

Klinik und Poliklinik
für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
des Klinikums rechts der Isar der
Technischen Universität München
(Prof. Dr. St. E. Combs)

Charakterisierung der HIF-1- und HIF-2-Stabilisierung unter kontinuierlicher versus intermittierender Hypoxie sowie Vergleich der Expression Malignitäts-assoziiertes Marker unter Hypoxie und Normoxie in humanen Pankreasadenokarzinomzellen unterschiedlicher Differenzierung

Ann-Kathrin Neudeck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. G. Multhoff
2. Prof. Dr. St. E. Combs

Die Dissertation wurde am 01.02.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.10.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das duktales Pankreasadenokarzinom - ein hinterhältiger Gegner	1
1.2	Die Hallmarks of Cancer - was zeichnet maligne Tumorzellen aus?	3
1.2.1	Die Hallmarks of Cancer	3
1.2.2	Tumorangiogenese und VEGF	5
1.2.3	Metastasierung und MMP-2	7
1.2.4	Tumore und Chaperone	8
1.3	Hypoxie in Tumoren	13
1.3.1	Hypoxie – Definition und Bedeutung für den zellulären Metabolismus	13
1.3.2	Hypoxie-induzierbare Faktoren – Mediatoren der zellulären Hypoxie-Adaptation	13
1.3.3	Tumorhypoxie	15
1.3.4	Formen der Tumorhypoxie	15
1.3.5	Hypoxie und Tumorprogression	16
1.4	Zielsetzung der Arbeit	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien	20
2.2	Geräte	21
2.3	Zellkultur	21
2.3.1	Zelllinien	21
2.3.2	Zellkulturbedingungen	21
2.4	Durchflusszytometrie (FACS)	22
2.5	Hypoxie	23
2.5.1	Zeitreihen mit bzw. ohne Reoxygenierung	23
2.6	Überstände	26
2.7	Zelllysate	26
2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA™ Protein assays	27
2.9	Exosomenpräparation	27
2.10	SDS-Page und Western Blot	29
2.11	Quantifizierung	31
2.12	ELISA	31
2.12.1	VEGF-ELISA	31
2.12.2	Hsp70-ELISA	31
2.12.3	MMP-2-ELISA	32
2.13	Statistik	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Expression von HIF-1α und HIF-2α bei kontinuierlicher versus intermittierender Hypoxie	33
3.1.1	Kontinuierliche Hypoxie	33
3.1.2	Intermittierende Hypoxie	37
3.2	Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Normoxie und Hypoxie	42
3.2.1	Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Normoxie	42
3.2.2	Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Hypoxie	45
3.3	Freisetzung von Hsp70-enthaltenden Exosomen unter Hypoxie versus Normoxie	51
4.	Diskussion	54

4.1	Kontinuierliche versus intermittierende Hypoxie	54
4.2	Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Normoxie und Hypoxie.....	59
4.2.1	Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Normoxie	60
4.2.2	Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 unter Hypoxie	70
4.3	Freisetzung von Hsp70-enthaltenden Exosomen unter Hypoxie versus Normoxie	76
5.	Zusammenfassung	80
6.	Anhang.....	82
6.1	Abkürzungsverzeichnis	82
6.2	Abbildungsverzeichnis	87
6.3	Tabellenverzeichnis	89
6.4	Lizenzen	91
6.5	Literaturverzeichnis	93
6.6	Danksagung	105

1. Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom - ein hinterhältiger Gegner

Maligne Neoplasien des Pankreas sind die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Im Jahr 2008 wurden in Deutschland ca. 15 000 Neuerkrankungen verzeichnet, damit gehört das Pankreaskarzinom zu den zehn häufigsten Krebserkrankungen in der Bundesrepublik.

Unter den malignen Neoplasien des Pankreas bilden Adenokarzinome mit 95% die mit Abstand größte Gruppe (Robert-Koch-Institut 2012), wobei 80% der Adenokarzinome ihren Ausgang vom Epithel des Pankreasgangsystems nehmen (Schmoll, Höffken et al. 2006).

Die Prognose des duktales Pankreasadenokarzinoms ist sehr schlecht, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland bei nur 8% für Männer bzw. 7% für Frauen. Ursache der infausten Prognose ist insbesondere der späte Zeitpunkt der Diagnosestellung: Bei 90% der Patienten sind bei Erstdiagnose bereits Metastasen nachweisbar. Eine Heilung ist sehr selten und nur bei kurativer Resektion möglich, wobei nur bei ca. 10-15% der Patienten eine kurative Operation indiziert ist. Trotz intensiver Forschung sind die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten seit Ende der 1990er Jahre bei beiden Geschlechtern weitgehend konstant geblieben (Robert-Koch-Institut 2012).

Nur ca. 5% der duktales Pankreasadenokarzinome (PDAC) sind genetisch bedingt, die überwiegende Zahl ist sporadischer Natur. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren des PDAC zählen Zigarettenrauchen, Übergewicht und Diabetes mellitus mit frühem Beginn, zu den nicht modifizierbaren Risikofaktoren Lebensalter, Geschlecht, chronische Pankreatitis (familiär/ tropisch), genetische Prädisposition sowie eine Blutgruppe ungleich 0.

Die Entartung von normalem Pankreasgangepithel zu einem Karzinom erfordert eine Reihe von Mutationen. Sehr früh in der Pathogenese treten in der Regel die Überexpression des HER-2/neu-Rezeptors und KRAS-Punktmutationen auf. In einem intermediären Stadium kommt es häufig zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16, während sehr spät in der Karzinogenese der Ausfall der Tumorsuppressorgene p53, DPC4 und BRCA2 erfolgt. Dieser mehrschrittige Transformationsprozess verläuft über meist zystische Vorläuferläsionen, zu denen die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), die intraduktalen papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) und die muzinös-zystischen Neoplasien (MCN) zählen. Während die IPMN und die MCN der Bildgebung zugänglich sind, ist die häufigste Vorläuferläsion, die PanIN, bisher mit keiner bildgebenden Modalität darstellbar (Muniraj, Jamidar et al. 2013).

Einleitung

Das PDAC ist umgeben von großen Mengen an Tumorstroma aus Kollagen, Fibronectin, Proteoglykanen, Hyaluronsäuren und verschiedenen Enzymen, eine Eigenschaft, die als Desmoplasie bezeichnet wird (Feig, Gopinathan et al. 2012). Die Tumormasse wächst infiltrierend und invasiv, sodass sie im Verlauf in Mesenterialgefäße, perineuronales Gewebe und Lymphgefäße eindringt. Dabei verursacht der wachsende Tumor je nach Lage zunächst meist keine Symptome. Als Frühsymptom der Tumoren im Pankreaskopf kann ein Ikterus im Rahmen eines tumorbedingten Verschlusses der ableitenden Gallenwege auftreten. Tumore im Corpus oder in der Cauda des Pankreas bleiben dagegen meist bis in ein weit fortgeschrittenes Stadium asymptomatisch. Neben einem Ikterus manifestieren sich Pankreasadenokarzinome durch Pruritus, Gewichtsverlust, neu aufgetretenen Diabetes mellitus oder Depression. Im Verlauf der Tumorprogression treten weitere Symptome durch Lebermetastasen, die Kompression und Invasion mit Stenosierung benachbarter Abschnitte des Magen-Darm-Trakts und eine Peritonealkarzinose hinzu.

Zur Erhärtung eines Verdachts auf Pankreaskarzinom dient in der Regel ein transabdomineller Ultraschall. Die definitive Diagnose wird jedoch durch ein abdominelles CT oder MRT gestellt, während die histologische Sicherung der Tumorentität durch endosonographisch gesteuerte Feinnadelaspiration erfolgen kann. Zur Abschätzung der prä- bzw. postoperativen Prognose und zur Überwachung des Therapieansprechens dient der Tumormarker CA 19-9 im Patientenserum. Als Marker für ein Pankreaskarzinom-Screening ist CA 19-9, das weder organspezifisch noch tumorspezifisch ist, wegen seines niedrigen positiv prädiktiven Werts nicht geeignet (Muniraj, Jamidar et al. 2013).

Der einzige kurative Therapieansatz besteht in der vollständigen Resektion eines operablen Pankreaskarzinoms. Selbst bei mikroskopisch tumorfreiem Resektatrand profitiert der Patient von einer adjuvanten Chemotherapie mit Gemcitabin oder mit 5-FU kombiniert mit Folinsäure.

Bei inoperablen Patienten sehen die Leitlinien eine palliative Chemotherapie mit Gemcitabin oder bei metastasiertem PDAC eine Kombination aus Gemcitabin und dem EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib bzw. eine Chemotherapie nach dem FOLFIRINOX-Protokoll vor. Bei symptomatischen Skelett- oder Hirnmetastasen kann eine Strahlentherapie erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Die Prognose des duktaalen Pankreasadenokarzinoms ist auch nach kurativer Resektion infaust. Sie liegt im Median bei 20 bis 22 Monaten (Hidalgo 2010). Zu den Faktoren, die die postoperative Lebenserwartung positiv beeinflussen, zählen: eine Tumorgöße unter 2 cm,

negativer Lymphknotenstatus, ein gut differenzierter Tumor und negative Resektionsränder (Garcea, Dennison et al. 2008). So treten bei schlecht differenzierten bzw. undifferenzierten Pankreasadenokarzinomen signifikant häufiger Frührezidive unter adjuvanter Chemotherapie nach kurativer Resektion auf (Fischer, Breidert et al. 2012).

Ein niedriger Differenzierungsgrad des Tumors beeinflusst jedoch nicht nur die Überlebenschance nach kurativer Operation ungünstig, sondern wirkt sich als unabhängiger Prädiktor in allen Tumorstadien negativ aus. Dies veranlasste die Arbeitsgruppen von Wasif et al. und Rochefort et al. dazu, eine Erweiterung des TNM Staging-Systems des American Joint Committee on Cancer um den Differenzierungsgrad (G) des Tumors vorzuschlagen. In dem von Ihnen etablierten TNMG-System konnten sie in zwei Studien eine verbesserte Trennschärfe bezüglich der Prognose der Patienten belegen (Wasif, Ko et al. 2010, Rochefort, Ankeny et al. 2013).

1.2 Die Hallmarks of Cancer - was zeichnet maligne Tumorzellen aus?

1.2.1 Die Hallmarks of Cancer

Im Jahr 2000 charakterisierten Hanahan und Weinberg in ihrer wegweisenden Übersichtsarbeit die sechs „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan and Weinberg 2000): Sechs grundlegende Aberrationen in der Physiologie von Krebszellen, die in ihrer Gesamtheit zur malignen Entartung führen (Hanahan and Weinberg 2000).

Zu diesen Schlüsselfähigkeiten von Krebszellen zählen:

- Anhaltende Aktivierung proliferativer Signalwege: Tumoren stehen vier Möglichkeiten zur Verfügung, um ihr Wachstum durch Zellteilung aufrechtzuerhalten: a) autokrin, indem Tumorzellen selbstständig Wachstumsfaktoren bilden, die an die zelleigenen Rezeptoren binden und diese stimulieren, b) durch Überexpression von Rezeptoren von Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche, c) durch konstitutive Aktivierung von Elementen der proliferativen Signalkaskade, sodass dieser Signalweg unablässig aktiviert bleibt, d) durch Inaktivierung von negativen Feedback-Mechanismen, die das Wachstum durch Zellteilung hemmen.
- Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Signalen: Durch inaktivierende Mutationen von Genprodukten, die die Zellteilung bremsen, z.B. durch Inaktivierung des RB-Tumorsuppressorgens oder durch Umgehung der Kontakthemmung können Krebszellen immun gegen antiproliferative Stimuli werden.

Einleitung

- Unterdrückung von Apoptose: Zu den Mechanismen, die Krebszellen entwickelt haben, um dem programmierten Zelltod zu umgehen, zählen Loss-of-Function Mutationen oder Deletionen von zellulären Apoptoseinduktoren wie TP53, dem zellulären Sensor für DNS-Schäden, die Überexpression von anti-apoptotischen Mediatoren, das Herunterregulieren von pro-apoptotischen Faktoren oder der Kurzschluss des extrinsischen Wegs des programmierten Zelltods.
- Immortalisierung: Insbesondere durch die Aktivierung des Enzyms Telomerase, einer spezialisierten DNS-Polymerase, die den Telomerverlust verhindert, erlangen Krebszellen unbegrenztes replikatives Potenzial.
- fortgesetzte Angiogenese: Die Grundvoraussetzung für das Tumorwachstum ist seine Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff und die Entsorgung von Abfallstoffen. Zudem bilden die Tumor-versorgenden Gefäße eine Eintrittspforte für die hämatogene Metastasierung von Krebszellen.
- Gewebeinvasion, Metastasierung: Durch die Suppression von Adhäsionsmolekülen und die Expression von Matrix-abbauenden Enzymen wie den Matrix-Metalloproteasen gelingt es Krebszellen, sich aus dem Zellverband des Primärtumors zu lösen, das Nachbargewebe zu infiltrieren und in das Lymph- und Blutgefäßsystem einzudringen, um in anderen Organen des Körpers Absiedlungen zu bilden (Hanahan and Weinberg 2011).

Der Erwerb dieser Schlüsselfähigkeiten ist an genetische Veränderungen gebunden, insbesondere Gain-of-Function Mutationen, Amplifikationen und/oder Überexpression von Onkogenen einerseits und Loss-of-Function Mutationen, Deletionen und/oder epigenetisches Silencing von Tumorsuppressoren andererseits (Hahn and Weinberg 2002).

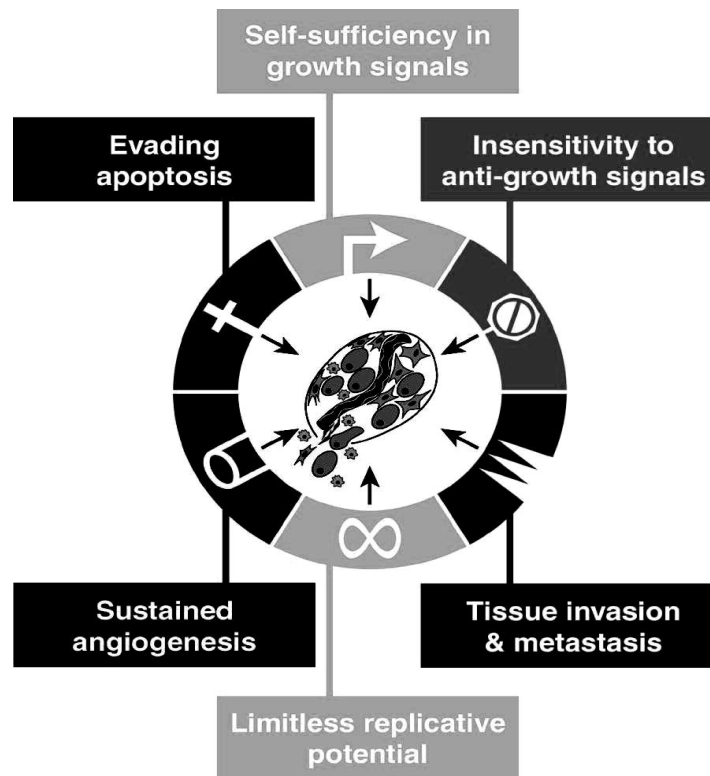


Abb. 1-1: Die sechs „Hallmarks of Cancer“ nach Hanahan und Weinberg (Hanahan and Weinberg 2000)

1.2.2 Tumorangiogenese und VEGF

Ursache der Angiogeneseinduktion in Tumoren ist der sog. *angiogenic switch*, d.h. die Verschiebung der Balance von anti- und pro-angiogenetischen Faktoren hin zum Übergewicht der pro-angiogenetischen Faktoren (Folkman 2002, Schwab 2011). Infolgedessen kommt es zur Ausbildung von Tumor-versorgenden Gefäßen, die es Tumoren ermöglichen, über die Limitationen der Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen hinaus zu wachsen. Einen wesentlichen Beitrag zum *angiogenic switch* leistet die Sekretion pro-angiogenetischer Faktoren durch den Tumor, zu denen auch die Gruppe der Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) zählt (Folkman 2002).

Die VEGF-Familie besteht aus fünf Mitgliedern: VEGF (entspricht VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, placental growth factor (PlGF), wobei VEGF der Hauptmediator ist. Die acht Splicevarianten des Glykoproteins VEGF bestehen aus 121 bis 206 Aminosäuren und bilden antiparallele Homodimere, die durch zwei Disulfidbrücken kovalent verknüpft sind. Als zentrales Element besitzen sie in Analogie zu anderen Wachstumsfaktoren ein Cystin-Knoten-Motiv.

Einleitung

VEGF wird sezerniert, wobei die Splicevarianten in Abhängigkeit von ihren funktionellen Domänen frei in Lösung vorliegen und/oder an Heparine in der extrazellulären Matrix binden. Aus ihrer Bindung an die extrazelluläre Matrix können sie durch Proteolyse freigesetzt werden, wodurch ihre Bioverfügbarkeit reguliert wird.

Seine Wirkung vermittelt VEGF durch Bindung an drei Rezeptoren der Rezeptortyrosinkinase-Gruppe (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), die in ihrer Funktion mit Korezeptoren kooperieren. Seine Hauptfunktion übt VEGF jedoch durch Bindung an den VEGF-Rezeptor 2 auf der Membran von Endothelzellen aus: VEGF wirkt als Mitogen für Endothelzellen, steigert die vaskuläre Permeabilität, induziert Angiogenese und fungiert als Überlebensfaktor für das neu entstandene Gefäßnetz. Darüber hinaus spielt VEGF eine Rolle in der Hämatopoese (Ferrara 2004, Roskoski 2007). Bemerkenswerterweise kann VEGF auch für nicht-endotheliale Zellen als Mitogen wirken, zum Beispiel für das Pankreasgangepithel (Oberge-Welsh, Sandler et al. 1997).

Als Signal für die Genexpression von VEGF wirkt eine niedrige Sauerstoffspannung in der Zelle. Des Weiteren induzieren auch Wachstumsfaktoren (u.a. EGF, TGF- α , TGF- β , IGF-1), Hormone (u.a. TSH, Gonadotropine, Sexualhormone) und pro-inflammatorische Zytokine (z.B. IL-1 α , IL-6) die VEGF-Expression (Ferrara 2004).

Im physiologischen Kontext spielt VEGF-vermittelte Angiogenese unter anderem eine Rolle bei der Anlage des Gefäßsystems während der Embryonalentwicklung, beim Knochenwachstum durch enchondrale Ossifikation, beim Follikelwachstum und der Ausbildung des Corpus luteum im weiblichen Reproduktionszyklus (Ferrara 2004).

In Tumoren ab einer Größe von 0,2-2 mm ist die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch Diffusion nicht mehr suffizient. Durch das hypoxische Milieu wird im Tumor die Sekretion von VEGF angestoßen und es kommt zur Induktion Tumor-versorgender Gefäße. Synergistisch zu der niedrigen Sauerstoffspannung im Tumor bewirken verschiedene onkogene Mutationen wie Mutationen von Ras, Myb, Myc, HER-1 (EGFR), HER-2 sowie der Verlust von Tumorsuppressorgenen wie p53 eine Überexpression von VEGF (Roskoski 2007). Infolge der überschießenden, unphysiologischen Stimulation der Angiogenese sind die neu gebildete Gefäße jedoch hyperpermeabel, chaotisch und vulnerabel. Durch ihre mangelnde Funktionalität und den hohen interstitiellen Druck infolge der vaskulären Leckage bleibt die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff mangelhaft; dem Tumor ist es zwar möglich zu wachsen, das saure, hypoxische Mikromilieu bleibt jedoch erhalten. Dadurch wird die VEGF-Sekretion weiter stimuliert und die unregulierte Angiogenese wird perpetuiert (Farnsworth,

Lackmann et al. 2013). Die irreguläre Gefäßarchitektur begünstigt mit niedriger Perizytdichte und hoher vaskulärer Permeabilität die Invasion von Tumorzellen in den Blutstrom und fördert so die Metastasierung. Damit trägt die VEGF-vermittelte Angiogenese auch zur weiteren Dissemination des Tumorleidens bei (Catalano, Turdo et al. 2013).

1.2.3 Metastasierung und MMP-2

Im Rahmen ihrer Progression entwickeln die meisten Tumorentitäten die Fähigkeit, in benachbartes Gewebe vorzudringen und auf hämatogenem oder lymphogenem Weg in andere Organe zu streuen. Dort setzen sie ihr zerstörerisches Werk fort, indem sie das funktionstragende Gewebe durch Kompression und Infiltration zerstören (Holland, Frei et al. 2000). Es ist dieses invasive Potenzial, das für den tödlichen Ausgang von Krebserkrankungen verantwortlich ist: 90% der Krebspatienten sterben infolge von Metastasen (Chaffer and Weinberg 2011).

Gewebeinfiltration und Metastasierung sind an die Aktivität von Proteasen gebunden, die den Tumorzellen durch Abbau der Basalmembran des Ursprungsepithels, Degradation der extrazellulären Matrix und Arrodierung der Basalmembran von Blutgefäßen den Weg bahnen. Zu den im Rahmen der Tumorinvasion aktiven Proteasen zählt auch die Gruppe der Matrix-Metalloproteasen (Holland, Frei et al. 2000).

Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Zink-abhängigen Proteasen, deren Hauptfunktion der Umbau der extrazellulären Matrix ist. Matrix-Metalloproteasen werden überwiegend sezerniert, der andere Teil der Matrix-Metalloproteasen besitzt eine membrangebundene Form. Die Matrix-Metalloproteasen werden nicht in ihrer funktionsfähigen Form, sondern als inaktive Proenzyme freigesetzt. Die Aktivierung der Vorstufen erfolgt durch proteolytische Prozessierung.

Matrix-Metalloproteasen haben primär Bedeutung für den Turn-over der extrazellulären Matrix. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle in der zellulären Kommunikation durch die Freisetzung von Zytokinen aus Membran-gebundenen Vorstufen, dem sogenannten *Shedding*.

Ihre Expression wird durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen induziert. Eine negative Regulation erfolgt durch Breitspektrum-Proteaseinhibitoren wie α 2-Globulin und spezifischen Inhibitoren der MMPs, den Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs).

Einleitung

Die Einteilung der sezernierten Matrix-Metalloproteasen erfolgt gemäß ihrer Substratspezifität in vier Klassen: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und sonstige. Die membrangebundenen MMPs werden als eigene Klasse betrachtet.

MMP-2 gehört zusammen mit MMP-9 zur Klasse der Gelatinasen, die sich durch ihre Fähigkeit, denaturiertes Kollagen (Gelatine) abzubauen, auszeichnet. Ihre Expression erfolgt ubiquitär und konstitutiv. Die Aktivierung von MMP-2 erfolgt durch Bindung von pro-MMP-2 an TIMP-2, der Komplex bildet dann das Substrat für die membrangebundene MMP-14. Abgesehen von Gelatin ist MMP-2 auch zur Degradation von Kollagen Typ I, IV sowie V, Elastin und Vitronectin in der Lage. Dadurch ist MMP-2 fähig, die Basalmembran von Gefäßen zu arrodieren, welches Vorbedingung für Angiogenese und Neovaskularisation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen wie Tumor-Angiogenese und Metastasierung ist. In diesem Kontext ist auch die Freisetzung von in der extrazellulären Matrix gebundenem VEGF zu sehen. Darüber hinaus schafft das Durchbrechen der epithelialen Basalmembran die entscheidenden Voraussetzungen für die Ausbreitung eines Tumors durch Infiltration und Gefäßinvasion. Des Weiteren kann die Freisetzung von Gelatinasen die Tumorprogression durch Prozessierung von Wachstumsfaktoren weiter vorantreiben (Klein and Bischoff 2011). Entsprechend ist eine verstärkte Expression von Gelatinasen in vielen Tumorzellen und umgebendem Stroma nachweisbar (Hadler-Olsen, Winberg et al. 2013), so auch im duktalem Pankreasadenokarzinom (Bramhall, Neoptolemos et al. 1997, Gong, Xu et al. 2000).

1.2.4 Tumore und Chaperone

1.2.4.1 Non-oncogene Addiction

Tumorzellen sind nicht nur auf aktivierte Onkogene angewiesen, um ihr Überleben und ihre Proliferation zu sichern, sondern zeigen auch eine gesteigerte Abhängigkeit von normalen zellulären Funktionen - ein Phänomen, das als *non-oncogene addiction* bezeichnet wird (Solimini, Luo et al. 2007).

So sind Aneuploidie und Veränderungen der Zahl der Genkopien kennzeichnend für viele solide Tumoren. Das hieraus resultierende Übergewicht von Wachstums- und Überlebensfaktoren führt einerseits zur Unterdrückung von Apoptose und Proliferation und damit letztendlich zur Tumorgenese, andererseits führt die Dysregulation von Transkriptionsleveln zu einer Störung der Stöchiometrie der Einzelkomponenten von Proteinkomplexen. Dadurch steigt die Zahl der toxischen ungefalteten Proteinaggregate und belastet die zelleigene Proteinfaltungs- und -degradationsmaschinerie.

Einleitung

Tumorzellen lösen dieses Problem unter anderem durch die Aktivierung der Hitzeschockantwort (Luo, Solimini et al. 2009). Entsprechend zeigen die meisten Tumorzellen eine Überexpression von Hitzeschockproteinen und anderen Chaperonen. Die Blockade der Hitzeschockantwort führt zum Zelltod. Umgekehrt profitieren Tumorzellen von einer Überexpression der Hitzeschockproteine, da insbesondere erhöhte zelluläre Konzentrationen von Hsp70 und Hsp27 zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber der Induktion des programmierten Zelltods durch andere exogene und endogene Stimuli führen sowie Resistenz gegen Chemotherapeutika vermitteln (Calderwood, Khaleque et al. 2006).

1.2.4.2 Chaperone

Als molekulare Chaperone werden Proteine mit folgenden Eigenschaften bezeichnet:

- (1) Sie helfen anderen Molekülen dabei, sich in ihren endgültigen funktionsfähigen Zustand zu falten, indem sie unerwünschte Interaktionen bei der Faltung blockieren oder rückgängig machen.
- (2) Sie sind nicht Bestandteil der endgültigen aktiven Konformation (Meyers).

1.2.4.3 Hsp70

Eine wesentliche Rolle im Chaperon-System der Zelle spielt die Hsp70-Familie. Varianten dieser Faltungshelfer mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa sind in allen Organismen zu finden. Hsp70 ist aus zwei Domänen aufgebaut: einer N-terminalen Nukleotid-Bindungsdomäne mit ATPase-Aktivität und einer C-terminalen Peptidbindungsdomäne. Dieser Aufbau ist über alle Spezies hinweg hochgradig konserviert (Murphy 2013).

Die humane Hsp70-Familie setzt sich aus mindestens acht verschiedenen Proteinen zusammen, die sich in zellulärer Lokalisation, Gewebespezifität und Expressionsmodus unterscheiden (Daugaard, Rohde et al. 2007).

Zentrale Eigenschaft der Mitglieder der Hsp70-Familie ist ihre Fähigkeit, ungefaltete Proteine über deren exponierte hydrophobe Domänen zu erkennen und zu binden. Durch anschließende kontrollierte Freisetzung der gebundenen Proteine ermöglichen sie bevorzugt die vorgesehenen Wechselwirkungen im Makromolekül und unterstützen so deren korrekte Faltung. Angetrieben wird dieser Reaktionszyklus durch Bindung und Spaltung von ATP (Meyers). Entsprechend liegen die Aufgaben der Hsp70-Proteine unter physiologischen Bedingungen u.a. in folgenden Bereichen:

Einleitung

- (1) Proteinfaltung: Einige Mitglieder der Hsp70-Familie verhindern die Aggregation von noch ungefalteten Proteinen und unterstützen ihre Faltung in den nativen Status. Darüber hinaus sind sie in der Lage, Proteinaggregate in Kooperation mit anderen Chaperonen aufzulösen und auf diese Weise die Faltung zurück in den funktionellen Zustand zu unterstützen.
- (2) Transport von Proteinen über Membranen
- (3) Signaltransduktion: Hsp70-Proteine wirken als regulatorische Elemente in Signalwegen, die Zellhomöostase, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod kontrollieren (Mayer and Bukau 2005, Daugaard, Rohde et al. 2007).

Neben den konstitutiv exprimierten Mitgliedern der Hsp70-Familie, die primär House-keeping-Funktionen erfüllen, gibt es im humanen Organismus drei Subtypen, die durch zellulären Stress, wie Hitze, Ischämie, oxidativen Stress oder Infektionen induzierbar sind. In Abwesenheit dieser Stressoren werden sie zellzyklusabhängig nur in niedriger Konzentration gebildet (Kiang and Tsokos 1998, Murphy 2013).

Unter Stressbedingungen dagegen wird ihre Transkription durch Stress-sensible Transkriptionsfaktoren, die Hitzeschock-Faktoren (HSF), vor allem HSF-1, angestoßen. Diese werden durch den vermehrten Anfall von entfaltenen und aggregierten Proteinen unter zellulärem Stress aktiviert und binden als Trimere an ihre DNS-Bindungs-Elemente, sogenannte Hitzeschockelemente (HSE), im Promotor der Gene der Stress-induzierbaren Hsp70 (Murphy 2013). Die gebildeten Stress-induzierbaren Hsp70 verhindern gemäß ihrer Funktion als Chaperone die Aggregation der unter diesen Stressbedingungen vermehrt anfallenden fehlgefalteten und denaturierten Proteine und tragen so zur Wiederherstellung ihres funktionellen Zustands bei. Darüber hinaus greifen sie aber auch direkt hemmend in die Signalwege des programmierten Zelltods ein und geben so der Zelle die Möglichkeit, die Schäden zu reparieren (Beere and Green 2001).

Als Bremse der Hitzeschockantwort wirkt eine negative Feedbackschleife zwischen HSF-1 und den Stress-induzierbaren Hsp70-Proteinen (Akerfelt, Morimoto et al. 2010).

Neben der physiologischen Bedeutung besitzt das Hsp70-System eine essenzielle Bedeutung für die Pathophysiologie, insbesondere für die Tumorgenese.

Durch Querverbindungen zwischen aktivierten onkogenen Signalwegen und der Regulation von HSF-1 einerseits sowie den erhöhten proteotoxischen Stress in Tumorzellen andererseits kommt es in Tumorzellen häufig zu einer vermehrten Expression von

Hitzeschockproteinen (Murphy 2013). So zeigen auch Pankreaskarzinome eine im Vergleich zum gesunden Gewebe gesteigerte Hsp70-Expression (Gress, Muller-Pillasch et al. 1994, Aghdassi, Phillips et al. 2007).

Durch ihre hemmende Wirkung auf die Apoptosekaskade sichern die erhöhten zytosolischen Hsp-Konzentrationen das Überleben der Tumorzellen und fördern dadurch indirekt das Tumorwachstum (Calderwood 2007).

Neben der Überexpression von Stress-induzierbarem Hsp70 können Tumorzellen weitere Aberrationen im Hsp70-System aufweisen: Einige Tumorzellen exprimieren Hsp70 auf ihrer Membran, ein Charakteristikum, das normales Gewebe nicht aufweist (Multhoff, Botzler et al. 1997, Pfister, Radons et al. 2007).

Darüber hinaus sezernieren Tumorzellen aktiv Hsp70 in Form von Exosomen (Wolfers, Lozier et al. 2001). Exosomen sind Membranvesikel mit einem Durchmesser von ca. 40-100 nm. Sie bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht, die einen Kern aus Zytosol, Proteinen und Nukleinsäuren umfasst. Ihre Bildung und Freisetzung erfolgt über den endosomalen Weg unter Beteiligung von Proteinen der Rab-Familie und wird u.a. durch extrazelluläre Stimuli aber auch zellulären Stress getriggert (Azmi, Bao et al. 2013). Exosomen können von anderen Zellen über drei verschiedene Mechanismen - durch Rezeptor-abhängige Endozytose, durch direkte Fusion mit der Membran der Zielzelle und durch Phagozytose - aufgenommen werden. Damit stellen Exosomen für gesunde wie auch entartete Zellen ein multipel einsetzbares Kommunikationsmittel für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion dar. So zählen zu ihrer Proteinfracht neben Tetraspanines, Enzymen, Zytoskelettbestandteilen, Transportproteinen und Hitzeschockproteinen auch Signalmoleküle und MHC-Moleküle. Exosomen von Tumorzellen enthalten darüber hinaus Onkoproteine, Onko-miRNA und Onko-mRNA, die von benachbarten Tumorzellen aufgenommen werden und deren Wachstum stimulieren können (Kharaziha, Ceder et al. 2012). Über die Exosomenfracht hinaus können auch mit der Exosomenmembran assoziierte Moleküle Signalwirkung besitzen: Exosomen von Membran-Hsp70-positiven Tumoren besitzen ebenfalls Membran-gebundenes Hsp70. Dieses stimuliert das angeborene Immunsystem, indem es die zytotoxische Aktivität von Natürlichen Killerzellen fördert (Gastpar, Gehrman et al. 2005).

1.2.4.4 Hsp27

Hsp27 gehört zur Gruppe der Small Heat Shock Proteins (sHSPs), die ebenfalls Teil des zellulären Chaperon-System sind. Die Grundbausteine der Small Heat Shock Proteins sind Monomere mit einem Molekulargewicht von ca. 10-42 kDa, deren zentrales Element eine

Einleitung

konservierte α -Crystallin-Domäne ist. Diese dient der Dimerisierung und ist aus 80-90 Aminosäuren aufgebaut, die sich zu zwei β -Faltblatt-Strukturen anordnen. Die α -Crystallin-Domäne wird durch variabelere N- und C-terminale Domänen eingerahmt, die für die weitere Oligomerisation und die Bindung des Substrats verantwortlich sind (Sun and MacRae 2005).

Die Small Heat Shock Proteins wirken als ATP-unabhängige Holdasen: Ihre Hauptfunktion besteht im Binden und Festhalten von fehlgefalteten Proteinen, wodurch sie die Bildung zytotoxischer Proteinaggregate verhindern. In der Auflösung der Proteinaggregate kooperieren sie dann mit ATP-abhängigen Faltungshelfern, u.a. Hsp70. Ihre Chaperon-Funktion erfüllen die sHSPs in Form von Oligomeren variabler Zusammensetzung. Ihr Oligomerisationszustand moduliert ihre Bindungseigenschaften und wird durch die reversible Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in den Monomeren reguliert. Der Funktion der sHSPs als Faltungshelfer kommt insbesondere unter Stressbedingungen, unter denen es zu einem vermehrten Anfall fehlgefalteter Proteine kommt, große Bedeutung zu (Garrido, Paul et al. 2012). Unter dem Einfluss endogener oder exogener Noxen wie Hyperthermie oder Hypoxie wird die Expression von sHSPs zum einen durch Bindung von HSF-1 an Heat Shock Elements, zum anderen durch Aktivierung von sogenannten Stress Response Elements (STRE) im Promotor der sHSPs stimuliert. Die Transkription von Hsp27 steht unter hypoxischen Bedingungen zudem noch unter der Kontrolle von HIF-1 α (de Thonel, Le Mouel et al. 2012). Über ihre Rolle als Faltungshelfer hinaus erfüllen sHSPs noch weitere Aufgaben in der zellulären Stressantwort: Insbesondere Hsp27 schützt die Zelle vor oxidativem Stress, indem es die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies durch Absenkung des intrazellulären Eisenspiegels und Aktivierung der Glutathionbildung reduziert (Vidyasagar, Wilson et al. 2012). Darüber hinaus fördert Hsp27 den Proteasom-vermittelten Abbau oxidierter Proteine und verhindert dadurch deren Akkumulation in der Zelle. Des Weiteren greifen sHSPs hemmend in den programmierten Zelltod ein: Hsp27 wirkt sowohl als negativer Regulator des intrinsischen Wegs des programmierten Zelltods, ausgelöst zum Beispiel durch Hyperthermie und oxidativen Stress, als auch des extrinsischen Wegs, der zum Beispiel durch Aktivierung des Fas-Rezeptors angestoßen werden kann (Garrido, Paul et al. 2012).

Wie auch im Fall ihrer größeren Verwandten beuten Tumorzellen die zytoprotektiven Eigenschaften der sHSPs aus. Eine Hsp27-Überexpression findet sich in verschiedenen Tumorentitäten. Durch seine hemmende Wirkung auf den Caspase-abhängigen programmierten Zelltod, ist Hsp27 mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verbunden (Vidyasagar, Wilson et al. 2012).

1.3 Hypoxie in Tumoren

1.3.1 Hypoxie – Definition und Bedeutung für den zellulären Metabolismus

Hypoxie bezeichnet eine kritische Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks in einem Gewebe, die eine molekulare oder physiologische Reaktion hervorruft (Schwab 2011).

In gesundem Gewebe beträgt der physiologische interstitielle Sauerstoffpartialdruck je nach Organ zwischen 10 und 80 mmHg, wobei 10 mmHg als Schwellenwert betrachtet werden kann (Hockel and Vaupel 2001, Cairns, Papandreou et al. 2006).

Sauerstoffpartialdrücke unter diesem Schwellenwert stellen eine vitale Bedrohung für die zelluläre Integrität dar. Durch die verminderte ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung wird der aktive Transport in der Zelle beeinträchtigt. Dadurch droht der Zelle der Zusammenbruch des Na⁺- K⁺-Gradienten, die Depolarisierung der Zellmembran, Cl⁻-Einstrom, Zellschwellung, erhöhte zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen und intrazelluläre Azidose (Hockel and Vaupel 2001). Das verminderte Sauerstoffangebot kann zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase führen, zu Apoptose oder Nekrose infolge intrazellulärer Übersäuerung, ATP-Depletion und der Hypoxie-induzierten Expression von Apoptose-Mediatoren. Dem Hypoxie-induzierten Proliferationsstopp und Zelluntergang stehen wirksame Adaptionsmechanismen entgegen, die das zelluläre Überleben trotz Sauerstoff- und Nährstoffmangel und sinkendem intrazellulärem pH zu sichern vermögen (Harris 2002, Bacon and Harris 2004).

1.3.2 Hypoxie-induzierbare Faktoren – Mediatoren der zellulären Hypoxie-Adaptation

Eine Schlüsselrolle in den zellulären Anpassungsvorgängen an ein vermindertes Sauerstoffangebot spielt eine Gruppe Sauerstoff-labiler Transkriptionsfaktoren, die Hypoxie-induzierbaren Faktoren. Sie gehören zur Familie der basic helix-loop-helix-PAS (bHLH/PAS) Transkriptionsfaktoren und bestehen aus einer Sauerstoff-abhängig regulierten HIF α -Untereinheit und einer Sauerstoff-unabhängig, konstitutiv exprimierten HIF β -Untereinheit, die zusammen den aktiven HIF-Komplex bilden (Hansen, Kristensen et al. 2011).

Es existieren drei Isoformen – HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α . HIF-1 α und HIF-2 α stellen dabei die wesentlichen Mediatoren der Hypoxieantwort da, wobei HIF-1 α ubiquitär im Organismus exprimiert wird, HIF-2 α dagegen nur in wenigen Geweben, z.B. in Endothel, Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Leber, Pankreas und Darm. Die Funktion von HIF-3 α ist noch nicht endgültig geklärt (Hansen, Kristensen et al. 2011, Keith, Johnson et al. 2012).

Einleitung

Die Steuerung der Aktivität der HIF erfolgt sauerstoffabhängig vor allem durch post-translationale Modifizierung und Stabilisierung.

Unter normoxischen Bedingungen ist die HIF α -Untereinheit nicht stabil: In einer Sauerstoff-abhängigen Reaktion modifizieren Prolylhydroxylasen Prolylreste in der HIF α -Untereinheit. Die hydroxylierte HIF α -Untereinheit wird durch das von Hippel-Lindau-Protein gebunden, welches eine Ubiquitin-Ligase rekrutiert, die die HIF α -Untereinheit dem Abbau durch das 26S-Proteasom zuführt.

Eine weitere Hydroxylase reguliert sauerstoffabhängig die transkriptionelle Aktivität von HIF. Factor inhibiting HIF (FIH) hydroxyliert unter normoxischen Bedingungen einen Asparaginrest in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne der HIF α -Untereinheit, wodurch Wechselwirkungen zwischen HIF und transkriptionellen Koaktivatoren und damit eine effektive Aktivierung der Transkription verhindert werden.

Unter hypoxischen Bedingungen sind die für den Sauerstoff-abhängigen Abbau der HIF α -Untereinheiten verantwortlichen Prolylhydroxylasen nicht funktionsfähig. HIF α transloziert in den Nukleus und dimerisiert mit der β -Untereinheit. Der HIF-Komplex bindet an sogenannte Hypoxia response elements (HRE) im Promotor seiner Zielgene und führt dort zur Induktion oder Suppression der Transkription. Eine suffiziente Transkription erfordert jedoch die Interaktion mit Koaktivatoren (Hansen, Kristensen et al. 2011).

Die Zielgene von HIF-1 α lassen sich vier großen Kategorien zuordnen: Glucosetransporter und Enzyme der Glycolyse mit der Folge einer erhöhten Effizienz der Energiebereitstellung durch anaeroben Glykolyse, Angiogenese mit dem Ziel einer verbesserten Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, Überleben und Proliferation sowie Invasion und - im Kontext der Tumorprogression - Metastasierung.

HIF-2 α ähnelt HIF-1 α strukturell in seiner Dimerisierungs- und DNS-Bindungsdomäne, unterscheidet sich aber in seiner Transaktivierungsdomäne. Entsprechend gibt es eine Reihe von Genen, deren Transkription sowohl durch HIF-1 α als auch durch HIF-2 α aktiviert wird, darüber hinaus besitzen sie aber auch individuelle Zielgene (Lu and Kang 2010). Zu den gemeinsamen Zielgenen gehören u. a. VEGF und der Glucose Transporter 1. Zu den alleinigen Zielgenen von HIF-2 α zählen dagegen u.a. der Stammzellefaktor Oct-4, der Zellzyklus-Regulator Cyclin D1 und das für die Hämatopoese essenzielle Hormon Erythropoietin (EPO) (Patel and Simon 2008, Schwab 2011). Jedoch unterscheidet sich die Gen-Regulation von Gewebe zu Gewebe, so dass eine generelle Unterteilung in HIF-1-regulierte bzw. HIF-2-regulierte Gene nicht möglich ist (Hansen, Kristensen et al. 2011).

1.3.3 Tumorhypoxie

50-60% der soliden Tumore enthalten hypoxische oder anoxische Areale, in denen der interstitielle Sauerstoffpartialdruck weniger als 5 mmHg beträgt (Cairns, Papandreou et al. 2006, Vaupel and Mayer 2007). Insbesondere das duktales Pankreasadenokarzinom zeichnet sich durch einen signifikant niedrigeren intratumoralen Sauerstoffpartialdruck im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe aus (Koong, Mehta et al. 2000). Ursächlich ist zum einen die geringe Zahl der Tumor-versorgenden Gefäße, zum anderen die starke desmoplastische Reaktion des duktales Pankreasadenokarzinoms. Dies hat eine massive Akkumulation von Tumorstroma zur Folge und kann zur Kompression der Tumor-versorgenden Gefäße führen. Dadurch wird die Perfusion des Tumors weiter beeinträchtigt (Feig, Gopinathan et al. 2012).

1.3.4 Formen der Tumorhypoxie

Bei der Tumorhypoxie werden primär zwei Subtypen unterschieden:

- Chronische Hypoxie: Chronische Hypoxie bezeichnet einen Stunden bis Tage anhaltenden Zustand der Sauerstoffunterversorgung. Ursächlich für das insuffiziente Sauerstoffangebot können verlängerte Diffusionsstrecken bei unzureichender Kapillardichte im rasch wachsenden Tumor sein, eine verminderte Sauerstofftransportkapazität des Blutes infolge einer Tumor- oder Therapie-bedingten Anämie oder eine gestörte Perfusion der Tumor-versorgenden Gefäße durch Thrombosierung oder äußere Kompression.
- Akute Hypoxie: Als akute Hypoxie werden Minuten bis Stunden anhaltende Phasen des Sauerstoffmangels bezeichnet, die sich zyklisch mit Phasen der Reoxygenierung abwechseln können. Hervorgerufen wird akute bzw. intermittierende Hypoxie durch vorübergehende Obstruktion von Gefäßen durch Aggregation von Tumor- oder Blutzellen oder Fibrin, durch Umbauprozesse in der Tumor-versorgenden Gefäßarchitektur, durch kurzzeitige Perfusion der Kapillaren mit ausschließlich Plasma. Zu den durch den Sauerstoffmangel bedingten Auswirkungen auf die Zellfunktion treten Effekte durch reaktive Sauerstoffspezies, die bei der Reoxygenierung entstehen (Vaupel and Mayer 2014).

Eine klare Definition des zeitlichen Rahmens von akuter und chronischer Hypoxie existiert bisher nicht in der Literatur. Die für in-vitro-Experimente zur akuten zyklischen Hypoxie gewählten Intervalle variieren von Minuten bis hin zu einer Woche, während als akute kontinuierliche Hypoxie 30 Minuten bis 3 Tage gewählt wurden und der experimentelle

Zeitraumen für chronische kontinuierliche Hypoxie in vitro 4 Stunden bis mehrere Wochen umfasst. Entsprechend unterscheiden sich auch die experimentellen Ergebnisse in vitro bezüglich der biologischen Konsequenzen von akuter zyklischer/ kontinuierlicher bzw. chronischer Hypoxie. Es besteht jedoch ein Trend zu der Annahme, dass die zellulären Vorgänge unter akuter Hypoxie primär unter der Kontrolle von HIF-1 α stehen, wobei Hinweise für eine verstärkte HIF-1 α -Aktivität unter zyklischem Wechsel von Phasen der Hypoxie und der Reoxygenierung existieren (Matsumoto, Yasui et al. 2010, Bayer and Vaupel 2012). Dagegen wird HIF-2 α eine Funktion insbesondere in Phasen lang anhaltender Hypoxie zugeschrieben (Keith, Johnson et al. 2012).

1.3.5 Hypoxie und Tumorprogression

Sauerstoffmangel führt auch in Tumorzellen zu Adaptationsvorgängen mit dem Ziel, das Überleben der Tumorzellen unter widrigen Bedingungen zu sichern. Darüber hinaus können die durch den Sauerstoffmangel hervorgerufenen Veränderungen im Proteom und Genom des Tumors jedoch zur Tumorprogression beitragen und einen aggressiveren Phänotyp begünstigen (Vaupel and Harrison 2004). So kann die zelluläre Hypoxiereaktion die vermehrte Expression von anti-apoptischen Proteinen wie Bcl-2, Bcl-X_L und IAP fördern und zur Aktivierung des PI-3K/Akt-Signalwegs führen, der Zellüberleben und -proliferation steuert, wodurch das Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellproliferation im Tumor weiter ausgehebelt wird. Eine Steigerung der Telomerase-Aktivität unter Sauerstoffmangel trägt zur Immortalisierung der Tumorzelle bei. Darüber hinaus induziert HIF-1 die Expression von Wachstumsfaktoren und Angiogenesemediatoren wie VEGF, TGF β und IGF-2, wodurch die weitere Proliferation des Tumors gefördert wird. Ein Tumorwachstum über eine Größe von 1-2 mm hinaus erfordert jedoch die Ausbildung Tumor-versorgender Gefäße. Ein vermindertes Sauerstoffangebot im Gewebe stimuliert die Sekretion von Angiogeneseinduktoren wie VEGF und PDGF, während die Expression von anti-angiogenetischen Faktoren supprimiert wird (Zhou, Schmid et al. 2006, Vaupel 2008). Die induzierten Tumor-versorgenden Gefäße zeichnen sich durch eine irreguläre Struktur und erhöhte Permeabilität aus, wodurch eine hämatogene Dissemination von Tumorzellen begünstigt wird (Catalano, Turdo et al. 2013). Gewebsinfiltration und Metastasierung vorangestellt ist jedoch ein Prozess, der als Epithel-Mesenchym-Transition bezeichnet wird. Die transformierten Zellen verlieren ihre epitheliale Polarität, zeigen eine erhöhte Motilität, exprimieren eine verminderte Zahl von interzellulären Adhäsionsmolekülen und erwerben mesenchymale Eigenschaften (Thomas-Tikhonenko 2010). Ein verminderter Sauerstoffpartialdruck im Tumor fördert diesen Vorgang, indem Hypoxie-bedingt die Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin herabreguliert wird.

Einleitung

Darüber hinaus begünstigt die HIF-abhängige Expression von Enzymen, welche die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran abbauen, die Gewebsinvasion und Intravasation und damit die lokale und systemische Ausbreitung des Tumors (Lu and Kang 2010). Des Weiteren führen hypoxische Bedingungen im Tumor zu einer verminderten Effizienz der DNS-Reparaturmechanismen, während bei Reoxygenierung genotoxische reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Infolge dessen wird das Auftreten von Punktmutationen und Genamplifikation begünstigt, die wiederum zur Tumorprogression führen können.

Eine weitere Konsequenz einer unzureichenden Oxygenierung von Tumorarealen ist eine verminderte Effizienz Sauerstoff-abhängiger Therapieverfahren. So führt Tumorphoxie zu einem verminderten Ansprechen unter Strahlentherapie, da durch die verminderte Anzahl der durch die Bestrahlung gebildeten Sauerstoffradikale weniger DNS-Doppelstrangbrüche induziert werden, die primär für die toxische Wirkung der Strahlentherapie verantwortlich sind, und die entstandenen DNS-Doppelstrangbrüche auch nicht durch Adduktbildung mit Sauerstoff fixiert werden.

Ebenso benötigen eine Reihe von Chemotherapeutika Sauerstoff, um ihre Wirkung zu entfalten. Darüber hinaus kann der unter hypoxischen Bedingungen erniedrigte pH-Wert im Gewebe den Effekt von einigen Chemotherapeutika beeinträchtigen. Des Weiteren kann die insuffiziente Architektur der Tumor-versorgenden Gefäße die Verteilung und Diffusion der Zytostatika an ihren Wirkort beeinträchtigen (Bristow and Hill 2008, Luoto, Kumareswaran et al. 2013).

Der Umstand, dass hypoxische Tumoren sich aggressiver verhalten, eher zu Metastasierung neigen und eine erhöhte Therapieresistenz aufweisen, erklärt die meist signifikant schlechtere Prognose von Patienten mit Tumoren, die größere hypoxische Areale enthalten (Wilson and Hay 2011).

Einleitung

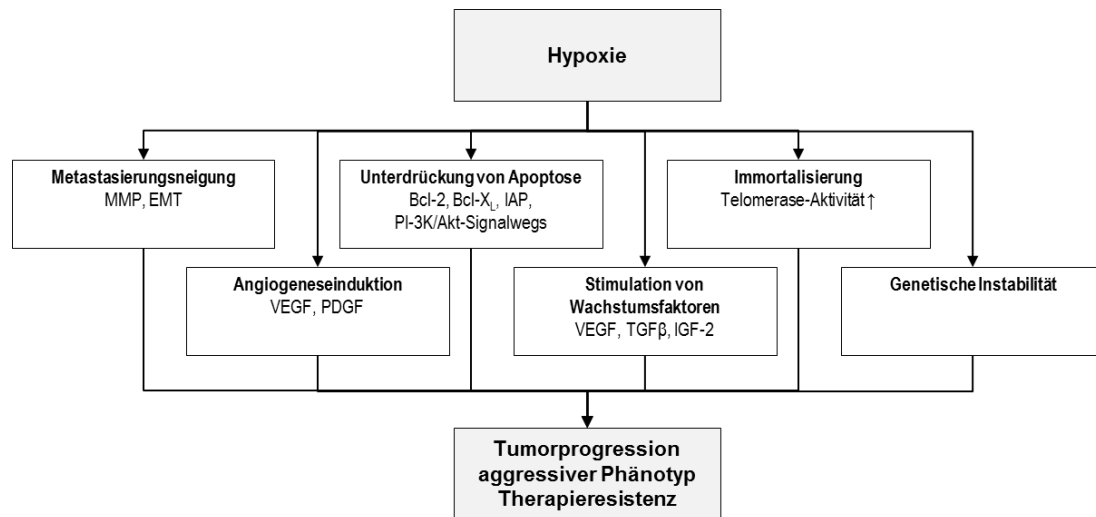


Abb. 1-2: Einfluss von Hypoxie auf die Tumorprogression vgl. Abb. 6 aus Vaupel and Harrison 2004 (Vaupel and Harrison 2004)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit untersucht exemplarisch an zwei unterschiedlich differenzierten humanen Pankreasadenokarzinom-Zelllinien den Einfluss von Sauerstoffmangel auf das maligne Potenzial dieser Zelllinien.

Im Rahmen dieser Fragestellung werden folgende Themenfelder bearbeitet:

1. Charakterisierung und Vergleich der Hypoxieantwort beider Zelllinien im HIF-1 und HIF-2-System in Abhängigkeit von der Expositionsdauer und der Kontinuität des Sauerstoffmangels: Nach welcher Zeit unter hypoxischen Bedingungen ist die Stabilisierung der Hypoxie-induzierten Faktoren maximal? Unterscheidet sich die Stabilisierung der Hypoxie-induzierten Faktoren unter kontinuierlicher versus zyklischer Hypoxie?
2. Vergleich des malignen Potenzials beider Zelllinien unter normoxischen Bedingungen: Wie unterscheiden sich die untersuchten Zelllinien in Bezug auf Mediatoren der Angiogenese, Invasion und der Hitzeschockantwort?
3. Vergleich des malignen Potenzials beider Zelllinien unter hypoxischen Bedingungen: Führt Hypoxie zu einer erhöhten Aggressivität der beiden Zelllinien?

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tab. 2-1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TritonX100	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
TWEEN® 20	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trizma Base	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Basel, Schweiz)
Phosphatase Inhibitor	Roche (Basel, Schweiz)

2.2 Geräte

Tab. 2-2: Geräte

Gerät	Hersteller
FACS Calibur	BD Biosciences (San Jose, USA)
Biotek EL808 Microplate Reader	Biotek (Winooski, USA)
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Hettich Zentrifugen Mikro 22 R	Hettich Lab Technology (Tuttlingen, Deutschland)
Heraeus™ Fresco™ 17 Mikrocentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Heraeus™ Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sorvall® Discovery M120 SE Micro-Ultracentrifuge	Kendro Laboratory Products (Newtown, Connecticut, USA)
Sorvall® S55-A Fixed Angle Rotor	Kendro Laboratory Products (Newtown, USA)
Sorvall® S52-ST Swinging Bucket Rotor	Kendro Laboratory Products (Newtown, USA)
Biospherix Hypoxiekammer C-274 mit Biospherix ProOx C21 Kontrollmodul	BioSpherix, Ltd. (Lacona, USA)
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S Gel-Elektrophoresekammer	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
XCell II™ Tank Blot Modul	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinien

Für die in-vitro-Versuche wurden die zwei humanen Pankreasadenokarzinomzelllinien Panc-1 und Capan-2 verwendet. Bei diesen beiden Zelllinien handelt es sich um etablierte Zelllinien der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MA, USA), die uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Jens Siveke der 2. Medizinischen Klinik des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (MRI) zur Verfügung gestellt wurden.

2.3.2 Zellkulturbedingungen

Zellen der Panc-1-Zelllinie wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und weiteren Zusätzen (s. unten) bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tab. 2-3: Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Einzelkomponenten	Hersteller
10% FCS in RPMI 1640	RPMI 1640	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	10% fetales Kälberserum	PAA (Pasching, Österreich)
	1 mM Natrium Pyruvat	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
	2 mM Glutamin	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
	1% Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	10 mM HEPES	Invitrogen (Carlsbad, USA)
DPBS Puffer		Invitrogen (Carlsbad, USA)
Trypsin		PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Trypanblau		Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert, hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend trypsinisiert und in frisches Medium aufgenommen. Je nach Versuchsanordnung wurde eine definierte Zellzahl ausgesät. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, zur Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen wurde Trypanblau zugegeben.

Die Kultivierung und Passage von Capan-2-Zellen erfolgte unter Verwendung von 14% FCS in RPMI 1640 mit Zusätzen (s. oben).

2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Für die durchflusszytometrische Analyse auf Hsp70 wurden Panc-1-Zellen für 48 Stunden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm in 10% FCS in RPMI 1640 bis zu 70-80% Konfluenz kultiviert. 24 Stunden vor der FACS-Analyse wurde das Medium gewechselt.

Capan-2-Zellen wurden für 24 Stunden in 14% FCS in RPMI 1640 kultiviert. Anschließend wurde das Medium gegen 10% FCS in RPMI 1640 ausgetauscht und die Zellen weitere 24 Stunden in Kultur gehalten.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen, über 3 Minuten (Panc-1) respektive 4 Minuten (Capan-2) trypsinisiert und anschließend in 5 ml RPMI 1640 mit 10% FCS aufgenommen.

Tab. 2-4: Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Reagenz	Einzelkomponenten	Hersteller
FACS-Puffer	DPBS Puffer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	10% FCS	PAA (Pasching, Österreich)
Propidium Iodid (PI)		Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden nach Bestimmen der Zellzahl je 200 000 Zellen auf zwei 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verteilt und bei 500x g, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands und Aufratschen des Pellets wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer für 5 Minuten bei 500 x g und 4°C gewaschen. Nach Absaugen des Überstands wurde der Waschschrift wiederholt. Für die Antikörper-Färbung wurden die Zellen mit Hsp70-FITC bzw. IgG1-FITC als Kontrolle, 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Tubes überführt. Der Ausschluss toter Zellen von der Analyse erfolgte mithilfe von 4 µl PI.

Tab. 2-5: Durchflusszytometrie-Antikörper

Antikörper	Volumen	Hersteller
cmHsp70.1-FITC (1:2)	4 µl	6 µl Multimmune GmbH (München, Deutschland)
IgG1-FITC	5 µl	BD Biosciences (San Jose, USA)

2.5 Hypoxie

Die Experimente, bei denen Zellen unter Hypoxie gesetzt wurden, wurden in einer BioSpherix Hypoxiekammer bei 37°C in einer Atmosphäre aus ca. 1% O₂, 5% CO₂ und 94% N₂ durchgeführt.

2.5.1 Zeitreihen mit bzw. ohne Reoxygenierung

Die Zellen wurden in 6 cm bzw. 10 cm Zellkulturschälchen in ihrem Kulturmedium ausgesät. Hierfür wurden folgende Zellzahlen verwendet:

Tab. 2-6: Zahl der ausgesäten Zellen für Hypoxie-Experimente

	Panc-1	Capan-2
6 cm Schälchen	650 000	180 000
10 cm Schälchen	1 700 000	-

Nach 36-stündiger Kultivierung unter normoxischen Bedingungen bei 37°C und 5% O₂ wurde das Kulturmedium durch 10% FCS in RPMI 1640 ersetzt und die Zellen weitere 24 Stunden kultiviert.

Nach insgesamt 60 Stunden hatten die Zellen eine Konfluenz von 70-80% und damit die optimale Dichte für die Folgeversuche erreicht. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiträume unter Hypoxie gesetzt. Im Anschluss wurden die Zellen unter Gewinnung von Zellkulturüberständen sofort lysiert. Für die Versuchsreihe zum Einfluss von Sauerstoffmangel auf die Hsp27-Expression und die MMP-2-Sekretion wurde nur die Hälfte der ausgesäten Zellen eines Hypoxiezeitraums sofort lysiert, während die andere Hälfte der Schälchen noch einmal für 12 Stunden unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurde, um dann ebenfalls Lysate und Zellkulturüberstände zu gewinnen.

Für die Experimente zur intermittierenden Hypoxie wurden die Zellkulturschälchen für 1 Stunde bzw. 2 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und anschließend für 1 Stunde unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Diese Sequenz wurde anschließend noch ein- bzw. dreimal wiederholt, wobei der Versuchsablauf mit einer hypoxischen Phase endete.

Die als Kontrollen definierten Zellkulturschälchen wurden zum Zeitpunkt des Beginns der Versuchsreihe lysiert.

Als Zeitintervalle wurden gewählt:

Tab. 2-7: Zeitintervalle der Hypoxie-Experimente

	Panc-1 (s. Abb. 2-1)	Capan-2 (s. Abb. 2-2)
kontinuierliche Hypoxie	<ul style="list-style-type: none"> • 2 Stunden • 4 Stunden • 8 Stunden • 24 Stunden 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 Stunden • 4 Stunden • 8 Stunden • 24 Stunden
intermittierende Hypoxie	<ul style="list-style-type: none"> • 4 x 1 Stunde Hypoxie/ jeweils 1 Stunde Reoxygenierungszeit zwischen geschaltet • 2 x 2 Stunden Hypoxie/ jeweils 1 Stunde Reoxygenierungszeit zwischen geschaltet 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 x 2 Stunden Hypoxie/ jeweils 1 Stunde Reoxygenierungszeit zwischen geschaltet • 4 x 2 Stunden Hypoxie/ jeweils 1 Stunde Reoxygenierungszeit zwischen geschaltet

Zeitreihen Panc-1

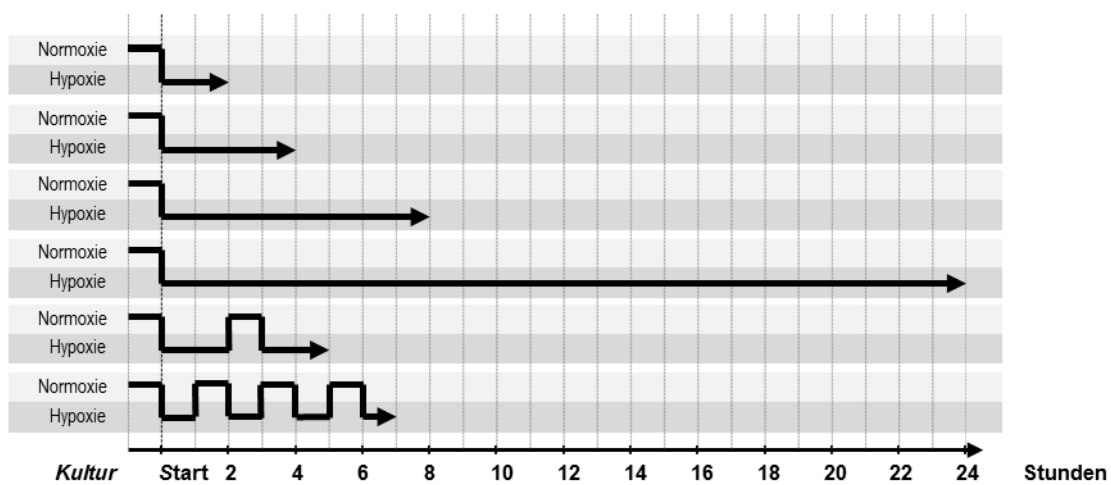


Abb. 2-1: Versuchsaufbau der Hypoxie-Experimente mit Panc-1-Zellen

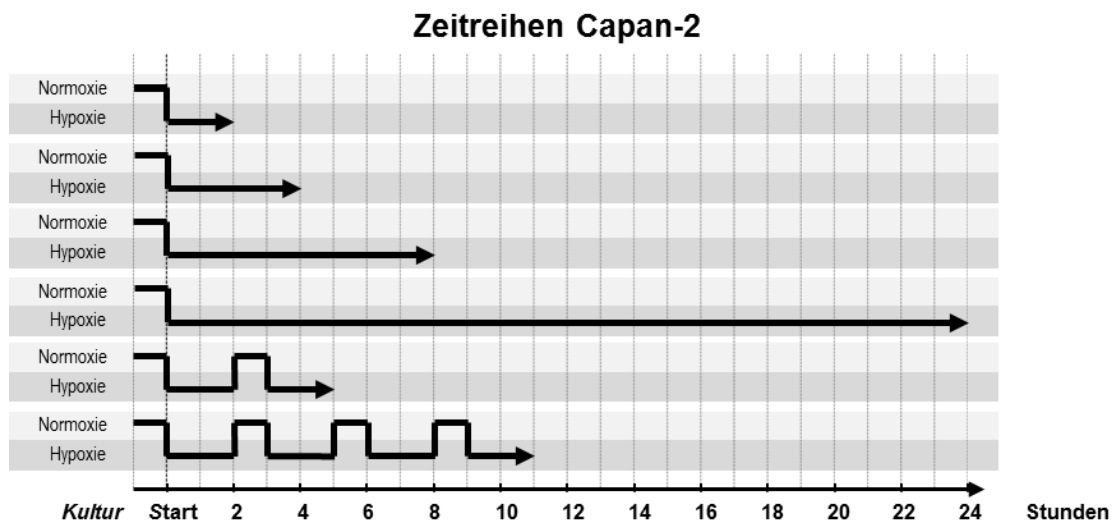


Abb. 2-2: Versuchsaufbau der Hypoxie-Experimente mit Capan-2-Zellen

2.6 Überstände

Zur Gewinnung von Zellkulturüberständen wurden 1,5 ml Medium aus den Zellkulturschälchen entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 500 x g und 4°C zur Entfernung toter Zellen wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß abpipettiert und bei -80°C gelagert.

2.7 Zelllysate

Die Zellkulturschälchen wurden auf Eis gestellt und mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 65 µl Lysepuffer je 6 cm Zellkulturschälchen bzw. 175 µl Lysepuffer je 10 cm Zellkulturschälchen mithilfe eines Zellschabers von der Oberfläche abgelöst.

10 x TBS (pH 8.5)

- 10 mM Trizma Base
- 0.9 % NaCl

Lysepuffer

- 1 x TBS
- 1 % TritonX100
- 5 mM EDTA
- 1 x Protease Inhibitor Cocktail
- 1 x Phosphatase Inhibitor
- 1 mM PMSF

Das Lysat wurde in der Folge für 30 Minuten alle 1,25 Minuten gevortext. Nach Abzentrifugieren des Zelldetritus bei 10 000 x g für 10 Minuten bei 4°C wurde das Zelllysate in ein zweites Eppendorf-Gefäß überführt und 10 µl Probe für eine Proteinbestimmung entnommen. Die Proben wurden bis zu ihrer Analyse bei -80°C gelagert.

2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA™ Protein assays

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mithilfe des BCA™ Protein Assay Kits von Pierce bestimmt. Hierfür wurden 10 µl Probe im Verhältnis 1:15 in Lysepuffer (s. oben) verdünnt.

Nach Hersteller-Anweisung wurde eine Standard-Reihe mit 6 Messpunkten und einer maximalen Proteinkonzentration von 800 µg/ml durch serielle Verdünnung einer durch das Kit bereitgestellten BSA-Lösung hergestellt.

Je 50 µl Standard, Probe oder Leerwert pro Well wurden auf eine 96 Well-Platte aufgetragen. Durch zweimaliges Auftragen der Proben (Doppelbestimmung) wurde eine zuverlässige Ermittlung der Proteinkonzentration gewährleistet. Anschließend wurden die Farbreagenzien A und B aus dem Kit im Verhältnis B:A= 1: 49 gemischt und je 200 µl AB-Lösung pro Well zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur oder für 2 Stunden bei 37°C wurde die optische Dichte bei 550 nm und einer Korrekturwellenlänge von 630 nm mit einem ELISA-Reader bestimmt und mit Hilfe der Verdünnung und der Standardreihe die Proteinkonzentration in µg/ml ermittelt.

Tab. 2-8: BCA™ Protein Assay

Material	Hersteller
BCA™ Protein Assay	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.9 Exosomenpräparation

Für die Isolation von Exosomen wurden 3 Millionen Panc-1-Zellen in eine T162-Zellkulturflasche ausgesät. Sobald die Zellen eine Dichte von 50-60% erreicht hatten, wurde das Kulturmedium durch Exosomen-freies Medium ersetzt. Hierzu wurden 50 ml fetales Kälberserum bei 55 000 rpm und 4°C über 8 Stunden zentrifugiert und anschließend im gleichen Verhältnis wie beim Kulturmedium (s. oben) mit Penicillin/Streptomycin, Glutamin, Pyruvat, Hapes-Puffer und RPMI 1640 Medium gemischt.

Material und Methoden

Anschließend wurden die Zellen für weitere 12 Stunden kultiviert. Nach Erreichen von 70-80% Konfluenz wurden die Zellen für 12 Stunden unter Hypoxie gesetzt, die Kontrollgruppe verblieb unter normoxischen Bedingungen. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation unter normoxischen Bedingungen wurde das Medium von Versuchs- und Kontrollgruppe abgesaugt und in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.

Als Referenz der Gesamtzellmenge wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach 6-minütiger Trypsinierung in Medium aufgenommen. Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt, die Differenzierung zwischen toten und lebendigen Zellen erfolgte mit Hilfe von Trypan-Blau.

Das abgesaugte Medium wurde in einer Zentrifuge mit 1500 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde im nächsten Schritt über 10 Minuten mit 4000 rpm und bei 4°C zentrifugiert und anschließend durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm gepresst.

Als Nächstes wurde das filtrierte Medium mit Hilfe von Zentrifugen-Filtereinheiten mit einer Retentionsgrenze für Proteine ≥ 10 kDa bei 4000 rpm über 20 Minuten bei 4°C aufkonzentriert.

Im Folgeschritt wurde das aufkonzentrierte Medium in Sorvall® Thick wall Zentrifugenröhrchen überführt und bei 51 000 rpm für 3 Stunden bei 4°C in einer Ultrazentrifuge in einem Fixed Angle Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das resultierende Pellet wurde entweder durch vorsichtiges Resuspendieren oder Inkubation über Nacht auf Eis auf einem Schüttler in 2 ml PBS gelöst und direkt in Sorvall® Thin wall Zentrifugenröhrchen gegeben. Im Anschluss an einen weiteren Zentrifugationsschritt in einem Swinging bucket Rotor bei 45 000 rpm und 4°C über 4 Stunden wurde der Überstand verworfen und das Pellet zurückbehalten.

Für Messungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop wurde das Pellet in 40 µl PBS gelöst und bis zur Fixierung wenige Stunden bei 4°C aufbewahrt.

Für eine Analyse mit SDS-PAGE und Western Blot bzw. durch Hsp70-ELISA wurde das Pellet in 40 µl PBS und 40 µl Lysepuffer gelöst und nachfolgend 30 Minuten intermittierend gevortext. Um Membranreste zu entfernen folgte eine weiterer Zentrifugationsschritt bei 10 000x g und 4°C über 10 Minuten.

Tab. 2-9: Ultrazentrifugenzubehör für die Exosomenisolation

Material	Hersteller
Amicon® Ultra-Zentrifugenfilter 10 K (15 ml)	Merck Millipore (Billerica, USA)
Sorvall® Thick wall Zentrifugenröhrchen (10 ml)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sorvall® Thin wall Zentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.10 SDS-Page und Western Blot

Für die Analyse von Zelllysaten mit SDS Page wurden 10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele gegossen.

Trenngel (10 %)

- 2 ml H₂O
- 1,65 ml Rotiphorese 40
- 1,25 ml 1,5M Tris (pH 8,8)
- 50 µl 10% SDS
- 50 µl 10% APS
- 2 µl TEMED

Sammelgel (5 %)

- 2 ml H₂O
- 415 µl
- 650 µl 0,5M Tris (pH 6,8)
- 25 µl 10% SDS
- 25 µl 10% APS
- 2,5 µl TEMED

Laufpuffer

- 25 mM Tris-Base
- 192 mM Glycine
- 10% SDS

Transferpuffer

- 25 mM Tris-Base
- 192 mM Glycin
- 20% Methanol

Waschlösung (PBS-T)

- PBS
- 0,1% Tween® 20

Blocking solution

- Waschlösung
- 5% Milchpulver

4 x Lämmli-puffer

- 200 mM Tris (pH 6.8)
- 8% SDS
- 40% Glycerol
- 0,1% Bromophenolblau
- 100 mM DTT

Pro Tasche wurde jeweils die identische Proteinmenge geladen. Hierfür wurden die Zelllysate mit destilliertem Wasser verdünnt und im Verhältnis 1:4 mit 4-fach konzentriertem Lämmli-Puffer gemischt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25 mA. Anschließend wurden die Proteine bei 30 V über 1 Stunde auf eine PVDF-Membran übertragen. Nachfolgend wurde die PVDF-Membran für eine 1 Stunde in 5% Milch in PBS-T blockiert und bei 4°C über Nacht mit einem Primärantikörper inkubiert.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

Tab. 2-10: Primärantikörper für Immunoblots

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-HIF-1 α	1:500	R & D Systems (Minneapolis, USA)
Anti-HIF-2 α	1:200	R & D Systems (Minneapolis, USA)
Anti-Hsp70	1:1000	ENZO Life Sciences (New York, USA)
Anti-Hsp27	1:1000	ENZO Life Sciences (New York, USA)
Anti- β -Aktin	1:50 000	Oncogene Research Products (Boston, USA)
Anti-GRP94	1:1000	Stressgen Biotechnologies (Victoria, Kanada)
Anti-Rab4	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

Nach drei Waschschritten à ca. 20 Minuten wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert. Als Sekundär-

Antikörper wurden Anti-Maus- (1:2500 in 5% Milch verdünnt), Anti-Ziege- (1:1000 in 5% Milch verdünnt) und Anti-Kaninchen-Antikörper (1:2000 in 5% Milch verdünnt) eingesetzt. Im Anschluss an 3 weitere Waschschrte à ca. 20 Minuten wurde die Membran mit ECL-1- und ECL-2-Lösung inkubiert und das Signal auf einem Röntgenfilm registriert.

Tab. 2-11: Sekundärantikörper für Immunoblots

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse-HRP	1:2500	Promega (Madison, USA)
Anti-Goat-HRP	1:1000	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-Rabbit-HRP	1:2000	Promega (Madison, USA)
Anti-Rat-HRP	1:2000	Dako (Glostrup, Dänemark)

Tab. 2-12: Detektionsreagenzien und Membranen für Immunoblots

Material	Hersteller
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
PVDF Membran (0,4 µm)	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
PVDF Membran (0,2 µm)	Merck Millipore (Billerica, USA)

2.11 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Proteinexpression, wie sie sich in den Western-Blot-Banden zeigte, erfolgte nach Einscannen der Röntgenfilme mit Hilfe des Programms ImageJ des National Institute of Health.

2.12 ELISA

2.12.1 VEGF-ELISA

Für die Bestimmung der VEGF-Konzentration in Zellkulturüberständen wurde ein VEGF-ELISA durchgeführt. Hierfür wurde ein kommerzielles Kit eingesetzt. Die Proben wurden zunächst im vom Hersteller bereitgestellten Reagent Diluent im Verhältnis 1:3 bis 1:5 verdünnt, die Durchführung des ELISAs erfolgte dann nach Herstellerprotokoll.

2.12.2 Hsp70-ELISA

Die Hsp70-Konzentration in Überständen und Zelllysaten wurde mit Hilfe eines Hsp70-ELISAs unter Verwendung eines kommerziellen Kits bestimmt. Zelllysate wurden im

Verhältnis 1:1000, Zellkulturüberstände im Verhältnis 1:5 in PBS mit 1% BSA verdünnt. Anschließend wurde der ELISA gemäß Hersteller-Protokoll durchgeführt.

2.12.3 MMP-2-ELISA

Zur Ermittlung der MMP-2-Konzentration in Zellkulturüberständen wurde ein kommerzieller MMP-2-ELISA verwendet. Zellkulturüberstände von Panc-1-Zellen wurden im Verhältnis 1:4 bis 1:20 in 1% BSA in PBS verdünnt, Zellkulturüberstände von Capan-2-Zellen wurden unverdünnt verwendet. Bei der Durchführung des ELISAs wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

Tab. 2-13: ELISA-Kits

Material	Hersteller
human VEGF Quantikine®	R & D Systems (Minneapolis, USA)
human Hsp70 DuoSet®	R & D Systems (Minneapolis, USA)
human MMP-2 DuoSet®	R & D Systems (Minneapolis, USA)

2.13 Statistik

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe des Statistikprogramm SPSS (SPSS, Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Als statistischer Test wurde der Student's T-Test verwendet. Folgende Signifikanzniveaus wurden definiert: Ein Wert von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet, Werte von $p > 0,05$ dagegen als nicht signifikant. In den Grafiken dieser Arbeit sind folgende Markierungen enthalten: Signifikante Werte ($p \leq 0,05$) sind mit einem Stern (*), Ergebnisse mit einem p-Wert von $p \leq 0,03$ mit zwei Sternen (**) und hochsignifikante Werte ($p \leq 0,01$) mit 3 Sternen (***) hervorgehoben. Tabellen und Abbildungen wurden mittels Word 2007®, PowerPoint 2007® und Excel 2007® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von HIF-1 α und HIF-2 α bei kontinuierlicher versus intermittierender Hypoxie

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung der Stabilisierung der Hypoxie-induzierten Faktoren HIF-1 α und HIF-2 α in Panc-1 und Capan-2. Ziel war es, den unterschiedlichen Einfluss von kontinuierlicher beziehungsweise intermittierender Hypoxie auf die Bildung der beiden Transkriptionsfaktor-Untereinheiten darzustellen.

3.1.1 Kontinuierliche Hypoxie

Zunächst wurde die HIF-1 α - und HIF-2 α -Stabilisierung beider Zelllinien in Reaktion auf Intervalle kontinuierlicher Hypoxie unterschiedlicher Länge untersucht.

Hierfür wurden Panc-1- und Capan-2-Zellen in mindestens 3 unabhängigen Versuchen 2, 4, 8 und 24 Stunden unter Hypoxie gesetzt und direkt im Anschluss an die Hypoxiephase lysiert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Die HIF-1 α - und HIF-2 α -Stabilisierung wurde durch Immunoblot bestimmt, β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die Abbildungen 3-1 bis 3-4 zeigen die HIF-1 α -Stabilisierung bzw. HIF-2 α -Stabilisierung beider Zelllinien im Verhältnis zur Ladekontrolle (Mittelwert+SEM).

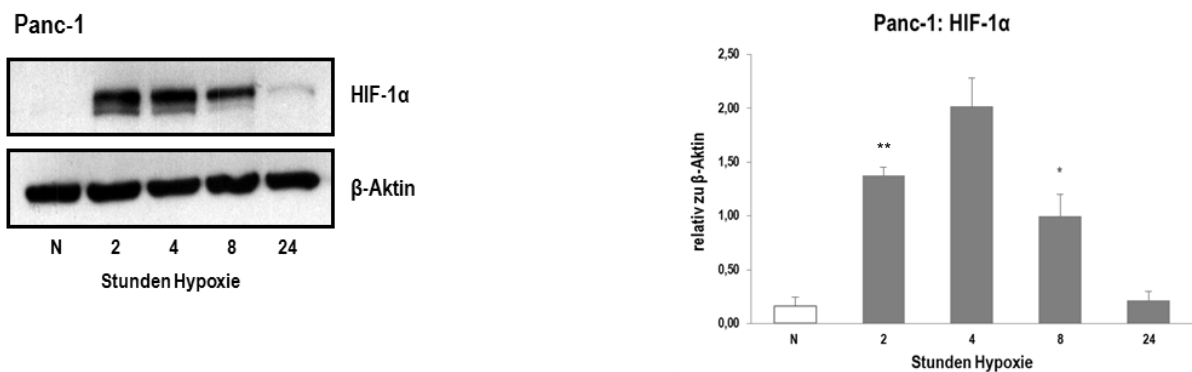


Abb. 3-1: HIF-1 α -Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

Ergebnisse

Capan-2

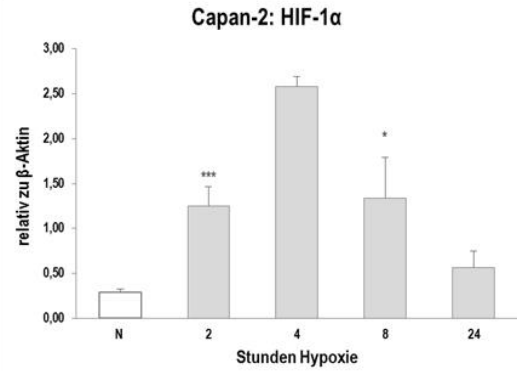
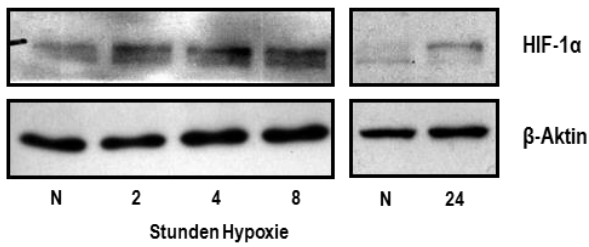


Abb. 3-2: HIF-1 α -Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

Panc-1

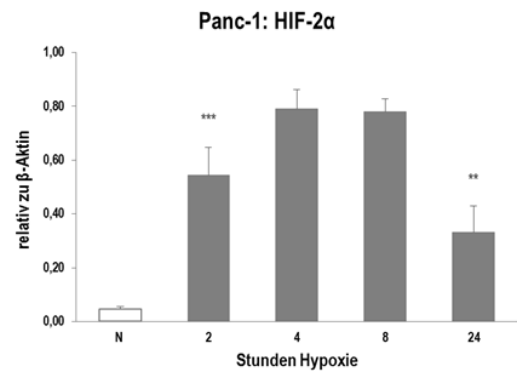
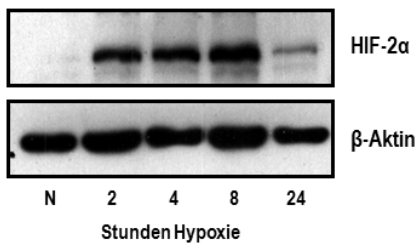


Abb. 3-3: HIF-2 α -Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

Capan-2

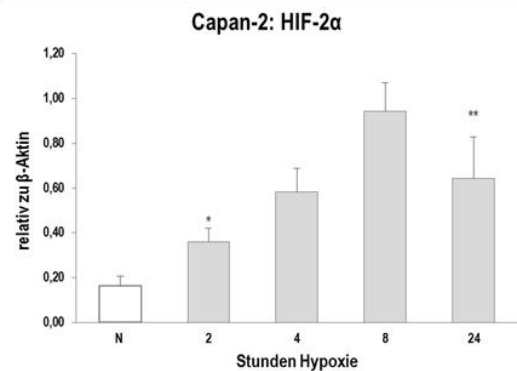
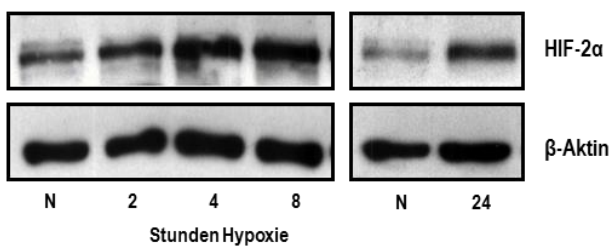


Abb. 3-4: HIF-2 α -Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

Beide Zelllinien wiesen bereits unter physiologischer Sauerstoffkonzentration eine geringe basale Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α auf.

Ergebnisse

Die HIF-1 α -Stabilisierung beider Zelllinien zeigte bereits nach 2 Stunden Hypoxie einen raschen signifikanten Anstieg mit Höhepunkt bei 4 Stunden Hypoxie (Capan-2) bzw. zwischen 2 und 4 Stunden Hypoxie (Panc-1). Waren die Zellen für mehr als 4 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, sank die HIF-1 α -Konzentration wieder ab (s. Tab. 3-1) Dieser Abfall der HIF-1 α -Konzentration bei 8 Stunden stellte sich sowohl bei Capan-2 als auch bei Panc-1 als signifikant dar.

Tab. 3-1: HIF-1 α -Stabilisierung unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zur HIF-1 α -Expression bei Normoxie

HIF-1 α -Stabilisierung unter hypoxischen Bedingungen				
Stunden Hypoxie	Capan-2		Panc-1	
	MW \pm SD	relativ zu N	MW \pm SD	relativ zu N
0	0,29 \pm 0,07	1,00	0,16 \pm 0,15	1,00
2	1,25 \pm 0,36	4,29	1,37 \pm 0,13 (p<0,01)	8,65
4	2,58 \pm 0,20	8,85	2,02 \pm 0,46 (p<0,01)	12,69
8	1,34 \pm 0,78 (ns)	4,60	1,00 \pm 0,35 (p<0,03)	6,27
24	0,57 \pm 0,31 (ns)	1,95	0,21 \pm 0,15 (ns)	1,33

Die HIF-2 α -Stabilisierung in beiden Zelllinien nahm ebenfalls bereits in den ersten 2 Stunden signifikant zu und erreichte ein Maximum bei 8 Stunden (Capan-2) bzw. bei 4 bis 8 Stunden Hypoxie (Panc-1). Auch für HIF-2 α ergab sich bei 24 Stunden Hypoxie ein signifikanter Abfall der HIF-2 α -Konzentration (s. Tab. 3-2).

Tab. 3-2: HIF-2 α -Stabilisierung unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zur HIF-2 α -Expression bei Normoxie

HIF-2 α -Stabilisierung unter hypoxischen Bedingungen				
Stunden Hypoxie	Capan-2		Panc-1	
	MW \pm SD	relativ zu N	MW \pm SD	relativ zu N
0	0,16 \pm 0,09	1,00	0,05 \pm 0,02	1,00
2	0,36 \pm 0,11 (p<0,05)	2,19	0,54 \pm 0,18 (p<0,01)	11,55
4	0,58 \pm 0,18 (p<0,01)	3,56	0,79 \pm 0,13 (p<0,01)	16,78
8	1,01 \pm 0,22 (p<0,01)	6,18	0,78 \pm 0,08 (p<0,01)	16,56
24	0,64 \pm 0,32 (p<0,03)	3,93	0,33 \pm 0,17 (p<0,05)	7,07

Ergebnisse

Als nächstes wurden die beiden Zelllinien untereinander in Bezug auf ihre basale bzw. Hypoxie-induzierte HIF-1 α - bzw. HIF-2 α - Stabilisierung verglichen. Zu diesem Zweck wurden Lysate von unter Normoxie kultivierten und mit 4 respektive 8 Stunden exponierten Panc-1- bzw. Capan-2-Zellen aus je 2 unabhängigen Versuchen im Immunoblot auf die Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α analysiert (s. Abb.3-5 und Abb. 3-6).

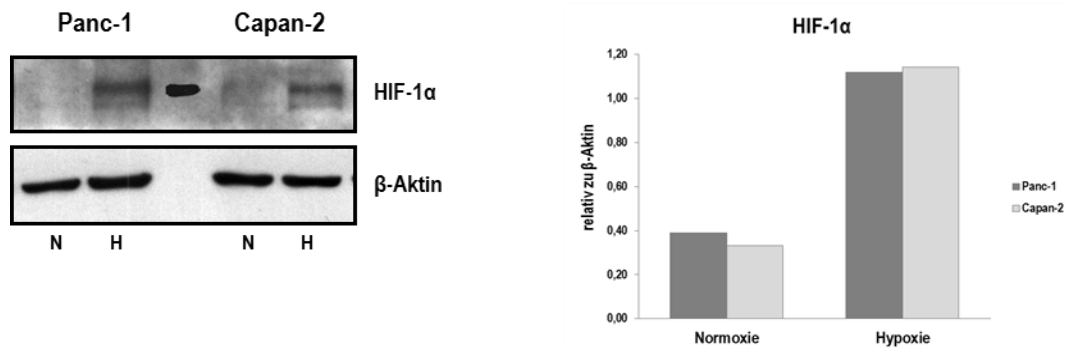


Abb.3-5: HIF-1 α -Stabilisierung in Panc-1 und Capan-2 unter Normoxie bzw. 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert)

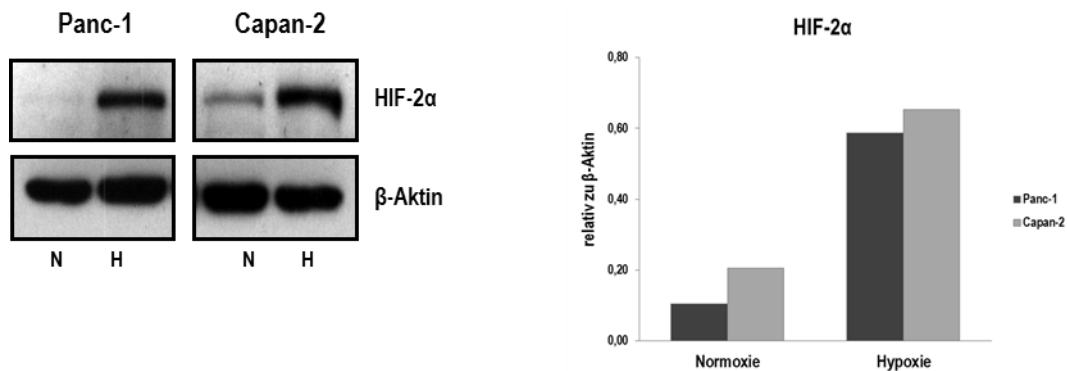


Abb. 3-6: HIF-2 α -Stabilisierung in Panc-1 und Capan-2 unter Normoxie und 8 Stunden kontinuierlicher Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert)

Unter normoxischen Bedingungen zeigte Capan-2 gegenüber Panc-1 eine geringfügig höhere basale HIF-2 α -Stabilisierung. Dieser Unterschied in der basalen HIF-2 α -Stabilisierung erklärt möglicherweise den deutlicheren Anstieg der HIF-2 α -Stabilisierung unter hypoxischen Bedingungen in Panc-1 gegenüber Capan-2 in den oben beschriebenen Versuchsreihen und bei der direkten Gegenüberstellung der durch 8 Stunden Hypoxie induzierten HIF-2 α -Stabilisierung in Panc-1 und Capan-2 (s. Abb. 3-6). Dagegen gab es

keinen Anhalt für eine unterschiedliche Intensität der HIF-1 α -Stabilisierung in beiden Zellreihen unter normoxischen Bedingungen respektive nach 4 Stunden Hypoxie

3.1.2 Intermittierende Hypoxie

Im zweiten Schritt wurde die Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α in Capan-2 und Panc-1 unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen mit der Stabilisierung unter intermittierend hypoxischen Bedingungen verglichen.

Hierfür wurden die HIF-1 α - bzw. HIF-2 α -Stabilisierungsmaxima der beiden Zelllinien als Bezugswert für kontinuierliche Hypoxie gewählt:

- Panc-1: 4 Stunden kontinuierliche Hypoxie sowohl für HIF-1 α und HIF-2 α
- Capan-2: 4 Stunden kontinuierliche Hypoxie für HIF-1 α bzw. 8 Stunden kontinuierliche Hypoxie für HIF-2 α

Diesen Hypoxieintervallen wurden Zyklen von je 2 Stunden Hypoxie, unterbrochen durch eine jeweils einstündige Reoxygenierungsphase bei physiologischen Sauerstoffkonzentrationen, gegenübergestellt.

Für Panc-1 erfolgte noch ein weiterer Versuch mit kürzeren Zyklen bestehend aus 1 Stunde Hypoxie gefolgt von einer einstündigen Reoxygenierungsphase. Diese Versuchsanordnungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

Die Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α bei intermittierender im Vergleich zu kontinuierlicher Hypoxie wurde im Immunoblot analysiert, wobei β -Aktin als Ladekontrolle diente. In den Abbildungen 3-7 bis 3-12 ist die HIF-1 α - bzw. HIF-2 α -Expression im Verhältnis zur Ladekontrolle dargestellt (Mittelwerte+SEM).

Ergebnisse

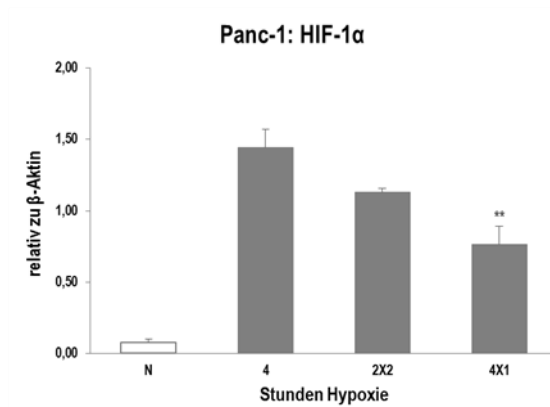
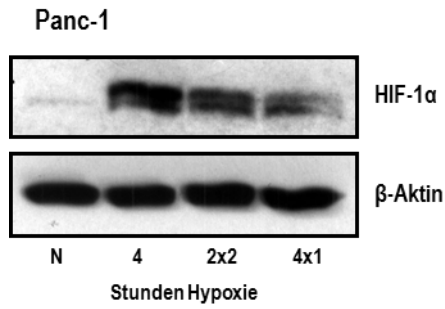


Abb. 3-7: HIF-1α-Stabilisierung in Panc-1 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

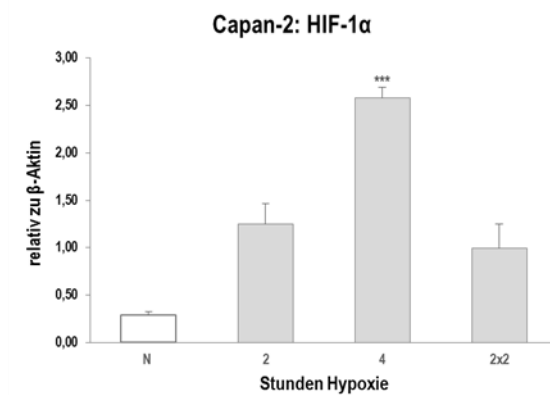
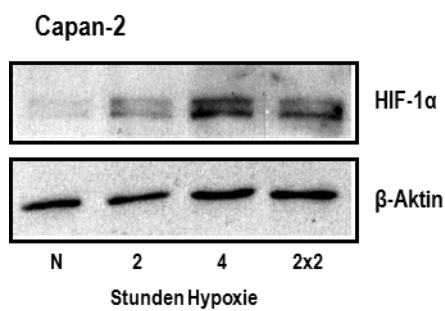


Abb. 3-8: HIF-1α-Stabilisierung in Capan-2 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

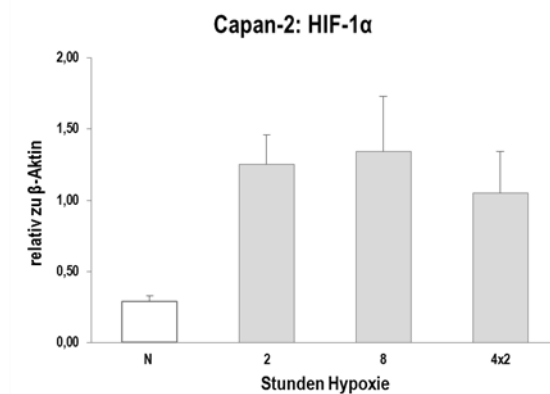
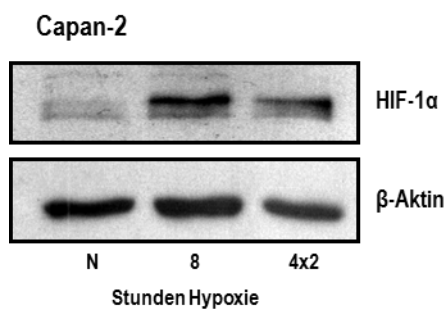


Abb. 3-9: HIF-1α-Stabilisierung in Capan-2 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

Ergebnisse

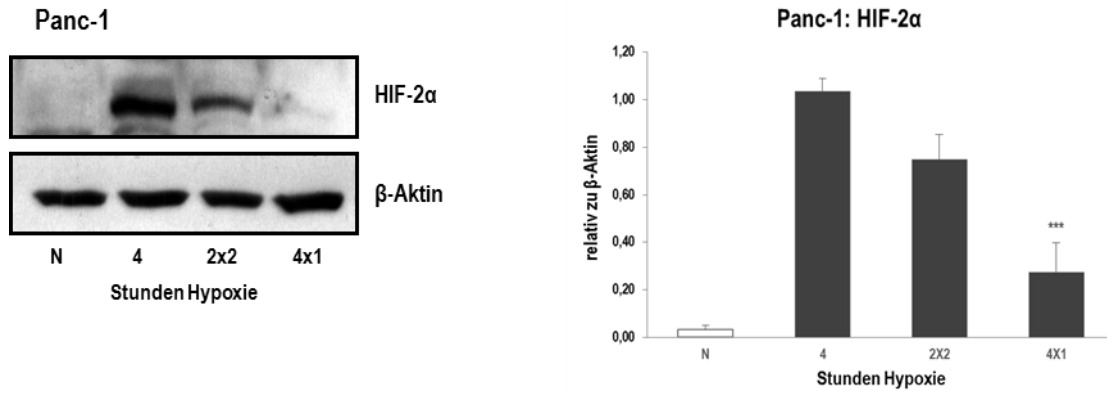


Abb. 3-10: HIF-2 α -Stabilisierung in Panc-1 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

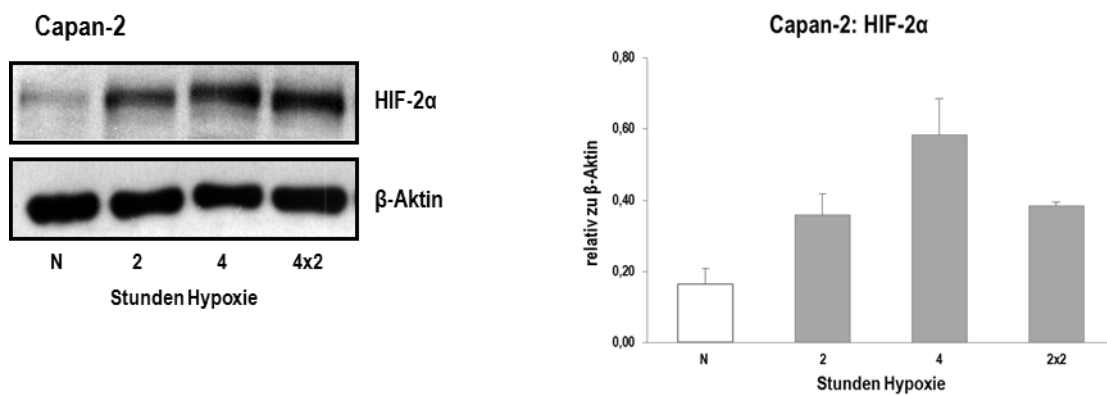


Abb. 3-11: HIF-2 α -Stabilisierung in Capan-2 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

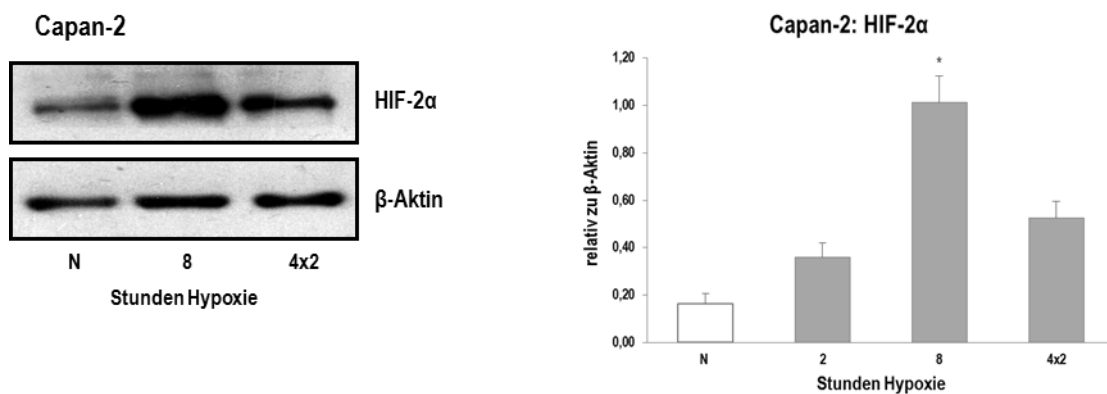


Abb. 3-12: HIF-2 α -Stabilisierung in Capan-2 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

Beide Zelllinien zeigten unter kontinuierlicher Hypoxie eine höhere HIF-1 α -Expression als unter zyklischer Hypoxie (s. Tab. 3-3 und Tab. 3-4).

Ergebnisse

Für Capan-2 ergab sich unter 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie eine signifikant höhere HIF-1 α -Konzentration im Vergleich zu 2 Zyklen à 2 Stunden Hypoxie. Demgegenüber war der Unterschied zwischen 2 Stunden kontinuierlicher Hypoxie gegenüber 2 Zyklen à 2 Stunden Hypoxie nicht signifikant.

Zwar stellte sich auch die HIF-1 α -Expression in Capan-2 nach 4 Zyklen à 2 Stunden Hypoxie niedriger dar als unter 8 Stunden kontinuierlicher Hypoxie, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant, ebenso wenig wie der Unterschied zwischen 4 Zyklen und 2 Stunden kontinuierlicher Hypoxie.

Tab. 3-3: HIF-1 α -Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlicher Hypoxie (KH) bzw. intermittierender Hypoxie (IH) relativ zu Normoxie

HIF-1 α -Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlicher versus intermittierender Hypoxie					
Stunden Hypoxie	MW \pm SD	relativ zu Normoxie	IH/4 Stunden KH	IH/8 Stunden KH	IH/2 Stunden KH
0	0,29 \pm 0,07	1,00			
2	1,25 \pm 0,36	4,29			
4	2,58 \pm 0,20	8,85			
2x2	0,99 \pm 0,44	3,41	0,66 (ns)		1,07 (ns)
8	1,34 \pm 0,78	4,60			
4x2	1,05 \pm 0,51	3,61		0,52 (p<0,05)	1,47 (ns)

Für Panc-1 ergab sich ebenfalls eine höhere HIF-1 α -Expression unter kontinuierlicher Hypoxie als unter zyklischer Hypoxie, wobei lediglich der Unterschied zwischen 4 Zyklen à 1 Stunde Hypoxie und 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie signifikant war, der Unterschied zwischen 2 Zyklen à 2 Stunde Hypoxie und 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie jedoch nicht.

Ergebnisse

Tab. 3-4: HIF-1 α -Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlicher Hypoxie (KH) bzw. intermittierender Hypoxie (IH) relativ zu Normoxie

HIF-1 α -Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlicher versus intermittierender Hypoxie			
Stunden Hypoxie	MW \pm SD	relativ zu Normoxie	Vergleich IH/4 Stunden KH
0	0,08 \pm 0,03	1,00	
4	1,44 \pm 0,22	18,48	
2X2	1,13 \pm 0,05	14,45	0,78 (ns)
4X1	0,76 \pm 0,22	9,76	0,53 (p<0,03)

Auch in der Analyse der HIF-2 α -Expression beider Zelllinien ergab sich eine höhere HIF-2 α -Expression unter kontinuierlicher Hypoxie gegenüber intermittierender Hypoxie (s.Tab. 3-5 und Tab. 3-6). Für Capan-2 zeigte sich eine signifikant höhere HIF-2 α -Expression unter 8 Stunden kontinuierlicher Hypoxie gegenüber 4 Zyklen à 2 Stunden Hypoxie, wohingegen kein signifikanter Unterschied zwischen der HIF-2 α -Expression nach 2 Zyklen à 2 Stunden Hypoxie und 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie festzustellen war. Ebenso entsprach die HIF-2 α -Expression nach 2 Stunden kontinuierlicher Hypoxie annähernd der Expression unter 2 respektive 4 Hypoxiezyklen (s. Tab. 3-5).

Tab. 3-5: HIF-2 α -Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlicher Hypoxie (KH) bzw. intermittierender Hypoxie (IH) relativ zu Normoxie

HIF-2 α -Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlicher versus intermittierender Hypoxie					
Stunden Hypoxie	MW \pm SD	relativ zu Normoxie	IH/4 Stunden KH	IH/8h Stunden KH	IH/2 Stunden KH
0	0,16 \pm 0,09	1,00			
2	0,36 \pm 0,11	2,19			
4	0,58 \pm 0,18	3,56			
2x2	0,38 \pm 0,02	2,35	0,66 (ns)		1,07 (ns)
8	1,01 \pm 0,22	6,18			
4x2	0,53 \pm 0,12	3,21		0,52 (p<0,05)	1,47 (ns)

Analog zu den Ergebnissen bei der Betrachtung der HIF-1 α -Expression zeigte Panc-1 eine signifikant höhere HIF-2 α -Expression unter 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie als unter 4 einstündigen Hypoxiezyklen. Demgegenüber ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der HIF-2 α -Expression nach 2 zweistündigen Hypoxiezyklen und 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie (s. Tab. 3-6).

Tab. 3-6: HIF-2 α -Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlicher Hypoxie (KH) bzw. intermittierender Hypoxie (IH) relativ zu Normoxie

HIF-1α-Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlicher versus intermittierender Hypoxie			
Stunden Hypoxie	MW \pm SD	relativ zu Normoxie	Vergleich IH/4 Stunden KH
0	0,03 \pm 0,03	1,00	
4	1,03 \pm 0,10	31,43	
2X2	0,75 \pm 0,18	22,75	0,78 (ns)
4X1	0,28 \pm 0,21	8,37	0,53 (p<0,03)

3.2 Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Normoxie und Hypoxie

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Sauerstoffmangel auf die Aggressivität der Panc-1- und der Capan-2-Zelllinie. Von Interesse war insbesondere, ob die gut differenzierte Capan-2-Zelllinie unter Sauerstoffmangel bedingt durch die Aktivierung Hypoxie-induzierter Signalwege ein mit der schlecht differenzierten Panc-1-Zelllinie vergleichbares aggressives Potenzial entwickeln würde.

Im Fokus der Analyse standen als Surrogatmarker für Aggressivität in Anlehnung an die Hallmarks of Cancer:

- die Sekretion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) als Maß für das angiogenetische Potenzial der Zelllinien,
- die Freisetzung der Matrix-Metalloprotease 2 (MMP-2) als Indikator für Metastasierungsneigung und
- die Konzentration der zytosolischen Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp27 als Surrogatmarker für die Unterdrückung des programmierten Zelltods.

Da in den vorangegangenen Versuchen eine reproduzierbarere und deutlichere Stimulation der HIF-vermittelten Hypoxieantwort durch kontinuierlichen Sauerstoffmangel als durch intermittierenden Sauerstoffmangel beobachtet wurde, konzentrierte sich diese Arbeit auf die Untersuchung des Einflusses kontinuierlicher Hypoxie auf die genannten Markerproteine.

3.2.1 Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Normoxie

Als Grundlage für den Vergleich des malignen Potenzials von Capan-2 und Panc-1 nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen, erfolgte zunächst eine Charakterisierung der beiden Zelllinien im Hinblick auf die genannten Markerproteine VEGF, MMP-2, Hsp70 und

Hsp27 unter normoxischen Bedingungen. Des Weiteren wurde der Status der beiden Zelllinien bezüglich Membran-gebundenem Hsp70 ermittelt.

3.2.1.1 Vascular Endothelial Growth Factor

Die durch die beiden Zelllinien unter normoxischen Bedingungen sezernierte VEGF-Menge im Medium wurde mit Hilfe eines VEGF-ELISAs bestimmt. Um die Vergleichbarkeit zwischen den beiden Zelllinien zu gewährleisten, wurde die Menge des sezernierten VEGF auf die aus den Lysaten der Zellen erhaltenen Proteinmengen bezogen. Die nachfolgende Abbildung 3-13 zeigt die basale VEGF-Sekretion der beiden Zelllinien unter normoxischen Bedingungen in pg VEGF / μg Protein (Mittelwert + SEM).

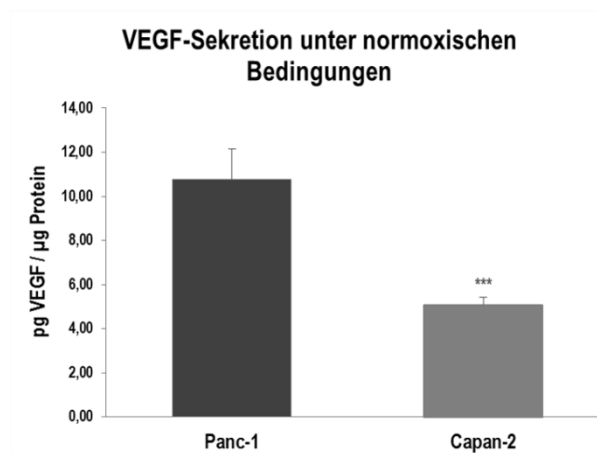


Abb. 3-13: VEGF-Sekretion durch Panc-1 und Capan-2 unter Normoxie in pg VEGF / μg Protein (Mittelwert+SEM)

Hierbei ergab sich für die Panc-1-Zelllinie im Vergleich zu Capan-2 eine 2,1-fach höhere basale VEGF-Sekretion. Der Unterschied in der basalen VEGF-Sekretion zwischen Panc-1 und Capan-2 war hochsignifikant ($p < 0,01$).

3.2.1.2 Matrix-Metalloprotease-2

Die Quantifizierung der MMP-2-Sekretion beider Zelllinien unter physiologischen Bedingungen erfolgte mit Hilfe eines MMP-2-ELISAs. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde die sezernierte MMP-2-Menge aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen zu den aus den Zelllysaten erhaltenen Proteinmengen ins Verhältnis gesetzt.

Für die Zelllinie Panc-1 ergab sich eine basale MMP-2-Sekretion von ca. 207 pg MMP-2 pro μg Protein (s.Abb. 3-14).

Demgegenüber zeigte die Capan-2-Zelllinie keine nachweisbare MMP-2-Sekretion.

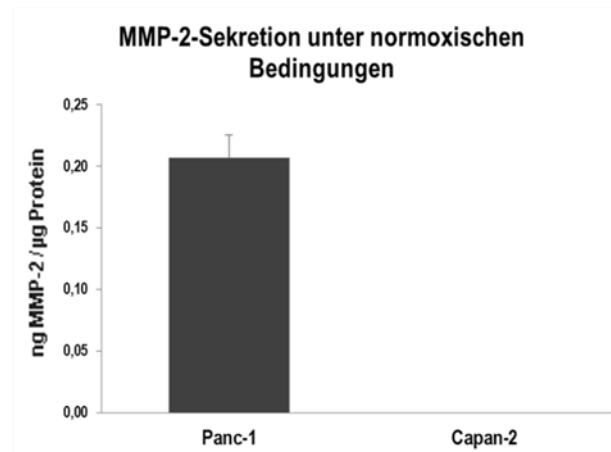


Abb. 3-14: MMP-2-Sekretion durch Panc-1 bzw. Capan-2 unter normoxischen Bedingungen in ng MMP-2 / µg Protein (Mittelwert+SEM)

3.2.1.3 Hitzeschockproteine im Zytosol

Die basale zytosolische Expression der Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp27 in Panc-1- und Capan-2-Zellen wurde mittels Immunoblot semiquantitativ bestimmt. Die Abbildung 3-15 zeigt die Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen im Verhältnis zur Ladekontrolle β -Aktin (Mittelwert + SEM) sowie einen exemplarischen Ausschnitt des zugrunde liegenden Immunoblots.

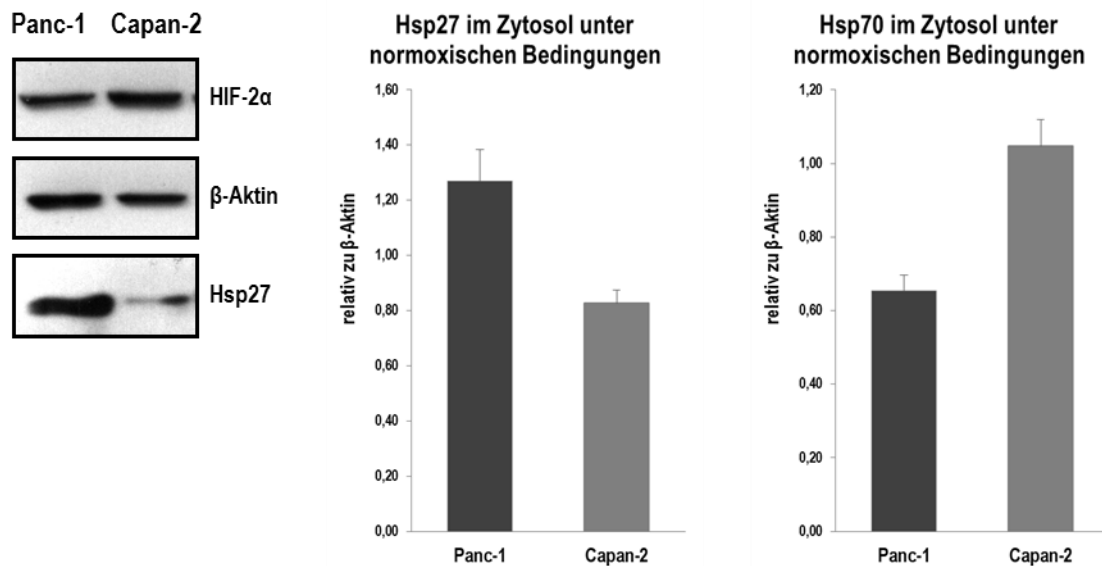


Abb. 3-15: zytosolische Hsp27- bzw. Hsp70-Expression in Panc-1-Zellen bzw. Capan-2- unter Normoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)

Capan-2 wies im Vergleich zu Panc-1 eine ca. 1,5-mal höhere zytosolische Hsp70 Expression auf. Interessanterweise zeigten die beiden Zelllinien in Bezug auf die

Ergebnisse

zytosolische Hsp27-Expression das umgekehrte Verhältnis: Die zytosolische Hsp27-Expression von Capan-2 betrug lediglich das 0,63-Fache der zytosolischen Hsp27-Expression von Panc-1.

3.2.1.4 Membran-gebundenes Hsp70

Im Sinne eines weiteren mit Malignität assoziierten Markers wurden die beiden Zelllinien bezüglich ihrer Expression von Membran-gebundenem Hsp70 (mHsp70) unter physiologischen Bedingungen untersucht. Als Maß der mHsp70-Expression in der durchflusszytometrischen Analyse diente die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für mHsp70 sowie der Anteil Hsp70-positiver Zellen.

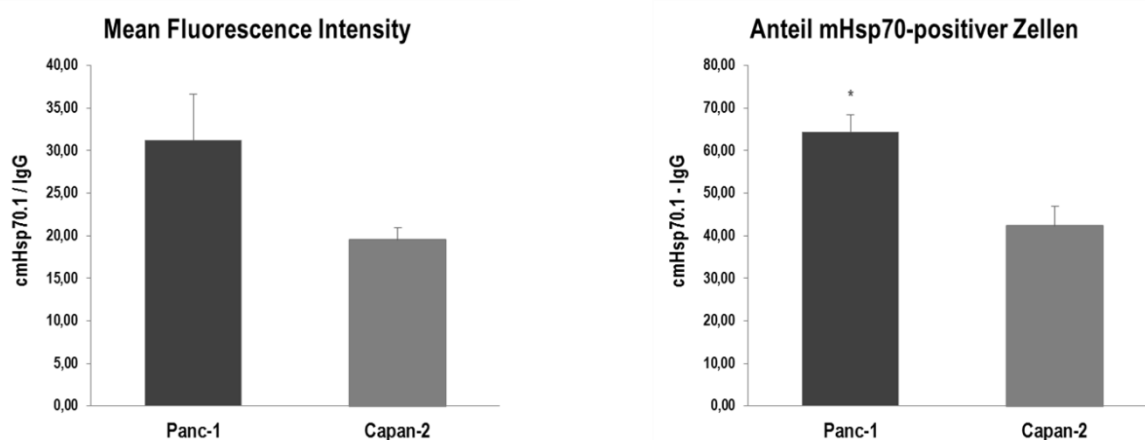


Abb. 3-16: Mean Fluorescence Intensity für mHsp70 (Mittelwert+SEM) bzw. Anteil an mHsp70-positiven Zellen in Prozent (Mittelwert+SEM)

Hierbei betrug die für die Panc-1-Zelllinie gemessene MFI ca. 31,2 und damit das ca. 1,6-fache der für Capan-2 gemessenen MFI von 19,5 (s. Abb. 3-16). Dieser Unterschied war nicht signifikant. Der Anteil mHsp70 positiver Zellen belief sich bei der Panc-1-Zelllinie auf ca. 64,3% und übertraf damit den für Capan-2 gemessenen Wert von 42,3 % signifikant um das 1,5-fache ($p < 0,03$).

3.2.2 Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Hypoxie

Als nächster Schritt erfolgte der Vergleich der Aggressivität der beiden Zelllinien Panc-1 und Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen anhand der gewählten Surrogatmarker. Hierfür wurden 4 Hypoxie-Intervalle (2 Stunden, 4 Stunden, 8 Stunden, 24 Stunden) definiert, nach denen die Expression der gewählten Malignitätsmarker gemessen wurde.

3.2.2.1 Vascular Endothelial Growth Factor

Sowohl Panc-1 als auch Capan-2 zeigten unter hypoxischen Bedingungen eine zunehmende Steigerung ihrer VEGF-Sekretion (s. Abb. 3-17), die bei beiden Zelllinien nach 24 Stunden ein signifikantes Niveau ($p < 0,03$) erreichte.

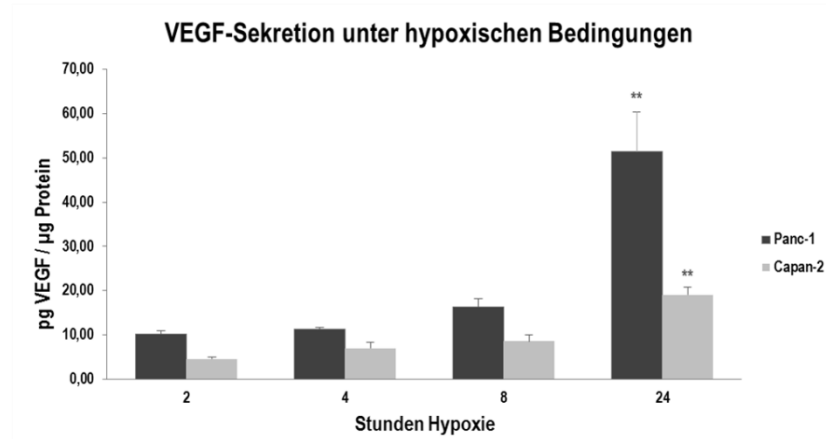


Abb. 3-17: VEGF-Sekretion durch Panc-1 und Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen in pg VEGF / µg Protein (Mittelwert+ SEM)

Bei unterschiedlicher basaler VEGF-Sekretion zeigten beide Zelllinien unter Hypoxie eine annähernd äquivalente Steigerung ihrer VEGF-Sekretion (s. Tab. 3-7).

Tab. 3-7: VEGF-Sekretion durch Panc-1 und Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen relativ zur VEGF-Sekretion unter normoxischen Bedingungen

Hypoxie-induzierte VEGF-Sekretion relativ zur konstitutiven VEGF-Sekretion			
Stunden Hypoxie	Panc-1	Capan-2	Signifikanz
2	0,99 ± 0,29	0,84 ± 0,09	ns
4	1,08 ± 0,19	1,30 ± 0,42	ns
8	1,60 ± 0,58	1,72 ± 0,56	ns
24	5,14 ± 2,69	3,54 ± 0,56	ns

Infolgedessen blieb das Verhältnis zwischen konstitutiver bzw. Hypoxie-induzierter VEGF-Sekretion von Panc-1 versus Capan-2 stets im Bereich von ca. 2,1 +/- 0,5 (s. Tab. 3-8).

Tab. 3-8: Verhältnis der VEGF-Sekretion durch Panc-1 zur VEGF-Sekretion durch Capan-2 unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen

VEGF-Sekretion unter Normoxie und Hypoxie in pg VEGF / µg Protein (MW ± SD)			
Stunden Hypoxie	Panc-1	Capan-2	Verhältnis der VEGF-Sekretion Panc-1 / Capan-2
0	10,76 ± 2,40	5,08 ± 0,95	2,1
2	10,25 ± 1,05	4,55 ± 0,65	2,3
4	11,27 ± 0,74	7,04 ± 2,40	1,6
8	16,36 ± 3,22	8,54 ± 2,99	1,9
24	51,49 ± 15,42	19,09 ± 3,09	2,7

Bedingt durch die signifikant höhere konstitutive VEGF-Sekretion von Panc-1 gegenüber Capan-2 nahm dagegen die Differenz in der durch die beiden Zelllinien sezernierten VEGF-Menge mit zunehmender Dauer der hypoxischen Inkubation zu: Der absolute Unterschied in der sezernierten VEGF-Menge betrug bei Normoxie ca. 5,7 pg VEGF/ µg Protein, nach 8 Stunden Hypoxie ca. 7,8 pg VEGF / µg Protein und nach 24 Stunden ca. 32,4 pg VEGF / µg Protein.

3.2.2.2 Matrix-Metalloprotease-2

Im Gegensatz zur Steigerung der VEGF-Sekretion unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich keine Hypoxie-induzierte Änderung der MMP-2-Sekretion von Panc-1 (s. Abb. 3-18).

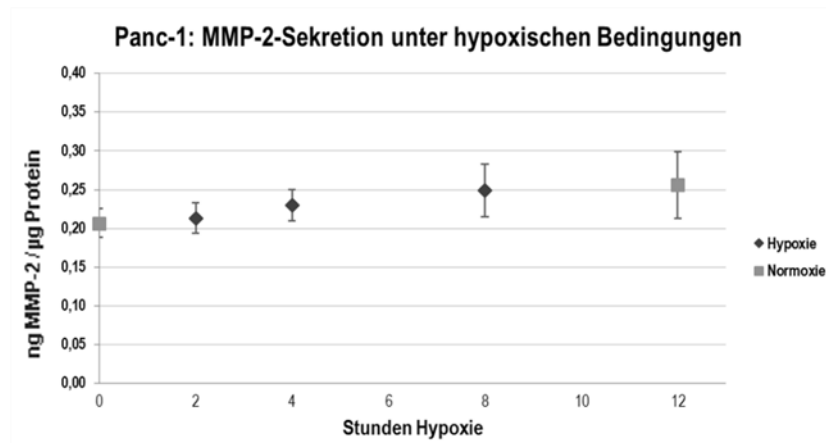


Abb. 3-18: MMP-2-Sekretion durch Panc-1 in ng MMP-2 / µg Protein unter hypoxischen Bedingungen (Mittelwert+SEM)

Ergebnisse

Eine geringfügige Zunahme der MMP-2-Konzentration nach 8 Stunden unter Sauerstoffmangel war vermutlich eher auf eine Anreicherung von MMP-2 im Überstand im Verlauf der mehrstündigen Inkubationsintervalle denn auf eine Hypoxie-induzierte Stimulation der MMP-2-Freisetzung zurückzuführen. Für diese These spricht, dass sich auch eine leichte Erhöhung der MMP-2-Konzentration im Medium von Panc-1 nach weiteren 12 Stunden Inkubation unter normoxischen Bedingungen zeigte.

Capan-2 zeigte auch unter hypoxischen Bedingungen keine nachweisbare MMP-2-Sekretion.

3.2.2.3 Hitzeschockproteine im Zytosol

Die zytosolische Hsp70-Expression von Capan-2 und Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen wurde mit Hilfe eines Hsp70-ELISAs verglichen (s. Abb. 3-19).

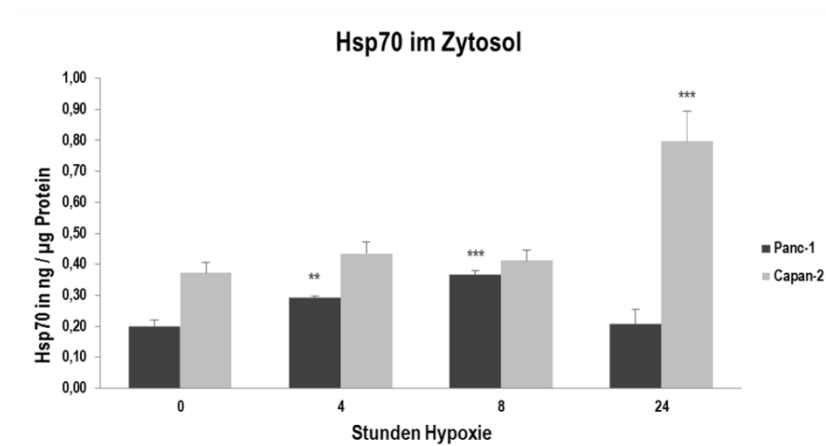


Abb. 3-19: zytosolische Hsp70-Expression in Panc-1 bzw. Capan-2-Zellen unter Normoxie und Hypoxie in ng Hsp70 / µg Protein (Mittelwert+SEM)

Hierbei bestätigte sich noch einmal die signifikant höhere Hsp70-Expression in Capan-2 gegenüber Panc-1 mit einem Verhältnis von ca. 1,9:1 ($p < 0,01$).

Capan-2 steigerte seine Hsp70-Expression in den ersten 8 Stunden unter Sauerstoffmangel nicht. Eine signifikant erhöhte zytosolische Hsp70-Konzentration war erst im Anschluss an 24 Stunden Hypoxie zu verzeichnen, zu diesem Zeitpunkt betrug die zytosolische Hsp70-Konzentration ca. das 2,1-fache des Basalwerts (s. Tab. 3-9).

Tab. 3-9: Hsp70-Expression in Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen im Verhältnis zur Hsp70-Expression bei Normoxie

Hsp70-Expression in Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen	
Stunden Hypoxie	Hsp70 unter Hypoxie relativ zu Hsp70 bei Normoxie
4	1,2-fach
8	1,1-fach
24	2,1-fach (p<0,01)

Im Gegensatz dazu zeigte Panc-1 bereits nach 4 Stunden hypoxischer Inkubation eine signifikante Erhöhung der zytosolische Hsp70-Konzentration (s. Tab. 3-10). Nach 8 Stunden Inkubation unter Sauerstoffmangel wies Panc-1 eine nahezu ebenso hohe zytosolische Hsp70-Konzentration auf wie Capan-2 (Verhältnis Hsp70-Expression Capan-2/ Panc-1 = 1,1). Nach 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen sank die zytosolische Hsp70-Konzentration in Panc-1 jedoch wieder annähernd auf das basale Niveau ab.

Tab. 3-10: Hsp70-Expression in Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen im Verhältnis zur Hsp70-Expression bei Normoxie

Hsp70-Expression in Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen	
Stunden Hypoxie	Hsp70 unter Hypoxie relativ zu Hsp70 bei Normoxie
4	1,5-fach (p<0,03)
8	1,9-fach (p<0,01)
24	1-fach

Die zytosolische Hsp27-Expression in Panc-1- bzw. Capan-2-Zellen unter hypoxischen Bedingungen wurde semiquantitativ im Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Weder Capan-2 noch Panc-1 zeigten einen Anstieg ihrer zytosolischen Hsp27-Expression nach hypoxischer Inkubation (s. Abb. 3-20 und Abb. 3-21).

Ergebnisse

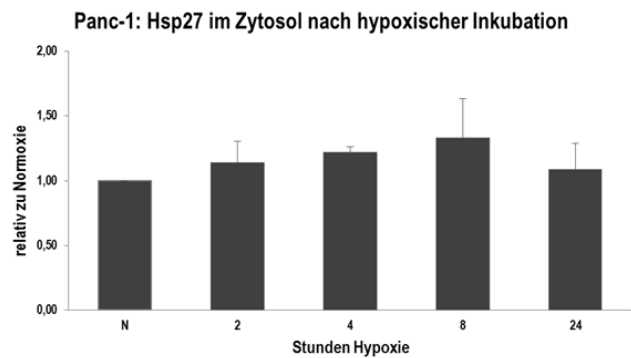
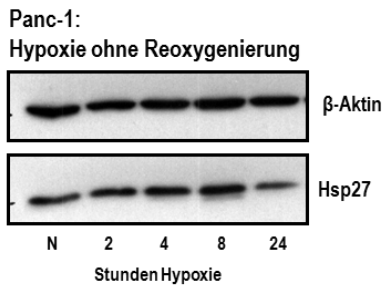


Abb. 3-20: Hsp27-Expression in Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen (keine Reoxygenierung) relativ zur Hsp27-Expression bei Normoxie (Mittelwert+SEM)

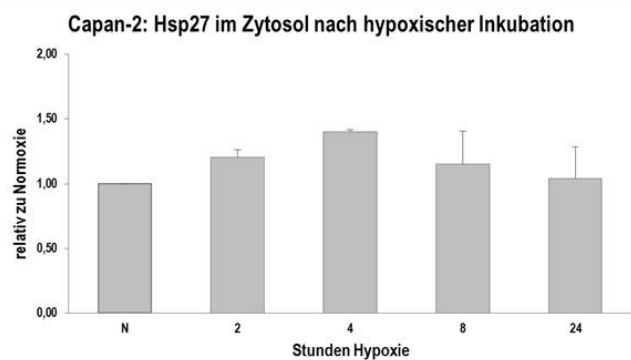
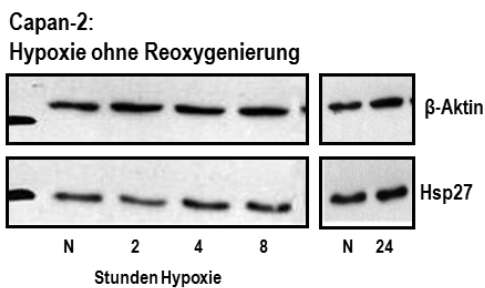


Abb. 3-21: Hsp27-Expression in Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen (keine Reoxygenierung) relativ zur Hsp27-Expression bei Normoxie (Mittelwert+SEM)

Um einen möglichen verspäteten Anstieg von Hsp27 in Reaktion auf Sauerstoffmangel auszuschließen, wurde zusätzlich die Hsp27-Expression im Anschluss an eine zwölfstündige Reoxygenierungsphase bestimmt. Jedoch war auch in diesem Versuchsaufbau keine vermehrte zytosolische Hsp27-Akkumulation zu verzeichnen (s. Abb. 3-22 und Abb. 3-23).

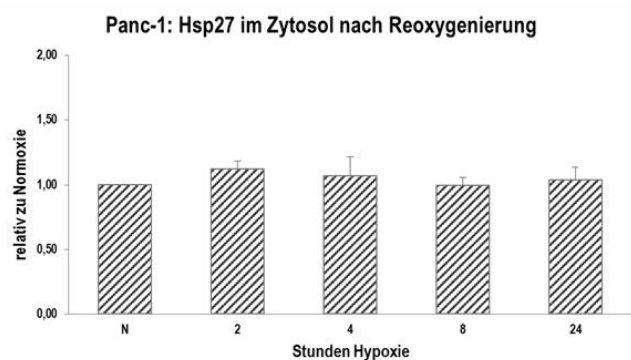
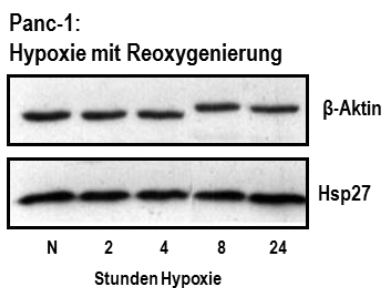


Abb. 3-22: Hsp27-Expression in Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen nach zwölfstündiger Reoxygenierung relativ zur Hsp27-Expression bei Normoxie (Mittelwert+SEM)

Ergebnisse

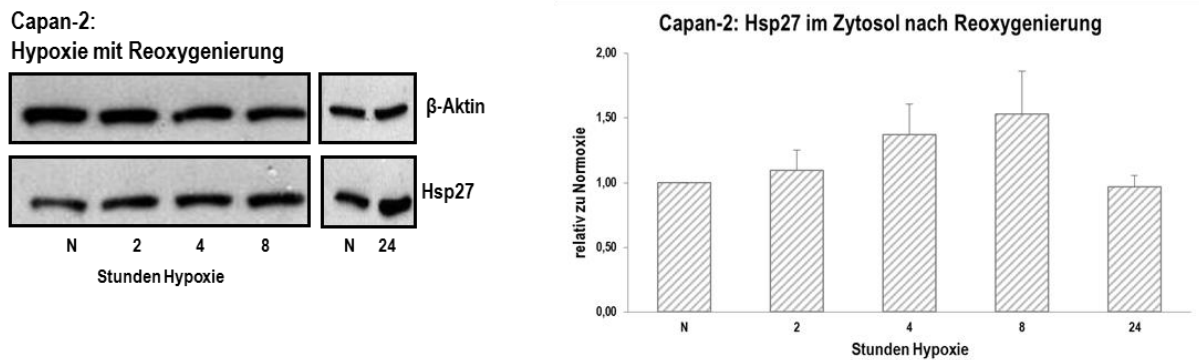


Abb. 3-23: Hsp27-Expression in Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen nach zwölfstündiger Reoxygenierung relativ zur Hsp27-Expression bei Normoxie (Mittelwert+SEM)

Da keine der beiden Zelllinien eine Induktion von zytosolischem Hsp27 unter hypoxischen Bedingungen zeigte, blieb das Verhältnis der Hsp27-Expression in Panc-1 und Capan-2 von ca. 1,6: 1 auch unter hypoxischen Bedingungen erhalten (s. Abb. 3-24).

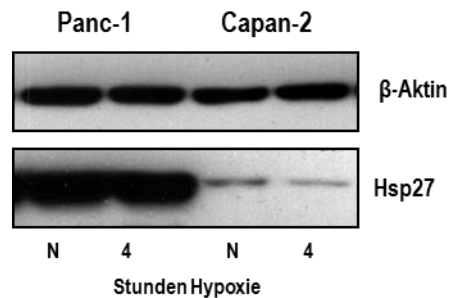


Abb. 3-24: zytosolische Hsp27-Expression in Panc-1 bzw. Capan-2 unter Normoxie bzw. nach 4 Stunden Hypoxie ohne Reoxygenierung

3.3 Freisetzung von Hsp70-enhaltenden Exosomen unter Hypoxie versus Normoxie

Bei den Versuchen zum Einfluss von Sauerstoffmangel auf die zytosolische Hsp70-Expression war bei Panc-1 eine Zunahme der zytosolischen Hsp70-Expression im Anschluss an 4 und 8 Stunden unter hypoxischen Bedingungen aufgefallen. Im Folgenden wurde untersucht, ob Panc-1-Zellen unter dem Stressor Sauerstoffmangel vermehrt Exosomen freisetzen. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob sich der Hypoxie-induzierte Anstieg der zytosolischen Hsp70-Konzentration in Panc-1-Zellen in einem erhöhtem Hsp70-Gehalt in Exosomen widerspiegelt, die unter hypoxischen Bedingungen freigesetzt werden.

Hierfür wurden Panc-1-Zellen für 12 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und anschließend für 24 Stunden unter Normoxie kultiviert.

Ergebnisse

Als Kontrolle diente die Exosomenfreisetzung einer Vergleichsgruppe, die unter physiologischen Sauerstoffbedingungen kultiviert wurde. Dieser Versuch wurde insgesamt vier Mal wiederholt.

Als Nachweis für die korrekte Isolation von Exosomen diente ein Immunoblot, der die Anwesenheit von Rab4 im Sinne einer Positivkontrolle (Gastpar, Gehrman et al. 2005) und die Abwesenheit von GRP94 im Sinne einer Negativkontrolle (Gastpar, Gehrman et al. 2005) demonstrierte (s. Abb. 3-25).

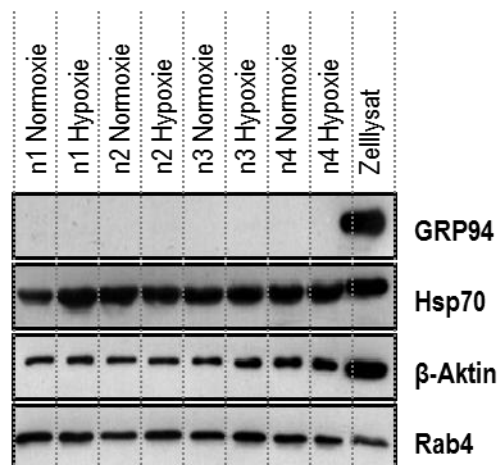


Abb. 3-25: Exosomenisolat aus dem Überstand von Panc-1 nach Kultivierung unter normoxischen Bedingungen bzw. zwölfstündiger hypoxischer Exposition

In einer TEM-Messung des Isolats konnten rundliche Membranvesikel mit einem Durchmesser von 70-80 nm nachgewiesen werden. Dies entspricht definitionsgemäß dem Größenbereich von Exosomen (Azmi, Bao et al. 2013).

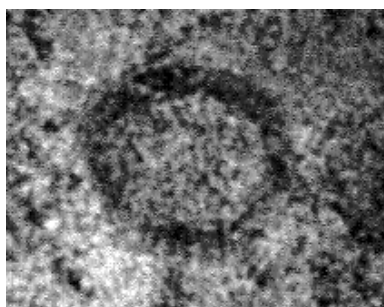


Abb. 3-26: TEM-Bild eines Exosoms aus einem Isolat aus dem Überstand von Panc-1

Das unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen freigesetzte exosomale Protein wurde mit Hilfe des BCATM Protein Assays quantifiziert und ist nachfolgend in Abbildung 3-27 dargestellt (Mittelwert + SEM).

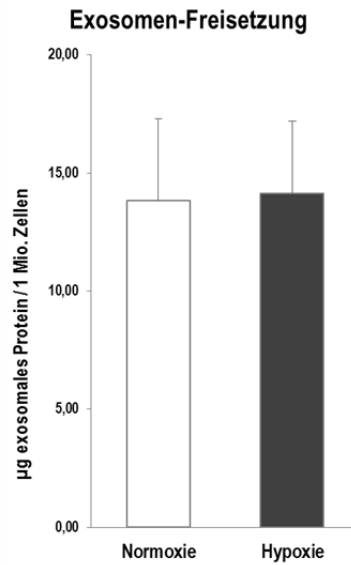


Abb. 3-27: Exosomen-Freisetzung durch Panc-1 unter Normoxie bzw. nach zwölfstündiger hypoxischer Exposition in µg exosomales Protein / 1 Mio. Zellen (Mittelwert+SEM)

Die in den Exosomen enthaltene Hsp70-Menge wurde mit Hilfe eines Hsp70-ELISAs bestimmt. Abbildung 3-28 zeigt den Anteil von Hsp70 am gesamten exosomalen Protein in pg Hsp70 / µg exosomales Protein (Mittelwert + SEM).

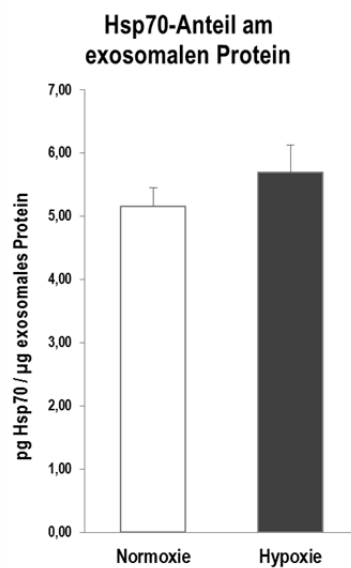


Abb. 3-28: Hsp70-Anteil am gesamten exosomalen Protein von unter Normoxie kultivierten respektive hypoxisch exponierten Panc-1-Zellen in pg Hsp70 / µg exosomales Protein (Mittelwert+SEM)

Panc-1-Zellen, die für 12 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, zeigten gegenüber der Kontrollgruppe nur im Trend eine vermehrte Exosomenfreisetzung, dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant (s. Abb. 3-27) .

Auch der Hsp70-Anteil am gesamten exosomalen Protein war in der Hypoxie-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe tendenziell erhöht, jedoch war auch dieser Anstieg nicht signifikant (s. Abb. 3-28).

4. Diskussion

4.1 Kontinuierliche versus intermittierende Hypoxie

50-60 % der soliden Tumoren enthalten hypoxische Areale (Vaupel and Mayer 2007). Hypoxische Bedingungen treten mit unterschiedlicher Dynamik in Tumoren auf:

1. Kontinuierlich über mehrere Stunden bis Tage infolge einer mit dem Tumor nicht schnell genug mitwachsenden Gefäßversorgung oder irregulären insuffizienten Gefäßarchitektur, die zu verlängerten Diffusionsstrecken und damit unzureichender Sauerstoffversorgung der Tumorzellen in der Kapillarperipherie führt.

2. Akut über Minuten bis Stunden durch Störung der Perfusion, z.B. durch Gefäßspasmen, Okklusion von Gefäßen durch Thromben, Tumorzellkonglomerate oder alleinigen Plasmafluss. Wird die Perfusion wieder hergestellt, kommt es unter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Reoxygenierung (Vaupel and Mayer 2014). Solche Zyklen von Sauerstoffmangel und Reoxygenierung können zyklisch mit Frequenzen von Sekunden bis Tagen aufeinanderfolgen (Matsumoto, Yasui et al. 2010).

Hypoxische Bedingungen erfordern Adaptationsvorgänge in nicht transformierten und transformierten Zellen mit Anpassung von Zellmetabolismus, Zellproliferation und Angiogeneseinduktion. Koordiniert werden diese Adaptationsprozesse primär durch eine Gruppe von Sauerstoff-labilen Transkriptionsfaktoren, den Hypoxie-induzierbaren Faktoren, wobei insbesondere HIF-1 und HIF-2 eine entscheidende Rolle spielen (Bacon and Harris 2004, Hansen, Kristensen et al. 2011).

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung der Stabilisierung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1 und HIF-2 unter Bedingungen der kontinuierlichen versus intermittierenden Hypoxie in vitro. Als Modellorganismus wurden zwei humane Pankreaskarzinomzelllinien gewählt. Das duktales Pankreasadenokarzinom zeichnet sich in vivo durch einen im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe erniedrigten intratumoralen Sauerstoffpartialdruck aus, der unter anderem eine Folge der spärlichen Vaskularisation des PDAC ist. Darüber hinaus werden die hypoxischen Verhältnisse im duktales Pankreasadenokarzinom aber auch durch einen hohen Anteil an fibrotischem Stroma im Tumor gefördert, das die Tumor-versorgenden Gefäße komprimieren und dadurch die

Perfusion weiter beeinträchtigen kann (Koong, Mehta et al. 2000, Feig, Gopinathan et al. 2012).

Bei den untersuchten humanen Pankreasadenokarzinomzelllinien handelte es sich um die gut differenzierte Capan-2-Zelllinie und die wenig differenzierte Panc-1-Zelllinie (Deer, Gonzalez-Hernandez et al. 2010).

Die Stabilisierung der beiden Transkriptionsfaktoren HIF-1 und HIF-2 unter kontinuierlichem bzw. intermittierendem Sauerstoffmangel wurde mit Hilfe des semiquantitativen Nachweises von HIF-1 α und HIF-2 α im Western Blot betrachtet. Voraussetzung für den Vergleich der HIF-Stabilisierung unter intermittierender versus kontinuierlicher Hypoxie war zunächst die Ermittlung der jeweiligen Stabilisierungsmaxima in Capan-2 und Panc-1 unter kontinuierlicher Hypoxie:

Bei einer Inkubation unter hypoxischen Bedingungen von höchstens 24 Stunden lag das Maximum der HIF-1 α -Expression bei 2 bis 4 Stunden (Panc-1) (s. Abb. 3-1) versus 4 Stunden (Capan-2) (s. Abb. 3-2). Dieses Ergebnis stimmt gut mit Erkenntnissen aus in-vitro-Versuchen zum Einfluss von kontinuierlicher Hypoxie auf die HIF-1 α -Expression in Tumorzellen respektive Endothelzellen von Uchida et al., Holmquist-Mengelbier et al. und Bracken et al. überein, die jeweils einen HIF-1 α -Peak bei ca. 4 Stunden belegen konnten. Darüber hinaus stellten diese Arbeitsgruppen ebenfalls einen Abfall der HIF-1 α -Expression nach Inkubationszeiten von mehr als 4 Stunden unter Hypoxie fest (Uchida, Rossignol et al. 2004, Bracken, Fedele et al. 2006, Holmquist-Mengelbier, Fredlund et al. 2006). Die beobachtete Abnahme der zellulären HIF-1 α -Konzentration beruht möglicherweise auf einer Destabilisierung der HIF-1 α -mRNA unter anhaltenden hypoxischen Bedingungen durch HIF-abhängige Transkription einer HIF-1 α -Antisense RNA, wie sie Uchida et al. in ihren in-vitro-Experimenten nachweisen konnten (Uchida, Rossignol et al. 2004). Synergistisch könnte auch der HIF-associated factor (HAF) zu einem Absinken von HIF-1 α unter fortgesetztem Sauerstoffmangel führen. Die Arbeitsgruppe von Koh et al. konnte durch in-vitro-Experimente mit verschiedenen humanen Zelllinien zeigen, dass HAF unter lang anhaltenden hypoxischen Bedingungen zum proteasomalen Abbau von HIF-1 α führt (Koh and Powis 2012).

Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der HIF-2 α -Expression bot dagegen eine Überraschung: So zeigten Panc-1-Zellen die höchste zelluläre HIF-2 α -Konzentration im Bereich von 4 bis 8 Stunden (s. Abb. 3-3), Capan-2 im Bereich von 8 Stunden (s. Abb. 3-4). Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu Arbeiten von Holmquist-Mengelbier et al., die in ihren in-vitro-

Experimenten mit Neuroblastomzellen eine Stabilisierung von HIF-2 α vor allem bei Sauerstoffmangelzuständen mit einer Dauer von mehr als 24 Stunden nahelegten (Holmquist-Mengelbier, Fredlund et al. 2006). Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanzen ergibt sich aus den Arbeiten von Bracken et al.: Im Rahmen ihrer Experimente mit sechs unterschiedlichen humanen bzw. tierischen Tumor- bzw. Nicht-Tumor-Zelllinien untersuchten sie die HIF-2 α -Akkumulation nach 4 versus 16 Stunden. Bei 2 der 6 Zelllinien erfolgte eine HIF-2 α -Akkumulation erst nach ca. 16 Stunden Sauerstoffmangel, während 3 der 6 Zelllinien eine verstärkte HIF-2 α -Stabilisierung bereits nach 4 Stunden Hypoxie gegenüber 16 Stunden Hypoxie zeigten. Bracken et al. vermuteten eine Zelltyp-spezifische Regulation der HIF-2 α -Expression (Bracken, Fedele et al. 2006).

Im nächsten Schritt wurden den Intervallen kontinuierlicher Hypoxie, die zur maximalen Akkumulation von HIF-1 α bzw. HIF-2 α geführt hatten (Panc-1: 4 Stunden Hypoxie für HIF-1 α und HIF-2 α , Capan-2: 4 Stunden Hypoxie für HIF-1 α bzw. 8 Stunden Hypoxie für HIF-2 α), Zyklen intermittierender Hypoxie mit äquivalenter kumulierter hypoxischer Exposition gegenübergestellt.

Dabei bestand die Herausforderung darin, die Länge der Zyklen festzulegen, da keine eindeutige Definition von intermittierender Hypoxie in der Literatur existiert (Bayer and Vaupel 2012).

Arbeiten zur spontanen Fluktuation des Sauerstoffpartialdrucks in Tumoren, die im Mausmodell mit verschiedenen bildgebenden Verfahren nachvollzogen wurden, demonstrierten Zyklusfrequenzen von 0,5 bis 1 Zyklus pro Stunde (Baudelet, Cron et al. 2006) bzw. 1,3 Zyklen pro Stunde (Magat, Jordan et al. 2010). In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden als Zykluslängen zum einen 2 Stunden Hypoxie mit 1 Stunde Reoxygenierung bzw. für Panc-1 zusätzlich 1 Stunde Hypoxie mit 1 Stunde Reoxygenierung gewählt.

Interessanterweise zeigte sich in allen Vergleichskonstellationen von kontinuierlicher mit intermittierender Hypoxie eine stärkere Akkumulation der HIF-1 α - und HIF-2 α -Untereinheiten (s. Tab. 4-1).

Tab. 4-1: Zusammenfassung des Vergleichs intermittierender Hypoxie (IH) mit kontinuierlicher Hypoxie (KH)

	HIF-1 α	HIF-2 α
Panc-1	4 Std. KH > 2x 2 Std. IH > 4x 1 Std. IH	4 Std. KH > 2x 2 Std. IH > 4x 1 Std. IH
Capan-2	4 Std. KH > 2x 2 Std. IH	4 Std. KH > 2x 2 Std. IH
	8 Std. KH > 4x 2 Std. IH	8 Std. KH > 4x 2 Std. IH

Ein signifikanter Unterschied zwischen kontinuierlicher und intermittierender Hypoxie war jedoch lediglich dann zu verzeichnen, wenn die Länge des einzelnen Hypoxie-Intervalls in der Versuchsanordnung für intermittierende Hypoxie sich deutlich vom Akkumulationsmaximum unter kontinuierlicher Hypoxie unterschied. So war die HIF-1 α -Akkumulation in Panc-1-Zellen nach 4 Zyklen à 1 Stunde Hypoxie signifikant niedriger als nach 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie. Ein Zyklus von 2 mal 2 Stunden Hypoxie - wobei das gewählte Hypoxie-Intervall von 2 Stunden in den Vorversuchen zur kontinuierlichen Hypoxie bereits nahe am Maximum gelegen hatte - führte im Vergleich zu 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie nicht zu einer signifikant geringeren HIF-1 α -Konzentration in den Zellen (s. Abb. 3-7).

Umgekehrt spielte auch eine Rolle, ob als Bezugswert für den Vergleich kontinuierliche versus intermittierende Hypoxie ein Intervall kontinuierliche Hypoxie nahe des angenommenen Akkumulationsmaximum des Hypoxie-induzierbaren Faktors gewählt wurde: Der Unterschied der zellulären HIF-2 α -Konzentration in Capan-2-Zellen nach 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie (nicht dem Akkumulationsmaximum von HIF-2 α entsprechend) und 2 Zyklen à 2 Stunden Hypoxie war nicht signifikant (s. Abb. 3-11). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 8 Stunden kontinuierlicher Hypoxie (entspricht dem Akkumulationsmaximum von HIF-2 α) eine signifikant höhere zelluläre HIF-2 α -Konzentration in Capan-2-Zellen als nach 4 Zyklen à 2 Stunden Hypoxie (s. Abb. 3-12).

Eine stärkere Akkumulation von HIF-1 α und HIF-2 α unter kontinuierlicher Hypoxie als unter intermittierender Hypoxie wurde auch in den Arbeiten von Nanduri et al. mit Ratten-Phäochromozytom-Zellen demonstriert. Allerdings beobachtete die Arbeitsgruppe zusätzlich ein Absinken der zellulären HIF-2 α -Konzentration mit zunehmender Zahl der hintereinandergeschalteten Zyklen bis auf Werte unterhalb des normoxischen Ausgangswerts. Als Ursache des Abfalls von HIF-2 α konnten Nanduri et al. einen Calpain-abhängigen Abbau von HIF-2 α nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit ein Anstieg der zellulären HIF-2 α -Konzentration unter intermittierender Hypoxie gezeigt werden.

Die Ursache dieser Diskrepanz könnte in den unterschiedlichen Versuchsanordnungen begründet sein: Nanduri et al. wählten für ihre Studien eine hohe Anzahl sehr kurzer Hypoxie-Reoxygenierungs-Zyklen (60 Zyklen à 30 s Hypoxie mit 5 Minuten Reoxygenierung bei Normoxie) und konnten eine deutliche Zunahme der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies demonstrieren (Nanduri, Wang et al. 2009). Diese massive Bildung von ROS wiederum kann zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels und dadurch zu einer Aktivierung der Calpaine führen (Friedrich 2004, Yuan, Nanduri et al. 2008). In der in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsanordnung war eine derart starke ROS-Produktion auf Grund der deutlich niedrigeren Zyklusfrequenz von 0,5 respektive 0,3 Zyklen pro Stunde weniger zu erwarten. Entsprechend dominierte in den hier beschriebenen Versuchsreihen möglicherweise die Hypoxie-vermittelten Stimulation der HIF-2 α -Akkumulation gegenüber der Calpain-vermittelten Degradation von HIF-2 α .

Die in-vitro-Studien von Hsieh et al. mit Glioblastomzellen ergaben eine stärkere Akkumulation von HIF-1 α unter zyklischer als unter kontinuierlicher Hypoxie. Hsieh et al. analysierten die HIF-1 α -Expression nach 3 Zyklen à 1 Stunde Hypoxie gefolgt von 30 Minuten Normoxie im Vergleich zu 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie (Hsieh, Lee et al. 2010). Dieses Intervall entspricht dem in dieser Arbeit verwendeten Referenzwert von 4 Stunden Sauerstoffmangel. Möglicherweise liegt die Ursache für das abweichende Ergebnis von Hsieh et al. in der Wahl einer kürzeren Reoxygenierungsphase. Laut Jewell et al. besitzt HIF-1 α unter Reoxygenierungsbedingungen im Anschluss an eine hypoxische Episode eine Halbwertszeit von 8 Minuten (Jewell, Kvietikova et al. 2001), sodass eine Akkumulation von HIF-1 α bei mehreren Hypoxiezyklen durch unvollständigen Abbau innerhalb einer 30-minütigen Reoxygenierungsphase möglich erscheint. Diese Annahme wird gestützt durch Ergebnisse von Martinive et al., die bei ähnlichem Versuchsaufbau mit ebenfalls kurzem Reoxygenierungszeitraum (1 Stunde Hypoxie gefolgt von 30 Minuten Normoxie) eine zunehmende Anhäufung von HIF-1 α in Abhängigkeit von der Anzahl hintereinandergeschalteter Zyklen demonstrieren konnten (Martinive, Defresne et al. 2006).

Dieser Effekt der HIF-1 α -Akkumulation von Zyklus zu Zyklus mag auch in den Folgeexperimenten von Hsieh et al. eine Rolle gespielt haben: Hsieh et al. verglichen 4 Stunden kontinuierliche Hypoxie mit 12 Zyklen à 10 Minuten Hypoxie gefolgt von 10 Minuten Normoxie. Dabei ergab sich eine höhere HIF-1 α -Akkumulation nach zyklischer Hypoxie gegenüber kontinuierlicher Hypoxie, die von der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies während der Hypoxie-Reoxygenierungs-Zyklen abhängig war (Hsieh, Shyu et al. 2011). Nach Ergebnissen von Yuan et al. führen ROS durch Aktivierung von mTOR zu einer

verlängerten Halbwertszeit von HIF-1 α in der Reoxygenierungsphase (Yuan, Nanduri et al. 2008). Infolgedessen könnte in der Versuchsanordnung von Hsieh et al. eine überlappende Akkumulation von HIF-1 α über die Hypoxiephasen hinweg ohne Abfall auf normoxische Werte während der Reoxygenierungsphasen angenommen werden. Im Gegensatz dazu ist die in dieser Arbeit verwendete Zahl hintereinander geschalteter Zyklen gering und damit fällt vermutlich auch die ROS-Bildung niedrig aus. Entsprechend ist weder von einer ROS-getriggerten, verstärkten HIF-1 α -Stabilisierung und -Bildung noch von einer verlängerten Halbwertszeit während der Reoxygenierungszeit auszugehen. Dies legt nahe, dass in den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsanordnungen für zyklische Hypoxie die HIF-1 α -Akkumulation in den Hypoxiephasen jener im Anschluss an 2 respektive 1 Stunde kontinuierlicher Hypoxie entspricht und die HIF-1 α -Konzentration in den anschließenden Reoxygenierungsphasen wieder auf das normoxische Niveau absinkt. Folglich mag die Stimulation der HIF-1 α -Akkumulation nach 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie höher ausfallen als nach Zyklen von 2 mal 2 bzw. 4 mal 1 Stunde Hypoxie.

Insgesamt legt die Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Arbeit mit den bereits in der Literatur beschriebenen Resultaten nahe, dass die demonstrierten unterschiedlichen Effekte von kontinuierlicher und intermittierender Hypoxie auf die HIF- α -Antwort *in vitro* deutlich von den verwendeten Versuchsanordnungen abhängen: Einfluss auf das Ergebnis scheinen insbesondere zu haben:

- Länge des als Referenzwert verwendeten Intervalls kontinuierlicher Hypoxie
- Anzahl und Frequenz der Hypoxiezyklen

Es erscheint deshalb ratsam, das Phänomen zyklische Hypoxie zunächst **in vivo** weiter zu untersuchen, um eine abschließende Definition von zyklischer Hypoxie bezüglich Zykluslängen, -frequenzen aber auch Sauerstoffkonzentrationen zu ermöglichen, die dann als Grundlage für weitere Experimente **in vitro** dienen könnten.

4.2 Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Normoxie und Hypoxie

In Pankreasadenokarzinomen ist der Sauerstoffpartialdruck deutlich niedriger als in gesundem Pankreasgewebe (Koong, Mehta et al. 2000). Zahlreiche klinische Studien an verschiedenen Tumorentitäten konnten eine erhöhte Aggressivität von Krebszellen infolge hypoxischer Bedingungen im Tumorgewebe demonstrieren (Vaupel and Mayer 2007).

Darüber hinaus besteht gerade beim duktalem Pankreasadenokarzinom ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem niedrigen Differenzierungsgrad der Tumorzellen und einer ungünstigen Prognose für das Überleben des Patienten (Garcea, Dennison et al. 2008, Wasif, Ko et al. 2010, Fischer, Breidert et al. 2012).

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob es unter hypoxischen Bedingungen zu einer Zunahme der Aggressivität von zwei ausgewählten Pankreasadenokarzinom-Zelllinien (Panc-1, Capan-2) kommt und inwieweit sich die verschiedenen differenzierten Tumorzelllinien in ihrer Reaktion auf Sauerstoffmangel unterscheiden.

4.2.1 Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 bei Normoxie

Zunächst erfolgte die Charakterisierung des malignen Potenzials von Capan-2 und Panc-1 unter normoxischen Bedingungen.

Aus der Literatur war bekannt, dass die Zelllinie Capan-2 ausgehend von einem gut differenzierten duktalem Pankreasadenokarzinom des Pankreaskopfes etabliert worden war. Zum Zeitpunkt der Tumorsektion hatten noch keine Lymphknoten- oder Fernmetastasen vorgelegen. Im Gegensatz dazu war der Donor der Panc-1-Zelllinie an einem schlecht differenzierten Pankreasadenokarzinom des Kopfes erkrankt, das bei Resektion bereits lymphogen metastasiert hatte (Deer, Gonzalez-Hernandez et al. 2010).

Auf Grund des höheren UICC-Stadiums und des niedrigeren Differenzierungsgrads des Primärtumors wurde bei der Panc-1-Zelllinie ein aggressiverer Phänotyp im Vergleich zu Capan-2 postuliert.

Die Auswahl der Kriterien für Malignität erfolgte in Anlehnung an drei der sechs „Hallmarks of Cancer“: Tumor-assoziierte Angiogenese, Metastasierung, Unterdrückung des programmierten Zelltods (Hanahan and Weinberg 2000).

4.2.1.1 Fortgesetzte Angiogenese – Vascular Endothelial Growth Factor

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) spielt eine herausragende Rolle in der Tumor-assoziierten Angiogenese. Dieses homodimere Protein wird von Zellen unter hypoxischen Bedingungen freigesetzt und induziert als Mitogen und Überlebensfaktor für Endothelzellen die Ausbildung neuer Gefäßnetze. VEGF kommt dadurch eine elementare Funktion in der embryonalen Entwicklung des Gefäßsystems, in der Wundheilung, im Knochenwachstum oder auch im weiblichen Reproduktionszyklus zu (Ferrara 2004).

Solide Tumoren zeigen zwei Muster der VEGF-Sekretion:

- Eine Hypoxie-induzierte VEGF-Bildung, bedingt durch niedrige Sauerstoffpartialdrücke, wie sie z.B. im Zentrum rasch wachsender Tumoren auftreten.
- Eine konstitutive VEGF-Freisetzung unter normoxischen Bedingungen, hervorgerufen durch eine aberrante Signalgebung, z.B. durch Aktivierung der Onkogene c-Src und K-Ras (White, Carroll et al. 1995, Mukhopadhyay and Datta 2004).

Aus transformierten Zellen freigesetztes VEGF induziert die Vaskularisierung des Tumors, wodurch sein Wachstum über die Grenzen der diffusionsgebundenen Sauerstoffversorgung hinaus möglich wird (Roskoski 2007). Durch ihre irreguläre hyperpermeable Architektur begünstigen die neu gebildeten Tumor-versorgenden Gefäße zudem die hämatogene Aussaat von Tumorzellen und damit die Ausbildung von Fernmetastasen (Farnsworth, Lackmann et al. 2013).

Darüber hinaus fördert VEGF das Tumorwachstum auch direkt durch seine mitogene Wirkung auf nicht-endotheliale Zellen wie Pankreasepithelzellen (Oberge-Welsh, Sandler et al. 1997).

Wie von Shi et al. für mehrere Pankreaskarzinomzelllinien beschrieben (Shi, Le et al. 2001), konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine konstitutive VEGF-Sekretion bei Panc-1 und Capan-2 unter normoxischen Bedingungen nachgewiesen werden (s. Abb. 3-13).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Shi et al. zeigte Panc-1 eine signifikant höhere basale VEGF-Sekretion als Capan-2, die in den hier beschriebenen Versuchen etwa das Doppelte der basalen VEGF-Freisetzung durch Capan-2 betrug (s. Abb. 3-13).

Shi et al. führten die konstitutive VEGF-Expression in Pankreaskarzinomzellen auf eine Überexpression des Transkriptionsfaktors Sp1 zurück. Als Ursache für die unterschiedliche basale VEGF-Expressionsrate der untersuchten Zelllinien machten Shi et al. eine höhere Transkriptionsrate von VEGF bedingt durch eine höhere Sp1-Bindungsaktivität sowie eine höhere Sp1-Expression in PDAC-Zellen mit hoher VEGF-Sekretion gegenüber solchen mit einer geringen VEGF-Sekretion aus (Shi, Le et al. 2001).

Ein weiterer Einflussfaktor könnte der Mutationsstatus der beiden Zelllinien darstellen: Während in Panc-1 das Tumorsuppressorgen TP53 mutiert ist, liegt bei Capan-2 Wildtyp-TP53 vor (Deer, Gonzalez-Hernandez et al. 2010). Es wird vermutet, dass p53 als negativer Regulator der VEGF-Sekretion wirkt (Fujioka, Yoshida et al. 2001, Joo, Sohn et al. 2002). Somit würde der TP53-Verlust in Panc-1 zu einer Enthemmung der VEGF-Sekretion führen.

In Übereinstimmung mit seiner Rolle in der Tumervaskularisation und damit der Tumortrophik konnte in zahlreichen immunhistochemischen Analysen von Operationsresektaten von Pankreasadenokarzinomen die prognostische Bedeutung der Tumor-gebundenen VEGF-Expression belegt werden. So konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen intratumoraler VEGF-Expression und dem reduzierten post-operativen Überleben von Patienten mit Pankreaskarzinomen gezeigt werden (Smith, Tang et al. 2011, Zorgetto, Silveira et al. 2013). Die Arbeitsgruppen von Liang et al. und Park et al. belegten eine signifikante Korrelation zwischen VEGF-Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen (Liang, Wang et al. 2010, Park, Kim et al. 2012). Die Korrelation VEGF-Expression/Fernmetastasen konnte von Nagawaka et al. nicht bestätigt werden (Nagakawa, Aoki et al. 2002). Die Ursache für dieses abweichende Ergebnis ist möglicherweise die im Vergleich zu anderen Studien sehr kleine Patientenkohorte: 32 Patienten (Nagakawa, Aoki et al. 2002) gegenüber 88 (Park, Kim et al. 2012) bzw. 100 Patienten (Liang, Wang et al. 2010). Darüber hinaus erscheint der von Park et al. demonstrierte Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression durch Pankreaskarzinome und dem Auftreten von Fernmetastasen plausibel, da sich die durch VEGF induzierten Tumor-versorgenden Gefäße häufig durch eine hyperpermeable, insuffiziente Architektur auszeichnen, die das Auftreten von Fernmetastasen begünstigt (Farnsworth, Lackmann et al. 2013). Zudem konnten Nagawaka et al. eine signifikant vermehrte venöse Invasion und Destruktion in VEGF-exprimierenden Pankreasadenokarzinomen nachweisen (Nagakawa, Aoki et al. 2002). Ferner konnten Liang et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen Tumorgröße und TNM-Stadium der untersuchten Pankreaskarzinome herstellen (Liang, Wang et al. 2010).

Basierend auf den genannten Korrelationsanalysen ex vivo ist davon auszugehen, dass eine positive Korrelation zwischen der Höhe der VEGF-Sekretion, der Fähigkeit zur Angiogeneseinduktion und letztendlich dem malignem Potenzial einer Zelllinie besteht. Folglich ist bei Panc-1 ein höheres angiogenetisches Potenzial zu vermuten als bei Capan-2.

4.2.1.2 Gewebeinvasion, Metastasierung – Matrix-Metalloprotease 2

Als Indikator für invasives Verhalten diene die Sekretion der Matrix-Metalloprotease MMP-2. Diese Zink-abhängige Protease vermittelt den Abbau von fibrillären Komponenten der Extrazellulären Matrix, unter anderem auch von Kollagen Typ IV. Dieses ist unter anderem Bestandteil der Basalmembran von Epithelien und Endothelien. Entsprechend steigert die

MMP-2- Sekretion die Invasivität von Tumorzellen mit der Konsequenz der Infiltration benachbarter Strukturen und der Ausbildung von Fernmetastasen (Klein and Bischoff 2011).

Im MMP-2-ELISA zeigte die Panc-1-Zelllinie unter normoxischen Bedingungen eine relevante basale MMP-2-Freisetzung, wohingegen bei Capan-2 keine MMP-2-Sekretion nachweisbar war (s. Abb. 3-14). Die Bedeutung der Expression von MMP-2 für die Progression des Pankreaskarzinoms belegen Korrelationsanalysen ex vivo: In immunhistochemischen Untersuchungen der OP-Präparate von Pankreaskarzinom-Patienten konnten Xu et al. und Juuti et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen MMP-2-Expression, einem niedrigen Differenzierungsgrad des Karzinoms, Lymphknotenmetastasen bzw. einem hohen TNM-Stadium aufzeigen. Während Xu et al. eine Korrelation zwischen MMP-2-Expression und einer schlechten postoperativen Prognose aufzeigen konnten, stellte sich MMP-2 in der Arbeit von Juuti et al. nicht als unabhängiger prognostischer Marker dar (Juuti, Lundin et al. 2006, Xu, Ding et al. 2013). Diese Diskrepanz mag in der unterschiedlichen Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse begründet sein: Während Juuti et al. die Tumoren nach der Anzahl MMP-2-positiver Zellen in die Kategorien „negativ bis schwache MMP-2-Expression“ und „mäßige bis starke MMP-2-Expression“ zusammenfassten, nahmen Xu et al. keine Kategorisierung vor und bewerteten das Kontinuum (Juuti, Lundin et al. 2006, Xu, Ding et al. 2013). Ferner konnten Park et al. in ihren immunhistochemischen Analysen bei Patienten mit MMP-2-positiven Pankreasadenokarzinomen einen signifikant kürzeren postoperativen Verlauf, bis zum Auftreten von Fernmetastasen demonstrieren (Park, Kim et al. 2012). Ähnlich konnten Nagawaka et al. eine Assoziation zwischen der MMP-2-Expression durch Pankreasadenokarzinome und dem Auftreten von Lebermetastasen beobachten, wenn dieses Ergebnis auch – vermutlich infolge der kleinen Patientenkohorte von 32 Patienten - nicht signifikant war (Nagakawa, Aoki et al. 2002). Die Arbeitsgruppe von Smigielski et al. untersuchte dagegen die MMP-2-Konzentration im Vollblut von Patienten mit benignen und malignen Pankreas-Tumoren. Im Blut von Karzinom-Patienten konnte eine höhere MMP-2-Konzentration nachgewiesen werden als im Blut von Patienten mit benignen Pankreas-Tumoren, jedoch erreichte der Unterschied keine Signifikanz (Smigielski, Piskorz et al. 2013). Auf Basis dieser klinischen Studien ist anzunehmen, dass die fehlende MMP-2-Expression von Capan-2 gegenüber Panc-1 als Indikator für eine geringere Malignität anzusehen ist.

Unterdrückung des programmierten Zelltods - Hitzeschockproteine im Zytosol

Hsp70 und Hsp27 sind essenziell für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und Funktionalität: Als Chaperone verhindern sie die Aggregation denaturierter und naszierender Proteine und ermöglichen deren korrekte Faltung. Weiterhin entlasten sie das Chaperonsystem der Zelle, indem sie den proteosomalen Abbau zytotoxischer Proteinaggregate fördern. Darüber hinaus schützen sie die Zelle vor dem extrinsisch oder intrinsisch ausgelösten Zelltod, indem sie hemmend auf verschiedenen Stufen in die Apoptosekaskade eingreifen:

- auf prä-mitochondrialer Ebene z.B. durch Interaktion mit der Signalgebung von zellulären Todesrezeptoren,
- auf mitochondrialer Ebene verhindert Hsp70 die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und
- auf post-mitochondrialer Ebene durch Bindung und Hemmung von aus den Mitochondrien freigesetzten pro-apoptotischen Signalmolekülen

Diesen Funktionen kommt vor allem unter zellulären Stressbedingungen wie Hitze, Ischämie oder oxidativem Stress eine wesentliche Bedeutung zu: Unter zellulärem Stress kommt es zum vermehrten Anfall von denaturierten und fehlgefalteten Proteine, dem die Zelle durch die vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen entgegenwirkt. Zusätzlich gibt die direkte anti-apoptotische Wirkung der Hitzeschockproteine der Zelle die Möglichkeit zur Reparatur der Schäden, ehe die Apoptosekaskade ihre Wirkung entfaltet (Garrido, Brunet et al. 2006).

In Tumorzellen findet sich jedoch auch unter physiologischen Bedingungen eine Überexpression von Hitzeschockproteinen. Als Ursache werden zum einen eine konstante Aktivierung der Hitzeschockantwort durch den vermehrten Anfall von veränderten (Onko-)Proteinen in Tumorzellen und den durch die tumortypische Aneuploidie hervorgerufenen Stress aber auch Querverbindungen zwischen onkogenen Signalwegen und der Hitzeschockantwort diskutiert (Garrido, Brunet et al. 2006, Solimini, Luo et al. 2007). Folge der Überexpression von Hitzeschockproteinen ist häufig ein vermindertes Therapieansprechen durch verminderte Chemo- und Strahlensensibilität (Brondani Da Rocha, Regner et al. 2004, Pocaly, Lagarde et al. 2007, Vidyasagar, Wilson et al. 2012, Yang, Wang et al. 2012).

Gemcitabin ist integraler Bestandteil der adjuvanten Chemotherapie bei Pankreasadenokarzinomen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Dieses Chemotherapeutikum gehört zur Gruppe der Antimetabolite. Als Cytidin-Analogon führt es bei der DNS-Synthese zum Kettenabbruch. Da Gemcitabin auch die für die DNS-Reparatur verantwortlichen DNS-Polymerasen hemmt, wirkt es nicht nur auf proliferierende Zellen sondern auch auf ruhende Zellen. Zusätzlich inhibiert es die Ribonukleotid-Reduktase und damit die Synthese der DNS-Bausteine (Freissmuth, Offermanns et al. 2012). In-vitro-Studien konnten einen deutlichen Zusammenhang zwischen einer Überexpression von Hsp27 in Pankreaskarzinom-Zelllinien und einer vermehrten Resistenz gegenüber Gemcitabin demonstrieren: Pankreasadenokarzinomzelllinien mit primär oder durch Transfektion gesteigerter Hsp27-Expression erwiesen sich als signifikant weniger Gemcitabin-sensibel, wohingegen einer primär oder durch Verwendung von Inhibitoren oder siRNA reduzierte Hsp27-Expression mit erhöhter Gemcitabin-Sensitivität einherging (Mori-Iwamoto, Kuramitsu et al. 2007, Mori-Iwamoto, Kuramitsu et al. 2008, Taba, Kuramitsu et al. 2010). Darüber hinaus scheint das Phosphorylierungsmuster von Hsp27 eine Rolle in der Gemcitabin-Resistenz von PDAC-Zellen zu spielen (Taba, Kuramitsu et al. 2010).

Neben Gemcitabin gilt nach den neuen S3-Leitlinien die Gabe des Uracil-Analogons 5-FU, das die Synthese des Nukleosidmonophosphatats dTMP hemmt, als gleichwertiges adjuvantes Chemotherapieschema bei PDAC (Freissmuth, Offermanns et al. 2012, Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Auch für 5-FU konnten in-vitro-Studien mit Kolonkarzinomzellen (Sharma, Upadhyay et al. 2009) und hepatozellulären Karzinom-Zellen (Hayashi, Ishii et al. 2012) eine Korrelation zwischen 5-FU-Resistenz und Hsp27-Expression aufzeigen. Der Mechanismus dieser Hsp27-vermittelten Chemoresistenz, die auch für andere Chemotherapeutika wie Etoposid (Urbani, Poland et al. 2005) und Doxorubicin (Hansen, Parra et al. 1999) belegt ist, ist noch nicht eindeutig geklärt und wird bisher allgemein der hemmenden Wirkung von Hsp27 auf die Mitochondrien-abhängige Apoptosekaskade zugeschrieben (Mori-Iwamoto, Kuramitsu et al. 2007, Mori-Iwamoto, Kuramitsu et al. 2008, Taba, Kuramitsu et al. 2010).

Die Assoziation zwischen Hsp27-Expression und Gemcitabin-Resistenz konnte auch in zwei klinischen Studien demonstriert werden: So war der immunhistochemische Nachweis einer gesteigerten Hsp27-Expression in den Resektaten von 41 Pankreaskarzinompatienten in einer Studie von Tsiaousidou et al. mit einem schlechteren Ansprechen auf die adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin assoziiert (Tsiaousidou, Lambropoulou et al. 2013), während in der immunhistochemischen Analyse von Pankreasadenokarzinom-Feinnadelbiopsien

durch Mori-Iwamoto et al. der Nachweis einer erhöhten intratumoralen Hsp27-Expression mit einem gesteigerten Risiko für eine Tumorprogression einherging (Mori-Iwamoto, Kuramitsu et al. 2007). In deutlichem Widerspruch zu diesen Ergebnissen steht eine klinisch-experimentelle Arbeit von Schäfer et al., in der die Arbeitsgruppe einen signifikanten Zusammenhang zwischen intratumoraler Hsp27-Überexpression und längerem Patienten-Überleben infolge besserem Ansprechen auf die adjuvante Gemcitabin-Chemotherapie aufzeigte. Darüber hinaus demonstrierten Schäfer et al. eine erhöhte Gemcitabin-Sensibilität bei PDAC-Zellen mit Vektor-induzierter Hsp27-Überexpression bzw. eine verminderte Gemcitabin-Sensibilität bei einer initial Hsp27-überexprimierenden PDAC-Zelllinie nach Hsp27-Knockout (Schafer, Seeliger et al. 2012).

Vor dem Hintergrund des Überwiegens von Hinweisen für eine prognostisch ungünstige Rolle einer Hsp27-Überexpression wird in dieser Arbeit eine vermehrte zytosolische Hsp27-Expression als Indikator für einen Therapie-resistenten und damit maligneren Phänotyp betrachtet.

Neben der Überexpression von Hsp27 gehört auch eine vermehrte Expression von Hsp70 zu den Überlebensstrategien des PDAC. Die schützende Rolle einer vermehrten Hsp70-Expression für PDAC-Zellen belegt eine experimentelle Arbeit von Aghdassi et al.: Die Herabregulation der zellulären Hsp70-Expression durch Quercetin oder siRNA führt zu vermindertem Überleben und vermehrter Apoptose von Pankreaskarzinomzellen in vitro und zu herabgesetztem Tumorwachstum im Mausmodell (Aghdassi, Phillips et al. 2007). Als Mechanismus der Apoptoseinduktion infolge Hsp70-Depletion konnte ein Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration sowie die Freisetzung von Kathepsinen aus Lysosomen demonstriert werden (Dudeja, Mujumdar et al. 2009). Darüber hinaus konnten Sliutz et al. in einer in-vitro-Studie mit Fibrosarkomzellen einen kausalen Zusammenhang zwischen erhöhter Resistenz gegenüber Gemcitabin und einer Hsp70-Überexpression demonstrieren (Sliutz, Karlseder et al. 1996).

Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen steht eine klinische Studie von Sagol et al., in der eine zytosolische Hsp70-Überexpression als positiver prognostischer Marker für eine längere postoperative Überlebenszeit bei Pankreaskarzinom-Patienten identifiziert wird. Die Autoren erklären dieses Ergebnis mit einem effektiveren Hsp70-vermittelten Abbau von Onkoproteinen in Hsp70-überexprimierenden Pankreaskarzinomen, die bei Akkumulation zu einem aggressiveren Phänotyp führen könnten (Sagol, Tuna et al. 2002). Einschränkend sei jedoch bemerkt, dass die Patientenkohorte mit 36 Patienten sehr klein gewählt war und damit die Repräsentativität dieser Studie anzuzweifeln ist. Darüber hinaus steht dieses

Ergebnis im Widerspruch zu klinischen Studien zu anderen Entitäten gastrointestinaler Tumore wie kolorektalen Tumoren (Bauer, Nitsche et al. 2012), Magenkarzinomen vom intestinalen Typ (Lee, Lee et al. 2013) und Magenfrühkarzinomen (Kang, Jung et al. 2013) sowie hepatozellulären Karzinomen (Shin, Ryu et al. 2011), in denen eine Hsp70-Überexpression mit einer negativen Prognose assoziiert war.

Entsprechend wird in dieser Arbeit eine zytosolische Hsp70-Überexpression als Surrogatmarker für eine erhöhte Malignität behandelt.

In der semiquantitativen Analyse der Hsp27- und Hsp70-Expression von Capan-2 und Panc-1 durch Gelelektrophorese und Western Blot zeigten die beiden Zelllinien interessanterweise ein inverses Expressionsmuster: Während die Panc-1-Zelllinie im Vergleich zur Capan-2-Zelllinie eine deutlich höhere zytosolische Hsp27-Expression aufwies, zeigte Panc-1 im Gegenzug einen geringeren zytosolischen Hsp70-Spiegel als Capan-2 (s. Abb. 3-15). Dieses Ergebnis ist jedoch nicht überraschend, da die gesteigerte Aktivität des Chaperonsystems in der Regel nicht mit einer globalen Induktion der Hitzeschockantwort einhergeht sondern es tumorspezifisch zur präferentiellen Expression eines oder mehrerer Hitzeschockproteine kommt (de Thonel, Le Mouel et al. 2012).

Hsp70 und Hsp27 greifen beide hemmend auf prä- und postmitochondrialer Ebene in den programmierten Zelltod ein, jedoch interagieren sie nicht mit den gleichen Partnern (Garrido, Brunet et al. 2006). Entsprechend scheinen sich Hsp70 und Hsp27 in ihrer anti-apoptotischen Wirkung eher zu ergänzen als dass eine Redundanz besteht. Ein Indiz hierfür findet sich in einer in-vitro-Studie von Patel et al. zur familiären Amyotrophen Lateralsklerose: Durch Überexpression von entweder Hsp27 bzw. Hsp70 konnte der verfrühte Zelltod der Zellen mit der FALS-typischen Mutation der Superoxid-Dismutase 1 verhindert werden. Die Überexpression beider Hitzeschockproteine zeigte jedoch die stärkste anti-apoptotische Wirkung (Patel, Payne Smith et al. 2005).

Infolge fehlender Anhaltspunkte aus der Literatur bzw. eigener experimenteller Daten ist eine Bewertung, ob eine Hsp27- oder Hsp70-Überexpression die überlegene Überlebensstrategie darstellt, nicht möglich. Daher wird in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass eine gesteigerte Hsp27-Expression und eine vermehrte Hsp70-Expression in ihrem zytoprotektiven Effektes vergleichbar sind.

4.2.1.3 Membran-gebundenes Hsp70

Als weiteres Kriterium für malignes Potenzial wurde die Hsp70-Expression in der Membran (mHsp70) von Capan-2 und Panc-1 verglichen. Die Expression von Membran-gebundenem Hsp70 ist ein Spezifikum vieler Tumorzellen, das sich in nicht transformiertem Gewebe nicht findet (Multhoff, Botzler et al. 1995). Seine Rolle in der Tumorbilogie stellt sich ambivalent dar: Auf der einen Seite führt die Expression von Hsp70 in der Membran zu einer erhöhten Rigidität der Zellmembran und scheint diese zu stabilisieren (Pfister, Radons et al. 2007). Die Folge ist unter anderem eine verminderte Strahlensensibilität (Gehrmann, Marienhagen et al. 2005). Des Weiteren scheint Membran-gebundenes Hsp70 eine Rolle bei der Metastasierung zu spielen: So zeigen die Metastasen sowohl von mHsp70-positiven als auch von mHsp70-negativen Primärtumoren überwiegend einen Hsp70-positiven Phänotyp (Betzler, Schmidt et al. 1998, Farkas, Hantschel et al. 2003). Andererseits dient Membran-gebundenes mHsp70 dem angeborenen Immunsystem als Erkennungsstruktur und fördert die Aktivierung von NK-Zellen. Dies führt dann zur Lyse der mHsp70-positiven Tumorzellen (Multhoff 2002, Elsner, Muppala et al. 2007). Klinische Studien zum prognostischen Wert von Membran-gebundenem Hsp70 bezüglich Differenzierungsgrad, Gesamtüberleben und Therapieansprechen erbrachten ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse: Während ein mHsp70-positiver Phänotyp bei Tumorentitäten wie akuter myeloischer Leukämie, tiefen Rektumkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Lunge mit einem reduzierten Gesamtüberleben einhergeht, ist die mHsp70-Expression bei Magenkarzinomen und Kolonkarzinomen mit einer besseren Prognose korreliert (Steiner, Graf et al. 2006, Pfister, Radons et al. 2007). Als mögliche Erklärung für diese abweichenden Ergebnisse schlagen Pfister et al. einen Zusammenhang zwischen der prognostischen Bedeutung von mHsp70 und der Metastasierungsroute der Tumorentität vor: Bei portalvenös metastasierenden Karzinomen wie Magenkarzinomen und Kolonkarzinomen könnten hepatische NK-Zellen als Filter wirken und in den Blutstrom ausgeschwemmte mHsp70-positive Tumorzellen abfangen. Entsprechend würde bei diesen Tumorentitäten ein mHsp70-positiver Phänotyp zu einem niedrigeren Metastasierungsrisiko führen. Beim kavalen Metastierungstyp, wie er für tiefe Rektumkarzinome typisch ist, fehlt eine vorgeschaltete immunologische Filterstation. Entsprechend dominieren möglicherweise beim kavalen Metastierungstyp die prognostisch ungünstigeren Auswirkungen der mHsp70-Expression, wie eine erhöhte Strahlenresistenz und eine gesteigerte Membranstabilität (Pfister, Radons et al. 2007, Herold 2014).

Was bedeutet dies für die Entität des Pankreaskarzinoms? Bisher gibt es keine klinischen Studien zur prognostischen Bedeutung von Membran-gebundenem Hsp70 für den Krankheitsverlauf bei Pankreaskarzinomen. Prognosebegrenzend bei Patienten mit Pankreaskarzinom ist in der Regel das Auftreten von Fernmetastasen (Yachida, Jones et al. 2010). Beim Pankreaskarzinom dominiert bei 2/3 der Patienten der portalvenöse Metastasierungsweg, entsprechend ist die häufigste Lokalisation von Fernmetastasen die Leber. Fernmetastasen in Peritoneum, Lunge, Pleura oder Knochen treten später auf (Kamisawa, Isawa et al. 1995, Mao, Domenico et al. 1995, Yachida and Iacobuzio-Donahue 2009). Darüber hinaus spielt die Radiotherapie in der primären Therapie des Pankreaskarzinoms keine Rolle, sie kommt lediglich mit palliativer Zielsetzung bei symptomatischen Skelett- und zerebralen Metastasen zur Anwendung (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Vor diesem Hintergrund liegt es nahe, eine mHsp70-positive Pankreaskarzinomzelllinie als weniger aggressiv zu werten.

Im Vergleich der mHsp70-Expression von Panc-1 und Capan-2 zeigte die Panc-1-Zelllinie eine höhere MFI (nicht signifikant) und einen signifikant höheren Anteil mHsp70 positiver Zellen (s. Abb. 3-16). Legt man jedoch den für klinische Studien üblichen Cut-off von 10% mHsp70 exprimierenden Zellen zugrunde, um eine Zelllinie als mHsp70-positiv zu klassifizieren (Steiner, Graf et al. 2006, Pfister, Radons et al. 2007), sind beide Zelllinien als mHsp70 positiv einzustufen. Folglich wäre kein signifikanter Einfluss des jeweiligen mHsp70-Status auf das Verhalten der beiden Tumorzelllinien in vivo zu vermuten. Diese Hypothese wurde jedoch nicht weiter überprüft.

4.2.1.4 Zusammenfassung

In der Synopsis der Expressions- und Sekretionsmuster der beiden Zelllinien Panc-1 und Capan-2 unter normoxischen Bedingungen, bestätigte sich die Hypothese der höheren Malignität von Panc-1 gegenüber Capan-2: Zwar konnte im Hinblick auf die basale Expression der anti-apoptotischen Hitzeschockproteine kein eindeutiges Resümee gezogen werden, da beide Zelllinien jeweils präferentiell eines der untersuchten Hitzeschockproteine verstärkt exprimieren und bisher kein Beleg für eine Überlegenheit der schützenden Wirkung von Hsp27 bzw. Hsp70 existiert. Darüber hinaus ergab sich in Bezug auf die Expression von Membran-gebundenem Hsp70 kein relevanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien. Jedoch zeigte die Panc-1-Zelllinie unter physiologischen Bedingungen gegenüber Capan-2 eine höhere VEGF-Sekretion und im Gegensatz zu Capan-2 eine nachweisbare MMP-2-

Sekretion. Folglich ist bei Panc-1 eine erhöhte Neigung zur Angiogeneseinduktion und Metastasierung anzunehmen.

4.2.2 Vergleich maligner Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 unter Hypoxie

Auf der Grundlage der Ergebnisse zum Sekretions- und Expressionsmuster von Capan-2 und Panc-1 unter normoxischen Bedingungen erfolgte der Vergleich der gewählten Surrogatmarker für Angiogeneseinduktion, Metastasierungsneigung und Hitzeschockprotein-Expression unter hypoxischen Bedingungen.

4.2.2.1 Fortgesetzte Angiogenese – Vascular Endothelial Growth factor

Ein niedriger zellulärer Sauerstoffpartialdruck ist ein starker Induktor der VEGF-Sekretion. Die Aktivierung der VEGF-Transkription unter hypoxischen Bedingungen wird im Wesentlichen durch die Bindung von HIF-1 bzw. HIF-2 an ein HRE im Promotor des VEGFA-Gens vermittelt (Ferrara 2004, Koh and Powis 2012).

Entsprechend zeigten sowohl Capan-2 als auch Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Steigerung ihrer VEGF-Sekretion (s. Abb. 3-17). Dabei war der Faktor der Hypoxie-induzierten Sekretionszunahme beider Zelllinien nahezu äquivalent (Zunahme der VEGF-Sekretion nach 24 Stunden Hypoxie auf das ca. 4-fache der basalen VEGF-Sekretion, s. Tab. 3-7). Da jedoch die basale VEGF-Sekretion von Panc-1 das Doppelte der basalen VEGF-Sekretion von Capan-2 betrug, nahm der absolute Unterschied in der unter hypoxischen Bedingungen sezernierten VEGF-Menge beider Zelllinien mit zunehmender Dauer der hypoxischen Exposition zu (s. Tab. 3-8). Dieses Ergebnis stimmt mit der Erkenntnis von Shi et al. überein, dass die konstitutive Aktivierung der VEGF-Sekretion durch SP1-Überexpression unter normoxischen Bedingungen und die Hypoxie-induzierbare VEGF-Sekretion voneinander unabhängige Ereignisse sind (Shi, Le et al. 2001).

4.2.2.2 Gewebeinvasion, Metastasierung – Matrix-Metalloprotease 2

In-vitro-Studien an verschiedenen Tumorentitäten legen eine erhöhte Invasivität unter hypoxischen Bedingungen nahe (Chang and Erler 2014). In einigen Tumorzelllinien beruhte die Hypoxie-induzierte Steigerung der Invasivität auf einer vermehrten Sekretion der Matrix-Metalloprotease 2, so unter anderem in Ösophaguskarzinomen, in HNO-Tumoren, in Gliomzellen sowie in zwei PDAC-Zelllinien (Fujiwara, Nakagawa et al. 2007, Miyazaki, Hara et al. 2008, Jing, Wang et al. 2013). Dagegen zeigten eine Reihe von Brustkrebszelllinien, Neuroblastom- und Rhabdomyosarkomzelllinien keine Zunahme ihrer MMP-2-Expression unter Sauerstoffmangel, so dass auch andere Mechanismen in der erhöhten Invasivität unter

hypoxischen Bedingungen eine Rolle spielen müssen (Himmelstein and Koch 1998, Fu, Hou et al. 2009).

Als Mechanismus der Hypoxie-bedingten Steigerung der MMP-2-Sekretion in den untersuchten PDAC-Zelllinien konnten Zhao et al. eine HIF-1 α -induzierte Zunahme der Fascin-Expression demonstrieren (Zhao, Gao et al. 2014). Bei Fascin handelt es sich um eine Gruppe von Aktin-bindenden Proteinen, die Aktin in paralleler Anordnung bündeln (Adams 2004). Über die Aktivierung der Proteinkinase C und Extracellular-signal Regulated Kinase führte Fascin in den untersuchten PDAC-Zelllinien zur gesteigerten Expression von MMP-2 (Zhao, Gao et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit war keine relevante Zunahme der MMP-2-Sekretion von Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen nachweisbar (s. Abb. 3-18). Ebenso wenig zeigte die Capan-2-Zelllinie eine Hypoxie-induzierte MMP-2-Freisetzung. Eine mögliche Erklärung für diese von den Ergebnissen von Zhao et al. abweichenden Resultate könnte sein, dass die Expression von Fascin im Gegensatz zum Fascin-negativen gesunden Pankreasgewebe zwar ein häufiges aber kein obligates Merkmal von Pankreasadenokarzinomen ist (Lu, Hu et al. 2004, Swierczynski, Maitra et al. 2004). Zum anderen zeigte Panc-1 bereits unter normoxischen Bedingungen eine deutliche HIF-1 α -Stabilisierung, sodass eine Hypoxie-induzierte Steigerung der MMP-2-Sekretion eventuell ohne messbaren Effekt bleibt.

4.2.2.3 Unterdrückung des programmierten Zelltods – Hitzeschockproteine im Zytosol

Werden Kulturen von Neuronen oder Kardiomyozyten einem mildem thermischen Stress von 42-43°C ausgesetzt, so weisen die betroffenen Zellen für einige Stunden nach dieser Behandlung eine erhöhte Toleranz gegenüber einem weiteren höhergradigen thermischen Stress aber auch gegenüber Ischämie oder Entzug des zellulären Energieträgers ATP auf (Mailhos, Howard et al. 1993, Amin, Cumming et al. 1995, Kabakov, Budagova et al. 2002). Analog zeigten im Tierexperiment die mit einem thermischen Stress vorbehandelten Herzen von Versuchstieren eine geringere Empfindlichkeit gegenüber einer ischämischen Episode, gemessen an Infarktgröße bzw. Wiederherstellung ihrer Kontraktilität (Currie, Karmazyn et al. 1988, Donnelly, Sievers et al. 1992). Als ursächlich für diese vorübergehende thermisch-induzierte Toleranz gegen weitere Stressoren erwies sich die durch den thermischen Reiz induzierte vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen (Currie, Karmazyn et al. 1988, Donnelly, Sievers et al. 1992, Mailhos, Howard et al. 1993, Amin, Cumming et al. 1995, Kabakov, Budagova et al. 2002). Deren zytoprotektive Wirkung beruht zum einen auf ihrer Chaperonfunktion, zum anderen auf ihrem direkten hemmenden Eingreifen in die

Apoptosekaskade (Latchman 2001). Hsp27 schützt die Zelle darüber hinaus durch die Stabilisierung des Zytoskeletts (Bluhm, Martin et al. 1998). Ein deutliches Indiz für die Richtigkeit dieses Erklärungsmodells ergibt sich aus in-vitro-Experimenten mit Herzmuskel- und Nervenzellen, die nach Transfektion mit einem Hsp27- oder Hsp70-überexprimierenden viralen Vektor eine gesteigerte zelluläre Hsp70- bzw. Hsp27-Expression aufwiesen. Diese Kulturen von Hsp27- bzw. Hsp70-überexprimierenden Zellen wiesen ebenfalls eine erhöhte Toleranz gegenüber Ischämie bzw. Kultivierung in Serum-freiem Medium bzw. thermischem Stress auf (Martin, Mestril et al. 1997, Brar, Stephanou et al. 1999, Wagstaff, Collaco-Moraes et al. 1999).

Analog zur thermisch-induzierten Toleranz konnte in vitro und in vivo an Herzmuskelzellen und Neuronen der protektive Effekt einer kurzen Phase subletaler Ischämie gegenüber einer zweiten prolongierten Ischämiephase demonstriert werden. Auch in diesen Fällen konnte als schützender Mechanismus die Induktion einer gesteigerten Hsp27- und/ oder Hsp70-Expression ermittelt werden (Amin, Cumming et al. 1995, Przyklenk and Kloner 1998, Li, Roth et al. 2003). Unklar ist, ob die Aktivierung von HSF-1 und die konsekutive Hitzeschockantwort unter hypoxischen Bedingungen auf einer Interaktion von HSF-1 und HIF-1 α beruht - wie es eine Arbeit von Baird et al. nahelegt (Baird, Turnbull et al. 2006) - oder ob die Aktivierung von HSF-1 unabhängig vom zellulären Sauerstoffpartialdruck durch den mit Ischämie einhergehenden pH-Abfall und ATP-Mangel ausgelöst wird, wofür Studien von Eickelberg et al. sprechen (Eickelberg, Seebach et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob ein solches „*Preconditioning with ischemia*“ (Murry, Jennings et al. 1986) auch in den beiden untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien, die bereits unter normoxischen Bedingungen eine gesteigerte Expression von Hsp27 bzw. Hsp70 aufweisen, eine vermehrte Expression dieser beiden Hitzeschockproteine auslösen würde.

Panc-1- und Capan-2-Zellen wurden für 2 bis 24 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Direkt im Anschluss an die hypoxische Phase wurde die Hsp70-Expression beider Zelllinien im ELISA bestimmt.

Die Capan-2-Zelllinie zeigte nach zwei- bis achtstündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen keinen signifikanten Anstieg ihrer Hsp70-Expression. Erst im Anschluss an 24 Stunden Sauerstoffmangel war eine signifikante Zunahme der Hsp70-Expression in Capan-2 nachweisbar (s. Abb. 3-19).

Dagegen ergab sich für Panc-1 bereits nach vierstündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen ein signifikanter Anstieg der zytosolischen Hsp70-Konzentration. Im Anschluss an eine 8-stündige Hypoxiephase zeigten die Zellen der Panc-1-Linie noch einmal einen Anstieg ihrer Hsp70-Expression. Damit erreichte die (Hypoxie-induzierte) zytosolische Hsp70-Konzentration von Panc-1 den Wert der basalen Hsp70-Expression von Capan-2 (s. Abb. 3-19). Im Gegensatz hierzu führte 24-stündige Inkubation unter Sauerstoffmangel in Panc-1 zu einem Absinken der Hsp70-Expression auf das Ausgangsniveau unter normoxischen Bedingungen.

Folglich zeigten beide Zelllinien eine Reaktion im Hsp70-System auf den Stressor Sauerstoffmangel. Die Ergebnisse, dass

- 1) kein Anstieg der Hsp70-Expression in Capan-2 während der ersten 8 Stunden unter Sauerstoffmangel erfolgte und
- 2) der zu vermutende Peak der Hsp70-Expression in Panc-1 bei einer ähnlichen Hsp70-Konzentration liegt wie die auch unter Hypoxie aufrechterhaltene basale Hsp70-Konzentration in Capan-2

könnten darauf hindeuten, dass es eine zelluläre Obergrenze der Hsp70-Expression gibt, bis zu der eine Steigerung der Hsp70-Expression sinnvoll ist, um eine schützende Wirkung zu vermitteln. Ähnliche Schlüsse zog auch die Arbeitsgruppe von Amin et al., die die Hsp70-Induktion in Kulturen von Kardiomyozyten und Neuronen nach ischämischer Präkonditionierung verglichen. Sie folgerten, dass es eine Schwelle der Hsp70-Expression geben müsse, oberhalb derer Hsp70 gegen ischämischen Stress schützend wirkt, wohingegen eine weitere Steigerung der Hsp70-Expression keinen verbesserten Schutz bietet (Amin, Cumming et al. 1995). Für diese These sprechen auch Studien von Martin et al.: In Kardiomyozyten von neugeborenen Ratten, die bereits eine hohe basale Hsp27-Expression aufwiesen, schützte eine weitere Steigerung der Hsp27-Expression durch Transfektion mit einem Hsp27-überexprimierenden Vektor nicht vor einer Ischämiebedingten Zellschädigung. Dagegen führte eine Reduktion der Hsp27-Expression durch Antisense-RNA zu einem vermehrten Zelluntergang unter hypoxischen Bedingungen. Umgekehrt führte die durch Transfektion induzierte Hsp27-Überexpression bei initial nur wenig Hsp27-exprimierenden Kardiomyozyten zu einer erhöhten Ischämietoleranz (Martin, Mestril et al. 1997). Dies lässt die Folgerung zu, dass eine Steigerung der Hitzeschockprotein-Expression unter hypoxischen Bedingungen nur bis zu einem bestimmten Schwellenwert physiologisch sinnvoll ist. Diese Ischämietoleranz vermittelnde

Konzentration ist bei Capan-2 vermutlich bereits unter normoxischen Bedingungen erreicht, weshalb die Zelllinie ihre Hsp-Bildung nicht weiter steigert.

Der sprunghafte Anstieg der Hsp70-Expression in Capan-2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen ist möglicherweise auf eine additive Induktion der Hitzeschockantwort durch den pH-Abfall im Kulturmedium zurückzuführen. Anhand des Umschlags des zugesetzten Indikators war nach 24-stündiger Inkubation von Capan-2-Kulturen unter Hypoxie trotz Zugabe eines Puffers eine deutliche Übersäuerung des Kulturmediums festzustellen. Wie aus einer Arbeit von Zhong et al. hervorgeht bewirkt ein Absinken des pHs eine Aktivierung des zentralen Regulators der Hitzeschockantwort, HSF-1, die synergistisch zur Induktion von HSF-1 durch andere Stressoren wirkt (Zhong, Kim et al. 1999). Der additive Stressor pH-Abfall könnte auch im beschriebenen Experiment zum überschießenden Anstieg der Hsp70-Expression in Capan-2 nach 24 Stunden Sauerstoffmangel geführt haben.

Bei den Experimenten mit der Panc-1-Zelllinie ergab sich kein Hinweis auf eine Übersäuerung des Mediums im Anschluss an eine 24-stündige hypoxischer Inkubation. Ursache für das Absinken der Hsp70-Konzentration im Zytosol von Panc-1-Zellen im Anschluss an 24 Stunden Hypoxie könnte eine Drosselung der Proteinbiosynthese infolge einer mit dem prolongierten Sauerstoffmangel einhergehenden Verarmung an Energieträgern sein. Bei einer errechneten und experimentell ermittelten Halbwertszeit von Hsp70 von ca. 16 bis 20 Stunden (Gerner, Vejda et al. 2002) würde eine verringerte Hsp70-Syntheserate unter prolongierter Hypoxie nach 24 Stunden zu einem Absinken der intrazellulären Hsp70-Konzentration führen, wie in dem hier beschriebenen Versuch mit Panc-1-Zellen beobachtet.

Die Hsp27-Expression von Capan-2 und Panc-1 wurde im Western Blot ermittelt. Dabei zeigte keine der beiden Zelllinien eine Steigerung ihrer Hsp27-Expression unmittelbar im Anschluss an eine hypoxische Phase (s. Abb. 3-20, Abb. 3-21). Da in einer Arbeit von Li et al. ein Anstieg der Hsp27-mRNA in Ganglionzellen der Netzhaut erst 5 Stunden nach Reperfusion nachweisbar gewesen war (Li, Roth et al. 2003), wurden beide Zelllinien im Anschluss an eine hypoxische Phase für weitere 12 Stunden unter normoxischen Bedingungen nachinkubiert und darauffolgend die Hsp27-Expression im Western Blot bestimmt, um einen möglichen späten Anstieg der Hsp27-Expression zu detektieren. Doch auch nach zwölfstündiger Reoxygenierung zeigte sich kein relevanter Anstieg in der Hsp27-Expression beider Zelllinien (s. Abb. 3-22).

Die fehlende Reaktion des Hsp27-Systems auf den ischämischen Stimulus war zunächst unerwartet, da ein Anstieg der Hsp70-Expression unter hypoxischen Bedingungen in Panc-1-Zellen zu beobachten war, der auf eine Aktivierung von HSF-1 durch den ischämischen Stress zurückgeführt wurde. Der Stress-induzierbare Transkriptionsfaktor HSF-1 aktiviert jedoch nicht nur die Transkription von Hsp70, sondern auch von einer Reihe anderer Hitzeschockproteine, z.B. Hsp27 (Akerfelt, Morimoto et al. 2010, de Thonel, Le Mouel et al. 2012). Jedoch zeigen auch die Arbeiten anderer Forschungsgruppen in Abhängigkeit vom Zelltyp eine präferentielle Expression eines oder mehrerer Hitzeschockproteine auf denselben Stressor: So führte derselbe Stress in einer Arbeit von Udelsman et al. im Tiermodell in Nebennierenzellen zur Expression von Hsp70, dagegen in den glatten Muskelzellen der großen Gefäße zur Expression von Hsp70 und Hsp27, wohingegen Li et al. in der Retina eine selektive Induktion von Hsp27 nach einem ischämischen Stress und Sun et al. nach Zusatz von Dexamethason eine Aktivierung von HSF-1 und eine vermehrte Hsp70-Expression ohne Steigerung der Hsp27- und Hsp60-Expression in Kulturen von Kardiomyozyten adulter Ratten beobachteten (Udelsman, Blake et al. 1993, Sun, Chang et al. 2000, Li, Roth et al. 2003). Sun et al. erklärten diese Beobachtung einer selektiven Hsp-Induktion bei HSF-1-Aktivierung mit einer erhöhten Sensitivität des Hsp70-Systems im Vergleich zu den anderen untersuchten Hitzeschockprotein-Systemen (Sun, Chang et al. 2000). In Erweiterung dieser Hypothese unterscheiden sich möglicherweise Zelltyp-spezifisch die Hitzeschockprotein-Familien in ihrer Ansprechbarkeit durch HSF-1, sodass eine schwache Aktivierung von HSF-1 präferentiell das empfindlichere Hitzeschockprotein-System induziert. Ischämie aktiviert die Hitzeschockantwort schwächer als ein thermischer Stress (Amin, Cumming et al. 1995). Unter der Annahme, dass in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien Hsp70 das reagiblere System darstellt, ist eine selektive Induktion von Hsp70 ohne gleichzeitige Induktion von Hsp27 bei schwacher Aktivierung von HSF-1 unter hypoxischen Bedingungen plausibel.

4.2.2.4 Zusammenfassung

In der Zusammenschau der Analyse der Expressions- und Sekretionsmuster beider Zelllinien unter Sauerstoffmangel ist eine gesteigerte Aggressivität von Capan-2 und Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen anzunehmen (s. Tab. 4-2). Beide Zelllinien zeigten eine vermehrte Sekretion des pro-angiogenetischen Faktors VEGF und eine gesteigerte Expression des anti-apoptotisch wirksamen Chaperones Hsp70 unter hypoxischen Bedingungen. Ein Einfluss von Sauerstoffmangel auf die Expression des zytoprotektiv

wirksamen Chaperones Hsp27 bzw. die Sekretion der mit Metastasierung assoziierten Matrix-Metalloprotease 2 konnte nicht nachgewiesen werden. Da jedoch mit MMP-2 nur einer von vielen mit einer vermehrten Metastasierungsneigung korrelierenden Markern untersucht wurde, kann über die Auswirkungen von hypoxischen Bedingungen auf das metastatische Potenzial von Capan-2 und Panc-1 kein abschließendes Urteil gefällt werden.

Die Inkubation unter Sauerstoffmangel hatte jedoch keine Neubewertung des malignen Potenzials beider Zelllinien im direkten Vergleich zur Folge (s. Tab. 4-2): So führte zwar die hypoxische Inkubation bei Capan-2 zu einer Steigerung ihrer VEGF-Sekretion und damit ihres angiogenetischen Potenzials, jedoch erreichte die von Capan-2 sezernierte VEGF-Menge zu keinem Zeitpunkt die Sekretionstätigkeit von Panc-1 unter den gleichen Bedingungen. Des Weiteren zeigte Capan-2 auch unter hypoxischen Bedingungen keine nachweisbare MMP-2-Sekretion, dem gewählten Indikator für eine Metastasierungsneigung.

Auch unter hypoxischen Bedingungen ist eine Bewertung des Hsp27- bzw. Hsp70-Expressionsmusters beider Zelllinien als Surrogatmarker für die erfolgreiche Unterdrückung von Apoptose unter Stressbedingungen nur schwer möglich: Keine der Zelllinien zeigte eine Reaktion im Hsp27-System auf den Stimulus Hypoxie. Die Panc-1-Zelllinie zeigte unter Sauerstoffmangel eine vermehrte Hsp70-Expression. Andererseits ist möglicherweise bereits die hohe basale Hsp70-Expression von Capan-2 als Schutz gegen den Stressor Hypoxie ausreichend. Summa summarum ist auch unter hypoxischen Bedingungen von einer höheren Aggressivität der Panc-1-Zelllinie gegenüber der Capan-2-Zelllinie auszugehen.

Tab. 4-2: Zusammenfassung des Vergleichs der malignen Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen

Bedingungen	Zelllinie	VEGF	MMP-2	Hsp70	Hsp27
normoxisch	Panc-1	++	+	+	++
	Capan-2	+	-	++	+
hypoxisch	Panc-1	↑↑	↔	↑	↔
	Capan-2	↑	↔	(↑)	↔

Legende: ++ starke Expression, + vorhandene Expression, - Keine Expression, ↑↑ starke Zunahme, ↑ Zunahme, ↔ keine Änderung

4.3 Freisetzung von Hsp70-enthaltenden Exosomen unter Hypoxie versus Normoxie

Als Exosomen werden Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 40-100 nm bezeichnet. Sie bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht-Membran und einem Kern aus Zytosol, Proteinen

und Nucleinsäuren. Ihre Bildung und Freisetzung erfolgt über den endosomalen Weg (Azmi, Bao et al. 2013). Neben einer ubiquitären Fracht aus Tetraspaninen, Zytoskelettbestandteilen, Transportproteinen und Hitzeschockproteinen enthalten Exosomen auch Proteine und Nucleinsäuren, die vom Zelltyp und vom Stresszustand der Ursprungszelle abhängig sind (de Jong, Verhaar et al. 2012, Kharaziha, Ceder et al. 2012, Kucharzewska, Christianson et al. 2013). Da Exosomen von anderen Zellen durch verschiedene Mechanismen aufgenommen werden können, stellen Exosomen für gesunde wie auch entartete Zellen ein multipel einsetzbares Kommunikationsmittel für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation dar. So enthalten Exosomen von Tumorzellen Onkoproteine, Onko-miRNA und Onko-mRNA, durch die z.B. eine prämetastatische Nische induziert wird (Kharaziha, Ceder et al. 2012). Darüber hinaus führt zellulärer Stress wie Hitzeschock oder eine bakterielle Infektion nicht nur zu einer vermehrten zytosolischen Hsp70-Expression, sondern auch zu einer gesteigerten Freisetzung von Hsp70-haltigen Exosomen, die als Gefahrensignale das Immunsystem alarmieren (Gastpar, Gehrman et al. 2005, Lancaster and Febbraio 2005, Taylor, Robinson et al. 2007, Anand, Anand et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die vermehrte zytosolische Expression von Hsp70 in Panc-1-Zellen nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen (1) mit einer vermehrten Freisetzung von Exosomen einhergeht bzw. (2) die durch hypoxische Panc-1-Zellen freigesetzten Exosomen einen erhöhten Hsp70-Anteil enthalten.

Zur Klärung dieser Fragen wurden Panc-1-Zellen über 12 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Taylor et al. hatten zeigen können, dass die erhöhte zytosolische Hsp70-Konzentration nach einem zellulären Stressereignis für ca. 24 Stunden aufrechterhalten wird, die Freisetzung von Hsp70 jedoch erst nach einer Latenz von ca. 6 Stunden auftritt und dann für bis zu 48 Stunden anhält (Taylor, Robinson et al. 2007). Vor dem Hintergrund dieser Sekretionskinetik wurden die Zellen für weitere 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen nachinkubiert, um eine ausreichende Menge Exosomen isolieren zu können. Eine längere Nachinkubation war auf Grund der abnehmenden Überlebensrate der Panc-1-Kulturen nach mehr als 24 Stunden nicht sinnvoll.

In der Analyse der Exosomen-Freisetzung zeigten Panc-1-Zellen nach 12-stündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur unter normoxischen Bedingungen kultivierten Kontrollgruppe keine signifikant vermehrte Freisetzung von Exosomen. Nur ein marginaler Anstieg in der Exosomen-Produktion der hypoxisch exponierten Panc-1-Zellen war zu erkennen (s. Abb. 3-27).

Der fehlende Anstieg in der Freisetzung von Exosomen unter hypoxischen Bedingungen war unerwartet, da King et al. in ihren Versuchen mit Brustkrebszellen eine signifikante Zunahme der Exosomen-Freisetzung unter hypoxischen Bedingungen beobachten und sogar eine mögliche Rolle von HIF-1 α im Exosomentransport demonstrieren konnten (King, Michael et al. 2012). Eine Erklärung für dieses abweichende Ergebnis liegt möglicherweise in Unterschieden im Isolationsprotokoll: So verwendeten King et al. das Exoquick™ Kit von System Biosciences, das nach Angaben der Autoren eine 50 mal höhere Effektivität besitzt als die Exosomenisolation via Ultrazentrifugation wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde (King, Michael et al. 2012). Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe von Lancaster et al. in ihren Studien zur Exosomen-Freisetzung nach Hitzeschock ebenfalls keinen Anstieg der Exosomen-Freisetzung in den untersuchten Leukozyten nachweisen, wobei auch diese Gruppe ein Ultrazentrifugationsprotokoll verwendeten (Lancaster and Febbraio 2005). So stellt sich die Frage, ob der fehlende Anstieg in der Exosomenfreisetzung durch Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen auf einer realen nicht vorhandenen Zunahme der Exosomen-Freisetzung beruht oder viel mehr auf einer mangelnden Effizienz des Isolationsprotokolls.

Weiterhin konnte eine schwache Zunahme des Hsp70-Anteils an der Gesamtmenge der exosomal Proteinfracht im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden, wenn Panc-1-Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden (s. Abb. 3-28). Dieser Anstieg war allerdings nicht signifikant.

Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Anand et al. überein, die nach Infektion von Maus-Makrophagen mit Mykobakterien zwar eine vermehrte Präsentation von Hsp70 auf der Membran der Exosomen infizierter Zellen feststellen konnten, jedoch trotz erhöhter zytosolischer Konzentration von Hsp70 in den Mykobakterien tragenden Zellen nur eine marginale Erhöhung des gesamten Hsp70-Gehalts der Exosomen beobachteten (Anand, Anand et al. 2010). Andererseits konnte die Arbeitsgruppe von Ramteke et al. in ihren Studien an Exosomen hypoxischer Prostatakarzinomzellen in der Tat eine Erhöhung des Hsp70-Anteils im Vergleich zur Kontrollgruppe belegen. Allerdings verwendet diese Arbeitsgruppe das Exoquick™ Kit und stellte hierbei fest, dass die unter hypoxischen Bedingungen freigesetzten Exosomen tendenziell kleiner waren als die unter Kontrollbedingungen freigesetzten Exosomen (Ramteke, Ting et al. 2013). Möglicherweise war diese Exosomenfraktion in der vorliegenden Analyse und in den Studien von Lancaster et al. (beide unter Verwendung des Ultrazentrifugationsprotokolls) unterrepräsentiert. Dadurch wäre die fehlende Signifikanz der Zunahme im Hsp70-Gehalt von unter hypoxischen Bedingungen freigesetzten Exosomen zu erklären.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit nur in der Tendenz eine Zunahme der Freisetzung von Exosomen durch Panc-1-Zellen unter hypoxischen Bedingungen sowie nur ein schwacher Anstieg des Hsp-70-Gehalts dieser unter dem Einfluss von Sauerstoffmangel freigesetzten Exosomen demonstriert werden.

In einer vergleichenden Arbeit von Caradec et al. wurde eine mangelnde Effizienz und Reproduzierbarkeit der Exosomenisolation mit Hilfe von Ultrazentrifugation gegenüber dem Exoquick™ Kit demonstriert (Caradec, Kharmate et al. 2014). Entsprechend wäre eine Wiederholung der Versuche unter Verwendung des Exoquick™ Kit sinnvoll.

Unter Berücksichtigung der stimulatorischen Wirkung von Membran-gebundenem Hsp70 auf das angeborene Immunsystem (Gastpar, Gehrman et al. 2005), wäre darüber hinaus ein Vergleich der Hsp70-Präsentation auf der Membran von Exosomen, die unter dem Einfluss von Sauerstoffmangel bzw. unter Kontrollbedingungen freigesetzt wurden, eine lohnende Forschungsfrage.

5. Zusammenfassung

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist auch heute noch mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert. Es zeichnet sich durch einen signifikant niedrigeren intratumoralen Sauerstoffpartialdruck im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe aus.

Hypoxische Bedingungen führen sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen zu zellulären Adaptationsvorgängen, die auf Transkriptionsebene insbesondere durch die Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1 und HIF-2 vermittelt werden. Diese Anpassungsvorgänge können in Tumorzellen u.a. durch Induktion von Angiogenese, Unterdrückung von Apoptose und vermehrter Expression von Enzymen, die die extrazelluläre Matrix abbauen, sowie durch Erhöhung der genetischen Instabilität zu einem aggressiveren Tumor-Phänotyp und zur Progression des Tumors beitragen.

Nach Pathomechanismus und Dauer werden zwei Arten der Hypoxie unterschieden: (1) Akute Hypoxie, die Minuten bis Stunden anhaltende Phasen des Sauerstoffmangels bezeichnet und sich mit Reoxygenierungsphasen als intermittierende oder zyklische Hypoxie abwechseln kann, sowie (2) chronische Hypoxie, die Stunden bis Tage des Sauerstoffmangels umfasst.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Stabilisierung der sauerstofflabilen Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α unter kontinuierlicher und intermittierender Hypoxie *in vitro* zu untersuchen. Hierfür wurden zwei humane Pankreasadenokarzinom-Zelllinien für bis zu 24 Stunden kontinuierlich oder intermittierend hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Mit Hilfe von SDS-Page und Western Blot wurden anschließend die HIF-1 α - und HIF-2 α -Stabilisierung verglichen.

Als Versuchsanordnung wurde eine niedrige Hypoxie-Reoxygenierungs-Frequenz verwendet, bei der nur eine geringe Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies als zusätzlichem Induktor der HIF-Stabilisierung und keine HIF-Akkumulation über die Reoxygenierungsphase hinaus anzunehmen war. Es zeigte sich unter kontinuierlicher Hypoxie eine stärkere HIF-1 α - und HIF-2 α -Stabilisierung als unter intermittierender Hypoxie.

Des Weiteren erfolgte mit Hilfe von vier Surrogatmarkern eine Charakterisierung der beiden Pankreasadenokarzinom-Zelllinien im Hinblick auf ihre Aggressivität: Die Sekretion des Signalmoleküls VEGF diente als Marker für angiogenetisches Potenzial, die Sekretion der Matrix-Metalloprotease MMP-2 als Indikator für Invasivität und die Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp27 als Marker für vermehrte Resistenz gegen zelluläre Stressoren und

Zusammenfassung

Unterdrückung von Apoptose. Die Quantifizierung der MMP-2- und VEGF-Sekretion erfolgte durch ELISA, die Bestimmung der Hsp27- und der Hsp70-Expression durch SDS-Page und Western Blot bzw. SDS-Page, Western Blot und ELISA.

Unter normoxischen Bedingungen zeigte die gering differenzierte PDAC-Zelllinie Panc-1 gegenüber der gut differenzierten PDAC-Zelllinie Capan-2 eine höhere Sekretion von VEGF und MMP-2. In Bezug auf die intrazelluläre Expression von Hsp70 und Hsp27 bestand bei den beiden Zelllinien ein reziprokes Verhältnis. Entsprechend wurde der gering differenzierten Panc-1-Zelllinie ein höheres Potenzial zur Angiogenese-Induktion und Invasivität mit konsekutiv höherer Aggressivität zugeschrieben.

Unter hypoxischen Bedingungen zeigten beide Zelllinien eine Steigerung der VEGF-Sekretion und eine vermehrte Hsp70-Expression. Die MMP-2-Freisetzung und die Hsp27-Expression änderten sich nicht. Insgesamt zeigte Panc-1 weiterhin die höhere VEGF- und MMP-2-Sekretion bei vergleichbarer Hsp70-Expression. Dies spricht für eine höhere Aggressivität der gering differenzierten Panc-1-Zelllinie auch unter hypoxischen Bedingungen.

Des Weiteren können Tumorzellen aktiv Hsp70 in Form von Exosomen, kleinen Membranvesikeln, sezernieren. Exosomen dienen Zellen unter anderem als Mediatoren der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation.

Aus dem Überstand von Zellkulturen mit Panc-1 konnten sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen durch Ultrazentrifugation Exosomen isoliert werden. Diese wurden mit Transmissionselektronenmikroskopie dargestellt und mit ELISA und Western-Blot auf ihren Hsp70-Gehalt analysiert. Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich weder ein Anstieg der Exosomenfreisetzung noch der exosomalen Hsp70-Sekretion.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
bHLH	basic helix-loop-helix
BRCA2	breast cancer 2
BSA	Bovine serum albumin (= Bovines Serumalbumin)
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	E-Cadherin (epithelial)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor (= Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	EGF-Rezeptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoetin

Anhang

FACS	fluorescence-activated cell sorting (= Fluorescence-aktivierte Zellsortierung)
FCS	fetal calf serum (= Fetales Kälberserum)
FIH	Factor inhibiting HIF (= HIF-hemmender Faktor)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FOLFIRINOX	Oxaliplatin, Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin
g	Gramm
g	Gravitation
GRP	glucose-regulated proteins
HAF	hypoxia associated factor (= Hypoxie-assoziierte Faktor)
HER-2/neu-Rezeptor	human epidermal growth factor receptor (= Humaner epidermaler Wachstumsfaktor)
HIF	Hypoxia-inducible factor (= Hypoxie-induzierter Faktor)
HRE	Hypoxia Response Element
HSE	heat shock element (= Hitzeschock-Element)
HSF	Heat shock factor (= Hitzeschock-Faktor)
Hsp	Heat shock protein (= Hitzeschockprotein)
IAP	Inhibitors of apoptosis proteins (= Apoptoseinhibitoren)
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor (= Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IH	intermittierende Hypoxie
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-6	Interleukin-6
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
KH	kontinuierliche Hypoxie

Anhang

KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MCN	Muzinöse zystische Neoplasie
mg	Milligramm
mHsp70	Membran-gebundenes Hsp70
miRNA	microRNA
mM	millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA (= Boten-RNA)
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin (= Ziel des Rapamycins im Säugetier)
Myb	myeloblastosis
Myc	myelocytomatosis
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N2	Stickstoff
ns	nicht signifikant
O2	Sauerstoff
Oct-4	octamer-binding transcription factor 4 (= Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4)
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia (= intraepitheliale Neoplasie des Pankreas)
PBS	Phosphat-Buffered-Saline (= Phosphat-Salzpufferlösung)

Anhang

PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma (= Duktales Adenokarzinom des Pankreas)
PDGF	Platelet-derived Growth Factor (= Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
pg	Pikogramm
PI	Propidium Iodid
PI-3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIGF	Placental Growth Factor (Plazentarer Wachstumsfaktor)
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	Rat sarcoma
RB	Retinoblastom
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute (=Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.	siehe
SDS	sodium dodecyl sulfate (= Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (= Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEM	Standard Error of the Mean (= Standardfehler des Mittelwerts)
sHSP	small heat shock protein (= kleines Hitzeschockprotein)
Sp1	specificity protein 1
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline (= Tris gepufferte Salzlösung)

Anhang

TBS-T	Tris-Buffered Saline plus Tween® 20 (Tris gepufferte Salzlösung plus Tween® 20)
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF- β	Transforming Growth Factor β (= Transformierender Wachstumsfaktor beta)
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase (= Gewebe Metalloproteasen Inhibitor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor, Nodes, Metastases (= Tumor, Lymphknoten, Metastasen)
TP53	Tumorprotein 53
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
VEGF	vascular endothelial growth factor (= Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VEGFR	VEGF-Rezeptor

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Die sechs „Hallmarks of Cancer“ nach Hanahan und Weinberg (Hanahan and Weinberg 2000).....	5
Abb. 1-2: Einfluss von Hypoxie auf die Tumorprogression vgl. Abb. 6 aus Vaupel and Harrison 2004 (Vaupel and Harrison 2004)	18
Abb. 2-1: Versuchsaufbau der Hypoxie-Experimente mit Panc-1-Zellen	25
Abb. 2-2: Versuchsaufbau der Hypoxie-Experimente mit Capan-2-Zellen	26
Abb. 3-1: HIF-1 α -Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	33
Abb. 3-2: HIF-1 α -Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	34
Abb. 3-3: HIF-2 α -Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	34
Abb. 3-4: HIF-2 α - Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	34
Abb.3-5: HIF-1 α -Stabilisierung in Panc-1 und Capan-2 unter Normoxie bzw. 4 Stunden kontinuierlicher Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert).....	36
Abb. 3-6: HIF-2 α -Stabilisierung in Panc-1 und Capan-2 unter Normoxie und 8 Stunden kontinuierlicher Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert).....	36
Abb. 3-7: HIF-1 α -Stabilisierung in Panc-1 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	38
Abb. 3-8: HIF-1 α -Stabilisierung in Capan-2 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	38
Abb. 3-9: HIF-1 α -Stabilisierung in Capan-2 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	38
Abb. 3-10: HIF-2 α -Stabilisierung in Panc-1 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	39
Abb. 3-11: HIF-2 α -Stabilisierung in Capan-2 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	39
Abb. 3-12: HIF-2 α -Stabilisierung in Capan-2 unter intermittierender Hypoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	39
Abb. 3-13: VEGF-Sekretion durch Panc-1 und Capan-2 unter Normoxie in pg VEGF / μ g Protein (Mittelwert+SEM).....	43

Abb. 3-14: MMP-2-Sekretion durch Panc-1 bzw. Capan-2 unter normoxischen Bedingungen in ng MMP-2 / μg Protein (Mittelwert+SEM).....	44
Abb. 3-15: zytosolische Hsp27- bzw. Hsp70-Expression in Panc-1-Zellen bzw. Capan-2- unter Normoxie relativ zu Beta-Aktin (Mittelwert+SEM)	44
Abb. 3-16: Mean Fluorescence Intensity für mHsp70 (Mittelwert+SEM) bzw. Anteil an mHsp70-positiven Zellen in Prozent (Mittelwert+SEM)	45
Abb. 3-17: VEGF-Sekretion durch Panc-1 und Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen in pg VEGF / μg Protein (Mittelwert+ SEM)	46
Abb. 3-18: MMP-2-Sekretion durch Panc-1 in ng MMP-2 / μg Protein unter hypoxischen Bedingungen (Mittelwert+SEM)	47
Abb. 3-19: zytosolische Hsp70-Expression in Panc-1 bzw. Capan-2-Zellen unter Normoxie und Hypoxie in ng Hsp70 / μg Protein (Mittelwert+SEM)	48
Abb. 3-20: Hsp27-Expression in Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen (keine Reoxygenierung) relativ zur Hsp27-Expression bei Normoxie (Mittelwert+SEM)	50
Abb. 3-21: Hsp27-Expression in Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen (keine Reoxygenierung) relativ zur Hsp27-Expression bei Normoxie (Mittelwert+SEM)	50
Abb. 3-22: Hsp27-Expression in Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen nach zwölfstündiger Reoxygenierung relativ zur Hsp27-Expression bei Normoxie (Mittelwert+SEM)	50
Abb. 3-23: Hsp27-Expression in Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen nach zwölfstündiger Reoxygenierung relativ zur Hsp27-Expression bei Normoxie (Mittelwert+SEM)	51
Abb. 3-24: zytosolische Hsp27-Expression in Panc-1 bzw. Capan-2 unter Normoxie bzw. nach 4 Stunden Hypoxie ohne Reoxygenierung	51
Abb. 3-25: Exosomenisolat aus dem Überstand von Panc-1 nach Kultivierung unter normoxischen Bedingungen bzw. zwölfstündiger hypoxischer Exposition	52
Abb. 3-26: TEM-Bild eines Exosoms aus einem Isolat aus dem Überstand von Panc-1	52
Abb. 3-27: Exosomen-Freisetzung durch Panc-1 unter Normoxie bzw. nach zwölfstündiger hypoxischer Exposition in μg exosomales Protein / 1 Mio. Zellen (Mittelwert+SEM)	53
Abb. 3-28: Hsp70-Anteil am gesamten exosomalen Protein von unter Normoxie kultivierten respektive hypoxisch exponierten Panc-1-Zellen in pg Hsp70 / μg exosomales Protein (Mittelwert+SEM).....	53

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Chemikalien	20
Tab. 2-2: Geräte	21
Tab. 2-3: Reagenzien für die Zellkultur	22
Tab. 2-4: Reagenzien für die Durchflusszytometrie	23
Tab. 2-5: Durchflusszytometrie-Antikörper.....	23
Tab. 2-6: Zahl der ausgesäten Zellen für Hypoxie-Experimente	24
Tab. 2-7: Zeitintervalle der Hypoxie-Experimente	25
Tab. 2-8: BCA TM Protein Assay.....	27
Tab. 2-9: Ultrazentrifugenzubehör für die Exosomenisolation	29
Tab. 2-10: Primärantikörper für Immunoblots	30
Tab. 2-11: Sekundärantikörper für Immunoblots.....	31
Tab. 2-12: Detektionsreagenzien und Membranen für Immunoblots.....	31
Tab. 2-13: ELISA-Kits.....	32
Tab. 3-1: HIF-1 α -Stabilisierung unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zur HIF-1 α -Expression bei Normoxie	35
Tab. 3-2: HIF-2 α -Stabilisierung unter kontinuierlich hypoxischen Bedingungen relativ zur HIF-2 α -Expression bei Normoxie	35
Tab. 3-3: HIF-1 α -Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlicher Hypoxie (KH) bzw. intermittierender Hypoxie (IH) relativ zu Normoxie.....	40
Tab. 3-4: HIF-1 α -Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlicher Hypoxie (KH) bzw. intermittierender Hypoxie (IH) relativ zu Normoxie.....	41
Tab. 3-5: HIF-2 α -Stabilisierung in Capan-2 unter kontinuierlicher Hypoxie (KH) bzw. intermittierender Hypoxie (IH) relativ zu Normoxie.....	41
Tab. 3-6: HIF-2 α -Stabilisierung in Panc-1 unter kontinuierlicher Hypoxie (KH) bzw. intermittierender Hypoxie (IH) relativ zu Normoxie.....	42
Tab. 3-7: VEGF-Sekretion durch Panc-1 und Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen relativ zur VEGF-Sekretion unter normoxischen Bedingungen	46
Tab. 3-8: Verhältnis der VEGF-Sekretion durch Panc-1 zur VEGF-Sekretion durch Capan-2 unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen	47
Tab. 3-9: Hsp70-Expression in Capan-2 unter hypoxischen Bedingungen im Verhältnis zur Hsp70-Expression bei Normoxie	49
Tab. 3-10: Hsp70-Expression in Panc-1 unter hypoxischen Bedingungen im Verhältnis zur Hsp70-Expression bei Normoxie	49

Anhang

Tab. 4-1: Zusammenfassung des Vergleichs intermittierender Hypoxie (IH) mit kontinuierlicher Hypoxie (KH)	57
Tab. 4-2: Zusammenfassung des Vergleichs der malignen Eigenschaften von Capan-2 und Panc-1 unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen	76

6.4 Lizenzen

Erklärung:

Die Abbildung Abb. 1-1 unterliegt dem Urheberrecht. Eine Verwendung und der Abdruck ohne Genehmigung/Lizenzierung durch den Rechteinhaber sind untersagt. Für die gekennzeichnete Abbildung liegt folgende Lizenz zum alleinigen Abdruck in dieser Arbeit vor:

Copyright-Declaration:

The illustration/picture Abb. 1-1 is protected by copyright. Reuse and reprint are prohibited. License for this thesis is as followed:

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Oct 18, 2015

This is a License Agreement between Ann ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Ann-Kathrin Neudeck
Customer address	Wirtstr, 40 München, 81539
License number	3731980022769
License date	Oct 18, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Cell
Licensed content title	The Hallmarks of Cancer
Licensed content author	Douglas Hanahan, Robert A Weinberg
Licensed content date	7 January 2000
Licensed content volume number	100
Licensed content issue number	1
Number of pages	14
Start Page	57
End Page	70
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1

Anhang

Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	German
Original figure numbers	1
Title of your thesis/dissertation	Charakterisierung der HIF-1- und HIF-2-Stabilisierung unter kontinuierlicher versus intermittierende Hypoxie sowie Vergleich der Expression Malignitäts-assoziiertes Marker unter Hypoxie und Normoxie in humanen Pankreasadenokarzinomzellen unterschiedlicher Differenzierung
Expected completion date	Dec 2015
Estimated size (number of pages)	91
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0,00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0,00 EUR / 0,00 GBP
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

6.5 Literaturverzeichnis

- Adams, J. C. (2004). "Roles of fascin in cell adhesion and motility." *Curr Opin Cell Biol* 16(5): 590-596.
- Aghdassi, A., P. Phillips, V. Dudeja, D. Dhaulakhandi, R. Sharif, R. Dawra, M. M. Lerch and A. Saluja (2007). "Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma." *Cancer Res* 67(2): 616-625.
- Akerfelt, M., R. I. Morimoto and L. Sistonen (2010). "Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(8): 545-555.
- Amin, V., D. V. Cumming, R. S. Coffin and D. S. Latchman (1995). "The degree of protection provided to neuronal cells by a pre-conditioning stress correlates with the amount of heat shock protein 70 it induces and not with the similarity of the subsequent stress." *Neurosci Lett* 200(2): 85-88.
- Anand, P. K., E. Anand, C. K. Bleck, E. Anes and G. Griffiths (2010). "Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria." *PLoS One* 5(4): e10136.
- Azmi, A. S., B. Bao and F. H. Sarkar (2013). "Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review." *Cancer Metastasis Rev.*
- Bacon, A. L. and A. L. Harris (2004). "Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology." *Ann Med* 36(7): 530-539.
- Baird, N. A., D. W. Turnbull and E. A. Johnson (2006). "Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1." *J Biol Chem* 281(50): 38675-38681.
- Baudelet, C., G. O. Cron and B. Gallez (2006). "Determination of the maturity and functionality of tumor vasculature by MRI: correlation between BOLD-MRI and DCE-MRI using P792 in experimental fibrosarcoma tumors." *Magn Reson Med* 56(5): 1041-1049.
- Bauer, K., U. Nitsche, J. Slotta-Huspenina, E. Drecol, C. H. von Weyhern, R. Rosenberg, H. Hofler and R. Langer (2012). "High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer." *Cell Oncol (Dordr)* 35(3): 197-205.
- Bayer, C. and P. Vaupel (2012). "Acute versus chronic hypoxia in tumors: Controversial data concerning time frames and biological consequences." *Strahlenther Onkol* 188(7): 616-627.
- Beere, H. M. and D. R. Green (2001). "Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis." *Trends Cell Biol* 11(1): 6-10.
- Bluhm, W. F., J. L. Martin, R. Mestril and W. H. Dillmann (1998). "Specific heat shock proteins protect microtubules during simulated ischemia in cardiac myocytes." *Am J Physiol* 275(6 Pt 2): H2243-2249.
- Botzler, C., J. Schmidt, A. Luz, L. Jennen, R. Issels and G. Multhoff (1998). "Differential Hsp70 plasma-membrane expression on primary human tumors and metastases in mice with severe combined immunodeficiency." *Int J Cancer* 77(6): 942-948.

- Bracken, C. P., A. O. Fedele, S. Linke, W. Balrak, K. Lisy, M. L. Whitelaw and D. J. Peet (2006). "Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α stabilization and transactivation in a graded oxygen environment." *J Biol Chem* 281(32): 22575-22585.
- Bramhall, S. R., J. P. Neoptolemos, G. W. Stamp and N. R. Lemoine (1997). "Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma." *J Pathol* 182(3): 347-355.
- Brar, B. K., A. Stephanou, M. J. Wagstaff, R. S. Coffin, M. S. Marber, G. Engelmann and D. S. Latchman (1999). "Heat shock proteins delivered with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or hypoxic stress." *J Mol Cell Cardiol* 31(1): 135-146.
- Bristow, R. G. and R. P. Hill (2008). "Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability." *Nat Rev Cancer* 8(3): 180-192.
- Brondani Da Rocha, A., A. Regner, I. Grivicich, D. Pretto Schunemann, C. Diel, G. Kovaleski, C. Brunetto De Farias, E. Mondadori, L. Almeida, A. Braga Filho and G. Schwartzmann (2004). "Radioresistance is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines." *Int J Oncol* 25(3): 777-785.
- Cairns, R., I. Papandreou and N. Denko (2006). "Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment." *Mol Cancer Res* 4(2): 61-70.
- Calderwood, S. K. (2007). *Cell stress proteins*. New York, Springer.
- Calderwood, S. K., M. A. Khaleque, D. B. Sawyer and D. R. Ciocca (2006). "Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis." *Trends Biochem Sci* 31(3): 164-172.
- Caradec, J., G. Kharmate, E. Hosseini-Beheshti, H. Adomat, M. Gleave and E. Guns (2014). "Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods." *Clin Biochem* 47(13-14): 1286-1292.
- Catalano, V., A. Turdo, S. Di Franco, F. Dieli, M. Todaro and G. Stassi (2013). "Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay." *Semin Cancer Biol*.
- Catalano, V., A. Turdo, S. Di Franco, F. Dieli, M. Todaro and G. Stassi (2013). "Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay." *Semin Cancer Biol* 23(6 Pt B): 522-532.
- Chaffer, C. L. and R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." *Science* 331(6024): 1559-1564.
- Chang, J. and J. Erler (2014). "Hypoxia-mediated metastasis." *Adv Exp Med Biol* 772: 55-81.
- Currie, R. W., M. Karmazyn, M. Kloc and K. Mailer (1988). "Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery." *Circ Res* 63(3): 543-549.
- Daugaard, M., M. Rohde and M. Jaattela (2007). "The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions." *FEBS Lett* 581(19): 3702-3710.
- de Jong, O. G., M. C. Verhaar, Y. Chen, P. Vader, H. Gremmels, G. Posthuma, R. M. Schiffelers, M. Gucek and B. W. van Balkom (2012). "Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes." *J Extracell Vesicles* 1.

- de Thonel, A., A. Le Mouel and V. Mezger (2012). "Transcriptional regulation of small HSP-HSF1 and beyond." *Int J Biochem Cell Biol* 44(10): 1593-1612.
- Deer, E. L., J. Gonzalez-Hernandez, J. D. Coursen, J. E. Shea, J. Ngatia, C. L. Scaife, M. A. Firpo and S. J. Mulvihill (2010). "Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines." *Pancreas* 39(4): 425-435.
- Donnelly, T. J., R. E. Sievers, F. L. Visser, W. J. Welch and C. L. Wolfe (1992). "Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion?" *Circulation* 85(2): 769-778.
- Dudeja, V., N. Mujumdar, P. Phillips, R. Chugh, D. Borja-Cacho, R. K. Dawra, S. M. Vickers and A. K. Saluja (2009). "Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms." *Gastroenterology* 136(5): 1772-1782.
- Eickelberg, O., F. Seebach, M. Riordan, G. Thulin, A. Mann, K. H. Reidy, S. K. Van Why, M. Kashgarian and N. Siegel (2002). "Functional activation of heat shock factor and hypoxia-inducible factor in the kidney." *J Am Soc Nephrol* 13(8): 2094-2101.
- Elsner, L., V. Muppala, M. Gehrman, J. Lozano, D. Malzahn, H. Bickeboller, E. Brunner, M. Zientkowska, T. Herrmann, L. Walter, F. Alves, G. Multhoff and R. Dressel (2007). "The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands." *J Immunol* 179(8): 5523-5533.
- Farkas, B., M. Hantschel, M. Magyarlaci, B. Becker, K. Scherer, M. Landthaler, K. Pfister, M. Gehrman, C. Gross, A. Mackensen and G. Multhoff (2003). "Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma." *Melanoma Res* 13(2): 147-152.
- Farnsworth, R. H., M. Lackmann, M. G. Achen and S. A. Stacker (2013). "Vascular remodeling in cancer." *Oncogene*.
- Feig, C., A. Gopinathan, A. Neesse, D. S. Chan, N. Cook and D. A. Tuveson (2012). "The pancreas cancer microenvironment." *Clin Cancer Res* 18(16): 4266-4276.
- Ferrara, N. (2004). "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress." *Endocr Rev* 25(4): 581-611.
- Fischer, R., M. Breidert, T. Keck, F. Makowiec, C. Lohrmann and J. Harder (2012). "Early recurrence of pancreatic cancer after resection and during adjuvant chemotherapy." *Saudi J Gastroenterol* 18(2): 118-121.
- Folkman, J. (2002). "Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis." *Semin Oncol* 29(6 Suppl 16): 15-18.
- Freissmuth, M., S. Offermanns and S. Böhm (2012). *Pharmakologie & Toxikologie Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Friedrich, P. (2004). "The intriguing Ca²⁺ requirement of calpain activation." *Biochem Biophys Res Commun* 323(4): 1131-1133.
- Fu, O. Y., M. F. Hou, S. F. Yang, S. C. Huang and W. Y. Lee (2009). "Cobalt chloride-induced hypoxia modulates the invasive potential and matrix metalloproteinases of primary and metastatic breast cancer cells." *Anticancer Res* 29(8): 3131-3138.

- Fujioka, S., K. Yoshida, S. Yanagisawa, M. Kawakami, T. Aoki and Y. Yamazaki (2001). "Angiogenesis in pancreatic carcinoma: thymidine phosphorylase expression in stromal cells and intratumoral microvessel density as independent predictors of overall and relapse-free survival." *Cancer* 92(7): 1788-1797.
- Fujiwara, S., K. Nakagawa, H. Harada, S. Nagato, K. Furukawa, M. Teraoka, T. Seno, K. Oka, S. Iwata and T. Ohnishi (2007). "Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas." *Int J Oncol* 30(4): 793-802.
- Garcea, G., A. R. Dennison, C. J. Pattenden, C. P. Neal, C. D. Sutton and D. P. Berry (2008). "Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature." *JOP* 9(2): 99-132.
- Garrido, C., M. Brunet, C. Didelot, Y. Zermati, E. Schmitt and G. Kroemer (2006). "Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties." *Cell Cycle* 5(22): 2592-2601.
- Garrido, C., C. Paul, R. Seigneuric and H. H. Kampinga (2012). "The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones." *Int J Biochem Cell Biol* 44(10): 1588-1592.
- Gastpar, R., M. Gehrman, M. A. Bausero, A. Asea, C. Gross, J. A. Schroeder and G. Multhoff (2005). "Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells." *Cancer Res* 65(12): 5238-5247.
- Gehrman, M., J. Marienhagen, H. Eichholtz-Wirth, E. Fritz, J. Ellwart, M. Jaattela, T. Zilch and G. Multhoff (2005). "Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells." *Cell Death Differ* 12(1): 38-51.
- Gerner, C., S. Vejda, D. Gelbmann, E. Bayer, J. Gotzmann, R. Schulte-Hermann and W. Mikulits (2002). "Concomitant determination of absolute values of cellular protein amounts, synthesis rates, and turnover rates by quantitative proteome profiling." *Mol Cell Proteomics* 1(7): 528-537.
- Gong, Y. L., G. M. Xu, W. D. Huang and L. B. Chen (2000). "Expression of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of metalloproteinases and their local invasiveness and metastasis in Chinese human pancreatic cancer." *J Surg Oncol* 73(2): 95-99.
- Gress, T. M., F. Muller-Pillasch, C. Weber, M. M. Lerch, H. Friess, M. Buchler, H. G. Beger and G. Adler (1994). "Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma." *Cancer Res* 54(2): 547-551.
- Hadler-Olsen, E., J. O. Winberg and L. Uhlin-Hansen (2013). "Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets." *Tumour Biol* 34(4): 2041-2051.
- Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). "Rules for making human tumor cells." *N Engl J Med* 347(20): 1593-1603.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.

- Hansen, A. E., A. T. Kristensen, I. Law, J. T. Jorgensen and S. A. Engelholm (2011). "Hypoxia-inducible factors--regulation, role and comparative aspects in tumourigenesis." *Vet Comp Oncol* 9(1): 16-37.
- Hansen, R. K., I. Parra, P. Lemieux, S. Oesterreich, S. G. Hilsenbeck and S. A. Fuqua (1999). "Hsp27 overexpression inhibits doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* 56(2): 187-196.
- Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." *Nat Rev Cancer* 2(1): 38-47.
- Hayashi, R., Y. Ishii, H. Ochiai, A. Matsunaga, T. Endo, H. Hasegawa and Y. Kitagawa (2012). "Suppression of heat shock protein 27 expression promotes 5-fluorouracil sensitivity in colon cancer cells in a xenograft model." *Oncol Rep* 28(4): 1269-1274.
- Herold, G. (2014). *Innere Medizin 2014 eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis.* Köln, Selbstverl.
- Hidalgo, M. (2010). "Pancreatic cancer." *N Engl J Med* 362(17): 1605-1617.
- Himelstein, B. P. and C. J. Koch (1998). "Studies of type IV collagenase regulation by hypoxia." *Cancer Lett* 124(2): 127-133.
- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." *J Natl Cancer Inst* 93(4): 266-276.
- Holland, J. F., E. Frei, R. C. Bast and American Cancer Society (2000). *Cancer medicine.* Hamilton u.a., Decker.
- Holmquist-Mengelbier, L., E. Fredlund, T. Lofstedt, R. Noguera, S. Navarro, H. Nilsson, A. Pietras, J. Vallon-Christersson, A. Borg, K. Gradin, L. Poellinger and S. Pahlman (2006). "Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype." *Cancer Cell* 10(5): 413-423.
- Hsieh, C. H., C. H. Lee, J. A. Liang, C. Y. Yu and W. C. Shyu (2010). "Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity." *Oncol Rep* 24(6): 1629-1636.
- Hsieh, C. H., W. C. Shyu, C. Y. Chiang, J. W. Kuo, W. C. Shen and R. S. Liu (2011). "NADPH oxidase subunit 4-mediated reactive oxygen species contribute to cycling hypoxia-promoted tumor progression in glioblastoma multiforme." *PLoS One* 6(9): e23945.
- Jewell, U. R., I. Kvietikova, A. Scheid, C. Bauer, R. H. Wenger and M. Gassmann (2001). "Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous." *FASEB J* 15(7): 1312-1314.
- Jing, S. W., Y. D. Wang, L. Q. Chen, M. X. Sang, M. M. Zheng, G. G. Sun, Q. Liu, Y. J. Cheng and C. R. Yang (2013). "Hypoxia suppresses E-cadherin and enhances matrix metalloproteinase-2 expression favoring esophageal carcinoma migration and invasion via hypoxia inducible factor-1 alpha activation." *Dis Esophagus* 26(1): 75-83.
- Joo, Y. E., Y. H. Sohn, W. S. Lee, C. H. Park, S. K. Choi, J. S. Rew, C. S. Park and S. J. Kim (2002). "Expression of vascular endothelial growth factor and p53 in pancreatic carcinomas." *Korean J Intern Med* 17(3): 153-159.

- Juuti, A., J. Lundin, S. Nordling, J. Louhimo and C. Haglund (2006). "Epithelial MMP-2 expression correlates with worse prognosis in pancreatic cancer." *Oncology* 71(1-2): 61-68.
- Kabakov, A. E., K. R. Budagova, D. S. Latchman and H. H. Kampinga (2002). "Stressful preconditioning and HSP70 overexpression attenuate proteotoxicity of cellular ATP depletion." *Am J Physiol Cell Physiol* 283(2): C521-534.
- Kamisawa, T., T. Isawa, M. Koike, K. Tsuruta and A. Okamoto (1995). "Hematogenous metastases of pancreatic ductal carcinoma." *Pancreas* 11(4): 345-349.
- Kang, Y., W. Y. Jung, H. Lee, W. Jung, E. Lee, B. K. Shin, A. Kim, H. K. Kim and B. H. Kim (2013). "Prognostic significance of heat shock protein 70 expression in early gastric carcinoma." *Korean J Pathol* 47(3): 219-226.
- Keith, B., R. S. Johnson and M. C. Simon (2012). "HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression." *Nat Rev Cancer* 12(1): 9-22.
- Kharaziha, P., S. Ceder, Q. Li and T. Panaretakis (2012). "Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle." *Biochim Biophys Acta* 1826(1): 103-111.
- Kiang, J. G. and G. C. Tsokos (1998). "Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology." *Pharmacol Ther* 80(2): 183-201.
- King, H. W., M. Z. Michael and J. M. Gleadle (2012). "Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells." *BMC Cancer* 12: 421.
- Klein, T. and R. Bischoff (2011). "Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases." *Amino Acids* 41(2): 271-290.
- Koh, M. Y. and G. Powis (2012). "Passing the baton: the HIF switch." *Trends Biochem Sci* 37(9): 364-372.
- Koong, A. C., V. K. Mehta, Q. T. Le, G. A. Fisher, D. J. Terris, J. M. Brown, A. J. Bastidas and M. Vierra (2000). "Pancreatic tumors show high levels of hypoxia." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48(4): 919-922.
- Kucharzewska, P., H. C. Christianson, J. E. Welch, K. J. Svensson, E. Fredlund, M. Ringner, M. Morgelin, E. Bourseau-Guilmain, J. Bengzon and M. Belting (2013). "Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(18): 7312-7317.
- Lancaster, G. I. and M. A. Febbraio (2005). "Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins." *J Biol Chem* 280(24): 23349-23355.
- Latchman, D. S. (2001). "Heat shock proteins and cardiac protection." *Cardiovasc Res* 51(4): 637-646.
- Lee, H. W., E. H. Lee, S. H. Kim, M. S. Roh, S. B. Jung and Y. C. Choi (2013). "Heat shock protein 70 (HSP70) expression is associated with poor prognosis in intestinal type gastric cancer." *Virchows Arch* 463(4): 489-495.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K. and AWMF). (2013, 01.10.2013). "S3-Leitlinie Onkologie: Exokrines Pankreaskarzinom." from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0100LI_S3_Exokrines_Pankreaskarzinom_21112013.pdf.

- Li, Y., S. Roth, M. Laser, J. X. Ma and C. E. Crosson (2003). "Retinal preconditioning and the induction of heat-shock protein 27." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(3): 1299-1304.
- Liang, Q. L., B. R. Wang, G. Q. Chen, G. H. Li and Y. Y. Xu (2010). "Clinical significance of vascular endothelial growth factor and connexin43 for predicting pancreatic cancer clinicopathologic parameters." *Med Oncol* 27(4): 1164-1170.
- Lu, X. and Y. Kang (2010). "Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis." *Clin Cancer Res* 16(24): 5928-5935.
- Lu, Z., L. Hu, S. Evers, J. Chen and Y. Shen (2004). "Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue." *Proteomics* 4(12): 3975-3988.
- Luo, J., N. L. Solimini and S. J. Elledge (2009). "Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction." *Cell* 136(5): 823-837.
- Luoto, K. R., R. Kumareswaran and R. G. Bristow (2013). "Tumor hypoxia as a driving force in genetic instability." *Genome Integr* 4(1): 5.
- Magat, J., B. F. Jordan, G. O. Cron and B. Gallez (2010). "Noninvasive mapping of spontaneous fluctuations in tumor oxygenation using ¹⁹F MRI." *Med Phys* 37(10): 5434-5441.
- Mailhos, C., M. K. Howard and D. S. Latchman (1993). "Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis." *Neuroscience* 55(3): 621-627.
- Mao, C., D. R. Domenico, K. Kim, D. J. Hanson and J. M. Howard (1995). "Observations on the developmental patterns and the consequences of pancreatic exocrine adenocarcinoma. Findings of 154 autopsies." *Arch Surg* 130(2): 125-134.
- Martin, J. L., R. Mestral, R. Hilal-Dandan, L. L. Brunton and W. H. Dillmann (1997). "Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes." *Circulation* 96(12): 4343-4348.
- Martinive, P., F. Defresne, C. Bouzin, J. Saliez, F. Lair, V. Gregoire, C. Michiels, C. Dessy and O. Feron (2006). "Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies." *Cancer Res* 66(24): 11736-11744.
- Matsumoto, S., H. Yasui, J. B. Mitchell and M. C. Krishna (2010). "Imaging cycling tumor hypoxia." *Cancer Res* 70(24): 10019-10023.
- Mayer, M. P. and B. Bukau (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." *Cell Mol Life Sci* 62(6): 670-684.
- Meyers, R. A. Proteins from analytics to structural genomics. Weinheim, Wiley-VCH.
- Miyazaki, Y., A. Hara, K. Kato, T. Oyama, Y. Yamada, H. Mori and T. Shibata (2008). "The effect of hypoxic microenvironment on matrix metalloproteinase expression in xenografts of human oral squamous cell carcinoma." *Int J Oncol* 32(1): 145-151.
- Mori-Iwamoto, S., Y. Kuramitsu, S. Ryozaawa, K. Mikuria, M. Fujimoto, S. Maehara, Y. Maehara, K. Okita, K. Nakamura and I. Sakaida (2007). "Proteomics finding heat shock protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine." *Int J Oncol* 31(6): 1345-1350.

- Mori-Iwamoto, S., Y. Kuramitsu, S. Ryozaawa, K. Taba, M. Fujimoto, K. Okita, K. Nakamura and I. Sakaida (2008). "A proteomic profiling of gemcitabine resistance in pancreatic cancer cell lines." *Mol Med Rep* 1(3): 429-434.
- Mukhopadhyay, D. and K. Datta (2004). "Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors." *Semin Cancer Biol* 14(2): 123-130.
- Multhoff, G. (2002). "Activation of natural killer cells by heat shock protein 70." *Int J Hyperthermia* 18(6): 576-585.
- Multhoff, G., C. Botzler, L. Jennen, J. Schmidt, J. Ellwart and R. Issels (1997). "Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells." *J Immunol* 158(9): 4341-4350.
- Multhoff, G., C. Botzler, M. Wiesnet, E. Muller, T. Meier, W. Wilmanns and R. D. Issels (1995). "A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells." *Int J Cancer* 61(2): 272-279.
- Muniraj, T., P. A. Jamidar and H. R. Aslanian (2013). "Pancreatic cancer: A comprehensive review and update." *Dis Mon* 59(11): 368-402.
- Murphy, M. E. (2013). "The HSP70 family and cancer." *Carcinogenesis* 34(6): 1181-1188.
- Murry, C. E., R. B. Jennings and K. A. Reimer (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* 74(5): 1124-1136.
- Nagakawa, Y., T. Aoki, K. Kasuya, A. Tsuchida and Y. Koyanagi (2002). "Histologic features of venous invasion, expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, and the relation with liver metastasis in pancreatic cancer." *Pancreas* 24(2): 169-178.
- Nanduri, J., N. Wang, G. Yuan, S. A. Khan, D. Souvannakitti, Y. J. Peng, G. K. Kumar, J. A. Garcia and N. R. Prabhakar (2009). "Intermittent hypoxia degrades HIF-2alpha via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(4): 1199-1204.
- Oberg-Welsh, C., S. Sandler, A. Andersson and M. Welsh (1997). "Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro." *Mol Cell Endocrinol* 126(2): 125-132.
- Park, J. K., M. A. Kim, J. K. Ryu, Y. B. Yoon, S. W. Kim, H. S. Han, G. H. Kang, H. Kim, J. H. Hwang and Y. T. Kim (2012). "Postoperative prognostic predictors of pancreatic ductal adenocarcinoma: clinical analysis and immunoprofile on tissue microarrays." *Ann Surg Oncol* 19(8): 2664-2672.
- Patel, S. A. and M. C. Simon (2008). "Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease." *Cell Death Differ* 15(4): 628-634.
- Patel, Y. J., M. D. Payne Smith, J. de Belleruche and D. S. Latchman (2005). "Hsp27 and Hsp70 administered in combination have a potent protective effect against FALS-associated SOD1-mutant-induced cell death in mammalian neuronal cells." *Brain Res Mol Brain Res* 134(2): 256-274.
- Pfister, K., J. Radons, R. Busch, J. G. Tidball, M. Pfeifer, L. Freitag, H. J. Feldmann, V. Milani, R. Issels and G. Multhoff (2007). "Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis." *Cancer* 110(4): 926-935.

- Pocaly, M., V. Lagarde, G. Etienne, J. A. Ribeil, S. Claverol, M. Bonneu, F. Moreau-Gaudry, V. Guyonnet-Duperat, O. Hermine, J. V. Melo, M. Dupouy, B. Turcq, F. X. Mahon and J. M. Pasquet (2007). "Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia." *Leukemia* 21(1): 93-101.
- Przyklenk, K. and R. A. Kloner (1998). "Ischemic preconditioning: exploring the paradox." *Prog Cardiovasc Dis* 40(6): 517-547.
- Ramteke, A., H. Ting, C. Agarwal, S. Mateen, R. Somasagara, A. Hussain, M. Graner, B. Frederick, R. Agarwal and G. Deep (2013). "Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules." *Mol Carcinog*.
- Robert-Koch-Institut (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin, Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. : 48-51.
- Rocheftort, M. M., J. S. Ankeny, B. E. Kadera, G. W. Donald, W. Isacoff, Z. A. Wainberg, O. J. Hines, T. R. Donahue, H. A. Reber and J. S. Tomlinson (2013). "Impact of tumor grade on pancreatic cancer prognosis: validation of a novel TNMG staging system." *Ann Surg Oncol* 20(13): 4322-4329.
- Roskoski, R., Jr. (2007). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression." *Crit Rev Oncol Hematol* 62(3): 179-213.
- Sagol, O., B. Tuna, A. Coker, S. Karademir, F. Obuz, H. Astarcioglu, A. Kupelioglu, I. Astarcioglu and O. Topalak (2002). "Immunohistochemical detection of pS2 protein and heat shock protein-70 in pancreatic adenocarcinomas. Relationship with disease extent and patient survival." *Pathol Res Pract* 198(2): 77-84.
- Schafer, C., H. Seeliger, D. C. Bader, G. Assmann, D. Buchner, Y. Guo, A. Ziesch, A. Palagyi, S. Ochs, R. P. Laubender, A. Jung, E. N. De Toni, T. Kirchner, B. Goke, C. Bruns and E. Gallmeier (2012). "Heat shock protein 27 as a prognostic and predictive biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma." *J Cell Mol Med* 16(8): 1776-1791.
- Schmoll, H.-J., K. Höffken and K. Possinger (2006). Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Schwab, M. (2011). Encyclopedia of Cancer. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Sharma, A., A. K. Upadhyay and M. K. Bhat (2009). "Inhibition of Hsp27 and Hsp40 potentiates 5-fluorouracil and carboplatin mediated cell killing in hepatoma cells." *Cancer Biol Ther* 8(22): 2106-2113.
- Shi, Q., X. Le, J. L. Abbruzzese, Z. Peng, C. N. Qian, H. Tang, Q. Xiong, B. Wang, X. C. Li and K. Xie (2001). "Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma." *Cancer Res* 61(10): 4143-4154.
- Shin, E., H. S. Ryu, S. H. Kim, H. Jung, J. J. Jang and K. Lee (2011). "The clinicopathological significance of heat shock protein 70 and glutamine synthetase expression in hepatocellular carcinoma." *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18(4): 544-550.
- Sliutz, G., J. Karlseder, C. Tempfer, L. Orel, G. Holzer and M. M. Simon (1996). "Drug resistance against gemcitabine and topotecan mediated by constitutive hsp70 overexpression in vitro: implication of quercetin as sensitiser in chemotherapy." *Br J Cancer* 74(2): 172-177.

- Smigielski, J., L. Piskorz, R. Talar-Wojnarowska, E. Malecka-Panas, S. Jablonski and M. Brocki (2013). "The estimation of metalloproteinases and their inhibitors blood levels in patients with pancreatic tumors." *World J Surg Oncol* 11: 137.
- Smith, R. A., J. Tang, C. Tudur-Smith, J. P. Neoptolemos and P. Ghaneh (2011). "Meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer." *Br J Cancer* 104(9): 1440-1451.
- Solimini, N. L., J. Luo and S. J. Elledge (2007). "Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells." *Cell* 130(6): 986-988.
- Steiner, K., M. Graf, K. Hecht, S. Reif, L. Roszbacher, K. Pfister, H. J. Kolb, H. M. Schmetzer and G. Multhoff (2006). "High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with a worse prognosis." *Leukemia* 20(11): 2076-2079.
- Sun, L., J. Chang, S. R. Kirchhoff and A. A. Knowlton (2000). "Activation of HSF and selective increase in heat-shock proteins by acute dexamethasone treatment." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(4): H1091-1097.
- Sun, Y. and T. H. MacRae (2005). "Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function." *Cell Mol Life Sci* 62(21): 2460-2476.
- Swierczynski, S. L., A. Maitra, S. C. Abraham, C. A. Iacobuzio-Donahue, R. Ashfaq, J. L. Cameron, R. D. Schulick, C. J. Yeo, A. Rahman, D. A. Hinkle, R. H. Hruban and P. Argani (2004). "Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays." *Hum Pathol* 35(3): 357-366.
- Taba, K., Y. Kuramitsu, S. Ryozaawa, K. Yoshida, T. Tanaka, S. Maehara, Y. Maehara, I. Sakaida and K. Nakamura (2010). "Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells." *Anticancer Res* 30(7): 2539-2543.
- Taylor, A. R., M. B. Robinson, D. J. Gifondorwa, M. Tytell and C. E. Milligan (2007). "Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases." *Dev Neurobiol* 67(13): 1815-1829.
- Thomas-Tikhonenko, A. (2010). *Cancer Genome and Tumor Microenvironment*. New York, NY, Springer Science+Business Media.
- Tsiaousidou, A., M. Lambropoulou, E. Chatzitheoklitos, G. Tripsianis, C. Tsompanidou, C. Simopoulos and A. K. Tsaroucha (2013). "B7H4, HSP27 and DJ-1 molecular markers as prognostic factors in pancreatic cancer." *Pancreatology*.
- Uchida, T., F. Rossignol, M. A. Matthay, R. Mounier, S. Couette, E. Clottes and C. Clerici (2004). "Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha." *J Biol Chem* 279(15): 14871-14878.
- Udelsman, R., M. J. Blake, C. A. Stagg, D. G. Li, D. J. Putney and N. J. Holbrook (1993). "Vascular heat shock protein expression in response to stress. Endocrine and autonomic regulation of this age-dependent response." *J Clin Invest* 91(2): 465-473.
- Urbani, A., J. Poland, S. Bernardini, L. Bellincampi, A. Biroccio, M. Schnolzer, P. Sinha and G. Federici (2005). "A proteomic investigation into etoposide chemo-resistance of neuroblastoma cell lines." *Proteomics* 5(3): 796-804.
- Vaupel, P. (2008). "Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis." *Oncologist* 13 Suppl 3: 21-26.

- Vaupel, P. and L. Harrison (2004). "Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response." *Oncologist* 9 Suppl 5: 4-9.
- Vaupel, P. and A. Mayer (2007). "Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome." *Cancer Metastasis Rev* 26(2): 225-239.
- Vaupel, P. and A. Mayer (2014). "Hypoxia in tumors: pathogenesis-related classification, characterization of hypoxia subtypes, and associated biological and clinical implications." *Adv Exp Med Biol* 812: 19-24.
- Vidyasagar, A., N. A. Wilson and A. Djamali (2012). "Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target." *Fibrogenesis Tissue Repair* 5(1): 7.
- Wagstaff, M. J., Y. Collaco-Moraes, J. Smith, J. S. de Belleruche, R. S. Coffin and D. S. Latchman (1999). "Protection of neuronal cells from apoptosis by Hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector." *J Biol Chem* 274(8): 5061-5069.
- Wasif, N., C. Y. Ko, J. Farrell, Z. Wainberg, O. J. Hines, H. Reber and J. S. Tomlinson (2010). "Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging?" *Ann Surg Oncol* 17(9): 2312-2320.
- White, F. C., S. M. Carroll and M. P. Kamps (1995). "VEGF mRNA is reversibly stabilized by hypoxia and persistently stabilized in VEGF-overexpressing human tumor cell lines." *Growth Factors* 12(4): 289-301.
- Wilson, W. R. and M. P. Hay (2011). "Targeting hypoxia in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 11(6): 393-410.
- Wolfers, J., A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena and L. Zitvogel (2001). "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." *Nat Med* 7(3): 297-303.
- Xu, L., X. Ding, H. Tan and J. Qian (2013). "Correlation between B7-H3 expression and matrix metalloproteinases 2 expression in pancreatic cancer." *Cancer Cell Int* 13(1): 81.
- Yachida, S. and C. A. Iacobuzio-Donahue (2009). "The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer." *Arch Pathol Lab Med* 133(3): 413-422.
- Yachida, S., S. Jones, I. Bozic, T. Antal, R. Leary, B. Fu, M. Kamiyama, R. H. Hruban, J. R. Eshleman, M. A. Nowak, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and C. A. Iacobuzio-Donahue (2010). "Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer." *Nature* 467(7319): 1114-1117.
- Yang, X., J. Wang, Y. Zhou, Y. Wang, S. Wang and W. Zhang (2012). "Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells." *Cancer Lett* 321(2): 137-143.
- Yuan, G., J. Nanduri, S. Khan, G. L. Semenza and N. R. Prabhakar (2008). "Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR." *J Cell Physiol* 217(3): 674-685.
- Zhao, X., S. Gao, H. Ren, W. Sun, H. Zhang, J. Sun, S. Yang and J. Hao (2014). "Hypoxia-inducible factor-1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis by activating transcription of the actin-bundling protein fascin." *Cancer Res* 74(9): 2455-2464.

- Zhong, M., S. J. Kim and C. Wu (1999). "Sensitivity of Drosophila heat shock transcription factor to low pH." *J Biol Chem* 274(5): 3135-3140.
- Zhou, J., T. Schmid, S. Schnitzer and B. Brune (2006). "Tumor hypoxia and cancer progression." *Cancer Lett* 237(1): 10-21.
- Zorgetto, V. A., G. G. Silveira, J. P. Oliveira-Costa, D. F. Soave, F. A. Soares and A. Ribeiro-Silva (2013). "The relationship between lymphatic vascular density and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) expression with clinical-pathological features and survival in pancreatic adenocarcinomas." *Diagn Pathol* 8(1): 170.

6.6 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die vielfältige Unterstützung, die mir von vielen Seiten zuteil wurde, nicht möglich gewesen.

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Gabriele Multhoff für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Prof. Multhoff für ihre kontinuierliche Betreuung und ihr wertvolles und kritisches Feedback bedanken. Darüber hinaus danke ich Frau Prof. Multhoff für ihre Offenheit gegenüber eigenen Ideen gepaart mit Ihrer professioneller Anleitung.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin Frau Dr. Christine Bayer, die mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit mit außerordentlicher Sachkundigkeit, Tatkraft und Geduld zur Seite stand. Ihre wegweisende und kreative Unterstützung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Darüber hinaus danke ich ihr für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Für die Einführung in die in dieser Arbeit verwendeten Techniken der Proteinanalytik und in die Methode der FACS-Analyse danke ich Frau Ines Nachtigall ganz herzlich.

Frau Jessica Pelzel und Frau Andrea Mair danke ich für Ihre Unterstützung bei der Durchführung diverser Experimente.

Dem restlichen Team der Arbeitsgruppe, Frau Dr. Daniela Schilling, Herrn Prof. Mathias Gehrman, Herrn Dr. Thomas Schmid, Frau Stephanie Breuninger, Herrn Wolfgang Sievert und Herrn Stefan Stangl danke ich für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima. Es hat mir viel Spaß bereitet, in diesem Team mitarbeiten zu können!

Mein herzlicher Dank gilt auch der Arbeitsgruppe Prof. Jens Siveke der 2. Medizinischen Klinik des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (MRI) für die Bereitstellung der beiden in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. Der Fakultät für Chemie der TU München danke ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Messungen.

Darüber hinaus danke ich Herrn Ludwig Bulst für das Korrigieren dieser Arbeit.

Ebenso danke ich meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben und mich immer emotional unterstützt haben.

Anhang

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Verlobten Osman Agirbas, der mir während der Anfertigung der Doktorarbeit geduldig und liebevoll zur Seite gestanden hat.