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

Kiel 2014
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 Inflam-
  mation ................................................................. 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 Immunosorbert Assay .................................... 13
  2.7 Invasionsanalysen ........................................................... 14
  2.8 Orthotopes Tiermodell ...................................................... 15
  2.9 Humane Tumoproben ........................................................ 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 In vitro 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
<table>
<thead>
<tr>
<th>Chapter</th>
<th>Section</th>
<th>Page</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>3.4.1</td>
<td>Orthotopes Tiermodell</td>
<td>37</td>
</tr>
<tr>
<td>3.4.2</td>
<td>Humane Tumorproben</td>
<td>38</td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>Diskussion</td>
<td>41</td>
</tr>
<tr>
<td>4.1</td>
<td>In vitro Analysen zu Chemosensibilität</td>
<td>41</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2</td>
<td>Analysen an Tumorproben aus einem murinen Tiermodell</td>
<td>44</td>
</tr>
<tr>
<td>4.3</td>
<td>Humane Tumorproben</td>
<td>45</td>
</tr>
<tr>
<td>5</td>
<td>Zusammenfassung</td>
<td>48</td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>Literaturverzeichnis</td>
<td>50</td>
</tr>
<tr>
<td>7</td>
<td>Anhang</td>
<td>61</td>
</tr>
<tr>
<td>7.1</td>
<td>Material, Chemikalien und Geräte</td>
<td>61</td>
</tr>
<tr>
<td>7.2</td>
<td>Danksagung</td>
<td>67</td>
</tr>
<tr>
<td>7.3</td>
<td>Curriculum vitae</td>
<td>69</td>
</tr>
<tr>
<td>7.4</td>
<td>Abstracts</td>
<td>71</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Abbildungsverzeichnis

1 Kristallviolet-Assay der Zelllinie BEN ........................................ 24
2 Kristallviolet-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 Tumorstadums 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 µg/ml nach Chemotherapie über 48 Stunden ......................................................................................... 25

5 Angenäherte Effektivdosen (ED$_{20}$ und ED$_{50}$) in µg/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)


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 Lungenkrebsmerkrankungen 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-
Einleitung


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-kleinzeligen Bronchialkarzinome erfährt eine weitere Aufgliederung in Plattenepitheelkarzinome (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.

## 1 Einleitung

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Tumorstadium (UICC)</th>
<th>Primärtumor</th>
<th>Regionäre Lymphknoten</th>
<th>Fernmetastasen</th>
<th>5-Jahres-Überlebensrate (klinisches Stadium)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Okkultes Karzinom</td>
<td>Tx</td>
<td>No</td>
<td>Mo</td>
<td>50%</td>
</tr>
<tr>
<td>Stadium 0</td>
<td>Tis</td>
<td>No</td>
<td>Mo</td>
<td>50%</td>
</tr>
<tr>
<td>Stadium IA</td>
<td>T1a, T1b</td>
<td>No</td>
<td>Mo</td>
<td>43%</td>
</tr>
<tr>
<td>Stadium IB</td>
<td>T2a</td>
<td>No</td>
<td>Mo</td>
<td>36%</td>
</tr>
<tr>
<td>Stadium IIA</td>
<td>T1a, T1b</td>
<td>N1</td>
<td>Mo</td>
<td>25%</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>T2a</td>
<td>N1</td>
<td></td>
<td>7%</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>T2b</td>
<td>No</td>
<td></td>
<td>7%</td>
</tr>
<tr>
<td>Stadium IIB</td>
<td>T2b</td>
<td>N1</td>
<td>Mo</td>
<td>25%</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>T3</td>
<td>No</td>
<td></td>
<td>25%</td>
</tr>
<tr>
<td>Stadium IIIA</td>
<td>T1, T2</td>
<td>N2</td>
<td>Mo</td>
<td>19%</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>T3</td>
<td>N1-2</td>
<td></td>
<td>19%</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>T4</td>
<td>No-1</td>
<td></td>
<td>19%</td>
</tr>
<tr>
<td>Stadium IIIB</td>
<td>T4</td>
<td>N2</td>
<td>Mo</td>
<td>7%</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Jedes T</td>
<td>N3</td>
<td></td>
<td>7%</td>
</tr>
<tr>
<td>Stadium IV</td>
<td>Jedes T</td>
<td>Jedes N</td>
<td>M1</td>
<td>2%</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### 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
Einleitung

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).


1.3 Chemotherapieinduzierte Resistenz und Inflammation

Die aktuellen Chemotherapieregime des NSCLC weisen eine Ansprechraten, 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 Monaten bei ERCC1-negativen Patienten. Weitere Untersuchungen wurden zur Untereinheit M1 (RRM1), die die Ribonukleotidreduktase reguliert, und zum Brustkrebsgen 1 (BRCA1) durchgeführt.


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-glykoprotenie (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 Nukleosidanalogon Gemcitabin, dessen Wirkung durch Blockierung der DNS-Strangverlängerung besteht. Analog

1.4 Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom und tumorinduzierte Inflammation


So kann angenommen werden, dass TNF-α sich selbst im Sinne eines endogenen Tumorpromoters 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 Tumorproliferation (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 tumorassozierte 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 Tumorgenese beteiligen. Sie modulieren die Signalwege hin zu mehr Angiogenese (Pold et al., 2004).


von einer Reihe endogener Stimuli, wie oben beschrieben, aber auch von externen Kanzerogenen und inflammatorischen Stimuli über den IκB-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


2.1 Material, Geräte und Chemikalien


2.2 Zellkultur

Die Zelllinien BEN (humanes Lungenkarzinom) und KNS62-Wildtyp (squamöses 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 trypsiniert 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 15ml-Röhrchen mit 10ml kaltem RPMI-Nährmedium und einem Zusatz von 10% FCS überführt und 5 Minuten bei 1420 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 10ml RPMI mit 10% FCS aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt, in der die Zellen 24 Stunden anwuchsen.

2.3 Kristallviolett-Vitalitätsanalysen

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

2.4 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie


Die Zellen wurden in 6-well-Platten zu je 1 x 10⁵ 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, adhäsente 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 unbekannten 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


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

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

Die Fibroblasten wurden in 1 ml Medium zu 1,5 x 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 x 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


Die Inokulation der Tumorzellen erfolgte unter Anästhesie der Mäuse mit einer intraperitonealen 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 x 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 Tumorgröße und das Tumorvolumen wurden berechnet (V = Länge x Höhe x Breite x 0,5236). Die resezierten Tumoren wurden zweigeteilt und für weitere Untersuchungen sowohl kryoasserviert als auch formalinfixiert.

2.9 Humane Tumorproben


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:


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 µl β-Mercaptoethanol gemischt und dann 600 µl 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 $\geq 8000 \text{ g} \ (\geq 10000 \text{ rpm})$ 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 µl 70-prozentigem Ethanol vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt und anschließend auf eine RNeasy spin column gebracht und 15 Sekunden bei $\geq 8000 \text{ g} \ (\geq 10000 \text{ rpm})$ zentrifugiert. Der sich nun im Filter der Säule befindlichen RNS wurden 350 µl RW1-Puffer zugegeben. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei $\geq 8000 \text{ g} \ (\geq 10000 \text{ rpm})$ für 15 Sekunden, um die Membran zu reinigen. Zur Vorbeugung möglicher DNS-Verunreinigungen der Proben wurde nun eine Lösung aus 70 µl RDD–Puffer und 10 µl DNase I direkt auf die RNeasy spin column gegeben. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und bei $\geq 8000 \text{ g} \ (\geq 10000 \text{ rpm})$ für 15 Sekunden zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 500 µl RPE-Puffer zur RNeasy spin column sowie die anschließende Zentrifugation bei $\geq 8000 \text{ g} \ (\geq 10000 \text{ rpm})$ 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 aufgeregnete RNS wurde mittels 50 µl RNase-free water bei $\geq 8000 \text{ g} \ (\geq 10000 \text{ rpm})$ aus der Membran der Säule in ein steriles Eppendorf-Tube zentrifugiert. Um den Gewinn an RNS zu erhöhen, wurden die 50 µl RNase-free water erneut bei $\geq 8000 \text{ g} \ (\geq 10000 \text{ rpm})$ über die Säule zentrifugiert und in einem sterilen Eppendorf-Tube bei -80 °C gelagert.

Die zwischengelagerten AllPrep DNA Spin columns wurden nun mit 500 µl AW1-Puffer bestückt und bei $\geq 8000 \text{ g} \ (\geq 10000 \text{ rpm})$ für 15 Sekunden zentrifugiert. Im
nächsten Schritt wurden 500 µl AW2-Puffer auf die Säule geben und bei \( \geq 8000 \text{ g} \) (\( \geq 10000 \text{ rpm} \)) 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 \( \geq 8000 \text{ g} \) (\( \geq 10000 \text{ rpm} \)) für 1 Minute zentrifugiert. Damit war die DNS aus der Membran gelöst und wurde bei \(-20^\circ\text{C}\) 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
Material und Methoden


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

\[
\Delta Ct = Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}
\]

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

\[
\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{behandeltes Kollektiv}} - \Delta Ct_{\text{unbehandeltes Kollektiv}}
\]

Die relative Expression ergibt sich dann durch einsetzen der Δ∆Ct-Werte in folgende Formel:

\[
\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta \Delta Ct}
\]

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 0,5ml–Eppendorf-Tube eine Gesamtmenge von 10µl, bestehend aus der benötigten Menge an RNS und der Differenz zu 10µl mit sterilem Wasser pipettiert. Ein Tube mit 10µl 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 10µl 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

<table>
<thead>
<tr>
<th>+ RT [Faktor]</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>H₂O</td>
</tr>
<tr>
<td>5 x Puffer</td>
</tr>
<tr>
<td>DTT</td>
</tr>
<tr>
<td>dNTPs</td>
</tr>
<tr>
<td>Random Hexamer</td>
</tr>
<tr>
<td>RNase Inhibitor</td>
</tr>
<tr>
<td>Superscript</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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 in iect. 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.
### Material und Methoden

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

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


3.1 In vitro Chemoresistenz von NSCLC-Zelllinien

Im ersten Abschnitt werden die Dosiseskalationskurven zur Zytotoxizität der Chemotherapeutika dargestellt sowie die ermittelten Effektivdosen (ED$_{20}$ und ED$_{50}$). 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).
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 (ED_{20} und ED_{50}) in µg/ml nach Chemotherapie über 48 Stunden

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>BEN ED_{20} [µg/ml]</th>
<th>BEN ED_{50} [µg/ml]</th>
<th>KNS62 ED_{20} [µg/ml]</th>
<th>KNS62 ED_{50} [µg/ml]</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Cisplatin</td>
<td>0,497</td>
<td>1,989</td>
<td>0,497</td>
<td>1,989</td>
</tr>
<tr>
<td>Etoposid</td>
<td>2,495</td>
<td>9,982</td>
<td>2,495</td>
<td>9,982</td>
</tr>
<tr>
<td>Gemcitabin</td>
<td>0,023</td>
<td>0,092</td>
<td>0,008</td>
<td>0,035</td>
</tr>
<tr>
<td>Paclitaxel</td>
<td>0,022</td>
<td>0,09</td>
<td>0,002</td>
<td>0,009</td>
</tr>
<tr>
<td>5-Fluorouracil</td>
<td>0,606</td>
<td>2,426</td>
<td>0,107</td>
<td>0,428</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Tab. 5: Angenäherte Effektivdosen (ED_{20} und ED_{50}) in µg/ml nach Chemotherapie über 48 Stunden

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>BEN ED_{20} [µg/ml]</th>
<th>BEN ED_{50} [µg/ml]</th>
<th>KNS62 ED_{20} [µg/ml]</th>
<th>KNS62 ED_{50} [µg/ml]</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Cisplatin</td>
<td>0,1</td>
<td>1</td>
<td>0,1</td>
<td>1</td>
</tr>
<tr>
<td>Etoposid</td>
<td>1</td>
<td>10</td>
<td>1</td>
<td>10</td>
</tr>
<tr>
<td>Gemcitabin</td>
<td>0,01</td>
<td>1</td>
<td>0,01</td>
<td>0,1</td>
</tr>
<tr>
<td>Paclitaxel</td>
<td>0,01</td>
<td>0,1</td>
<td>0,01</td>
<td>0,1</td>
</tr>
<tr>
<td>5-Fluorouracil</td>
<td>0,1</td>
<td>1</td>
<td>0,1</td>
<td>1</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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 ED_{50} 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.
**Ergebnisse**

**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 inflammationsassoziierter 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)

Beim 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 ED$_{20}$ von Etoposid eine Herabregulation des IL-8–Spiegels und für Etoposid (ED$_{50}$), 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-Un tersuchungen 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).

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 µg/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 µg/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 µg/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 µg/ml). Analog zum Verhalten der Zelllinie BEN bei Behandlung mit Gemcitabin zeigte sich im unteren Behandlungsbereich (0,001 µg/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 ED$_{20}$ und 0,59 ng/ml bei der ED$_{50}$ von Paclitaxel sowie 0,96 ng/ml bei der ED$_{20}$ und 0,74 ng/ml bei der ED$_{50}$ bei 5-FU.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, bewirkte die zytostatische Behandlung der Zelllinie KNS62 wt eine allgemeine Verminderung der Sekretion von TNF-α in den zellulären Überstanden. 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 ED$_{50}$ von Etoposid bewirkte eine Inhibition der
Ergebnisse

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

**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 ED<sub>20</sub> (1,23 ng/ml) und die Behandlungen mit 5-FU (ED<sub>20</sub> 1,01 ng/ml und ED<sub>50</sub> 1,16 ng/ml). Alle weiteren Behandlungen senkten die im Überstand gemessenen mittleren uPA-Spiegel auf 0,28 ng/ml (ED<sub>50</sub> Paclitaxel) und 0,60 ng/ml (ED<sub>50</sub> Gemcitabin).

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

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)

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


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

<table>
<thead>
<tr>
<th>KNS62 wt</th>
<th>Behandlung</th>
<th>KNS62 Bcl-xL</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>&lt;image&gt;</td>
<td>Kontrolle 48 Std.</td>
<td>&lt;image&gt;</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt;image&gt;</td>
<td>Cisplatin 48 Std.</td>
<td>&lt;image&gt;</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt;image&gt;</td>
<td>Etoposid 48 Std.</td>
<td>&lt;image&gt;</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt;image&gt;</td>
<td>Gemcitabin 48 Std.</td>
<td>&lt;image&gt;</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt;image&gt;</td>
<td>Paclitaxel 48 Std.</td>
<td>&lt;image&gt;</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt;image&gt;</td>
<td>5-Fu 48 Std.</td>
<td>&lt;image&gt;</td>
</tr>
</tbody>
</table>
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


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

3.4.2 Humane Tumorproben

Ergebnisse

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).


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


Diese Analysen wiesen nach, dass die verschiedenen untersuchten Zytostatika in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelllinie und der eingesetzten Zytostatikakonzentration Apoptose (Sub-G_1 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 G_1- bzw. G_2-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 inflammationsassozierte 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.
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). Gisingis-Velitski et al. konnten im

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


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-
Diskussion

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

Zusammenfassend lassen sich auf dieser Ebene 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 mRNS-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 mRNS-Extraktion aus kompletten Tumorproben vorgenommen wurde, d. h. die mRNS setzt sich in Summe nicht nur aus der Tumorzell-mRNS zusammen, sondern aus dem gesamten Spektrum des murinen Tumorstromas, was zu einer mRNS-„Kontamination“ der Proben führt. Inwieweit dieser Umstand die erzielten Ergebnisse beeinflusst bleibt spekulativ. Kontrollen an mikrodisseziertem 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 neoadjuvantem Chemotherapiekonzept auf mRNS-Ebene eine ubiquitäre Überexpression der proinflammatorischen, angiogenetischen und proinvasiven Zytokin-mRNS.
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.


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).

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 Dosiseskalationsuntersuchungen 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 Dosiseskalationsuntersuchungen 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 chemotherapienavbzw. 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
Zusammenfassung


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.

6 Literaturverzeichnis

A


B


C


D


E


F


G


H


J


K


N


O


R


S


V


W


X


# 7 Anhang

## 7.1 Material, Chemikalien und Geräte

### Tab. 7: Zellkultur

<table>
<thead>
<tr>
<th>Material</th>
<th>Lieferant</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Accutase</td>
<td>PAA Pasching Laboratories GmbH, Pasching</td>
</tr>
<tr>
<td>Fötale Kälberserum (FCS)</td>
<td>PAN Biotech GmbH, Aidenbach</td>
</tr>
<tr>
<td>L-Glutamin, 100-fach konzentriert</td>
<td>Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Na-Pyruvat, 100-fach konzentriert</td>
<td>Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco’s</td>
<td>Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>RPMI 1640 Zellkultur - Medium</td>
<td>Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Trypsin 0,05 % - EDTA 0,02 %</td>
<td>PAA Pasching Laboratories GmbH, Pasching</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### Tab. 8: Zelllinien

<table>
<thead>
<tr>
<th>Name</th>
<th>Erläuterung</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>BEN</td>
<td>Humaner NSCLC (Ellison et al., 1975)</td>
</tr>
<tr>
<td>KNS62-Bcl-xL</td>
<td>Transduziert mit pBate - Bcl-xL</td>
</tr>
<tr>
<td>KNS62 wt</td>
<td>Gehirnmetastase, squamöser NSCLC (Takaki, 1980)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### Tab. 9: Chemotherapie

<table>
<thead>
<tr>
<th>Medikament</th>
<th>Lieferant</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>5-Fluorouracil</td>
<td>medac GmbH, Hamburg</td>
</tr>
<tr>
<td>Cisplatin</td>
<td>TEVA GmbH, Ulm</td>
</tr>
<tr>
<td>Etoposid</td>
<td>Gry Pharma GmbH, Kirchzarten</td>
</tr>
<tr>
<td>Gemcitabin</td>
<td>Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg</td>
</tr>
<tr>
<td>Paclitaxel</td>
<td>medac GmbH, Hamburg</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### Tab. 10: Kristallviolett

<table>
<thead>
<tr>
<th>Material</th>
<th>Lieferant</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Kristallviolett</td>
<td>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Methanol</td>
<td>Merck, Darmstadt</td>
</tr>
</tbody>
</table>
### Tab. 11: Propidiumiodid-Durchflusszytometrie

<table>
<thead>
<tr>
<th>Substanz</th>
<th>Hersteller</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Propidiumiodid</td>
<td>Sigma, Deisenhofen</td>
</tr>
<tr>
<td>RNase A</td>
<td>Boehringer, Mannheim</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### Tab. 12: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

**Block-Puffer**
- 1 % BSA                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim   |
- 5 % Sucrose                 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim   |
- 0,05 % NaN₃                | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn           |
- 5 % Sucrose                 | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn           |

**DuoSet IL8-ELISA**
- Capture Antibody           | R&D Systems, Inc., Abingdon, UK        |
- Standard Solution (IL-8)    |                                         |
- Detection Antibody         |                                         |
- Streptavidin-HRP           |                                         |
- Glo Substate Reagent Pack  |                                         |

**Human TNF-α DuoSet**
- Capture Antibody           | R&D Systems, Inc., Abingdon, UK        |
- Standard Solution (TNF-α)   |                                         |
- Detection Antibody         |                                         |
- Streptavidin-HRP           |                                         |
- Glo Substate Reagent Pack  |                                         |

**PBS (pH 7,2-7,4)**
- 137 mM NaCl                 | Merck, Darmstadt                      |
- 2,7 mM KCL                  |                                         |
- 8,1 mM Na₂HPO₄              |                                         |
- 1,5 mM KH₂PO₄               |                                         |

**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**
- H₂SO₄ 2,5 mol/l             | Merck, Darmstadt                      |

**Waschpuffer (pH 7,2-7,4)**
- 0,05 % Tween20              | Merck, Hohenbrunn                     |
- PBS                         |                                         |
### Tab. 13: Multiplex-Bead-Array

<table>
<thead>
<tr>
<th>Human Inflammatory Cytokines Kit</th>
<th>Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Cytometric Bead Array (CBA)</td>
<td>San Jose, USA</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

**AllPrep DNA/RNA Mini Kit**
- DNA Mini Spin Columns
- RNeasy Mini Spin Columns
- Puffer RLT Plus
- Puffer RW1
- Puffer RPE
- RNase-Free Water
- Puffer AW1
- Puffer AW2
- Puffer EB
- dNTPs
- Ethanol
- LightCycler Kit FastStart DNA Master
- SYBR Green I
- Random Hexamer
- RNase Inhibitor
- RNase-Free DNase Set
- DNase I, RNase-Free (lyophilized)
- RNase-Free Water
- β-Mercaptoethanol
- **Superscript**
- 5 x Puffer
- DTT

**Superscript**
- PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
- Merck, Darmstadt
- Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
- Applied Biosystems, Darmstadt
- Applied Biosystems, Darmstadt
- QIAGEN GmbH, Hilden
- DTT
- Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### Tab. 15: Invasionsanalysen

<table>
<thead>
<tr>
<th>Dimethylsulfoxid (DMSO)</th>
<th>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Trypan-Blau</td>
<td>Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe</td>
</tr>
</tbody>
</table>
### Tab. 16: Tiermodell: verwendete Medikamente und Materialien

<table>
<thead>
<tr>
<th>Artikel</th>
<th>Hersteller</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Anexate® (Flumazenil)</td>
<td>Roche, Grenzach-Wyhen</td>
</tr>
<tr>
<td>Antisedan® (Atipamezol)</td>
<td>Pfizer, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Dormicum® (Midazolam)</td>
<td>Roche, Grenzach-Wyhen</td>
</tr>
<tr>
<td>Dormitor® (Medetomidin)</td>
<td>Pfizer, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Fentanyl</td>
<td>medac GmbH, Janssen-Cilag, Neuss</td>
</tr>
<tr>
<td>Naloxon</td>
<td>CuraMed, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Phenylbutyrat</td>
<td>Apotheke des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel</td>
</tr>
<tr>
<td>1-ml-Spritze</td>
<td>BD, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>Alzet osmotische Minipumpe, Modell 2002</td>
<td>Alzet, Cupertino, USA</td>
</tr>
<tr>
<td>Bacillol® AF</td>
<td>Bode Chemie GmbH, Hamburg</td>
</tr>
<tr>
<td>Band Aid</td>
<td>Johnson &amp; Johnson, Skipton, England</td>
</tr>
<tr>
<td>Einmalrasierer</td>
<td>Kaimedical, Solingen</td>
</tr>
<tr>
<td>Einstreu SNIFF</td>
<td>Spezialdiäten GmbH, Soest</td>
</tr>
<tr>
<td>Futter bestrahlt für Ratten und Mäuse</td>
<td>Altromin, Lage</td>
</tr>
<tr>
<td>Glukose 5 Braun</td>
<td>Braun, Melsungen</td>
</tr>
<tr>
<td>Insulinspritzen U-40, 1 ml, 291/2</td>
<td>BD, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>GA/0,33 x 12,7 mm Isotone Natriumchloridlösung 0,9% Braun</td>
<td>Braun, Melsungen</td>
</tr>
<tr>
<td>Kanülen 27 GA, 0,4 x 19</td>
<td>BD, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>Laminar-Airflow-Schrank</td>
<td>Scanbur, Koge, Dänemark</td>
</tr>
<tr>
<td>Latex OP-Handschuhe</td>
<td>Gammex PF, Ansell, Malaysia</td>
</tr>
<tr>
<td>Makronolkafige Typ III mit Filtertops</td>
<td>Scanbur, Koge, Dänemark</td>
</tr>
<tr>
<td>Matrigel TM Basement Membrane Matrix</td>
<td>BD, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>Mikro-Nadelhalter nach Müller FM 061 R</td>
<td>Aesculap, Tuttlingen</td>
</tr>
<tr>
<td>Mikro-Pinzette mit 1 x 2 Zähnen nach Müller FM 034R</td>
<td>Aesculap, Tuttlingen</td>
</tr>
<tr>
<td>Mikro-Pinzette mit Ring 1,2 mm nach Müller FM 035R</td>
<td>Aesculap, Tuttlingen</td>
</tr>
<tr>
<td>Mullkompressen 10 x 10 cm</td>
<td>Hartmann, Heidenheim</td>
</tr>
<tr>
<td>Mullkompressen 6 x 6 cm</td>
<td>NOBA Verbandsmittel, Wetter</td>
</tr>
<tr>
<td>Natürliches Mineralwasser</td>
<td>Fürst Bismarck Quelle, Aumühle</td>
</tr>
<tr>
<td>OP-Abdecktücher</td>
<td>Mölnlycke Health Care Oy Fin, Finnland</td>
</tr>
<tr>
<td>OP-Haube</td>
<td>Johnson &amp; Johnson, Norderstedt</td>
</tr>
<tr>
<td>OP-Maske</td>
<td>Johnson &amp; Johnson, Norderstedt</td>
</tr>
<tr>
<td>Materialien und Geräte</td>
<td>Hersteller</td>
</tr>
<tr>
<td>------------------------</td>
<td>------------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>Präzisionswaage Explorer 1</td>
<td>Merck, Hamburg</td>
</tr>
<tr>
<td>Schere, fein, gerade, BC 060R</td>
<td>Aesculap, Tuttlingen</td>
</tr>
<tr>
<td>Sicherheitswerkbank Typ SAFE, Klasse II, HB 2448</td>
<td>Scanbur, Dänemark</td>
</tr>
<tr>
<td>Trinkflaschen 250 ml</td>
<td>Scanbur, Koge, Dänemark</td>
</tr>
<tr>
<td>Vicryl 6/0, 0,7 metric</td>
<td>Ethicon, Hamburg</td>
</tr>
<tr>
<td>Wattestäbchen mit kleinem Kopf</td>
<td>Beese, Barsbüttel</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### Tab. 17: weitere Materialien und Geräte

<table>
<thead>
<tr>
<th>Materialien und Geräte</th>
<th>Hersteller</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1,8 ml Cryo-Röhrchen</td>
<td>Nunc GmbH &amp; Co. KG, Wiesbaden</td>
</tr>
<tr>
<td>15 ml Röhrchen</td>
<td>Greiner Bio-One, Frickenhausen</td>
</tr>
<tr>
<td>Brutschrank Heraeus CO₂-Auto-Zero</td>
<td>Heraeus Instruments GmbH, Osterode</td>
</tr>
<tr>
<td>Combitips plus (0,5 ml, 5 ml, 10 ml)</td>
<td>Eppendorf AG, Hamburg</td>
</tr>
<tr>
<td>Einfrierbox Mr. Frosty</td>
<td>Thermo Fisher Scientific (Nalgene), Langensel-bold</td>
</tr>
<tr>
<td>Eppendorf Multipipette Plus</td>
<td>Eppendorf AG, Hamburg</td>
</tr>
<tr>
<td>Eppendorffraktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)</td>
<td>Eppendorf AG, Hamburg</td>
</tr>
<tr>
<td>FacsScan</td>
<td>Becton Dickinson, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>Falconröhrchen 50 ml</td>
<td>Falcon – GmbH, Gräfeling-Locham</td>
</tr>
<tr>
<td>Feather Mikrotomklingen</td>
<td>pfm AG, Deutschland</td>
</tr>
<tr>
<td>Gefrierschrank Liebherr Comfort (-20°C)</td>
<td>Liebherr AG, Ochsenhausen</td>
</tr>
<tr>
<td>Gefrierschrank Typ Nuaire</td>
<td>Zapf Instrumente, Sarstedt</td>
</tr>
<tr>
<td>Kolbenhupipetten</td>
<td>Eppendorf AG, Hamburg</td>
</tr>
<tr>
<td>LightCycler II</td>
<td>Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim</td>
</tr>
<tr>
<td>Lysing Matrix A Tubes</td>
<td>MP Biomedicals, LLC, Solon, USA</td>
</tr>
<tr>
<td>Maxisorp-Platte</td>
<td>Nunc, Roskilde, Dänemark</td>
</tr>
<tr>
<td>Menzel Gläser Super Frost Plus</td>
<td>Menzel GmbH &amp; Co. KG, Braunschweig</td>
</tr>
<tr>
<td>Mikrostat-Cryotom HM 500 OM</td>
<td>Mikrom Laborgeräte GmbH, Walldorf</td>
</tr>
<tr>
<td>Mycoplasma Detektion Kit</td>
<td>Takara Bio INC., Japan</td>
</tr>
<tr>
<td>Pipetboy acu Integra</td>
<td>Bioscience, Fernwald</td>
</tr>
<tr>
<td>Pipettierhilfe Pipetus</td>
<td>Hirschmann Laborgeräte GmbH &amp; Co. KG, Ebersdorf</td>
</tr>
<tr>
<td>Plattformschüttler</td>
<td>Heidolph Instruments GmbH &amp; Co. KG, Schwabach</td>
</tr>
<tr>
<td>PRECELLYS 24 (Schredder-Zentrifuge)</td>
<td>PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Anhang

ProgRes C10 plus, Digitalkamera
ProgRes Capture Pro 2,5, Software
Reagiergefäße 1,5 ml und 2 ml
Ritips, steril, 0,5 ml und 5 ml
Serologische Pipetten
Sunrise remote Touch Screen Photometer
Thermo Cycler
Wasserbad Typ 1083
well-Platten (6-, 24-, 96-well)
Workbench Typ Hera safe
Zeiss Mikroskop
Zellkulturflaschen T75 cm² und T175 cm²
Zentrifuge 5415 R
Zentrifuge Eppendorf mini spin plus
Zentrifuge Rotina 48R
Zentrifugenröhrchen

Jenoptik Laser Optik Systeme GmbH, Deutschland
Jenoptik Laser Optik Systeme GmbH, Deutschland
Sarstedt, Nümbrecht
Ritter, Schwabmünchen
Sarstedt, Nümbrecht
Tecan Trading AG, Austria
Biometra GmbH, Göttingen
GFL, Burgwedel
Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Heraeus, Hanau
Carl Zeiss AG, Jena
Merck, Darmstadt
Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf AG, Hamburg
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.


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.

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

05/2007-07/2007 Hilfswissenschaftler in der Sektion Molekulare Onkologie am UK-SH, Campus Kiel


08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2003 Studienbeginn der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulausbildung

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


