

Aus der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und
Kinderchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. Th. Becker)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**CHEMOTHERAPIEINDUZIERTE INFLAMMATION BEIM
NICHT-KLEINZELLIGEN BRONCHIALKARZINOM:
UNTERSUCHUNGEN
ZUR *IN VITRO* UND *IN VIVO* RELEVANZ**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JULIUS PHILIPP HÜSECKEN

aus **Iserlohn**

1. Berichterstatter:

Professor Dr. med. Bodo Schniewind

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. med. Carsten Maik Naumann

Tag der mündlichen Prüfung:

04. Juni 2015

Zum Druck genehmigt, Kiel den

.....

gez:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC)	1
1.2 Chemotherapie beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom	3
1.3 Chemotherapieinduzierte Resistenz und Inflammation	5
1.4 Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom und tumorinduzierte Inflammation	7
1.5 Fragestellung	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Material, Geräte und Chemikalien	10
2.2 Zellkultur	10
2.3 Kristallviolett-Vitalitätsanalysen	11
2.4 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie	12
2.5 Multiplex-Bead-Array-Proteindurchflussanalysen	13
2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	13
2.7 Invasionsanalysen	14
2.8 Orthotopes Tiermodell	15
2.9 Humane Tumorproben	16
2.10 Quantitative Echtzeit-PCR Analysen	17
2.10.1 Aufarbeitung von Gewebeproben	17
2.10.2 Isolation der RNS und DNS	17
2.10.3 Quantitative Echtzeit-PCR-Analyse	19
2.10.3.1 Herstellen von cDNS	20
2.10.3.2 Echtzeit-PCR	21
3 Ergebnisse	23
3.1 <i>In vitro</i> Chemoresistenz von NSCLC-Zelllinien	23
3.1.1 Kristallviolett	23
3.1.2 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie	25
3.2 Multiplex-FACS-(Bead-Array-) Analysen und ELISA	28
3.3 Invasionsanalysen	35
3.4 Semiquantitative Echtzeit-PCR-Analysen	37

3.4.1	Orthotopes Tiermodell	37
3.4.2	Humane Tumorproben	38
4	Diskussion	41
4.1	<i>In vitro</i> Analysen zu Chemosensibilität	41
4.2	Analysen an Tumorproben aus einem murinen Tiermodell	44
4.3	Humane Tumorproben	45
5	Zusammenfassung	48
6	Literaturverzeichnis	50
7	Anhang	61
7.1	Material, Chemikalien und Geräte	61
7.2	Danksagung	67
7.3	Curriculum vitae	69
7.4	Abstracts	71

Abbildungsverzeichnis

1	Kristallviolett-Assay der Zelllinie BEN	24
2	Kristallviolett-Assay der Zelllinie KNS62	24
3	Propidium-FACS der Zelllinie BEN	26
4	Propidium-FACS der Zelllinie KNS62 wt	27
5	Propidium-FACS der Zelllinie KNS62 Bcl-xL	27
6	Multiplex-FACS-Analyse der Zelllinie BEN	28
7	Multiplex-FACS-Analyse der Zelllinie KNS62 wt	29
8	IL-8 ELISA der Zelllinie BEN	30
9	IL-8 ELISA der Zelllinie KNS62 wt	31
10	TNF- α ELISA der Zelllinie BEN	32
11	TNF- α ELISA der Zelllinie KNS62 wt	33
12	uPA ELISA der Zelllinie BEN	34
13	uPA ELISA der Zelllinie KNS62 wt	34
14	Relative Expression von mRNS der Tiertumore	37
15	Relative Expression von mRNS der humanen Tumore - Inflammations- zytokine	39
16	Relative Expression von mRNS der humanen Tumore - Matrixmetallo- proteasen	39
17	Korrelation der relativen mRNS-Expression und des Überlebens von NSCLC-Patienten nach neoadj. Chemotherapie & chirurg. Resektion . .	40

Tabellenverzeichnis

1	Tumorstadien (nach International Union against Cancer, UICC 7. Ausgabe) und Prognose in Abhängigkeit des Tumorstadiums des Bronchialkarzinoms	3
2	Zusammensetzung des Superscript-Mix	21
3	Tabellarische Darstellung der verwendeten PCR-Primer jeweils in Sense- und Antisense-Darstellung	22
4	Effektivdosen (ED_{20} und ED_{50}) in $\mu\text{g/ml}$ nach Chemotherapie über 48 Stunden	25
5	Angenäherte Effektivdosen (ED_{20} und ED_{50}) in $\mu\text{g/ml}$ nach Chemotherapie über 48 Stunden	25
6	Gegenüberstellung der fotografischen Auswertung der Invasionsanalyse der Zelllinien KNS62 wt und Bcl-xL nach 48 Stunden Chemotherapie .	36

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beginnt zunächst mit einem Blick auf die Tumorentität des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms sowie auf die aktuellen Möglichkeiten der Chemotherapie. Weiterhin wird dann ein Bezug zwischen Chemotherapie und Inflammation hergestellt, um schließlich die Fragestellungen der hier zugrunde liegenden Arbeit zu erläutern.

1.1 Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC)

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts stellten Bronchialkarzinome bzw. Lungentumore an sich noch eine Rarität in der Medizin dar. Hierzu bemerkte William Osler 1912 in seinem Textbuch der Medizin „Primärtumoren der Lunge sind eine Seltenheit!“ (Miller, 2005). Doch während der letzten 100 Jahre hat sich dieses Bild gewaltig verändert und das Bronchialkarzinom ist heute weltweit eine der führenden krebsbedingten Todesursachen mit über 1 Million Todesfällen weltweit pro Jahr (Jemal et al., 2004). Auch in Deutschland ist der Lungenkrebs sowohl für Männer als auch für Frauen die dritthäufigste Krebserkrankung nach Prostata- bzw. Brust- und Darmkrebs. So handelt es sich bei etwa 14 % aller Krebsneuerkrankungen der Männer um Lungenkrebs. Bei Betrachtung der Frauen verbirgt sich hinter 7 % aller bösartigen Neubildungen Lungenkrebs. Noch höher fällt der Anteil des Lungenkrebses an allen Krebssterbefällen mit einem Anteil von 26 % bei Männern und 12 % bei Frauen aus. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 69 Jahren (Robert Koch Institut, 2010).

Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs ist der Tabakrauch. Aus einem deutlich gestiegenen Konsum erklärt sich auch die massive Zunahme der Inzidenz des Bronchialkarzinoms. So sind bei Männern vermutlich neun von zehn und bei Frauen zirka sechs von zehn Lungenkrebserkrankungen auf das aktive Rauchen zurückzuführen (Robert Koch Institut, 2010). Berufsbedingte Karzinogene wie Asbest, Arsen, Chromate oder Radon werden nur für 5-8 % der Lungenkrebsfälle verantwortlich gemacht. Nur zirka 2 % haben noch weitere Ursachen wie Röntgenstrah-

lung, Ernährung oder genetische Faktoren (Rösler et al., 1993). Zudem sind Onkogene bekannt, die bei der malignen Transformation von Zellen eine Rolle spielen und so die Entstehung des Bronchialkarzinoms begünstigen können. Diese sind *erbB1*, *erbB2* und *HER2/neu*, welche membranständige Proteine kodieren und *myc*, *fos* und *jun*, die nukleare Proteine kodieren. Tumorsuppressorgene, die zur Entstehung beitragen, sind *p53* und *Rb* (Wiethege et al., 1994).

Die Einteilung der Bronchialkarzinome erfolgt nach histopathologischen Gesichtspunkten nach der World Health Organisation (WHO, 1999) in nichtkleinzellige (75 %, NSCLC) und kleinzellige (25 %, SCLC) Karzinome. Die Gruppe der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome erfährt eine weitere Aufgliederung in Plattenepithelkarzinome (ca. 40 %), Adenokarzinome (ca. 25 %) und großzellige Bronchialkarzinome (ca. 10 %). Zudem erfolgt eine weitere Einteilung nach Tumorstadium, Lymphknotenbefall und Metastasierung im selben oder in anderen Organen. Diese TNM-Klassifikation (s. Tab. 1) bildet zudem die Grundlage zur Einschätzung der ohnehin ungünstigen Prognose. Im Stadium IA liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 50 %. Während sie im Stadium IIIA auf nur noch 19 % gesunken ist, markiert sie im Stadium IV mit 2 % eine wahrlich schlechte Prognose. Dieses ist vor allem darin begründet, da sich zum Zeitpunkt der Diagnose der Lungenkrebs bereits in einem fortgeschrittenen, meist nicht mehr operablen, Stadium befindet.

Neben der Operation stehen für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom noch Bestrahlung und Chemotherapie als Therapieoptionen zur Verfügung. In den Stadien I bis IIIA ist die Operation bei funktionell operablen Patienten die Therapie der Wahl und verfolgt ein kuratives Therapieziel. Ist eine chirurgische Entfernung des Tumors nicht möglich, kann in den Stadien I bis III die Strahlentherapie noch einen kurativen Ansatz darstellen (Beckmann, 2006). Bei Inoperabilität in Stadium III und bei Tumoren in Stadium IV dominiert die Chemotherapie als palliative Behandlung, zum Teil ergänzt durch die Radiotherapie. Zudem kommen Maßnahmen im Rahmen des *best supportive care* im Sinne einer verbesserten Lebensqualität ein hoher Stellenwert zu.

Tab. 1: Tumorstadien (nach International Union against Cancer, UICC 7. Ausgabe) und Prognose in Abhängigkeit des Tumorstadiums des Bronchialkarzinoms

Tumorstadium (UICC)	Primärtumor	Regionäre Lymphknoten	Fernmetastasen	5-Jahres-Überlebensrate (klinisches Stadium)
Okkultes Karzinom	Tx	No	Mo	
Stadium o	Tis	No	Mo	
Stadium IA	T1a, T1b	No	Mo	50 %
Stadium IB	T2a	No	Mo	43 %
Stadium IIA	T1a, T1b	N1	Mo	36 %
	T2a	N1		
	T2b	No		
Stadium IIB	T2b	N1	Mo	25 %
	T3	No		
Stadium IIIA	T1, T2	N2	Mo	19 %
	T3	N1-2		
	T4	No-1		
Stadium IIIB	T4	N2	Mo	7 %
	Jedes T	N3		
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1	2 %

1.2 Chemotherapie beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

Im Rahmen der Chemotherapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms unterscheidet man prinzipiell zwischen drei Modalitäten, der neoadjuvanten, adjuvanten und der palliativen Chemotherapie. Aufgrund der zumeist erst späten Diagnose des Lungenkrebses wird der palliativen Chemotherapie ein hoher Stellenwert beigemessen, da es sich bei über 75 % der Patienten bereits um eine metastasierte Erkrankung handelt (Evans, 2005). Für die Durchführung einer Chemotherapie sprechen ein

verlängertes Überleben, eine Reduzierung der krebsassoziierten Symptome und eine Verbesserung der Lebensqualität im Vergleich zu alleinigen Maßnahmen im Rahmen des *best supportive care* (Socinski et al., 2007).

In den letzten Jahren hat sich sowohl für die neoadjuvante (chemotherapeutische Reduktion der Tumormasse gefolgt von einer Operation und postoperativer Chemotherapie) als auch für die adjuvante (postoperativ stattfindende Chemotherapie) Therapie eine Kombinationstherapie aus einem platinhaltigen Chemotherapeutikum und einem neueren Zytostatikum wie bspw. Gemcitabin, Etoposid, Paclitaxel oder 5-Fluorouracil, etabliert (S. Sörenson et al., 2001). Im europäischen Raum hat sich als Vertreter der platinhaltigen Medikamente Cisplatin gegenüber dem Carboplatin durchgesetzt. In verschiedenen Meta-Analysen hat sich ein Nebenwirkungsprofil des Cisplatin mit Schwindel, Übelkeit und renaler Toxizität im Gegensatz zu Carboplatin mit einer Erhöhung der Thrombozytopenie gezeigt (Hotta et al., 2004). Im Rahmen verschiedener Phase-III-Studien von Socinski (2002), Smith (2001), von Plessen (2006) und Park (2007) bezüglich der Dauer einer Chemotherapie beim NSCLC ist kumulativ festgestellt worden, dass eine kürzere Therapie, drei bis vier Zyklen, einen gleichen Effekt auf das Gesamtüberleben hat wie längere Zyklen, bei geringeren Nebenwirkungsraten und einer besseren Lebensqualität. Lange Zeit war eine Kombinationschemotherapie des NSCLC als optimale Therapie betrachtet worden (Breathnach et al., 2001). Sandler und seine Kollegen (2006) zeigten in einer Phase-III-Studie die günstigen Einflüsse des Angiogenesehemmers Bevacizumab in Kombination zur Chemotherapie mit Cisplatin und Paclitaxel. So konnten eine höhere Ansprechrate der Therapie, eine Verlängerung der Remission sowie ein verlängertes Gesamtüberleben dokumentiert werden. Die Ergebnisse dieser Studie bewegten die *United State Food and Drug Administration (FDA)*, den Antikörper Bevacizumab zur Therapie des NSCLC im Jahr 2006 zuzulassen. Allerdings ausschließlich für Patienten ohne nachweislichen squamösen Tumor, da sich mit dieser Histologie die Nebenwirkungsrate, im Besonderen das Auftreten von Blutungen, häuften (Sandler et al., 2006). Es existieren weitere sogenannte *targeted agents* in der Therapie des NSCLC. Priker und Kollegen (2009) konnten in ihrer Phase-III-Studie *FLEX* zeigen, dass die Kombination von Cisplatin und Vinorelbin mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab zu einem signifikant längeren Gesamtüberleben führt als die Kombinationschemotherapie Cisplatin/Vinorelbin allein (im Mittel

11,3 Monate gegenüber 10,1). In einer weiteren Phase-III-Studie von Lynch und Kollegen im darauffolgenden Jahr konnte die Kombination von Carboplatin, Paclitaxel und Cetuximab keine Überlebensvorteile zeigen. Die AVAIL-Studie von Manegold und Kollegen aus dem Jahr 2008 zeigte keine signifikante Änderung des Gesamtüberlebens von 1047 Patienten, welche zum einen aus einer Kombination von Cisplatin und Gemcitabin und zum anderen zusätzlich mit verschiedenen Dosen von Bevacizumab behandelt wurden. So bleibt der tatsächliche Gewinn der Antikörper für die Therapie des NSCLC zunächst fraglich. Sicherlich besteht hier noch weiterer Forschungsbedarf.

1.3 Chemotherapieinduzierte Resistenz und Inflammation

Die aktuellen Chemotherapieregime des NSCLC weisen eine Ansprechrage, definiert als Reduktion der Tumorgröße um 50 %, von nur 30 % auf (Evans, 2005). Wie bereits aus Untersuchungen zu anderen Tumorentitäten bekannt, gibt es zahlreiche Mechanismen einer Tumorzelle sich dem tödlichen Einfluss des Therapeutikums zu entziehen. In einer Studie von D'Amato und Kollegen konnte 2006 in *in vivo* Kulturen aus Tumorgewebe von 3042 Patienten mit NSCLC eine Resistenz der Tumorzelle für Cisplatin bzw. Carboplatin bei 63 % bzw. 68 % der Patienten gezeigt werden. Ebenfalls dokumentierten sich Resistenzen bei den jeweils genutzten Kombinationspartnern wie Etoposid (63 %), Gemcitabin (72 %) und Paclitaxel (40 %).

Welche Mechanismen zeigen sich nun verantwortlich für die hohe Resistenzentwicklung des NSCLC? Im Sinne einer intrazellulären Entgiftung von Cisplatin kommen hierbei den Metallothioneinen (MT) und den Gluthation-Transferasen (GST) eine Bedeutung zu. So konnte während einer Studie gezeigt werden, dass bei NSCLC-Patienten unter Cisplatin-Therapie die Expression von MTs deutlich erhöht war, im Besonderen bei Patienten mit erhöhter Resistenzentwicklung (Matsumoto et al., 1997). Eine Art angeborene Resistenz gegen Cisplatin konnte im Zusammenhang mit einer Überexpression der π -GST gezeigt werden (Hida et al., 1993). Die apoptotische Wirkung des Cisplatin beruht auf Quervernetzungen der DNS, daher besteht ein weiterer Resistenzmechanismus in der Expression von DNS-Reparationsenzymen aus der Gruppe der Endonukleasen. Es konnte auch gezeigt werden, dass sich der Nachweis von ERCC1 sowohl negativ auf das progressionsfreie Intervall als auch auf

das Gesamtüberleben der Patienten auswirkt (Olaussen et al., 2006). Eine Phase-III-Studie von Vilmar und Kollegen aus dem letzten Jahr verglich zwei cisplatinhaltige Kombinationstherapien miteinander. Zugleich wurde bei über 50 % der Patienten in immunhistochemischen Färbungen der verfügbaren Tumorpräparate der Nachweis für ERCC₁ geführt. Es zeigte sich, dass das Vorhandensein der Endonuklease als prognostischer Faktor für das Ansprechen des Patienten auf die Chemotherapie dienen kann. ERCC₁-positive Patienten haben im Mittel ein verkürztes Gesamtüberleben mit 9,8 Monaten gegenüber 15,2 Monate bei ERCC₁-negativen Patienten. Weitere Untersuchungen wurden zur Untereinheit M₁ (RRM₁), die die Ribonukleotidreduktase reguliert, und zum Brustkrebsgen 1 (BRCA₁) durchgeführt.

Auch für die Substanzklasse der Taxane wie bspw. Paclitaxel gibt es Untersuchungen zur Chemoresistenz. Die zelluläre Zielstruktur der Taxane sind die BETA-Tubuline. Diese sind für die eigentliche Zellstruktur wie auch für den Transport von Vesikeln und Organellen innerhalb der Zelle von essentieller Bedeutung. Ebenfalls erfolgt die mitotische Zellteilung anhand eines dynamischen Microtubulusgerüsts. Taxane hemmen den Abbau gebildeter Gerüste. Dieses führt dann zum mitotischen Arrest und zum apoptotischen Zelltod (Jordan, 2002). So konnte gezeigt werden, dass Strukturveränderungen der Mikrotubuline und deren Messung sogar einen prognostischen Wert im Zusammenhang mit der Vorhersage der Resistenz gegen eine Kombinationschemotherapie mit Taxan und Cisplatin und auch für das progressionsfreie Intervall haben (Sève et al., 2005).

Eine bisher nur ungenügende Studienlage gibt es für Substanzen der Gruppe des Podophyllotoxins wie Etoposid, das das intranukleäre Enzym Topoisomerase I hemmt und damit in die DNS-Replikation eingreift. Man vermutet, dass verschiedene Mechanismen zum Tragen kommen wie zum Beispiel der aktive Wegtransport via P-glykoproteinie (P-gps) oder Multi-Drug-Resistance-Proteine (MDRs) (Sève et al., 2005). Weiterhin wird diskutiert, dass die Tumorzelle in der Lage ist, die Topoisomerase I herunterzuregulieren (Kanzawa et al., 1990) oder Topoisomerase I-Mutationen hervorzubringen (Xu et al. 2002) und so das Angriffsziel des Etoposids zu verdecken.

Eine ähnlich unzureichenden Studienlage besteht für das Nucleosidanalogen Gemcitabin, dessen Wirkung durch Blockierung der DNS-Strangverlängerung besteht. Analog

zu Etoposid konnten Sève und Kollegen (2005) vergleichbare Resistenzmechanismen zeigen. So scheint die Tumorzelle jene Enzyme zu deprimieren, welche die Prodrug Gemcitabin aktivieren. Daher können intrazellulär keine Wirkspiegel erreicht werden. Des Weiteren zeigen sich Variationen des Ribonucleotidreduktase-Enzyms wie auch in der Veränderung der Signalkaskade der Apoptose. Eine Phase-III-Studie konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass erhöhte RRM1-Level mit einem verschlechterten Ansprechen einer Gemcitabin-Kombinationschemotherapie vergesellschaftet sind (Boukovinas et al. 2008).

1.4 Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom und tumorinduzierte Inflammation

Es war Rudolf Virchow, der bereits im Jahr 1863 einen Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktionen und dem Auftreten von Karzinomen bzw. der Tumorprogression herstellte (Blakewill und Mantovani, 2001). Wie sich herausgestellt hat, ist es die chronische Entzündungsreaktion, die, neben kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus, Arthritis, auch begünstigend auf Tumore wirkt (Aggarwal BB, 2004). Der Einfluss der entzündlichen Reaktion erstreckt sich hierbei auf sämtliche Prozesse im Tumor wie auf seine Entstehung, sein Überleben und seine lokale und generalisierte Ausbreitung (Mantovani A., 2005 und Coussens et al., 2002). Bis heute konnten verschiedene Botenstoffe und Signalwege entschlüsselt werden, welche für diese genannten Effekte verantwortlich sind.

Als einem der bekanntesten inflammatorischen Botenstoffe kommt dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF- α) eine besondere Bedeutung zu (Balkwill F., 2002). Zunächst wurde TNF- α als ein Botenstoff interpretiert, der vor allem tumorsuppressiv wirkt. Später konnten jedoch ebenfalls gegenteilige Effekte nachgewiesen werden. Die Sekretion von TNF- α erfolgt nicht nur durch verschiedene inflammatorische Zellen, sondern auch durch Tumorzellen selbst, wie Balkwill 2002 nachweisen konnte. Komori und Kollegen konnten 1993 bereits zeigen, dass TNF- α eine tausendfach stärkere Wirkung als Tumorpromoter besitzt als die sehr potente Okadasäure, dem Substrat eines im Pazifik beheimateten Schwamms. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass, nach Kontakt mit Okadasäure, die Sekretion von TNF- α deutlich gesteigert wird.

So kann angenommen werden, dass TNF- α sich selbst im Sinne eines endogenen Tumorpromoter unterhält. Auch konnte mittlerweile gezeigt werden, dass TNF- α wie ein autokriner Wachstumsfaktor agieren kann und so die Expression von unterschiedlichen Mediatoren, welche für die Tumorphiliferation (5-LOX, COX-2), die Angiogenese (VEGF A) sowie die Invasion bzw. die Metastasierung (Chemo- und Interleukine) verantwortlich sind, in Gang setzen bzw. unterstützen kann (Aggarwal et al., 2006).

Zudem konnte den bekannten proinflammatorischen Interleukinen (IL-1, IL-6, IL-8 und IL-18) eine Rolle in der Kanzerogenese nachgewiesen werden (Saijo et al., 2002). Unter den genannten Interleukinen wurde IL-8 eine besonders intensiv untersucht, da IL-8 bereits in verschiedenen Tumorentitäten im Zusammenhang mit Tumorwachstum und Metastasierung eine wichtige Rolle zugewiesen werden konnte (Luca et al., 1997 und Xu et al., 2000). Zugleich konnte gezeigt werden, dass IL-8 im Zusammenspiel mit dem Proto-Onkogen RAS für die tumorassoziierte Entzündungsreaktion und Neovaskularisation unabdingbar ist (Sparmann A., 2004).

Bei *in vitro* Versuchen mit NSCLC-Zelllinien konnte zudem demonstriert werden, dass auch Cyclooxygenasen (COX-2) sich in der Tumorgense beteiligen. Sie modulieren die Signalwege hin zu mehr Angiogenese (Pold et al., 2004).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Tumorausbreitung sind die Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Physiologisch sind sie während der Wundheilung zum Aufspalten der überschüssigen Extrazellulärmatrix von Bedeutung. Allerdings zeigen sich aber auch erhöhte Aktivitäten bei Inflammation und Kanzerogenese. Als besonders relevante Moleküle dieser Gruppe, die für das Tumorwachstum und deren Ausbreitung verantwortlich sind, wurden MMP-2, MMP-7, MMP-9 und MMP-12 identifiziert (Egebald und Werb, 2002).

Dem Transkriptionsfaktor NF- κ B kommt als zentralem „Schalter“ dieser Signalwege der bisher genannten Mechanismen eine wichtige Rolle zu (Shishodia und Aggarwal, 2004), wodurch NF- κ B sowohl für das Tumorwachstum als auch für die Metastasierung eine wichtige Rolle spielen kann. Bei *in vivo* Experimenten mit Ausschaltung bzw. Inhibierung des NF- κ B Signalweges konnte erkannt werden, dass es zu einer deutlich herabgesetzten Invasivität des Tumors kommt (Lirk et al., 2002). Wie Pikarsky und Kollegen 2004 postulierten, scheint NF- κ B ein wichtiges Bindeglied zwischen chronischer Entzündung und Tumorentstehung bzw. -progression zu sein. Da NF- κ B sowohl

von einer Reihe endogener Stimuli, wie oben beschrieben, aber auch von externen Kanzerogenen und inflammatorischen Stimuli über den I κ B-Kinase-Komplex aktiviert wird. Die daraufhin ausgeschütteten Mediatoren unterstützen bzw. unterhalten die Kanzerogenese.

1.5 Fragestellung

Aufgrund der bereits geschilderten Zusammenhänge stellt sich die zentrale Frage: Was passiert mit der Tumorzelle nach oder während der Chemotherapie, wenn sie nicht den gewünschten Zelltod erleidet? Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Versuche, die bezugnehmend auf folgende Fragestellungen durchgeführt wurden:

- Welchen Einfluss üben die unterschiedlichen Zytostatika (Cisplatin, Etoposid, Gemcitabin, Paclitaxel und 5-Flourouracil) auf humane NSCLC-Zellen (BEN, KNS62 und KNS62 Bcl-xL) aus?
- Kann Chemotherapie die biologische Aktivität der humanen NSCLC-Zelllinien im Hinblick auf proinflammatorische und proinvasive Effekte beeinflussen?
- Finden sich solche Effekte auch im orthotopen Tiermodell bzw. in humanen Tumorproben?
- Ergibt sich eine biologische Relevanz hinsichtlich ihrer Therapieresistenz?
- Eignen sich chemotherapieinduzierte proinflammatorische Proteine als prognostische Marker bzgl. der Überlebenszeit bei Patienten mit einem NSCLC?

2 Material und Methoden

Im folgenden Teil werden die Methoden, die dieser Arbeit zugrunde liegen, beschrieben. Zunächst folgen Erläuterungen zum Umgang mit der Zellkultur, dem Kristallviolett-Vitalitätsassay, dem Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA), der Propidiumiodid-Durchflusszytometrie und der Polymerasekettenreaktion (PCR). Schließlich folgt ein letzter Abschnitt zum tierexperimentellen Arbeiten. Die verwendeten Materialien, Chemikalien und Geräte befinden sich in tabellarischer Form im Anhang.

2.1 Material, Geräte und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad „zur Analyse“. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt bezogen und entsprachen ebenfalls dem Reinheitsgrad „zur Analyse“. Allgemeine molekularbiologische Methoden wurden Standardprotokollen entnommen oder dem jeweiligen Protokoll des Herstellers. Eine Auflistung aller verwendeten Chemikalien findet sich im Anhang.

2.2 Zellkultur

Die Zelllinien BEN (humanes Lungenkarzinom) und KNS62-Wildtyp (squamoses humanes Lungenkarzinom, im Folgenden KNS62 wt) und Zellen des Zellpools KNS62 Bcl-xL, welche stabil mit Bcl-xL gentranfiziert wurden (Kurdow et al., 2005), wurden in RPMI Medium plus 10 % FCS, 2 mM Glutamin und 1 mM Na-Pyruvat in T75 oder T175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium retroviral transduzierter Zellen (KNS62 Bcl-xL) enthielt zusätzlich 5 µg/ml Puromycin. Die Kultivierung erfolgte in einem 37 °C Brutschrank, in welchem eine mit Wasserdampf gesättigte und mit 5 % CO₂ angereicherte Atmosphäre herrschte. Die Zellen wuchsen adhärent als Monolayer und wurden zweimal wöchentlich mit Trypsin-EDTA gelöst und im Verhältnis 1:5 passagiert.

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Kontamination durch Mycoplasmen mit einem Testkit (Mycoplasma Detektion Kit, Boehringer) getestet.

Die Zellen wurden bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die einzufrierenden Zellen zunächst trypsinisiert und anschließend mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde nun auf Eis in kaltem FCS/10 % DMSO aufgenommen und die Zellsuspension in ein Cryo-Röhrchen gefüllt, das dann in eine auf 4 °C vorgekühlte Einfrierbox Mr. Frosty (gefüllt mit 100 % Isopropylalkohol) gestellt und sofort bei -80 °C gelagert wurde. Nach 12 bis 24 Stunden konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff umgelagert und dort mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Um die so gelagerten Zellen wieder nutzen zu können, wurden sie so schnell wie möglich aus dem Stickstoff aufgetaut, indem das Cryo-Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt wurde, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Dann wurden die Zellen in ein 15 ml-Röhrchen mit 10 ml kaltem RPMI-Nährmedium und einem Zusatz von 10 % FCS überführt und 5 Minuten bei 1420 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 10 ml RPMI mit 10 % FCS aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt, in der die Zellen 24 Stunden anwuchsen.

2.3 Kristallviolett-Vitalitätsanalysen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vitalitätsanalysen erfolgten nach der Kristallviolett-Methode, basierend auf der photometrischen Messung des Triphenylmethanfarbstoffs Kristallviolett, der sich an die DNS der Zellen anlagert (Gillies et al., 1986). Nach Behandlung der Zellen (1×10^4 Zellen gesät in 96-well-Platten) mit Chemotherapie wurde das Medium entfernt und dann jedes well mit 50 μl Kristallviolett-Lösung versetzt. Bei Raumtemperatur wurde die 96-well-Platte für 15 bis 30 Minuten auf den Plattenschüttler gestellt. Nach Ablauf der Wartezeit musste jedes well mit Aqua dest. solange gespült werden, bis die Spüllösung klar war. Anschließend wurde die Platte bei Raumtemperatur über Nacht bzw. in einem 37 °C Brutschrank innerhalb von zwei Stunden getrocknet. Nach Trocknung wurden auf jedes well 200 μl Methanol gegeben und zugedeckt bei Raumtemperatur solange auf den Plattenschüttler gestellt, bis sich der Farbstoff aus den Zellen gelöst hatte. Anschließend

erfolgte die photometrische Messung bei 590 nm zur Angabe und Darstellung von prozentualen Unterschieden der Vitalität.

2.4 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung des chemotherapieinduzierten Zellzyklusarrests wurde eine Durchflusszytometrie (auch als Fluorescence-activated cell sorting bezeichnet) mit dem DNS-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid durchgeführt. Diese Methode identifiziert Zellen der G₂/M-Phase anhand ihrer höheren Fluoreszenz im Vergleich zu Zellen der G₁-Phase. Zellen deren Fluoreszenz geringer ist als die der Zellen der G₁-Phase, werden als sub-G₁-Zellen bezeichnet. Sub-G₁-Zellen repräsentieren apoptotische Zellen, die aufgrund apoptosebedingter DNS-Fragmentierung nach Färbung mit Propidiumiodid nur geringe Fluoreszenz zeigen.

Die Zellen wurden in 6-well-Platten zu je 1×10^5 Zellen pro well gesät. Nach 24-stündiger Adhäsionsphase erfolgte die Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Chemotherapeutika, ein well pro Platte blieb ohne Chemotherapie im Sinne einer Kontrollpopulation. Die Inkubation über 48 Stunden erfolgte bei 37 °C. Anschließend wurden die Überstände der einzelnen wells in Tubes gesammelt und zentrifugiert, damit die sich bereits gelösten Zelle nicht verloren gehen. Die 6-well-Platten wurden auf Eis mit PBS/5 mM EDTA gespült und die Überstände zum Zentrifugat gegeben. Restliche, adhärenente Zellen wurden durch 30-minütige Inkubation in PBS/5 mM EDTA bei 37 °C abgelöst und ebenfalls zu dem Zentrifugat gegeben. Es erfolgte nach erneuter Zentrifugation und Waschen mit PBS/5 mM EDTA, das Resuspendieren in 1 ml PBS/5 mM EDTA. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Ethanol und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in 0,5 ml PBS/5 mM EDTA resuspendiert und unter Zugabe von je 20 µl RNAase A (Boehringer, Mannheim) für erneute 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation folgte das Resuspendieren mit 0,5 ml PBS/5 mM EDTA/0,5 µg/ml Propidiumiodid (Sigma, Deisenhofen) sowie die anschließende Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln bei 4 °C. Abschließend erfolgte die Analyse im FacsScan (Becton Dickinson, Heidelberg) unter Verwendung des Kanals FL2 (rot).

2.5 Multiplex-Bead-Array-Proteindurchflussanalysen

Mithilfe von Multiplex-Bead-Array-Proteindurchflussanalysen ist die quantitative Bestimmung von löslichen Proteinen möglich. Hierbei enthalten die Versuchslösungen bestimmte *capture beads* (kleine „Perlen“ mit bekannter Größe und Fluoreszenz), welche wiederum mit einem bestimmten Antikörper konjugiert sind. Wenn nun in einer unbekannt Probe die *capture beads* und das *detector reagent* für sie spezifische Analyte finden, entsteht ein Sandwichkomplex (Perle (*capture bead*) + Analyt (z.B. IL-8) + *detection reagent*), ähnlich dem ELISA. Mittels Durchflusszytometrie kann nun die Fluoreszenz des *capture beads* und des Detektors zur Quantifizierung des Proteins benutzt werden. Im Vergleich zum ELISA bietet diese Methode den Vorteil, dass mehrere verschiedene Proteine in einer Probe bestimmt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden IL-6, IL-8, IL-1beta, IL-10, TNF- α , IL-12, IL-4, VEGF A, MIP-1a, MIP-1b, Angiogenin, basic FGF und FAS Ligand quantifiziert.

Zur Durchführung dieses Assays erfolgte zunächst die Anzucht und Behandlung der Zellen, wie unter 2.4 beschrieben. Dann wurde der Assay nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und die Messung erfolgte im FacsScan (Becton Dickinson, Heidelberg).

2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Zur Untersuchung der Quantität verschiedenster Zytokine dient der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Das Prinzip dieses Assays beruht auf der spezifischen Antigenbindung eines Antikörpers und der nachfolgenden Bindung eines zweiten Antikörpers an den ersten. Bei den für diese Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen handelt es sich um Zytokine wie IL-8 oder TNF- α . Nach erfolgreicher Bindung von Primär- und Sekundär-Antikörper kommt es zur enzymatischen Umsetzung eines Farbstoffs, dessen Quantität fotometrisch bestimmt wird. Um genaue Aussagen über die Menge des enthaltenden Antigens machen zu können, wird stets ein Standard mit bekannter Menge mitgemessen.

Zu Beginn dieses Assays wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte mit dem spezifischen Coating-Antikörper bestückt. Hierzu wurde eine Lösung aus PBS und dem Antikörper

im Verhältnis 1:180 hergestellt. Pro *well* wurden 100 µl pipettiert. Die abgeklebte Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der überflüssige Antikörper mittels Waschpuffer entfernt. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer wurden je 200 µl Blockingpuffer pro *well* aufgetragen, dieser dient zur Absättigung freier Bindungsstellen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde, mit je 200 µl Waschpuffer pro *well*, dreimal gewaschen. Danach erfolgte das Auftragen der Zellkulturüberstände. Teilweise wurden diese mit Reagenz diluent verdünnt, pro *well* 100 µl. Zudem wurde stets nach Angaben des Herstellers eine Standardreihe angefertigt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde mit je 200 µl Waschpuffer pro *well* dreimal gewaschen. Im folgenden Arbeitsschritt erfolgte das Auftragen des Detection-Antikörpers, welcher das Bindeglied zwischen Antigen und Farbstoffreaktion ist. Hierzu wurde eine Lösung aus Reagenz diluent und dem Antikörper im Verhältnis 1:180 hergestellt und pro *well* wurden 100 µl pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde mit je 200 µl Waschpuffer pro *well* dreimal gewaschen. Nun folgte das Auftragen der Horse Raddish Peroxidase (HRP) in Form einer Lösung aus Reagenz diluent und Streptavidin-HRP im Verhältnis 1:200. Es wurden 100 µl pro *well* pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt wurde mit je 200 µl Waschpuffer pro *well* dreimal gewaschen. Es folgte das Auftragen von 100 µl des Substrates pro *well*. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt wurden weitere Reaktionen mit 50 µl pro *well* einer Stopsolution unterbunden. Abschließend erfolgte die fotometrische Messung im Tecan Sunrise ELISA-Reader bei 450 nm.

2.7 Invasionsanalysen

Zur Untersuchung der Invasivität der Tumorzellen wurde ein Invasionsassay durchgeführt. Hierbei werden die chemotherapierten Zellen auf einen Monolayer aus Fibroblasten (NIH 3T3) gesät, der das eigentliche tumorumgebende Stromagewebe simuliert. Invasiv wachsende Zellen sind in der Lage, Fibroblasten von der Kulturplatte abzulösen und sich darauf weiter auszubreiten sowie zu proliferieren. Durch Zugabe

von Trypanblau können die toten und fixierten Fibroblasten angefärbt werden. Dabei zeigt sich ein blauer Monolayer. Bei nun invasivem Wachstum bilden sich helle Areale auf der Kulturplatte. Diese zeigen ein Eindringen der Bronchialkarzinomzellen an.

Die Fibroblasten wurden in 1 ml Medium zu $1,5 \times 10^5$ Zellen pro *well* auf eine 24-*well*-Platte ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 250 µl DMSO pro *well* für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach zweimalig mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Die zu untersuchenden invasiv wachsenden Zellen wurden daraufhin zu 1×10^5 Zellen in 500 µl Medium darüber gesät. Dabei wurden immer drei *wells* mit einer der entsprechenden Konzentrationen Chemotherapie (*Kontrolle*, *Cisplatin* 0,1 µg/ml, *Etoposid* 1 µg/ml, *Gemcitabin* 0,01 µg/ml, *Paclitaxel* 0,01 µg/ml, *5-Fu* 0,1 µg/ml) für 48 bzw. 96 Stunden inkubiert. Nach Absaugen des Nährmediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 500 µl Trypanblau (1:2 mit PBS verdünnt) pro *well* inkubiert. Danach wurde das Trypanblau abgesaugt und die *wells* dreimal mit PBS gewaschen. Abschließend erfolgte die fotografische Dokumentation unter einem Mikroskop.

2.8 Orthotopes Tiermodell

Entsprechend dem etablierten Tierversuchsmodell von K. Heintz von 2007 wurden weibliche SCID-bg (C:B-17/IcrHsd-Prkdcscid Lystbg) Mäuse zwischen 14 und 19 g von Harlan Winkelmann, Borcheln bezogen und eine Woche in einer sterilen Umgebung an die vorherrschenden Laborbedingungen gewöhnt. Sämtliche Futtermittel, das Wasser sowie das im Käfig ausgestreute Sägemehl wurden vor der Verwendung sterilisiert. Futter und Wasser wurden ad libitum gegeben.

Die Inokulation der Tumorzellen erfolgte unter Anästhesie der Mäuse mit einer intra-peritonealen Injektion einer Lösung aus Midazolam 5,0 mg/kg, Fentanyl 0,05 mg/kg und Medetomidin 5,0 mg/kg. Nach lateraler Thorakotomie rechts wurde die Lunge vorsichtig dargestellt. Anschließend wurden 30 µl einer auf 4 °C gekühlten Suspension von 1×10^6 Tumorzellen in Matrigel in das Lungengewebe inokuliert. Zur Vermeidung von Abtropfmetastasen wurden die Inokulationskanülen erst nach Aushärten des Matrigels bei Körpertemperatur aus der Lunge retrahiert. Die Thoraxwand und die

Haut wurden mit einer fortlaufenden absorbierbaren 6-0 Naht verschlossen. Jedes Tier erhielt einen Ohrlochcode als Identifizierungsmarkierung. Danach wurde die Anästhesie durch die intraperitoneale Injektion von Flumazenil 0,5 mg/kg, Naloxon 1,2 mg/kg und Atipamezol 2,5 mg/kg antagonisiert. Alle Mäuse wurden täglich im Hinblick auf mögliche Komplikationen inspiziert. Nachdem sich die orthotopen BEN und KNS62 Tumore gebildet hatten (sieben Tage nach Tumorzellinjektion), wurden die Mäuse in vier Gruppen eingeteilt. Die Behandlung erfolgte mit 50 mg/kg Körpergewicht Gemcitabin intraperitoneal zweimal wöchentlich für 28 Tage, 300 mg/kg Phenylbutyrat über subkutane Infusion mittels Alzet osmotischen Minipumpen oder mit der Kombinationstherapie. Nach zwei Wochen wurden die Minipumpen ausgetauscht. In der Kontrollgruppe wurde anstelle von Chemotherapie NaCl gemäß des Gemcitabin-Schemas i. p. verabreicht. Nach 35 Tagen wurden die Tiere durch CO₂ getötet und die Tumoren wurden reseziert. Die Tumorgöße und das Tumorumfangen wurden berechnet ($V = \text{Länge} \times \text{Höhe} \times \text{Breite} \times 0,5236$). Die resezierten Tumoren wurden zweigeteilt und für weitere Untersuchungen sowohl kryoasserviert als auch formalinfixiert.

2.9 Humane Tumorproben

Die humanen Gewebe stammen in ihrer Gesamtheit aus einer Gewebebank der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Es handelt sich hierbei um auf Stickstoff kryoasservierte Proben von Patienten mit einem NSCLC im Stadium IIIA. 23 Proben stammen von Patienten, die vor Entnahme neoadjuvant, d. h. mit drei Zyklen einer Kombinationstherapie aus Cisplatin und Paclitaxel, behandelt worden sind. 15 Proben sind von Patienten mit Tumoren im gleichen Stadium, allerdings ohne neoadjuvantes Therapiekonzept. Es handelt sich daher um native Tumore.

Die Aufarbeitung der Gewebe zur Analyse erfolgte, wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben.

2.10 Quantitative Echtzeit-PCR Analysen

Im folgenden Abschnitt werden alle durchgeführten Arbeitsschritte und Verfahren beschrieben, die nötig waren, um eine quantitative Echtzeit-PCR Analyse (qRT-PCR) durchzuführen. Dazu wurde zuerst Zellmaterial aus Tumoren gewonnen (s. Erläuterungen unter 2.10.1). Hieraus erfolgte die Isolierung von RNS und DNS. Im nächsten Schritt erfolgte die Herstellung von cDNS aus der gewonnenen RNS, die wiederum für die eigentliche Analyse (s. Erläuterungen unter 2.10.3) benutzt wurde.

2.10.1 Aufarbeitung von Gewebeproben

Die Aufarbeitung der Gewebeproben, sowohl für die Gewebe der Tierexperimente als auch für die Gewebe der humanen Tumorproben Gültigkeit, erfolgte nach folgendem Schema:

Die bei -80°C gelagerten Tumorgewebe wurden ausgewählt, dass jeweils fünf Tumorproben von chemotherapierten Tieren und fünf Proben von Tieren der Kontrollgruppe untersucht werden konnten (s. Erläuterungen zum Tiermodell unter 2.8). Auf der -20°C kalten Arbeitsfläche des Kryotoms erfolgte die manuelle Probengewinnung von ca. je 30 mg mit dem Skalpell. Die Gewebeproben wurden sofort in die vorbereiteten Lysing-Martix-A-Röhrchen verbracht und auf Eis gekühlt (s. Erläuterungen unter 2.10.2). Die Lysing-Matrix-A-Röhrchen dienen mit ihren enthaltenen Eisenspänen und der Keramikugel in Verbindung mit der *Shredder*-Zentrifuge zum mechanischen Zerkleinern der Gewebeproben. Das restliche Tumorgewebe wurde wieder eingefroren.

2.10.2 Isolation der RNS und DNS

Die Isolation der DNS und RNS erfolgte mit Hilfe des AllPrep DNA/RNA Mini Kits der Firma Quiagen.

Begonnen wurde mit der Herstellung des RLT-Puffer-Plus unter einem Abzug, welcher der Stabilisierung der in der Tumorprobe enthaltenen RNS dient. Hierzu wurden 1 ml RLT-Puffer aus dem Kit mit $10\ \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol gemischt und dann $600\ \mu\text{l}$ dieser Lösung in ein Lysing-Martix-A-Röhrchen pipettiert. Diese Röhrchen wurden mit den Proben bestückt und auf Eis gelagert (s. Erläuterungen unter

2.10.1). Es folgte die zweimalige 30-sekündige Zentrifugation in einer speziellen *Shredder*-Zentrifuge, die die Zerkleinerung des Gewebes auf mechanische Art und Weise durchführt. Im nächsten Schritt erfolgte eine erneute Zentrifugation in einer herkömmlichen Zentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zum Setzen der Eisenspäne der Lysing-Matrix-A-Röhrchen. Der so entstandene Überstand wurde auf eine AllPrep DNA Spin column pipettiert und für 30 Sekunden bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) zentrifugiert. Da aus den Lysing-Matrix-A-Röhrchen mehr Volumen gewonnen wurde, als auf eine Säule passt, musste die letzte Zentrifugation mehrmals wiederholt werden. Nach diesem Schritt befand sich nun die DNS der lysierten Proben in dem Filter der Säule und die RNS der Proben im Durchfluss in einem 2 ml-Tube. Zunächst wurde die Aufreinigung der RNS begonnen, wobei die Säulen mit der DNS bei Raumtemperatur zwischengelagert wurden. Im ersten Schritt der RNS-Aufreinigung wurde die Probe mit 600 μ l 70-prozentigem Ethanol vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt und anschließend auf eine RNeasy spin column gebracht und 15 Sekunden bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) zentrifugiert. Der sich nun im Filter der Säule befindlichen RNS wurden 350 μ l RW₁-Puffer zugegeben. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) für 15 Sekunden, um die Membran zu reinigen. Zur Vorbeugung möglicher DNS-Verunreinigungen der Proben wurde nun eine Lösung aus 70 μ l RDD-Puffer und 10 μ l DNase I direkt auf die RNeasy spin column gegeben. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden 350 μ l RW₁-Puffer auf die Säule pipettiert und bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) für 15 Sekunden zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 500 μ l RPE-Puffer zur RNeasy spin column sowie die anschließende Zentrifugation bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) für 15 Sekunden. Zur Reinigung der Säulenmembran wurde dieser Schritt insgesamt zweimal durchgeführt. Anschließend wurde sie in der Zentrifuge innerhalb von zwei Minuten getrocknet. Die aufgereinigte RNS wurde mittels 50 μ l RNase-free water bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) aus der Membran der Säule in ein steriles Eppendorf-Tube zentrifugiert. Um den Gewinn an RNS zu erhöhen, wurden die 50 μ l RNase-free water erneut bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) über die Säule zentrifugiert und in einem sterilen Eppendorf-Tube bei -80 °C gelagert.

Die zwischengelagerten AllPrep DNA Spin columns wurden nun mit 500 μ l AW₁-Puffer bestückt und bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) für 15 Sekunden zentrifugiert. Im

nächsten Schritt wurden 500 µl AW₂-Puffer auf die Säule geben und bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) für 2 Minuten zentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugation, welche zum Trocknen der Membran diente, wurden 100 µl EB-Puffer direkt auf die Membran gegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert, dann bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) für 1 Minute zentrifugiert. Damit war die DNS aus der Membran gelöst und wurde bei -20 °C im Kühlschrank gelagert.

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nicht explizit erwähnt wurde in den obigen Beschreibungen, dass nach jedem Schritt, welcher zum Waschen oder Trocknen diente, nach dem Zentrifugieren der Durchfluss entsorgt wurde.

2.10.3 Quantitative Echtzeit-PCR-Analyse

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine sensitive Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die unterschiedliche Zytokine kodieren. Damit dient sie zu deren Nachweis bzw. lässt Rückschlüsse über die Höhe der Expression einzelner Zytokine in einer Probe zu. Zur Durchführung (s. Durchführung unter 2.10.3.2) einer solchen Echtzeit-PCR wird die aus den Proben gewonnene und aufbereitete RNS in komplementäre DNS (cDNS) mittels reverser Transkription umgeschrieben (s. Durchführung 2.10.3.1) und dient dann in der Echtzeit-PCR als Ausgangsstrang für die einzelnen jeweils genspezifischen und fluoreszenzmarkierten Primer (s. Tab. 3 unter 2.10.3.2). Während eines Echtzeit-PCR-Zyklus erfolgt die Messung der Fluoreszenz. Diese nimmt mit steigender Anzahl der entstandenen PCR-Produkte proportional zu. Am Ende eines Echtzeit-PCR-Laufes, bestehend aus mehreren Echtzeit-PCR-Zyklen, wird zur Quantifizierung der PCR-Produkte und damit der ursprünglich enthaltenen Nukleinsäuren eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Während dieser erfolgt das Schmelzen der eben entstandenen PCR-Produkte, wobei die jeweiligen Produkte spezifische Schmelzpunkte haben, sodass zum Beispiel reine Primerdimere als mögliche Fehlhybridisierungen herausgefiltert werden können. Aus den Schmelzkurven lassen sich für die jeweiligen Zytokine sogenannte *Crossing Points* bzw. *Cycle Thresholds* (Ct-Werte) bestimmen. Diese markieren im Rahmen eines PCR-Laufes denjenigen PCR-Zyklus, in welchem die Fluoreszenz erstmalig signifikant gegenüber der Hintergrundfluoreszenz ist. Daraus ergibt sich: Je niedriger dieser Ct-Wert ist, desto höher muss die Ausgangskonzentration an den zu bestimmenden Nukleinsäuren

in der Probe sein. Über die Bestimmung des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes lassen sich dann Aussagen über die x -fache Expression des gesuchten Zytokins in der Probe respektive der Tumore machen. Die Bestimmung des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes beruht auf der Bildung eines Verhältnisses zwischen einem sogenannten *Housekeeping Gens* und dem zu untersuchenden Gen. Das *Housekeeping Gens* zeichnet sich durch ein Vorkommen in vielen verschiedenen Geweben mit einer konstitutiven und gleichmäßigen Expression aus. Für diese Arbeit kam das Gen für die Porphobilinogendeaminase (PBGD) zum Einsatz.

Die Bestimmung des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes erfolgt in mehreren Schritten. Zuerst wird der ΔC_t -Wert ermittelt, indem vom C_t -Wert des zu untersuchenden Gens (IL-8, uPA, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12, TNF- α , TACE und VEGF A) der C_t -Wert des *Housekeeping Gens* (PBDG) subtrahiert wird.

$$\Delta C_t = C_t^{\text{gene of interest}} - C_t^{\text{housekeeping gene}}$$

In einem zweiten Schritt erfolgt die Gruppenbildung durch Subtraktion der ΔC_t -Werte des unbehandelten Kollektives von den ΔC_t -Werten des behandelten Kollektivs.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t^{\text{behandeltes Kollektiv}} - \Delta C_t^{\text{unbehandeltes Kollektiv}}$$

Die relative Expression ergibt sich dann durch einsetzen der $\Delta\Delta C_t$ -Werte in folgende Formel:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.10.3.1 Herstellen von cDNS

Für die cDNS-Synthese wurden je 2 μg der RNS-Proben durch reverse Transkription in cDNS umgeschrieben. Die Proben und die benötigten Reagenzien (5x Puffer, DTT, dNTPs, Random Hexamer, RNase Inhibitor und Superscript) wurden auf Eis aufgetaut. Nun wurde in ein steriles 0,5 ml-Eppendorf-Tube eine Gesamtmenge von 10 μl , bestehend aus der benötigten Menge an RNS und der Differenz zu 10 μl mit sterilem Wasser pipettiert. Ein Tube mit 10 μl reinem Wasser diente zur Kontrolle. Für 10 Minuten wurde die Denaturierung der Proben im PCR-Gerät durchgeführt. Zwischenzeitlich wurde der Superscript-Mix (s. Tab. 2) hergestellt. Zu den denaturierten Proben wurde dann jeweils 10 μl des Superscript-Mix pipettiert und

das Programm zur Herstellung der cDNS aktiviert (10 min bei 24 °C, 1 h bei 42 °C und 3 min bei 94 °C).

Tab. 2: Zusammensetzung des Superscript-Mix

	+ RT [Faktor]
H ₂ O	1,6
5 x Puffer	4
DTT	0,4
dNTPs	1
Random Hexamer	1
RNase Inhibitor	1
Superscript	1

2.10.3.2 Echtzeit-PCR

Die Vorbereitung der Proben zur Messung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers Roche Diagnostics GmbH unter Verwendung des LightCycler Kit FastStart DNA Master SYBR Green I.

Zur Vorbereitung des SYBR Green wurden nach Herstellerangaben die im Kit enthaltenen Tubes 1a und 1b aufgetaut, zentrifugiert und anschließend 10 µl aus 1a in 1b pipettiert. Danach erfolgte die Herstellung des Master-Mix. Hierzu wurde in ein steriles Eppendorf-Tube Aqua ad iniectionem pipettiert (zum Auffüllen bis auf 20 µl), 2,4 µl MgCl₂ (4 mM), 1 µl Primer (0,4 µM - s. Tab. 3) und 2 µl SYBR Green. Die tatsächlichen Mengenangaben hingen von der Anzahl der zu untersuchenden Proben ab. In einer speziellen Kapillare, in welcher auch die Messung erfolgte, wurden 19 µl Master-Mix vorgelegt und dann je 1 µl pro Probe hinzu pipettiert. Danach erfolgte der sterile Verschluss der Kapillaren durch einen Gummistopfen. Nach abschließender kurzer Zentrifugation konnte dann die Messung im LightCycler gestartet werden.

Tab. 3: *Tabellarische Darstellung der verwendeten PCR-Primer jeweils in Sense- und Antisense-Darstellung*

Primer	Sense	Antisense
PBGD	5'-CTT CAC CAT CGG AGC CAT CTG C-3'	5'-CGA AGC CGG GTG TTG AGG TTT-3'
IL-8	5'-AAG AAA CCA CCG GAA GGA ACC-3'	5'-GTG TTG GCG CAG TGT GGT C-3'
uPA	5'-ACA CGC AAG GGG AGA TGA AGT TT-3'	5'-TCG AGG GCA GGC AGA TGG T-3'
MMP-2	5'-TGC TGA AGG ACA CAC TAA AG-3'	5'-CCA AAG TTG ATC ATG ATG TC-3'
MMP-7	5'-GAG ATT TTA TCT CTA TGA CTC AG-3'	5'-CCT TTG ACA CTA ATC GAT C-3'
MMP-9	5'-AAC CAA TCT CAC CGA CAG-3'	5'-AAA GGC GTC GTC AAT CAC-3'
MMP-12	5'-GAC CGG GCA ACT GGA CAC ATC T-3'	5'-AGC TTT CCG GAT TGC GTA GTC AAC-3'
TNF- α	5'-ATC GGC CCC CAG AGG GAA GAG T-3'	5'-CAT TGG CCA GGA GGG CAT TGG-3'
TACE	5'-ACC TGA AGA GCT TGT TCA TCG AG-3'	5'-CCA TGA AGT GTT CCG ATA GAT GTC-3'
VEGF	5'-ATC CAA TCG AGA CCC TGG TG-3'	5'-CAT TCA CAT TTG TTG TGC TGT AGG-3'

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wird bei der Darstellung der Ergebnisse mit den *in vitro* Analysen begonnen. Im Weiteren werden die Ergebnisse der ELISA und Multiplex-Bead-Array-Analysen sowie der Angiogenese- und Invasivitätsuntersuchungen dargestellt. Abschließend erfolgt die aufgegliederte Ergebnisbeschreibung der qRT-PCR-Untersuchungen.

3.1 In vitro Chemoresistenz von NSCLC-Zelllinien

Im ersten Abschnitt werden die Dosiseskalkationskurven zur Zytotoxizität der Chemotherapeutika dargestellt sowie die ermittelten Effektivdosen (ED₂₀ und ED₅₀). Es folgt die Darlegung der Ergebnisse der Propidiumiodid-Durchflusszytometrie.

3.1.1 Kristallviolett

Zur Betrachtung der Zytotoxizität der verwendeten fünf Chemotherapeutika wurden von zwei humanen NSCLC-Zelllinien jeweils Zellkulturansätze über 48 Stunden mit eskalierenden Konzentrationen der Medikamente analysiert. Wie Abbildung 1 zu entnehmen ist, weist die Zelllinie BEN folgende aufsteigende Rangfolge bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber den eingesetzten Chemotherapeutika auf: Gemcitabin (54 % vitale Zellen bei Dosismaximum), Etoposid (35 % vitale Zellen bei Dosismaximum), 5-Fluorouracil (25 % vitale Zellen bei Dosismaximum), Cisplatin (15 % vitale Zellen bei Dosismaximum) und Paclitaxel (8 % vitale Zellen bei Dosismaximum). Bei der Zelllinie KNS62, dargestellt in Abbildung 2, ergibt sich folgende aufsteigende Rangfolge hinsichtlich ihrer Sensitivität bezüglich der verschiedenen eingesetzten Chemotherapeutika: Gemcitabin (52 % vitale Zellen bei Dosismaximum), Cisplatin (51 % vitale Zellen bei Dosismaximum), 5-Fluorouracil (31 % vitale Zellen bei Dosismaximum), Etoposid (16 % vitale Zellen bei Dosismaximum) und Paclitaxel (9 % vitale Zellen bei Dosismaximum).

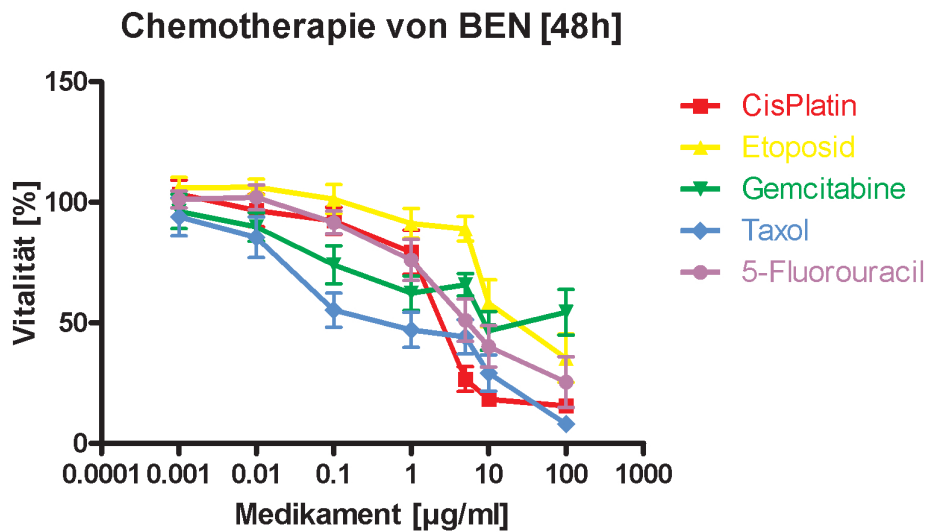


Abb. 1: Kristallviolett-Assay der Zelllinie BEN nach 48 Stunden Chemotherapie. Gezeigt ist die Vitalität der Zellen in Prozent in Abhängigkeit der verwendeten Medikamentendosis in Mikrogramm pro Milliliter und die Standardabweichung ($n=12$).

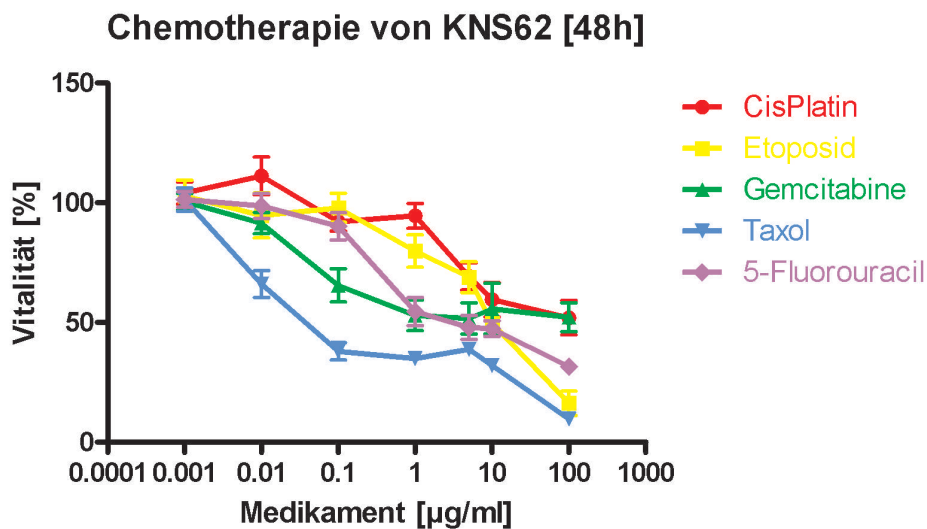


Abb. 2: Kristallviolett-Assay der Zelllinie KNS62 nach 48 Stunden Chemotherapie. Gezeigt ist die Vitalität der Zellen in Prozent in Abhängigkeit der verwendeten Medikamentendosis in Mikrogramm pro Milliliter und die Standardabweichung ($n=12$).

Zusätzlich wurden anhand dieser Ergebnisse die Effektivdosen (ED) 20 und 50 ermittelt, bei denen das Medikament 20 % bzw. 50 % seiner Wirkung entfaltet hat. Alle folgenden Experimente beziehen sich auf diese Effektivdosen (s. Tab. 4 u. 5). Zur leichteren Durchführung der Experimente wurden die tatsächlich verwendeten Medikamentendosen an die ermittelten Dosierungen angenähert (s. Tab. 5).

Tab. 4: Effektivdosen (ED₂₀ und ED₅₀) in µg/ml nach Chemotherapie über 48 Stunden

	BEN		KNS62	
	ED ₂₀	ED ₅₀	ED ₂₀	ED ₅₀
	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]
Cisplatin	0,497	1,989	0,497	1,989
Etoposid	2,495	9,982	2,495	9,982
Gemcitabin	0,023	0,092	0,008	0,035
Paclitaxel	0,022	0,09	0,002	0,009
5-Fluorouracil	0,606	2,426	0,107	0,428

Tab. 5: Angenäherte Effektivdosen (ED₂₀ und ED₅₀) in µg/ml nach Chemotherapie über 48 Stunden

	BEN		KNS62	
	ED ₂₀	ED ₅₀	ED ₂₀	ED ₅₀
	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]
Cisplatin	0,1	1	0,1	1
Etoposid	1	10	1	10
Gemcitabin	0,01	1	0,01	0,1
Paclitaxel	0,01	0,1	0,01	0,1
5-Fluorouracil	0,1	1	0,1	1

3.1.2 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie

Die Analyse des Zellzyklus unter Einwirkung der Chemotherapie zeigt folgende Ergebnisse. Ein besonderes Augenmerk galt den Zellen der sub G₁-Fraktion, da diese den Anteil der Zellen mit der wenigsten intakten DNS aufweist, was in diesem Zusammenhang mit dem apoptotischen Zelltod gleichgesetzt werden kann. Nach 48-stündiger Behandlung der Zelllinie BEN zeigten diese die höchste sub G₁-Fraktion nach Behandlung mit der ED₅₀ von Etoposid und Paclitaxel (39,5 % und 39,3 %). Gleichzeitig konnte ermittelt werden, dass BEN insgesamt die sensibelste Zelllinie der getesteten ist (s. Abb. 3). Bei jedem der getesteten Chemotherapeutika waren mindestens 15 % apoptotisch.

Bei der vergleichenden Analyse des allgemeinen Sensitivitätsniveaus der KNS62-Wildtyp-Zellen mit einem Pool KNS62-Zellen, die stabil mit dem Bcl-xL-Gen transfiziert (KNS62 Bcl-xL) worden waren, zeigte sich ein deutlicher Unterschied (s. Abb. 4 u. 5). Während der Wildtyp eine große apoptotische Zellfraktion bei der Behandlung mit Paclitaxel (ED_{20} : 43,7% und ED_{50} : 47,7%) gemessen werden konnte, fiel diese beim Zellpool Bcl-xL erheblich geringer aus (ED_{20} : 25% und ED_{50} : 21%). Zudem zeigte sich, dass die ED_{20} einen höheren Effekt hatte als die ED_{50} . Bei der Quantifizierung der Zellen in der S-Phase (S-Fraktion: Zellen, die sich in der Synthese-Phase der DNS befinden), ließ sich bei den Wildtyp-Zellen eine deutlich größere S-Fraktion nach Etoposidbehandlung (ED_{50} : 69,4%) messen im Vergleich zum Zellpool KNS62 Bcl-xL (56,4%). Im Zellpool Bcl-xL war die Syntheseaktivität am größten nach der Cisplatinbehandlung (67,1%).

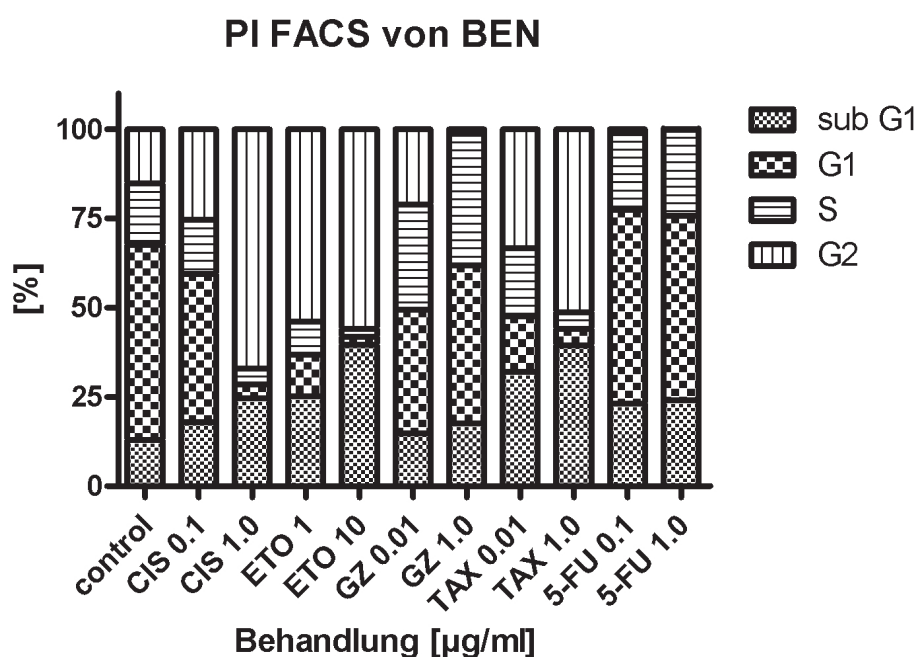


Abb. 3: Propidium-FACS zur Zellzyklusanalyse der Zelllinie BEN nach 48h Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika (control = Kontrolle, CIS = Cisplatin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, TAX = Paclitaxel und 5-FU = 5-Fluorouracil) in den angegebenen Konzentrationen. Gezeigt sind die jeweiligen Zyklusphasen in Teilen von Hundert.

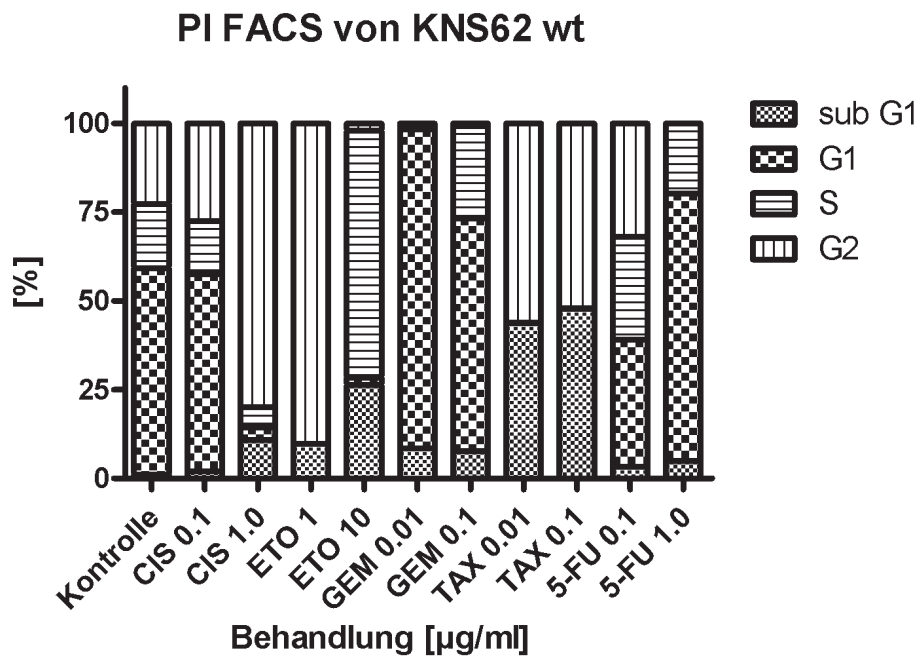


Abb. 4: Propidium-FACS zur Zellzyklusanalyse der Zelllinie KNS62 wt nach 48h Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika (CIS = Cisplatin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, TAX = Paclitaxel und 5-FU = 5-Fluorouracil) in den angegebenen Konzentrationen. Gezeigt sind die jeweiligen Zyklusphasen in Teilen von Hundert.

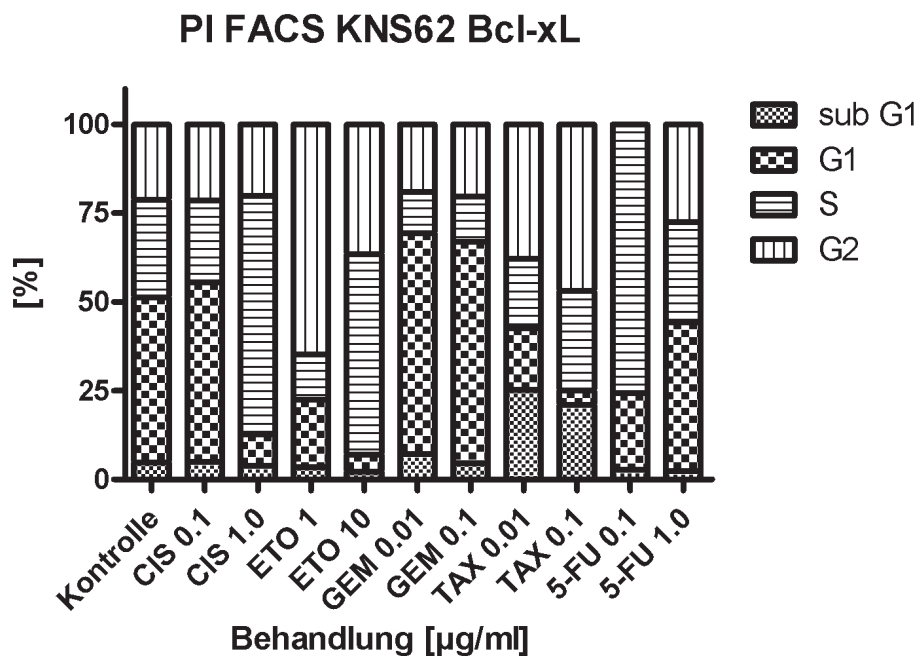


Abb. 5: Propidium-FACS zur Zellzyklusanalyse der Zelllinie KNS62 Bcl-xL nach 48h Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika (CIS = Cisplatin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, TAX = Paclitaxel und 5-FU = 5-Fluorouracil) in den angegebenen Konzentrationen. Gezeigt sind die jeweiligen Zyklusphasen in Teilen von Hundert.

3.2 Multiplex-FACS-(Bead-Array-) Analysen und ELISA

Um ein breites Spektrum verschiedener inflammationsassoziiierter Proteine quantitativ im Überstand der mit Chemotherapie behandelten Tumorzellen nachweisen zu können, wurden Multiplex-FACS-Analysen durchgeführt. Mit dieser Analysetechnik konnten 13 verschiedene Proteine simultan in einem Ansatz zellulären Überstands nachgewiesen werden.

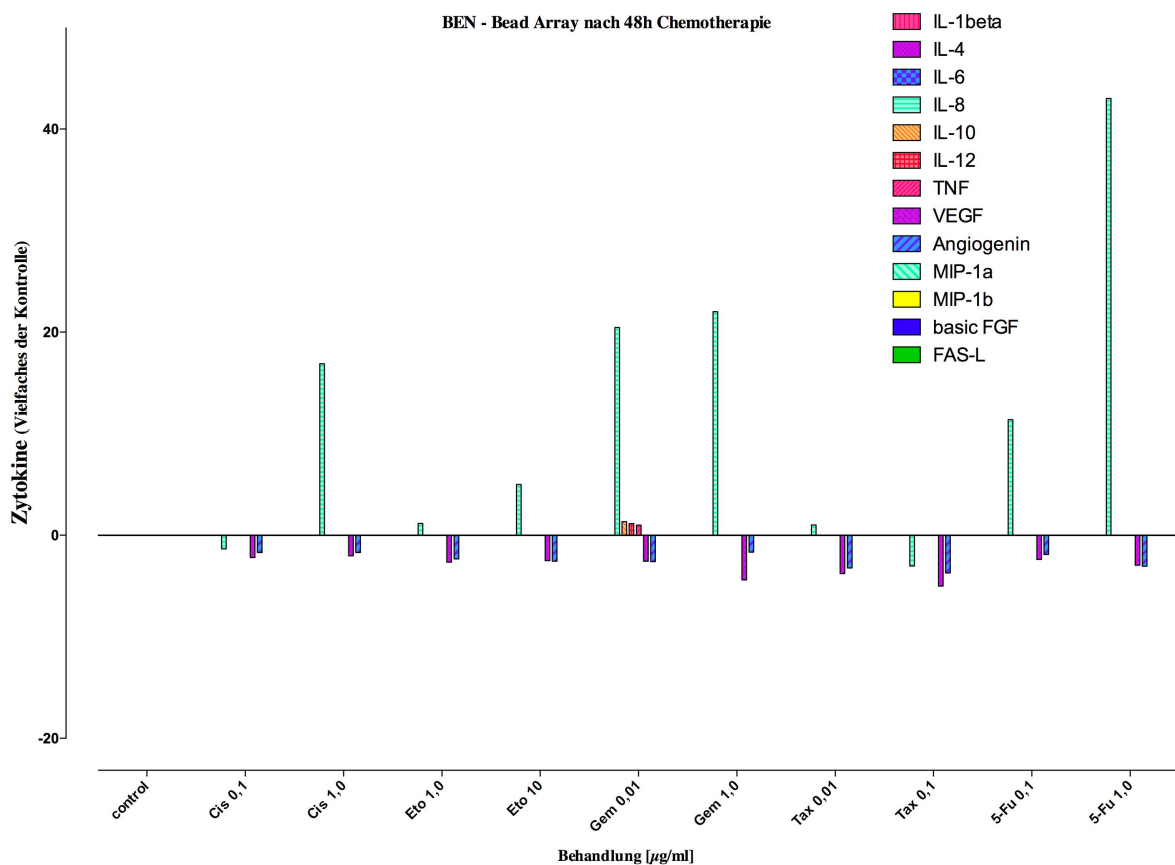


Abb. 6: Ergebnisse der Multiplex-FACS-Analyse der Zelllinie BEN nach 48 Stunden Chemotherapie; dargestellt findet sich jeweils ein Vielfaches der Kontrolle in Abhängigkeit der Chemotherapie (control = Kontrolle, CIS = Cisplatin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, TAX = Paclitaxel und 5-FU = 5-Fluorouracil)

Bei der Zelllinie BEN wurden nach 48-stündiger zytostatischer Behandlung (Substanz und Konzentration s. Abb. 6) sechs verschiedene Proteine (IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , VEGF A und Angiogenin) im zellulären Überstand nachgewiesen. In Abbildung 6 sind die Proteine jeweils als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. Hier kann eine Erhöhung

der Zytokinspiegel durch Zytostatika Behandlung der Tumorzellen im Überstand für IL-8, IL-10, IL-12 und TNF- α festgestellt werden.

VEGF A und Angiogenin waren im Überstand nach chemotherapeutischer Behandlung im Vergleich zur konstitutiven Sekretion in geringerer Konzentration nachweisbar. VEGF A war um das 5-fache und Angiogenin um das 3,7-fache der Kontrolle supprimiert.

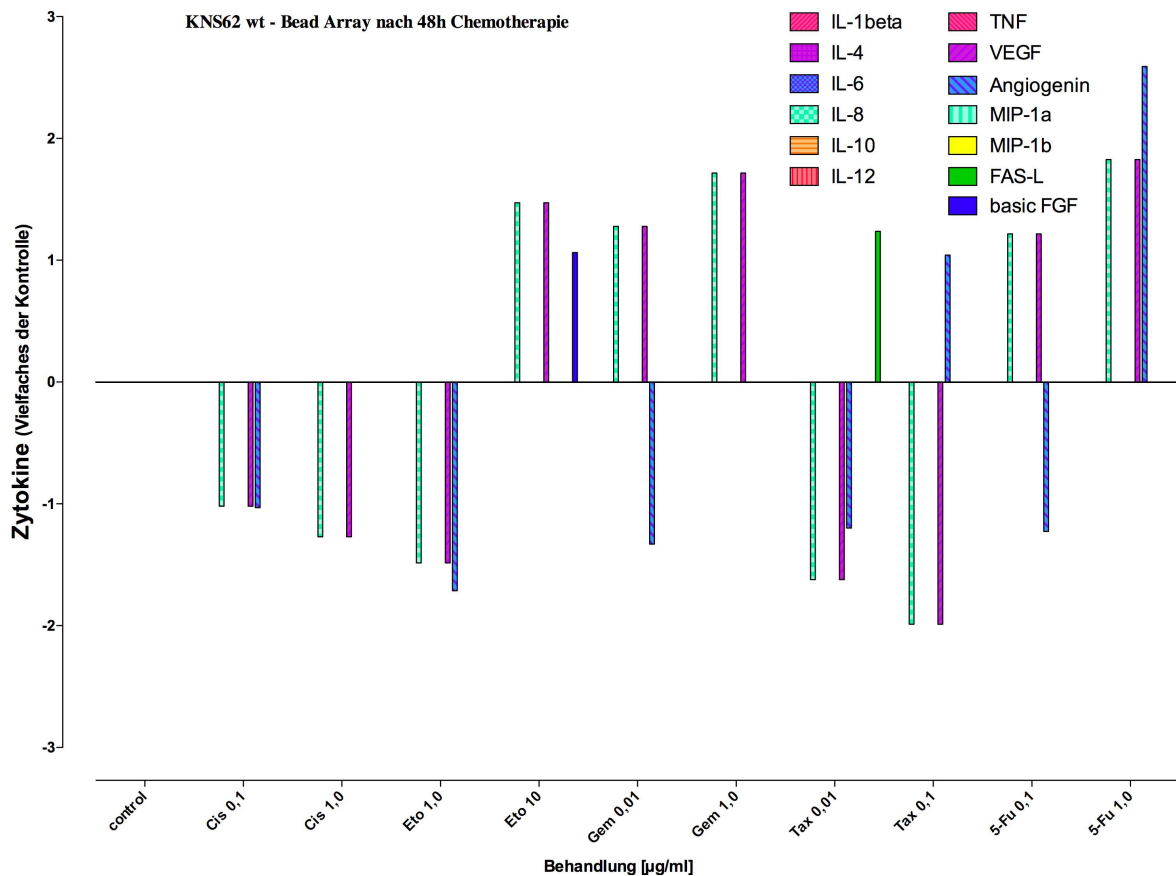


Abb. 7: Ergebnisse der Multiplex-FACS-Analyse der Zelllinie KNS62 wt nach 48 Stunden Chemotherapie; dargestellt findet sich jeweils ein Vielfaches der Kontrolle in Abhängigkeit der Chemotherapie (control = Kontrolle, CIS = Cisplatin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, TAX = Paclitaxel und 5-FU = 5-Fluorouracil)

Bei KNS62 wt (Abb. 7) wurde nach Behandlung mit Cisplatin, Paclitaxel und der ED₂₀ von Etoposid eine Herabregulation des IL-8-Spiegels und für Etoposid (ED₅₀), Gemcitabin und 5-FU eine Heraufregulation gemessen. Ein vergleichbares Bild zeigten die VEGF A Spiegel in Abhängigkeit von den verwendeten Medikamenten.

Um die Ergebnisse aus der „Breitspektrum-Analyse“ der Multiplex-FACS-Untersuchungen zu verifizieren und weitere Aussagen über ein breiteres Konzentrationsspektrum der untersuchten Zytostatika treffen zu können, wurden weitere ELISA-Analysen durchgeführt. Es wurden ELISA-Untersuchungen in den Tumorzellüberständen für die folgenden Proteine durchgeführt: Interleukin-8 (IL-8), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Urokinase (uPA).

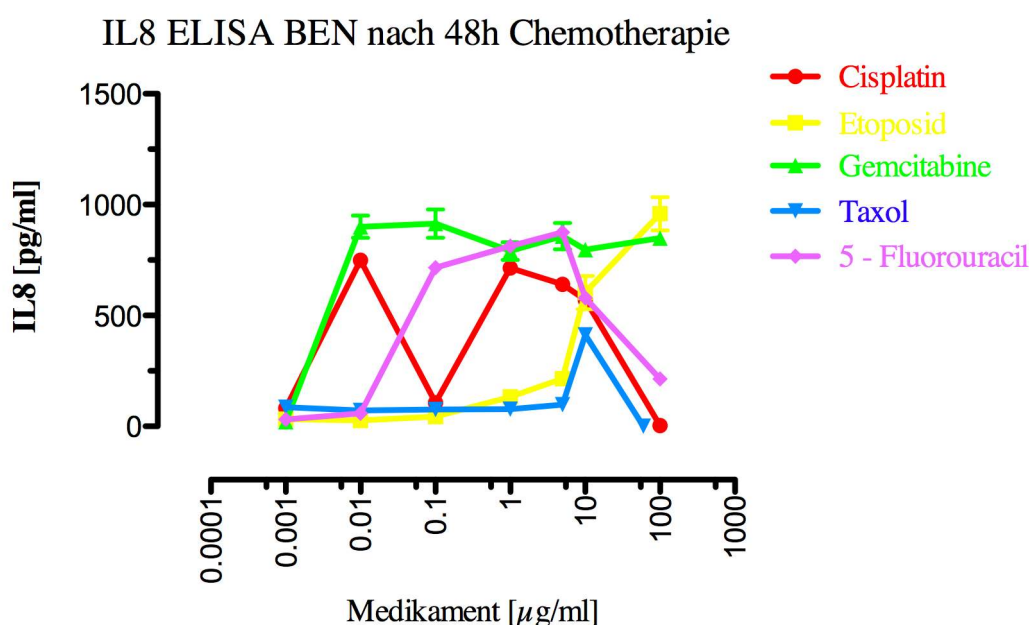


Abb. 8: IL-8 ELISA der Zelllinie BEN nach 48 Stunden Chemotherapie. Gezeigt ist die IL-8 Konzentration in Pikogramm pro Milliliter der Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Medikamentendosis in Mikrogramm pro Milliliter und die Standardabweichung ($n=12$).

Die gemessenen IL-8-Spiegel im Überstand der Zelllinie BEN waren in Abhängigkeit vom gewählten Zytostatikum ausgesprochen variabel (Abb. 8). Unter Berücksichtigung der Vitalitätsanalysen nach Etoposid-Behandlung zeigte sich, dass auf einen minimalen Effekt hinsichtlich der Zytotoxizität der Chemotherapie auch nur eine geringe Stimulation der IL-8-Sekretion folgte, d. h. in den unteren Dosisbereichen stieg die IL-8-Konzentration nicht über 45 pg/ml im Zellüberstand. Beim Überschreiten der Dosis des Zytostatikums der ED_{50} konnten im Überstand IL-8-Spiegel bis 959 pg/ml im Mittel gemessen werden. Vitalität und Sekretion verhielten sich bei Behandlung mit Etoposid dementsprechend umgekehrt proportional zueinander. Betrachtet man den

Zusammenhang nach Behandlung mit Gemcitabin, so konnte im unteren Dosisbereich (0,001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gemcitabin) eine geringe Sekretion von IL-8 im Zellüberstand mit 20 pg/ml im Mittel nachgewiesen werden, die bei weiterer Eskalation der Dosis relativ früh (0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gemcitabin) konstante Spiegel zwischen 800 bis 900 pg/ml erreichte. Die Behandlung mit 5-FU wies im unteren Dosisbereich einen zunächst verhaltenen Anstieg der IL-8-Konzentration (31 und 58 pg/ml) auf, dann einen Anstieg auf 716 pg/ml bei Behandlung mit der ED_{20} . Bei weiterer Eskalation zeigte sich ein Anstieg auf bis zu 875 pg/ml (5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-FU-Behandlung). Bei Maximaldosis war unter Berücksichtigung der Vitalitätsanalyse kaum noch IL-8 nachweisbar (213 pg/ml).

Bei der Zelllinie KNS62 (Abb. 9) führten die Etoposid-, Paclitaxel- und Cisplatinbehandlung zu einer hohen Stimulation der IL-8-Sekretion (im Bereich von 131,06 pg/ml bei Cisplatin bis 852 pg/ml bei Paclitaxel) nach Behandlung mit der niedrigsten Konzentration (0,001 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Analog zum Verhalten der Zelllinie BEN bei Behandlung mit Gemcitabin zeigte sich im unteren Behandlungsbereich (0,001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gemcitabin) eine geringe Sekretion von IL-8 mit 345 pg/ml . Bei weiterer Eskalation der Dosis stieg die Sekretion an, blieb aber zwischen 2752 und 3548 pg/ml IL-8 relativ konstant.

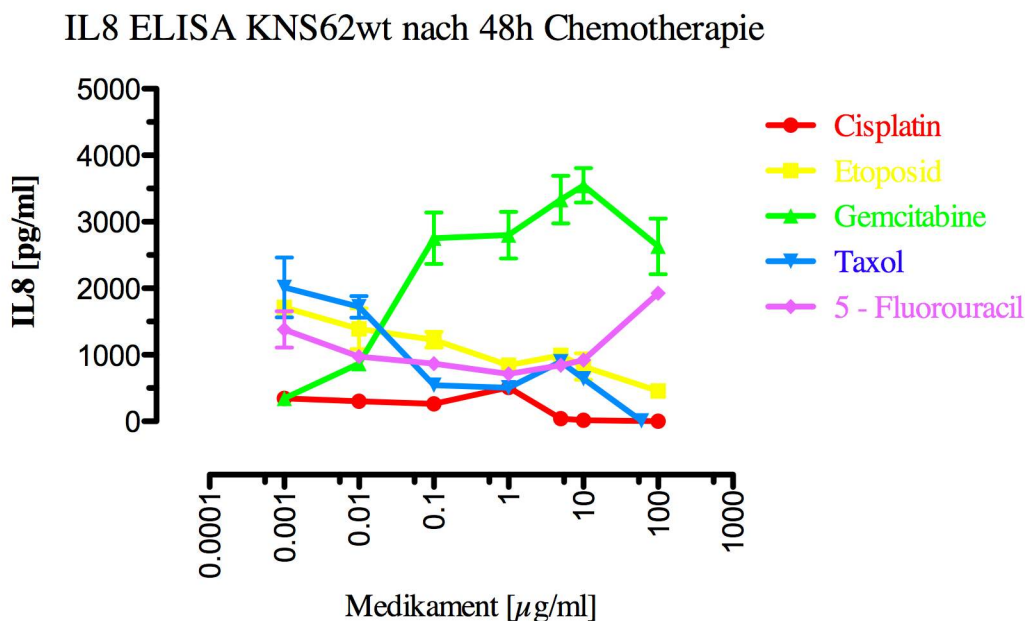


Abb. 9: IL-8 ELISA der Zelllinie KNS62 wt nach 48 Stunden Chemotherapie. Gezeigt ist die IL-8 Konzentration in Pikogramm pro Milliliter der Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Medikamentendosis in Mikrogramm pro Milliliter und die Standardabweichung ($n=12$).

Die Quantifizierung von TNF- α im zellulären Überstand mittels ELISA-Analyse zeigte nur eine geringfügige Modifikation durch Zytostatikabehandlung, wie bereits in den vorgenannten FACS-Analysen gesehen. Bei Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Effektivdosen der gewählten Zytostatika wiesen die Tumorzellen bei Cisplatin und Gemcitabin eine geringfügige Stimulation der TNF- α -Sekretion (Abb. 10) auf. Die Behandlungen mit Paclitaxel und 5-FU stimulierte die konstitutive Sekretion auf 0,60 ng/ml bei der ED₂₀ und 0,59 ng/ml bei der ED₅₀ von Paclitaxel sowie 0,96 ng/ml bei der ED₂₀ und 0,74 ng/ml bei der ED₅₀ bei 5-FU.

TNF ELISA BEN nach Chemotherapie (48h)

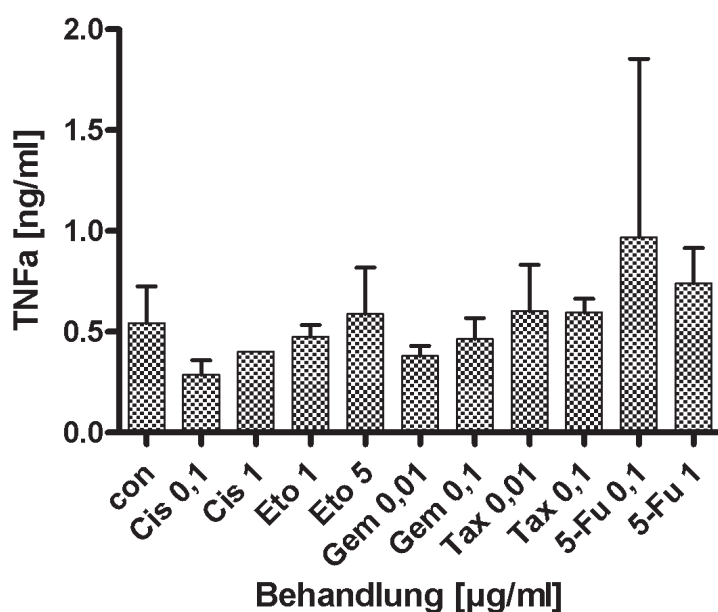


Abb. 10: TNF- α ELISA der Zelllinie BEN nach 48 Stunden Chemotherapie. Gezeigt ist die TNF- α Konzentration in Nanogramm pro Milliliter der Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Medikamentendosis in Mikrogramm pro Milliliter und die Standardabweichung ($n=12$). (con = Kontrolle, CIS = Cisplatin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, TAX = Paclitaxel und 5-FU = 5-Fluorouracil)

Wie in Abbildung 11 gezeigt, bewirkte die zytostatische Behandlung der Zelllinie KNS62 wt eine allgemeine Verminderung der Sekretion von TNF- α in den zellulären Überständen. Die unbehandelten Zellen wiesen einen konstitutiven mittleren TNF- α -Spiegel von 0,71 ng/ml auf. Dieser wurde in keinem Fall medikamenteninduziert überschritten. Die Behandlung mit der ED₅₀ von Etoposid bewirkte eine Inhibition der

Sekretion auf 0,30 ng/ml TNF- α im Überstand.

TNF ELISA KNS62 wt nach Chemotherapie (48)

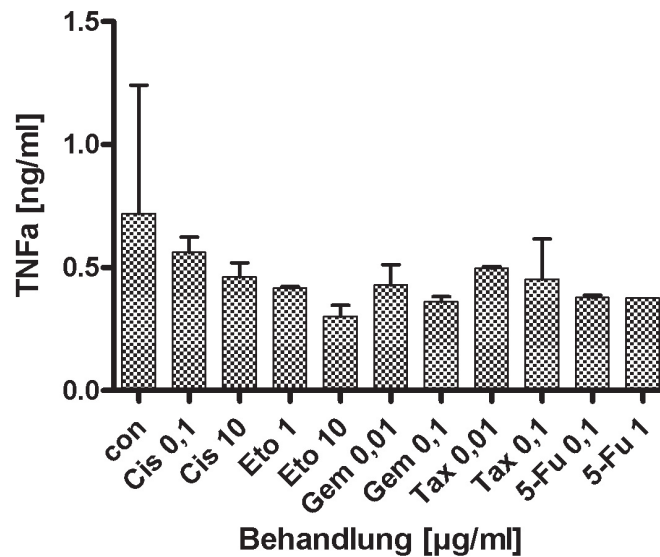


Abb. 11: TNF- α ELISA der Zelllinie KNS62 wt nach 48 Stunden Chemotherapie. Gezeigt ist die TNF- α Konzentration in Nanogramm pro Milliliter der Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Medikamentendosis in Mikrogramm pro Milliliter und die Standardabweichung ($n=12$). (con = Kontrolle, CIS = Cisplatin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, TAX = Paclitaxel und 5-FU = 5-Fluorouracil)

Die Untersuchung eines vor allem invasionsassoziiertem weiteren Proteins, uPA, mit dem ELISA-Verfahren zeigte sowohl für die untersuchten Zelllinien als auch für die untersuchten Substanzen uneinheitliche Ergebnisse (Abb. 12 u. 13). Zellen der Linie BEN wiesen eine basale mittlere Sekretion des Proteins uPA von 0,91 ng/ml im Überstand auf. Eine Stimulation der Sekretion bewirkte die Behandlung mit Gemcitabin ED₂₀ (1,23 ng/ml) und die Behandlungen mit 5-FU (ED₂₀ 1,01 ng/ml und ED₅₀ 1,16 ng/ml). Alle weiteren Behandlungen senkten die im Überstand gemessenen mittleren uPA-Spiegel auf 0,28 ng/ml (ED₅₀ Paclitaxel) und 0,60 ng/ml (ED₅₀ Gemcitabin).

KNS62 wt wies kaum messbare Veränderungen der im Überstand gemessenen mittleren uPA- Spiegel auf chemotherapeutischen Behandlung hin auf. Die Kontrolle zeigte basale mittlere Spiegel von 2,9 ng/ml uPA.

uPA ELISA BEN nach Chemotherapie (48h)

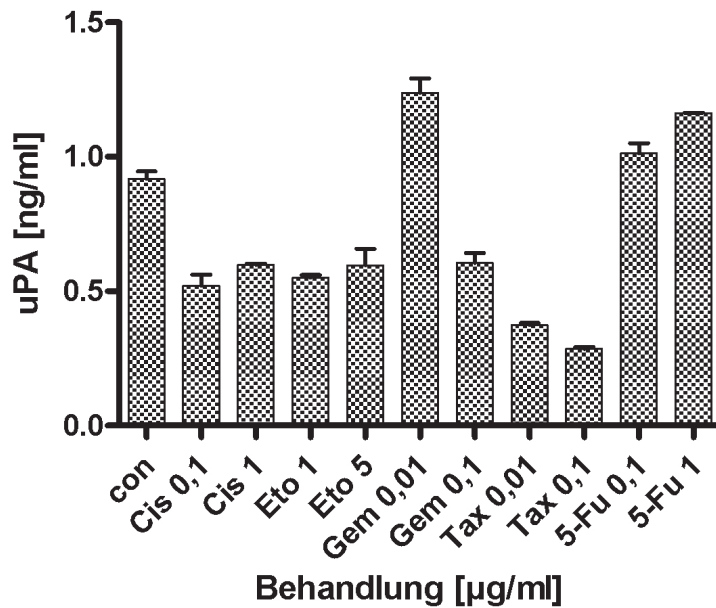


Abb. 12: uPA ELISA der Zelllinie BEN nach 48 Stunden Chemotherapie. Gezeigt ist die uPA Konzentration in Nanogramm pro Milliliter der Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Medikamentendosis in Mikrogramm pro Milliliter und die Standardabweichung ($n=12$). (con = Kontrolle, CIS = Cisplatin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, TAX = Paclitaxel und 5-FU = 5-Fluorouracil)

uPA ELISA KNS62 wt nach Chemotherapie (48h)

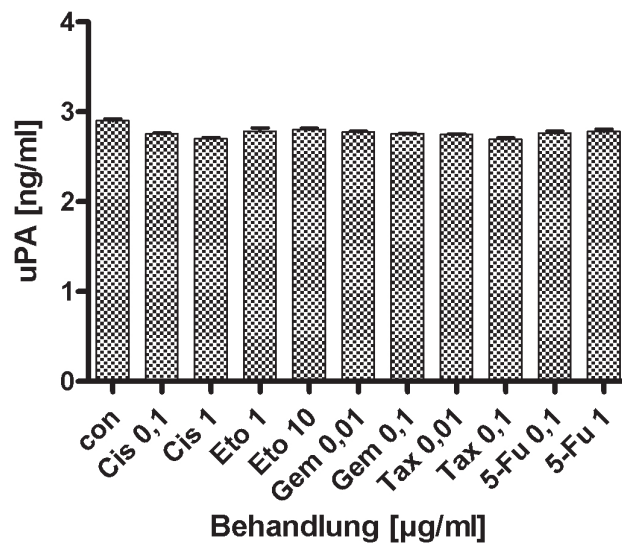


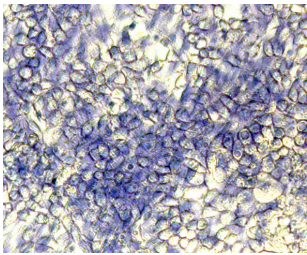
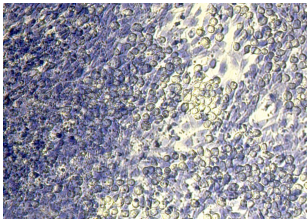
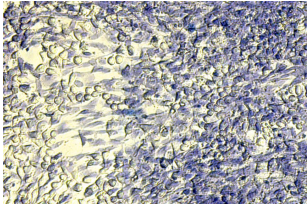
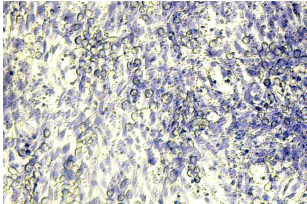
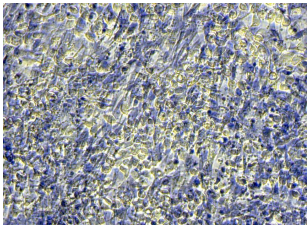
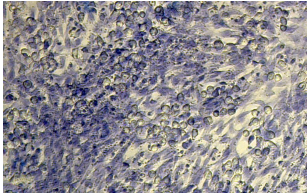
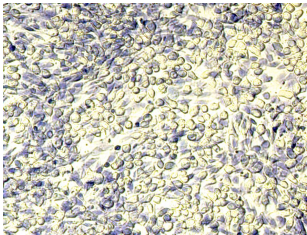
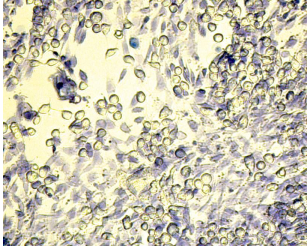
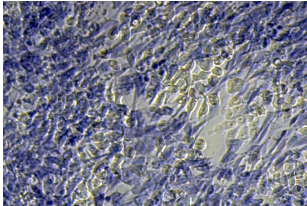
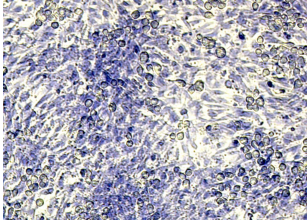
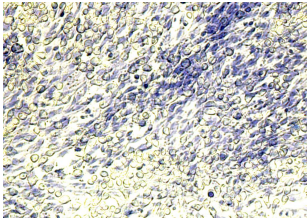
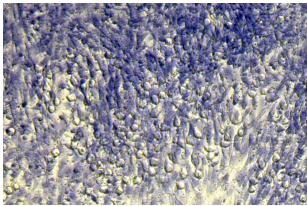
Abb. 13: uPA ELISA der Zelllinie KNS62 wt nach 48 Stunden Chemotherapie. Gezeigt ist die uPA Konzentration in Nanogramm pro Milliliter der Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Medikamentendosis in Mikrogramm pro Milliliter und die Standardabweichung ($n=12$). (con = Kontrolle, CIS = Cisplatin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, TAX = Paclitaxel und 5-FU = 5-Fluorouracil)

3.3 Invasionsanalysen

Untersuchungen zur Invasivität der Tumorzelllinie KNS62 nach Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika zeigten im Fibroblastenmonolayer Invasionstest, dass unter bestimmten Bedingungen (substanz-, dosis- und zeitabhängig) eine zunehmende Destruktion des Fibroblastenmonolayers in der Zellkultur nachgewiesen werden kann. Dieser Effekt variierte zwischen den zwei unterschiedlichen Zelllinien KNS62-Wildtype und dem Zellpool KNS62 Bcl-xL. Bereits ohne Behandlung (Kontrolle) konnte beim Wildtyp eine basale Destruktion des Fibroblastenmonolayers durch die Tumorzellen nachgewiesen werden. Nach einer zweitägigen Behandlung mit Cisplatin, Gemcitabin und 5-FU konnte eine Zunahme des Effekts festgestellt werden. Am stärksten konnte diese Reaktion durch die Behandlung mit Gemcitabin hervorgerufen werden, gefolgt von Cisplatin und 5-FU. Keine wesentliche Veränderung zur Kontrolle zeigte sich bei Behandlung mit Etoposid und Paclitaxel.

Auch der Zellpool von KNS62 Bcl-xL wies ohne Behandlung eine basale Invasivität auf, die im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen ausgeprägter war. Die chemotherapeutische Behandlung zeigte einen ausgeprägteren Effekt bezüglich der Destruktion des Fibroblastenzellrasens im Vergleich zu den Wildtyp-Tumorzellen nach Behandlungen mit Gemcitabin und Cisplatin. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen bewirkte 5-FU keine Steigerung der Invasivität, wohl aber Paclitaxel. Bei der Behandlung mit Etoposid konnte korrespondierend zu den Wildtyp-Zellen kein nachweisbarer Effekt gemessen werden.

Tab. 6: Gegenüberstellung der fotografischen Auswertung der Invasionsanalyse der Zelllinien KNS62 wt und Bcl-xL nach 48 Stunden Chemotherapie

KNS62 wt	Behandlung	KNS62 Bcl-xL
	Kontrolle 48 Std.	
	Cisplatin 48 Std.	
	Etoposid 48 Std.	
	Gemcitabin 48 Std.	
	Paclitaxel 48 Std.	
	5-Fu 48 Std.	

3.4 Semiquantitative Echtzeit-PCR-Analysen

Im Folgenden werden semiquantitativ die Expression verschiedener Kandidaten-mRNS in Tumoren aus einem orthotopen, murinen Bronchialkarzinom Xenotransplantationsmodell und im Vergleich aus humanen Bronchialkarzinom Tumorproben dargestellt. Sowohl die Tumore aus dem murinen Tiermodell, die humanen Bronchialkarzinom Zelllinien KNS62 und BEN als auch die humanen Patiententumorproben waren zytostatisch vorbehandelt.

3.4.1 Orthotopes Tiermodell

In dem bereits beschriebenen Tiermodell wurden, analog zu den *in vitro* Untersuchungen, orthotope Tumore der humanen Bronchialkarzinomzelllinien KNS62 und BEN im murinen Xenotransplantationsmodell etabliert. Nach Beendigung der Behandlung wurden die Tumore reseziert und die zelluläre Gesamt-RNS isoliert. Mittels semiquantitativer Echtzeit-PCR-Analysen wurde die RNS-Expression für IL-8, TNF- α , VEGF A, MMP-2, -7 und -9 gemessen. In der vorliegenden Arbeit werden lediglich vergleichend die Ergebnisse mit der Zelllinie KNS62 wt und dem Zellpool KNS62 Bcl-xL dargestellt.

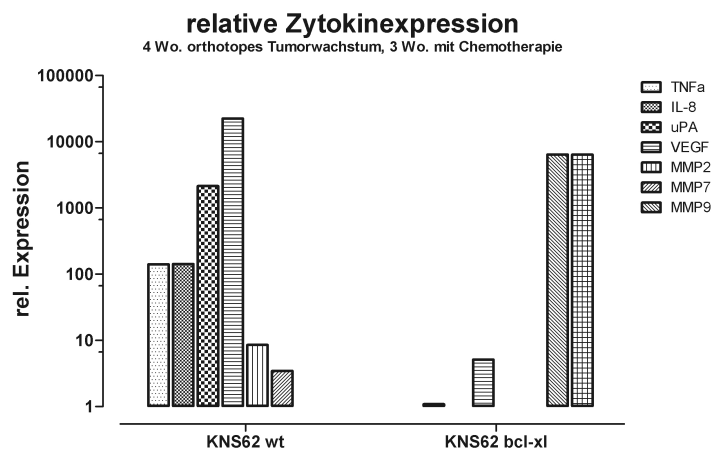


Abb. 14: Relative Expression von mRNS der aufgearbeiteten Tiertumore nach qRT-PCR, im Vergleich KNS62 wt und Bcl-xL

Die Wildtyp-Tumore (s. Abb. 14) wiesen eine gesteigerte Expression von TNF- α , IL-8 und VEGF A auf (2- bzw. 4,5-fach im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). Einen geringen Einfluss der Chemotherapie zeigte sich bezüglich der Expression der Matrix-Metalloproteinasen. MMP-2 war hier der am höchsten regulierte Parameter, bleibt aber dennoch weit hinter den anderen. Bei der Analyse der KNS62 Bcl-xL Tumore konnte eine fast ausschließliche Heraufregulation der MMPs gemessen werden. Zusammenfassend konnte im Tiermodell eine Modifikation verschiedener inflammationsassoziiierter mRNS durch eine zytostatische Behandlung demonstriert werden.

3.4.2 Humane Tumorproben

In Analogie zur Analyse der Lungentumore im Tiermodell wurden die Tumorproben von Patienten mit einem Bronchialkarzinom untersucht. Bei allen Tumoren handelte es sich um nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC) mit dem Tumorstadium IIIA nach UICC. Es wurden 23 Tumorproben bei Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie analysiert und 15 Tumorproben bei Patienten ohne chemotherapeutische Vorbehandlung. Die semiquantitative Analyse der mRNS erfolgte ebenfalls mittels RT-PCR, wobei die gemessene mRNS-Expression in Tumoren nach neoadjuvanter Chemotherapie in Relation zur mRNS aus Tumoren ohne chemotherapeutische Vorbehandlung dargestellt wurde. In den folgenden Abbildungen 15 und 16 werden exemplarisch die Ergebnisse von 13 neoadjuvant vorbehandelten Tumorproben in Relation zu den unbehandelten Tumoren dargestellt. Bei der semiquantitativen Analyse der mRNS-Expression der untersuchten inflammations assoziierten Proteine (Abb. 15) ließ sich in den meisten Tumorproben nach Chemotherapie ein Anstieg der Expression nachweisen. Besonders VEGF A und uPA zeigten einen deutlichen Anstieg, der bei VEGF A im Einzelfall im Vergleich zur nicht chemotherapierten Gruppe bis auf das 9-fache anstieg (TU 3517 und TU 3353). Vergleichbares ließ sich auch für uPA nachweisen (TU 4347). Lediglich in einem Fall zeigte sich eine dezente Suppression von uPA (TU 3201). Die ebenfalls quantifizierte mRNS-Expression von IL-8 und TNF- α wies, bis auf eine Ausnahme (TU 3000), einen gesteigerten Wert im Vergleich zur unbehandelten Gruppe auf.

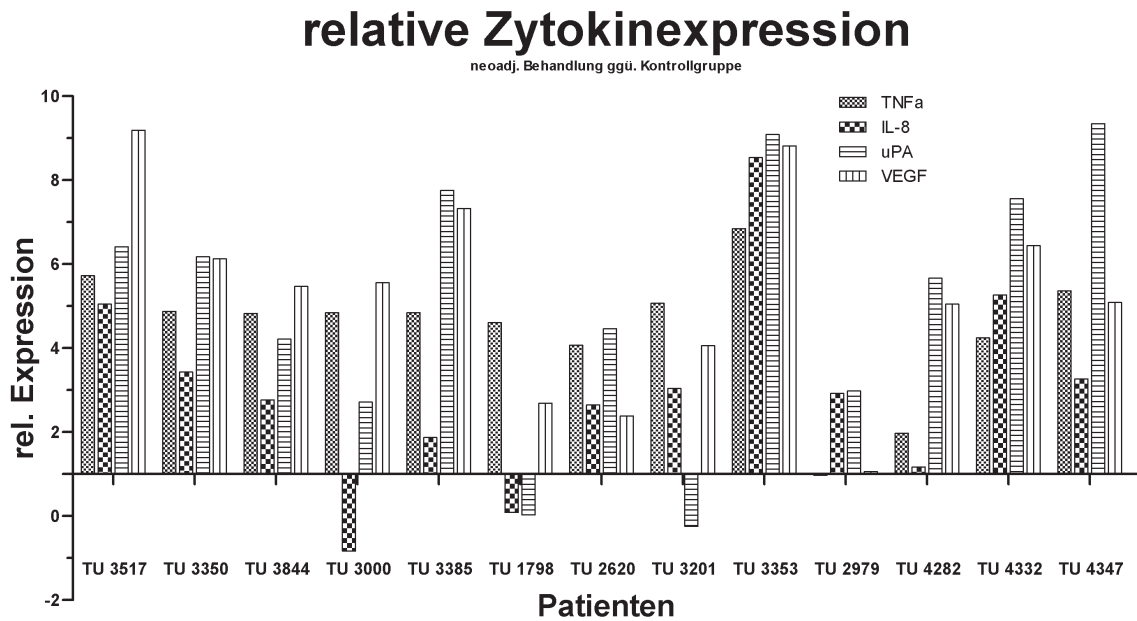


Abb. 15: Relative Expression von mRNA (TNF- α , IL-8, uPA und VEGF A) der aufgearbeiteten humanen Tumore nach qRT-PCR, im Vergleich neoadjuvante Chemotherapie gegen die Kontrollgruppe

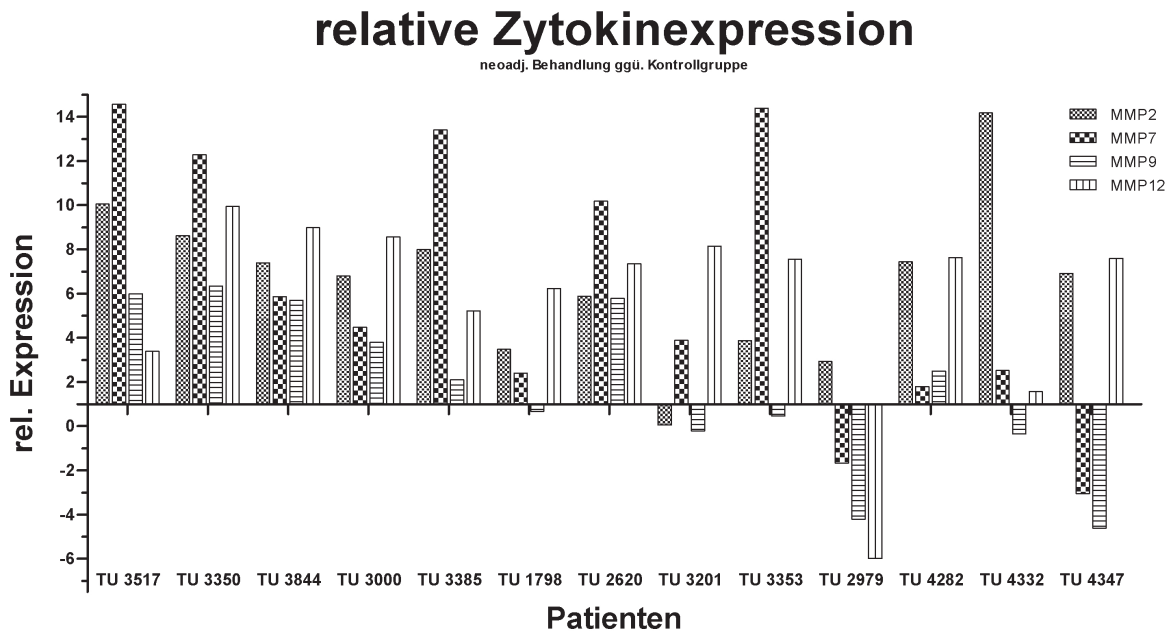


Abb. 16: Relative Expression von mRNA (MMP-2, -7, -9 und -12) der aufgearbeiteten humanen Tumore nach qRT-PCR, im Vergleich neoadjuvante Chemotherapie gegen die Kontrollgruppe

Vergleicht man die Expression der MMP-2, -7, -9, -12 (Abb. 16) in der Gruppe der chemotherapierten Tumoren mit der Kontrollgruppe, so zeigt sich, dass es auch hier zu

einer gesteigerten Expression gekommen ist. Im Maximum war die MMP-7-Expression um das 14-fache gesteigert (TU 3517, TU 3353).

Schließlich wurde das Langzeitüberleben der Patienten, aus denen die Tumorproben gewonnen worden waren, mit der Höhe der jeweiligen mRNA-Expression korreliert. Die Gruppe der Patienten mit einem NSCLC nach neoadjuvanter Chemotherapie wurde demnach jeweils in die Patienten mit einer Expression unterhalb bzw. oberhalb des Medians aufgeteilt. In den dargestellten Kaplan-Meier-Analysen (Abb. 17) für IL-8, uPA, VEGF A, TNF- α , MMP-2, -7, -9 und -12 zeigen sich, zwar auf einem geringen Signifikanzniveau von 10 %, verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeiten für Patienten mit einer relativen Überexpression von IL-8, uPA und VEGF A sowie MMP-2 und MMP-12.

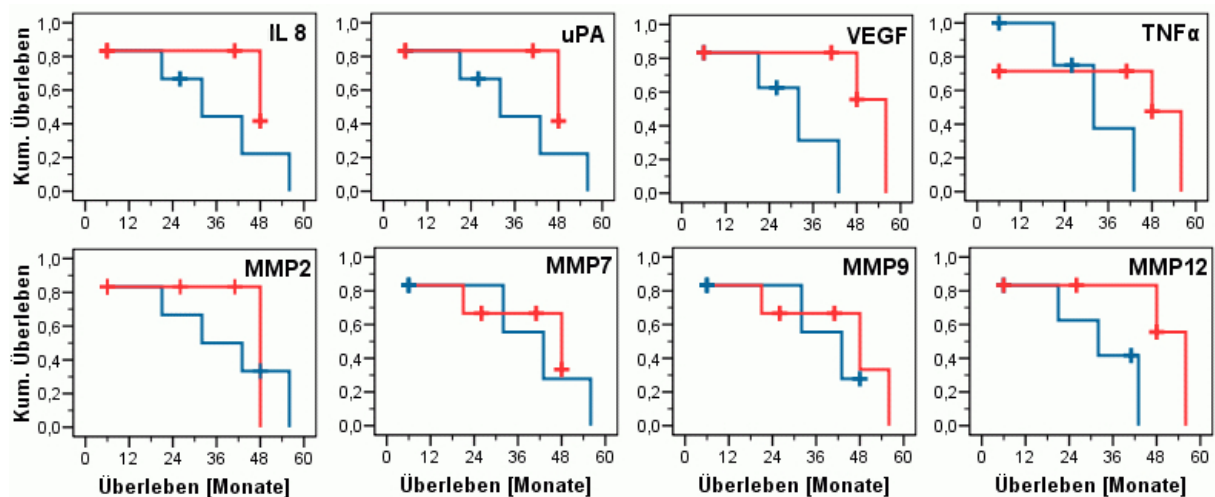


Abb. 17: Korrelation der relativen mRNA-Expression und des Überlebens nach Kaplan-Meier bei Patienten mit einem NSCLC nach neoadjuvanter Chemotherapie und chirurgischer Resektion:

Blau: mRNA-Expression im Tumor unterhalb des Medians

Rot: mRNA-Expression im Tumor oberhalb des Medians



4 Diskussion

Der Erfolg der Standardchemotherapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) ist limitiert und die Prognose des Bronchialkarzinoms insgesamt immer noch ungünstig (Dimitroulis et al., 2005), da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die meisten Tumoren lokal fortgeschritten oder metastasiert sind und somit nicht mehr in kurativer Intention behandelbar. In dieser Arbeit wurden quantitativ deskriptive Untersuchungen durchgeführt, die die Assoziation der Wirkung von verschiedenen Chemotherapeutika auf Bronchialkarzinomzellen und die dadurch bedingte Freisetzung verschiedener inflammatorischer Mediatoren analysierten. Darüber hinaus wurde die mögliche biologische Bedeutung der Mediatoren sowie ihre fragliche Relevanz hinsichtlich einer Prädiktion des Ansprechens der Tumorzellen auf Chemotherapeutika sowohl in einem orthotopen Mausmodell als auch in Patientenproben analysiert.

4.1 In vitro Analysen zu Chemosensibilität

Auf *in vitro* Ebene wurden fünf verschiedene Chemotherapeutika (5-FU, Gemcitabin, Etoposid, Cisplatin, Taxol) bei drei verschiedenen NSCLC-Zelllinien (KNS62 wt, KNS62 Bcl-xL, BEN) in Dosiseskallationsanalysen mit Hilfe von Kristallviolett-vitalfärbungen untersucht. Es ergab sich ein inhomogenes Bild bezüglich der Sensitivität der verschiedenen Zelllinien hinsichtlich der unterschiedlichen Substanzen. Die Zelllinie KNS62 wt und die insgesamt resistere Zelllinie KNS62 Bcl-xL waren sensibler für Etoposid und Gemcitabin. Die Zelllinie BEN war am sensibelsten gegen eine Cisplatin-Behandlung.

Die untersuchten Chemotherapeutika wiesen in den *in vitro* Analysen eine unterschiedliche Effizienz hinsichtlich ihrer Zytotoxizität auf, wie sie in aktuellen klinischen Studien für diese Substanzen ebenfalls gezeigt werden konnten (Rossi et al., 2012 und Jiang et al., 2013). Um die Modalität des Zelltodes (Apoptose, Zellzyklusarrest) der Tumorzellen deskriptiv näher zu erfassen, wurden Zellzyklus Propidiumiodid-FACS-Analysen durchgeführt.

Diese Analysen wiesen nach, dass die verschiedenen untersuchten Zytostatika in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelllinie und der eingesetzten Zytostatikakonzentration Apoptose (Sub-G₁ Zellfraktion) induzieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Vielzahl von Studien, in denen ein unterschiedliches Ausmaß von Apoptoseinduktion durch Zytostatika bei epithelialen Tumorzellen nachgewiesen werden konnte (Wang et al., 2004). Ebenfalls ließ sich reproduzieren, dass bei Bronchialkarzinomzellen die Apoptoseresistenz durch eine Überexpression des Bcl-xL-Proteins signifikant zunimmt (Stewart, 2010).

Darüber wird in den Propidiumiodid-FACS-Analysen deutlich, dass auch andere Veränderungen im Zellzyklus wie ein Zellzyklusarrest in der G₁- bzw. G₂-Phase durch eine Zytostatikabehandlung induziert werden kann. Auch für diesen Effekt liegen bereits verschiedene Beispiele in der Literatur vor, die hierfür verschiedene Erklärungsansätze liefern (Wang Q et al., 2013).

Neben den Effekten der Zytostatika auf die Vitalität der Bronchialkarzinomzellen selbst wurde analysiert, inwieweit diese Substanzen einen Effekt auf die Expression bzw. Sekretion von verschiedenen inflammationsassoziierten Proteinen haben. Für unterschiedliche solide Tumore wurde nachgewiesen, dass die Behandlung mit Zytostatika die Induktion verschiedener proinflammatorischer Proteine induzieren kann (Coventry et al., 2012). Die biologische Relevanz dieser Effekte wird bspw. als Resistenzmechanismus über autokrine Regulationsmechanismen der Tumorzellen selbst oder als parakrine Interaktionen mit den Zellen des Tumorstromas interpretiert (Morgillo et al., 2005).

In Breitspektrum-FACS-Analysen (13 verschiedene inflammationsassoziierte Proteine) wurde der zelluläre Überstand in Relation zu unbehandelten Kontrollen der Tumorzellen hinsichtlich der Quantität der verschiedenen Proteine nach Behandlung mit den verschiedenen Zytostatika analysiert. Relativ homogen zeigte sich für die untersuchten Zelllinien eine teilweise erhebliche Induktion der IL-8-Sekretion. Bei den anderen untersuchten Proteinen war das Bild inhomogen und sowohl eine Induktion als auch eine Suppression der Sekretion wurden gemessen. Eine Induktion der IL-8-Expression durch das Zytostatikum Oxaliplatin konnte bereits für das Prostatakarzinom gezeigt

werden (Wilson et al. 2008) wie auch für Paclitaxel im Falle des Brustkrebses (Bhola et al., 2013). Für das NSCLC ist dieses Phänomen in der Literatur noch nicht beschrieben. Es finden sich verschiedene Untersuchungen zur nativen IL-8-Expression (Gioulbasanis et al., 2012) bzw. Eliminationsversuche von IL-8 (Wang et al., 1996), die die Rolle des IL-8 in Bezug auf Inflammation und Tumorprogression zu klären versuchen. Als entscheidender Mechanismus wird der Effekt des IL-8 über para- und autokriner Sekretion diskutiert. Insgesamt ist die biologische Bedeutung unzureichend geklärt. In eigenen, nicht gezeigten, Analysen ergaben sich in Kokultivierungsuntersuchungen mit IL-8 neutralisierenden Antikörpern und Zytostatikabehandlung keine Hinweise auf eine Modifikation der Zytotoxizität bzw. der Tumorzellproliferation.

Es ist hinlänglich bekannt, dass IL-8 ein ausgesprochen potentes Chemotaxin für neutrophile Granulozyten darstellt (Waugh et al., 2008). Ob eine relevante biologische Bedeutung für die Expression in der Modifikation einer komplexen Tumor-Stroma-Interaktion (Farrow et al., 2004) vorliegt, bleibt auf dem Boden der Daten der eigenen Analysen unbeantwortet. Dennoch ist diese Interaktion in anderen Tumorsystemen für IL-8 nachgewiesen worden (Kitadai Y., 2009)

Darüber hinaus wurde deskriptiv für drei ausgewählte Proteine, IL-8, TNF- α und uPA, das Sekretionsprofil im zellulären Überstand in Zytostatika-Dosiseskalationsprofilen in hochsensitiven ELISA-Analysen erstellt. In diesen Analysen konnte bestätigt werden, dass die Induktion von IL-8 dosis- und substanzabhängig ist, wie in den Multiplex-FACS-Analysen besonders ausgeprägt nachgewiesen werden konnte. Für TNF- α und uPA sind diese Effekte auch in den hochsensitiven ELISA-Analysen inhomogen.

Um den Einfluss der Zytostatikatherapie *in vitro* auf ihr Verhalten hinsichtlich ihrer Invasivität zu analysieren, wurden mit Zytostatika präkonditionierte Bronchialkarzinomzellen auf einen Fibroblastenmonolayer kokultiviert. Durch eine zytostatische Vorbehandlung mit Gemcitabin und 5-FU konnte eine gesteigerte Destruktion des Fibroblastenmonolayers nachgewiesen werden. Diese kann als eine erhöhte zytostatikainduzierte Invasivität der Tumorzellen interpretiert werden. In der Literatur finden sich einzelne Beispiele, die bei verschiedenen Tumoren eine Steigerung der Invasivität durch Zytostatika nachweisen konnten (Li et al., 2013). Gingis-Velitski et al. konnten im

Jahr 2011 eine zytostatikainduzierte gesteigerte Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMPs) bei einem Bronchialkarzinom-Mausmodell nachweisen und führen dieses als ein Erklärungsmodell für eine gesteigerte Metastasierung heran. In eigenen, nicht gezeigten, Zymogramm-Analysen konnte ebenfalls eine gesteigerte zytostatikainduzierte MMP-Aktivität nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit in folgenden Untersuchungen an Tumorproben eines *in vivo* Tiermodells (orthotopes, xenogenes Scid bg Mausmodell) und an humanen Tumorproben die Expression von MMPs zusätzlich analysiert.

Weiterführende Analysen müssen untersuchen, welche Faktoren für diese funktionelle Beeinflussung der Tumorzellen hinsichtlich einer gesteigerten Invasivität durch die Zytostatika-Applikation verantwortlich sein könnten. So sind Analysen, die spezifisch die sezernierten MMPs neutralisieren (z.B. mit Hilfe spezifischer MMP-Inhibitoren), denkbar, um nachzuweisen, ob hierdurch die funktionellen Effekte modifizierbar sind.

4.2 Analysen an Tumorproben aus einem murinen

Tiermodell

Weiterführende Analysen wurden an Tumorproben durchgeführt, die in einem orthotopen, xenogenen SCID-bg Mausmodell generiert wurden. Durch die mikrochirurgische Inokulation einer Tumorzellsuspension der humanen Zelllinie KNS62 in die murine Lunge konnten Tumore von chemotherapeutisch behandelten Tieren (Gemcitabin-Monotherapie) und Kontrolltieren generiert werden. Aus den Tumoren wurde eine komplette RNS-Extraktion durchgeführt und mit Hilfe von semiquantitativen Echtzeit-PCR-Analysen die Expression von IL-8, TNF- α , VEGF A, MMP-2, -7 und -9 gemessen.

Vergleichbar mit den *in vitro* Analysen wurde in Chemotherapie behandelten KNS62 wt Tumoren eine gesteigerte Expression der mRNS der proinflammatorischen (IL-8, TNF- α) und angiogenetischen (VEGF A) Zytokine nachgewiesen.

Die weiterführenden und vergleichenden Analysen der chemoresistenten Zelllinie KNS62 Bcl-xL weisen ein modifiziertes Zytokinexpressionsmuster nach. Die chemothe-

rapieinduzierte mRNA-Expression lässt sich vor allem und ausgeprägter für die MMPs nachweisen.

Zusammenfassend lassen sich auf dieser Ebenen vergleichbare Ergebnisse zu den *in vitro* Voruntersuchungen nachweisen. Aus diesem Grund gelten auch hier die bereits oben ausgeführten Überlegungen zu einer potentiellen biologischen Bedeutung (s. Kap. 4.1).

In weiterführenden Untersuchungen muss analysiert werden, ob die auf mRNA-Ebene erzielten Untersuchungsergebnisse sich auf Proteinebene verifizieren lassen, da eine komplexe post-transkriptionelle bzw. -translationelle Regulation denkbar ist (Chetty et al., 2011). Darüber hinaus muss darauf hingewiesen werden, dass die mRNA-Extraktion aus kompletten Tumorproben vorgenommen wurde, d. h. die mRNA setzt sich in Summe nicht nur aus der Tumorzell-mRNA zusammen, sondern aus dem gesamten Spektrum des murinen Tumorstromas, was zu einer mRNA-„Kontamination“ der Proben führt. Inwieweit dieser Umstand die erzielten Ergebnisse beeinflusst bleibt spekulativ. Kontrollen an mikrodiseziertem Gewebe wären möglich, um diese vorgenannten Effekte zu minimieren bzw. auszuschließen, ähnlich wie es Narita und Kollegen im Jahr 2011 vergleichend für benigne und maligne Brusttumoren gezeigt haben.

4.3 Humane Tumorproben

In Analogie zu den Untersuchungen der Tumorproben des Tiermodells wurden die vergleichbaren Untersuchungen an humanen Tumorproben durchgeführt.

Es wurden Tumorproben von 38 Patienten, die an einem NSCLC im Stadium IIIA erkrankt waren, analysiert. Hierbei waren 15 Tumorproben von Patienten, die chirurgisch reseziert worden waren und deren Tumore chemotherapie-naiv waren. Diesen Proben wurden die Analysen von 23 Tumorproben gegenübergestellt, die vor der chirurgischen Resektion eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten. Verglichen mit den 15 Patienten mit alleiniger Operation zeigte sich bei den Tumorproben der 23 Patienten mit neoadjuvante Chemotherapiekonzept auf mRNA-Ebene eine ubiquitäre Überexpression der proinflammatorischen, angiogenetischen und proinvasiven Zytokin-mRNA.

Grundsätzlich bestätigen also die Analysen der humanen Tumorproben die Ergebnisse des *in vitro* bzw. des murinen Modells.

Wie oben bereits ausgeführt, ist die Induktion dieser Mediatoren durch verschiedene Chemotherapeutika beschrieben. Ebenfalls gelten die einschränkenden Bemerkungen hinsichtlich der semiquantitativen RT-PCR-Analysen der Tumor-mRNS, wie sie oben bereits zu den Tierproben gemacht wurden (s. Kap. 4.2). Die biologische Relevanz in Bezug auf einen möglichen Tumorprogress, eine Angioinvasion oder eine Metastasierung ist aber nach wie vor wenig verstanden.

Inwieweit diese zuvor beschriebenen Effekte eine Aussage hinsichtlich des onkologischen Ansprechens der Tumore auf die (Chemo-) Therapie zulassen, wurde in der Folge untersucht. Die Patienten mit einer Tumor mRNS-Expression oberhalb des Medians aller gemessenen Werte wurden den Patienten mit einem Expressionsniveau unterhalb des Medians gegenübergestellt. In Kaplan-Meier-Analysen wurden statistischen Überlebensverläufe in einer Log-Rank-Analyse verglichen. Auf Grund der geringen Fallzahl ist die Aussagekraft dieser Analyse naturgemäß nur sehr eingeschränkt. Trotzdem konnten für die Expression von VEGF A und MMP-12 ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit einer gemessenen unterdurchschnittlichen mRNS-Expression im Tumor nach Chemotherapie ermittelt werden. Sowohl die Expression von VEGF A als auch von MMPs ist als prognostisch relevanter Marker für verschiedene solide Tumore und das Bronchialkarzinom beschrieben (Pajares et al., 2012 und Peng et al., 2012).

Es finden sich jedoch nur wenig Daten in der Literatur, inwiefern eine modifizierte Expression entsprechender Marker möglicherweise einen Hinweis auf das Ansprechen einer Therapie geben könnte (Liang et al., 2004 und Nishioka et al., 2011).

Darüber hinaus lassen die eigenen Untersuchungen letztlich offen, ob es sich um eine regulierte Expression der gemessenen Parameter durch die Chemotherapie handelt oder ob es sich um eine grundsätzlich tumorspezifische Expression von beispielsweise VEGF A handelt. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine niedrige Expression von VEGF A beim NSCLC mit einer schlechten Prognose

vergesellschaftet ist (Farhat et al., 2012).

Um die Relevanz der erhobenen Daten zu überprüfen, wäre eine Analyse mit einer höheren Fallzahl wünschenswert, die den Einschluss mehrerer behandelnder Zentren notwendig macht. Sollten sich bei den durchgeführten Untersuchungen prognostische Untergruppen beim NSCLC ermitteln lassen, stellt sich natürlich die Frage nach der therapeutischen Relevanz. So könnte beispielsweise bei dieser Patientengruppe die Chemotherapie um eine Radiotherapie erweitert werden. Aber vor allem bei Patienten mit einer VEGF A „Antwort“ auf eine „konventionelle“ Chemotherapie könnte eine Behandlung mit einem VEGF A neutralisierenden Antikörper (bspw. Bevacizumab) erwogen werden.

5 Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom zeichnet sich durch eine hohe Malignität und eine ausgeprägte Chemotherapieresistenz aus. Der klinische Erfolg von Standardchemotherapieprotokollen ist daher immer noch limitiert und die damit in Verbindung stehende Prognose sehr ungünstig.

Für die zur Behandlung des Bronchialkarzinoms häufig verwendeten Zytostatika wie Cisplatin, Etoposid, Gemcitabin, Paclitaxel und 5-Fluorouracil konnten im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Effekte auf humane NSCLC-Zellen (BEN, KNS62 wt und KNS Bcl-xL) nachgewiesen werden. In *in vitro* Analysen wurden in Dosisescalationsuntersuchungen die verschiedenen Effektivdosierungen für die verschiedenen Zytostatika bei unterschiedlichen humanen Bronchialkarzinom-Tumorzelllinien ermittelt. In weiterführenden Zellzyklusanalysen mittels Propidiumjodid-Durchflusszytometrie wurde der Einfluss der verschiedenen Zytostatika auf den Zellzyklus und die Apoptoseinduktion quantifiziert, der sowohl Substanz- als auch Dosisvariabel war.

Mittels Breitspektrum-Multiplex-FACS-Analysen wurde im zellulären Überstand von Chemotherapie behandelten, humanen Bronchialkarzinomzellen die Regulation der Sekretion von sechs verschiedenen inflammationsassoziierten Proteinen (IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , VEGF A und Angiogenin) nachgewiesen. In ELISA-Untersuchungen wurden diese Ergebnisse für IL-8 in Dosisescalationsuntersuchungen genauer quantifiziert und präzisiert. In *in vitro* Invasionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Chemotherapie (Gemcitabin und 5-Fluorouracil) in der Lage ist, die Invasivität der Tumorzellen zu steigern.

In Tumorproben aus einem orthotopen, xenogenen SCID-bg Mausmodell, die entweder chemotherapienaiv bzw. chemotherapeutisch vorbehandelt waren, wurde aus der isolierten zellulären mRNA in semiquantitativen RT-PCR-Analysen die mRNA-Expression von sieben verschiedenen inflammationsassoziierten Genen (IL-8, uPA, VEGF A, TNF- α , MMP-2, -7, und -9) untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass

das quantitative Expressionsniveau durch eine chemotherapeutische Vorbehandlung in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie relevant modifiziert wurde. Eine entsprechende Analyse wurde im Anschluss an 23 neoadjuvant vorbehandelten, humanen NSCLC-Tumorproben in Relation zu 15 unbehandelten Tumorproben durchgeführt (alle Proben entsprechend UICC Tumorstadium IIIA). Das genannte mRNS-Genprofil wurde um MMP-12 ergänzt, analysiert und die relative Expression quantifiziert. Anschließend wurde eine vergleichende Analyse des Langzeitüberlebens der Patienten nach Kaplan-Meier durchgeführt. Das neoadjuvant behandelte Patientenkollektiv wurde in Tumore mit einer relativ oberhalb bzw. unterhalb des Medians gelegenen mRNS-Genexpression geteilt und gegenübergestellt.

Auf Grund der geringen Patientenzahl (n=23) konnte nur ein Trend hinsichtlich einer günstigeren Prognose für Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie mit NSCLC-Tumoren mit einem überdurchschnittlichen mRNS-Nachweis für IL-8, uPA, VEGF A und MMP-12 gezeigt werden.

Zusammenfassend wurde in *in vitro* Analysen gezeigt, dass verschiedene Chemotherapeutika Einfluss auf die Expression von inflammationsassoziierten Genen bei NSCLC-Tumorzellen nehmen. Dieses ist substanz-, tumorzellsensitivitäts- und konzentrationsabhängig. Der Effekt konnte auf mRNS-Ebene *in vivo* sowohl in einem Tiermodell als auch an menschlichen Tumorproben auf mRNS-Ebene verifiziert werden. Die biologische Relevanz dieser Effekte muss in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden. Dennoch deuten die Ergebnisse aus den humanen Tumorproben auf eine Prognose relevante Bedeutung hin.

6 Literaturverzeichnis

A

Aggarwal, B.B. 2004. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*. 6:203-8.

Aggarwal, B.B., S. Shishodia, S.K. Sandur, M.K. Pandey, and G. Sethi. 2006. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*. 72:1605-21.

B

Balkwill, F. 2002. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*. 13:135-41.

Balkwill, F., and A. Mantovani. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 357:539-45.

Beckmann, H.J. 2006. [Surgical practice in an integrated physician network]. *Chirurg. Suppl*: 237-40.

Bhola, N.E., J.M. Balko, T.C. Dugger, M.G. Kuba, V. Sanchez, M. Sanders, J. Stanford, R.S. Cook, and C.L. Arteaga. 2013. TGF-beta inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest*. 123:1348-58.

Boukovinas, I., C. Papadaki, P. Mendez, M. Taron, D. Mavroudis, A. Koutsopoulos, M. Sanchez-Ronco, J.J. Sanchez, M. Trypaki, E. Staphopoulos, V. Georgoulas, R. Rosell, and J. Souglakos. 2008. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One*. 3:e3695.

Breathnach, O.S., B. Freidlin, B. Conley, M.R. Green, D.H. Johnson, D.R. Gandara, M. O'Connell, F.A. Shepherd, and B.E. Johnson. 2001. Twenty-two years of phase III trials for patients with advanced non-small-cell lung cancer: sobering results. *J Clin Oncol.* 19:1734-42.

C

Chetty, C., J.S. Rao, and S.S. Lakka. 2011. Matrix metalloproteinase pharmacogenomics in non-small-cell lung carcinoma. *Pharmacogenomics.* 12:535-46.

Coussens, L.M., and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420:860-7.

Coventry, B.J., and M.L. Ashdown. 2012. Complete clinical responses to cancer therapy caused by multiple divergent approaches: a repeating theme lost in translation. *Cancer Manag Res.* 4:137-49.

D

d'Amato, T.A., R.J. Landreneau, R.J. McKenna, R.S. Santos, and R.J. Parker. 2006. Prevalence of in vitro extreme chemotherapy resistance in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 81:440-6; discussion 446-7.

Dimitroulis, J., and G.P. Stathopoulos. 2005. Evolution of non-small cell lung cancer chemotherapy (Review). *Oncol Rep.* 13:923-30.

E

Egeblad, M., and Z. Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2:161-74.

Ellison, M., D. Woodhouse, C. Hillyard, M. Dowsett, R.C. Coombes, E.D. Gilby, P.B. Greenberg, and A.M. Neville. 1975. Immunoreactive calcitonin production by human lung carcinoma cells in culture. *Br J Cancer.* 32:373-9.

Evans, T. 2005. Chemotherapy in advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Semin Respir Crit Care Med.* 26:304-313.

F

Farhat, F.S., A. Tfayli, N. Fakhruddin, R. Mahfouz, Z.K. Otrrock, R.S. Alameddine, A.H. Awada, and A. Shamseddine. 2012. Expression, prognostic and predictive impact of VEGF and bFGF in non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 84:149-60.

Farrow, B., Y. Sugiyama, A. Chen, E. Uffort, W. Nealon, and B. Mark Evers. 2004. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg.* 239:763-9; discussion 769-71.

G

Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 159:109-13.

Gingis-Velitski, S., D. Loven, L. Benayoun, M. Munster, R. Bril, T. Voloshin, D. Alishekevitz, F. Bertolini, and Y. Shaked. 2011. Host response to short-term, single-agent chemotherapy induces matrix metalloproteinase-9 expression and accelerates metastasis in mice. *Cancer Res.* 71:6986-96.

Gioulbasanis, I., A. Patrikidou, K. Kitikidou, K. Papadimitriou, P.J. Vlachostergios, C. Tsatsanis, A.N. Margioris, C.N. Papandreou, D. Mavroudis, and V. Georgoulas. 2012. Baseline plasma levels of interleukin-8 in stage IV non-small-cell lung cancer patients: relationship with nutritional status and prognosis. *Nutr Cancer.* 64:41-7.

H

Heintz, K. 2007. Mechanismen und Effizienz einer Histon-Deacetylase-Inhibitor-modifizierten Chemotherapie beim humanen Bronchialkarzinom. *Med. Diss. Kiel.*

Hida, T., Y. Ariyoshi, M. Kuwabara, T. Sugiura, T. Takahashi, T. Takahashi, K. Hosoda, Y. Niitsu, and R. Ueda. 1993. Glutathione S-transferase pi levels in a panel of lung cancer cell lines and its relation to chemo-radiosensitivity. *Jpn J Clin Oncol.* 23:14-9. Hotta, K., K. Matsuo, H. Ueoka, K. Kiura, M. Tabata, and M. Tanimoto. 2004. Meta-analysis of randomized clinical trials comparing Cisplatin to Carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 22:3852-9.

J

Jemal, A., R.C. Tiwari, T. Murray, A. Ghafoor, A. Samuels, E. Ward, E.J. Feuer, and M.J. Thun. 2004. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 54:8-29.

Jiang, J., X. Liang, X. Zhou, R. Huang, Z. Chu, and Q. Zhan. 2013. Non-platinum doublets were as effective as platinum-based doublets for chemotherapy-naive advanced non-small-cell lung cancer in the era of third-generation agents. *J Cancer Res Clin Oncol.* 139:25-38.

Jordan, M.A. 2002. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2:1-17.

K

Kanzawa, F., Y. Sugimoto, K. Minato, K. Kasahara, M. Bungo, K. Nakagawa, Y. Fujiwara, L.F. Liu, and N. Saijo. 1990. Establishment of a camptothecin analogue (CPT-11)-resistant cell line of human non-small cell lung cancer: characterization and mechanism of resistance. *Cancer Res.* 50:5919-24.

Kitadai, Y. 2009. Cancer-Stromal Cell Interaction and Tumor Angiogenesis in Gastric Cancer. *Cancer Microenviron.*

Komori, A., J. Yatsunami, M. Suganuma, S. Okabe, S. Abe, A. Sakai, K. Sasaki, and H. Fujiki. 1993. Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res.* 53:1982-5.

Kurdow, R., B. Schniewind, S. Zoefelt, L. Boenicke, A.S. Boehle, P. Dohrmann, and H. Kalthoff. 2005. Apoptosis by gemcitabine in non-small cell lung cancer cell line KNS62 is induced downstream of caspase 8 and is profoundly blocked by Bcl-xL over-expression. *Langenbecks Arch Surg.* 390:243-8.

L

Li, S.Z., K. Li, J.H. Zhang, and Z. Dong. 2013. The effect of quercetin on doxorubicin cytotoxicity in human breast cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 13:352-5.

Liang, Y., L. O'Driscoll, S. McDonnell, P. Doolan, I. Oglesby, K. Duffy, R. O'Connor, and M. Clynes. 2004. Enhanced in vitro invasiveness and drug resistance with altered gene expression patterns in a human lung carcinoma cell line after pulse selection with anticancer drugs. *Int J Cancer.* 111:484-93.

Lirk, P., G. Hoffmann, and J. Rieder. 2002. Inducible nitric oxide synthase—time for reappraisal. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 1:89-108.

Luca, M., S. Huang, J.E. Gershenwald, R.K. Singh, R. Reich, and M. Bar-Eli. 1997. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol.* 151:1105-13.

Lynch, T.J., T. Patel, L. Dreisbach, M. McCleod, W.J. Heim, R.C. Hermann, E. Paschold, N.O. Iannotti, S. Dakhil, S. Gorton, V. Pautret, M.R. Weber, and D. Woytowicz. 2010. Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. *J Clin Oncol.* 28:911-7.

M

Manegold, C., J. Pawel, P. Zatloukal, R. Ramlau, V. Gorbounova, V. Hirsh, I.N. Leigh, J. Mezger, and V. Archer. 2008. BO17704 (AVAIL): A Phase III randomized study of first-line bevacizumab combined with cis-platin/gemcitabine (CG) in patients (pts) with advanced or recurrent non-squamous, non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol.* 19.

Mantovani, A. 2005. Cancer: inflammation by remote control. *Nature*. 435:752-3.

Matsumoto, Y., M. Oka, A. Sakamoto, F. Narasaki, M. Fukuda, H. Takatani, K. Terashi, K. Ikeda, J. Tsurutani, S. Nagashima, H. Soda, and S. Kohno. 1997. Enhanced expression of metallothionein in human non-small-cell lung carcinomas following chemotherapy. *Anticancer Res*. 17:3777-80.

Miller, Y.E. 2005. Pathogenesis of lung cancer: 100 year report. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 33:216-23.

Morgillo, F., and H.Y. Lee. 2005. Resistance to epidermal growth factor receptor-targeted therapy. *Drug Resist Updat*. 8:298-310.

N

Narita, D., E. Seclaman, R. Ilina, N. Cireap, S. Ursoniu, and A. Anghel. 2011. ADAM12 and ADAM17 gene expression in laser-capture microdissected and non-microdissected breast tumors. *Pathol Oncol Res*. 17:375-85.

Nishioka, M., M. Shimada, N. Kurita, T. Iwata, S. Morimoto, K. Yoshikawa, J. Higashijima, and T. Miyatani. 2011. Gene expression profile can predict pathological response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 8:87-92.

O

Olaussen, K.A., A. Dunant, P. Fouret, E. Brambilla, F. Andre, V. Haddad, E. Taranchon, M. Filipits, R. Pirker, H.H. Popper, R. Stahel, L. Sabatier, J.P. Pignon, T. Tursz, T. Le Chevalier, and J.C. Soria. 2006. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin- based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 355:983-91.

P

Pajares, M.J., J. Agorreta, M. Larrayoz, A. Vesin, T. Ezponda, I. Zudaire, W. Torre, M.D. Lozano, E. Brambilla, C. Brambilla, Wistuba, II, C. Behrens, J.F. Timsit, R. Pio, J.K. Field, and L.M. Montuenga. 2012. Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol.* 30:1129-36.

Park, J.O., S.W. Kim, J.S. Ahn, C. Suh, J.S. Lee, J.S. Jang, E.K. Cho, S.H. Yang, J.H. Choi, D.S. Heo, S.Y. Park, S.W. Shin, M.J. Ahn, J.S. Lee, Y.H. Yun, J.W. Lee, and K. Park. 2007. Phase III trial of two versus four additional cycles in patients who are nonprogressive after two cycles of platinum-based chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 25:5233-9.

Peng, W.J., J.Q. Zhang, B.X. Wang, H.F. Pan, M.M. Lu, and J. Wang. 2012. Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 expression in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Chim Acta.* 413:1121-6.

Pikarsky, E., R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, and Y. Ben-Neriah. 2004. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 431:461-6.

Pirker, R., J.R. Pereira, A. Szczesna, J. von Pawel, M. Krzakowski, R. Ramlau, I. Vynnychenko, K. Park, C.T. Yu, V. Ganul, J.K. Roh, E. Bajetta, K. O'Byrne, F. de Marinis, W. Eberhardt, T. Goddemeier, M. Emig, and U. Gatzemeier. 2009. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet.* 373:1525-31.

Pold, M., L.X. Zhu, S. Sharma, M.D. Burdick, Y. Lin, P.P. Lee, A. Pold, J. Luo, K. Krysan, M. Dohadwala, J.T. Mao, R.K. Batra, R.M. Strieter, and S.M. Dubinett. 2004. Cyclooxygenase-2-dependent expression of angiogenic CXC chemokines ENA-78/CXC Ligand (CXCL) 5 and interleukin-8/CXCL8 in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 64:1853-60.

R

Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). 2010. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe: 48-51.

Rösler, J., and H. Weitowitz. 1993. Asbesteinwirkung am Arbeitsplatz und Sterblichkeit an bösartigen Tumoren in der Bundesrepublik Deutschland.

Rossi, A., M. Di Maio, P. Chiodini, R.M. Rudd, H. Okamoto, D.V. Skarlos, M. Fruh, W. Qian, T. Tamura, E. Samantas, T. Shibata, F. Perrone, C. Gallo, C. Gridelli, O. Martelli, and S.M. Lee. 2012. Carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy in first-line treatment of small-cell lung cancer: the COCIS meta-analysis of individual patient data. *J Clin Oncol.* 30:1692-8.

S

Saijo, Y., M. Tanaka, M. Miki, K. Usui, T. Suzuki, M. Maemondo, X. Hong, R. Tazawa, T. Kikuchi, K. Matsushima, and T. Nukiwa. 2002. Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. *J Immunol.* 169:469-75.

Sandler, A., R. Gray, M.C. Perry, J. Brahmer, J.H. Schiller, A. Dowlati, R. Lilenbaum, and D.H. Johnson. 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 355:2542-50.

Sève, P., and C. Dumontet. 2005. Chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 5:73-88.

Sève, P., J. Mackey, S. Isaac, O. Tredan, P.J. Souquet, M. Perol, R. Lai, A. Voloch, and C. Dumontet. 2005. Class III beta-tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. *Mol Cancer Ther.* 4:2001-7.

Shishodia, S., and B.B. Aggarwal. 2004. Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer? *Biochem Pharmacol.* 68:1071-80.

Smith, I.E., M.E. O'Brien, D.C. Talbot, M.C. Nicolson, J.L. Mansi, T.F. Hickish, A. Norton, and S. Ashley. 2001. Duration of chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a randomized trial of three versus six courses of mitomycin, vinblastine, and cisplatin. *J Clin Oncol.* 19:1336-43.

Socinski, M.A., R. Crowell, T.E. Hensing, C.J. Langer, R. Lilenbaum, A.B. Sandler, and D. Morris. 2007. Treatment of non-small cell lung cancer, stage IV: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 132:277S-289S.

Socinski, M.A., M.J. Schell, A. Peterman, K. Bakri, S. Yates, R. Gitten, P. Unger, J. Lee, J.H. Lee, M. Tynan, M. Moore, and M.S. Kies. 2002. Phase III trial comparing a defined duration of therapy versus continuous therapy followed by second-line therapy in advanced-stage IIIB/ IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 20:1335-43. Sorenson, S., B. Glimelius, and P. Nygren. 2001. A systematic overview of chemotherapy effects in non-small cell lung cancer. *Acta Oncol.* 40:327-39.

Sparmann, A., and D. Bar-Sagi. 2004. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell.* 6:447-58.

Stewart, D.J. 2010. Tumor and Host Factors That May Limit Efficacy of Chemotherapy in Non-Small Cell and Small Cell Lung Cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 75:173-234.

T

Takaki, T. 1980. An epithelial cell line (KNS-62) derived from a brain metastasis of bronchial squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 96:27-33.

V

Vilmar A.C., Santoni-Rugiu E., Sorensen J.B. 2013. Predictive impact of RRM1 protein expression on vinorelbine efficacy in NSCLC patients randomly assigned in a chemotherapy phase III trial. *Ann Oncol.* 24(2):309-14.

von Plessen, C., B. Bergman, O. Andresen, R.M. Bremnes, S. Sundstrom, M. Gilleryd, R. Stephens, J. Vilsvik, U. Aasebo, and S. Sorenson. 2006. Palliative chemotherapy beyond three courses conveys no survival or consistent quality-of-life benefits in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 95:966-73.

W

Wang, G., E. Reed, and Q.Q. Li. 2004. Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Rep.* 12:955-65.

Wang, J., M. Huang, P. Lee, K. Komanduri, S. Sharma, G. Chen, and S.M. Dubinett. 1996. Interleukin-8 inhibits non-small cell lung cancer proliferation: a possible role for regulation of tumor growth by autocrine and paracrine pathways. *J Interferon Cytokine Res.* 16:53-60.

Wang, Q., P.C. Wu, D.Z. Dong, I. Ivanova, E. Chu, S. Zeliadt, H. Vesselle, and D.Y. Wu. 2013. Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape. *Int J Cancer.* 132:1505-15.

Waugh, D.J., and C. Wilson. 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 14:6735-41.

Wiethage, T., B. Voss, and K.M. Muller. 1994. [Oncogenes and tumor suppressor genes in the pathogenesis of lung tumors]. *Pathologe.* 15:321-30.

Wilson, C., C. Purcell, A. Seaton, O. Oladipo, P.J. Maxwell, J.M. O'Sullivan, R.H. Wilson, P.G. Johnston, and D.J. Waugh. 2008. Chemotherapy-induced CXC-chemokine/CXC- chemokine receptor signaling in metastatic prostate cancer cells confers resistance to oxaliplatin through potentiation of nuclear factor-kappaB transcription and evasion of apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 327:746-59.

World-Health-Organisation. 1999. *The World Health Report 1999: Making a Difference.* 65-80.

X

Xu, L. and Fidler, I. J. 2000. Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 60:4610-6.

Xu, Y., and M.A. Villalona-Calero. 2002. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann Oncol.* 13:1841-51.

7 Anhang

7.1 Material, Chemikalien und Geräte

Tab. 7: Zellkultur

Accutase	PAA Pasching Laboratories GmbH, Pasching
Fötiales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
L - Glutamin, 100-fach konzentriert	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Na - Pyruvat, 100-fach konzentriert	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco's	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Zellkultur - Medium	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin 0,05 % - EDTA 0,02 %	PAA Pasching Laboratories GmbH, Pasching

Tab. 8: Zelllinien

BEN	Humaner NSCLC (Ellison et al., 1975)
KNS62-Bcl-xL	Transduziert mit pBate - Bcl-xL
KNS62 wt	Gehirnmetastase, squamöser NSCLC (Taki, 1980)

Tab. 9: Chemotherapie

5 - Fluorouracil	medac GmbH, Hamburg
Cisplatin	TEVA GmbH, Ulm
Etoposid	Gry Pharma GmbH, Kirchzarten
Gemcitabin	Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg
Paclitaxel	medac GmbH, Hamburg

Tab. 10: Kristallviolett

Kristallviolett	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt

Tab. 11: Propidiumiodid-Durchflusszytometrie

Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
RNase A	Boehringer, Mannheim

Tab. 12: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Block-Puffer	
1 % BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5 % Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
0,05 % NaN ₃	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
5 % Sucrose	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
DuoSet IL8-ELISA	
Capture Antibody	
Standard Solution (IL-8)	
Detection Antibody	R&D Systems, Inc., Abingdon, UK
Streptavidin-HRP	
Glo Substrate Reagent Pack	
Human TNF-α DuoSet	
Capture Antibody	
Standard Solution (TNF- α)	
Detection Antibody	R&D Systems, Inc., Abingdon, UK
Streptavidin-HRP	
Glo Substrate Reagent Pack	
PBS (pH 7,2-7,4)	
137 mM NaCl	
2,7 mM KCl	Merck, Darmstadt
8,1 mM Na ₂ HPO ₄	
1,5 mM KH ₂ PO ₄	
Reagenz diluent (pH 7,2-7,4)	
0,1 % BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
0,05 % Tween20	Merck, Hohenbrunn
Tris Ultra Qualität Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Stop Solution	
H ₂ SO ₄ 2,5 mol/l	Merck, Darmstadt
Waschpuffer (pH 7,2-7,4)	
0,05 % Tween20	Merck, Hohenbrunn
PBS	

Tab. 13: *Multiplex-Bead-Array*

Human Inflammatory Cytokines Kit	Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
Cytometric Bead Array (CBA)	San Jose, USA

Tab. 14: *Quantitative Echtzeit-PCR-Analysen*

AllPrep DNA/RNA Mini Kit				
DNA Mini Spin Columns				
RNeasy Mini Spin Columns				
Puffer RLT Plus				
Puffer RW ₁				
Puffer RPE				
QIAGEN GmbH, Hilden				
RNase-Free Water				
Puffer AW ₁				
Puffer AW ₂				
Puffer EB				
dNTPs				
PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen				
Ethanol				
Merck, Darmstadt				
LightCycler Kit	FastStart	DNA	Master	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
SYBR Green I				
Random Hexamer				
Applied Biosystems, Darmstadt				
RNase Inhibitor				
Applied Biosystems, Darmstadt				
RNase-Free DNase Set				
DNase I, RNase-Free (lyophilized)				
QIAGEN GmbH, Hilden				
RNase-Free Water				
β-Mercaptoethanol				
Merck, Darmstadt				
Superscript				
5 x Puffer				
Invitrogen GmbH, Karlsruhe				
DTT				

Tab. 15: *Invasionsanalysen*

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypan-Blau	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tab. 16: Tiermodell: verwendete Medikamente und Materialien

Anexate® (Flumazenil)	Roche, Grenzach-Wyhen
Antisedan® (Atipamezol)	Pfizer, Karlsruhe
Dormicum® (Midazolam)	Roche, Grenzach-Wyhen
Dormitor® (Medetomidin)	Pfizer, Karlsruhe
Fentanyl	medac GmbH, Janssen-Cilag, Neuss
Naloxon	CuraMed, Karlsruhe
Phenylbutyrat	Apotheke des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
1-ml-Spritze	BD, Heidelberg
Alzet osmotische Minipumpe, Modell 2002	Alzet, Cupertino, USA
Bacillol® AF	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Band Aid	Johnson & Johnson, Skipton, England
Einmalrasierer	Kaimedical, Solingen
Einstreu SNIFF	Spezialdiäten GmbH, Soest
Futter bestrahlt für Ratten und Mäuse	Altromin, Lage
Glukose 5 Braun	Braun, Melsungen
Insulinspritzen U-40, 1 ml, 291/2	BD, Heidelberg
GA/0,33 x 12,7 mm Isotone Natriumchloridlösung 0,9 % Braun	Braun, Melsungen
Kanülen 27 GA, 0,4 x 19	BD, Heidelberg
Laminar-Airflow-Schrank	Scanbur, Koge, Dänemark
Latex OP-Handschuhe	Gammex PF, Ansell, Malaysia
Makrolonkäfige Typ III mit Filtertops	Scanbur, Koge, Dänemark
Matrigel TM Basement Membrane Matrix	BD, Heidelberg
Mikro-Nadelhalter nach Müller FM 061 R	Aesculap, Tuttlingen
Mikro-Pinzette mit 1 x 2 Zähnen nach Müller FM 034R	Aesculap, Tuttlingen
Mikro-Pinzette mit Ring 1,2 mm nach Müller FM 035R	Aesculap, Tuttlingen
Mullkompressen 10 x 10 cm	Hartmann, Heidenheim
Mullkompressen 6 x 6 cm	NOBA Verbandsmittel, Wetter
Natürliches Mineralwasser	Fürst Bismarck Quelle, Aumühle
OP-Abdecktücher	Mölnlycke Health Care Oy Fin, Finnland
OP-Haube	Johnson & Johnson, Norderstedt
OP-Maske	Johnson & Johnson, Norderstedt

Präzisionswaage Explorer 1	Merck, Hamburg
Schere, fein, gerade, BC 060R	Aesculap, Tuttlingen
Sicherheitswerkbank Typ SAFE, Klasse II, HB 2448	Scanbur, Dänemark
Trinkflaschen 250 ml	Scanbur, Koge, Dänemark
Vicryl 6/0, 0,7 metric	Ethicon, Hamburg
Wattestäbchen mit kleinem Kopf	Beese, Barsbüttel

Tab. 17: weitere Materialien und Geräte

1,8 ml Cryo-Röhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
15 ml Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Brutschrank Heraeus CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Combitips plus (0,5 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Einfrierbox Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific (Nalgene), Langenselbold
Eppendorf Multipipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorffraktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
FacsScan	Becton Dickinson, Heidelberg
Falconröhrchen 50 ml	Falcon – GmbH, Gräfeling-Locham
Feather Mikrotomklingen	pfm AG, Deutschland
Gefrierschrank Liebherr Comfort (-20 °C)	Liebherr AG, Ochsenhausen
Gefrierschrank Typ Nuaire	Zapf Instrumente, Sarstedt
Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
LightCycler II	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Lysing Matrix A Tubes	MP Biomedicals, LLC, Solon, USA
Maxisorp-Platte	Nunc, Roskilde, Dänemark
Menzel Gläser Super Frost Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Mikrostat-Cryotom HM 500 OM	Mikrom Laborgeräte GmbH, Walldorf
Mycoplasma Detektion Kit	Takara Bio INC., Japan
Pipetboy acu Integra	Bioscience, Fernwald
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Ebersdorf
Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
PRECELLYS 24 (Schredder-Zentrifuge)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

ProgRes C10 plus, Digitalkamera	Jenoptik Laser Optik Systeme GmbH, Deutschland
ProgRes Capture Pro 2,5, Software	Jenoptik Laser Optik Systeme GmbH, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Ritips, steril, 0,5 ml und 5 ml	Ritter, Schwabmünchen
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sunrise remote Touch Screen Photometer	Tecan Trading AG, Austria
Thermo Cycler	Biometra GmbH, Göttingen
Wasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
<i>well</i> -Platten (6-, 24-, 96- <i>well</i>)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Workbench Typ Hera safe	Heraeus, Hanau
Zeiss Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Zellkulturflaschen T75 cm ² und T175 cm ²	Merck, Darmstadt
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Eppendorf mini spin plus	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen	Eppendorf AG, Hamburg

7.2 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die maßgeblich am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren. Durch deren fortwährende Betreuung, Beratung, Unterstützung und zahlreiche Diskussionen diese Arbeit für mich zu etwas Besonderem haben werden lassen.

Mein Dank gebührt Herrn Professor Holger Kalthoff, wissenschaftlicher Direktor des Krebszentrum Nord und Leiter der Sektion Molekulare Onkologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe der Sektion Molekulare Onkologie sowie für die beständige Unterstützung wie auch für die Überlassung dieses Promotionsthemas. Ebenfalls danke ich Frau Privatdozentin Anna Trauzold und Herrn Doktor Christian Röder für die gute und meist harmonische Zusammenarbeit und vermittelte Arbeitsatmosphäre im Labor. Ein besonderer Dank gilt Frau Angelika Duttmann, Frau Alexandra Sieger und Frau Bianca Zinke für die stets kompetente und freundliche Einführung in die wissenschaftlichen Arbeitstechniken, die Geduld bei der Beantwortung diesbezüglicher Fragen und die aufmunternden Worte in erfolglosen Phasen der experimentellen Arbeit. Die gemeinsame Zeit wird mir stets als etwas Besonderes in Erinnerung bleiben.

Vor allem aber möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Bodo Schniewind, Chefarzt der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Städtischen Klinikums Lüneburg, danken. Trotz seiner fordernden klinischen Tätigkeit hatte er über die Jahre immer

ein offenes Ohr für jede Art von Fragen und Problemen. Ich möchte mich auch für die hervorragende Betreuung, das Engagement und die freundschaftliche Aufmunterung, sowohl in klinischen als auch in nicht-klinischen Bereichen, die für das Fortkommen dieser Arbeit, aber auch meiner persönlichen Entwicklung von unschätzbarem Wert waren, bedanken.

Außerordentlichen Dank schulde ich meiner Frau Eva und meinen Freunden Pamela, Lena, Markus und Martin, die mir in allen Phasen dieser Arbeit die nötige Entschlossenheit, Kraft und Zeit gegeben haben. Ohne meine Eltern, Bernd und Beatrix, hätte es diese Arbeit sicherlich niemals gegeben. Ihnen danke ich von ganzem Herzen.

7.3 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Julius Philipp Hüsecken
Anschrift: Feldstr. 13, 21335 Lüneburg
Geburtstag/-ort: 06. Januar 1983 in Iserlohn

Weiterbildung

08/2012 - heute Weiterbildungsassistent für Viszeralchirurgie in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- & Thoraxchirurgie, Städtisches Klinikum Lüneburg

07/2010-07/2012 Weiterbildungsassistent für Viszeralchirurgie in der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie, Campus Kiel, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

Studium

05/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02/2009-01/2010

1. Tertial des Praktischen Jahres: Chirurgie am UK-SH Kiel
2. Tertial des Praktischen Jahres: Anästhesie am WKK
3. Tertial des Praktischen Jahres: Innere am KKH Rendsburg

- 09/2008 Vortrag auf der 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie mit dem Thema: „Chemotherapieinduzierte Tumorprogression beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom?“
- 05/2007-07/2007 Hilfwissenschaftler in der Sektion Molekulare Onkologie am UK-SH, Campus Kiel
- seit 02/2007 Dissertation mit dem Thema: „Chemotherapieinduzierte Inflammation beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom: Untersuchungen zur *in vitro* und *in vivo* Relevanz“
- 08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 10/2003 Studienbeginn der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung

- 08/1993-06/2002 Städtisches Gymnasium Hohenlimburg in Hagen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife im Juni 2002
- 08/1989-07/1993 Grundschule Wesselbach in Hagen

7.4 Abstracts

Hüsecken P., Schulte T., Egberts J., Kurdow R., Dohrmann P., Kalthoff H., Schniewind B. (2008) Chemotherapie-induzierte Tumorprogression beim NSCLC? *17. Jahrestagung DGT, Bremen*

Schniewind B., **Hüsecken P.**, Schulte T., Egberts J., Schafmayer C., Kurdow R., Dohrmann P., Kalthoff H. (2009) Chemotherapie-induzierte Inflammation beim NSCLC: Fluch oder Segen? *126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München*

World Lung Accepted Abstract ID P1.118: Chemotherapy induced inflammatory markers and relevance for prognosis and response in resected stage IIIA. Poster Session, Monday July 4, 2011: 12:15 PM - 2:15 PM CEST. **P. Huesecken** - Presenter. *International Association for the Study of Lung Cancer's (IASLC) 14th World Conference on Lung Cancer (WCLC), Amsterdam, The Netherlands. July 3-7, 2011.*

Hüsecken P., Ammerpohl O., Rose T., Egberts J.H., Schafmayer C., Becker T., Kalthoff H., Schniewind B. (2011) Der Sirtuin-Inhibitor Sirtinol hemmt effektiv das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen in vitro und in vivo *Viszeralmedizin 2011, 14. – 17. September 2011, CCL Leipzig*