellproliferationstest

Die Konzentration der jeweiligen Chemotherapeutika wurde in Vorversuchen ermittelt und so gewählt, dass der Überlebensbereich zwischen 0 % und 100 % abgedeckt war.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet, gezählt und 800 – 1500 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Dabei wurden die Wells am Rand der Platte nicht verwendet, um ungenaue Messwerte auf Grund der stärkeren Evaporation in diesem Bereich zu vermeiden. Die Zellen wurden in 100 µl Medium für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in aufsteigender Konzentration mit Chemotherapeutika (Gemcitabin/Paclitaxel/5-Fluorouracil/Cisplatin) behandelt.

Chemo-therapeutikum	1. Reihe	2. Reihe	3. Reihe	4. Reihe	5. Reihe	6. Reihe	7. Reihe	8. Reihe	
Gemcitabin	0	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	[nM]
Paclitaxel	0	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	100	[nM]
5-Fluorouracil	0	0,41	1,23	3,70	11,1	33,3	100	300	[µM]
Cisplatin	0	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,5	5	[µM]

Tab. 4: Schema der Behandlung mit Chemotherapeutika und deren Konzentrationen

Nach 6 Tagen kontinuierlicher Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl H₂O pro Well lysiert. Danach wurde SYBR Green in einer Endkonzentration von 0,5 % hinzugefügt. SYBR Green interkaliert mit doppelsträngiger DNS. Die gemessene Fluoreszenz entspricht der Menge an DNS in der Probe und diese wiederum korreliert direkt mit der Anzahl der lebendigen Zellen vor der Lyse. Das Extinktionsmaximum des SYBR Green/DNS-Komplexes liegt bei 485 nm, das Emissionsmaximum bei 535 nm. Die Fluoreszenz wurde gemessen und die Messwerte mit denen der unbehandelten Kontrollen verglichen. Jeder Datenpunkt berechnet sich aus einem Triplikat. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler von je drei Experimenten.

Vor jedem Experiment wurde die HSP27-Expression der verwendeten Zellen quantitativ mittels Westernblot nachgewiesen.

Als Vergleichszellen für die Versuche wurden entweder die parietale polyklonale Population der PL5-Zellen oder monoklonale Leervektor-Zellklone herangezogen.

Zur Klonierung der Leervektor-Zellen wurden die parietalen Zellen mit dem unveränderten pcDNA3.1-Vektor transfiziert, selektiert und zu Einzelzellklonen herangezogen. Dabei wurden monoklonale Zellpopulationen verwendet, um eine klonale Variabilität auszuschließen. Ein Leervektor wurde transfiziert, um Artefakte auszuschließen, die allein durch die Transfektion des pcDNA3.1-Plasmides entstehen.

In den Experimenten, die mit beiden Kontrollzellverfahren durchgeführt wurden, verhielten sich die klonal expandierten Zellen genauso wie die parietalen Kontrollzellen.

2.2.2.3 Behandlung der Zellen mit γ -Strahlung und Messung der Radiosensitivität mittels Koloniebildungstest

Die PL5-Zellen wurden gezählt und entsprechend ihrer Strahlungssensitivität, welche in Vorversuchen ermittelt wurde, in adäquater Menge ausgesät. Dabei betrug die Zellzahl pro 6-Well zwischen 20 und 100 Zellen bei 0 Gy, 100 und 300 bei 2 Gy, 2000 und 5000 bei 4 Gy, 5000 und 15000 bei 6 Gy, 50.000 und 100.000 bei 8 Gy. Nach 24 h wurden die Zellen mit ^{137}C -Gamma-Strahlung (Dosis: 0,604 Gy/min) behandelt und dann für 12 Tage im Inkubator kultiviert. Während dieser Zeit wurde das Medium gewechselt, sobald sich eine Verfärbung und damit eine Änderung des pH-Wertes zeigte. Zur Auswertung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Crystal Violet Lösung bedeckt. Nach 15 min wurde die Lösung abgesaugt und die Platten vorsichtig mit Leitungswasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Platten, wurden die Kolonien gezählt. Alle Variationen der Zellzahl und Bestrahlungsintensität wurden im Duplikat durchgeführt und gemittelt. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Crystal Violet-Lösung:	0,1 g	Crystal Violet
	100 ml	H_2O
	10 %	Formaldehyd

2.2.2.4 Behandlung der Zellen mit Hitzeschock

PL5-Zellen, PL11-Zellen und die neu etablierte Zelllinie aus einem primärem Pankreaskarzinom (PPC) wurden in T10-Zellkulturflaschen ausgesät. Nachdem die Zellen ca. 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurden die Flaschen luftdicht verschlossen und die Zellen der Pankreaskarzinomzelllinien für 1 h, die PPC für 2 h in einem Wasserbad bei 39°C oder 41°C inkubiert. Die Kontrollzellen wurden keinem Hitzeschock unterzogen und währenddessen im Inkubator bei 37°C belassen. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für weitere 3 h, 6 h oder 9 h im Inkubator belassen. Anschließend wurden die Zellen geerntet, wie oben beschrieben lysiert und mittels Westernblot die HSP27- und die phospho-HSP27-Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.3 Plasmidamplifikation und -präparation

Zur Replikation der Plasmidkonstrukte wurden diese in Bakterien transformiert, dort vermehrt und anschließend mittels Maxipräparation aufgereinigt.

2.2.3.1 Transformation von kompetenten Bakterien

E.coli DB3.1 λ pir wurden nach der Methode von Mandel und Higa durch Behandlung mit eiskalter CaCl_2 -Lösung chemisch kompetent gemacht [141]. Erfolgreich transformierte Bakterien wurden mittels der durch das Plasmid übertragenen Resistenz selektiert.

500 µl kompetente DB3.1λpir Bakterien wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. Direkt nach dem Auftauen wurde 1 µg Plasmid in die Bakterienlösung gegeben. Während des gesamten Prozesses wurde eine Kontrolle ohne DNS mitgeführt, um eine Kontamination ausschließen zu können. Die Bakterien wurden dann für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock ausgesetzt. Dazu wurden sie für 1 min in einem Wasserbad bei 42°C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Dann wurde zu jeder Probe 500 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien für 1 h unter kontinuierlichem Schütteln bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien auf eine Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht in einen Inkubator bei 37°C gestellt.

SOC-Medium:	5 % w/v	Hefeextrakt
	2 % w/v	Trypton
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	20 mM	Glukose
	10 mM	MgCl \ wurde erst nach dem
	10 mM	MgSO ₄ / Autoklavieren hinzugegeben

2.2.3.2 Amplifikation

Am nächsten Tag wurde die Vorkultur unter sterilen Bedingungen mit einer der Kolonien von der Agarplatte angeimpft. Die Vorkultur enthielt 5 ml LB-Medium (aus LB Base powder nach Angaben des Herstellers) und Ampicillin (100 µg/ml) und wurde über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur in eine Hauptkultur mit 400 ml LB-Medium und Ampicillin (100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert.

2.2.3.3 Plasmidisolierung aus Bakterien

Zur Isolation der Plasmide aus DB3.1λpir Bakterien wurde eine Methode, basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Anlehnung an Birnboim und Doly 1979, durchgeführt [142].

Die Bakterien wurden in einer Kühlzentrifuge bei 5.000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 12,5 ml GTE-Puffer resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren wurden nun 25 ml NaOH/SDS-Lösung dazugegeben. Zum Ausfällen des SDS wurde 12,5 ml KAc/HAc-Lösung zugegeben und dann die Probe für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 5.000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt. Nun wurde die DNS mittels Zugabe von 20 ml Isopropanol gevortext und durch anschließendes

Kühlen bei -20°C für 20 min, gefällt. Die Probe wurde dann bei 10.000 U/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4,5 ml TE-Puffer gelöst. Um die RNA aus der Probe zu entfernen, wurden 5 ml 5 M Lithiumchloridlösung zugegeben, die Probe gevortext und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Probe bei 10.000 U/min für 15 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Probe weiter aufzureinigen, wurde nun 20 ml 100 %iges Ethanol zugesetzt, das Ganze kurz gevortext, 10 min bei -20°C gekühlt und anschließend für 10 min bei 10.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit 5 ml Ethanol 70 % gewaschen. Nun wurde das Pellet getrocknet und dann in 0,8 - 1 ml TE-Puffer resuspendiert.

GTE-Puffer:	50 mM	Glukose
	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris-HCl
NaOH/SDS-Lösung:	1 %	SDS w/v
	0,2 M	NaOH
KAc/HAc-Lösung:	3 M	Kaliumacetat
	2 M	Essigsäure
TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM	EDTA

2.2.3.4 DNS-Quantifizierung und Qualitätsbestimmung

Die Bestimmung der DNS-Konzentration wurde mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vorgenommen. Eine Extinktion bei 260 nm von 1,0, bestimmt in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke, entspricht einer Konzentration an doppelsträngiger DNS von ca. 50 µg/ml. Durch Berechnung des Quotienten OD₂₆₀ / OD₂₈₀ wurde die Reinheit der Probe bestimmt. Reine DNS hat einen Extinktionsquotienten von 1,8. Durch Protein-Beimischung sinkt der Wert Richtung 0. RNS erhöht den Wert Richtung 2. Bei Werten, die mehr als ein Zehntel vom Sollwert abweichen, wurde die Probe erneut aufgereinigt.

2.2.3.5 DNS-Agarosegelektrophorese

DNS-Fragmente können entsprechend ihrer Größe in einer Agarosematrix im elektrischen Feld getrennt werden. Die durch das Zucker-Phosphat-Gerüst im basischen Milieu negativ geladene DNS wandert dabei in Richtung der Anode. Detaillierte Informationen zur Methode wurden aus Sambrook et al. entnommen [143].

Die DNS-Fragmente wurden in 1 %igem Agarose-Gel der Größe nach getrennt. Dem Gel wurde 0,003 % Ethidiumbromid zugefügt. 20 µl der DNS-Proben wurden mit 4 µl des 6-fach Ladebuffer verdünnt und in das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 100 V für ca. 30 min. Als Größenstandard wurde der O'Gene Ruler 1kb DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Anschließend konnten die DNS-Fragmente durch Anregung der Ethidiumbromidfluoreszenz mittels UV-Licht sichtbar gemacht und photographisch festgehalten werden.

TAE-Puffer:	40 mM	Tris-Base
	10 mM	EDTA
	1 %	Essigsäure v/vml

2.2.4 Transfektion

Wie in eigenen Vorversuchen bestätigt, zeigte die Transfektion mittels Polykationen (L-PEI 22 und Lipofectamin 2000) eine geringe Zellschädigung bei guter Transfektionseffizienz und wurde deshalb als Standardmethode gewählt. Diese wurde erstmals von Felgner et al. 1987 beschrieben und beruht auf der Bildung von DNS-Liposomen-Komplexen und deren Aufnahme in die Zellen durch Endozytose [144]. Die Weiterentwicklung dieses Prinzips ist die Transfektion mittels Polyethylenimin, das vor allem für die Anwendung *in vivo* entwickelt wurde, aber auch sehr gute Transfektionseigenschaften *in vitro* zeigt [145].

Für die Transfektion wurde L-PEI 22 verwendet. Dieses lineare Polyethylenimin hat eine hohe Spezifität für Tumorzellen bei der Transfektion *in vivo* [136]. Eine gute Transfektionseffizienz bestätigte sich in unseren *in vitro* Vorversuchen. Falls damit keine ausreichende Transfektionseffizienz zu erreichen war, wurde auf das zelltoxischere Lipofectamin 2000 zurückgegriffen.

2.2.4.1 Transiente Transfektion zur Transfektionsoptimierung

Die Zellen wurden in 12-Wellplatten ausgesät, sodass sie am folgenden Tag eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht hatten. 24 h nach dem Aussäen wurde das Medium der Zellen gewechselt (1 ml Medium pro Well) und die Zellen transfiziert.

Nach der Transfektion wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Um die Toxizität des Verfahrens zu beurteilen, wurden die Zellen anschließend weiter im Inkubator kultiviert und nach 72 h erneut unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.4.1.1 Transfektion mit L-PEI 22

2.2.4.1.1.1 Austestung des optimalen Puffers und der Transfektionszeit

Dazu wurde 1 µg DNS (EGFP) und 0,78 µg L-PEI 22 in jeweils 100 µl Puffer vorverdünnt und anschließend sofort durch auf- und abpipettieren miteinander vermischt. Um die Komplexbildung zwischen L-PEI 22 und der DNS zu fördern, wurde die Mischung anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Lösung tropfenweise unter Schwenken in das Medium gegeben. Die Transfektionszeit betrug 4 h oder 24 h.

Puffer: HBS-Puffer: 20 mM HEPES, 145 mM NaCl, pH 7,4

HBG-Puffer: 20 mM HEPES, 5 % Glukose w/v, pH 7,4

OptiMem

2.2.4.1.1.2 DNS-Konzentrationsbestimmung

Dazu wurden 1 µg, 2 µg oder 3 µg DNS (eGFP) und die jeweils adäquate Menge L-PEI 22 (0,78 µg, 1,56 µg, 2,34 µg) in jeweils 100 µl HBS-Puffer verdünnt und anschließend sofort durch Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt. Um die Komplexbildung zwischen L-PEI 22 und der DNS zu fördern, wurde die Mischung anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Lösung tropfenweise in das Medium gegeben. Die Transfektionszeit betrug 4 h.

2.2.4.1.2 Transfektion mit Lipofectamin 2000

Zur Transfektion mit Lipofectamin 2000 wurde Medium ohne P/S verwendet. Die 2 µg DNS und 2 µg, 4 µg, 6 µg, oder 8 µg Lipofectamin wurden in je 100 µl OptiMem verdünnt, anschließend durch auf- und abpipettieren vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Lösung tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach einer Transfektionszeit von 4 h wurde das Medium (+P/S) gewechselt.

2.2.4.2 Stabile Transfektion

2.2.4.2.1 Austesten der Dosis-Letalitäts-Kurve für Genitcin

Um während der Selektion die Toxizität für die Zellen durch Genitcin zu minimieren, wurde vor der stabilen Transfektion die minimalnotwendige Konzentration von Genitcin, bei der nicht-resistente Zellen sterben, ermittelt.

Dazu wurden die Zellen in 6-Wellplatten (2 ml Medium pro Well) 70 % konfluent ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und aufsteigende Konzentrationen Genitcin (200, 400, 600, 800 und 1000 µg/ml) zugegeben. Über 14 Tage

wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop analysiert. Für die Selektion wurde die niedrigste Konzentration gewählt, bei der alle Zellen gestorben waren.

2.2.4.2.2 Vorgehen bei der stabilen Transfektion

Die Zellen wurden in einer Zellkulturschale in einer Konfluenz von ca. 50 % ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium der Zellen gewechselt und die Zellen transfiziert.

Dazu wurden für die PL5 und die Panc-1 Zellen 24 µg DNS und 18,72 µg L-PEI 22 in jeweils 1,5 ml HBS-Puffer verdünnt und anschließend sofort durch auf- und abpipettieren miteinander vermischt. Um die Komplexbildung zwischen L-PEI 22 und der DNS zu fördern, wurde die Mischung anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Lösung tropfenweise in das Medium gegeben.

Die SU.86.86-Zellen wurden mit Lipofectamin 2000 transfiziert. Dazu wurde das Medium direkt vor der Transfektion gewechselt und Medium ohne P/S verwendet. 24 µg DNS und 48 µg Lipofectamin wurden in je 1,5 ml OptiMem vorverdünnt, anschließend durch auf- und abpipettieren vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Lösung tropfenweise zu den Zellen gegeben.

Die Transfektionszeit betrug bei allen Zelllinien 4 h. Nach dieser Zeit wurde das Medium (+ P/S) gewechselt. 24 h nach der Transfektion wurden 0,4 bzw. 0,6 mg/ml Geniticide als Selektionslösung hinzugegeben und die Zellen unter ständiger Selektion für 4 Wochen kultiviert.

2.2.4.3 Generieren von Einzelzellklonen mittels Endpunkt titration

Zur Generierung von Einzelzellklonen wurden die stabil-transfizierten Zellen aufgenommen und gezählt, auf eine Dichte von 15, 5 und 1,5 Zellen pro ml verdünnt und je 200 µl pro Well in einer 96-Wellplatte ausplattiert. Nach einer Woche wurden die Platten lichtmikroskopisch evaluiert. Nach weiteren zwei Wochen konnten die Einzelklone identifiziert, in größere Kulturschalen überführt und im Folgenden analysiert und eingefroren werden.

Die Testung der Zellen auf HSP27-Expression erfolgte mittels Westernblot. Die Klone mit der stärksten Expression von HSP27 hu, 3A und 3D und die Kontrollzellen wurden entsprechend benannt (PL5/hu16, hu18, hu20, PL5/3A, PL5/3D und PL5/EV) und für die weiteren Versuche verwendet.

Die Zellen wurden am Anfang kontinuierlich, später intermittierend unter Selektion mit 0,4 mg/ml bzw. 0,6 mg/ml Geniticide gehalten. Beim Auftauen und Einfrieren wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

2.2.5 Proteinchemische Methoden

2.2.5.1 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinmenge in Zelllysaten wurde mittels der Bradford-Methode photometrisch bestimmt [146]. Dieses Verfahren beruht auf dem Farbstoff CBBG, der in saurer Lösung mit unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Die ungebundene Form des Farbstoffes hat bei der photometrischen Bestimmung ein Absorptionsmaximum von 470 nm. Durch die Komplexbildung verschiebt sich dieses Absorptionsmaximum auf 595 nm. Diese Verschiebung des Absorptionsmaximums wurde zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge genutzt.

Die Kalibriergerade wurde mit definierten BSA-Standards (0,2 – 0,8 mg/ml) angefertigt. Die Proteinlysate wurden vor der Messung 1:10 in H₂O verdünnt. Anschließend wurden 10 µl der Proteinlösung mit 990 µl Bradford-Reagenz versetzt, 10 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen.

2.2.5.2 SDS-PAGE

Die Methode der SDS-PAGE erlaubt die Trennung der Proteine nach Größe. Dazu werden die sekundären Proteinstrukturen durch Erhitzen unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen aufgebrochen. Die so linearisierten Proteine werden mit SDS beladen, wobei eine zur Molekülgröße proportionale negative Ladung entsteht. Diese können dann mittels Elektrophorese in der Gelmatrix getrennt werden, da sie in Richtung der positiven Ladung wandern. Dabei richtet sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine vor allem nach der Dichte der Gelmatrix. Bei dieser Methode werden Polyacrylamid-Gele verwendet.

Um die Proben für die Gelelektrophorese vorzubereiten, wurde die Proteinmenge auf 1 mg/ml eingestellt. Die Denaturierung der Proteine und die Auftrennung der Disulfidbrücken erfolgten nach der Methode von Laemmli [147]. Dazu wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt und anschließend auf 95°C für 5 min erhitzt und auf Eis wieder abgekühlt.

Laemmli-Puffer:	2,5 ml 0,5 M Tris-Base pH 6,8
	2,5 ml 2-Mercaptoethanol
1 g	SDS
5 ml	Glycerol
10 mg	Bromphenolblau
	auf 10 ml mit H ₂ O auffüllen

Bei der Herstellung der SDS-PAGE-Gele wurde wie folgt vorgegangen:

Es wurde das SDS-PAGE-System von BioRad verwendet und die Gelkassette nach Angaben des Herstellers staubfrei zusammengebaut. Dann wurde die Trengellösung vorbereitet.

Für ein 10 %iges Trengel wurden 3,25 ml Trengelpuffer + 1,7 ml Acrylamid / Bisacrylamid-Mix + 50 µl 10 % APS + 10 µl TEMED in einem Reagenzgefäß vermischt. Auf Grund der Bildung freier Radikale von APS in wässriger Lösung wird durch dessen Zugabe die Vernetzungsreaktion gestartet. Die Reaktion wird durch den Zusatz von TEMED katalysiert. Die Trengellösung wurde blasenfrei bis zur gewünschten Höhe zwischen die Glasscheiben der Elektrophoreseapparatur gegossen und mit Methanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte für etwa 1 h bei RT. Nach Erstarren des Trengels wurde das Methanol abgesaugt und das Sammelgel darüber gegossen. Dazu wurden 1,6 ml Sammelgelpuffer + 335 µl Acrylamid/Bisacrylamid-Mix + 20 µl APS + 3 µl TEMED vermischt, blasenfrei in die Kassette gegossen und nach Einsetzen des Kamms die Polymerisation abgewartet.

Trenngelpuffer:

90,8 g	TRIS Base
1 g	SDS
auf 500 ml mit H ₂ O auffüllen	
pH 8,8	

Sammelgelpuffer:

45,4 g	TRIS Base
1 g	SDS
auf 250 ml mit H ₂ O auffüllen	
pH 6,8	

Die SDS-PAGE wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Laupuffer gefüllt. Auf jede Probentasche wurde die gleiche Menge Protein (5 mg) der verschiedenen Proben aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde eine Spannung mit 100 V für 15 min angelegt und anschließend auf 200 V für 45 min erhöht. Als Größenmarker wurden 3 µl Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad, München) verwendet.

10x SDS-Laupuffer-Stammlösung:

30,3 g	TRIS Base
144,1 g	Glycin
10 g	SDS
auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen	

Für SDS-Laupuffer die Stammlösung 1:10 mit H₂O verdünnen.

2.2.5.3 Westernblot

Die Methode des Westernblot wurde 1979 von Towbin et al. eingeführt [148]. Bei dieser Methode werden zuvor in einem Gel aufgetrennte Proteine entweder über Kapillartransfer oder über Elektrotransfer auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert, um bestimmte Proteine mittels Immundetektion in den Proben nachweisen zu können.

Zum Übertragen der Proteine aus der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran wurde die „semi-dry-blot“-Methode gewählt [149]. Die Membran wurde in Methanol aktiviert, mit H₂O gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die PVDF-Membran luftblasenfrei auf die SDS-PAGE gelegt und in transferpuffergetränktes Whatman-Papier eingebettet (s. Abb. 3). Es wurde für 45 min eine Stromstärke von 50 mA pro Membran angelegt.

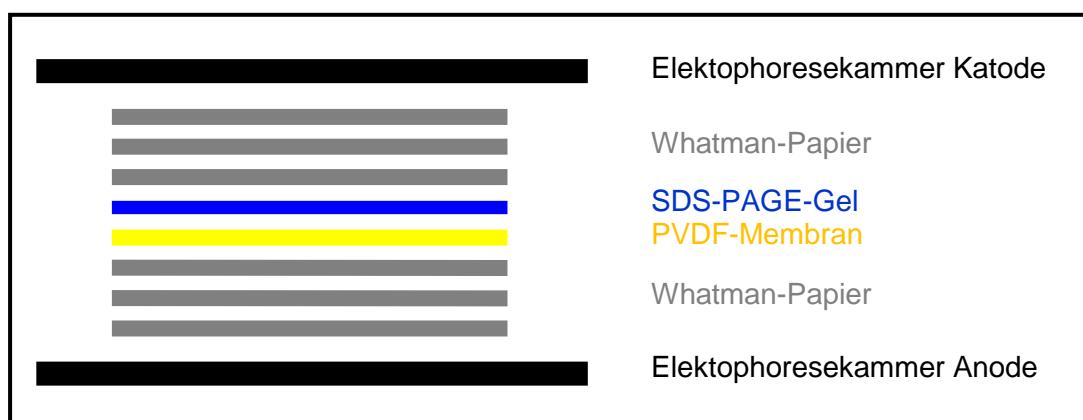


Abb. 3: Aufbau des semi-dry-Blots

Aufbau von Anode zu Katode: 3 Lagen Transferpuffer getränktes Whatman-Papier, SDS-PAGE-Gel, kalibrierte PVDF-Membran, 3 Lagen Transferpuffer getränktes Whatman-Papier

Transferpuffer-Puffer:	10 ml	Transferpuffer-Stammlösung
	20 ml	Methanol
	70 ml	H ₂ O

Transferpuffer-Stammlösung:	30,0 g	TRIS Base
	144,1 g	Glycin
	30 g	SDS
auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen		

2.2.5.4 Immundetektion und Auswertung

Der Nachweis der Proteine erfolgte über die spezifische Antikörper-Epitop-Bindung des Primärantikörpers mit dem Protein. Anschließend wird der Primärantikörper mit einem Sekundärantikörper auf der Membran lokalisiert. An diesen Sekundärantikörper ist ein Reporter gekoppelt, welcher die Detektion des primären Antikörpers erlaubt und die Signalstärke amplifiziert. Der Nachweis des Antikörperkomplexes auf der Membran erfolgt durch die lokale Umsetzung eines Substrates durch die Reporterenzyme, welche mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann.

Wenn nicht gesondert aufgeführt, wurden alle Schritte bei RT unter ständigem Schütteln durchgeführt.

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran für 30 min in Blockierlösung inkubiert, um ein Binden der Antikörper direkt auf der Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran mit den primären Antikörpern (verdünnt in Blockierlösung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend die sekundären Antikörper (verdünnt in Blockierlösung) hinzugegeben und die Membran darin für 1,5 h inkubiert. Vor dem Auswerten wurde die Membran gründlich mit TBST-Puffer gewaschen.

Zur Detektion wurde das ECL-System nach Angaben des Herstellers verwendet. Durch die chemolumineszente Reaktion wurde ein Röntgenfilm belichtet, sodass die Banden dargestellt werden konnten. Die so erhaltenen Bilder wurden mit ImageJ quantitativ analysiert.

Zum Nachweis von p-HSP27 wurde ein Antikörper gegen HSP27 mit einer Phosphorylierung an Position Serin 78 verwendet. Um die HSP27 und die p-HSP27-Expression in Bezug zur Gesamtproteinmenge der Zellen setzen zu können, wurde für alle Proben in demselben Blot zusätzlich β-Actin nachgewiesen.

Blockierlösung:	2 %	Milchpulver in TBST-Puffer
TBST-Puffer:	2,41 g	TRIS Base
	8,0 g	NaCl
	auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen	
	pH 7,6	
	1 ml Tween 20	

2.2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden in 6-Wellplatten auf mit UV-Licht sterilisierten Deckgläschchen ausgesät. Nachdem sie ca. 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit Gemcitabin (0 nM, 3 nM, 6 nM) für 24 h behandelt.

Für die Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, anschließend mit Fixierlösung überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert. Die Fixierlösung wurde anschließend abgesaugt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen.

Die Zellen wurden nun für 5 min mit Permeabilisierungslösung überschichtet und anschließend mit Blockierlösung für 20 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Probe mit Phalloidin-Lösung überschichtet und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Alle danach durchgeführten Inkubationsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt.

Die Probe wurde mit PBS gewaschen und für 10 min mit Permeabilisierungslösung 2 (PL 2) behandelt. Zum Blocken für die Immunfärbung wurde die Probe mit Blockierlösung 2 für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in Blockierlösung 2 zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe mit PBS gewaschen, mit dem Sekundärantikörper in Blockierlösung überschichtet und für 2 h bei RT inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschritt mit PL 2, wurde die DNS der Zellkerne mit Hoechst 33342 eingefärbt. Dazu wurde 0,1 % Hoechst 33342 in PL 2 gelöst, auf die Zellen gegeben und 5 min inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit PL 2 gewaschen, mit Vectashield bedeckt und auf Objektträgern fixiert. Die Zellen wurden dann mit dem Fluoreszenz-Mikroskop und der Axiovision-Software analysiert. Dabei wurden die Bilder in drei Frequenzbereichen aufgenommen.

Farbstoff	gebunden an	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Farbe
Alexa 488	Sekundärantikörper	495	519	grün
Hoechst 33342		350	461	blau
Alexa 546	Phalloidin	556	573	gelb

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Farbstoffe und deren Spezifikationen

Die Bilder wurden mit der Axio Cam MRM aufgenommen. Die Belichtungszeit und die Software-Einstellungen wurden für alle Aufnahmen eines Experiments konstant gehalten.

Fixierlösung:	3,7 % Formaldehyd-Lösung in PBS (methanolfrei)
Permeabilisierungslösung:	0,1 % Triton X-100 in PBS
Blockierlösung:	1 % BSA in PBS
Phalloidin-Lösung:	Rhodamin-Phalloidin 5 U/ml in 1 % BSA in PBS
Permeabilisierungslösung 2 (PL 2):	0,5 % Triton X-100 in TBS
Blockierlösung 2:	2 % BSA in TBS-Triton X-100

3 Ergebnisse

3.1 Quantitative und qualitative Expression von HSP27 und p-HSP27 in Pankreaskarzinomzelllinien

Frühere Studien in multiplen Tumorentitäten berichten von differentieller HSP27-Expression zwischen Karzinomgeweben und Normalgewebe. Dabei zeigte sich in einigen Tumorentitäten eine Überexpression von HSP27 und phospho-HSP27 im Vergleich zum Normalgewebe [122, 125]. Allerdings liegen noch keine hinreichenden Daten zur HSP27-Expression im Pankreasgewebe und im Pankreaskarzinom vor. Deshalb wurde die Proteinexpression und Verteilung von HSP27 und p-HSP27 in einem Panel etablierter Pankreaskarzinomlinien betrachtet. Dabei wurden sowohl die quantitative Expression mittels Westernblot sowie die qualitative Expression und die räumliche Verteilung mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

3.1.1 **Western Blotting zum quantitativen Nachweis von HSP27- und p-HSP27 in Pankreaskarzinomlinien**

Die quantitative Proteinexpression von HSP27 und p-HSP27 wurde mittels Westernblot bestimmt. Für alle Westernblots diente β -Actin als Ladekontrolle.

Alle Zelllinien exprimierten HSP27 konstitutiv. Allerdings zeigte sich zwischen den verschiedenen Zelllinien eine unterschiedliche HSP27-Expression. Eine geringe konstitutive Expression von HSP27 zeigten die Zelllinien PL5, PL11 und CFPAC-1. Die Zelllinien Capan-1, Capan-2, AsPC-1, MIA PaCa-2 und BxPC-3 zeigten eine hohe konstitutive Expression von HSP27, während Panc-1 und Su.86.86 eine mittelstarke Expression zeigten (Abb. 4).

Im Gegensatz zur konstitutiven Expression von HSP27 in allen untersuchten Zelllinien wurde p-HSP27 nur von Capan-1 und Capan-2 konstitutiv exprimiert (Abb. 4).

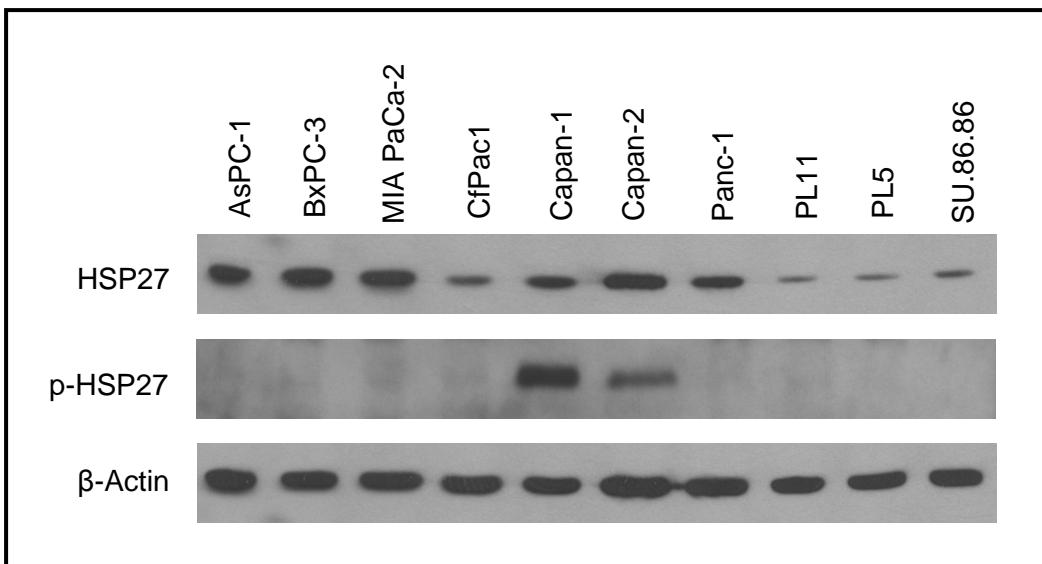


Abb. 4: Quantifizierung der (p-)HSP27-Expression in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien, Repräsentative Ergebnisse eines Experiments ($n=3$)

Zum Ausschluss potentieller Artefakte im Rahmen der Zellkultur wie Kulturbedingungen, Zellzyklusphasen und Splitting wurde das Experiment viermal zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt.

Wie bereits beschrieben, stellt eine hohe Konfluenz Zellstress dar und kann zu einer höheren Expression von HSPs führen [150]. Entsprechend wurde die HSP27 Expression zwischen 100% konfluenten und nicht konfluenten Linien verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die beobachtete unterschiedliche HSP27- und p-HSP27-Expression in den verschiedenen getesteten Linien nicht auf Konfluenz-Unterschiede zurückzuführen war (Abb. 5).

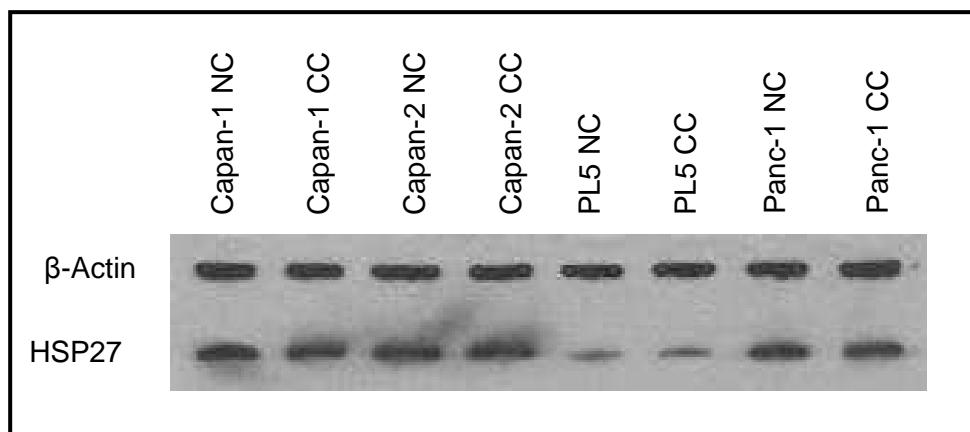


Abb. 5: Quantitative Messung der HSP27-Expression in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien im konfluenten (CC) und nicht-konfluenten (NC) Zustand, Repräsentative Ergebnisse eines Experiments ($n=3$).

3.1.2 Immunfluoreszenz zum Nachweis der räumlichen Verteilung von Gesamt-HSP27 und p-HSP27 in Pankreaskarzinomzelllinien

Zum besseren Verständnis der Rolle und Funktion von HSP27 wurde die intrazelluläre Verteilung und Phosphorylierung dieser Proteine mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie in den Pankreaskarzinomzelllinien MIA PaCa-2, Capan-1, Capan-2, Panc-1 und PL5 näher untersucht. Dazu wurden die Zellen fixiert und HSP27 oder p-HSP27 mittels entsprechender Antikörper durch Immunfluoreszenz detektiert. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit Hoechst 33342 angefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop analysiert und repräsentative Bilder aufgenommen.

Alle Zellen zeigten eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation von HSP27, während p-HSP27 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden konnte. Zusätzlich war eine Akzentuierung des nukleären Expressionsmusters während der Mitose zu beobachten. Dieses Muster zeigte sich in allen Zelllinien (Abb. 6 und Daten nicht gezeigt).

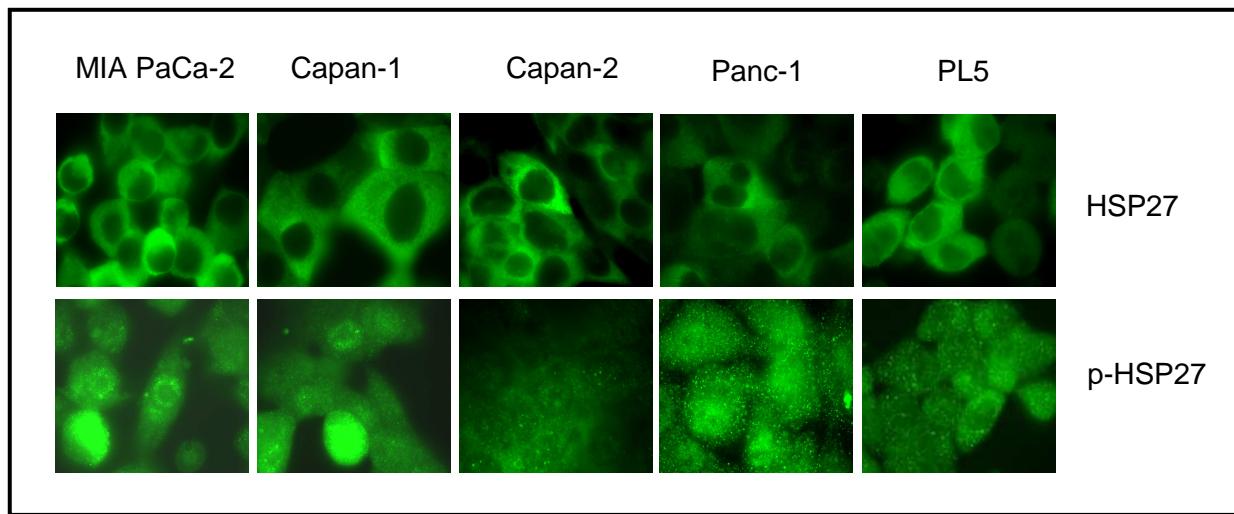


Abb. 6: IHC-Analyse des intrazellulären Verteilungsmusters von (p-)HSP27 in MIA PaCa-2, Capan-1, Capan-2, Panc-1, und PL5, Repräsentative Ergebnisse eines Experiments ($n=3$)

3.2 Etablierung stabil HSP27-transfizierter PL5-Zellklone

In Vorversuchen im nicht-isogenen Modell mit unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien konnten keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen HSP27-Expression und Chemosensitivität gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten bestätigten unsere Erwartung, dass die Expression von HSP27 und p-HSP27 nicht die Hauptdeterminante für das unterschiedliche Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika ist.

Um die multiplen molekularen Unterschiede zwischen den nicht-isogenen Zelllinien zu umgehen, wurde für die weiteren Versuche ein isogenes Zellmodell etabliert. Dieses bietet

den Vorteil, dass Zelllinien-spezifische Unterschiede minimiert werden. Dazu wurde mittels stabiler Transfektion eine Modellzelllinie erzeugt.

Das isogene Zellmodell wurde etabliert, indem das Gen für humanes HSP27 (hu-HSP27) oder eine mutierte Form des Gens stabil in die PL5-Zelllinie transfiziert wurde. In den mutierten Formen waren die Serin-Reste an den Positionen 15, 78 und 82 entweder zu Aspartat verändert, wodurch die pseudo-phosphorylierte Form von HSP27 entsteht, welche die aktivierte Form von HSP27 imitiert oder zu Alanin, wodurch eine nicht-phosphorylierbare und damit nicht aktivierbare Form von HSP27 entsteht. Die entsprechenden Plasmide wurden von Prof. Dr. Lee Weber (University of Nevada, Reno) zur Verfügung gestellt.

Für die stabile Transfektion wurden die Zelllinien PL5, Panc-1 und Su.86.86 ausgewählt, da diese eine relative niedrige konstitutive HSP27-Expression aufweisen (vgl. Abb. 4) und folglich zu erwarten war, dass durch die Überexpression der Transgene ein deutlicher Unterschied zu den nativen Zellen erzeugt werden kann. Außerdem zeigten diese Zelllinien in Vorversuchen eine gute Transfektionseffizienz.

3.2.1 Etablierung und Optimierung der Transfektionsbedingungen

In Vorversuchen wurden die Transfektionsbedingungen mittels transakter Transfektion des pEGFP-N1-Plasmides optimiert. Dieses Plasmid enthält ein Gen, welches für eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) kodiert und unter der Kontrolle des CMV-Promoters konstitutiv exprimiert wird. Das Protein emittiert grünes Licht in einer Wellenlänge von 509 nm, wenn es mit einer Wellenlänge von 488 nm optisch angeregt wird, und ermöglicht dadurch eine Evaluation der Proteinexpression und dadurch mittelbar der Transfektionseffizienz.

	Transfektionsreagenz Konzentration	Transfektionspuffer	DNS- Konzentration	Transfektionszeit
PL5	L-PEI 22 1,56 µg/ml > 0,78 µg/ml	HBS > OptiMem > HBG	2 µg/ml > 1, 3, 4 µg/ml	4h = 24h
Panc-1	L-PEI 22 1,56 µg/ml	HBS = OptiMem > HBG	2 µg/ml	4h
Su.86.86	Lipofectamin 2000 4 µg/ml > 2, 5, 6, 8 µg/ml	Lipofectamin immer in OptiMem	2 µg/ml	4h

Tab. 6: Übersicht zur Austestung der optimalen Zelllinien-spezifischen Transfektionsbedingungen.

3.2.2 Zelllinien-spezifische Genitycin-Sensitivitätstestung

Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde die durch das pcDNA3.1-Plasmid vermittelte Neomycin-Genitycin-Resistenz genutzt. Dafür wurde in Vorversuchen die niedrigste nötige Genitycin-Konzentration zur sicheren Selektion der transfizierten Zellen ermittelt. Anschließend wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von Genitycin behandelt und über 14 Tage mittels Lichtmikroskop deren Viabilität beurteilt.

Folgende Konzentrationen wurden in zwei unabhängigen Versuchen als optimale Selektionskonzentrationen ermittelt:

PL5	400 µg/ml
Panc-1	600 µg/ml
Su.86.86	600 µg/ml

3.2.3 Stabile Transfektion und Selektion resistenter Klone

Die Zellen wurden nun in einer Zellkulturschale mit dem für die jeweilige Zelllinie etablierten Protokoll (s. Abschnitt 3.2.1) transfiziert und anschließend mit der jeweils benötigten Konzentration von Genitycin (s. Abschnitt 3.2.2) behandelt. Nach vier Wochen unter Selektion wurden die entstandenen Kolonien der stabilen Transfektanten gepoolt, auf HSP27-Expression getestet und für spätere Versuche eingefroren. Die gepoolten Populationen zeigten bei der Testung eine sehr unterschiedliche Expression von HSP27 (Abb. 7 (A)).

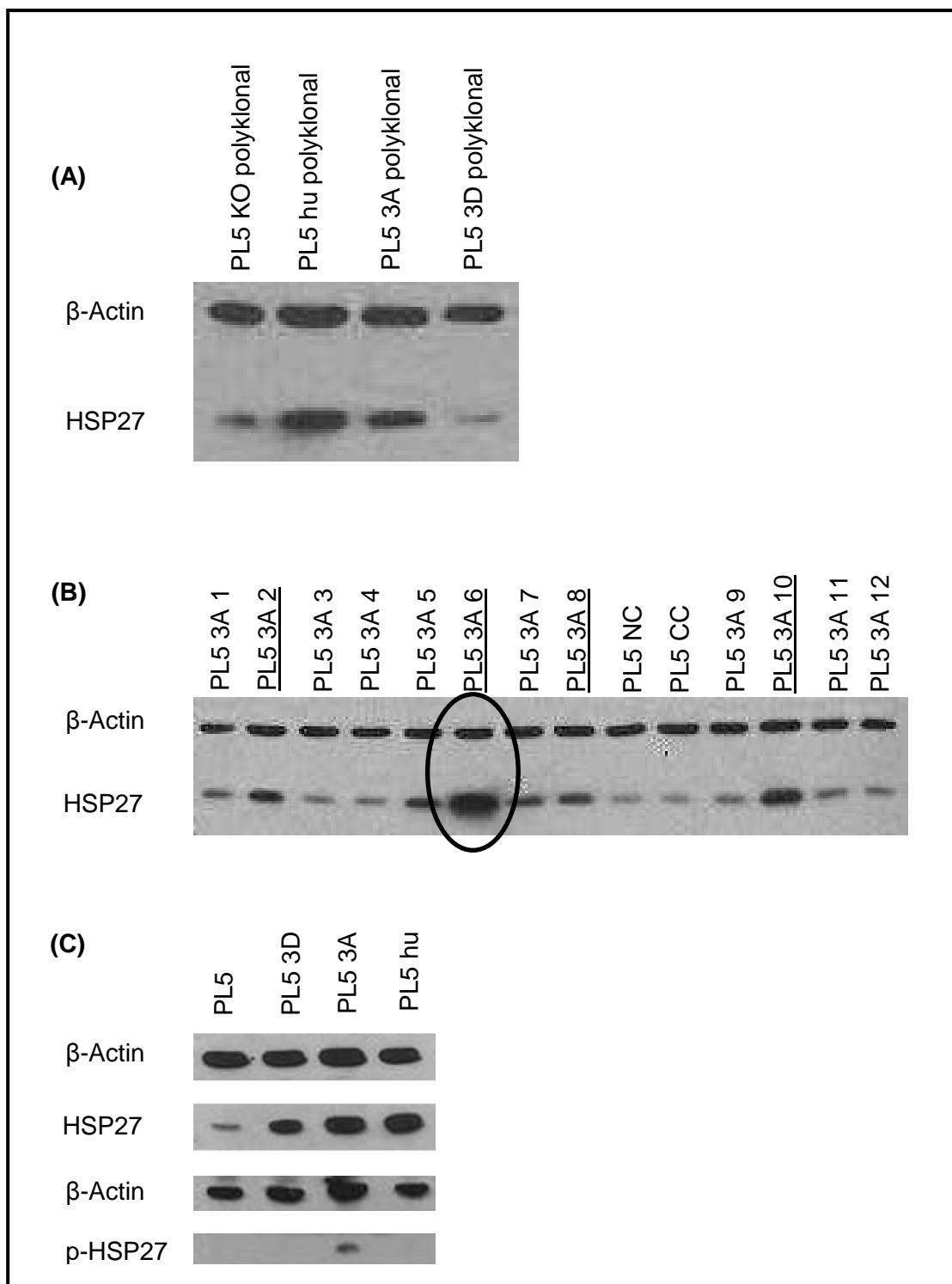


Abb. 7: Herstellung monoklonaler Einzelzellklone am Beispiel von PL5: (A) Westernblot mit Nachweis der HSP27-Expression der polyklonalen stabil transfizierten PL5-Zellen, (B) Westernblot mit Nachweis der HSP27-Expression in den HSP27-3A-exprimierenden Einzelzellklonen nach Endpunkt titration, (C) Westernblot zum Nachweis der HSP27- und p-HSP27-Expression in den ausgewählten Klonen.

3.2.4 Endpunkt titration zur Identifikation HSP27-hochexprimierender Einzelklone

Da nicht alle polyklonalen Varianten der Zelllinien eine eindeutige Überexpression von HSP27 zeigten, wurden im nächsten Schritt aus den polyklonalen Zelllinienvarianten monoklonale Zellklone herangezogen. Als Ziel wurde eine mindestens 3-fach höhere HSP27-Expression als die Ausgangszelllinie festgelegt.

Um die Einzelzellklone herzustellen, wurden die PL5-Zellen in einer theoretischen Zellzahl von einer Zelle pro Well in 96-Wellplatten ausgesät. Die entstehenden Einzelkolonien wurden dann weiterkultiviert.

10 – 20 Zellklone je Konstrukt wurden mittels Westernblot auf ihre HSP27-Expression hin getestet. Dabei wurden für alle Varianten (hu, 3D, 3A) deutlich überexprimierende Klone gefunden.

Die Klone mit der stärksten Expression von HSP27 hu, 3A und 3D und die Kontrollzellen wurden entsprechend benannt (siehe Tab. 7) und für die weiteren Versuche verwendet (Abb. 7).

Beschreibung	Bezeichnung
Selektierte Einzelzellklone transfiziert mit Gen für humanes HSP27	PL5 hu16, PL5 hu18, PL5 hu20
Selektierter Einzelzellklon transfiziert mit Gen für 3D-Variante von HSP27	PL5 3D
Selektierter Einzelzellklon transfiziert mit Gen für 3A-Variante von HSP27	PL5 3A
Polyklonale Ursprungszelllinie PL5 mit niedriger konstitutiver HSP27-Expression	PL5 KO
Selektierter Einzelzellklon transfiziert mit pcDNA3.1-Vektor-Leervektor	PL5 LV

Tab. 7: Selektierte Klone und deren Nomenklatur

Einzelzellklone wurden auch für Panc-1-Zellen selektiert. Dabei wurden allerdings nicht für alle Varianten ausreichend HSP27-überexprimierende Klone gefunden (Daten nicht gezeigt).

3.3 Einfluss stabiler HSP27- und p-HSP27-Überexpression auf die zelluläre Sensitivität gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika

Da frühere Studien gezeigt haben, dass HSP27 Einfluss auf die Chemosensitivität von Zellen hat [122-124], wurden mit den PL5-Klonen Chemosensitivitätsstudien mittels Zellproliferationstests durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen in aufsteigender Konzentration mit den Chemotherapeutika behandelt. Nach 6 Tagen wurden die abgestorbenen und somit nicht mehr adhärenten Zellen durch waschen entfernt, die verbleibenden Zellen lysiert und die DNS mittels SYBR Green angefärbt. Anschließend wurde photometrisch die Menge an DNS bestimmt und dadurch die Menge der lebenden Zellen nach Behandlung abgeschätzt.

Als Versuchskontrolle wurden entweder die parietale, polyklonale Population der PL5-Zellen oder monoklonale Leervektor-Zellklone verwendet. In den Versuchen, die mit beiden Kontrollzellverfahren durchgeführt wurden, verhielten sich die klonal expandierten Zellen genauso wie die parietalen Kontrollzellen.

3.3.1 Gemcitabin/Paclitaxel/5-Fluorouracil/Cisplatin

Um den Einfluss der unterschiedlichen HSP27- und p-HSP27-Expression auf das Überleben der Zellen bei Behandlung mit den beim Pankreaskarzinom gebräuchlichsten Chemotherapeutika (Gemcitabin/Paclitaxel/5-Fluorouracil/Cisplatin) zu testen, wurden Zellproliferationstests durchgeführt. Das mittlere Überleben wurde mittels IC_{50} abgeschätzt. Diese beschreibt die mittlere Konzentration eines Therapeutikums bei der die halbmaximale Wachstumshemmung erreicht wird. Wenn man diese Größe für verschiedene Zellen in Bezug setzt, wird dies als IC_{50} -Ratio bezeichnet.

Unter der Behandlung mit Gemcitabin zeigten die Kontrollzellen ein besseres Überleben als die HSP27-überexprimierenden Zellen. Die mittlere benötigte Konzentration, um eine Wachstumshemmung von 50% herbeizuführen (IC_{50}), war um das 25-fache höher als die IC_{50} in den drei HSP27-überexprimierenden Klonen. Der Phosphorylierungsstatus von HSP27 hatte dabei keinen Einfluss auf die IC_{50} der Zellen. Sowohl die nicht-phosphorylierbare Variante (3A) als auch die pseudo-phosphorylierte Variante (3D) zeigten die gleiche Chemosensitivität wie die Varianten, die das unveränderte humane HSP27 (hu) überexprimieren. Diese Daten legen nahe, dass die Sensitivitätssteigerung der Zellen auf Behandlung mit Gemcitabin abhängig von der Menge an exprimiertem HSP27, jedoch nicht vom Phosphorylierungsstatus des HSP27, ist.

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der Behandlung mit Paclitaxel, 5-Fluorouracil und Cisplatin keine Unterschiede in der Chemosensitivität (Abb. 8).

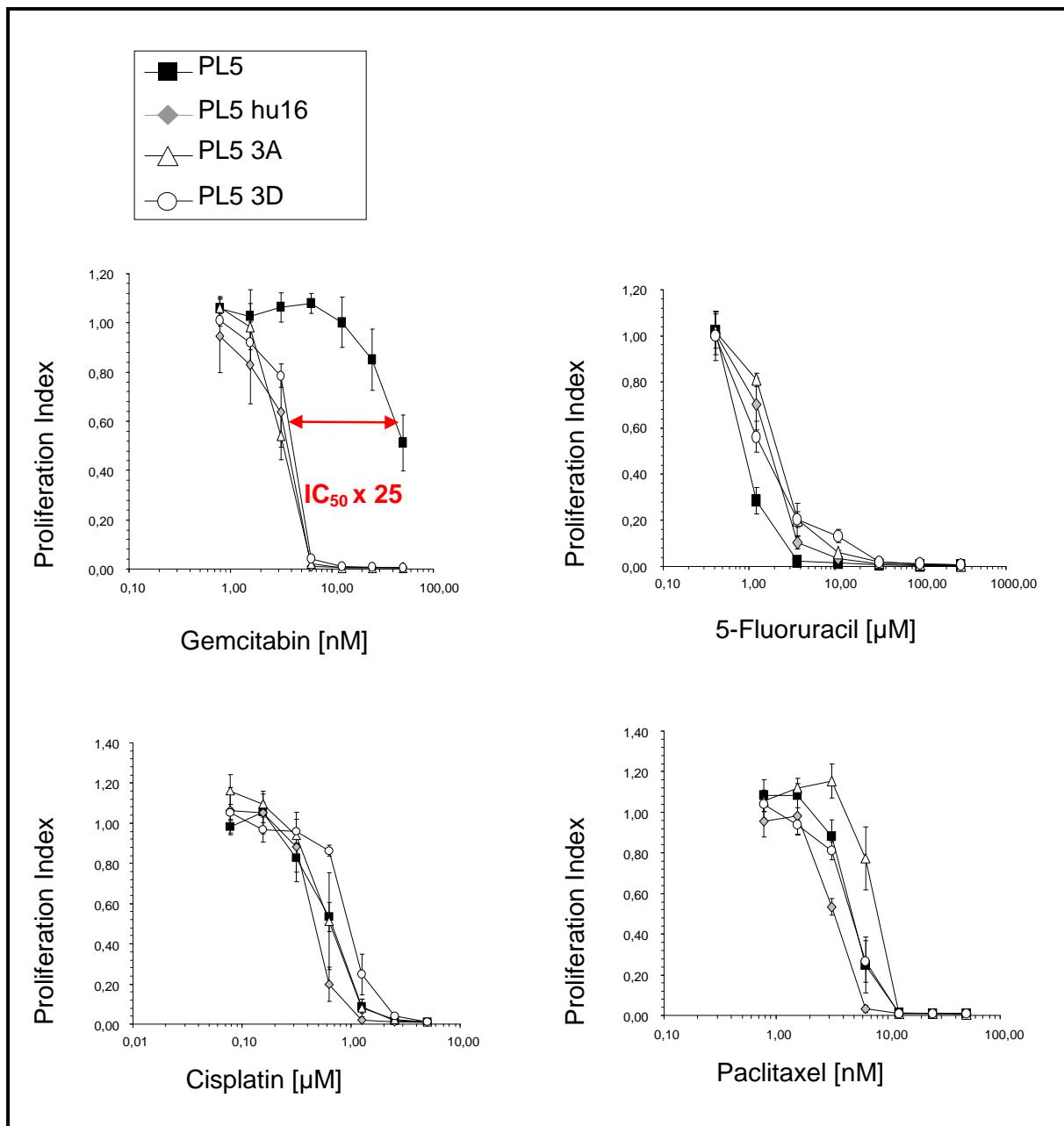


Abb. 8: Einfluss von (p-)HSP27 auf die Chemosensitivität: Deutlich erhöhte Sensitivität aller HSP27-überexprimierenden Klone auf Gemcitabin. Daten gemittelt aus $n=3$ unabhängigen Experimenten

3.3.2 Ausschluss klonaler Variabilität

Um die Sensitivierung auf die Behandlung mit Gemcitabin durch hohe HSP27-Expression zu bestätigen, wurde der Zellproliferationstest mit zwei anderen hu-HSP27 überexprimierenden PL5-Klonen wiederholt. Zusätzlich diente dieser Versuch dazu, Artefakte auszuschließen, die durch klonale Variabilität entstehen können.

Alle drei hu-HSP27-überexprimierenden Klone zeigten eine deutlich höhere Sensitivität auf die Behandlung mit Gemcitabin als die Kontrollzellen. Auch in diesem Versuch ließ sich eine eindeutige Verminderung der IC₅₀ feststellen (Abb. 9).

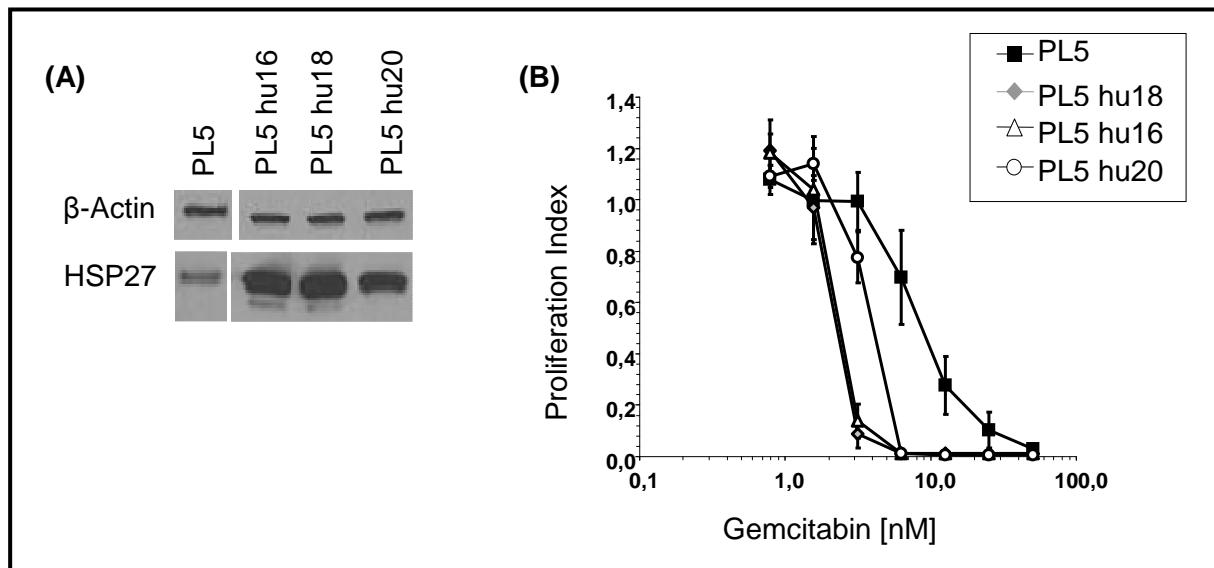


Abb. 9: (A) Quantifizierung der HSP27-Überexpression in selektierten, deutlich überexprimierenden Klonen der huHSP27-Variante. (B) Chemosensitivitätstestung: Deutlich erhöhte Sensitivität aller HSP27-überexprimierenden Klonen auf Gemcitabin. Daten gemittelt aus n=3 unabhängigen Experimenten

3.3.3 Reversibilität der HSP27-bedingten Gemcitabin-Sensitivität

Der Kausalzusammenhang zwischen der HSP27-Expression und der erhöhten Chemosensitivität gegenüber Gemcitabin konnte durch die Reversibilität der Sensitivität gezeigt werden. Dazu wurde der Zellproliferationstest mit einem Klon wiederholt, der während der Kultivierung seine Fähigkeit HSP27 zu überexprimieren aufgrund fehlender kontinuierlicher Selektion und konsekutivem Verlust der HSP27-Überexpression, z. B. durch Methylierung des exogenen HSP27-Konstrukts, verloren hatte.

Im Vergleich mit einem überexprimierenden Klon und den nicht-transfizierten Kontrollzellen zeigte dieser Klon die gleiche Sensitivität gegenüber Gemcitabin wie die Kontrollzellen (Abb. 10). Dies belegt weiter die Abhängigkeit der Gemcitabin-Sensitivität von der HSP27-Expressionsstärke in diesem Modell.

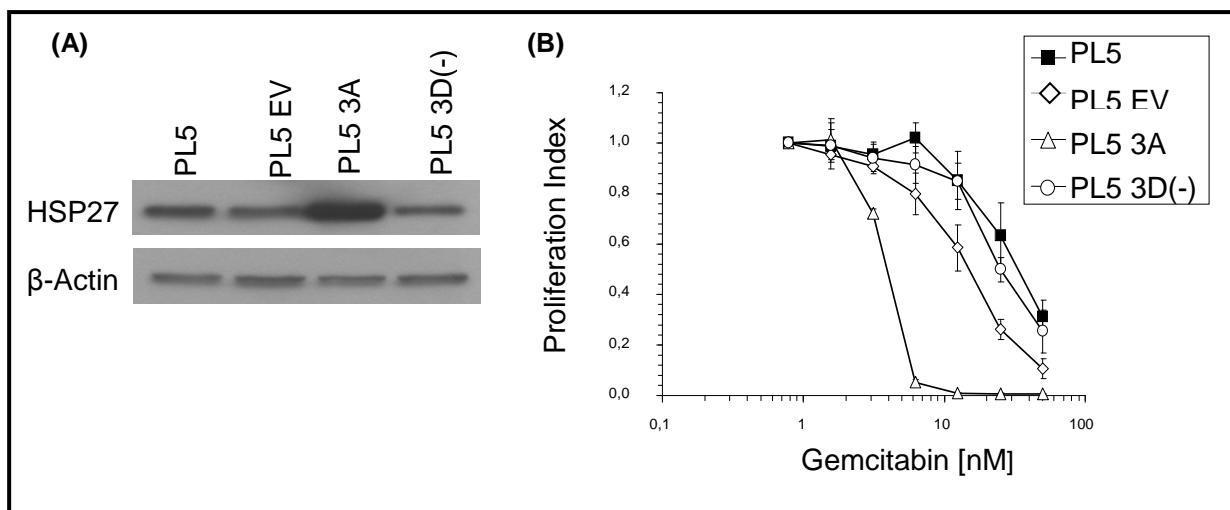


Abb. 10: (A) Quantifizierung der HSP27-Expression in Kontrollen, überexprimierendem Klon PL5 3A und PL5 3D(-) (nach Verlust der Überexpression). (B) Chemosensitivitätstestung: Reversibilität der Chemosensitivität durch Verlust der HSP27-Überexpression im Klon PL5 3D(-). Daten gemittelt aus $n=3$ unabhängigen Experimenten

3.4 Einfluss stabiler HSP27- bzw. p-HSP27-Überexpression auf die zelluläre Sensitivität gegenüber γ -Bestrahlung

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit beim Pankreaskarzinom stellt die Bestrahlung dar. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die unterschiedlichen Klone ein unterschiedliches Ansprechen auf γ -Bestrahlung zeigen.

Zur Überprüfung der Strahlungssensitivität wurden die Zellen in 6-Wellplatten ausgesät und am nächsten Tag mit aufsteigenden Strahlungsdosen behandelt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 12 Tage kultiviert. In dieser Zeit konnten die überlebenden Zellen Kolonien bilden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen fixiert, mit Crystal Violet angefärbt und die Kolonien gezählt. Jeder Versuch wurde im Duplikat durchgeführt.

Im Vergleich zum Zellproliferationstest misst der Koloniebildungstest nicht nur die Menge an lebenden Zellen, sondern die Fraktion der Tumorzellen, die im Anschluss an die Behandlung noch die Fähigkeit zur Proliferation aufweisen. Dabei hat der Zelltod-auslösende Mechanismus keinen Einfluss auf den Test oder seine Auswertung [151].

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Überleben der Zellen nach γ -Bestrahlung zwischen den Klonen HSP27-hu, HSP27-3A, HSP27-3D und den nicht-transfizierten Kontrollzellen (Abb. 11). Somit scheinen in unserem Modell weder die Höhe der HSP27-Expression noch der Phosphorylierungsstatus von HSP27 bei Pankreaskarzinomzellen einen Einfluss auf das Überleben nach γ -Bestrahlung zu haben.

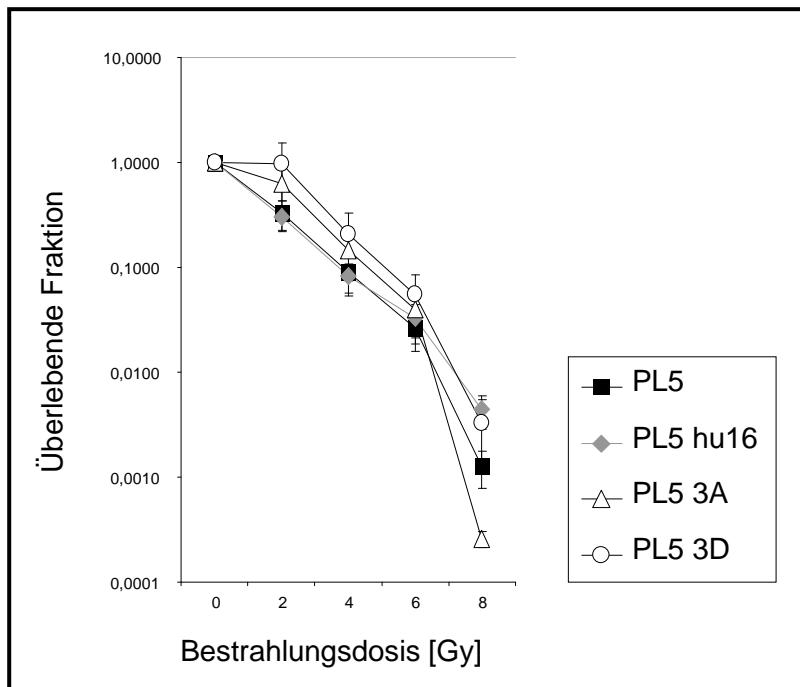


Abb. 11: Einfluss von (p-)HSP27 auf die Bestrahlungssensitivität. Es zeigt sich kein Unterschied in der Bestrahlungssensitivität. Daten gemittelt aus $n=3$ unabhängigen Experimenten

3.5 Induzierbarkeit der HSP27-Expression durch Hitzeschock

Zur Evaluation möglicher klinischer Implikationen der erhaltenen Daten, insbesondere hinsichtlich klinischer Therapieregime mit Hyperthermie als Chemosensitivierung, wurde überprüft, ob es prinzipiell möglich ist, eine HSP27-Überexpression mittels Hitzeschock in dem etablierten HSP27-Zellmodell zu erzeugen. Dieser Effekt wurde bereits für unterschiedliche Zellsysteme vorbeschrieben [152, 153], jedoch noch nicht für das hier etablierte Zellsystem validiert. Außerdem könnte die Induktion von HSP27 mittels Hyperthermie als Grundlage für zukünftige mechanistische Studien dienen.

Dabei wurden Zellen der Pankreaskarzinomzelllinien PL5 und PL11 und PCC-Zellen für 1 h bzw. 2 h in einem Wasserbad bei 39°C oder 41°C inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden sie für 3 h, 6 h oder 9 h im Inkubator kultiviert, bevor sie lysiert und mittels Westernblot analysiert wurden. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet.

3.5.1 Induzierbarkeit der HSP27-Expression durch Hitzeschock in PL5 und PL11

PL5-Zellen und PL11-Zellen zeigten beide einen starken Anstieg der HSP27-Expression durch den Hitzeschock. Sowohl nach 3 h und 6 h konnte ein Anstieg der HSP27-Konzentration bei 39°C und noch deutlicher bei 41°C beobachtet werden. Nach 9 h Inkubation nahm die HSP27-Konzentration in den Zellen bereits wieder ab (Abb. 12 (A)).

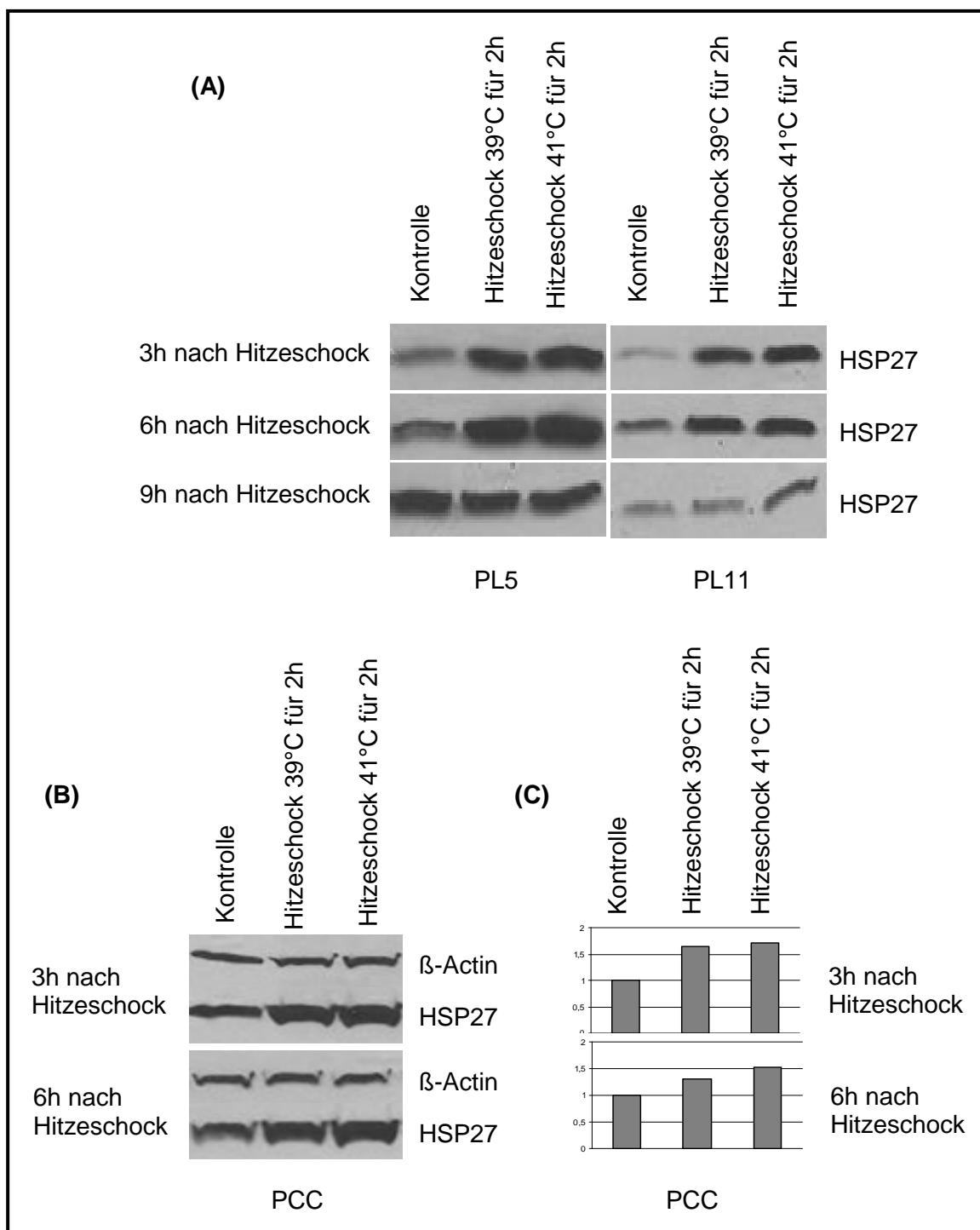


Abb. 12: HSP27-Expression nach Hitzeschockbehandlung

(A) Quantitative Messung der HSP27-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien (PL5 und PL11) nach Hitzeschockbehandlung (2 h bei 39°C/41°C) und nach 3 h, 6 h und 9 h. (B) Quantitative Messung der HSP27-Expression in kurzzeitkultivierten primären Pankreaskarzinomzellen (PCC) nach Hitzeschockbehandlung (2 h bei 39°C/41°C) und nach 3 h und 6 h. (C) Densitometrische Messung der HSP27-Expression in PCC

3.5.2 Induzierbarkeit der HSP27-Expression durch Hitzeschock in neu etablierten kurzzeitkultivierten Pankreaskarzinomlinien

Um zu überprüfen, ob der in Pankreaszelllinien beobachtete Effekt auch generalisierbar ist, wurde der Versuch mit einer kurzzeitkultivierten Primärtumorzelllinie aus einem humanen Pankreaskarzinom (PPC) durchgeführt.

Auch die neu etablierten Zellen zeigten einen starken Anstieg der HSP27-Expression nach Hitzeschock. Ebenso wie in den Versuchen mit den Pankreaskarzinomzelllinien PL5 und PL11 war die Reaktion auf einen Hitzeschock mit 41°C effektiver als mit 39°C. Auch in den PPC war eine Abnahme der Konzentration nach 9 h zu beobachten (Abb. 12 (B+C)).

3.6 Mechanistische Untersuchungen zur HSP27-modulierten Gemcitabin-Sensitivität in PL5 Zellen

Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war die Identifikation potentieller mechanistischer Zusammenhänge zwischen der beobachteten HSP27-abhängigen Gemcitabin-Sensitivierung und den gut charakterisierten Hauptfunktionen von HSP27.

3.6.1 Einfluss der Behandlung mit Chemotherapeutika auf die (p-)HSP27-Expression

Wie in den vorangegangen Versuchen gezeigt wurde, kann die HSP27-Expression die Wirkung von Chemotherapeutika beeinflussen. Umgekehrt legen die Ergebnisse von Tanaka et al. nahe, dass die Expression von HSP27 von der Behandlung mit zytotoxischen Medikamenten beeinflusst wird [154]. Deshalb wurde die Menge der (p-)HSP27-Expression nach der Behandlung mit Gemcitabin quantifiziert.

Dazu wurden die Zellen mit Gemcitabin für 24 h behandelt und anschließend die HSP27 und p-HSP27-Expression mittels Westernblot analysiert.

Es wurde nach der Behandlung mit Gemcitabin kein Unterschied in der Expression von HSP27 oder p-HSP27 nachgewiesen (Abb. 13).

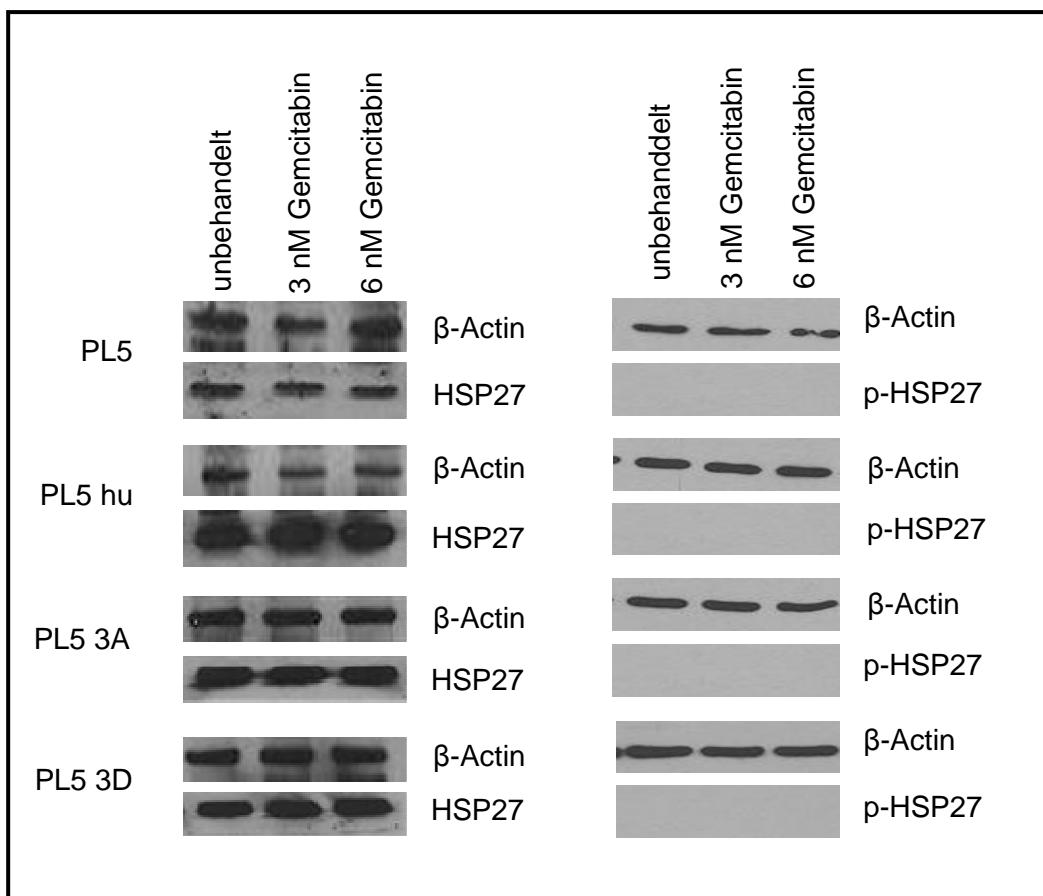


Abb. 13: Quantitative Messung der HSP27- und p-HSP27-Expression nach Behandlung der Zellen mit Chemotherapie. Repräsentative Ergebnisse eines Experiments ($n=3$).

3.6.2 Einfluss von Gemcitabin auf die räumliche Verteilung von (p-)HSP27 und die Beziehung zum Aktinskelett

Die Stabilisierung der Aktinfilamente stellt eine der Hauptaufgaben von HSP27 dar. Veränderungen dieser Interaktion durch Chemotherapeutika und die Verlagerung von HSP27 in andere Zellkompartimente könnten zu einer Destabilisierung der Zellintegrität und zur Apoptose führen. Da sich der Wirkmechanismus verschiedener Chemotherapeutika komplett unterscheidet, ist anzunehmen, dass diese auch einen unterschiedlichen Einfluss auf das komplexe Zusammenspiel der Zellfilamente und deren Interaktionspartner, wie HSP27, haben. Dies könnte ein Grund für die HSP27-abhängige Sensitivitätsänderung der Zellen spezifisch auf Gemcitabin sein.

3.6.2.1 Darstellung der räumliche Korrelation zwischen Gesamt-HSP27 und p-HSP27, Aktin mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Verteilung und Phosphorylierung von HSP27 und die Veränderung der Aktinfilamente nach Behandlung mit Gemcitabin wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Dazu wurden die Zellen mit 0 nM, 3 nM oder 6 nM Gemcitabin für 24 h behandelt und anschließend das Aktinskeletts, HSP27 und p-HSP27 über spezifische Bindungen gefärbt. Zur Identifizierung des zytoplasmatischen und des nukleären Kompartiments der Zellen wurde die doppelsträngige DNS mit Hoechst 33342 markiert.

Wie auch schon für die Pankreaskarzinomzelllinien MIA PaCa-2, Capan-1, Capan-2, Panc-1 und PL5 konnte für die unbehandelten Klone und die unbehandelten Kontrollzellen fast ausschließlich eine diffuse zytoplasmatische HSP27-Expression festgestellt werden (Abb. 14, 1. Spalte). Durch die Behandlung mit Gemcitabin veränderte sich das räumliche Expressionsmuster von HSP27. Es zeigte sich vermehrt eine nukleäre HSP27-Expression (Abb. 14, 2 + 3. Spalte). Dieses Muster war sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den drei verschiedenen Klonen zu beobachten (Abb. 14).

Im Gegensatz zu HSP27 lag p-HSP27 in den unbehandelten Zellen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vor (Abb. 15, 1. Spalte). In den klonalen HSP27-überexprimierenden Zelllinien dominierte jedoch die p-HSP27-Expression im Zellkern. Im Zytoplasma zeigte sich eine körnige Verteilungsstruktur. Durch die Behandlung mit Chemotherapeutika änderte sich in allen Zelllinien das Verteilungsmuster nur unwesentlich (Abb. 15, 2. + 3. Spalte).

Die Behandlung mit Gemcitabin und anderen Chemotherapeutika stellt für die Zellen eine Form des Zellstress dar. Entsprechend reagierten alle Zellen mit unspezifischen Anzeichen des Zellstress (Stressfasern, Stachel der äußeren Zellmembran und vermehrte Membranfärbung). Diese stressinduzierten Zellveränderungen zeigten sich konzentrationsabhängig. Darüber hinaus zeigte sich durch die Behandlung mit Gemcitabin kein spezieller Einfluss auf das Aktinskelett. Trotz der unterschiedlichen Quantität und des unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus hatte die HSP27-Expression keinen signifikanten Einfluss auf die beschriebenen Veränderungen des Aktinskeletts (Abb. 16).

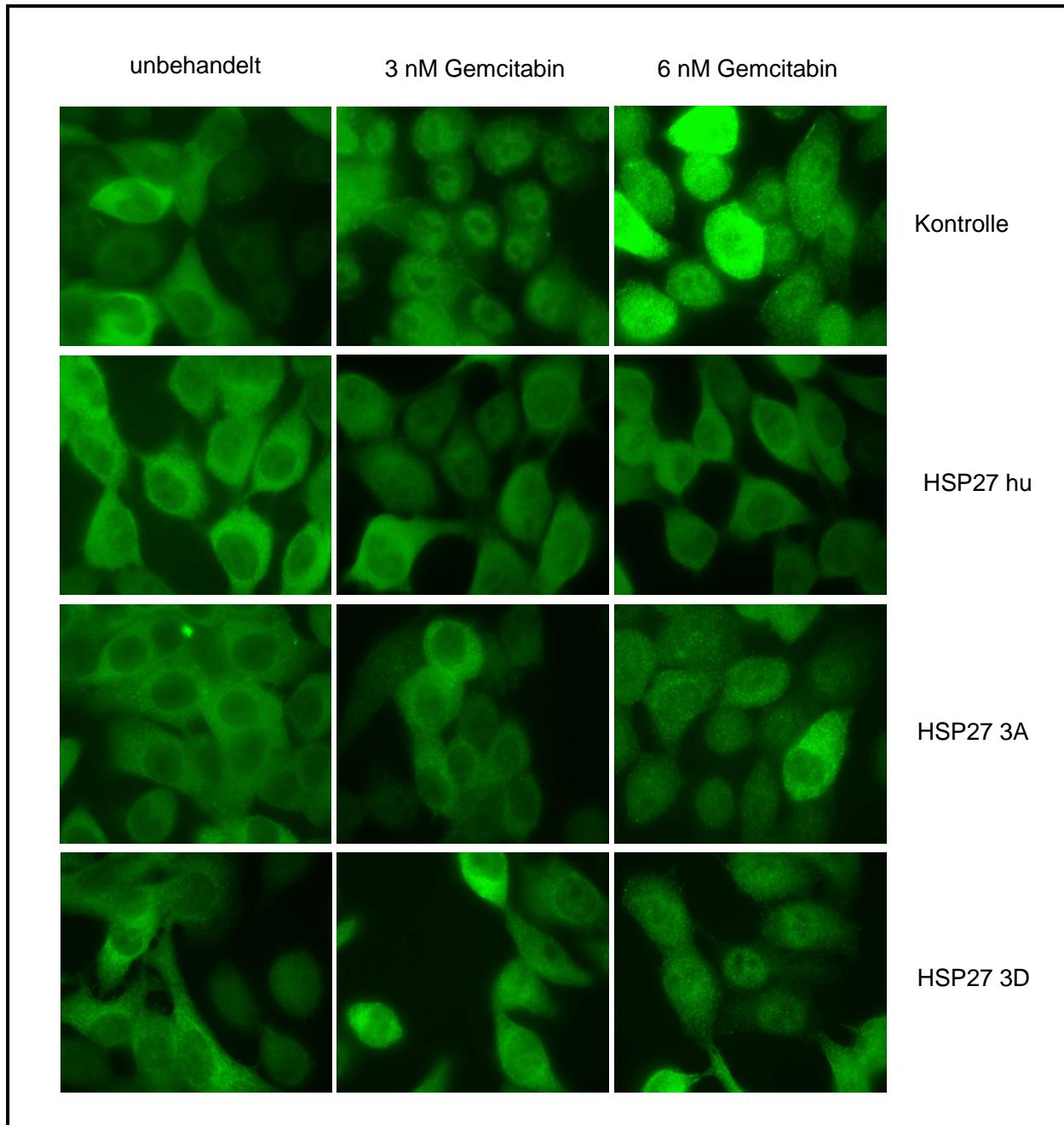


Abb. 14: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der HSP27-Verteilung nach Behandlung mit Gemcitabin. Repräsentative Ergebnisse eines Experiments ($n=3$).

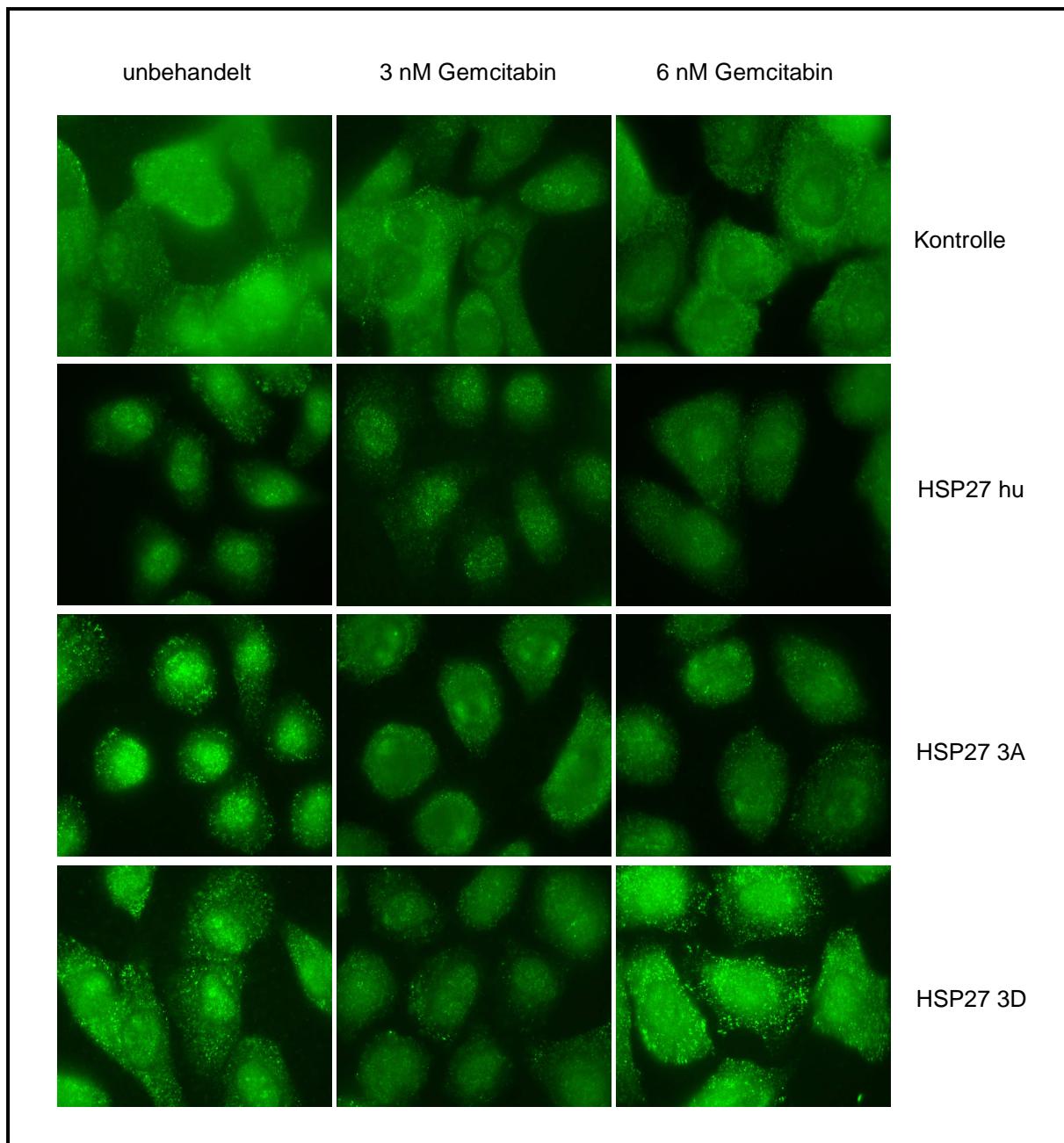


Abb. 15: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der phospho-HSP27-Verteilung nach Behandlung mit Gemcitabin. Repräsentative Ergebnisse eines Experiments ($n=3$).

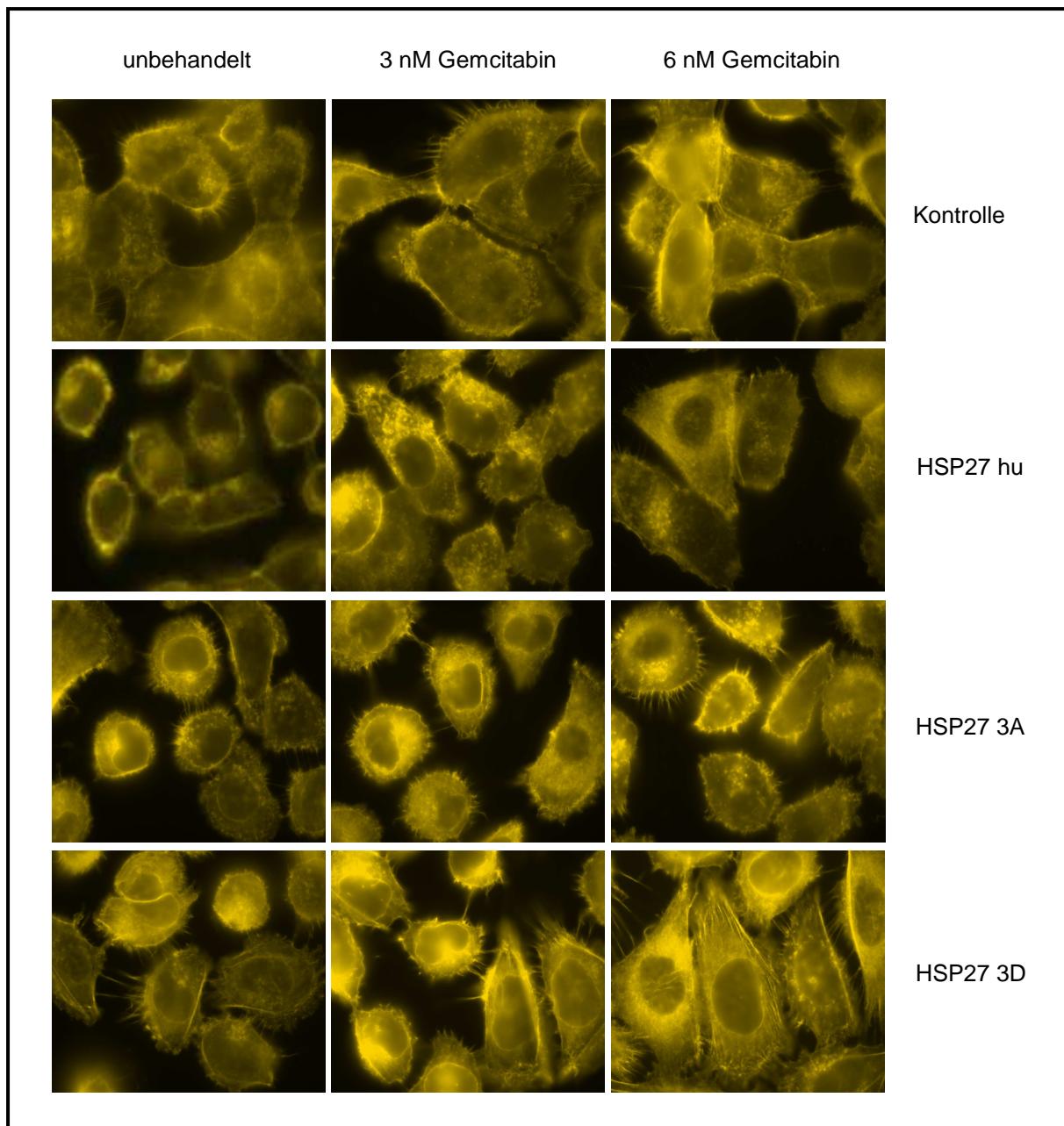


Abb. 16: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse des Aktin-Zytoskeletts nach Behandlung mit Gemcitabin. Repräsentative Ergebnisse eines Experiments ($n=3$).

3.6.2.2 Phasenauf trennung zur quantitativen Analyse der HSP27-Verteilung mittels Westernblot

Da Immunfluoreszenzmikroskopie eine qualitative Analyse der HSP27- und p-HSP27-Verteilung zulässt, allerdings keine klare Quantifizierung ermöglicht, wurde im Folgenden die Expression von (p-)HSP27 in den verschiedenen Zellkompartimenten quantitativ mittels Westernblot bestimmt.

Dazu wurden die Lysate aus Gemcitabin-behandelten und unbehandelten Zellen durch Verwendung eines Triton X-haltigen Lysepuffers in verschiedenen Zentrifugationsschritten in

eine Triton-lösliche Phase (membrangebundene HSP27-Fraktion), eine Triton-unlösliche Phase (lösliches HSP27-Fraktion) und eine nukleäre Phase aufgetrennt.

Dabei fand sich in allen Zellen der Hauptteil der HSP27-Proteine in der Triton-löslichen Phase. Durch die Behandlung mit Gemcitabin veränderte sich die nachgewiesene Menge von HSP27 in keiner der Zelllinien.

In der Triton-unlöslichen Phase war in allen Zelllinien nur wenig HSP27, mit geringen Schwankungen, z. B. im Rahmen methodischer Ungenauigkeiten, nachweisbar.

Auch die HSP27-Proteinmenge in der nukleären Phase war in allen Zelllinien vor und nach der Behandlung mit Gemcitabin praktisch konstant.

Zusammenfassend war HSP27 hauptsächlich in der Triton-löslichen Phase und nur in sehr kleinen Anteilen in der Triton-unlöslichen oder der nukleären Phase nachweisbar. Auch durch die Behandlung mit Gemcitabin war keine mit dieser Methode nachweisbare Veränderung der HSP27-Expression nachzuweisen (Abb. 17).

P-HSP27 konnte gar nicht oder nur in sehr kleinen Mengen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse waren nicht ausreichend, um eine fundierte Aussage über die p-HSP27-Expression zu treffen (Daten nicht gezeigt).

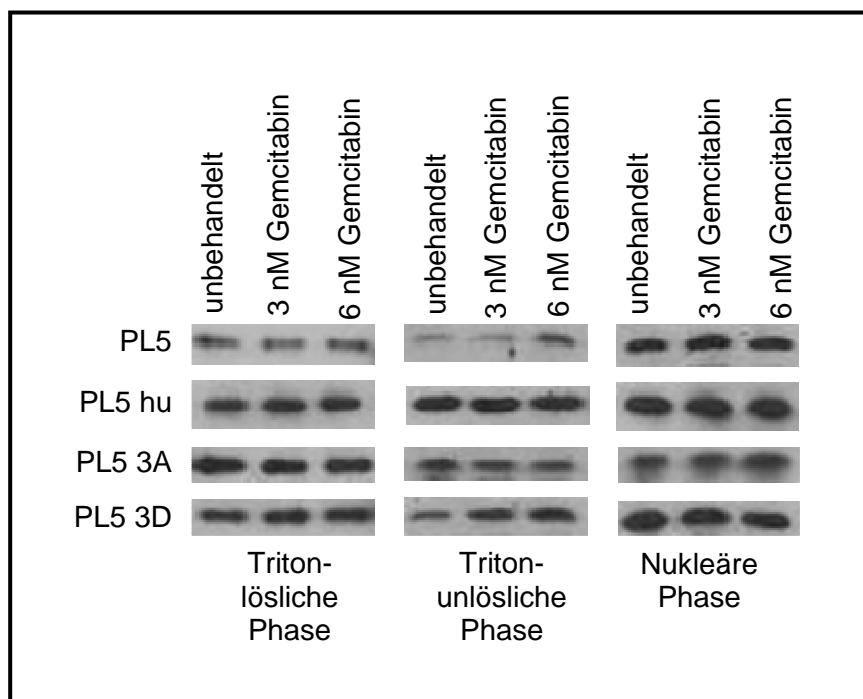


Abb. 17: Quantitative Messung der HSP27-Expression nach Gemcitabinbehandlung und Phasenauf trennung. Repräsentative Ergebnisse eines Experiments ($n=3$).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der HSP27- und p-HSP27-Proteinexpression auf die Chemo- und Radiosensitivität von Pankreaskarzinomzellen anhand von Pankreaskarzinomzelllinien in einem neu-establierten stabilen Tranksfektionsmodell untersucht.

4.1 Das nicht-isogene HSP27-Pankreaskarzinommodell

Im ersten Schritt wurden dazu verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien auf ihre quantitative und qualitative HSP27- und p-HSP27-Expression untersucht. Die Pankreaskarzinomzelllinien zeigten zwar eine konstitutive Expression von HSP27, diese war aber in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt. P-HSP27 wurde nur von zwei der getesteten Zelllinien (Capan-1, Capan-2) konstitutiv exprimiert.

Es hat sich gezeigt, dass die HSP27-Expression in vielen verschiedenen menschlichen Karzinomentitäten erhöht ist. Eine Übersicht über die diagnostische Bedeutung von HSP27 in verschiedenen Tumorentitäten bietet Tab. 8.

Bisher gibt es nur wenige und teilweise widersprüchliche Untersuchungen zur HSP27-Expression im Pankreaskarzinom im Vergleich mit normalem Pankreasgewebe. Lu et al. zeigten eine signifikant höhere Expression von HSP27 in normalem Pankreasgewebe im Vergleich zum Karzinomgewebe [129], während Melle et al. eine niedriger Expression im Normalgewebe zeigten [130]. Die deutlich differenten Ergebnisse trotz ähnlicher Herangehensweise könnte unter anderem auf die unterschiedlichen Karzinomproben (mikrodisseziertes / gesamtes Karzinomgewebe) zurückzuführen sein.

Wir konnten in einem TMA an 86 Patientenproben bei 49 % der Pankreaskarzinome eine Expression von HSP27 nachweisen. Die Expression von p-HSP27 war in 48 % der Karzinomproben positiv. Das korrespondierende Normalgewebe zeigte in 71 % eine HSP27-Expression und in 66 % eine p-HSP27-Expression [131]. Baylot et al. zeigten in einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2011 in einem TMA an 181 Patientenproben, dass die Intensität der HSP27- und die phospho-HSP27-Färbung mit steigendem Malignitätsgrad zunimmt [155].

Es konnten keine Studien gefunden werden, welche auf die konstitutive Expression von p-HSP27 in Karzinomzellen eingehen. Die p-HSP27-Expression von Capan-1 und Capan-2 stellt allerdings einen interessanten Sachverhalt dar, welche in zukünftigen Studien weiter zu untersuchen sein wird.

Diese Studien zeichnen ein sehr uneinheitliches Bild der Expression von HSP27 in unterschiedlichen Karzinomentitäten, aber auch innerhalb der untersuchten Karzinomproben. Dies wird durch unsere Beobachtungen aus den nicht-isogenen Pankreaskarzinomzelllinien ergänzt, die ebenfalls sehr heterogene Expressionsmuster von HSP27 und p-HSP27 aufwiesen. Aus diesen Gründen erschien das nicht isogene Modell zur kontrollierten

Untersuchung des HSP27-Einflusses auf die Therapiesensitivität als suboptimal. Um kontrollierbare Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde daher im nächsten Schritt mittels stabiler HSP27-Überexpression ein isogenes Pankreaszellmodell etabliert.

	Diagnose		Prognose	
		Quellen		Quellen
Bronchialkarzinom	0	[156]	0/+	Adenokarzinom [156] / NSCLC [157]
Endometriumkarzinom	-	[158, 159]	+	[160, 161]
Hepatozelluläres Karzinom	+	[162-165]	0/-	[163, 166] / [167]
Kolonrektales Karzinom	+	[168, 169]	-	[168-170]
Leukämie	+	[171, 172]	0/-	[173] / In Kombination [174]
Lymphom	0	[120]	?	
Mammakarzinom	+	[175-177]	0	[178-182]
Nierenzellkarzinom	+	[183-185]	0/+	[185] / [186]
Ösophaguskarzinom	-	[102, 187]	+	PEC [188, 189], Adenokarzinom [190]
Ovarialkarzinom	+	[119, 191]	-/0/+	[119, 161, 192] / [123] / [193, 194]
Pankreaskarzinom	-/+	[129] / [130, 131, 155]	+	[131]
Prostatakarzinom	0/+	[195] / [196]	-	[117, 186, 196]
Urothelkarzinom	+/-	[195] / [197]	0	[195]
ZNS-Tumore	-/0/+	[198] / [199, 200] / [201]	0	[199]

Tab. 8: HSP27 und seine diagnostische und prognostische Bedeutung nach Ciocca et al [121, 202] und eigener Recherche,

Diagnose: mehr (+), gleiche (0), weniger (-) HSP27-Expression im Vergleich zum Normalgewebe; **Prognose:** positive (+), negative (-), keine (0) Korrelation der HSP27-Expression mit der Prognose; Keine Studien (?), widersprüchliche Daten (+/-), PEC – Plattenepithelkarzinom, NSCLC - Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom

4.2 Das isogene HSP27-Pankreaskarzinommodell

In verschiedenen Vorversuchen wurden PL5-Zellen aufgrund der niedrigen konstitutiven HSP27- und p-HSP27-Expression und der guten Transfizierbarkeit für die

Etablierung eines stabil-HSP27-überexprimierenden Pankreaskarzinommodells ausgewählt. Außerdem wurden unterschiedliche HSP27-Varianten in den PL5-Zellen überexprimiert.

Die PL5-Zellen wurden entweder mit der humanen Wildtyp-Variante des HSP27-Gens, mit der mutanten, nicht-phosphorylierbaren Form oder der pseudo-phosphorylierten Form von HSP27 transfiziert [137, 138]. So konnte ein Modell erzeugt werden, das eine selektive und spezifische Aussage über den Einfluss von HSP27 und p-HSP27 Überexpression auf Pankreaskarzinomzellen zulässt.

4.2.1 Evaluation des gewählten Zellmodells

Ein *in vitro*-Zellmodell bietet im Vergleich zu anderen Versuchsanordnungen die Möglichkeit, den Einfluss vieler unkontrollierbarer Nebeneinflüsse auszuschließen. *In vitro*-kultivierte Zellen unterliegen im Vergleich zu Zellen in Gewebsverbänden nur geringen interzellulären Einflussfaktoren, wie z. B. Wachstumshemmung durch Konfluenz oder interzellulärer Signaltransduktion und auch nicht dem Einfluss des umliegenden Gewebes in Form der Tumor-Stroma-Interaktion. Aus diesem Grund ist es in einem klonalen Zellmodell möglich, genau ein Merkmal der Zellen spezifisch unter Minimierung von Störeinflüssen zu untersuchen.

Veränderungen der Genexpression in Zellen können entweder über natürliche Selektion oder sogenanntes Zell-Engineering erzeugt werden. Bei der Entwicklung eines isogenen Zelllinienmodells bewirkt die artifizielle Manipulation von nur einem Gen, dass man spezifisch dieses Gen und nicht eine Fülle von Veränderungen untersucht [203]. Im Gegensatz dazu erzeugt die Genveränderung über Selektion, wie sie in mehreren anderen Veröffentlichungen zu diesem Thema verwendet wurde [133-135, 204], potentiell eine Vielzahl von verschiedenen, teilweise unkontrollierten sogenannten Passenger-Mutationen sowie potentiell auch epigenetische Veränderungen. Diese können im Folgenden zu einer Reduktion oder Erhöhung der zellulären Fitness führen [203], welche in unkontrollierter Weise die nachfolgenden Untersuchungen beeinflussen.

Beim Zell-Engineering werden gezielt einzelne Gene und damit die entsprechenden Protein-Expressionsmuster von Zellen verändert. Die drei gängigsten Methoden sind stabile Überexpression einzelner Gene, gezielte RNA-Interferenz mittels siRNAs, oder spezifischer Gen-Knock-Out. In dieser Arbeit wurde ein Modell mittels stabiler Transfektion gewählt, da es für pharmakologische Studien ein stabiles Modellsystemen bietet.

RNS-Interferenz mittels siRNAs ist eine transiente Methode bei der die physiologische Genexpression mit einer reduzierten Genexpression unmittelbar verglichen werden kann. Für pharmakologische Studien zeigen sie den Nachteil, dass es auf Grund häufiger Nebeneffekte der siRNAs schwer möglich ist, geeignete Kontrollen zu entwickeln [205]. Diese Nebeneffekte sind sowohl schlecht reproduzierbar als auch schwer mittels passender siRNAs zu validieren. Außerdem scheinen häufig toxische Nebeneffekte zu entstehen [206], welche

bei pharmakologischen Überlebensstudien mit den eigentlichen Effekten interferieren können.

Der gezielte Gen-Knock-Out stellt heute für viele *in vitro* Versuche die Standardmethode dar. Allerdings kann das akute künstliche Ausschalten der Genaktivität in ca. 30% der Gene zu einer deutlichen Reduktion der Zellfitness führen.

Stabile Transfektion erzeugt ein Zellmodell mit konstanten Zellveränderungen und Kontrollmöglichkeiten bei geringer Reduktion der zellulären Fitness. Allerdings können durch den zufälligen Einbau der Fremd-DNS in das Genom der Zellen während der stabilen Transfektion sogenannte Transfektionsartefakte, also z. B. Veränderungen in der Proteinexpression entstehen, welche durch entsprechende Kontrollen (z.B. Etablierung mehrerer unabhängiger Einzelklone) ausgeschlossen werden müssen. Des Weiteren kommt es per definitionem zu einem unphysiologisch hohen Expressionsniveau der entsprechenden Gene [203], welche außerdem im Gegensatz zur physiologischen Regulierung konstitutiv und nicht-regulierbar exprimiert werden.

Ein Nachteil aller *in vitro*-Zellmodellen liegt im Verlust von natürlichen, gewebe-spezifischen Einflüssen auf die Tumorzellen. Aus diesem Grund ist es notwendig, die in *in vitro*-Versuchen gewonnenen Daten in weiteren Studien in anderen Modellsystemen (z.B. *in vivo*-Systemen) zu validieren.

4.3 Einfluss von HSP27 auf die Therapiesensitivität

4.3.1 Einfluss von HSP27 auf die Sensitivität gegenüber konventionellen Chemotherapeutika

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pankreaskarzinomzellen, die HSP27 konstitutiv überexprimieren, eine 25-fach niedrigeren IC₅₀ bei der Behandlung mit Gemcitabin haben, als solche die HSP27 nicht überexprimieren. Dieser Effekt war spezifisch für die Behandlung mit Gemcitabin und konnte bei keinem weiteren untersuchten Chemotherapeutikum (5-Fluoruracil, Cisplatin, Paclitaxel) beobachtet werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass dieser Effekt reversibel ist. So konnte anhand des Klons PL5 3D(-) gezeigt werden, dass der Verlust der Überexpression, nach Absetzen des Selektionsdrucks mit konsekutiver Hypermethylierung des HSP27-überexprimierenden Konstrukts, auch zu einem Verlust der Sensitivität gegenüber Gemcitabin führt. Zusätzlich zeigten in den Versuchen sowohl die nicht-phosphorylierbare Form (3A) als auch die pseudo-phosphorylierte Form (3D) die gleiche Reaktionsweise wie die Wildtyp-Variante von HSP27. Daraus folgt, dass die Sensitivitätssteigerung gegenüber Gemcitabin unabhängig vom HSP27-Phosphorylierungsstatus war.

Verschiedene Studien beschreiben den Einfluss von HSP27 auf die Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika. So berichten Studien über eine erhöhte

Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, zum Beispiel von Mammakarzinomzellen gegenüber Doxorubicin, Prostatakarzinomzellen gegenüber Etoposid und Neuroblastomzellen gegenüber Etoposid [207-209]. Eine weitere Übersicht über die prädiktive Bedeutung der HSP27-Expression in einige ausgewählte Tumorentitäten bietet Tab. 9.

	Prädiktion	
	Quellen	
Bronchialkarzinom	-	[210]
Endometriumkarzinom	?	
Hepatozelluläres Karzinom	-	[211]
Kolonrektales Karzinom	-	[212]
Leukämie	-	[213]
Lymphom	-	[214]
Mammakarzinom	0	[178, 215]
Nierenzellkarzinom	?	
Ösophaguskarzinom	-/+	PEC [124, 197] / Adenokarzinom [216]
Ovarialkarzinom	-/0	[119, 191] / [217]
Pankreaskarzinom	-	[133, 135, 155, 218]
Prostatakarzinom	?	
Urothelkarzinom	-	[219] / [220]
ZNS-Tumore	0	[221]

Tab. 9: HSP27 und seine prädiktive Bedeutung nach Ciocca et al [121, 202] und eigener Recherche

HSP27-Expression hat positiven (+), negativen (-), keinen (0) prädiktiven Einfluss auf die Therapie, Keine Studien (?), widersprüchliche Daten (+/-),

Zur Klärung des Einflusses von HSP27 auf das Tumortherapie-Ansprechen spezifisch gegenüber Gemcitabin ist die Datenlage bislang unzureichend.

Hsu et al. untersuchten die Unterschiede in der Gemcitabinsensitivität zwischen einer Lungenkarzinomzelllinie und einer mit Stammzellen angereicherten Zellpopulation und fanden dabei eine höhere HSP27-Expression und Phosphorylierung in den Gemcitabin-resistenten Stammzellen [222]. Der Versuchsaufbau von Hsu et al. und anderen Studien (siehe unten) besteht aus einer Erst-Selektion und anschließender Identifizierung von Expressionsveränderungen, wie zum Beispiel einer HSP27-Überexpression. Diese Reihenfolge in der Herangehensweise birgt das Risiko, dass durch die Selektion nicht nur die gewünschten, sondern auch viele unkontrollierte molekulare Veränderungen stattfinden,

welche die Funktionalität der Zellen beeinflussen. Es bietet somit nicht die Möglichkeit, gezielt den Einfluss einer HSP27-Überexpression in einem Zellmodell zu untersuchen.

Zur Evaluation des Einflusses von HSP27 auf die Chemosensitivität des Pankreaskarzinoms gibt es bisher nur sehr wenige Studien [133, 155, 218].

Baylot et al. zeigten in einer Studie, dass durch den Einsatz eines spezifischen HSP27-antisense Oligonukleotids der zytoplasmatische Gehalt von HSP27 gesenkt werden kann und dies mit einer Gemcitabinsensibilisierung einhergeht. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz der ASO im Tiermodell mit Nacktmäusen und darin erzeugten MiaPaCa-2-Tumoren einen Überlebensvorteil in der mit OGX-427 behandelten Gruppe erbringt [155].

Auch eine Studie von Heinrichs et al. arbeitete mit einem small molecule, welches in der Lage ist, HSP27 zu binden und damit dessen zytoplasmatischen Gehalt zu reduzieren. Allerdings zeigten die beschriebenen Experimente nicht, welche anderen zellulären Effekte RP101 hat. Eine kombinierte Therapie mit RP101 und MMC erwies sich in einem *in vitro*-Experiment mit BxPC-3-Pankreaskarzinomzellen als effektiver als eine MMC-Monotherapie. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte allerdings nicht geklärt werden. In einer ersten Phase II-Studie zeigte sich vor allem wegen Gemcitabin-Nebenwirkungen aufgrund von Medikamentenüberdosierung ein besseres Überleben der Placebo + Gemcitabin-Gruppe im Vergleich zu der RP101 + Gemcitabin-Gruppe [218].

Zur Identifizierung von Proteinen, welche zu einer Resistenz des Pankreaskarzinoms bei der Behandlung mit Gemcitabin führen könnten, wurde in der Studie von Mori-Iwamoto et al. eine Gemcitabin-resistente Zelllinie etabliert. Dazu wurde aus einer Gemcitabin-sensitiven Zelllinie über kontinuierliche Selektion mit Gemcitabin eine Gemcitabin-resistente Zelllinie erzeugt und mit der sensiblen Kontrollzelllinie mittels Proteinexpressionsanalyse verglichen. Dabei zeigte sich, dass HSP27 in der Gemcitabin-resistenten Zelllinie im Vergleich zur Gemcitabin-sensitiven Zelllinie überexprimiert war. Ein Herabregulieren der HSP27-Expression in der Gemcitabin-resistenten Zelllinie mittels siRNA stellte die Gemcitabin-sensitivität wieder her [133]. Aufbauend auf demselben Zellmodell wurden von dieser Arbeitgruppe weitere Studien veröffentlicht [134, 204, 223]. Die Unterschiede der beiden Modelle wurden bereits weiter oben diskutiert. Taba et al. konnte an demselben Zellmodell zeigen, dass es nicht nur zu einer erhöhten Expression von HSP27 sondern auch von p-HSP27 (ser78, ser82) kommt [135]. Bei unseren Untersuchungen konnten wir nicht nachweisen, dass der Phosphorylierungsstatus einen Einfluss auf die Chemosensibilisierung gegenüber Gemcitabin hat. So zeigten sowohl die humane Variante von HSP27, als auch die pseudo-phosphorylierte und nicht-phosphorylierbare Varianten von HSP27, das gleiche Ansprechen auf die Behandlung mit Gemcitabin. Somit änderte in unseren Versuchen nur

die Quantität der HSP27-Expression und nicht der Phosphorylierungsstatus die Sensitivität auf Gemcitabin.

Eine Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte durch einen TMA, durchgeführt an 86 Patientenproben aus Pankreaskarzinomen, zeigen, dass eine signifikante, positive Korrelation zwischen der Expression von HSP27 und dem Überleben unter der Therapie mit Gemcitabin besteht [131].

Im Literaturkontext kann man sagen, dass somit teilweise widersprüchliche Daten zum Einfluss von HSP27 auf die Chemosensitivität im Pankreaskarzinom existieren. Allerdings ist die Studienlage im Moment noch zu schwach, um diesen Zusammenhang endgültig entscheiden zu können. Vorstellbar wäre auch, dass das Pankreaskarzinom keine einheitliche Entität darstellt, sondern in Subgruppen gemäß der HSP27-Expression analysiert werden muss, um eventuelle Unterschiede im Therapieansprechen bei der Behandlung mit Gemcitabin genauer differenzieren zu können.

4.3.2 Einfluss von HSP27 auf die Radiosensitivität

Neben der Chemotherapie stellt auch die Radiochemotherapie eine etablierte Therapieform bei der Behandlung von regional-fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen dar. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die Expression von HSP27 einen Einfluss auf die Radiosensitivität von Pankreaskarzinomzellen hat.

Dabei zeigten sowohl die parentalen PL5-Zellen wie auch die HSP27-überexprimierenden Zellklonvarianten in unserem Zellmodell das gleiche Ansprechen auf die Therapie mit γ -Strahlung. Der Phosphorylierungsstatus von HSP27 hatte keinen Einfluss auf das Verhalten der Zellen unter Bestrahlung.

Der Einfluss von HSP27 auf die Radiosensitivität wurde in verschiedenen Tumorentitäten bereits untersucht. Fortin et al. arbeiteten an einem Modell mit human-HSP27-überexprimierenden O23-Zellen, einem tumorigenen Subklon der Chinese Hamster Lungenfibroblastenzelllinie CCL39. Nach Applikation therapeutischer Dosen γ -Strahlung konnten sie keinen Unterschied im Ansprechen im Vergleich zur Kontrolle beobachten [125]. Teimourian et al. konnten in einer humanen Prostatakarzinomzelllinie mittels Transfektion der Anti-sense-cDNA für humanes HSP27 eine HSP27-unterexprimierende Form der Zelllinie erzeugen. Diese Zelllinie wies in weiteren Untersuchungen eine deutlich höhere Radiosensitivität im Vergleich zu der Kontrollzelllinie auf [224]. Aloy et al. zeigten in zwei humanen T-Zell-Leukämiezelllinien, in denen eine stabile Überexpression von HSP27 erzeugt wurde, dass HSP27 protektiv gegenüber der Behandlung mit γ -Strahlung wirkt. Dies bestätigten sie durch Herabregulieren der HSP27-Expression mittels interferierender RNA in der Glioblastomzelllinie U87, der Prostatakarzinomzelllinie PC3 und einer neu etablierten Plattenepithelkarzinomzelllinie [225]. In Karzinomzelllinien, etabliert aus humanen Kopf-Hals-Tumoren, konnten Proteinvergleichsanalysen zwischen einer radiosensitiven und einer

radioresistenten Zelllinie zeigen, dass die radioresistente Zelllinie neben vier anderen Proteinen auch HSP27 deutlich überexprimiert [226]. Diese Ergebnisse für Kopf-Hals-Karzinome wurden durch Hadchity et al bestätigt. Sie konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mittels Xenografttumoren in Mäusen zeigen, dass eine Unterdrückung der HSP27-Expression mithilfe von OGX-427, einem Anti-sense-Oligonukleotid, eine erhöhte Radiosensitivität hervorruft [227].

Zusammenfassend kann man aus diesen Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten schlussfolgern, dass eine hohe HSP27-Expression entweder keinen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber γ -Strahlung hat oder eine Sensitivitätsminderung hervorruft. Jedoch ist die Datenlage für eine differenzierte Aussage über den Zusammenhang von HSP27-Expression und Strahlungssensitivität unzureichend. Zusätzlich scheint es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorentitäten zu geben.

Für das Pankreaskarzinom gab es bislang noch keine Studie, die den Zusammenhang zwischen HSP27 und Radiosensitivität untersuchte. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse legen nahe, dass HSP27 im Pankreaskarzinom keinen Einfluss auf die Radiosensitivität hat. Darüber hinaus scheint auch der Phosphorylierungsstatus von HSP27 keinen Unterschied im Ansprechen der Zellen auf die Behandlung mit γ -Strahlung zu verursachen.

4.4 Induzierbarkeit der HSP27-Expression

Es ist seit Langem belegt, dass Hitzeschockproteine durch Wärmeapplikation induziert werden können [91, 92]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies auch auf HSP27 in Pankreaskarzinomzellen zutrifft. Durch eine Behandlung mit Hitzeschock konnte sowohl in etablierten Zelllinien als auch in einer kurzzeitkultivierten Primärtumorzelllinie aus einem humanen Pankreaskarzinom (PPC) HSP27 signifikant überexprimiert werden.

Durch die Kombination aus Induktion von HSP27 mittels Hyperthermie und der daraus resultierenden erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber Gemcitabin ergibt sich somit ein neues Therapiekonzept.

Dieses Konzept wird auch durch die *in vitro* Studie von Adachi et al. bestätigt, welche für die Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1 und MIAPaCa-2 zeigte, dass die Kombination von Gemcitabin mit einer Hitzeschockbehandlung eine höhere Zytotoxizität verursacht [228]. Als möglicher Mechanismus wurde gezeigt, dass die Expression von HSP70 nach der Hitzebehandlung erhöht waren. Die Expression von HSP27 wurde nicht untersucht, könnte aber, wie aus unseren Daten hervorgeht, ebenso einen plausiblen Mechanismus darstellen.

Zusätzlich wird unsere Theorie von einer kürzlich erschienenen klinischen Studie gestützt. Ohguri et al. zeigten, dass das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom signifikant verlängert

waren, wenn zusätzlich zu der Kombination aus Gemcitabin und Radiotherapie regionale Hyperthermie angewendet wurde [229].

Auch Tschoep-Lechner et al. zeigten für Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, welche unter der Therapie mit Gemcitabin einen Progress gezeigt hatte, dass durch eine kombinierte Therapie mit Cisplatin/Gemcitabin und regionaler Hyperthermie eine erneute Tumorkontrolle von 4,3 Monaten und ein Gesamtüberleben von 12,9 Monaten erreicht werden kann [230].

Insgesamt bilden unsere experimentellen Daten eine grundlagenwissenschaftliche Basis für klinische Studien zur Kombination von regionaler Hyperthermie (mit konsekutiv gesteigerter HSP27-Expression im Tumor) und Gemcitabin-Behandlung für Pankreaskarzinompatienten. Dieses Konzept wird auch bereits durch erste vielversprechende klinische Daten zur Effektivität von Hyperthermie plus Gemcitabin unterstützt [229, 230].

4.5 Mechanismus der Gemcitabinsensitivität

Bei der Auswahl der untersuchten Mechanismen haben wir uns vor allem den Hauptaufgaben von HSP27 und Untersuchungen bezüglich des Verteilungsmusters von HSP27, des Phosphorylierungsstatus und der Aktin-HSP27-Interaktion gewidmet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Änderung der Gemcitabinsensitivität unabhängig vom HSP27-Verteilungsmuster und auch dessen Phosphorylierungsstatus ist. Ebenso zeigte sich auch bei der Untersuchung der Aktin-HSP27-Interaktion kein klarer Zusammenhang zwischen Gemcitabinsensitivierung und der Verteilung von HSP27 und den Aktinfilamenten.

4.5.1 Verteilungsstruktur von HSP27

Bei der Immunfluoreszenzfärbung von HSP27 und p-HSP27 zeigte sich in allen untersuchten Zellen eine vermehrt zytoplasmatische Expression von HSP27, während p-HSP27 vermehrt im Zellkern lokalisiert war. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Gemcitabin unabhängig vom HSP27-Phosphorylierungsstatus zu einer Umverteilung von HSP27 in den Zellkern führt.

Zu diesen Beobachtungen gibt es weiteren Studien an anderen Modellsystemen und mit unterschiedlichen Stressoren. Diese haben gezeigt, dass UVB-Strahlung und Zellstress durch Hyperthermie zu einer Phosphorylierung und Umverteilung von HSP27 in das nukleäre Kompartiment von Keratinozyten führt [231, 232]. Die Beobachtungen hinsichtlich der intrazellulären Verteilung und der Dominanz der zytoplasmatischen Anfärbung stimmen ebenfalls mit den Ergebnissen der oben genannten Studien überein.

Insgesamt kann man anhand dieser Untersuchungen zwar auf eine gewisse Stressreaktion der Zellen, jedoch nicht auf ein Gemcitabin-spezifisches Reaktionsmuster schließen.

4.5.2 Interaktion von HSP27 mit dem Aktinfilament

Die enge Beziehung zwischen HSP27 und Aktinfilamenten ist schon seit Anfang der 90er Jahre bekannt [233]. HSP27 erhöht die Stabilität der Aktinfilamente und verhindert dadurch deren Degradation. Diese Funktion scheint hauptsächlich von der phosphorylierten HSP27-Variante ausgeübt zu werden [105].

Durch eine Zerstörung der Aktinfilamente kommt es über einen noch nicht vollständig geklärten Weg (vermutlich durch Integrine) zu einer Bid-Aktivierung und Umverteilung und dadurch zu einer Cytochrom c-Freisetzung und zur Apoptose der Zellen [234]. Die Bid-abhängige Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien wird durch Bcl-2 antagonisiert [235].

Zu untersuchen bleibt, ob eine konstitutive Expression von HSP27 und eine zusätzliche Belastung der Zellen durch die Behandlung mit Gemcitabin, die Fluidität der Aktinfilamente hemmt und so die Apoptose der Zellen auslösen kann.

Allerdings zeigte sich bei unseren Untersuchungen der HSP27-Funktion in Pankreaskarzinomzellen keine direkte Verbindung zwischen HSP27 oder p-HSP27 und dem Aktinskelett der Zellen. So ließ sich zwar eine räumlich enge Beziehung zwischen HSP27 bzw. p-HSP27 und Aktin nachweisen, diese zeigte sich jedoch unabhängig vom HSP27-Phosphorylierungssatus und von der Gemcitabinbehandlung.

4.6 HSP27 als Tumormarker

Die Expression von HSP27 ist in einer Vielzahl von humanen Tumorentitäten erhöht und war deshalb Anlass zu vielen Studien, die HSP27 als Tumormarker evaluiert haben (siehe auch Tab. 8, Tab. 9 und [121]). Tumormarker können in drei Gruppen eingeteilt werden. Diagnostische Tumormarker können zur Diagnosefindung, der Differenzierung einzelner Erkrankungen und auch zur Stadieneinteilung der Erkrankung genutzt werden. Prognostische Tumormarker geben einen Anhalt über den zukünftigen Verlauf der Erkrankung. Prädiktive Tumormarker dienen der Einschätzung über den Nutzen oder Schaden einer geplanten Therapiemöglichkeit.

Der Nutzen von HSP27 als diagnostischer Tumormarker muss in den einzelnen Tumorentitäten differenziert betrachtet werden. So gibt es in einigen Tumorentitäten wie z. B. Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom, Kolonkarzinom und Hepatozellulärem Karzinom deutliche Hinweise für den Nutzen von HSP27 als Tumormarker. Allerdings zeigen sich in anderen Entitäten widersprüchliche Ergebnisse, z. B. Prostatakarzinom, Urothelkarzinom und ZNS-Tumore. Auch für das Pankreaskarzinom gibt es bisher nur wenige Studien, welche zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen.

So konnten Lu et al. mittels 2-D-Westerblot zeigen, dass HSP27 eine signifikant verminderte Expression im Pankreaskarzinom im Vergleich zu Normalgewebe aufwies [129].

Melle et al, Baylot et al und auch eine Studie aus unserer Arbeitsgruppe zeigten dagegen mittels Immunhistochemie, 2-D-Westerblotting und TMA eine Zunahme der HSP27-Expression im Karzinomgewebe im Vergleich zum Normalgewebe [130, 131, 155].

Jedoch scheint HSP27 als diagnostischer Tumormarker für das Pankreaskarzinom nur von nachrangiger Bedeutung zu sein. Grund dafür ist die Expression von HSP27 in sehr unterschiedlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel der chronischen Pankreatitis und daraus resultierend keiner Möglichkeit der Differenzierung zwischen den verschiedenen Erkrankungen durch die Messung der HSP27-Expression. Außerdem ist der Expressionsunterschied in den meisten Entitäten zu klein und kann daher nicht als diskriminativer Marker zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe herangezogen werden.

Betrachtet man die Rolle von HSP27 als prognostischem Tumormarker, so stellt man fest, dass die Ergebnisse stark von der untersuchten Tumorentität abhängen. Zum Beispiel ist eine hohe HSP27-Expression mit einer schlechten Prognose in Osteosarkomen [236], Hepatozellulären Karzinomen [167] und Prostatakarzinomen [117, 196] assoziiert, während eine hohe HSP27-Expression für eine gute Prognose bei Adenokarzinomen des Endometriums [160], Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus [188] und bei malignen fibrösen Histiozytomen [237] spricht. Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass HSP27 keinen Effekt auf die Prognose in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen [238], Harnblasenkarzinom [195] oder Nierenzellkarzinom [184] hat. Bei oralen Plattenepithelkarzinomen [239-242], Magenkarzinomen [243-245] und Ovarialkarzinomen [119, 123, 192, 194, 246, 247] ist die Datenlage nicht eindeutig. Ausreichende Studien zum Pankreaskarzinom fehlen noch.

Ein Tissue-Microarray aus unserer Arbeitsgruppe zeigt nun [131, 248], dass HSP27-Expression als unabhängigen Prognosefaktor für das Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom gewertet werden muss. Die Implikationen der HSP27-Expression auf die Prognose scheint allerdings, je nach untersuchter Tumorentität, sehr unterschiedlich zu sein und gibt damit Anlass zu der Annahme, dass der Einfluss der HSP27-Expression stark von weiteren Tumor-spezifischen Eigenschaften [121] abhängt, wie zum Beispiel vom Tumormilieu, genetischen und epigenetischen Veränderungen, Mutationsstatus und Proteinexpressionsprofil (z. B. Rezeptorstatus).

Zusätzlich zu seiner Funktion als prognostischer Marker, könnte HSP27 auch als prädiktiver Marker eine Rolle spielen, um in bestimmten Tumoren das Ansprechen auf Radio-, Radiochemo- oder Chemotherapie prospektiv evaluieren zu können [121, 249]. Zu den Tumorentitäten, in denen der prädiktive Nutzen von HSP27 postuliert wird, gehören das Harnblasenkarzinom [219], das Mammakarzinom [122, 250], das Ösophaguskarzinom [124, 216], das Ovarialkarzinom [119, 123] und das Prostatakarzinom [251]. In anderen Studien für

unterschiedliche Tumorentitäten findet sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen HSP27 und dem Therapieansprechen [125, 178, 215, 217, 237, 252, 253].

Für das Pankreaskarzinom fehlen Studien, welche die Rolle von HSP27 als prädiktiver Marker für die Chemosensitivität *in vivo* evaluieren.

Zur Untersuchung der prädiktiven Bedeutung von HSP27 wurde von Mori-Iwamoto et al. ein *in vitro*-Zellmodell etabliert. Basierend auf diesem Zellmodell wurden drei Studien veröffentlicht, die den Einfluss von HSP27 auf die Chemosensitivität auf Gemcitabin mittels Proteinexpressionsanalysen untersucht haben. In diesen Studien ließ sich eine vermehrte Expression von HSP27 und phosphoryliertem HSP27 in der Gemcitabin-resistenten Pankreaskarzinomzelllinie KLM1-R im Vergleich zu der Gemcitabin-sensitiven Kontrollzelllinie KLM1 nachweisen [133, 135]. Außerdem zeigte sich durch eine Interferon- γ -induzierte Verringerung der HSP27-Expression eine erhöhte Zytotoxizität bei der Behandlung mit Gemcitabin [134]. Da alle drei Studien allerdings am selben Zellmodell durchgeführt wurden, erscheinen zusätzliche Untersuchungen in einem unabhängigen Zellmodell zur Validierung dieser Daten nötig. Außerdem lässt sich für die ersten beiden Studien sagen, dass sie zwar die Schlussfolgerung zulassen, dass HSP27 bei Chemoresistenz vermehrt exprimiert wird, nicht jedoch, dass diese Expression ursächlich für die Chemoresistenz der Zellen ist.

Zusammenfassend konnte in dem hier etablierten *in vitro* HSP27-Überexpressionsmodell gezeigt werden, dass eine hohe Expression von HSP27 mit einer hohen Gemcitabinsensitivität einhergeht. Dem entsprechend fungiert HSP27 in unserem *in vitro*-Modell als prädiktiver Marker für die Behandlung mit Gemcitabin.

4.7 Ausblick

In Zukunft könnte die Kombination aus Hyperthermie und damit der Induktion von HSP27 und einer Gemcitabin-basierte Chemotherapie eine zusätzliche Therapieoption in der Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellen.

Durch die in Abschnitt 3.5 dieser Arbeit beschriebene Induzierbarkeit von HSP27 mittels Hitzeschock könnte es möglich sein, eine Gemcitabin-Sensitivierung von Tumorzellen zu bewirken. Eine Erhöhung der HSP27-Expression mittels Hyperthermie könnte somit ein besseres Ansprechen der Patienten auf die nachfolgende systemische Behandlung mit Gemcitabin bewirken.

Der Nutzen von Hyperthermie bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms wurde von zwei Studien bereits untersucht. So zeigten Tschoep et al. in einer Studie, dass regionale Hyperthermie in Kombination mit Gemcitabin und Cisplatin sogar auch als Zweitlinientherapie in Gemcitabin-refraktären Tumoren eine signifikante zytotoxische Aktivität aufweist [254]. Außerdem konnten Ohguri et al. zeigen, dass das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei Patienten mit lokal-fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

signifikant besser war, wenn eine Hyperthermiebehandlung in Kombination mit einer Gemcitabin-basierten Radiochemotherapie durchgeführt wurde [229].

Allerdings gibt es noch keine Studien, die den direkten Zusammenhang zwischen HSP27-Expression und Gemcitabinsensitivierung, der in dieser Arbeit *in vitro* untersucht wurde, auch *in vivo* belegen.

Darüber hinaus belegen unsere Daten, dass eine hohe HSP27-Expression, zumindest in unserem *in vitro*-Modell, mit einer gesteigerten Gemcitabinsensitivität einhergeht. Falls diese Daten in anderen Modellsystemen und anderen Zelllinien in zukünftigen Untersuchungen reproduzierbar und damit generalisierbar wären, erscheint eine klinische Implementation von HSP27 als prädiktivem Marker für das Ansprechen auf eine Gemcitabin-basierte Therapie im Sinne einer Patientenstratifizierung anhand der HSP27-Expression im Pankreaskarzinom vielversprechend.

5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist die vierhäufigste krebsassoziierte Todesursache in der westlichen Welt. Auf Grund der späten Diagnose und der begrenzten Therapiemöglichkeiten liegt die Prognose bei Erstdiagnose bei durchschnittlich sechs Monaten. Bisher gibt es für das Pankreaskarzinom wenig verlässliche Biomarker. In der klinischen Routine wird vor allem CA 19-9 sowohl als diagnostischer als auch als prognostischer Biomarker eingesetzt [81, 88, 89].

Wir konnten in einem Tissue-Microarray an 86 Patientenproben zeigen, dass eine hohe HSP27-Expression eine positive prognostische Bedeutung im Pankreaskarzinom hat. Aufbauend darauf sollte nun untersucht werden, ob HSP27 auch als prädiktiver Biomarker zur Abschätzung der Wirksamkeit definierter Therapieoptionen vor Behandlungsbeginn dienen könnte. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit mittels stabiler Transfektion unterschiedlicher HSP27-Konstrukte ein Zellmodell HSP27-überexprimierender Pankreaskarzinomzellen erzeugt und konsekutiv in Chemo- und Radiosensitivitätsstudien charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive HSP27-Überexpression spezifisch die Chemosensitivität gegenüber Gemcitabin, nicht aber gegenüber anderen Chemotherapeutika oder Bestrahlung erhöhen kann. Diese Chemosensitivierung war unabhängig vom HSP27-Phosphorylierungsstatus. Im Rahmen mechanistischer Zusatzuntersuchungen im etablierten HSP27-Modellsystem konnten multiple Mechanismen, insbesondere die HSP27-abhängige Integrität des Aktin-Zytoskeletts, als Ursache für die beobachteten Effekte ausgeschlossen werden. Die zugrunde liegende Ursache wird derzeit in weiterführenden Analysen eingehend untersucht.

Des Weiteren konnte in mehreren etablierten Pankreaskarzinomzelllinien (PL5 und PL11) sowie auch in kurzzeitkultivierten Primärkulturen von Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden, dass Hyperthermiebehandlung die Expression von HSP27 auch in Pankreaskarzinomzellen induziert und damit diese Zellen auf die Behandlung mit Gemcitabin sensibilisieren könnte. Die daraus ableitbare Hypothese, dass eine Kombinationstherapie aus HSP27-induzierender Hyperthermiebehandlung und Gemcitabin auch im klinischen Setting eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit Pankreaskarzinom darstellen könnte, wird bereits durch mehrere klinische Arbeiten unterstützt.

Schließlich könnten unsere Daten, falls sie sich in zukünftigen Studien in anderen Modellsystemen reproduzieren und damit generalisieren lassen, im klinischen Setting zu einer Patientenstratifizierung entsprechend des HSP27-Expressionsstatus führen und HSP27 somit als prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Gemcitabin definieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Böcker, W., et al., *Pathologie*. Vol. 4. 2008: Urban & Fischer Verlag. 436-437; 838.
2. Ferlay, J., D.M. Parkin, and E. Steliarova-Foucher, *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008*. Eur J Cancer. **46**(4): p. 765-81.
3. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin. **60**(5): p. 277-300.
4. Jemal, A., American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2010*. Atlanta: American Cancer Society; 2010.
5. Krejs, G.J., *Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors*. Dig Dis. **28**(2): p. 355-8.
6. Altekruse SF, et al., *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007*. National Cancer Institute. Bethesda, MD. based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.
7. Li, D., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1049-57.
8. Hassan, M.M., et al., *Risk factors for pancreatic cancer: case-control study*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(12): p. 2696-707.
9. Falk, R.T., et al., *Life-style risk factors for pancreatic cancer in Louisiana: a case-control study*. Am J Epidemiol, 1988. **128**(2): p. 324-36.
10. Bonifazi, M., et al., *Aspirin use and pancreatic cancer risk*. Eur J Cancer Prev. **19**(5): p. 352-4.
11. MacMahon, B., et al., *Coffee and cancer of the pancreas*. N Engl J Med, 1981. **304**(11): p. 630-3.
12. Bhoo-Pathy, N., et al., *Intake of coffee, decaffeinated coffee, or tea does not affect risk for pancreatic cancer: results from the European Prospective Investigation into Nutrition and Cancer Study*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013. **11**(11): p. 1486-92.
13. Turati, F., et al., *A meta-analysis of coffee consumption and pancreatic cancer*. Ann Oncol, 2012. **23**(2): p. 311-8.
14. Batty, G.D., et al., *Risk factors for pancreatic cancer mortality: extended follow-up of the original Whitehall Study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(2): p. 673-5.
15. Genkinger, J.M., et al., *Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(3): p. 765-76.
16. Landi, S., *Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: A review of the literature*. Mutat Res, 2009. **681**(2-3): p. 299-307.
17. Lowenfels, A.B. and P. Maisonneuve, *Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2006. **20**(2): p. 197-209.
18. Wolpin, B.M., et al., *ABO blood group and the risk of pancreatic cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(6): p. 424-31.
19. Shi, C., R.H. Hruban, and A.P. Klein, *Familial pancreatic cancer*. Arch Pathol Lab Med, 2009. **133**(3): p. 365-74.
20. Fernandez, E., et al., *Family history and the risk of liver, gallbladder, and pancreatic cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994. **3**(3): p. 209-12.
21. Ghadirian, P., et al., *Reported family aggregation of pancreatic cancer within a population-based case-control study in the Francophone community in Montreal, Canada*. Int J Pancreatol, 1991. **10**(3-4): p. 183-96.
22. Silverman, D.T., et al., *Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer*. Br J Cancer, 1999. **80**(11): p. 1830-7.
23. Hruban, R.H., et al., *Genetics of pancreatic cancer. From genes to families*. Surg Oncol Clin N Am, 1998. **7**(1): p. 1-23.
24. Wormann, S.M. and H. Algul, *Risk Factors and Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 282.
25. Rustgi, A.K., *Familial pancreatic cancer: genetic advances*. Genes Dev, 2014. **28**(1): p. 1-7.
26. Ghadirian, P., et al., *Food habits and pancreatic cancer: a case-control study of the Francophone community in Montreal, Canada*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. **4**(8): p. 895-9.

27. Ji, B.T., et al., *Dietary factors and the risk of pancreatic cancer: a case-control study in Shanghai China*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. **4**(8): p. 885-93.
28. Stolzenberg-Solomon, R.Z., et al., *Dietary and other methyl-group availability factors and pancreatic cancer risk in a cohort of male smokers*. Am J Epidemiol, 2001. **153**(7): p. 680-7.
29. Feldmann, G., et al., *Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2007. **14**(3): p. 224-32.
30. Hruban, R.H., et al., *Precursors to pancreatic cancer*. Gastroenterol Clin North Am, 2007. **36**(4): p. 831-49, vi.
31. Hruban, R.H., A. Maitra, and M. Goggins, *Update on pancreatic intraepithelial neoplasia*. Int J Clin Exp Pathol, 2008. **1**(4): p. 306-16.
32. Takaori, K., *Current understanding of precursors to pancreatic cancer*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2007. **14**(3): p. 217-23.
33. Maitra, A. and R.H. Hruban, *Pancreatic cancer*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 157-88.
34. Macgregor-Das, A.M. and C.A. Iacobuzio-Donahue, *Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis*. J Surg Oncol, 2013. **107**(1): p. 8-14.
35. Caldas, C., et al., *Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 27-32.
36. Schutte, M., et al., *Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas*. Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3126-30.
37. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
38. Hahn, S.A., et al., *DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1*. Science, 1996. **271**(5247): p. 350-3.
39. Tascilar, M., et al., *The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(12): p. 4115-21.
40. Jones, S., et al., *Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1801-6.
41. Hamilton S.R. and A.L.A. (Eds.), *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. IARC Press: Lyon 2000.
42. Greenberg, R.E., S. Bank, and B. Stark, *Adenocarcinoma of the pancreas producing pancreatitis and pancreatic abscess*. Pancreas, 1990. **5**(1): p. 108-13.
43. Monno, S., et al., *Exocrine pancreatic cancer with humoral hypercalcemia*. Am J Gastroenterol, 1984. **79**(2): p. 128-32.
44. Hidalgo, M., *Pancreatic cancer*. N Engl J Med. **362**(17): p. 1605-17.
45. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF, S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, 2013.
46. Rickes, S., et al., *Differentiation of pancreatic tumours by conventional ultrasound, unenhanced and echo-enhanced power Doppler sonography*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(11): p. 1313-20.
47. Karlson, B.M., et al., *Abdominal US for diagnosis of pancreatic tumor: prospective cohort analysis*. Radiology, 1999. **213**(1): p. 107-11.
48. Karmazanovsky, G., et al., *Pancreatic head cancer: accuracy of CT in determination of resectability*. Abdom Imaging, 2005. **30**(4): p. 488-500.
49. Roche, C.J., et al., *CT and pathologic assessment of prospective nodal staging in patients with ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas*. AJR Am J Roentgenol, 2003. **180**(2): p. 475-80.
50. Andersson, R., C.E. Vagianos, and R.C. Williamson, *Preoperative staging and evaluation of resectability in pancreatic ductal adenocarcinoma*. HPB (Oxford), 2004. **6**(1): p. 5-12.
51. David, O., et al., *Pancreatic masses: a multi-institutional study of 364 fine-needle aspiration biopsies with histopathologic correlation*. Diagn Cytopathol, 1998. **19**(6): p. 423-7.

52. Harsha, H.C., et al., *A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer*. PLoS Med, 2009. **6**(4): p. e1000046.
53. Hess, V., et al., *CA 19-9 tumour-marker response to chemotherapy in patients with advanced pancreatic cancer enrolled in a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2008. **9**(2): p. 132-8.
54. Ferrone, C.R., et al., *Perioperative CA19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(18): p. 2897-902.
55. Berger, A.C., et al., *Postresection CA 19-9 predicts overall survival in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant chemoradiation: a prospective validation by RTOG 9704*. J Clin Oncol, 2008. **26**(36): p. 5918-22.
56. Tsavaris, N., et al., *CEA and CA-19.9 serum tumor markers as prognostic factors in patients with locally advanced (unresectable) or metastatic pancreatic adenocarcinoma: a retrospective analysis*. J Chemother, 2009. **21**(6): p. 673-80.
57. Haas, M., et al., *Prognostic relevance of CA 19-9, CEA, CRP, and LDH kinetics in patients treated with palliative second-line therapy for advanced pancreatic cancer*. Tumour Biol. **31**(4): p. 351-7.
58. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol. **17**(6): p. 1471-4.
59. Bilimoria, K.Y., et al., *Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database*. Cancer, 2007. **110**(4): p. 738-44.
60. Neuzillet, C., A. Sauvanet, and P. Hammel, *Prognostic factors for resectable pancreatic adenocarcinoma*. J Visc Surg, 2011. **148**(4): p. e232-43.
61. Shaib, Y., et al., *The impact of curative intent surgery on the survival of pancreatic cancer patients: a U.S. Population-based study*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(7): p. 1377-82.
62. Lieberman, M.D., et al., *Relation of perioperative deaths to hospital volume among patients undergoing pancreatic resection for malignancy*. Ann Surg, 1995. **222**(5): p. 638-45.
63. Slidell, M.B., et al., *Impact of total lymph node count and lymph node ratio on staging and survival after pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma: a large, population-based analysis*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(1): p. 165-74.
64. Hernandez, J.M., et al., *CA 19-9 velocity predicts disease-free survival and overall survival after pancreatectomy of curative intent*. J Gastrointest Surg, 2009. **13**(2): p. 349-53.
65. Neoptolemos, J.P., et al., *A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(12): p. 1200-10.
66. Oettle, H., et al., *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial*. Jama, 2007. **297**(3): p. 267-77.
67. Yip, D., et al., *Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2006. **3**: p. CD002093.
68. Burris, H.A., 3rd, et al., *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*. J Clin Oncol, 1997. **15**(6): p. 2403-13.
69. Sultana, A., et al., *Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(18): p. 2607-15.
70. Heinemann, V., et al., *Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 82.
71. Cunningham, D., et al., *Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(33): p. 5513-8.

72. Moore, M.J., et al., *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. J Clin Oncol, 2007. **25**(15): p. 1960-6.
73. Van Cutsem, E., et al., *Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(13): p. 2231-7.
74. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2011. **364**(19): p. 1817-25.
75. Von Hoff, D.D., et al., *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*. N Engl J Med, 2013. **369**(18): p. 1691-703.
76. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers?* Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(6): p. 463-6.
77. WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. . Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>., 2011.
78. Winter, J.M., C.J. Yeo, and J.R. Brody, *Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer*. J Surg Oncol, 2013. **107**(1): p. 15-22.
79. Chen, R., et al., *Pilot study of blood biomarker candidates for detection of pancreatic cancer*. Pancreas, **39**(7): p. 981-8.
80. La'ulu, S.L. and W.L. Roberts, *Performance characteristics of five automated CA 19-9 assays*. Am J Clin Pathol, 2007. **127**(3): p. 436-40.
81. Goonetilleke, K.S. and A.K. Siriwardena, *Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer*. Eur J Surg Oncol, 2007. **33**(3): p. 266-70.
82. Duffy, M.J., *CA 19-9 as a marker for gastrointestinal cancers: a review*. Ann Clin Biochem, 1998. **35** (Pt 3): p. 364-70.
83. Duffy, M.J., et al., *Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report*. Ann Oncol, 2010. **21**(3): p. 441-7.
84. Wang, Y., et al., *Diagnostic value of mucins (MUC1, MUC2 and MUC5AC) expression profile in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens of the pancreas*. Int J Cancer, 2007. **121**(12): p. 2716-22.
85. Bloomston, M., et al., *MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis*. Jama, 2007. **297**(17): p. 1901-8.
86. Mu, D.Q., Y.S. Peng, and Q.J. Xu, *Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(4): p. 471-5.
87. Duffy, M.J., et al., *Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report*. Ann Oncol, 2009. **21**(3): p. 441-7.
88. Boeck, S., et al., *Prognostic and therapeutic significance of carbohydrate antigen 19-9 as tumor marker in patients with pancreatic cancer*. Oncology, 2006. **70**(4): p. 255-64.
89. Lundin, J., et al., *The prognostic value of preoperative serum levels of CA 19-9 and CEA in patients with pancreatic cancer*. Br J Cancer, 1994. **69**(3): p. 515-9.
90. Garcea, G., et al., *Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review*. Eur J Cancer, 2005. **41**(15): p. 2213-36.
91. Ritossa, F., *A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in Drosophila*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1962. **18**(12): p. 571-573.
92. Peterson, N.S., G. Moller, and H.K. Mitchell, *Genetic mapping of the coding regions for three heat-shock proteins in Drosophila melanogaster*. Genetics, 1979. **92**(3): p. 891-902.
93. Lindquist, S. and E.A. Craig, *The heat-shock proteins*. Annu Rev Genet, 1988. **22**: p. 631-77.
94. Michel, G.P. and J. Starka, *Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of Zymomonas mobilis*. J Bacteriol, 1986. **165**(3): p. 1040-2.

95. Georgopoulos, C. and W.J. Welch, *Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones*. Annu Rev Cell Biol, 1993. **9**: p. 601-34.
96. Lindquist, S., *The heat-shock response*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 1151-91.
97. MacRae, T.H., *Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(6): p. 899-913.
98. Kriehuber, T., et al., *Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins*. Faseb J. **24**(10): p. 3633-42.
99. Kostenko, S. and U. Moens, *Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(20): p. 3289-307.
100. Garrido, C., *Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers*. Cell Death Differ, 2002. **9**(5): p. 483-5.
101. Garrido, C., et al., *Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties*. Cell Cycle, 2006. **5**(22): p. 2592-601.
102. Soldes, O.S., et al., *Differential expression of Hsp27 in normal oesophagus, Barrett's metaplasia and oesophageal adenocarcinomas*. Br J Cancer, 1999. **79**(3-4): p. 595-603.
103. Concannon, C.G., A.M. Gorman, and A. Samali, *On the role of Hsp27 in regulating apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(1): p. 61-70.
104. Lavoie, J.N., et al., *Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 24210-4.
105. Huot, J., et al., *HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress*. Cancer Res, 1996. **56**(2): p. 273-9.
106. Ehrnsperger, M., et al., *Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation*. Embo J, 1997. **16**(2): p. 221-9.
107. Cuesta, R., G. Laroia, and R.J. Schneider, *Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes*. Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1460-70.
108. Charette, S.J., et al., *Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(20): p. 7602-12.
109. Theriault, J.R., et al., *Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23463-71.
110. Landry, J., et al., *Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II*. J Biol Chem, 1992. **267**(2): p. 794-803.
111. Schafer, C., et al., *A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 24173-80.
112. Schultz, H., K. Engel, and M. Gaestel, *PMA-induced activation of the p42/44ERK- and p38RK-MAP kinase cascades in HL-60 cells is PKC dependent but not essential for differentiation to the macrophage-like phenotype*. J Cell Physiol, 1997. **173**(3): p. 310-8.
113. Butt, E., et al., *Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7108-13.
114. Lambert, H., et al., *HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9378-85.
115. Jäättelä, M., *Escaping Cell Death: Survival Proteins in Cancer*. Experimental Cell Research, 1999. **248**: p. 30-43.
116. Oesterreich, S., et al., *The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines*. Cancer Res, 1993. **53**(19): p. 4443-8.

117. Cornford, P.A., et al., *Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 7099-105.
118. Ehrenfried, J.A., et al., *Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers*. Surg Oncol, 1995. **4**(4): p. 197-203.
119. Langdon, S.P., et al., *Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(12): p. 1603-9.
120. Hsu, P.L. and S.M. Hsu, *Abundance of heat shock proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in malignant cells of Hodgkin's disease*. Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5507-13.
121. Ciocca, D.R. and S.K. Calderwood, *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*. Cell Stress Chaperones, 2005. **10**(2): p. 86-103.
122. Vargas-Roig, L.M., et al., *Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy*. Int J Cancer, 1998. **79**(5): p. 468-75.
123. Arts, H.J., et al., *Heat-shock-protein-27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma: relation in response to chemotherapy and prognosis*. Int J Cancer, 1999. **84**(3): p. 234-8.
124. Takeno, S., et al., *Immunohistochemical and clinicopathologic analysis of response to neoadjuvant therapy for esophageal squamous cell carcinoma*. Dis Esophagus, 2001. **14**(2): p. 149-54.
125. Fortin, A., et al., *Overexpression of the 27 KDa heat shock protein is associated with thermoresistance and chemoresistance but not with radioresistance*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. **46**(5): p. 1259-66.
126. Schafer, C. and J.A. Williams, *Stress kinases and heat shock proteins in the pancreas: possible roles in normal function and disease*. J Gastroenterol, 2000. **35**(1): p. 1-9.
127. Rakonczay, Z., Jr., et al., *Heat shock proteins and the pancreas*. J Cell Physiol, 2003. **195**(3): p. 383-91.
128. Kubisch, C., et al., *Overexpression of heat shock protein Hsp27 protects against cerulein-induced pancreatitis*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 275-86.
129. Lu, Z., et al., *Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3975-88.
130. Melle, C., et al., *Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker*. Clin Chem, 2007. **53**(4): p. 629-35.
131. Schafer, C., et al., *Heat shock protein 27 as a prognostic and predictive biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma*. J Cell Mol Med, 2012.
132. Liao, W.C., et al., *Serum heat shock protein 27 is increased in chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma*. Pancreas, 2009. **38**(4): p. 422-6.
133. Mori-Iwamoto, S., et al., *Proteomics finding heat shock protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine*. Int J Oncol, 2007. **31**(6): p. 1345-50.
134. Mori-Iwamoto, S., et al., *Interferon-gamma down-regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and helps in the cytotoxic effect of gemcitabine*. Pancreas, 2009. **38**(2): p. 224-6.
135. Taba, K., et al., *Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells*. Anticancer Res, 2010. **30**(7): p. 2539-43.
136. Ogris, M., et al., *Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes*. J Control Release, 2003. **91**(1-2): p. 173-81.
137. Mehlen, P., et al., *Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **241**(1): p. 187-92.

138. Schafer, C., et al., *HSP27 expression regulates CCK-induced changes of the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. C1032-43.
139. Kunkel, T.A., J.D. Roberts, and R.A. Zakour, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*. Methods Enzymol, 1987. **154**: p. 367-82.
140. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.
141. Mandel, M. and A. Higa, *Calcium-dependent bacteriophage DNA infection*. J Mol Biol, 1970. **53**(1): p. 159-62.
142. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
143. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T.H. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 2. 1989, Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
144. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
145. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
146. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
147. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
148. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
149. Burnette, W.N., "Western blotting": *electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
150. Garrido, C., et al., *HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs*. Cancer Res, 1997. **57**(13): p. 2661-7.
151. Katz, D., et al., *Increased efficiency for performing colony formation assays in 96-well plates: novel applications to combination therapies and high-throughput screening*. Biotechniques, 2008. **44**(2): p. ix-xiv.
152. Ciocca, D.R., et al., *Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs*. Cancer Res, 1992. **52**(13): p. 3648-54.
153. Oba, M., et al., *IFN-gamma down-regulates Hsp27 and enhances hyperthermia-induced tumor cell death in vitro and tumor suppression in vivo*. Int J Oncol, 2008. **32**(6): p. 1317-24.
154. Tanaka, Y., et al., *Paclitaxel inhibits expression of heat shock protein 27 in ovarian and uterine cancer cells*. Int J Gynecol Cancer, 2004. **14**(4): p. 616-20.
155. Baylot, V., et al., *OGX-427 inhibits tumor progression and enhances gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer*. Cell Death Dis, 2011. **2**: p. e221.
156. Wang, W., et al., *The expression and clinical significance of CLIC1 and HSP27 in lung adenocarcinoma*. Tumour Biol, 2011. **32**(6): p. 1199-208.
157. Malusecka, E., et al., *Stress proteins HSP27 and HSP70i predict survival in non-small cell lung carcinoma*. Anticancer Res, 2008. **28**(1B): p. 501-6.
158. Zagorianakou, N., et al., *Immunohistochemical expression of heat shock protein 27, in normal hyperplastic and neoplastic endometrium: correlation with estrogen and progesterone receptor status, p53, pRb and proliferation associated indices (PCNA, MIB1)*. Eur J Gynaecol Oncol, 2003. **24**(3-4): p. 299-304.
159. Wataba, K., et al., *Over-expression of heat shock proteins in carcinogenic endometrium*. Int J Cancer, 2001. **91**(4): p. 448-56.
160. Geisler, J.P., et al., *A study of heat shock protein 27 in endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1999. **72**(3): p. 347-50.

161. Piura, B., et al., [Heat shock proteins and malignancies of the female genital tract]. Harefuah, 2002. **141**(11): p. 969-72, 1010, 1009.
162. Delhaye, M., et al., Expression of 27-kD heat-shock protein isoforms in human neoplastic and nonneoplastic liver tissues. Hepatology, 1992. **16**(2): p. 382-9.
163. Luk, J.M., et al., Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. Proteomics, 2006. **6**(3): p. 1049-57.
164. Song, H.Y., et al., Proteomic analysis on metastasis-associated proteins of human hepatocellular carcinoma tissues. J Cancer Res Clin Oncol, 2006. **132**(2): p. 92-8.
165. Yasuda, E., et al., Attenuated phosphorylation of heat shock protein 27 correlates with tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(1): p. 337-42.
166. Harimoto, N., et al., The role of heat shock protein 27 expression in hepatocellular carcinoma in Japan: special reference to the difference between hepatitis B and C. Liver Int, 2004. **24**(4): p. 316-21.
167. King, K.L., et al., Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival. Cancer, 2000. **88**(11): p. 2464-70.
168. Wang, F., et al., Immunohistochemical detection of HSP27 and hnRNP K as prognostic and predictive biomarkers for colorectal cancer. Med Oncol, 2012. **29**(3): p. 1780-8.
169. Yu, Z., et al., Clinical significance of HSP27 expression in colorectal cancer. Mol Med Rep, 2010. **3**(6): p. 953-8.
170. Bauer, K., et al., High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer. Cell Oncol (Dordr), 2012. **35**(3): p. 197-205.
171. Xiao, K., et al., Study of heat shock protein HSP90 alpha, HSP70, HSP27 mRNA expression in human acute leukemia cells. J Tongji Med Univ, 1996. **16**(4): p. 212-6.
172. Sedlackova, L., et al., Heat-shock protein expression in leukemia. Tumour Biol, 2011. **32**(1): p. 33-44.
173. Stammler, G. and M. Volm, Expression of heat shock proteins, glutathione peroxidase and catalase in childhood acute lymphoblastic leukemia and nephroblastoma. Cancer Lett, 1996. **99**(1): p. 35-42.
174. Kasimir-Bauer, S., et al., Impact of the expression of P glycoprotein, the multidrug resistance-related protein, bcl-2, mutant p53, and heat shock protein 27 on response to induction therapy and long-term survival in patients with de novo acute myeloid leukemia. Exp Hematol, 2002. **30**(11): p. 1302-8.
175. He, Q., et al., Separation and identification of differentially expressed nuclear matrix proteins in breast carcinoma forming. Acta Oncol, 2010. **49**(1): p. 76-84.
176. Mlynarczyk-Liszka, J., et al., HSP27 diagnostic utility in the fine needle aspirate of breast. Correlation with progesterone and estrogen receptors. Neoplasma, 2009. **56**(4): p. 357-60.
177. Keeling, J. and G.T. McKee, Heat shock protein (HSP)27: a further refinement in the diagnosis of suspicious fine needle aspirates of breast. Cytopathology, 1999. **10**(1): p. 40-9.
178. Damstrup, L., et al., Immunocytochemical determination of the estrogen-regulated proteins Mr 24,000, Mr 52,000 and DF3 breast cancer associated antigen: clinical value in advanced breast cancer and correlation with estrogen receptor. Ann Oncol, 1992. **3**(1): p. 71-7.
179. Love, S. and R.J. King, A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. Br J Cancer, 1994. **69**(4): p. 743-8.
180. Tetu, B., et al., Prognostic significance of heat-shock protein-27 in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. Breast Cancer Res Treat, 1995. **36**(1): p. 93-7.

181. Oesterreich, S., et al., *The small heat shock protein HSP27 is not an independent prognostic marker in axillary lymph node-negative breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(7): p. 1199-206.
182. Ioachim, E., et al., *Clinicopathological study of the expression of hsp27, pS2, cathepsin D and metallothionein in primary invasive breast cancer*. Breast, 2003. **12**(2): p. 111-9.
183. Takashi, M., et al., *Different concentrations of two small stress proteins, alphaB crystallin and HSP27 in human urological tumor tissues*. Urol Res, 1998. **26**(6): p. 395-9.
184. Erkizan, O., et al., *Significance of heat shock protein-27 expression in patients with renal cell carcinoma*. Urology, 2004. **64**(3): p. 474-8.
185. Sarto, C., et al., *Expression of heat shock protein 27 in human renal cell carcinoma*. Proteomics, 2004. **4**(8): p. 2252-60.
186. Valera, V.A., et al., *Protein expression profiling in the spectrum of renal cell carcinomas*. J Cancer, 2010. **1**: p. 184-96.
187. Lambot, M.A., et al., *Overexpression of 27-kDa heat shock protein relates to poor histological differentiation in human oesophageal squamous cell carcinoma*. Histopathology, 2000. **36**(4): p. 326-30.
188. Kawanishi, K., et al., *Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus*. Cancer, 1999. **85**(8): p. 1649-57.
189. Nakajima, M., et al., *Significant correlation between expression of heat shock proteins 27, 70 and lymphocyte infiltration in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Lett, 2002. **178**(1): p. 99-106.
190. Slotta-Huspenina, J., et al., *Evidence of prognostic relevant expression profiles of heat-shock proteins and glucose-regulated proteins in oesophageal adenocarcinomas*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41420.
191. Song, T.F., et al., *Small interfering RNA-mediated silencing of heat shock protein 27 (HSP27) Increases chemosensitivity to paclitaxel by increasing production of reactive oxygen species in human ovarian cancer cells (HO8910)*. J Int Med Res, 2009. **37**(5): p. 1375-88.
192. Elpek, G.O., et al., *Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries*. APMIS, 2003. **111**(4): p. 523-30.
193. Geisler, J.P., et al., *HSP27 in patients with ovarian carcinoma: still an independent prognostic indicator at 60 months follow-up*. Eur J Gynaecol Oncol, 2004. **25**(2): p. 165-8.
194. Geisler, J.P., et al., *Heat shock protein 27: an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 1998. **69**(1): p. 14-6.
195. Storm, F.K., D.M. Mahvi, and K.W. Gilchrist, *Hsp-27 has no diagnostic or prognostic significance in prostate or bladder cancers*. Urology, 1993. **42**(4): p. 379-82.
196. Foster, C.S., et al., *Hsp-27 expression at diagnosis predicts poor clinical outcome in prostate cancer independent of ETS-gene rearrangement*. Br J Cancer, 2009. **101**(7): p. 1137-44.
197. Miyazaki, T., et al., *Predictors of response to chemo-radiotherapy and radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma*. Anticancer Res, 2005. **25**(4): p. 2749-55.
198. Shen, G., et al., *Downregulated expression of HSP27 in human low-grade glioma tissues discovered by a quantitative proteomic analysis*. Proteome Sci, 2010. **8**: p. 17.
199. Strik, H.M., et al., *Heat shock protein expression in human gliomas*. Anticancer Res, 2000. **20**(6B): p. 4457-62.
200. Assimakopoulou, M. and J. Varakis, *AP-1 and heat shock protein 27 expression in human astrocytomas*. J Cancer Res Clin Oncol, 2001. **127**(12): p. 727-32.
201. Hitotsumatsu, T., et al., *Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha B-crystallin) in human brain tumors*. Cancer, 1996. **77**(2): p. 352-61.

202. Ciocca, D.R., A.P. Arrigo, and S.K. Calderwood, *Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update*. Arch Toxicol, 2013. **87**(1): p. 19-48.
203. Gallmeier, E. and S.E. Kern, *Targeting Fanconi anemia/BRCA2 pathway defects in cancer: the significance of preclinical pharmacogenomic models*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(1): p. 4-10.
204. Kuramitsu, Y., et al., *Identification of up- and down-regulated proteins in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. Anticancer Res, 2010. **30**(9): p. 3367-72.
205. Birmingham, A., et al., *3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets*. Nat Methods, 2006. **3**(3): p. 199-204.
206. Fedorov, Y., et al., *Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype*. RNA, 2006. **12**(7): p. 1188-96.
207. Gibbons, N.B., et al., *Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis*. Prostate, 2000. **45**(1): p. 58-65.
208. Hansen, R.K., et al., *Hsp27 overexpression inhibits doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 1999. **56**(2): p. 187-96.
209. Urbani, A., et al., *A proteomic investigation into etoposide chemo-resistance of neuroblastoma cell lines*. Proteomics, 2005. **5**(3): p. 796-804.
210. Berrieman, H.K., et al., *Hsp27 may allow prediction of the response to single-agent vinorelbine chemotherapy in non-small cell lung cancer*. Oncol Rep, 2006. **15**(1): p. 283-6.
211. Sharma, A., A.K. Upadhyay, and M.K. Bhat, *Inhibition of Hsp27 and Hsp40 potentiates 5-fluorouracil and carboplatin mediated cell killing in hepatoma cells*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(22): p. 2106-13.
212. Hayashi, R., et al., *Suppression of heat shock protein 27 expression promotes 5-fluorouracil sensitivity in colon cancer cells in a xenograft model*. Oncol Rep, 2012. **28**(4): p. 1269-74.
213. Kasimir-Bauer, S., et al., *In acute myeloid leukemia, coexpression of at least two proteins, including P-glycoprotein, the multidrug resistance-related protein, bcl-2, mutant p53, and heat-shock protein 27, is predictive of the response to induction chemotherapy*. Exp Hematol, 1998. **26**(12): p. 1111-7.
214. Chauhan, D., et al., *Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6174-7.
215. Ciocca, D.R., et al., *Heat shock proteins hsp27 and hsp70: lack of correlation with response to tamoxifen and clinical course of disease in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer (a Southwest Oncology Group Study)*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(5): p. 1263-6.
216. Langer, R., et al., *Protein expression profiling in esophageal adenocarcinoma patients indicates association of heat-shock protein 27 expression and chemotherapy response*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(24): p. 8279-87.
217. Germain, I., et al., *Markers of chemoresistance in ovarian carcinomas: an immunohistochemical study of 86 cases*. Int J Gynecol Pathol, 1996. **15**(1): p. 54-62.
218. Heinrich, J.C., et al., *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): p. 1349-61.
219. Kassem, H., et al., *A potential role of heat shock proteins and nicotinamide N-methyl transferase in predicting response to radiation in bladder cancer*. Int J Cancer, 2002. **101**(5): p. 454-60.
220. Kamada, M., et al., *Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(1): p. 299-308.
221. Hermission, M., et al., *Expression and functional activity of heat shock proteins in human glioblastoma multiforme*. Neurology, 2000. **54**(6): p. 1357-65.
222. Hsu, H.S., et al., *Chemoresistance of lung cancer stemlike cells depends on activation of Hsp27*. Cancer, 2011.

223. Kuramitsu, Y., et al., *Heat-shock Protein 27 Plays the Key Role in Gemcitabine-resistance of Pancreatic Cancer Cells*. Anticancer Res. **32**(6): p. 2295-9.
224. Teimourian, S., et al., *Down-regulation of Hsp27 radiosensitizes human prostate cancer cells*. Int J Urol, 2006. **13**(9): p. 1221-5.
225. Aloy, M.T., et al., *Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **70**(2): p. 543-53.
226. Lee, Y.S., et al., *Proteomic analysis of two head and neck cancer cell lines presenting different radiation sensitivity*. Acta Otolaryngol, 2008. **128**(1): p. 86-92.
227. Hadchity, E., et al., *Heat shock protein 27 as a new therapeutic target for radiation sensitization of head and neck squamous cell carcinoma*. Mol Ther, 2009. **17**(8): p. 1387-94.
228. Adachi, S., et al., *Effect of hyperthermia combined with gemcitabine on apoptotic cell death in cultured human pancreatic cancer cell lines*. Int J Hyperthermia, 2009. **25**(3): p. 210-9.
229. Ohguri, T., et al., *Concurrent chemoradiotherapy with gemcitabine plus regional hyperthermia for locally advanced pancreatic carcinoma: initial experience*. Radiat Med, 2008. **26**(10): p. 587-96.
230. Tschoep-Lechner, K.E., et al., *Gemcitabine and cisplatin combined with regional hyperthermia as second-line treatment in patients with gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer*. Int J Hyperthermia, 2013. **29**(1): p. 8-16.
231. Nozaki, J., M. Takehana, and S. Kobayashi, *UVB irradiation induces changes in cellular localization and phosphorylation of mouse HSP27*. Photochem Photobiol, 1997. **65**(5): p. 843-8.
232. McClaren, M. and R.R. Isseroff, *Dynamic changes in intracellular localization and isoforms of the 27-kD stress protein in human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(3): p. 375-81.
233. Ciocca, D.R., et al., *Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(19): p. 1558-70.
234. Paul, C., et al., *Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 816-34.
235. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
236. Uozaki, H., et al., *Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis*. Pathol Res Pract, 2000. **196**(10): p. 665-73.
237. Tetu, B., et al., *Prognostic influence of HSP-27 expression in malignant fibrous histiocytoma: a clinicopathological and immunohistochemical study*. Cancer Res, 1992. **52**(8): p. 2325-8.
238. Gandour-Edwards, R., et al., *Heat shock protein and p53 expression in head and neck squamous cell carcinoma*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1998. **118**(5): p. 610-5.
239. Ito, T., et al., *Expression of heat shock proteins in squamous cell carcinoma of the tongue: an immunohistochemical study*. J Oral Pathol Med, 1998. **27**(1): p. 18-22.
240. Mese, H., et al., *Prognostic significance of heat shock protein 27 (HSP27) in patients with oral squamous cell carcinoma*. Oncol Rep, 2002. **9**(2): p. 341-4.
241. Wang, A., et al., *Dysregulation of heat shock protein 27 expression in oral tongue squamous cell carcinoma*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 167.
242. Lo Muzio, L., et al., *Prognostic value of HSP27 in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective analysis of 57 tumours*. Anticancer Res, 2006. **26**(2B): p. 1343-9.
243. Kapranos, N., et al., *Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance*. J Cancer Res Clin Oncol, 2002. **128**(8): p. 426-32.
244. Takeno, S., et al., *Analysis of the survival period in resectable stage IV gastric cancer*. Ann Surg Oncol, 2001. **8**(3): p. 215-21.

-
245. Giaginis, C., et al., *Heat Shock Protein-27, -60 and -90 expression in gastric cancer: association with clinicopathological variables and patient survival.* BMC Gastroenterol, 2009. **9**: p. 14.
246. Schneider, J., et al., *Co-expression of the MDR1 gene and HSP27 in human ovarian cancer.* Anticancer Res, 1998. **18**(4C): p. 2967-71.
247. Elstrand, M.B., et al., *Expression and clinical role of antiapoptotic proteins of the bag, heat shock, and Bcl-2 families in effusions, primary tumors, and solid metastases in ovarian carcinoma.* Int J Gynecol Pathol, 2009. **28**(3): p. 211-21.
248. Gallmeier, E., D. Bader, H. Seeliger, G. Assmann, D. Buchner, E. de Toni, T. Kirchner, C. J. Bruns, B. Goke, C. Schäfer, *Tissue microarray analysis to evaluate the role of heat shock protein 27 as a potential biomarker in pancreatic cancer,* in 2010 ASCO Annual Meeting2010.
249. Arrigo, A.P., et al., *Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets.* FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3665-74.
250. Seymour, L., et al., *Detection of P24 protein in human breast cancer: influence of receptor status and oestrogen exposure.* Br J Cancer, 1990. **61**(6): p. 886-90.
251. Bubendorf, L., et al., *Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays.* J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(20): p. 1758-64.
252. Vargas Roig, L.M., et al., *Effects of short-term tamoxifen administration in patients with invasive cervical carcinoma.* Anticancer Res, 1993. **13**(6B): p. 2457-63.
253. Rau, B., et al., *Preoperative treatment of rectal cancer with radiation, chemotherapy and hyperthermia: analysis of treatment efficacy and heat-shock response.* Radiat Res, 1999. **151**(4): p. 479-88.
254. Tschoep KE, et al., *Regional hyperthermia (RHT) combined with gemcitabine (GEM) + cisplatin (CIS) in patients with GEM-refractory advanced pancreatic cancer: Results of the ESHO phase II trial.* J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2008. **26**(4635).

7 Danksagung

Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Eike Gallmeier für die freundliche Überlassung des Arbeitsthemas und die gute Betreuung. Die jederzeitige freundliche Unterstützung und die konstruktive Kritik haben mir sehr bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Stefanie Ochs, Frau Antje Malo, Herrn Andreas Palagyи und Herrn Andreas Ziesch für die unermüdliche Unterstützung, die Vermittlung der Methode, die dauernden konstruktiven Diskussionen und für die Freundschaft bedanken.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Forschungslabore der Medizinischen Klinik II des Klinikums der Universität München - Großhadern für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die allzeit gern gewährte Hilfe und die vielen anregenden Gespräche bedanken.

Meiner Familie danke ich von Herzen für Ihre liebevolle Unterstützung und die Eröffnung aller Möglichkeiten.

Außerdem möchte ich mich bei Bernd Weber bedanken, der mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat und mich stets mit seinem Lachen ansteckt.

8 Anhang

8.1 Publikationen

Gallmeier, E., D. Bader, H. Seeliger, G. Assmann, D. Buchner, E. de Toni, T. Kirchner, C. J. Bruns, B. Goke, C. Schäfer, *Tissue microarray analysis to evaluate the role of heat shock protein 27 as a potential biomarker in pancreatic cancer*, in *2010 ASCO Annual Meeting*. 2010 [248]

Schafer, C., Seeliger, H., Bader, D. C., Assmann, G., Buchner, D., Guo, Y., Ziesch, A., Palagy, A., Ochs, S., Laubender, R. P., Jung, A., De Toni, E. N., Kirchner, T., Goke, B., Bruns, C., Gallmeier, E., *Heat shock protein 27 as a prognostic and predictive biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma*. J Cell Mol Med. [131]

Gallmeier E, Assmann G, Buchner D, Ziesch A, Seeliger H, Bader D, Ochs S, Jauch KW, Göke B, Bruns CJ, Schäfer C. *Welche Rolle spielt die Expression von Hsp27 im Pankreaskarzinom? Eine Analyse von 50 TMA's und Pankreaskarzinomzelllinien.* 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS), Hamburg, 2009

Eidesstattliche Versicherung

Buchner, Denise

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss der qualitativen und quantitativen HSP27-Expression auf die *in vitro* Chemo- und Radiosensitivität von Pankreaskarzinomzellen

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

Köln, den 29.05.2014

Unterschrift Doktorandin/Doktorand