

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Marek Zygmunt)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Einfluss von Paclitaxel und Carboplatin
auf das Hitzeschockprotein 27 in Ovarialkarzinomzellen**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der Universitätsmedizin

der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2018

vorgelegt von

Luise Wiegank

geboren am 19.11.1989

in Aschersleben

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Alexander Mustea
2. Gutachter: PD Dr. med. Lars Hanker
Ort, Raum: Greifswald, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe, Ferdinand-Sauerbruch-Straße, Seminarraum N0.03

Tag der Disputation: 10.12.2019

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Stope M.B., Wiegank L., Weiss M., Diesing K., Koensgen D., Burchardt M., Zygmunt M., Mustea A.

„Drug-induced Modulation of Heat Shock Protein HSPB1 in an Ovarian Cancer Cell Model.“

Anticancer Research 2016; 36: 3321-3327.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung.....	8
3 Materialien	9
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	9
3.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen.....	12
3.3 Puffer und Lösungen.....	13
3.4 Zelllinien.....	15
3.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur	15
3.6 Antikörper und Kits.....	15
3.7 Programme	16
4 Methoden.....	17
4.1 Zellbiologische Methoden	17
4.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	17
4.1.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen	18
4.1.3 Aussaat und Zellernte	18
4.1.4 Inkubation mit Chemotherapeutika.....	19
4.2 Proteinbiochemische Methoden	20
4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	20
4.2.2 Western Blot	20
4.2.3 ELISA	21
5 Ergebnisse	23
5.1 Wachstumshemmung von OvCa-Zellen durch Paclitaxel und Carboplatin.....	23

5.2	Modulation der Expression von HSP27 in Anwesenheit von Paclitaxel und Carboplatin	26
5.3	Modulation der Freisetzung von HSP27 in Anwesenheit von Paclitaxel und Carboplatin	29
6	Diskussion	32
6.1	Induktion von HSP27	32
6.2	Freisetzung von HSP27	36
6.3	Ausblick.....	39
	Zusammenfassung.....	41
	Literaturverzeichnis.....	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Wachstumskinetik der OvCa-Zellen OVCAR-3, SK-OV-3, TOV-21G und TOV-112D unter Einfluss von Paclitaxel im 24 h Maßstab über einen Zeitraum von 120 h	24
Abbildung 2	Wachstumskinetik der OvCa-Zellen OVCAR-3, SK-OV-3, TOV-21G und TOV-112D unter Einfluss von Carboplatin im 24 h Maßstab über einen Zeitraum von 120 h	25
Abbildung 3	Expression von HSP27 in Anwesenheit von Paclitaxel in OVCAR-3-, SK-OV-3-, TOV-21G- und TOV-112D-Zellen über einen Zeitraum von 120 h.....	27
Abbildung 4	Expression von HSP27 in Anwesenheit von Carboplatin in OVCAR-3-, SK-OV-3-, TOV-21G- und TOV-112D-Zellen über einen Zeitraum von 120 h.....	28
Abbildung 5	Freisetzung von HSP27 in Anwesenheit von Paclitaxel in OVCAR-3-, SK-OV-3-, TOV-21G- und TOV-112D-Zellen über einen Zeitraum von 120 h.....	30
Abbildung 6	Freisetzung von HSP27 in Anwesenheit von Carboplatin in OVCAR-3-, SK-OV-3-, TOV-21G- und TOV-112D-Zellen über einen Zeitraum von 120 h.....	31

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. demin	<i>Aqua demineralisata</i>
Ask1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CA-125	Cancer-Antigen 125
Daxx	<i>Death domain associated protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorbtionstest)
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i> (Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Fetales Kälberserum)
HE4	<i>Human epididymis protein 4</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
MAPKAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase
OvCa	Ovarialkarzinom
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PK	Proteinkinase
ROMA	<i>Risk of Ovarian Malignancy Algorithm</i>
SD	Standardabweichung

SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
Streptavidin-HRP	<i>Streptavidin-horseradish peroxidase</i> (Streptavidin-Meerrettichperoxidase)
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung) mit Tween20
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

1 Einleitung

Das Ovarialkarzinom (OvCa) repräsentiert eine der am meisten diagnostizierten Krebsarten und die insgesamt achthäufigste Krebstodesursache von Frauen weltweit.¹ In Deutschland liegt das OvCa mit 5,6 % aller Krebssterbefälle nach dem Mammakarzinom an zweiter Stelle unter den gynäkologischen Krebserkrankungen.² Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 69 Jahre und die Anzahl der Sterbefälle ca. 5600/Jahr.² Aufgrund fehlender Früherkennungsmöglichkeiten erfolgt die Erstdiagnose bei oft fortgeschrittener Erkrankung.² Hieraus ergibt sich für das OvCa eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 41 %. Bereits 61 % der Patientinnen befinden sich bei Diagnosestellung im Stadium T3.² Unspezifische, mangelnde Frühsymptome wie Völlegefühl, Bauchumfangsvermehrung oder zunehmende Miktionsfrequenz können erste Erkrankungshinweise liefern und sollten bei über 50-jährigen Frauen mittels gynäkologischer körperlicher Untersuchung sowie transvaginalem Ultraschall weiter abgeklärt werden.³ Der etablierte Tumormarker Cancer-Antigen 125 (CA-125) ist bei lediglich 50 % der Patientinnen im frühen Stadium nachzuweisen.⁴ Ein generelles Screening mittels CA-125-Bestimmung und transvaginalem Ultraschall wird somit aufgrund mangelnder Mortalitätsreduktion nicht empfohlen.³

Die Stadieneinteilung richtet sich nach der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO)-Klassifikation entsprechend lokaler Tumorausbreitung und dem Lymphknoten- und Metastasenstatus. Therapeutisch erfolgt nach zumeist operativer Tumorresektion eine systemische Chemotherapie. Das Stadium und der postoperativ verbliebene Tumorrest sind Prognoseentscheidend. Aktuelle Leitlinien verweisen auf folgendes Behandlungsschema: Beim frühen OvCa, welches die FIGO-Stadien I bis IIA umfasst, wird im Stadium IA Grad 1 nach erfolgreichem, operativem Staging keine adjuvante Chemotherapie, ab FIGO IA Grad 2 hingegen eine platin-haltige Therapie angewandt.³ Beim fortgeschrittenen Karzinom, FIGO IIB bis IV, empfiehlt sich eine Kombinationstherapie mit Carboplatin und Paclitaxel.³ Diese Kombination gilt als Standardtherapie.³

In einer 1996 veröffentlichten Studie an 386 Frauen im fortgeschrittenem OvCa-Stadium zeigte sich die Überlegenheit der Paclitaxel-Cisplatin- gegenüber der Cyclophosphamid-Cisplatin-Kombination durch verlängertes progressionsfreies Überleben und einer höheren Gesamtüberlebenszeit.⁵ Als erstes Taxan, welches für die Behandlung maligner Tumore eingesetzt wurde, findet es heute in der Therapie des Ovarial-, Mamma-, kleinzelligen Bronchialkarzinoms, Kaposisarkoms sowie der Tumore des Kopf-Hals-Bereichs Anwendung.⁶ 1971 konnte die Struktur Paclitaxels, welches aus dem Rindenextrakt der Pazifischen Eibe (*Taxus Brevifolia*) gewonnen wird, erstmals identifiziert und seine zytotoxische Wirkung festgestellt werden.⁷ Paclitaxel interagiert mit den Mikrotubuli, welche vor allem für Zellteilung und -transport verantwortlich sind.⁸ Sie sind aus α - und β -Tubulin-Untereinheiten aufgebaut. Während der Zellteilung kommt es durch stabilisierenden Einfluss des Taxans zur Funktionshemmung des Spindelapparates.⁹ Paclitaxel bindet die β -Tubulin-Untereinheit und verhindert somit eine für die Mitose benötigte Depolymerisation.¹⁰ Der Verlust der dynamischen Instabilität durch Bildung stabiler, dysfunktioneller Mikrotubuli führt zur Unterbrechung des Zellzyklus mit Arrest in der G2/M-Phase und Einleitung der Apoptose.^{11,12}

Seit über 30 Jahren finden Platin-Verbindungen in der Krebstherapie Anwendung.¹³ In den frühen 1960er-Jahren erfolgte die Entdeckung von Cisplatin rein zufällig: Bei der Untersuchung von elektrischem Strom auf das Zellwachstum von *Escherichia coli* wurden Platinelektroden eingesetzt, welche wachstumshemmende Wirkung zeigten.¹⁴ Carboplatin ist nach Cisplatin die zweite klinisch relevante Platinverbindung zur Behandlung von Krebserkrankungen, wie dem Ovarial-, Hoden-, Bronchial-, Zervix- oder Blasenkarzinom. Als besser verträgliche Weiterentwicklung von Cisplatin mit gleicher antitumorösen Aktivität wirkt es weniger nephrotoxisch, emetogen und besitzt keine neuro- oder ototoxischen Nebenwirkungen.¹⁵ Die zytotoxische Wirkung wird vor allem durch die Bindung an Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Moleküle mit DNA-Vernetzung zwischen benachbarten DNA-Strängen, aber auch innerhalb des gleichen Stranges erzielt, wodurch Transkription und Replikation gehemmt werden, die Zellen in der M/G2-Phase arretieren und anschließend absterben.¹⁶

Seit 2011 ist zudem ab Stadium IIIB der gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gerichtete Antikörper Bevacizumab zugelassen, welcher in Kombination und anschließend als Erhaltungstherapie für bis zu 15 Monate verabreicht werden kann.³ Durch gezielte Hemmung der Tumorangio-genese konnte in zwei Phase-III Studien das mittlere progressionsfreie Überleben signifikant verlängert werden.^{17,18}

Das OvCa zeigt meist eine gute Ansprechrate auf die platinhaltige Chemotherapie mit einer initialen Tumorregression von ca. 60 bis 80 % der Patienten.¹⁹ Behandlungsfortschritte wie die Zulassung von Bevacizumab und verbesserte Operationstechniken erhöhten das Gesamtüberleben von OvCa-Patientinnen weltweit.¹⁹ Nichtsdestotrotz kommt es bei über 60 % der Patientinnen in den FIGO-Stadien III und IV zu einem Rezidiv oder weiterem Fortschreiten der Erkrankung. Die Rückfallquote in den ersten zwei Jahren nach Therapiebeginn liegt bei insgesamt 70 %.²⁰ Treten Rezidive innerhalb von sechs Monaten nach oder bereits während der Gabe der platinhaltigen Therapie auf, werden sie als Platinresistentes Rezidiv bezeichnet, wohingegen das Auftreten nach sechs Monaten ein Platinsensibles Rezidiv darstellt.²⁰ Sie erfordern ein unterschiedlich erweitertes Behandlungsspektrum und sind nicht mehr mit einer heilbaren Erkrankung vereinbar. Die aktuellen Leitlinien betonen zudem, wie wichtig die Berücksichtigung zusätzlicher Aspekte wie das Alter oder genetische Faktoren bei Entscheidungen der Rezidivtherapie ist.³ Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika ist ein zunehmendes Hindernis, welches die Prognose des Patienten erheblich verschlechtert. Sie basiert auf vielfältigen Mechanismen, deren Identifizierung als momentaner Forschungsgegenstand zur besseren Anpassung von Therapieoptionen beitragen soll.

Um Rezidive frühzeitig zu erkennen und die Diagnosestellung zu verbessern, ist die Etablierung geeigneter Biomarker von großer Bedeutung. Als Marker mit höherer diagnostischer Sensitivität gegenüber CA-125 fand das *Human epididymis protein 4* (HE4) in den letzten Jahren Eingang in den klinischen Alltag.²¹ Zur Risikostratifizierung unklarer Raumforderungen wird der sogenannte *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*-Index (ROMA) verwendet, in welchen beide Parameter HE4 und CA-125, als auch der prä- und postmenopausale Status einbezogen werden und somit die diagnostische Genauigkeit

erhöht wird. Es konnte zudem gezeigt werden, dass HE4-Konzentrationen mit dem Rezidivstatus korrelieren.²¹

Mehrere Studien beleuchten im ähnlichen Zusammenhang die wichtige Rolle des Hitzeschockproteins 27 (HSP27), als Vermittler von Resistenzen, induziert durch Chemotherapie. HSP27 gilt als Schutzfaktor der Zelle vor gefährdenden Umwelteinflüssen. Zellulärer Stress, wie beispielsweise erhöhte Temperaturen, Chemikalien, oxidativer Stress, Chemotherapeutika oder Sauerstoffmangel, veranlasst Zellen zur Produktion von HSPs, welche sich durch zytoprotektive, anti-apoptische Eigenschaften auszeichnen.^{22,23,24} HSPs werden ihrer molekularen Masse nach aufgeteilt. HSP27 gehört mit 27 kDa zu den kleinen HSPs, welche im Bereich zwischen 15 bis 30 kDa liegen.²⁵ Die Synthese von HSP27 wird über Aktivierung der jeweiligen HSP-Gene über stress-induzierte Phosphorylierung des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors 1 aktiviert.²⁶ Bereits 1982 wurde die Produktion eines Proteins mit 27 kDa in Zellen des Zervixkarzinoms, den HeLa Zellen nach Inkubation bei 42 °C beschrieben.²⁷ Strukturell gliedert es sich in eine hochkonservierte α -Kristallin-Domäne mit einem schwach konservierten N-Terminus und flexiblen C-terminalen Ende sowie einer hydrophoben WDPF-Region, welche für die Oligomerisierung von Proteinen wichtig ist.^{28,29} Es ist ein ubiquitär vorkommendes, intrazelluläres Protein und wurde sowohl im gesunden als auch im kanzerogenen Gewebe nachgewiesen.³⁰ Als multifunktionelles Protein ist es in unterschiedliche Zellprozesse involviert. So kann es als molekulares Chaperon agieren, indem es sich unter Stressbedingungen an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt und Adenosintriphosphat (ATP)-unabhängig durch Anlagerung an fehlgefaltete Proteine deren Aggregation und Ausfällung verhindert.^{25,29} Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen bestimmen die Proteinfunktion und bilden die Antwort auf Veränderungen der Zellphysiologie, ausgelöst durch Stressoren wie Zytostatika.³¹ Das Protein besitzt die Fähigkeit, abhängig vom Phosphorylierungsstatus und der Einwirkung äußerer Stressfaktoren, bis zu 800 kDa große Oligomere zu formen.^{28,32} So konnte in einer Studie von Lelj-Garolla et al. gezeigt werden, dass erhöhte Umgebungstemperaturen zur Zunahme der oligomeren Struktur führen.³³ HSP27 kann an drei regulatorischen Serinresten (Serin 15, 78 und 82) durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase (MAPKAPK) 2, 3, 5 und Proteinkinase (PK) A, B, C und D phosphoryliert

werden.^{34,35} Die Phosphorylierung führt zum Verlust der Oligomerstruktur und zur Bildung von Tetrameren, Dimeren oder Monomeren.^{33,36} In der phosphorylierten Form besitzt HSP27 verschiedene Fähigkeiten: Antioxidative Eigenschaften werden durch Verminderung der Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies über den Anstieg von Glutathion und Abfall von Eisen vermittelt.³⁷ Auf verschiedenen Wegen wirkt HSP27 anti-apoptotisch: Die Fas/Fas-L vermittelte Apoptose wird durch Interaktion mit dem *Death domain associated protein* (Daxx), welches über Bindung an die *Apoptosis signal-regulating kinase 1* (Ask1) zum Zelltod führt, inhibiert.³⁸ Zudem wird die intrinsische Apoptose über Inaktivierung zahlreicher pro-apoptotischer Faktoren vermittelt: Durch Hemmung der Freisetzung von Cytochrom c und *Second mitochondria-derived activator of caspase* (Smac) aus den Mitochondrien unterbleibt die Aktivierung von Procaspase-9 und nachfolgenden Caspasen.^{39,40} Zusätzlich blockiert HSP27 die Funktion von *Bcl-2-associated X protein* (Bax), einem Protein, welches die mitochondriale Membran für Cytochrom c permeabel macht.⁴¹ In einer Studie von Garrido et al. konnte außerdem eine Beteiligung von HSP27 an der Proteasom-vermittelten Degradierung von Proteinen nachgewiesen werden.⁴² HSP27 ist zudem verantwortlich für die Organisation von Aktinfilamenten und wirkt auch hier zytoprotektiv.⁴³ Der Phosphorylierungsstatus ist dabei funktionsentscheidend: Durch Abkapseln von Aktin-Monomeren hemmt nicht-phosphoryliertes HSP27 die Aktinpolymerization, wohingegen phosphoryliertes HSP27 die entgegengesetzte Wirkung erzielt, ein Auflösen vorhandener Aktin-Strukturen verhindert und die Stabilität des Zytoskeletts unter Einflüssen wie oxidativen Stress gewähren kann.^{44,45} Durch enge Interaktionen mit Aktin ist HSP27 somit an der Regulation von Zellmigration, -zyklus und -differenzierung beteiligt.⁴⁶

HSP27 wird nicht nur im gesunden sondern auch im malignen Gewebe kontinuierlich exprimiert.³⁰ Verschiedene Tumorentitäten wie das OvCa weisen jedoch eine erhöhte HSP27-Expression auf.⁴⁷ Die vielfältigen Funktionen von HSP27 tragen in unterschiedlichen malignen Zellen zur Resistenzentwicklung gegenüber toxischen Wirkstoffen bei. So belegen mehrere Arbeiten, dass eine erhöhte HSP27-Expression oder Überexpression nach Transfektion mit Resistenzen gegenüber verschiedenen chemotherapeutischen Wirkstoffen einhergeht. 1991 zeigten Huot et al. in chinesischen Hamster-Zelllinien, dass Überexpression von HSP27 durch erfolgte Transfektion nicht nur

zu erhöhter Thermoresistenz, wie in vorherigen Arbeiten gezeigt, sondern auch zum erhöhten Schutz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen führt.⁴⁸ Richards et al. und Garrido et al. gewannen ähnliche Erkenntnisse bei der Behandlung von überexprimierten Zelllinien vom Hoden- und Kolonkarzinom mit Cisplatin und Doxorubicin.^{49,50} Auch im Mammakarzinom konnte der Zusammenhang zwischen hoher HSP27-Expression und erhöhter Doxorubicin-Resistenz hergestellt werden.⁵¹ Ähnliche Zusammenhänge wurden für das OvCa bestätigt: Langdon et al. verglichen im OvCa die Ansprechrate auf Chemotherapie verschiedener Patienten mit den HSP27-Expressionsmustern und schlussfolgerten, dass hohes HSP27 mit erhöhter Resistenz korreliert.⁴⁷ In vitro zeigten Cisplatin-resistente OvCa-Zelllinien einerseits eine erhöhte HSP27-Expression, andererseits wurden die Zellen nach Inhibition des Proteins sensitiver.^{52,53} Zusätzlich konnte im Ovarial- und Prostatakarzinom bestätigt werden, dass durch Inhibition von HSP27 durch Antisense-Nukleotide oder siRNA die Sensitivität gegenüber Paclitaxel erhöht wurde und es zu einem geringeren Zellwachstum kam.^{54,55} Eine andere Studie von Lu et al. zeigte ähnliche Ergebnisse bei der Verwendung von Cisplatin.⁵³ Außerdem wurden gegenüber beiden Therapeutika erhöhte Resistenzen bei Überexpression festgestellt.^{52,56} Andererseits existieren Studien, die diesen Zusammenhang verneinen und eine Resistenzbildung mit hoher HSP27-Expression in Frage stellen. Im Mammakarzinom wurden in zwei unterschiedlichen Paclitaxel-resistenten Zelllinien sowohl Erhöhung als auch Abfall der HSP27-Konzentration nachgewiesen.^{57,56} Eine dritte Mammakarzinom-Zelllinie mit Doxorubicin-Resistenz zeigte ebenfalls einen Abfall von HSP27 im Vergleich zu nicht resistenten Zellen.⁵⁸ Der Autor dieser Studie führte die Resistenzmechanismen auf die Induktion des ABC-Transporters P-Glykoprotein zurück.⁵⁸ Resistenzbildung folgt einem multifaktoriellen Muster. Ähnliche Beobachtungen wurden im Pankreaskarzinom gemacht: Sowohl Gemcitabin-resistente als auch sensitive Zellen wiesen eine erhöhte HSP27-Expression auf.^{59,60}

Krebszellen scheinen unterschiedliche zelllinienspezifische Abwehrmechanismen entwickelt zu haben, die mit verschiedenen HSP27-Expressionsmustern einhergehen. Auch wenn HSP27 wahrscheinlich nicht allgemein, sondern vielmehr individuell und zellspezifisch eine Rolle in Resistenzmechanismen spielt, wurde dieser Zusammenhang für das OvCa dennoch mehrfach bestätigt.^{47,52,48,54} Kommt es in malignem Gewebe zur

erhöhten HSP27-Expression, stellt sich die Frage, inwieweit das Protein als Biomarker zur Krebsfrüherkennung, im Rahmen der Therapie oder für die Bestimmung von Resistenzentwicklung etabliert werden kann. Um die diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen des OvCas zu verbessern, ist die genauere Charakterisierung von HSP27, insbesondere die Modulation durch chemotherapeutische Substanzen wie Paclitaxel und Carboplatin von Bedeutung.

2 Zielsetzung

HSP27 schützt die Zelle vor zytotoxischen Einflüssen und vermittelt Chemoresistenz im OvCa. Die protektive Funktion von HSP27 konnte in verschiedenen Studien mehrfach nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite ist wenig bekannt über die Regulation der HSP27-Induktion, ausgelöst durch chemotherapeutische Wirkstoffe. Das Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss der in der OvCa-Therapie eingesetzten Chemotherapeutika Paclitaxel und Carboplatin auf die HSP27-Expression in OvCa-Zellen zu untersuchen. In vier verschiedenen Zelllinien des OvCas wurde dazu die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der beiden Wirkstoffe ermittelt und anschließend sowohl die HSP27-Expression als auch die HSP27-Freisetzung analysiert.

3 Materialien

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
Abdeckfolie für ELISA SealPlate®: 676 070	Excel Scientific (Victorville, USA)
Accu-Jet®PRO	BRAND GmbH (Wertheim)
Antistatisches Tuch	Kinetronics (Bornheim)
Autoklav VX-150	Systemec (Wettenberg)
Bechergläser:	
250 ml, 1000 ml	VWR (Radnor, USA)
CASY Model TT - Cell counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CASY Röhrchen	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CO ₂ Inkubator MCO-18 AIC	Sanyo (Moriguchi, Japan)
ELISA Mikroplatte: Clear Microplate	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Flockeneisbereiter RF 0399 A	Manitowoc (Herborn)
FLUOstar Optima (Mikrotiterplatten-Leser)	BMG LABTECH (Ortenberg)
Gestelle und Racks:	
Acrylglasgestell 2x12, 4x12, 6x12	neoLab (Heidelberg)
neoRack®-Röhrchen-Gestell 4x4	
Unwire™ Half-Racks 3x3	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Hämozytometer Deckglas	Armin Baack (Schwerin)
Handtuchpapier Zick-Zack	Heemann OHG (Falkensee)
Immobilon-P PVDF Membran	Merck Millipore (Billerica, USA)
Indikatorband für Dampfsterilisation	Carl Roth (Karlsruhe)
Infrarot-Scanner Odyssey Imaging System	
ODY-2065	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Inkubationsbad 1003	GFL (Burgwedel)

Kapillarspitze MultiFlex Round Tip	Carl Roth (Karlsruhe)
Kosmetiktücher fusselarm	Abena (Aabenraa, Dänemark)
Kryo-Aufbewahrungsboxen mit Deckel	neoLab (Heidelberg)
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Kühlsysteme:	
Laborkühlschrank LKv 3910 mediline (4 °C)	Liebherr-International (Biberach)
MDF-U333 (-20 °C)	
MDF-U53V (-80 °C)	Sanyo (Moriguchi, Japan)
Tiefkälte-Lagerschrank Kryotec KLS 6086-2 (-80 °C)	Kryotec-Kryosafe (Hamburg)
Ultra-Low Temperature Freezer ULT10140-9- M22 (-140 °C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Laborglasflaschen:	
50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml	DURAN Group (Wertheim/Main)
Messzylinder:	
100 ml	BRAND (Wertheim)
500 ml, 1000 ml	Isolab Laborgeräte (Wertheim)
Mikroplatten Waschgerät Asys Atlantis	Biochrom Asys (Salzburg, Österreich)
Mikroskop Nikon TMS 302370	Nikon Corporation (Chiyoda, Japan)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Mini-PROTEAN TGX Gels 10 %	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Parafilm „M“ Laboratory Film	Bemis (Neenah, USA)
Pinzette	neoLab (Heidelberg)

Pipetten:

0,1 - 2,5 µl; 0,5 - 10 µl; 2 - 20 µl; 20 -

200 µl; 100 - 1000 µl; 0,5 - 5 ml

Mehrkanalpipette 30 - 300 µl

Eppendorf (Hamburg)

Pipettenspitzen:

10 µl SurPhob

Biozym Scientific (H. Oldendorf)

200 µl, 1000 µl

Sarstedt (Nümbrecht)

5000 µl

Eppendorf (Hamburg)

Präzisionswaage PCB

KERN & Sohn (Balingen-Frommern)

Reaktionsgefäße:

1 ml, 2 ml

Sarstedt (Nümbrecht)

Rotilabo®-Flüssigkeitsreservoirs PVC

Carl Roth (Karlsruhe)

Rotilabo-Signal-Timer

Carl Roth (Karlsruhe)

Schüttelinkubator KS-15 CONTROL

Edmund Bühler (Hechingen)

Schutzhandschuhe:

Peha-soft nitrile

Paul Hartmann AG (Heidenheim)

Nitrile Risk-CHEMO-protectLab

HANSA-TRADING (Hamburg)

Serologische Pipetten:

5 ml, 10 ml, 25 ml

Sarstedt (Nümbrecht)

Sicherheitswerkbank HERAsafe KS9

Thermo Scientific (Waltham, USA)

Stegeinsatz für Kryoboxen

Carl Roth (Karlsruhe)

Sterilbank HERA safe

Heraeus Instruments (Hanau)

Stromversorgungsgerät PowerPack™

Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)

Stuart™ analogue rocker & roller mixer

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Taschenrechner Modell: KF01605

Q-CONNECT (Gent, Belgien)

TC-Flasche T75, TC-Platte 6-Well

Sarstedt (Nümbrecht)

Tischabzug Scala

Waldner (Wangen)

Tischständer mit Vernichtungsbeutel

Sarstedt (Nümbrecht)

Thermomixer 5437	Eppendorf (Hamburg)
Trans Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad (Hercules, USA)
Universelle Beschriftungs-Klebebänder	neoLab (Heidelberg)
Whatman Chromatography Paper 20x20	Carl Roth (Karlsruhe)
Zentrifugen:	
5810 R, 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
VWR Mini Star	VWR (Radnor, USA)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)

3.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe)
Carboplatin	abcam (Cambridge, GB)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol unvergällt	TH. GEYER (Renningen)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG (Berlin)
Gentamycin	Ratiopharm (Ulm)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Händedesinfektion sensiva	Schülke GmbH (Norderstedt)
Insulin	Novo Nordisk (Bagsværd, Dänemark)
Methanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth (Karlsruhe)
Odyssey® One-Color Protein Molecular Weight Marker	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Paclitaxel	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Substrat Reagent Pack:	
Reagent A (Wasserstoffperoxid),	
Reagent B (Tetramethylbenzidine)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Tris PUFFERAN 99,3 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-HCL	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA Solution (10x) 0,5 %/ 0,2 %	Merck Millipore (Billerica, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

3.3 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 % SDS ad Aqua demineralisata (A. demin)
1x Blotting Transfer Puffer	100 ml 20x Transfer Puffer, 400 ml MeOH, 1500 ml A. demin
1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	9,55 g PBS/l ad A. demin
1x SDS-Gelelektrophorese-Puffer	500 ml 10x SDS-Laufpuffer, 4500 ml A. demin
1x Tris-buffered saline mit Tween 20 (TBS-T)	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20 ad A. demin
2x Lämmli-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS,

	20 % Glycerol; 0,02 % Bromphenolblau ad A. demin
10x SDS-Gelelektrophorese-Puffer	0,31 M Tris; 2,4 M Glycin; 43 mM SDS ad A. demin
10x Tris-buffered saline (TBS)	500 mM Tris-HCl, 1500 mM NaCl ad A. demin
20x Blotting Transfer Puffer	0,9 M Tris; 0,78 M Glycin; 0,75 % SDS ad A. demin
Antikörper-Puffer:	
Für den primären Antikörper	5 % BSA ad TBS-T
Für den sekundären Antikörper	5 % BSA in TBS-T; 0,01 % SDS ad A. demin
BSA	0,2 mg BSA in 1 ml A. demin
CASY ton	154 mM NaCl; 0,1 mM EDTA in A. demin
Chemotherapeutika-Stammlösungen:	
Carboplatin	25 mM ad A. demin
Paclitaxel	2 - 4 μ M ad DMSO
ELISA Stopplösung	1 M Schwefelsäure: 13,4 ml 96 % Schwefelsäure ad 236,6 ml A. demin
Milchpulver	5 % Milchpulver ad TBS-T
Reagent Diluent (R&D Puffer)	1 % BSA ad 1x PBS (unsteril)
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	1:200 in R&D Puffer
Waschpuffer ELISA	0,05 % Tween 20 ad 1x PBS

3.4 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
OVCAR-3	Cell Lines Service (Eppelheim)
SK-OV-3	Cell Lines Service (Eppelheim)
TOV-21G	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
TOV-112D	American Type Culture Collection (Manassas, USA)

3.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Zelllinie	Medium	Zusätze	Hersteller
OVCAR-3	RPMI-1640	10 % FBS 0,1 % Insulin	Biochrom AG (Berlin)
SK-OV-3	DMEM / F12	5 % FBS	Gibco Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)
TOV-21G	MCDB-105 + Medium 199	15 % FBS	tebu-bio Nordic Countries (Roskilde, Dänemark) Biochrom AG (Berlin)
TOV-112D	MCDB-105 + Medium 199	15 % FBS	tebu-bio Nordic Countries (Roskilde, Dänemark) Biochrom AG (Berlin)

3.6 Antikörper und Kits

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
HSP27 (G31) mouse mAb	1:10000	Cell Signaling (Cambridge, GB)
β-Actin (13E5) rabbit mAb	1:40000	Cell Signaling (Cambridge, GB)

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
IRDye 800CW goat anti-mouse IgG	1:10.000	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
IRDye 680RD goat anti-rabbit IgG	1:10.000	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)

Kit	Hersteller
Human Total HSP27 DuoSet IC ELISA	R&D Systems (Minneapolis, USA)

3.7 Programme

Programm	Verwendung	Hersteller
Image Studio Lite Version 5	Datenerhebung	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
	Western Blot	
Microsoft Excel 2010	Datenverarbeitung	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Power Point 2010	Bildbearbeitung	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Word 2010	Textverarbeitung	Microsoft (Redmond, USA)
Odyssey 3.0 CLx	Scanning Western Blot	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
OPTIMA Software v2.10	Datenerhebung ELISA	BMG LABTECH (Ortenberg)

4 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellkulturmodell mit den vier verschiedenen OvCa-Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3, TOV-21G und TOV-112D etabliert. Nach Ermittlung der IC_{50} der beiden Chemotherapeutika Paclitaxel und Carboplatin erfolgte die Wirkstoffinkubation um eine gezielte Wachstumshemmung zu erreichen. Anschließend wurden sowohl intra- als auch extrazelluläre HSP27-Konzentrationsveränderungen mittels Western Blot und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt.

4.1 Zellbiologische Methoden

Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese in den entsprechenden Nährmedien kultiviert und passagiert. Es folgte die Aussaat und Inkubation mit den beiden Chemotherapeutika. Nach der Ernte der Zellen wurden gewonnene Proteinproben für die späteren proteinbiochemischen Methoden eingefroren.

4.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um die verwendeten Zellen dauerhaft lagern zu können, müssen sie über einen bestimmten Zeitraum eingefroren werden. Dazu mussten vollbewachsene Flaschen mit Trypsin behandelt, zentrifugiert und mit dem Zellmedium resuspendiert werden. Nach Zählen der Zellen wurden je 3×10^6 Zellen pro Kryovate in 1 ml Volumen gefüllt und diese zunächst für 24 h bei -80 °C und anschließend bei -140 °C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen musste das Medium auf 36 °C erwärmt und die Kryovate für 30 s in ein Wasserbad mit ebenfalls 36 °C gestellt werden. Nach und nach tauten die Zellen durch Resuspension mit warmem Medium auf und wurden anschließend mit 10 ml Medium für 5 min zentrifugiert. Erneut wurde das Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert und die Zellen anschließend in T75-Flaschen zur weiteren Kultivierung überführt.

4.1.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die vier verwendeten Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3, TOV-21G und TOV-112D wurden in T75-Flaschen bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in ihren entsprechenden Nährmedien kultiviert. Alle 72 bis 96 h erfolgte das Passagieren der Zellen. Das Medium musste abdekantiert und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen werden. Es folgte die Zugabe von 2 ml 2x Trypsin, wodurch sich die Zellen nach einer Inkubationszeit von 3 bis 5 min von der Oberfläche der Kulturflasche lösten. Von der anschließend hergestellten Stopplösung (10 % FCS in PBS) wurden 10 ml in die Flasche gefüllt, gespült und der Inhalt in ein 50 ml großes Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (OV-CAR-3 und SK-OV-3: 300 x g; TOV-21G und TOV-112D: 130 x g). Nach Abdekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert und anschließend das entsprechende Verhältnis hergestellt. Das Umsetzen der Zelllinien erfolgte in jeweils unterschiedlichen Verdünnungsverhältnissen: Bei OV-CAR-3 1:3 bis 1:5, bei SK-OV-3 1:3 bis 1:4 und bei den TOV-Zelllinien 1:6 bis 1:8. Von dem Zellpellet wurde 1 ml zusammen mit 10 ml frischem Nährmedium in entsprechende Flaschen ausgesät und erneut bei 37 °C kultiviert.

4.1.3 Aussaat und Zellernte

Die Zellsuspensionen jeder Zelllinie wurden in je vier TC-Platten (6-Well) mit einer bestimmten Zellzahl pro Well ausgesät. Ausschlaggebend für die verwendete Zellzahl waren die unterschiedlichen Wachstumseigenschaften der Zelllinien. Zu erwarten war ein sigmoidales Wachstum über einen Zeitraum von 120 h. Es wurden 3×10^5 Zellen von der Zelllinie OVCAR-3, $1,5 \times 10^5$ Zellen von SK-OV-3, $2,5 \times 10^5$ von TOV-21-G und 1×10^5 von TOV-112D pro Well ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Von dem hergestellten Verdünnungsverhältnis der Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und mit 90 µl PBS versetzt. Hiervon wurden erneut 10 µl unter das Deckglas gegeben und die Zellen in allen vier Quadranten gezählt. Durch Berechnung ($\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellzahl}/4 \times 10^5$) ließ sich die geeignete Menge an Zellsuspension und Medium bestimmen. Dieser hergestellte Mastermix wurde gleichmäßig mit jeweils 2 ml pro Well auf die 6-Well Platten verteilt. 24 h später erfolgte die Inkubation mit den Chemotherapeutika sowie die erste Zellernte.

Die Zellernte erfolgte alle 24 h über einen Zeitraum von sechs Tagen. Zunächst wurden 0,5 ml Zellmedium abgenommen, zentrifugiert (1,300 x g, 4 °C, 5 min) und anschließend 350 µl des Überstandes für die spätere Messung mittels ELISA bei -80 °C eingefroren. Das restliche Medium wurde verworfen und die Wells mit 500 µl PBS gewaschen. Nach Hinzugeben von 500 µl Trypsin pro Well erfolgte die Inkubation der Zellen für 2 min. Anschließend wurden die Zellen nach zweimaliger Hinzugabe von 750 µl PBS in entsprechende Reaktionsgefäße überführt, von welchen 200 µl für die Messung der Zellzahl mittels CASY TT Cell Counter abgenommen wurden. Nach jeweiliger Eichung des Geräts auf die entsprechende Zelllinie wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYton verdünnt und die absolute Zellzahl nach drei aufeinanderfolgenden Messungen ermittelt.

Zur Gewinnung von Proteinproben für die spätere SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot erfolgte das Zentrifugieren der restlichen Zellsuspension, welche anschließend mit 200 µM Lämmli Puffer (50 % 2x Lämmli, 45 % A. demin, 5 % 2-Mercaptoethanol) versetzt wurde. Nach erfolgter Proteinisolierung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

4.1.4 Inkubation mit Chemotherapeutika

Durch Titration wurden die IC_{50} von Paclitaxel ((2 α ,4 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α)-4,10-bis(acetyloxy)-13-(((2R,3S)-3-(benzoylamino)-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl]oxy)-1,7-dihydroxy-9-oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-yl-benzoat) und Carboplatin (Diamminplatin(II)-cyclobutan-1,1-dicarboxylat) für die einzelnen Zelllinien ermittelt. Diese konnten zum Teil im Rahmen dieser Arbeit (TOV-21G: Carboplatin: 25 mM; TOV-112D: Paclitaxel: 2 nM, Carboplatin: 10 µM), zum Teil in vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe (SK-OV-3: Paclitaxel: 3 nM, Carboplatin: 125 µM; OV-CAR-3: Paclitaxel: 2 nM, Carboplatin: 25 mM; TOV-21G: Paclitaxel: 4 nM) ermittelt werden. Als Kontrolle dienten die jeweiligen Verdünnungslösungen DMSO für Paclitaxel und A. demin für Carboplatin.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

Zur Analyse der intrazellulären Proteinkonzentration wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Die extrazellulären Proteinkonzentrationen konnten mittels ELISA nachgewiesen werden.

4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen ihrer Größe nach, der relativen Molekülmasse entsprechend. Abhängig von der Dichte und Porengröße des Polyacrylamid-Gels können Moleküle verschiedener Größe im Gel entlangwandern. In einem erzeugten elektrischen Feld laufen die Proteine in Richtung positiv geladener Anode. SDS haftet sich an die Aminosäuren der Proteine, ersetzt die ursprüngliche Ladungsverteilung durch eine gleichmäßig negative Ladung und führt zur Denaturierung aller Proteine. Dadurch ist die Wanderungsgeschwindigkeit nur noch von der Proteingröße abhängig. Je kleiner die Proteine, umso schneller erreichen sie die Anode. Das hinzugegebene 2-Mercaptoethanol reduziert mögliche Disulfid-Brücken zur vollständigen Proteinentfaltung.⁶¹

Vor der Durchführung der Gelelektrophorese wurden die Proteinproben aufgetaut, bei 95 °C für 5 min denaturiert, abgekühlt, zentrifugiert und anschließend wieder auf Eis gestellt. Die 10 %igen Polyacrylamid-Gele wurden in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und diese mit 1x SDS-Gelelektrophorese-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte das Pipettieren von 20 µl Proteinprobe in die einzelnen Geltaschen mit jeweils 1,5 µl eines Größenmarkers pro Gel. Der Lauf der Proteine erfolgte zunächst bei 100 V für 5 min und anschließend bei 180 V für weitere 30 bis 45 min bis die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

4.2.2 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteinbanden durch eine angelegte Spannung vom Polyacrylamid-Gel auf eine Membran übertragen. Zur Blockierung von restlichen hydrophoben Bindungsstellen wird die Membran mit Milchpulver behandelt. Ein gelöster

Primärantikörper bindet anschließend an das Zielprotein HSP27. Zur Visualisierung erfolgt abschließend die Inkubation mit einem Farbstoff-markierten Sekundärantikörper.⁶²

Die Übertragung der Proteine auf eine Membran erfolgte mithilfe des Trans Blot Turbo Transfer Systems. Nach Ausspannen des Gels und Entfernen umgebender Platten wurde der Blot wie folgt aufgebaut: Insgesamt sechs in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere umhüllten das Gel und eine darunterliegende, in Methanol inkubierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran von beiden Seiten. Nach 30 min Laufzeit des Gerätes wurden die Membranen für 1 bis 3 h bei Raumtemperatur mit Milchpulver blockiert und anschließend für 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem im entsprechenden Puffer verdünnten primären Antikörper (Verdünnung: HSP27 1:10.000, β -Actin 1:40.000) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen und der sekundäre Antikörper (Verdünnung 1:10.000) für 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und mittels Odyssey 3.0 CLx detektiert. Die Analyse der Banden erfolgte mit Image Studio™ Lite Version 5.

4.2.3 ELISA

Beim ELISA wird das nachzuweisende Antigen (Protein) zunächst spezifisch von einem Primärantikörper (*Capture antibody*) gebunden und anschließend von einem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper (*Detection antibody*) detektiert. Das Antigen bildet eine Brücke zwischen beiden Antikörpern mit Entstehung einer Antikörper-Antigen-Antikörper Verbindung. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym, wie die Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP) gekoppelt. Dieses reagiert mit einem zugegebenen Substrat und bewirkt einen Farbumschlag, welcher proportional zur Menge des Antigens bzw. des Proteins ist. Anschließend erfolgt die Ermittlung der entsprechenden Proteinkonzentrationen durch das Photometer mithilfe der Kalibrierungskurve.⁶³

Zunächst wurden 100 μ l eines *Capture Antibodies* (Verdünnung mit PBS 1:180) auf jedes Well der Mikroplatte gegeben und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht

inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Wells dreimalig mit Puffer gewaschen, anschließend mit 200 µl *Reagent Diluent* befüllt und nach 1 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur erneut gewaschen. Während die zuvor tiefgefrorenen Proben langsam auftauten, erfolgte die Herstellung einer standardisierten Verdünnungsreihe. Dazu wurden sieben Reaktionsgefäße mit jeweils 225 µl *Reagent Diluent* und ein weiteres mit 5 µl Stammlösung (*Standard stock solution*) sowie 695 µl *Reagent Diluent* befüllt. Nach Resuspension erfolgte das Pipettieren von 225 µl in das jeweils nächste Gefäß bis eine Verdünnungsreihe entstand. Anschließend wurden je 100 µl Probe und Standard in ein Well gegeben und die Platte über Nacht bei 4 °C kühl gelagert. Nach dem nächsten Waschgang erfolgte die Zugabe von 100 µl einer *Detection antibody working solution* (Verdünnung mit Reagent Diluent: 1:180) in jedes Well mit anschließender Einwirkdauer von 2 h. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Streptavidin-HRP pro Well hinzugegeben, um die Platte anschließend lichtgeschützt für 20 min bei Raumtemperatur inkubieren zu lassen. Die Zugabe von 100 µl Substrat (1:1 Reagenz A und B) pro Well erfolgte nach dem letzten Waschgang, welche unter Lichtschutz nach 10 bis 20 min zu einem dunkelblauen Farbumschlag führte. Die Farbreaktion wurde anschließend mit Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure pro Well gestoppt, woraufhin ein erneuter Farbumschlag von blau nach gelb stattfand. Die Farbintensität der einzelnen Proben konnte nun mit OPTIMA Software v2.10 gemessen und ausgewertet werden.

5 Ergebnisse

Die Inkubation mit Chemotherapeutika führte zu einer halbmaximalen Wachstumshemmung sowie variablen Modulation der intra- und extrazellulären HSP27-Konzentrationen.

5.1 Wachstumshemmung von OvCa-Zellen durch Paclitaxel und Carboplatin

Um den Einfluss von Chemotherapeutika auf die Expression und Sekretion von HSP27 zu untersuchen, wurden die OvCa-Zellen OVCAR-3, SK-OV-3, TOV-21G und TOV-112D mit Paclitaxel und Carboplatin behandelt. Zunächst erfolgte die Bestimmung von geeigneten Wirkstoff-Konzentrationen, um den Bereich einer halbmaximalen Wachstumshemmung durch die Zytostatika über einen Zeitraum von 120 h zu erreichen. Hierbei zeigte sich, dass die Konzentrationen für die unterschiedlichen Zelllinien variierten. So wurden für Paclitaxel Konzentrationen von 2 bis 4 nM (Abbildung (Abb.) 1) und für Carboplatin 3 bis 125 μ M (Abb. 2) eingesetzt. Bei den SK-OV-3-Zellen konnte eine halbmaximale Hemmung mit einer Konzentration von 125 μ M Carboplatin erreicht werden, wie in Abb. 2B dargestellt. Wohingegen bei den TOV-21G-Zellen ein vergleichbarer Effekt mit einer Konzentration von nur 3 μ M Carboplatin (Abb. 2C) erzielt wurde. Das Wirkungsspektrum von Paclitaxel variierte hingegen nur von 2 nM wie bei den Linien TOV-112D (Abb. 1D) und OV-CAR-3 (Abb. 1A) bis 4 nM wie bei der Linie TOV-21G (Abb. 1C). Alle vier Zelllinien zeigten nicht nur unterschiedliche Ansprechraten auf die zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika, sondern von vorneherein ein unterschiedliches Wachstumsverhalten, was in der Anzahl der ausgesäten Zellen berücksichtigt wurde. In allen Zellreihen konnte eine annähernd gleiche Wachstumshemmung erreicht werden, sodass sie in den folgenden Inkubationsexperimenten zur HSP27-Expression unter Chemotherapie eingesetzt werden konnten.

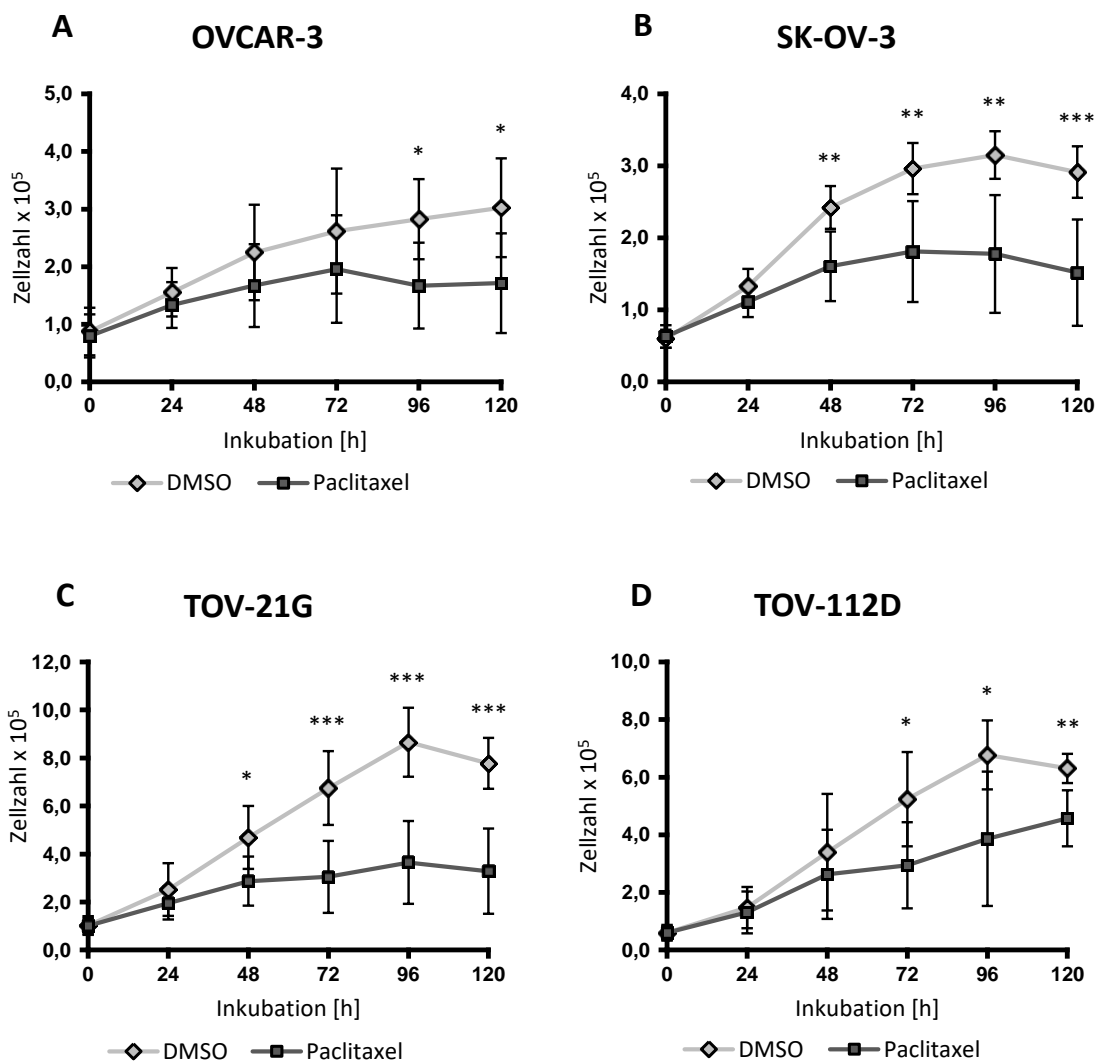


Abbildung 1: Wachstumskinetik der OvCa-Zellen OVCAR-3, SK-OV-3, TOV-21G und TOV-112D unter Einfluss von Paclitaxel im 24 h Maßstab über einen Zeitraum von 120 h.

OVCAR-3- (A), SK-OV-3- (B), TOV-21G- (C) und TOV-112D- (D) Zellen wurden über 120 h mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel behandelt. Nach Ermittlung der wachstumshemmenden Konzentrationen jeder einzelnen Zelllinie, wurde die Zellzahl alle 24 h mittels CASY bestimmt. Als Kontrolle diente DMSO. Die Ergebnisse aus mindestens sechs unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) der absoluten Zellzahl dargestellt. Die statistische Auswertung aller Experimente erfolgte mit dem Student's t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

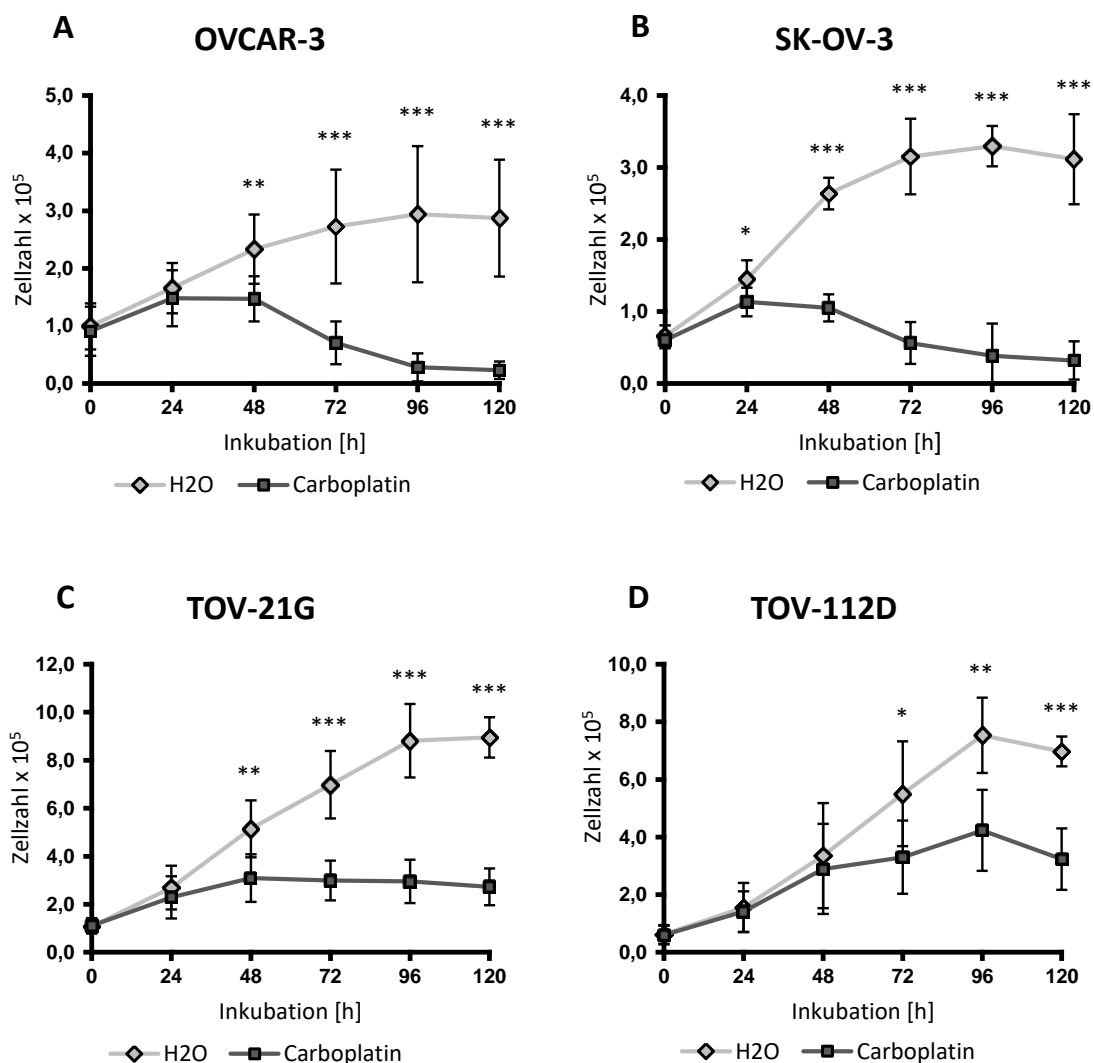


Abbildung 2: Wachstumskinetik der OvCa-Zellen OVCAR-3, SK-OV-3, TOV-21G und TOV-112D unter Einfluss von Carboplatin im 24 h Maßstab über einen Zeitraum von 120 h.

OVCAR-3- (A), SK-OV-3- (B), TOV-21G- (C) und TOV-112D- (D) Zellen wurden über 120 h mit dem Chemotherapeutikum Carboplatin behandelt. Nach Ermittlung der wachstumshemmenden Konzentrationen jeder einzelnen Zelllinie, wurde die Zellzahl alle 24 h mittels CASY bestimmt. Als Kontrolle diente H₂O. Die Ergebnisse aus mindestens sechs unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Die statistische Auswertung aller Experimente erfolgte mit dem Student's t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

5.2 Modulation der Expression von HSP27 in Anwesenheit von Paclitaxel und Carboplatin

Mittels Western Blot wurde der Einfluss der Chemotherapeutika auf die Expression von HSP27 untersucht. Eine modulierende Wirkung auf die Expression zeigte sich in allen Zelllinien. Ein Expressionsabfall war vordergründlich bei der Zelllinie TOV21-G zu erkennen. Hier sank die intrazelluläre HSP27-Konzentration nach 48 h unter Paclitaxel- und nach 72 h unter Carboplatinbehandlung signifikant ab (Abb. 3C und 4C). Ein ähnlicher Abfall war in der Zelllinie SK-OV-3 ab 72 h unter Carboplatin nachzuweisen (Abb. 4B). Auch die OVCAR-3-Zellen ließen unter Carboplatin ab 96 h einen signifikanten Abfall verzeichnen (Abb. 4A). Wenig modulierende Wirkung trat bei SK-OV-3- und OVCAR-3-Zellen unter Paclitaxelbehandlung ein. Es zeigte sich lediglich nach 120 h bzw. 72 h ein einmaliger Expressionsabfall (Abb. 3A und 3B).

Das Expressionsmuster der Zelllinie TOV-112D wurde insgesamt am wenigsten beeinflusst. Unter Einfluss beider Wirkstoffe stellten sich nur einmalige Konzentrationsabfälle nach 72 h bzw. 120 h (Abb. 3D und 4D) dar. Die mittels Western Blot gewonnenen Ergebnisse zeigen ein vom eingesetzten Wirkstoff abhängiges, individuelles Antwortverhalten jeder einzelnen Zelllinie. Insgesamt lässt sich allerdings eine abfallende Tendenz der HSP27-Expression in allen Experimenten nachweisen.

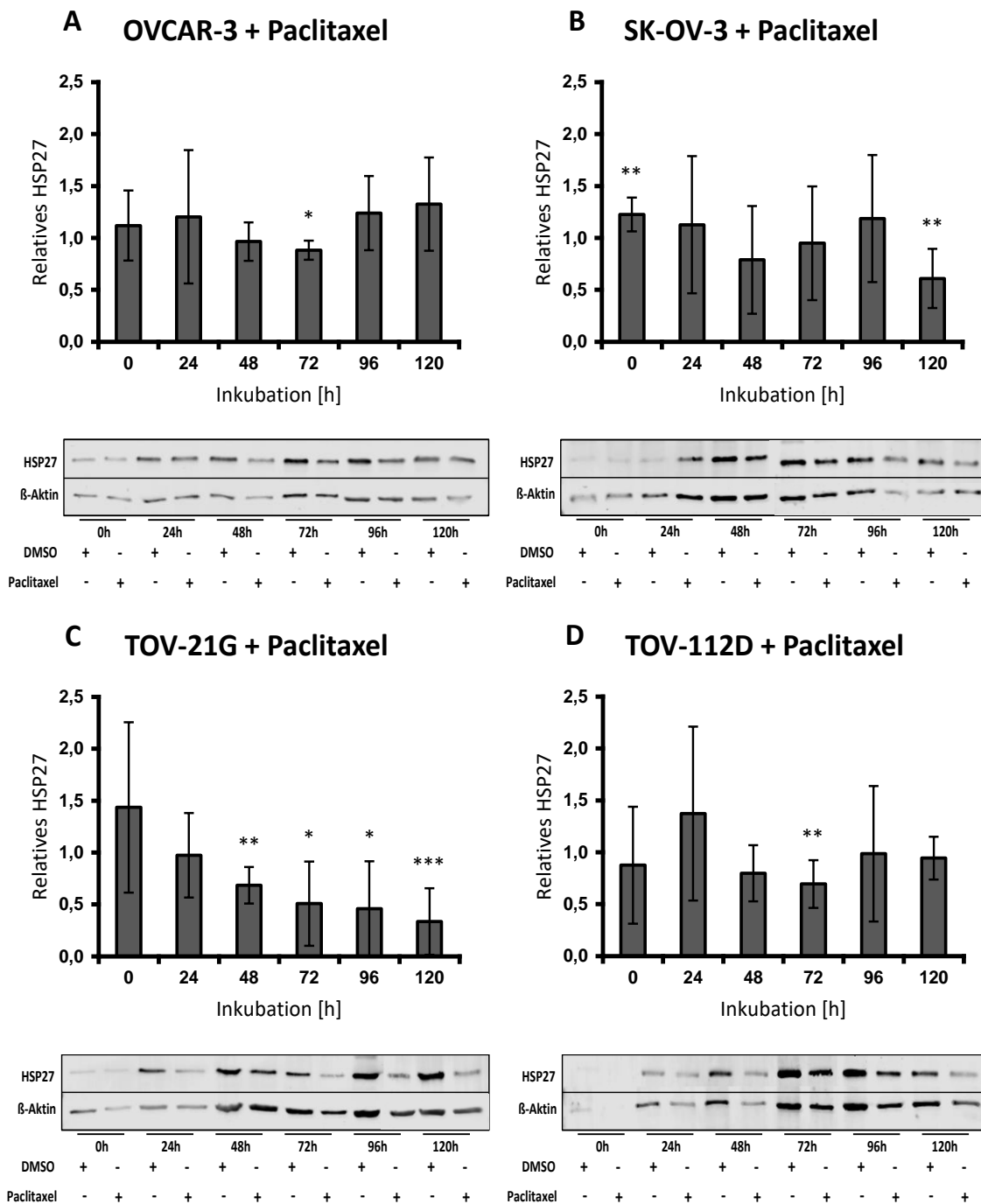


Abbildung 3: Expression von HSP27 in Anwesenheit von Paclitaxel in OVCAR-3-, SK-OV-3-, TOV-21G- und TOV-112D-Zellen über einen Zeitraum von 120 h.

Mittels Western Blot wurde im 24 h Maßstab die Expression von HSP27 von OVCAR-3- (A), SK-OV-3- (B), TOV-21G- (C) und TOV-112D- (D) Zellen unter Einfluss von Paclitaxel untersucht. Die Ergebnisse aus mindestens sechs unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt und auf die Kontrolle ($Ko=1,0$) normiert. Gezeigte Blotbilder stehen repräsentativ für die jeweils durchgeführten Versuche. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) statistisch ausgewertet.

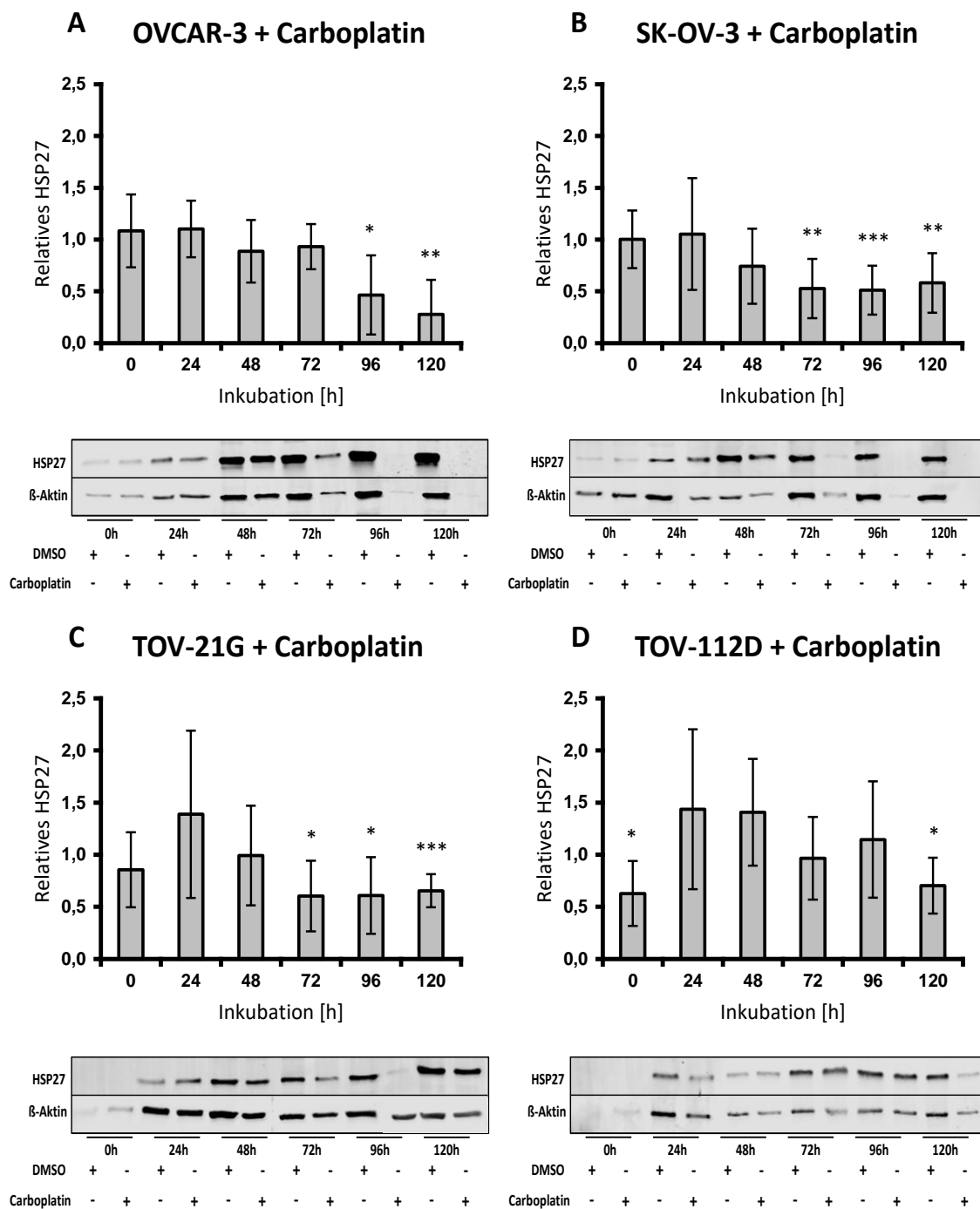


Abbildung 4: Expression von HSP27 in Anwesenheit von Carboplatin in OVCAR-3-, SK-OV-3-, TOV-21G- und TOV-112D-Zellen über einen Zeitraum von 120 h.

Mittels Western Blot wurde im 24 h Maßstab die Expression von HSP27 von OVCAR-3- (A), SK-OV-3- (B), TOV-21G- (C) und TOV-112D- (D) Zellen unter Einfluss von Carboplatin untersucht. Die Ergebnisse aus mindestens sechs unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt und auf die Kontrolle ($K_0=1,0$) normiert. Gezeigte Blotbilder stehen repräsentativ für die jeweils durchgeführten Versuche. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) statistisch ausgewertet.

5.3 Modulation der Freisetzung von HSP27 in Anwesenheit von Paclitaxel und Carboplatin

Die Freisetzung von HSP27 aus OvCa-Zellen wurde mittels ELISA untersucht. Auch hier ließ sich ein variables Verhalten der einzelnen Zelllinien gegenüber Paclitaxel und Carboplatin feststellen. Auffällig waren die Zellen der Linie SK-OV-3. Bei diesen konnte bei beiden Wirkstoffen bereits nach 48 h ein statistisch signifikanter Anstieg der extrazellulären Konzentration von HSP27 nachgewiesen werden (Abb. 5B und 6B). Keine oder nur geringe Veränderungen ließen sich wiederum bei OVCAR-3 feststellen. Hier kam es ausschließlich nach 96 h Carboplatin-Inkubation zu einem signifikanten Anstieg von extrazellulärem HSP27 (Abb. 6A).

Bei TOV-21G Zellen ließen sich nach 72 h unter der Behandlung mit Paclitaxel ähnliche Veränderungen feststellen (Abb. 5C). Der Einfluss von Carboplatin hingegen war deutlich geringer. Hier zeigte sich ein Absinken der extrazellulären HSP27-Konzentration nach 48 h und 72 h (Abb. 6C). Die HSP27-Freisetzung durch TOV-112D-Zellen wurde nur sehr geringfügig durch die Inkubation mit Paclitaxel und Carboplatin beeinflusst. Die HSP27-Konzentrationen im Zellkulturüberstand waren in Anwesenheit von Carboplatin nach 72 h (Abb. 6D) und in Anwesenheit von Paclitaxel nach 120 h leicht erhöht (Abb. 5D).

Der Einfluss von Paclitaxel und Carboplatin auf die HSP27-Freisetzung der OvCa-Zellen ist spezifisch, sowohl für die Zelllinien als auch für die eingesetzten Wirkstoffe. Insgesamt erfolgte jedoch eine überwiegende Erhöhung der extrazellulären HSP27-Konzentration.

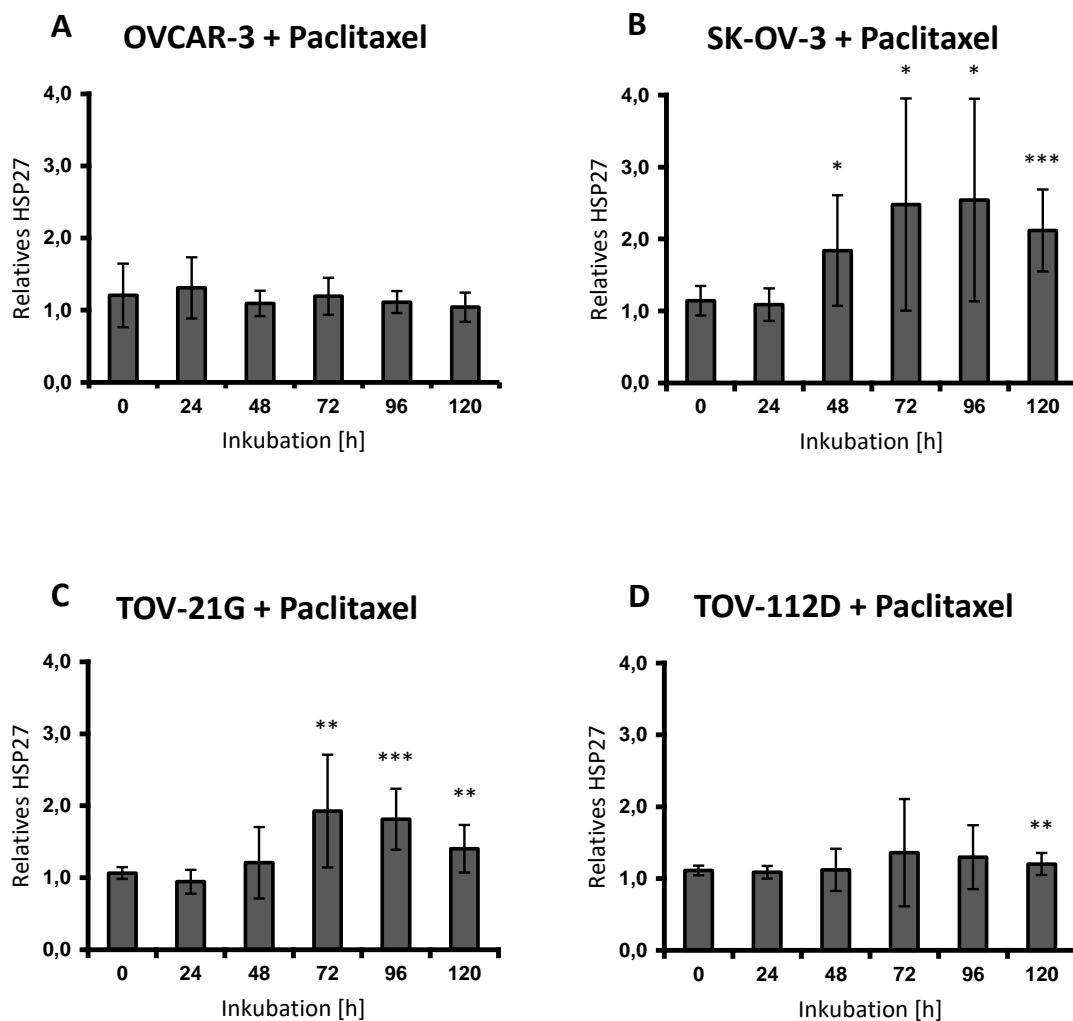


Abbildung 5: Freisetzung von HSP27 in Anwesenheit von Paclitaxel in OVCAR-3-, SK-OV-3-, TOV-21G- und TOV-112D-Zellen über einen Zeitraum von 120 h.

Veränderungen der Freisetzung von HSP27 der mit Paclitaxel behandelten Zellen OVCAR-3 (A), SK-OV-3 (B), TOV-21G (C) und TOV-112D (D) wurden alle 24 h mittels ELISA analysiert. Die Ergebnisse aus mindestens sechs unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert \pm SD der relativen Freisetzung dargestellt und auf die Kontrolle ($K_0=1,0$) normiert. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) statistisch ausgewertet.

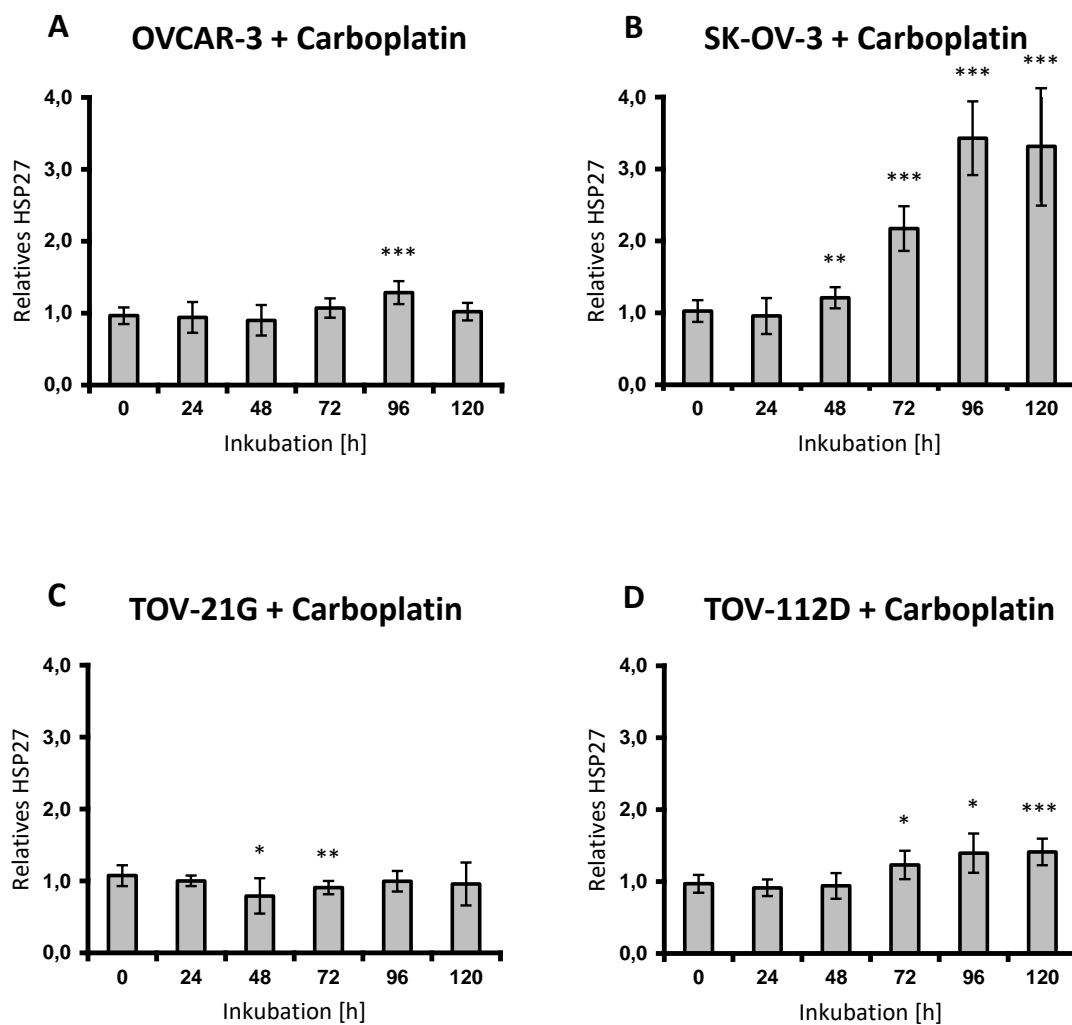


Abbildung 6: Freisetzung von HSP27 in Anwesenheit von Carboplatin in OVCAR-3-, SK-OV-3-, TOV-21G- und TOV-112D-Zellen über einen Zeitraum von 120 h.

Veränderungen der Freisetzung von HSP27 der mit Carboplatin behandelten Zellen OVCAR-3 (A), SK-OV-3 (B), TOV-21G (C) und TOV-112D (D) wurden alle 24 h mittels ELISA analysiert. Die Ergebnisse aus mindestens sechs unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert \pm SD der relativen Freisetzung dargestellt und auf die Kontrolle ($K_0=1,0$) normiert. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) statistisch ausgewertet.

6 Diskussion

In den letzten 20 Jahren zeigte sich ein zunehmendes Interesse an HSP27, das im Kontext der Charakterisierung maligner Zellen, der Resistenzbildung und zukünftiger Therapieansätze im OvCa und anderen Tumorentitäten eine entscheidende Rolle spielt. HSPs werden durch Stresseinwirkungen wie toxische Substanzen, also auch durch Chemotherapeutika induziert.^{64,24} Mehrfach wurde bestätigt, dass Resistenzmechanismen mit erhöhtem HSP27-Vorkommen in der Zelle assoziiert sind, und dass das Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt als Antwort auf die Chemotherapie induziert wird. Genaue Induktionsmechanismen bei Inkubation mit zytotoxischen Substanzen sind bisher unbekannt. Inwieweit Chemotherapeutika Expression und Freisetzung von HSP27 in einem Zeitfenster von 120 h modulieren, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

6.1 Induktion von HSP27

Die nachgewiesenen erhöhten Expressionsraten in unterschiedlichen Tumorentitäten wie Prostata-, Mamma-, Blasen-, Magen- und Ovarialkarzinom unterstreichen die Bedeutung des Proteins als möglichen diagnostischen und prognostischen Marker.^{65,47} Zahlreiche Untersuchungen bestätigen den Zusammenhang zwischen Tumorprogression und Expression von HSP27 im Magen-, Leber-, Prostatakarzinom und Osteosarkom.⁶⁶ In anderen Entitäten wie dem Ösophagus- oder dem Pankreaskarzinom zeigt sich jedoch ein inverser Zusammenhang.^{67,59} Auch im OvCa bestehen widersprüchliche Aussagen im Hinblick auf die prognostische Relevanz. Langdon et al. zeigten eine positive Korrelation zwischen Tumorprogress und HSP27-Expression: So konnte in fortgeschrittenen Stadien (II-IV) eine höhere HSP27-Konzentration als im Stadium I oder gutartigen Gewebe nachgewiesen werden.⁴⁷ Auch Schneider et al. zeigten, dass bei zunehmender Tumoraggressivität höhere Proteinkonzentrationen vorzufinden sind.⁶⁸ Die Bedeutung des prognostischen Markers wird in den OvCa-Studien von Elpek et al. und Arts et al. hervorgehoben: Eine hohe HSP27-Expression geht mit einem erniedrigtem Gesamtüberleben einher.^{69,70} Zwei andere Studien über OvCa-Zellen von Geisler et al.

zeigten hingegen, dass eine erniedrigte Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer niedrigen Überlebensrate in Verbindung steht.^{71,72}

Die vermittelte anti-apoptotische Wirkung von HSP27 in malignen Zellen führt zum Fortschreiten der Krebserkrankung und schützt die Zelle vor zytotoxischen Einflüssen wie Chemotherapie. Um den Einfluss der Therapie auf die HSP27-Expression molekular zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit vier verschiedene OvCa-Zelllinien auf intra- und extrazelluläre Konzentrationsveränderungen des Proteins nach Behandlung mit Paclitaxel und Carboplatin untersucht. In vorausgegangenen Studien zeigte sich ein unterschiedliches Induktionsverhalten von HSP27 abhängig von Tumorentität und eingesetztem Chemotherapeutikum. In Prostatakarzinom-Zellen wurde beispielsweise eine Docetaxel-abhängige HSP27-Induktion nachgewiesen.³¹ Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zwar eine überwiegend modulierende Wirkung der beiden Chemotherapeutika auf HSP27, allerdings konnte trotz signifikanter Wachstumshemmung keine Wirkstoff-abhängige Induktion von HSP27 festgestellt werden. Dies ließ sich vordergründlich in den Zelllinien OVCAR-3 und TOV-112D nachweisen: Hier führte Paclitaxel bis auf einen einmaligen Abfall nach 72 h zu keinen signifikanten Expressionsveränderungen (Abb. 3A und D). Auch andere Studien über Ovarial-, Zervix-, Endometrium- und Mammakarzinomzellen bestätigten die ausbleibende Induktion durch zytotoxische Substanzen. Arts et al. und Germain et al. untersuchten Veränderungen der HSP27-Expression in Tumorproben von 30 bzw. 48 OvCa-Patientinnen vor und nach Therapie mit größtenteils verschiedenen Substanzen wie Platinderivate (Cisplatin, Carboplatin), Doxorubicin, Hexamethylmelamin und Alkylanzien (Cyclophosphamid, Mephalan) und fanden keine Korrelation zwischen Behandlung und Proteininduktion.^{70,73} In den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit ließ sich im Zeitfenster von 120 h vielmehr ein tendenzieller, intrazellulärer Konzentrationsabfall erkennen. Dies zeigte sich verstärkt in den Zelllinien TOV-21G unter der Behandlung mit beiden Wirkstoffen (Abb. 3C und 4C) und in OVCAR-3, SK-OV-3 und TOV-112D unter der Behandlung mit Carboplatin (Abb. 4A, B und D). Womöglich resultiert dieser Abfall aus der Hemmung des Proteinumsatzes oder der vermehrten Freisetzung, wie auch Karaca et al. und Kim et al. bereits zeigen konnten: So kam es in unterschiedlichen OvCa-Zellen sowohl nach Kombinationstherapie mit dem Carboplatin ähnlichem Cisplatin und AT-101 als auch durch Cisplatin allein zur Abnahme

der Proteinexpression und zum Anstieg pro-apoptotischer Faktoren korrelierend mit dem Rückgang des Zellwachstums *in vitro*.^{74,75} Des Weiteren verglichen Tanaka et al. den Einfluss vier verschiedener Chemotherapeutika (Paclitaxel, Etoposid, Vincristin, Colcemid) auf die HSP27-Expression in Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen, und konnten allein bei Paclitaxel eine expressionshemmende Wirkung nachweisen, während die anderen Wirkstoffe zur Überexpression führten.⁷⁶ Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die expressionshemmende Wirkung Paclitaxels vor allem in der Zelllinie TOV-21G bestätigt (Abb. 3C). Liu et al. stellten im Zervixkarzinomgewebe nach Kontakt mit Paclitaxel und Cisplatin ebenfalls einen Abfall der Expression von HSP27 fest.⁷⁷ Ähnliche Erkenntnisse wurden in einer Studie mit drei verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien gewonnen: Hier wirkte Paclitaxel auf Zellen mit HSP27-Überexpression expressionshemmend.⁷⁸ Nicht nur im OvCa, sondern auch in anderen Tumorentitäten konnte mehrmals gezeigt werden, dass unter Paclitaxel oder einer Platinverbindung, einhergehend mit Ergebnissen der gegenwärtigen Arbeit, keine HSP27-Induktion stattfindet bzw. diese gehemmt wird. In keiner der vier Zelllinien wurde eine Induktion unter Behandlung mit Chemotherapie festgestellt. Vermutlich resultiert ein Abfall der HSP27-Expression aus Nekrose-induzierender Wirkung der Medikamente, da Wachstumshemmung in einigen Studien, einschließlich der vorliegenden, mit Expressionshemmung korrelierte.^{75,74} Allerdings haben andere Chemotherapeutika ähnliche wachstumshemmende Wirkung ohne Expressionshemmung.⁷⁶ Womöglich greifen zytotoxische molekulare Mechanismen von Paclitaxel und Carboplatin in Regulationen der HSP27-Synthese ein. Nichtsdestotrotz existieren konträre Daten mit dem Nachweis Wirkstoff-induzierter HSP27-Expression: Vargas-Roig et al. wiesen im Mammakarzinom *in vivo* den Zusammenhang zwischen Induktionschemotherapie mit verschiedenen Kombinationen (5-Fluorouracil, Adriamycin, Cyclophosphamid, Epirubicin und Methotrexat) und anschließend erhöhter HSP27-Expression nach, wobei es sich hier jedoch um andere Therapeutika handelte.²² Auch in Ehrlich-Aszites-Tumor-Zellen zeigte sich eine HSP27-Induktion nach Behandlung mit Cisplatin.⁷⁹ Konträr zu den gewonnenen Daten dieser Arbeit ist außerdem die Studie von Yamamoto et al., welche sowohl in Cisplatin-resistenten als auch sensitiven OvCa-Zellen eine HSP27-Induktion nach Cisplatin-Therapie nachweisen konnte.⁵²

Die Induktion von HSP27 folgt vermutlich keinem einheitlichen Schema, sondern ist vielmehr von der Krebsentität, der einzelnen Zelllinie und dem jeweiligen Wirkstoff abhängig. Jede der vier untersuchten Zelllinien zeigte eine individuelle Zellantwort, nicht nur in Bezug auf die wachstumshemmende Wirkstoffkonzentration, sondern auch im Expressionsmuster von HSP27 nach Chemotherapie. Im Zeitfenster von 120 h konnte in jeder Zelllinie unter beiden Medikamenten zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein intrazellulärer Konzentrationsrückgang von HSP27 verzeichnet werden. Dieser zeigte sich bei Paclitaxel vor allem in der Zelllinie TOV-21G und bei Carboplatin in TOV-21G, SK-OV-3 und OVCAR-3. Die Linie TOV-112D wies kaum signifikante Modulationen der Konzentration vor. Zu welchem Zeitpunkt und in welchem Ausmaß die Zelle reagiert, ist folglich abhängig sowohl vom Ursprung der Zelllinie als auch vom Wirkmechanismus der zytotoxischen Substanz. Bielka et al. untersuchten in Ehrlich-Aszites-Tumor-Zellen die Expression von HSP27 in Anwesenheit verschiedener Chemotherapeutika, und konnten hierbei ebenfalls ein wirkstoffabhängiges Induktionsverhalten feststellen.⁸⁰ Aktuelle Studien sowie die hier gezeigten Daten weisen darauf hin, dass im OvCa keine HSP27-Induktion durch Paclitaxel und Carboplatin im Rahmen einer schnellen Zellantwort stattfindet. Womöglich bedarf es einer längeren Zeitspanne, um erhöhte Expressionen nachzuweisen, da sich Resistenzen auch in vivo erst nach gewisser Zeit entwickeln. Die Durchsetzung der beiden Therapeutika als Standardtherapeutika spiegelt sich in der zytotoxischen Wirksamkeit wider, bestätigt durch gewonnene Daten mit Ausbleiben von Induktion eines Resistenzfaktor. Andere Zytostatika weisen hingegen expressionsfördernden Einfluss auf, wie von Tanaka et al. verdeutlicht.⁷⁶

Trotz allem sind Resistenzentwicklungen mit hoher HSP27-Expression assoziiert und werden in unterschiedlichem Ausmaß durch zytotoxische Substanzen getriggert. Zu welchem Zeitpunkt Karzinomzellen mit erhöhter HSP27-Synthese reagieren und auf welchem Weg die molekularen Mechanismen der HSP27-Induktion durch Chemotherapeutika beeinflusst werden, bleibt in zukünftigen Arbeiten zu erforschen.

6.2 Freisetzung von HSP27

Zellulärer Stress wie bei der malignen Entartung führt nicht nur zu erhöhter HSP27-Expression, sondern gleichermaßen zu erhöhten Serumspiegeln resultierend aus bisher unbekanntem Freisetzungsmechanismen der Zelle.⁸¹ In Tumorentitäten wie dem Pankreas-, Leber-, Mamma- und Ovarialkarzinom konnte eine erhöhte HSP27-Konzentration im extrazellulären Raum festgestellt werden.^{82,83,84} Korneeva et al. und Olejek et al. zeigten im Serum von OvCa-Patienten durch einen indirekten Nachweis eine höhere Rate an extrazellulärem HSP27 im Vergleich zu gesunden Frauen.^{85,86} Interessanterweise konnte auch im OvCa ein erhöhter HSP27-Spiegel mit der Invasivität des Tumors in Verbindung gebracht werden.⁸³ So berichteten Zhao et al. von erhöhten Konzentrationen bei OvCa-Patientinnen gegenüber gesunden und Patientinnen mit gutartigen Tumoren. Allerdings fand man diese erhöhten Spiegel lediglich bei jenen mit peritonealen Metastasen.⁸³ Somit könnte nicht nur intra- sondern auch extrazelluläres HSP27 als Indikator für Tumorprogression dienen.⁸³ Zhao et al. unterstrichen zudem die Bedeutung von HSP27 im Serum als Indikator für Therapieerfolg und zeigten, dass höhere Serumspiegel nach Chemotherapie mit einem stärkeren Spiegelrückgang einhergehen und sich der Spiegel bei Patientinnen ohne peritoneale Metastasen nach Therapie mit Paclitaxel und Carboplatin nicht signifikant verändert.⁸³

Um die mögliche Biomarker-Funktion von HSP27 näher zu beleuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Chemotherapie auf HSP27-Spiegel untersucht. Konträr zu den Daten von Zhao et al. kam es hier zu keinem Konzentrationsabfall. Im Zeitraum von 120 h stieg der HSP27-Spiegel in allen Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten an. Die Zelllinie SK-OV-3 reagierte am stärksten und besonders unter Carboplatin-Behandlung auf die Wirkstoffinkubation (Abb. 5B und 6B). Des Weiteren kam es bei der Zelllinie TOV-21G unter Paclitaxel- (Abb. 5C) und bei TOV-112D unter Carboplatin-Therapie jeweils ab 72 h zur erhöhten Freisetzung (Abb. 6D). Betrachtet man die intra- und extrazellulären Spiegel im Gesamtbild, lässt sich intrazellulär eine Tendenz zum Konzentrationsabfall und extrazellulär zum Konzentrationsanstieg erkennen. Ob transmembranöse Transportmechanismen oder eine Verminderung der HSP-Synthese zu einem Konzentrationsgefälle führen, ist bisher unklar. Studien belegen sowohl passive als

auch aktive Möglichkeiten der Freisetzung von HSPs. Zugrundeliegende Mechanismen sind für HSP27 jedoch weitgehend unbekannt. Experimente zu HSP70 zeigten hingegen aktive Freisetzungsmechanismen nach Behandlung mit dem immunstimulierenden Zytokin INF- γ und Hyperthermie in leukämischen Zellen.⁸⁷ Weiterhin ist ein Flip-Flop-Mechanismus zur Proteinfreisetzung denkbar, da HSP70 mit den am Zellmembranaufbau beteiligten Phosphatidylserinen assoziiert ist.⁸⁸ Ob ähnliche Regulationen auf HSP27 zutreffen, bleibt weiterhin zu ergründen. Stope et al. untersuchten Sekretionsmechanismen von HSP27 unter Verwendung der OvCa-Zellen OVCAR-3 und SK-OV-3. Hierbei zeigte sich sowohl nach HSP27-Überexpression mittels transienter Transfektion als auch nach Hitzezufuhr eine verstärkte Sekretion.⁸⁹ Es stellte sich eine konzentrationsabhängige Korrelation zwischen intra- und extrazellulärem HSP27-Spiegel heraus.⁸⁹ Des Weiteren wurde gezeigt, dass HSP27 unabhängig vom endoplasmatischen Retikulum und dem Phosphorylierungsstatus sezerniert wird.⁸⁹ Vielmehr seien Exosomen, von der Zelle abgekapselte Mikrosvesikel, wie bei der Zelllinie SK-OV-3 nach Hitzezufuhr gezeigt, für den Transport von HSP27 in den Extrazellularraum verantwortlich.⁸⁹ Auch Clayton et al. berichteten von der Bildung von HSP27 gefüllten Exosomen in B-Zellen nach Stresszufuhr.⁹⁰ In den durchgeführten Experimenten könnte es ebenfalls zur Bildung von Exosomen gekommen sein oder aber die Zellnekrose als Ursache des extrazellulären Anstiegs, ausgelöst durch zytotoxische Einwirkung, betrachtet werden.^{91,92} Die in den vorliegenden Versuchen gezeigte Wachstumshemmung mit folgendem Absterben der Zellen resultiert in passiver Freisetzung intrazellulärer Komponenten. Die erhöhten HSP27-Spiegel auf die Zellnekrose zurückzuführen liegt nahe, denn die Probengewinnung für das ELISA-Verfahren erfolgte aus dem gesamten Zellmedium mit Inhalten bereits abgestorbener Zellen. Je differenzierter die Ursachen und Mechanismen der HSP27-Freisetzung verstanden werden, umso besser kann die Frage der Biomarker-Funktion geklärt werden. Die Freisetzung durch Nekrose resultiert wahrscheinlich aus erfolgreicher, zytotoxischer Wirkung der Chemotherapie wie in vorliegenden Daten dargestellt, wohingegen eine vermutlich aktive Freisetzung im Rahmen der Proteinhomöostase der Tumorzellen auf verstärkte Proliferation hindeuten könnte.

Gelangt HSP27 in den extrazellulären Raum, treten immunmodulierende Einflüsse auf. Mehrfach konnte HSP27 als anti-inflammatorisches Protein charakterisiert werden.^{93,94} Über Aktivierung von Monozyten kommt es zur vermehrten Produktion der immunsuppressiven Mediatoren Interleukin-10 und Thrombospondin-1.^{93,94} An der Immunantwort beteiligte dendritische Zellen aktivieren über Antigen-Präsentation die T-Zellen. Freies HSP27 hat jedoch über inhibitorische dendritische Zellen einen hemmenden Einfluss auf die T-Zell-Proliferation.⁹³ Zusätzlich stört HSP27 die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder dendritischen Zellen.⁹³ Immunsupprimierende Wirkung hemmt einerseits überschießende Entzündungsreaktionen, fördert andererseits durch die Unterdrückung der antitumoralen Immunität die Tumorprogression.⁹⁵ Bestätigt wird die tumorprogressive Wirkung durch eine Studie mit Proben von Mammakarzinom-Patientinnen: HSP27 moduliert die Aktivität der Makrophagen, einhergehend mit dem Funktionsverlust der T-Zellen mit folglich fehlender antitumoraler Wirkung und zusätzlichem proangiogenetischen Einfluss durch Förderung der Neovaskularisation in Tumorzellen.⁹⁶ Ähnliche Mechanismen könnten auch für andere Entitäten wie dem OvCa von Bedeutung sein. Um die antitumorale Immunität zu wahren und gleichzeitig tumorfördernde Einflüsse durch HSPs zu verhindern, wird die Anwendung von Immuntherapien mit Injektion von HSP-Peptid-Komplexen diskutiert. Diese werden aus Tumorzellen des Patienten gewonnen, um eine individuelle, spezifische, gegen kanzerogene Zellen gerichtete Immunantwort auszulösen.⁹⁷ Gelangt HSP27 im Rahmen einer Entzündung oder Krebserkrankung aus der Zelle, reagiert das Immunsystem. Es kommt zur Antikörperbildung. Im OvCa wurden erhöhte HSP27-Antikörper im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen.^{86,85} Korneeva et al. berichteten von der Bildung von Anti-HSP27 IgA bei Patientinnen mit Endometrium-, Zervix- und Ovariakarzinom und unterstrichen dessen Bedeutung als Indikator für gynäkologische Tumoren.⁹⁸ Die Möglichkeit der Verwendung von Anti-HSP27-Antikörpern als prognostische Marker wurde bereits mehrfach bestätigt. Conroy et al. fanden erhöhte HSP27-Antikörper bei Mammakarzinom-Patientinnen mit verbesserter Überlebensrate.⁸⁴ Beim OvCa zeigte sich andererseits eine verminderte Antikörperbildung je fortgeschrittener das Stadium der Erkrankung.⁸⁶ Womöglich kommt es mit der

Progression der Tumorerkrankung zu einer Toleranz des Immunsystems gegenüber HSPs einhergehend mit einem Rückgang der Bildung von Antikörpern.

Zusammengefasst zeigte sich in der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer schnellen Zellantwort eine verstärkte Freisetzung von HSP27 nach zytotoxischer Behandlung. Dieses kann im Patientenserum aus Blutproben detektiert werden und ist womöglich zum einen von Nutzen zur Erkennung des Tumorfortschrittes, zum anderen ein potenzieller Indikator für das Ansprechen auf die Chemotherapie.

6.3 Ausblick

Die 5-Jahresüberlebensrate bei OvCa-Patientinnen ist stark vom Tumorprogress abhängig und variiert zwischen 20 und 90 %.⁹⁹ Da lediglich 25 % im Frühstadium diagnostiziert werden, ist die Etablierung geeigneter Tumormarker für Früherkennungsverfahren umso wichtiger.¹⁰⁰ Der Tumormarker CA-125 wird nur bei 50 % der Patientinnen im Anfangsstadium nachgewiesen und erreicht erst im späteren Verlauf bei 80 bis 85 % positive Werte.¹⁰⁰ Trotz verbesserter Früherkennung, in Kombination mit transvaginaler Sonografie, eignet sich dieser aufgrund geringer Spezifität und Sensitivität vielmehr als Verlaufsmarker.¹⁰⁰ Die Identifizierung zusätzlicher Biomarker für die Diagnose des OvCas ist Mittelpunkt gegenwärtiger Untersuchungen.⁹⁹ Die mit Tumorprogression korrelierende Expression und Freisetzung von HSP27 rechtfertigt dessen zukünftige Verwendung als diagnostischen sowie prognostischen Parameter. Zudem bestätigen zahlreiche Studien die Assoziation des Proteins mit Therapieresistenzen. Auch hier tritt die Markerfunktion als prognostischer Faktor für Therapiewirksamkeit in den Vordergrund. In diesem Zusammenhang entstehen neue Therapieansätze, welche das Protein inhibieren und somit einen Weg zur Resistenzbekämpfung darstellen, und folglich das Tumorwachstum eindämmen. Fehlende Möglichkeiten der direkten Medikamentenbindung mit HSP27 erfordern andere Therapieansätze wie Expressionshemmung auf DNA-Ebene.¹⁰¹ Dies kann durch Antisense Oligonukleotide vermittelt werden, welche an komplementäre mRNA-Regionen binden und die Transkription bestimmter Gensequenzen inhibieren.¹⁰² Untersuchungen im Pankreas- und Prostatakarzinom konnten dem HSP27-Antisense-Oligonukleotid OGX-427

proliferationshemmende, antitumoröse und chemosensitivierende Aktivität in Kombination mit einem Zytostatikum zuweisen.^{101,102,103,104} Die Verwendung von OGX-427 ist momentan noch Gegenstand klinischer Forschung. Im OvCa wurde bisher im Rahmen einer Phase-I-Studie OGX-427 allein sowie in Kombination mit Docetaxel an Patienten mit fehlenden oder erfolglosen kurativen Therapieoptionen untersucht.¹⁰⁵ Mehrere Phase-II-Studien mit OGX-427-Erprobung im Blasen-, Prostata und Bronchialkarzinom wurden außerdem durchgeführt.^{106,107,108} Darüber hinaus gewinnt die HSP-basierte Immuntherapie, welche durch tumorgezielte Abwehr das Tumorwachstum eindämmt, an Bedeutung.

Zusammenfassung

Die hohe Mortalität und späte Erstdiagnose im oft fortgeschrittenen Stadium des OvCas unterstreichen die Notwendigkeit der Identifizierung geeigneter Biomarker. HSP27, Schutzfaktor der Zelle vor gefährdenden Umwelteinflüssen im gesunden Gewebe, Indikator für Tumorprogress und Vermittler von Resistenzen, könnte im Rahmen der Verbesserung diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen genutzt werden. Um einerseits geeignete Früherkennungsmaßnahmen zu etablieren, andererseits eine mögliche Resistenzbildung zu detektieren und gegen HSP27 gerichtete Therapiemöglichkeiten effizient einsetzen zu können, ist die Charakterisierung des HSP27-Umsatzes von Bedeutung. Die genauen Mechanismen der Resistenzentwicklung, ausgelöst durch Chemotherapie, sind noch nicht vollständig verstanden und wurden in dieser Arbeit in einem Zellkulturmodell untersucht. Dazu wurden die vier Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3, TOV-21G und TOV-112 im Zeitfenster von 120 h mit den mittleren inhibitorischen Konzentrationen der Standardchemotherapeutika Paclitaxel und Carboplatin inkubiert. Nach erreichter Wachstumshemmung konnten die Veränderungen der intra- und extrazellulären HSP27-Konzentrationen mittels Western Blot und ELISA analysiert werden. Es zeigte sich nicht nur ein zellspezifisches, sondern auch ein wirkstoffspezifisches Antwortverhalten der vier Zelllinien. Insgesamt stellte sich im Rahmen einer schnellen Zellantwort im Intrazellularraum eine Tendenz zum Konzentrationsabfall und im Extrazellularraum eine Tendenz zum Konzentrationsanstieg von HSP27 heraus. Womöglich greifen die Medikamente in Regulationen der HSP27-Synthese ein oder führen durch Nekrose-induzierte Wirkung zur vermehrten Freisetzung in den Extrazellularraum. Die genauen Freisetzungsmechanismen sind noch unklar. Eine Induktion von HSP27 blieb zumindest im durchgeführten Zeitfenster aus. Womöglich tritt diese zu einem späteren Zeitpunkt ein. Vorliegende Ergebnisse beleuchten das individuelle Antwortverhalten jeder einzelnen Zelllinie auf äußere Stimuli in Form von Chemotherapie. Zukünftige Untersuchungen im OvCa über einen beispielsweise längeren Zeitraum sind erforderlich, um die Eignung von HSP27 als Indikator für Resistenzbildung weiter zu analysieren und zu bewerten.

Literaturverzeichnis

- 1 Ferlay J. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. <http://globocan.iarc.fr>, Zugriff: 15.05.2017.
- 2 Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg. 2015). Krebs in Deutschland 2011/2012. 10 , Berlin, 2015.
- 3 Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 2.0 2016. AWMF-Registernummer: 032/035OL. <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Ovarialkarzinom.61.0.html>, Zugriff: 20.05.2017.
- 4 Nustad K, Bast RC, JR, Brien TJ, Nilsson O, Seguin P, Suresh MR, Saga T, Nozawa S, Bormer OP, Bruijn HW de, Nap M, Vitali A, Gadnell M, Clark J, Shigemasa K, Karlsson B, Kreuz FT, Jette D, Sakahara H, Endo K, Paus E, Warren D, Hammarstrom S, Kenemans P, Hilgers J. Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen. First report from the ISOBM TD-1 workshop. International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. *Tumor Biol.* 1996; 17: 196-219.
- 5 McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 1996; 334: 1-6.
- 6 Marupudi NI, Han JE, Li KW, Renard VM, Tyler BM, Brem H. Paclitaxel. A review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opinion on Drug Safety* 2007; 6: 609-621.
- 7 Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 1971; 93: 2325-2327.
- 8 Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annual review of biochemistry* 2000; 69: 277-302.
- 9 Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980; 77: 1561-1565.
- 10 Rao S, Krauss NE, Heerding JM, Swindell CS, Ringel I, Orr GA, Horwitz SB. 3'-(p-azidobenzamido)taxol photolabels the N-terminal 31 amino acids of beta-tubulin. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269: 3132-3134.

- 11 Markman M, Mekhail TM. Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2005; 3: 755-766.
- 12 Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1999; 44: 355-361.
- 13 Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy. An historical perspective and an update. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 1998; 34: 1522-1534.
- 14 Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222: 385-386.
- 15 Lokich J, Anderson N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors. An analysis of the literature. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 1998; 9: 13-21.
- 16 Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 573-584.
- 17 Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, Greer BE, Boente M, Birrer MJ, Liang SX. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 2011; 365: 2473-2483.
- 18 Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, Du Bois A, Sehouli J, Kimmig R, Stahle A, Collinson F, Essapen S, Gourley C, Lortholary A, Selle F, Mirza MR, Lemin A, Plante M, Stark D, Qian W, Parmar MKB, Oza AM. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 2011; 365: 2484-2496.
- 19 Markman M. Pharmaceutical management of ovarian cancer. Current status. *Drugs* 2008; 68: 771-789.
- 20 Poisson LM, Munkarah A, Madi H, Datta I, Hensley-Alford S, Tebbe C, Buekers T, Giri S, Rattan R. A metabolomic approach to identifying platinum resistance in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2015; 8: 11.
- 21 Simmons AR, Baggerly K, Bast RC. The Emerging Role of HE4 in the Evaluation of Advanced Epithelial Ovarian and Endometrial Carcinomas. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 2013; 27: 548-556.
- 22 Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *International journal of cancer* 1998; 79: 468-475.

- 23 Landry J, Chretien P, Laszlo A, Lambert H. Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells. *Journal of cellular physiology* 1991; 147: 93-101.
- 24 Cotto JJ, Morimoto RI. Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. *Biochemical Society symposium* 1999; 64: 105-118.
- 25 Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *The Journal of biological chemistry* 1993; 268: 1517-1520.
- 26 Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Archives of toxicology* 2013; 87: 19-48.
- 27 Hickey ED, Weber LA. Modulation of heat shock polypeptide synthesis in HeLa cells during hyperthermia and recovery. *Biochemistry* 1982; 21: 1513-1521.
- 28 Garrido C. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell death and differentiation* 2002; 9: 483-485.
- 29 Treweek TM, Meehan S, Ecroyd H, Carver JA. Small heat-shock proteins. Important players in regulating cellular proteostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015; 72: 429-451.
- 30 Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, Mehlen P, Solary E. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer research* 1998; 58: 5495-5499.
- 31 Stope MB, Weiss M, Preuss M, Streitberger A, Ritter CA, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M. Immediate and transient phosphorylation of the heat shock protein 27 initiates chemoresistance in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2014; 32: 2380-2386.
- 32 Bakthisaran R, Tangirala R, Rao CM. Small heat shock proteins. Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2015; 1854: 291-319.
- 33 Lelj-Garolla B, Mauk AG. Self-association and Chaperone Activity of Hsp27 Are Thermally Activated. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 8169-8174.
- 34 Kostenko S, Moens U. Heat shock protein 27 phosphorylation. Kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66: 3289-3307.
- 35 Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994; 78: 1027-1037.
- 36 Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone

- function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274: 18947-18956.
- 37 Arrigo A-P, Viot S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxidants & redox signaling* 2005; 7: 414-422.
- 38 Charette SJ, Landry J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000; 926: 126-131.
- 39 Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature cell biology* 2000; 2: 645-652.
- 40 Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Catley L, Tai YT, Hayashi T, Shringarpure R, Burger R, Munshi N, Ohtake Y, Saxena S, Anderson KC. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 2003; 102: 3379-3386.
- 41 Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, Schwartz JH, Borkan SC. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283: 12305-12313.
- 42 Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2006; 5: 2592-2601.
- 43 Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *The Journal of biological chemistry* 1993; 268: 24210-24214.
- 44 During RL, Gibson BG, Li W, Bishai EA, Sidhu GS, LANDRY J, Southwick FS. Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation. *The EMBO Journal* 2007; 26: 2240-2250.
- 45 Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer research* 1996; 56: 273-279.
- 46 Jones TJ, Adapala RK, Geldenhuys WJ, Bursley C, AbouAlaiwi WA, Nauli SM, Thodeti CK. Primary cilia regulates the directional migration and barrier integrity of endothelial cells through the modulation of hsp27 dependent actin cytoskeletal organization. *Journal of cellular physiology* 2012; 227: 70-76.
- 47 Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJ, Hawkins RA, Smyth JF, Miller WR. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clinical cancer*

- research : an official journal of the American Association for Cancer Research 1995; 1: 1603-1609.
- 48 Huot J, Roy G, Lambert H, Chretien P, Landry J. Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer research* 1991; 51: 5245-5252.
- 49 Richards EH, Hickey E, Weber L, Master JR. Effect of overexpression of the small heat shock protein HSP27 on the heat and drug sensitivities of human testis tumor cells. *Cancer research* 1996; 56: 2446-2451.
- 50 Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, Mehlen P. HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer research* 1997; 57: 2661-2667.
- 51 Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL. Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer research* 1992; 52: 3648-3654.
- 52 Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y. Heat shock protein 27 was up-regulated in cisplatin resistant human ovarian tumor cell line and associated with the cisplatin resistance. *Cancer Letters* 2001; 168: 173-181.
- 53 Lu H, Sun C, Zhou T, Zhou B, Guo E, Shan W, Xia M, Li K, Weng D, Meng L, Xu X, Hu J, Ma D, Chen G. HSP27 Knockdown Increases Cytoplasmic p21 and Cisplatin Sensitivity in Ovarian Carcinoma Cells. *oncol res* 2016; 23: 119-128.
- 54 Song TF, Zhang ZF, Liu L, Yang T, Jiang J, Li P. Small interfering RNA-mediated silencing of heat shock protein 27 (HSP27) Increases chemosensitivity to paclitaxel by increasing Cells (HO8910). *The Journal of international medical research* 2009; 37: 1375-1388.
- 55 Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, Fazli L, Hurtado-Coll A, Yamanaka K, Gleave M. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research* 2004; 64: 6595-6602.
- 56 Pavlikova N, Bartonova I, Dincakova L, Halada P, Kovar J. Differentially expressed proteins in human breast cancer cells sensitive and resistant to paclitaxel. *Int J Oncol* 2014; 45: 822-830.
- 57 Pavlíková N, Bartoňová I, Balušíková K, Kopperova D, Halada P, Kovář J. Differentially expressed proteins in human MCF-7 breast cancer cells sensitive and resistant to paclitaxel. *Experimental Cell Research* 2015; 333: 1-10.
- 58 Kanagasabai R, Krishnamurthy K, Druhan LJ, Ilangovan G. Forced Expression of Heat Shock Protein 27 (Hsp27) Reverses P-Glycoprotein (ABCB1)-mediated Drug Efflux and MDR1 Gene Expression in Adriamycin-resistant Human Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 33289-33300.

- 59 Schäfer C, Seeliger H, Bader DC, Assmann G, Buchner D, Guo Y, Ziesch A, Palagyi A, Ochs S, Laubender RP, Jung A, Toni EN de, Kirchner T, Göke B, Bruns C, Gallmeier E. Heat shock protein 27 as a prognostic and predictive biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2012; 16: 1776-1791.
- 60 Mori-Iwamoto S, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Mikuria K, Fujimoto M, Maehara S-I, Maehara Y, Okita K, Nakamura K, Sakaida I. Proteomics finding heat shock protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *International journal of oncology* 2007; 31: 1345-1350.
- 61 Corley RB. *A Guide to Methods in the Biomedical Sciences*. Springer US, Boston 2005.
- 62 Wilson K, Walker J (Hrsg. 2000). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
- 63 Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder H, Frew AJ, Weyand CM. *Clinical Immunology, Principles and Practice (Expert Consult - Online and Print)*, 4: Clinical Immunology. Elsevier 2013.
- 64 Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat Shock Proteins. Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. *Biochemical and biophysical research communications* 2001; 286: 433-442.
- 65 Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, Neoptolemos JP, Ke Y, Foster CS. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer research* 2000; 60: 7099-7105.
- 66 Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer. Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress and Chaperones* 2005; 10: 86-103.
- 67 Kawanishi K, Shiozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, Tsujinaka T, Shamma A, Monden M. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999; 85: 1649-1657.
- 68 Schneider J, Jimenez E, Marenbach K, Marx D, Meden H. Co-expression of the MDR1 gene and HSP27 in human ovarian cancer. *Anticancer research* 1998; 18: 2967-2971.
- 69 Elpek GO, Karaveli S, Simsek T, Keles N, Aksoy NH. Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2003; 111: 523-530.
- 70 Arts HJ, Hollema H, Lemstra W, Willemse PH, Vries EG de, Kampinga HH, van der Zee AG. Heat-shock-protein-27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma. Relation in response to chemotherapy and prognosis. *International journal of cancer* 1999; 84: 234-238.
- 71 Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. Heat shock protein 27: an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology* 1998; 69: 14-16.

- 72 Geisler JP, Tammela JE, Manahan KJ, Geisler HE, Miller GA, Zhou Z, Wiemann MC. HSP27 in patients with ovarian carcinoma: still an independent prognostic indicator at 60 months follow-up. *European journal of gynaecological oncology* 2004; 25: 165-168.
- 73 Germain I, Tetu B, Brisson J, Mondor M, Cherian MG. Markers of chemoresistance in ovarian carcinomas. An immunohistochemical study of 86 cases. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 1996; 15: 54-62.
- 74 Karaca B, Atmaca H, Bozkurt E, Kisim A, Uzunoglu S, Karabulut B, Sezgin C, Sanli UA, Uslu R. Combination of AT-101/cisplatin overcomes chemoresistance by inducing apoptosis and modulating epigenetics in human ovarian cancer cells. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 3925-3933.
- 75 Kim J-H, Jeong S-J, Kim B, Yun S-M, Choi DY, Kim S-H. Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells. *Journal of Pineal Research* 2012; 52: 244-252.
- 76 Tanaka Y, Fujiwara K, Tanaka H, Maehata K, Kohno I. Paclitaxel inhibits expression of heat shock protein 27 in ovarian and uterine cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 616-620.
- 77 Liu H, Han Y, Mi R, Zhang Y, Su G, Wang H, Zhou X, Liu X, Zhu B. Identification of Cervical Cancer Proteins Associated With Treatment With Paclitaxel and Cisplatin in Patients. *International Journal of Gynecological Cancer* 2011; 21: 1452-1457.
- 78 Shi P, Wang MM, Jiang LY, Liu HT, Sun JZ. Paclitaxel-doxorubicin sequence is more effective in breast cancer cells with heat shock protein 27 overexpression. *Chinese medical journal* 2008; 121: 1975-1979.
- 79 Oesterreich S, Schunck H, Benndorf R, Bielka H. Cisplatin induces the small heat shock protein HSP25 and thermotolerance in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1991; 180: 243-248.
- 80 Bielka H, Hoinkis G, Oesterreich S, Stahl J, Benndorf R. Induction of the small stress protein, hsp25, in Ehrlich ascites carcinoma cells by anticancer drugs. *FEBS Letters* 1994; 343: 165-167.
- 81 Kepenekian V, Aloy M-T, Magné N, Passot G, Armandy E, Decullier E, Sayag-Beaujard A, Gilly F-N, Glehen O, Rodriguez-Lafrasse C. Impact of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy on Hsp27 protein expression in serum of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cell Stress and Chaperones* 2013; 18: 623-630.
- 82 Liao W-C, Wu M-S, Wang H-P, Tien Y-W, Lin J-T. Serum Heat Shock Protein 27 Is Increased in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Carcinoma. *Pancreas* 2009; 38: 422-426.

- 83 Zhao M, Ding JX, Zeng K, Zhao J, Shen F, Yin YX, Chen Q. Heat shock protein 27. A potential biomarker of peritoneal metastasis in epithelial ovarian cancer? *Tumor Biol.* 2014; 35: 1051-1056.
- 84 Conroy SE, Sasieni PD, Amin V, Wang DY, Smith P, Fentiman IS, Latchman DS. Antibodies to heat-shock protein 27 are associated with improved survival in patients with breast cancer. *British journal of cancer* 1998; 77: 1875-1879.
- 85 Korneeva I, Caputo TA, Witkin SS. Cell-free 27 kDa heat shock protein (hsp27) and hsp27-cytochrome c complexes in the cervix of women with ovarian or endometrial cancer. *Int. J. Cancer* 2002; 102: 483-486.
- 86 Olejek A, Damasiewicz-Bodzek A, Bodzek P, Wielkoszyński T, Zamłyński J, Stołtny P, Skutil M. Concentrations of Antibodies Against Heat Shock Protein 27 in the Sera of Women With Ovarian Carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer* 2009; 19: 1516-1520.
- 87 Barreto A, Gonzalez JM, Kabingu E, Asea A, Fiorentino S. Stress-induced release of HSC70 from human tumors. *Cellular Immunology* 2003; 222: 97-104.
- 88 Arispe N, Doh M, Simakova O, Kurganov B, Maio A de. Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18: 1636-1645.
- 89 Stope MB, Klinkmann G, Diesing K, Koensgen D, Burchardt M, Mustea A. Heat Shock Protein HSP27 Secretion by Ovarian Cancer Cells Is Linked to Intracellular Expression Levels, Occurs Independently of the Endoplasmic Reticulum Pathway and HSP27's Phosphorylation Status, and Is Mediated by Exosome Liberation. *Disease markers* 2017; 2017: 1575374.
- 90 Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *Journal of cell science* 2005; 118: 3631-3638.
- 91 Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer. Chaperones of tumorigenesis. *Trends in Biochemical Sciences* 2006; 31: 164-172.
- 92 Saito K, Dai Y, Ohtsuka K. Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells. *Experimental Cell Research* 2005; 310: 229-236.
- 93 Miller-Graziano CL, De A, Laudanski K, Herrmann T, Bandyopadhyay S. HSP27: an anti-inflammatory and immunomodulatory stress protein acting to dampen immune function. *Novartis Foundation symposium* 2008; 291: 196-208; discussion 208-11, 221-4.
- 94 De AK, Kodys KM, Yeh BS, Miller-Graziano C. Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF-alpha induction by heat-shock protein 27 (Hsp27)

- suggests Hsp27 is primarily an antiinflammatory stimulus. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2000; 165: 3951-3958.
- 95 Banerjee S, Lin C-FL, Skinner KA, Schiffhauer LM, Peacock J, Hicks DG, Redmond EM, Morrow D, Huston A, Shayne M, Langstein HN, Miller-Graziano CL, Strickland J, O'Donoghue L, De AK. Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer research* 2011; 71: 318-327.
- 96 Banerjee S, Lin C-FL, Skinner KA, Schiffhauer LM, Peacock J, Hicks DG, Redmond EM, Morrow D, Huston A, Shayne M, Langstein HN, Miller-Graziano CL, Strickland J, O'Donoghue L, De AK. Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer research* 2011; 71: 318-327.
- 97 Liu B, DeFilippo AM, Li Z. Overcoming immune tolerance to cancer by heat shock protein vaccines. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002; 1: 1147-1151.
- 98 Korneeva I, Bongiovanni AM, Girotra M, Caputo TA, Witkin SS. IgA antibodies to the 27-kDa heat-shock protein in the genital tracts of women with gynecologic cancers. *International journal of cancer* 2000; 87: 824-828.
- 99 Zhang B, Cai FF, Zhong XY. An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2011; 158: 119-123.
- 100 Bast RC, JR, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K. New tumor markers: CA125 and beyond. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2005; 15 Suppl 3: 274-281.
- 101 Lelj-Garolla B, Kumano M, Beraldi E, Nappi L, Rocchi P, Ionescu DN, Fazli L, Zoubeidi A, Gleave ME. Hsp27 Inhibition with OGX-427 Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer Cells to Erlotinib and Chemotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 2015; 14: 1107-1116.
- 102 Baylot V, Andrieu C, Katsogiannou M, Taieb D, Garcia S, Giusiano S, Acunzo J, Iovanna J, Gleave M, Garrido C, Rocchi P. OGX-427 inhibits tumor progression and enhances gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer. *Cell Death Dis* 2011; 2: e221.
- 103 Lamoureux F, Thomas C, Yin M-J, Fazli L, Zoubeidi A, Gleave ME. Suppression of heat shock protein 27 using OGX-427 induces endoplasmic reticulum stress and potentiates heat shock protein 90 inhibitors to delay castrate-resistant prostate cancer. *European urology* 2014; 66: 145-155.
- 104 Matsui Y, Hadaschik BA, Fazli L, Andersen RJ, Gleave ME, So AI. Intravesical combination treatment with antisense oligonucleotides targeting heat shock protein-

- 27 and HTI-286 as a novel strategy for high-grade bladder cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009; 8: 2402-2411.
- 105 Hotte SJ, Yu EY, Hirte HW, Higano CS, Gleave ME, Chi KN. Phase I trial of OGX-427, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide (ASO), against heat shock protein 27 (Hsp27). Final results. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28: 3077.
- 106 OncoGenex Technologies. A Phase II Study Comparing Chemotherapy in Combination With OGX-427 or Placebo in Patients With Bladder Cancer. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01454089>, Zugriff: 17.04.2016.
- 107 British Columbia Cancer Agency. OGX-427 in Castration Resistant Prostate Cancer Patients. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01120470?term=ogx-427&rank=2>, Zugriff: 17.04.2016.
- 108 SCRI Development Innovations LLC. Phase II Trial of Carboplatin and Pemetrexed +/- OGX-427 in Untreated Stage IV Non-Squamous-Non-Small-Cell Lung Cancer (Spruce). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01829113>, Zugriff: 17.04.2016.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Alexander Mustea und Prof. Dr. med. Marek Zygmunt danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die Unterstützung und Motivation eine experimentelle Doktorarbeit zu wagen sowie letztendlich auch die Möglichkeit meine Doktorarbeit im molekular-gynäkologischen Forschungslabor der Universitätsmedizin Greifswald durchführen zu können.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias B. Stope für die tolle Betreuung, die stets sehr motivierenden Worte, die anregenden Diskussionen und Hilfestellungen zu jeder Zeit.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des molekular-gynäkologischen Forschungslabors, insbesondere Karoline Diesing für die geduldige Einarbeitung in die Welt der Pipettenspitzen und Zellkulturen. Die Zeit im Forschungslabor war nicht nur fachlich, sondern auch menschlich bereichernd und hat jede Menge Spaß gemacht!

Ich danke außerdem Daria Hettenbach, mit der zusammen ich einen Großteil der Laborerfahrung geteilt und alle Höhen und Tiefen durchlitten habe für die enorme seelische Unterstützung.