

**Charakterisierung primärer Tumor-assoziiierter Fibroblasten und
Tumorzellen aus bronchialen Karzinomen und Untersuchung ihrer
Reaktion auf zielgerichtete und zytotoxische Therapie**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Physiologie,
Fachgruppe für Membranphysiologie,
Universität Hohenheim

Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart
und Universität Tübingen

vorgelegt von
Jens Oliver Schmid
aus
Rutesheim

2013

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer

1. berichtende Person: Prof. Dr. Walter E. Aulitzky

2. berichtende Person: Prof. Dr. Wolfgang R. L. Hanke

Eingereicht am: Januar 2013

Mündliche Prüfung am: 20. Juni 2013

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Jens Oliver Schmid

Stuttgart, den

1.	Einleitung	1
1.1	Lungentumore	1
1.2	Stroma	4
1.3	Tumor-assoziierte Fibroblasten.....	6
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	11
2.	Material und Methoden	13
2.1	Zellkultur	13
2.1.1	Isolierung Tumor-assoziiierter Fibroblasten aus Tumorgewebe der Lunge	13
2.1.2	Verwendete Zelllinien	14
2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	14
2.1.4	Zellkulturbedingungen und Kulturmedien.....	14
2.1.5	Verwendete Therapeutika und niedermolekulare Inhibitoren.....	16
2.1.6	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	16
2.2	Kultivierung von Frischgewebeschnitten aus Bronchialkarzinomen.....	17
2.3	Färbungen an Gewebeschnitten	17
2.3.1	Immunhistochemische Färbung nach der en-vision-Methode	17
2.3.2	Färbung zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen im Gewebe.....	19
2.4	Proteinbiochemische Analyse	20
2.4.1	Protein-Isolation	20
2.4.2	Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE.....	21
2.4.3	Western Blot.....	22
2.4.4	Herstellung von konditioniertem CAF-Medium	24
2.4.5	Protein-Arrays zur Identifikation der von CAFs sekretierten Faktoren.....	25
2.5	Genotypisierung bronchialer Karzinome	26
2.5.1	Sequenzierung der Exons 18, 19, und 21 von <i>EGFR</i>	27
2.5.2	Sequenzierung von <i>KRAS</i>	30

2.5.3	Sequenzierung von <i>TP53</i>	33
2.5.4	Verwendete Primer für die <i>EGFR</i> - und <i>KRAS</i> -Genotypisierung	34
2.6	MTT-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität einer Substanz.....	34
2.7	Durchflusszytometrische Methoden.....	35
2.7.1	Annexin-Assay zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen.....	35
2.7.2	Bromdesoxyuridin- und PI-Färbung zur Zellzyklusanalyse	36
2.8	β -Galaktosidase Färbung an Dasatinib-behandelten Fibroblasten.....	38
2.9	Transkriptomanalyse	39
2.9.1	RNA-Isolation für die Untersuchung des Dasatinib-Effekts.....	39
2.9.2	RNA-Isolation für den Vergleich von CAFs und NAFs	39
2.9.3	Transkriptomanalyse an primären Fibroblasten	40
2.10	Bestimmung der Dasatinib-Konzentration im Gewebe eines Lungenkarzinoms	41
2.10.1	<i>Ex vivo</i> Perfusion humaner Lungenlappen.....	41
2.10.2	Bestimmung der Dasatinibkonzentration mittels UHPLC	44
2.11	Statistische Auswertung	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Molekulare Unterscheidung von CAFs und NAFs der Lunge.....	46
3.1.1	CAF-Gene als prognostische Marker	49
3.2	Therapieansprechen im Gewebekulturmodell.....	56
3.2.1	Validierung des Gewebekulturmodells	56
3.2.2	Einfluss des EGFR-Inhibitors Erlotinib	61
3.2.2.1.	Immunhistochemische Färbung des EGFR in Tumoren der Lunge	62
3.2.2.2.	Untersuchung des <i>EGFR</i> - und <i>KRAS</i> -Genstatus in Tumoren der Lunge ...	63
3.2.2.3.	Untersuchung der Proliferation in Folge der Erlotinib-Behandlung.....	63
3.2.3	Reaktion von Gewebeschnitten bronchialer Karzinome auf Cisplatin	67
3.2.3.1.	Einteilung der Karzinome anhand ihres p53-Akkumulationsverhaltens	67

3.2.3.2.	Proliferation der Tumorzellen in Abhängigkeit von p53.....	71
3.2.3.3.	Einfluss der Cisplatin-Behandlung auf die Tumorzellproliferation.....	72
3.2.3.4.	Einfluss der Cisplatin-Behandlung auf den Zelltod in Tumorzellen	75
3.2.3.5.	Reaktion der Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin	79
3.2.3.5.1	p53-Akkumulation und Induktion von p21 in CAFs.....	79
3.2.3.5.2	Einfluss der Cisplatin-Behandlung auf den Zelltod von CAFs	83
3.3	Tumor-assoziierte Fibroblasten als Angriffspunkt einer gezielten Therapie	85
3.3.1	Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf Proliferation und Viabilität von CAFs....	85
3.3.2	Verteilung von Dasatinib in der <i>ex vivo</i> perfundierten Lunge	91
3.3.3	Molekulare Auswirkungen der Dasatinib-Behandlung in CAFs	93
3.3.4	Einfluss Dasatinib-behandelter CAFs auf Tumorzellen.....	96
4.	Diskussion	101
4.1	Molekulare Unterschiede zwischen CAFs und NAFs.....	102
4.2	Validierung des Gewebekulturmodells und Vergleich mit anderen Modellen	106
4.3	Einfluss des EGFR-Inhibitors Erlotinib im Gewebekulturmodell	107
4.4	Reaktion von Gewebeschnitten bronchialer Karzinome auf Cisplatin	110
4.5	Tumor-assoziierte Fibroblasten als Angriffspunkt einer gezielten Therapie	115
4.6	Fazit und Ausblick	121
5.	Zusammenfassung	123
6.	Abstract	126
7.	Literaturverzeichnis.....	128
8.	Eigene Veröffentlichungen	144
9.	Anhang	146
10.	Abkürzungsverzeichnis	147
11.	Danksagung.....	151
12.	Lebenslauf	152

1. Einleitung

Aufgrund einer stetig steigenden Lebenserwartung und der ständigen Exposition gegenüber krebserregenden Stoffen nimmt der Anteil krebsbedingter Todesfälle kontinuierlich zu. Dies hat zur Folge, dass Krebserkrankungen in den Industrieländern mittlerweile noch vor den Gefäßerkrankungen die häufigste Todesursache darstellen. Lungenkrebs ist dabei bei Männern die häufigste, bei Frauen die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit (Jemal et al., 2011).

1.1 Lungentumore

Tumore der Lunge sind nicht als homogene Gruppe von Neoplasien zu sehen, sondern vielmehr als Sammelbegriff für eine Gruppe von Tumoren mit sehr heterogenem Phänotyp, was die morphologischen und genetischen Eigenschaften betrifft (Petersen, 2011). Die Gruppe der Lungentumore besteht dabei beinahe ausschließlich aus Karzinomen, das heißt Tumore epithelialen Ursprungs. Diese Tumore werden in die Gruppe der kleinzelligen Lungenkarzinome (engl. Small Cell Lung Cancer, SCLC) und die Gruppe der nicht kleinzelligen Lungenkarzinome (engl. Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) eingeteilt, die weiter in die Gruppe der Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und Großzelligen Karzinome unterteilt wird (Hoffman, 2000). Die Abgrenzung ist jedoch nicht so klar, wie man auf den ersten Blick vermuten könnte und es kommt zusätzlich zu Mischformen wie z.B. dem adenosquamösen Karzinom, welches Anteile eines Adenokarzinoms und Anteile eines Plattenepithelkarzinoms besitzt (Petersen, 2011). Als solider Tumor besteht das Lungenkarzinom nicht nur aus den Tumorzellen allein, sondern aus einem zusätzlichen Stromaanteil. Dieses Stroma setzt sich aus einem nicht-zellulären Anteil extrazellulärer Matrix (EZM) und einem zellulären Anteil, bestehend aus Zellen unterschiedlichsten Ursprungs, zusammen (Mueller und Fusenig, 2004). Auf die Zusammensetzung des Stromas wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

Die 5-Jahres Überlebensrate von 15% bei Männern und 18% bei Frauen ist beim Bronchialkarzinom relativ gering (Petersen, 2011). Dies hängt damit zusammen, dass es erst

in fortgeschrittenem Zustand zu spezifischen Symptomen und damit zur Diagnose des Bronchialkarzinoms kommt. Den Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms stellt der Konsum von Tabak dar (Collins et al., 2007). Die frühen unspezifischen Symptome des Karzinoms, wie z.B. Kurzatmigkeit und Husten, werden daher fatalerweise häufig als Begleiterscheinungen des Tabakkonsums angesehen und nicht mit einem Tumor in Verbindung gebracht. Zusätzliche Gründe für die geringe Überlebensrate stellen die hohe Aggressivität des Tumors und die frühe Bildung von Metastasen dar, die vor allem beim kleinzelligen Karzinom zu beobachten ist (Collins et al., 2007). Weitere Risikofaktoren für die Entstehung stellen die Exposition gegenüber Asbest, Arsen, Radongas und polyzyklischen Aromaten dar (Jemal et al., 2011).

Der Tumorzellanteil des Lungenkarzinoms zeichnet sich durch eine genetische Instabilität aus, die im Falle von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen dazu führt, dass im Nukleus hyperploide Chromosomensätze gefunden werden, in kleinzelligen Lungenkarzinomen hingegen reduzierte, hypoploide Chromosomensätze (Petersen, 2011). Diese genetische Instabilität führt weiterhin dazu, dass die Tumorzellpopulation eines Karzinoms aus einer sehr heterogenen Gruppe von Subpopulation besteht. Die einzelnen Subpopulationen unterscheiden sich dabei in ihrer Resistenz gegenüber Therapeutika (Mitrus et al., 2011). Als Ursache für die Resistenz solider Tumore, z.B. gegenüber Therapeutika wie Cisplatin, kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Einen Resistenzmechanismus stellt die Reaktion von Cisplatin mit Glutathionen, Metallothioneinen oder anderen schwefelhaltigen Molekülen dar, die in der Bildung inaktiver Addukte resultiert (Wang und Lippard, 2005). Weiterhin führt die differenzielle Expression von Influx- bzw. Effluxtransportern dazu, dass es zu intrazellulären Cisplatin-Konzentrationen kommt, bei denen kein Effekt der Therapie festzustellen ist (Rabik und Dolan, 2006). Fehler in apoptotischen Signalwegen bzw. eine erhöhte Reparatur von Cisplatin-Addukten stellen zusätzliche Resistenzmechanismen dar (Wang und Lippard, 2005). Es ist jedoch davon auszugehen, dass es nicht ein einzelner Mechanismus ist, der zur Resistenz führt, sondern vielmehr die Kombination mehrerer Mechanismen (Rabik und Dolan, 2006). Durch die Vielzahl an Subpopulationen, die im Tumor vorzufinden sind, kommt es zu einer intratumoralen Evolution (klonalen Selektion),

die dazu führt, dass diejenige Subpopulation, welche am besten an die äußeren Bedingungen angepaßt ist, mit der Zeit zur vorherrschenden Population wird (Nowell, 1976). Die Folge ist die beim Lungenkarzinom zu beobachtende Progression der Erkrankung, nach anfänglichem Ansprechen auf eine Therapie, wie z.B. bei der Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren. Hier wird davon ausgegangen, dass ein bereits vorhandener, resistenter Klon, der nur einen geringen Teil der Gesamtpopulation an Tumorzellen ausmacht, während der Behandlung heranwächst (Mitsudomi und Yatabe, 2007). Das anfängliche Ansprechen auf die Therapie ist durch die weniger resistenten Klone zu erklären, die zu Beginn der Behandlung absterben bzw. die Proliferation einstellen.

Zu den häufigsten Genmutationen beim Lungenkarzinom gehören Mutationen in *TP53* und so lassen sich bei 50% der NSCLCs und 70% der SCLCs Mutationen in *TP53* feststellen, wobei sich die Häufigkeiten bestimmter Mutationen bei Rauchern und Personen, die nie geraucht haben, unterscheiden (Toyooka et al., 2003). Das Genprodukt von *TP53*, der Tumorsuppressor p53 akkumuliert in seiner wildtypischen Form in Folge verschiedener zellschädigender Prozesse wie Onkogenaktivierung, DNA-Schädigung oder oxidativem Stress (Aylon und Oren, 2007). Dies führt in der Zelle zum Zellzyklus-Arrest, zur Seneszenz oder aber zur Apoptose, wobei verschiedene Signale entscheiden, welcher der genannten Prozesse abläuft (Riley et al., 2008). In allen 3 Fällen ist es das Ziel, die geschädigte Zelle daran zu hindern, ihr tumorigenes Potential an Tochterzellen weiterzugeben. Im Falle des Zellzyklusarrest wird der Zelle die notwendige Zeit zur Verfügung gestellt, um den Schaden zu beheben (Vousden und Prives, 2009). Durch die Einleitung der Seneszenz bzw. Apoptose wird die defekte Zelle hingegen endgültig aus der Population der proliferierenden Zellen ausgeschlossen. Aufgrund der wichtigen Aufgabe für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität wird p53 daher auch als „guardian of the genome“ bezeichnet (Lane, 1992). Da es sich bei p53 um einen Transkriptionsfaktor handelt, geschieht die Regulation der zuvor genannten Prozesse hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene, wobei festzuhalten ist, dass p53 zusätzlich transkriptions-unabhängige Funktionen besitzt, wie z.B. die Induktion von Autophagie (Riley et al., 2008; Green und Kroemer, 2009). Weitere Mutationen, die beim Lungenkarzinom vorzufinden sind, stellen Mutationen in *EGFR* (engl. Epidermal Growth Factor Receptor) und

KRAS dar (Mitsudomi und Yatabe, 2007). Die Mutationen in *EGFR* führen dabei zu einer konstitutiven Aktivität des Rezeptors, weshalb zahlreiche Antikörper bzw. niedermolekulare Inhibitoren entwickelt wurden, welche die Aktivität des Rezeptors hemmen. Diese Therapeutika werden zum Teil bei Patienten mit *EGFR*-mutierten Tumoren bereits in der Klinik eingesetzt (Mitsudomi und Yatabe, 2007). Allgemein wird beim Lungenkarzinom jedoch eine adjuvante Chemotherapie mit einem cisplatinhaltigen Therapeutikum durchgeführt (Goeckenjan et al., 2011), die zu DNA-Schäden und somit zur Aktivierung des p53-Signalweges führt (Wang und Lippard, 2005). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die immunhistochemisch feststellbare Akkumulation von p53 als Readout für die Cisplatinwirkung verwendet.

1.2 Stroma

Als solider Tumor ist das Lungenkarzinom als ein „Organ“ zu sehen, welches sich aus dem Tumorzellanteil und einem sehr heterogenen Stroma zusammensetzt (Abb. 1).

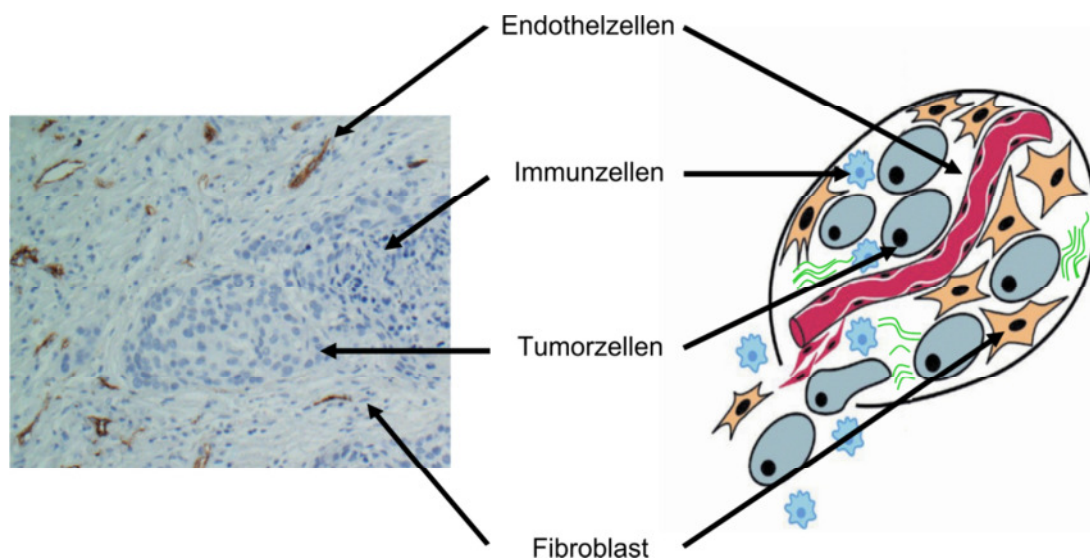


Abb. 1: Heterogener Aufbau eines Bronchialkarzinoms. Gezeigt ist der zelluläre Aufbau eines bronchialen Karzinoms. Links: CD34-gefärbter Gewebeschnitt eines Bronchialkarzinoms mit Hämatoxylin-Gegenfärbung. Rechts: Schematischer Aufbau eines soliden Tumors (verändert nach Hannahan und Weinberg, 2000).

Das Stroma oder auch die Mikroumgebung des Tumors besteht dabei aus einem nicht-zellulären Anteil, bestehend unter anderem aus Kollagen, Elastin, Fibronectin, Glykosaminoglykanen und Fibrin und einem sehr heterogenen zellulären Anteil (Dvorak et al., 1983). Dieser setzt sich vorwiegend aus Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur und Immunzellen zusammen, welche miteinander und den benachbarten Tumorzellen interagieren (Li et al., 2007). Die Zusammensetzung des Tumorstromas gleicht dabei der eines Wundgewebes, was Dvorak zu seinem Modell des Tumors als einer nicht heilenden Wunde veranlasste (Dvorak, 1986). Charakteristisch für den Tumor und sein Stroma sind ein erhöhter interstitieller Druck, ein niedriger pH-Wert und Hypoxie (Fukumura und Jain, 2007). Eine erhöhte Gefäßdichte im Umfeld des Tumors wurde bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieben (Goldman, 1907; Mueller und Fusenig, 2004). All diese Faktoren, an deren Entstehung das Stroma maßgeblich beteiligt ist, begünstigen das Wachstum des Tumors bzw. dessen Metastasierung.

Die Interaktion zwischen Tumorzellen und Stroma findet auf verschiedene Weise statt. Tumorzellen beeinflussen ihr Stroma zum einen direkt, indem sie die sie umgebende extrazelluläre Matrix verändern oder aber modulatorisch auf den Metabolismus der Stromazellen eingreifen (Zigrino et al., 2005). Diese Beeinflussung wird durch die Freisetzung solubler Faktoren durch die Tumorzellen oder aber durch direkten Zell-Zell-Kontakt ermöglicht. Durch die Freisetzung chemotaktischer Faktoren und der daraus resultierenden Infiltration durch Zellen des Immunsystems wird weiterhin die zelluläre Zusammensetzung des Stromas aktiv durch die Tumorzellen verändert (Zigrino et al., 2005). Die Zellen des Stromas wiederum beeinflussen die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen auf parakrine Weise durch die Sekretion verschiedenster solubler Faktoren und können durch die Produktion extrazellulärer Proteasen zu einer Steigerung der Invasivität und des Metastasierungspotenzials des Tumors führen (Bhowmick und Moses, 2005; Hanahan und Weinberg, 2000; Li et al., 2007). Der Stromaanteil variiert dabei von Tumor zu Tumor, wobei der mengenmäßige Anteil kein Maß für die Malignität des Gesamttumors darstellt (Dvorak et al., 1983). Trotz des sehr variablen Anteils spielt das Stroma des Tumors eine entscheidende Rolle für die Progression und so beeinflusst es maßgeblich das Wachstum, die

Invasivität, das Metastasierungsverhalten und die Sensitivität des Tumors gegenüber verschiedenen Arten von Therapie (Li et al., 2007; Tse und Kalluri, 1997; Fukumura und Jain, 2007). Die wichtige Rolle des Stromas für die Entstehung von Metastasen wurde schon Ende des 19. Jahrhunderts erkannt. Damals wurde bereits festgestellt, dass Tumore je nach Entität Metastasen in bestimmten Organen bilden. Die entscheidende Rolle wurde dabei der Mikroumgebung zugeschrieben, wie in Pagets „Seed and Soil“-Hypothese nachzulesen ist (Paget, 1889). Wie entscheidend die Bildung von Metastasen für den Verlauf einer Krebserkrankung ist, wird klar, wenn man sich vor Augen führt, dass 90% der krebsbedingten Todesfälle auf Metastasen zurückzuführen sind (Sporn, 1996).

Im Zuge der klonalen Evolution des Tumorzellanteils kommt es auch zu Veränderungen der Zusammensetzung des Stromaanteils (Novell, 1976; Mohla, 2007). Ob es dabei in den Zellen des Stromas ebenfalls zu einer erhöhten genetischen Instabilität kommt, wird kontrovers diskutiert (Übersicht in Schauer et al., 2011). Geht man jedoch von einer genetischen Stabilität in den Zellen des Stromas aus, wäre im Stroma weniger mit der Bildung von Resistenzen in Folge einer Therapie zu rechnen, weshalb das Stroma schon mehrmals als Ziel einer Therapie ins Auge gefasst wurde. So wurden Versuche unternommen inflammatorischer Zellen im Kolonkarzinom durch den Einsatz nichtsteroidaler Antirheumatika zu hemmen bzw. den „Vascular Endothelial Growth Factor“(VEGF)-Signalweg durch den Einsatz des Antikörpers Bevacizumab (Mueller und Fusenig, 2004).

1.3 Tumor-assoziierte Fibroblasten

Die Aufgabe von Fibroblasten besteht unter normalen physiologischen Bedingungen darin, durch die Sekretion verschiedener Faktoren wie Laminin oder Kollagen die extrazelluläre Matrix des Stromas zu bilden. Das nicht-zelluläre Stroma dient der Verankerung von Gefäßen, Nerven und Zellen des Immunsystems und stellt somit gewissermaßen ein Gerüst dar (Chang et al., 2002). Weiterhin spielen Fibroblasten eine essentielle Rolle bei der Heilung von Wunden. Hier kommt es in Folge der Freisetzung von Transforming Growth Factor β (TGF- β), Epidermal Growth Factor (EGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Fibroblast Growth Factor 2 (FGF 2) aus verletzten Endothelzellen bzw. Monozyten und

Makrophagen zur Aktivierung der Fibroblasten (Kalluri und Zeisberg, 2006). Diese Fibroblasten weisen durch ihre Aktivierung eine höhere Proliferationsrate auf (Kalluri und Zeisberg, 2006) und sind der wichtigste Zelltyp bei der Produktion von extrazellulärer Matrix (EZM) in der sich schließenden Wunde (Franco et al., 2010). Aktivierte Fibroblasten werden aufgrund der Expression von α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) auch als Myofibroblasten bezeichnet und sind in der Lage sich zu kontrahieren, wodurch es zum Verschluss der Wundränder kommt (Tomasek et al., 2002). Weiterhin stimulieren Myofibroblasten die Angiogenese und sorgen so für die Versorgung des neu gebildeten Gewebes (Franco et al., 2010). Nach dem Wundverschluss verschwinden die Myofibroblasten wieder aus dem neu gebildeten Gewebe, durch eine Nemosis genannte Art des programmierten Zelltods (Cirri und Chiarugi, 2011).

Die Fibroblasten, welche man im Tumor findet, die Tumor-assoziierten Fibroblasten (engl.: Cancer-Associated Fibroblasts, kurz CAFs), sind große, spindel-förmige mesenchymale Zellen (De Wever et al., 2008), die zahlenmäßig den größten Anteil der zellulären Komponente des Stromas darstellen (Xing et al., 2011). Durch die Expression von α -SMA zeigen sie den Phänotyp aktivierter Myofibroblasten, wie sie auch in Wunden zu finden sind. Weitere Marker dieser aktivierten Fibroblasten sind das Fibroblast Activation Protein (FAP), Desmin, Thy-1 und S100A4 (Li et al., 2007). Wie auch α -SMA, sind dies jedoch keine spezifischen Marker, weshalb die Untersuchung eines einzigen Markers keine sichere Identifikation von CAFs zulässt (Sugimoto et al., 2006). Dass es sich bei den CAFs eines Tumors um eine sehr heterogene Gruppe von Zellen handelt, konnte von Sugimoto gezeigt werden. So konnten in der gesamten CAF-Population eines Tumors verschiedene Subpopulationen identifiziert werden, welche ein unterschiedliches Expressionsmuster von Markern aufweisen. Der Einfluss der einzelnen Subpopulationen auf den Gesamttumor bleibt jedoch weiterhin unklar (Sugimoto et al., 2006).

Welcher Zelltyp als Ausgangszelle für die in Tumoren vorgefundenen CAFs anzusehen ist, kann nicht eindeutig beantwortet werden und so kommen mehrere Zelltypen als Ursprung eines Tumor-assoziierten Fibroblasten in Frage. Dabei handelt es sich zum einen um normale Fibroblasten, die sich im Interstitium befinden und ihren Phänotyp durch Aktivierung

verändern. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass solch eine Aktivierung normaler Fibroblasten durch TGF- β möglich ist (Xing et al., 2011). Derselbe Signalweg ist auch bei der Aktivierung von Fibroblasten in Wunden zu beobachten, was den Verdacht nahe legt, dass dieselben Mechanismen bei der Aktivierung von Fibroblasten in Wunden und Tumoren eine Rolle spielen (Kalluri und Zeisberg, 2006). Weitere Vorläuferzellen von CAFs stellen epitheliale Zellen dar, die im Zuge einer epithelial/mesenchymalen Transition (EMT) den CAF-Phänotyp annehmen bzw. endotheliale Zellen, die im Zuge einer endothelial/mesenchymalen Transition (EnMT) diesen Phänotyp annehmen. Bei beiden Prozessen scheint ebenfalls TGF- β zum veränderten Phänotyp zu führen, wobei beim Prozess der EMT auch PDGF und dem Hepatocyte Growth Factor (HGF) eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird (Xing et al., 2011; Jechlinger et al., 2006; Ogunwobi und Liu, 2011). Zusätzlich ist von Myofibroblasten (Xing et al., 2011) und mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark bekannt (Franco et al., 2010), dass sie zu CAFs transdifferenzieren können. Bei den glatten Muskelzellen der Gefäße, Pericyten und Adipozyten wird vermutet, dass sie ebenfalls dazu in der Lage sind, zu CAFs zu transdifferenzieren (Anderberg und Pietras, 2009).

Die CAFs, welche in Tumoren vorgefunden werden, sind wie auch die aktivierten Fibroblasten in Wunden, der wichtigste Zelltyp, was die Produktion extrazellulärer Matrix betrifft. Durch die gesteigerte Sekretion extrazellulärer Matrix-Komponenten, wie z.B. Kollagen und Integrin, kommt es in Tumoren zur Desmoplasie, die als Marker für eine schlechte Prognose gilt (Cirri und Chiarugi, 2011; Cirri und Chiarugi, 2012). In CAFs lässt sich weiterhin eine gesteigerte Expression von Proteinen feststellen, welche aktiv Komponenten der EZM spalten. Zu diesen Proteinen gehören membranständige Peptidasen wie das Glycoprotein FAP, welches von mehr als 90% der CAFs epithelialer Tumore exprimiert wird (Cheng et al., 2005). Zu den Substraten von FAP gehört unter anderem Kollagen, was die stimulierende Wirkung von FAP auf das Tumorstadium erklärt (Cheng et al., 2005). Neben der Expression der membrangebundenen Peptidase FAP kommt es in CAFs zur Expression solubler Proteasen vom Matrix Metalloproteinase (MMP)-Typ (Augsten et al., 2010). Diese spalten verschiedene Komponenten der EZM wie Kollagen, Laminin, Elastin

und Fibrinogen aber auch diverse Wachstumsfaktoren (Sternlicht und Werb, 2001; Cirri und Chiarugi, 2012). Durch den Abbau der EZM steht dem Tumor unmittelbar mehr Raum zur Verfügung, um sich auszubreiten und somit fördern MMPs auf diese Weise das Tumorwachstum (Cirri und Chiarugi, 2012). Durch die Spaltung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch MMPs und ihrer daraus resultierenden Aktivierung wird das Tumorwachstum weiter unterstützt (Cirri und Chiarugi, 2012). So fördert z.B. die Aktivierung des VEGF und des Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), welche zuvor inaktiv in der EZM vorlagen, die Angiogenese und damit die Versorgung des Tumors (Roy et al., 2009). Neben dem Tumorwachstum stimulieren CAFs zusätzlich die Metastasierung und sorgen durch den Abbau von Laminin für die Zerstörung der Basalmembran, was Tumorzellen das Eindringen in Gefäße ermöglicht (Roy et al., 2009). Abbauprodukte von Fibronectin und Kollagen führen zur chemotaktischen Attraktion von Zellen des Immunsystems, deren Proliferation stimuliert wird (Xing et al., 2011). So kommt es unter anderem zu einer großen Zahl Tumor-assoziierter Makrophagen (TAM), die selbst MMPs, VEGF, HGF und Interleukin 6 (IL-6) sekretieren und so weiter das Tumorwachstum und die Metastasierung fördern (Xing et al., 2011). Die MMPs können zusätzlich Adhäsionsmoleküle spalten, welche den Kontakt zwischen Zellen aber auch zwischen Zellen und Komponenten der EZM vermitteln und sorgen so für ein erhöhtes Invasivitäts- und Metastasierungspotenzial des Tumors (Ribeiro et al., 2010; Cirri und Chiarugi, 2011). So sorgt z.B. die Spaltung von E-Cadherin auf Tumorzellen zu einer erhöhten Invasivität der Zellen (Roy et al., 2009).

Neben MMPs werden eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen von CAFs synthetisiert. Zu den sekretierten Faktoren zählen TGF- β , HGF, VEGF, PDGF, Stralal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1), bFGF und die Interleukine IL-6, IL-8 und IL-1 β , die alle stimulierend auf das Tumorwachstum wirken bzw. das Metastasierungspotenzial des Tumors fördern (Kalluri und Zeisberg, 2006; Schauer et al., 2011; Worthley et al., 2010; Cirri und Chiarugi, 2012). Neben der bereits beschriebenen aktivierenden Wirkung von TGF- β auf ruhende Fibroblasten hat TGF- β einen stimulierenden Einfluss auf das Wachstum eines Tumors im späten Stadium, während ihm in frühen Stadien eine eher hemmende Wirkung zugeschrieben wird (Ijichi et al., 2011). Die Wirkungen, die HGF in der Tumorgenese

zugeschrieben werden, sind vielfältig. So führt HGF in SCLC-Zellen zu einer gesteigerten Motilität (Maulik et al., 2002), während es Prostatakarzinomzellen durch die Induktion des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivators (uPA) und des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptors (uPAR) eine erhöhte Invasivität verleiht (Nishimura et al., 2003). Weiterhin wird HGF die Fähigkeit zugeschrieben, bei Tumorzellen die EMT einzuleiten (Ogunwobi und Liu, 2011), Tumorzellen vor Apoptose zu schützen (Underineret al., 2010) bzw. über die Stimulation der VEGF-Sekretion die Angiogenese von Tumoren zu stimulieren (Schäfer und Werner, 2008). VEGF sorgt sowohl für die Vaskularisierung des Tumorgewebes als auch für eine erhöhte Permeabilität der Gefäße (Dvorak, 2002). Dadurch kommt es zu einem erhöhten interstitiellen Druck im Tumor, was die Anreicherung und damit die Wirkung von Therapeutika im Gewebe erschwert (Fukumura und Jain, 2007). PDGF stimuliert das Wachstum aktivierter Fibroblasten in Wunden und Tumoren (Schäfer und Werner, 2008) und wirkt somit autokrin auf die sezernierenden Zellen. Das Chemokin SDF-1 schützt Tumorzellen zum einen vor Chemotherapie und zum anderen fördert es ihre Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff (Singh et al., 2010). SDF-1 wirkt hierbei chemotaktisch auf endotheliale Vorläuferzellen, die in das Tumorgewebe einwandern und hier neue Gefäße bilden (Orimo et al., 2005). Die Sekretion von Interleukinen durch CAFs führt zu einem proinflammatorischen Milieu, welches sich positiv auf das Wachstum des Tumors auswirkt, indem es die Infiltration von Immunzellen und dadurch die Angiogenese und die Metastasierung fördert (Cirri und Chiarugi, 2012, Schauer et al., 2011).

Wie wichtig CAFs für die Tumorgenese sind, wird weiterhin durch die Tatsache unterstrichen, dass lediglich CAFs aber nicht normale Fibroblasten dazu in der Lage sind Tumore in Mäusen zu bilden, wenn sie mit immortalisierten Prostataepithelzellen koinjiziert werden (Mueller und Fusenig, 2004). Zusätzlich steigern CAFs die Invasivität von Tumorzellen, wenn sie in Mäuse koinjiziert werden (Kalluri und Zeisberg, 2006). CAFs stellen dabei den Zelltyp dar, der beim Prozess der Invasion direkt an der Tumorfront lokalisiert ist, wie in Kokulturrexperimenten gezeigt werden konnte (Strell et al., 2012). Fibroblasten scheinen weiterhin aktiv am Prozess der Metastasierung beteiligt zu sein. So wird angenommen, dass Fibroblasten im prämetastatischen Gewebe metastatische Nischen

vorbereiten, indem sie auf systemische Signale des Primärtumors reagieren und Fibronektin sekretieren (Strell et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Tumorzellen im Verband mit CAFs zu ihrer metastatischen Nische gelangen, wobei sie von den CAFs geschützt werden und die CAFs am Zielgewebe damit beginnen, eine stimulierende Mikroumgebung zu schaffen (Duda et al., 2010).

Im Gewebe des Tumors kommt es zu einer intensiven Kommunikation und gegenseitigen Beeinflussung zwischen CAFs und ihren Tumorzellen. Die Tumorzellen verändern dabei den Phänotyp der CAFs auf eine Weise, die dazu führt, dass die CAFs stimulierend auf das Tumorstadium einwirken. Dies geschieht zum Beispiel durch die Verhinderung der p53-Akkumulation in Fibroblasten, die in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden konnte und zur Sekretion proangiogener Faktoren wie SDF-1, VEGF1 und bFGF führt (Bar et al., 2010). Tumorzellen die gemeinsam mit p53-null Fibroblasten wachsen, weisen eine höhere Proliferation und Chemoresistenz auf als solche, die mit wildtypischen Fibroblasten wachsen (Bar et al., 2010). Wie in Experimenten mit Zellkulturüberständen gezeigt werden konnte, scheinen $TP53^{0/0}$ -Tumorzellen die p53-Expression in benachbarten CAFs durch die Sekretion von löslichen Faktoren zu inhibieren (Bar et al., 2008). Welcher Faktor jedoch den inhibitorischen Effekt vermittelt ist unklar, genauso wie die Antwort auf die Frage, ob dieses Phänomen *in vivo* eine Rolle spielt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die wichtige Rolle des Stromas bei der Progression, Invasivität und Metastasierung solider Tumore stand in den letzten Jahren im Fokus zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit sich CAFs der Lunge von normalen Fibroblasten desselben Patienten nach ihrer Isolation molekular unterscheiden und ob die festgestellten Unterschiede prognostisch von Bedeutung sind. Das Verhalten, das Tumorzellen bzw. Zellen des Stromas infolge einer Therapie zeigen, lässt sich nur sehr schwer unter möglichst *in vivo*-ähnlichen Bedingungen untersuchen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, die Reaktion der Zellen im Gewebeverband zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Frage bediente man sich des Modells der Gewebekultur, das im Haus

bereits für die Kultur von Mammakarzinom- und Lungenkarzinomgewebe etabliert wurde (Sonnenberg et al., 2008; Sonnenberg, 2009; van der Kuip et al., 2006). Zunächst musste überprüft werden, ob es im Gewebe durch die Kultur zu Veränderungen hinsichtlich der Morphologie, der Proliferation bzw. der konstitutiven p53-Expression kommt. Danach sollte der Einfluss des gegen EGFR gerichteten niedermolekularen Inhibitors Erlotinib auf die Tumorzellen im Gewebe untersucht werden. In Mausmodellen konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass die Expression von p53 im Stroma zu einer Inhibition des Tumorwachstums führt. Tatsächlich scheinen *TP53^{0/0}*-Tumorzellen, zumindest *in vitro*, durch die Sekretion solubler Faktoren, einen Weg gefunden zu haben, die Akkumulation von p53 infolge einer Behandlung mit Cisplatin in CAFs zu verhindern. Ob dieses Verhalten von Tumorzellen und CAFs auch unter *in vivo* nahen Bedingungen zu beobachten ist, sollte durch die Kultur von Gewebe primärer bronchialer Karzinome untersucht werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob sich CAFs durch den Einsatz von niedermolekularen Substanzen in ihrer Proliferation hemmen lassen und sich ihr Phänotyp dahingehend verändern lässt, dass sie ihre supportive Aktivität verlieren. Die molekularen Veränderungen, zu denen es durch die Behandlung kommt, sollten mit Hilfe von Transkriptomanalysen untersucht werden. Ob die Hemmung von CAFs tatsächlich Konsequenzen für das Wachstum von Tumorzellen hat, war eine weitere Frage, die es im Rahmen der Arbeit zu klären galt. Dies sollte mit Hilfe von konditioniertem Medium unbehandelter bzw. behandelter CAFs geklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Isolierung Tumor-assoziiierter Fibroblasten aus Tumorgewebe der Lunge

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der primären Tumor-assoziierten Fibroblasten diente frisches Lungentumorgewebe, welches direkt nach der Operation aufgearbeitet wurde. Für das Gewebe lag ein Ethikvotum (# 396/2205V) und eine Einverständniserklärung der Patienten vor. Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Skalpells mechanisch zerkleinert, um eine möglichst große Angriffsfläche für den anschließenden enzymatischen Verdau zu bieten. Zum Verdau wurde Cell Rinse Puffer verwendet, dem Kollagenase (167 U/ml), DNase (250 U/ml) und Protease (0,25mg/ml) zugesetzt wurden. Anschließend wurde der Puffer mit Hilfe eines 0,2µm-Filters (Whatman, Rotrand) steril filtriert. Die Zusammensetzung des Cell Rinse Puffers, sowie die verwendeten Enzyme und Materialien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Materialien zur Isolierung primärer Fibroblasten

Cell Rinse Puffer	120 mM NaCl 15,6 mM Glucose 2,5 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 5,4 mM KCl 1 mM NaH ₂ PO ₄ 20 mM HEPES pH 7,2
DNase (250 U/ml)	Sigma, Taufkirchen
Kollagenase (167 U/ml)	Sigma, Taufkirchen
Protease (0,25 mg/ml)	Sigma, Taufkirchen
<i>Cell Strainer</i> 70 µm	Becton Dickinson, USA

Das Gemisch aus zerkleinertem Gewebe und sterilen Puffer wurde für 90 min bei 37°C inkubiert und anschließend über ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70µm filtriert. Dadurch gelangen lediglich vereinzelte Zellen in das Filtrat, welches für 5 min bei 1400 rpm

zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgesaugt und das Pellet in Kulturmedium aufgenommen, welches dann in eine Kulturflasche überführt wurde. Nach den ersten 24h Kultur bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. Somit konnte sichergestellt werden, dass nur bis zu diesem Zeitpunkt adhärierte Zellen weiterkultiviert wurden. Das Medium wurde danach 2x wöchentlich gewechselt.

2.1.2 Verwendete Zelllinien

Neben den primären Fibroblasten, welche zusammen mit Maike Sonnenberg und Silke Haubeiß aus Normal- bzw. Tumorgewebe der Lunge gewonnen wurden, wurde die Lungenkarzinomzelllinie H1299/H2B:eGFP verwendet. Diese Zelllinie wurde von Moshe Oren vom Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zahl der lebenden Zellen zu bestimmen, wurden die nach dem Trypsinieren pelletierten Zellen in Medium aufgenommen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde 1:10 mit Trypan-Blau verdünnt. Trypan-Blau dringt in den Zellkern toter Zellen ein, wodurch sich tote von lebenden Zellen unterscheiden lassen. Die 1:10 Verdünnung wurde verwendet, um mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl am Mikroskop zu bestimmen. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Materialien zur Bestimmung der Zellzahl

Trypan-Blau 0,5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin
Hellfeldmikroskop	Zeiss, Jena
Zählkammer: Neubauer improved	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Zellkulturbedingungen und Kulturmedien

Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 (BioChrom AG) verwendet, dem im Falle der Tumorzelllinie 10%, im Falle der primären Fibroblasten 20% FCS zugesetzt wurde.

Weiterhin wurden auf 500ml RPMI 29ml einer Lösung gegeben, welche aus verschiedenen Zellkulturzusätzen besteht. Die Zusammensetzung des verwendeten Mediums ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des für die Zellkultur verwendeten Mediums

500 ml RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
wurden supplementiert mit:	
0,1 g/l Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
10 mM HEPES, pH 7,4	Merck, Darmstadt
2 mM L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
0,13 mM L-Asparagin	Serva, Heidelberg
0,05 mM β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
1 mM Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe
3 ml 100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin
Anschließend wurde FCS zugegeben:	
10% bzw. 20% (v/v) FCS (Foetal Bovine Serum)	Gibco, Karlsruhe

Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zur Kultivierung der Zellen wurde ein CO₂-Inkubator verwendet, in dem eine konstante Atmosphäre von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ herrschte. Spätestens sobald die Konfluenz der Zellen in Kultur 100% betrug, wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS mit Trypsin/EDTA vom Boden der Flasche abgelöst und ein Teil davon mit frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt. Dieser Vorgang wurde 2 bis 3 Mal pro Woche wiederholt. Die für die Zellkultur verwendeten Materialien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Materialien, die bei der Zellkultur verwendet wurden

Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
6-, 96-Loch Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
15ml Reagenz- und Zentrifugenröhre	Sarstedt, Nümbrecht
50ml Reagenz- und Zentrifugenröhre	Sarstedt, Nümbrecht
5-, 10-, 25 ml Stripette-Costar	Corning, USA

Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Inkubator	Heraeus, Hanau
PBS	Biochrom AG, Berlin

2.1.5 Verwendete Therapeutika und niedermolekulare Inhibitoren

Das verwendete Cisplatin wurde als Lösung (1mg/ml H₂O) von der Apotheke des RBK bezogen. Bei den verwendeten 160 Kinase-Inhibitoren, die auf ihre Aktivität im MTT-Assay (siehe unten) hin untersucht wurden, handelte es sich um niedermolekulare Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinase Inhibitoren, die aus 2 Calbiochem Kinase Inhibitoren Bibliotheken ausgewählt wurden (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany; Cat. No. #539744 and #539745). Sie wurden in einer Konzentration von 1µM eingesetzt.

Weiterhin wurden Imatinib Mesylat (Gleevec), Dasatinib (Sprycel), Nilotinib (Tasigna), Sorafenib (Nexavar) und Erlotinib (Tarceva) verwendet, die über Research Chemicals inc. (Novartis, Inc., North York, Canada) bezogen wurden.

2.1.6 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Nach der Isolation der Fibroblasten aus dem Gewebe wurden die Zellen so lange in Zellkulturflaschen kultiviert, bis eine Konfluenz von nahezu 100% erreicht war. Dann wurden die Zellen trypsiniert, die Zellzahl bestimmt und anschließend Aliquots mit $5 \cdot 10^5$ bis 10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) hergestellt. Durch den Einsatz einer speziellen Einfrierbox, wurde die Temperatur gleichmäßig auf -80°C abgesenkt. Danach wurden die Aliquots für die dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Die für die Kryokonservierung verwendeten Materialien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Materialien für die Kryokonservierung der Zellen

Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
1,8 ml CryoTube™	Nalgene Nunc International, Wiesbaden
5100 Cryo 1°C Einfrierbox ‚Mr. Frosty‘	Nalgene Nunc International, Wiesbaden

Bei der Rekultivierung wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut und sofort in ein 50ml Reaktionsgefäß mit 9ml Medium gegeben, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu verdünnen. Nach einer anschließenden Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um evtl. abgeschwommene, tote Zellen zu entfernen.

2.2 Kultivierung von Frischgewebeschnitten aus Bronchialkarzinomen

Für die Herstellung der Gewebeschnitte wurde frisches Tumorgewebe aus Bronchialkarzinomen verwendet. Für das Gewebe lag ein Ethikvotum (# 396/2205V) und eine Einverständniserklärung der Patienten vor. Mit Hilfe einer Gewebestanze wurden unter sterilen Bedingungen Gewebezyylinder mit einem Durchmesser von ungefähr 5 mm hergestellt. Diese konnten dann mit Hilfe des Krumdieck Tissue Slicers (Alabama Research and Development, Munford, USA) in kaltem 1X PBS zu Frischgewebeschnitten von ungefähr 250µm Höhe geschnitten werden. Die Schnitte wurden dann in eine 24-Loch Platte überführt, wo jeder Schnitt in einer Vertiefung mit 1 ml Medium kultiviert wurde. Nach 24h bei 37°C und 5% CO₂ wurde mit der Behandlung begonnen. Nach 72h wurde die Behandlung beendet, indem die Slices in 4% gepuffertem Formalin überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Im Anschluss daran wurden die so fixierten Schnitte in der Pathologie des RBK entwässert, fixiert und in Paraffin eingebettet.

2.3 Färbungen an Gewebeschnitten

2.3.1 Immunhistochemische Färbung nach der en-vision-Methode

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Paraffinblöcke zunächst mit dem RM 2255 Mikrotom (Leica) in Schnitte mit einer Stärke von 3µm geschnitten und dann auf Super Frost Plus Glasobjektträger (Thermo Scientific) aufgezogen. Über Nacht wurden die so präparierten Objektträger bei 56°C inkubiert und so das Gewebe mit dem Objektträger fest verbunden. Anschließend wurden die Paraffinschnitte mittels Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (100% Ethanol, 96% Ethanol, 70%, H₂O) rehydriert. Die Färbung erfolgte nach der en-vision-Methode (En VisionTM, Dako, Dänemark). Die

Vorbehandlung für die Ki67-, p53- und p21-erfolgte durch eine 15min Inkubation der Objektträger im Dampfgarer in Target Retrieval Solution pH6 (Dako, Dänemark). Die Vorbehandlung für die EGFR-Färbung erfolgte durch Inkubation mit Proteinase K (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers. Die verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Antikörper für die immunhistochemischen Analysen

Antikörper	Klon	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
EGFR	H11	Maus	Dako	1:200 in Dako Antibody Diluent
Ki67	MIB-1	Maus	Dako	1:50 in Dako Antibody Diluent
p21	DSC-60.2	Maus	Thermo Scientific	1:50 in Dako Antibody Diluent
p53	DM082-05	Maus	Acris	1:40 in Dako Antibody Diluent

Die p53-Färbungen am Gewebekulturmateriale wurde mit dem Dako Automation Stainer (Dako, Dänemark) durchgeführt. Alle anderen Färbungen wurden manuell durchgeführt. Nach den Antikörperfärbungen wurden von Hand Hämatoxylin & Eosin-Gegenfärbungen durchgeführt. Als Eindeckmedium wurde DePex Gurr verwendet. Die für die Immunhistochemischen Färbungen verwendeten Materialien finden sich in Tabelle 7.

Tabelle 7: Geräte und Chemikalien zur Herstellung und Färbung der Paraffinschnitte

Citratpuffer, pH 6	DakoCytomation, Dänemark
Dako <i>Envision Kit</i>	DakoCytomation, Dänemark
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%,	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Gurr DePex Medium	Merck, Darmstadt
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt
Isopropanol 70%	Merck, Darmstadt
Proteinase K (20 µg/ml)	Qiagen, Hilden
Xylol, 100%	Merck, Darmstadt
DakoAutomation <i>Stainer</i>	DakoCytomation, Dänemark
Rotationsmikrotom RM 2255	Leica Microsystems, Wetzlar

Die anschließende Bestimmung des Anteils positiver Zellen erfolgte am Lichtmikroskop (DM4000B, Leica) durch 2 unabhängige Beobachter (Silke Haubeiss, Jens Schmid). Wenn es hierbei zu Unterschieden in den erhaltenen Ergebnissen kam, wurde der Fall von beiden Beobachtern gemeinsam wiederholt untersucht bzw. wurde ein dritter Beobachter hinzugezogen.

2.3.2 Färbung zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen im Gewebe

Um innerhalb der Frischgewebeschnitte den Zelltod nachzuweisen, wurden von Silke Haubeiß immunhistochemische TUNEL-Färbungen durchgeführt. Die Vorbehandlung der Schnitte für die TUNEL-Färbung erfolgte durch Proteinase K (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die anschließende TUNEL-Färbung erfolgte ebenfalls nach Angabe des Herstellers (Merck Millipore, Darmstadt).

2.4 Proteinbiochemische Analyse

2.4.1 Protein-Isolation

Die Zellen wurden nach der Behandlung trypsiniert, zentrifugiert (1400 rpm, 5 min) und das Pellet anschließend mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Lysepuffers aufgeschlossen, dem direkt vor der Benutzung Protease- und Phosphatase Inhibitoren-Cocktails zugegeben wurde (Tabelle 8).

Tabelle 8: Verwendeter Lysepuffer und Inhibitoren

Lyse-Puffer	50mM Tris 250mM NaCl 0,1% mM Triton X-100 5mM EDTA pH 7,6
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim

Um die Zellen möglichst effizient aufzuschließen, wurde die Zellsuspension mit Hilfe von Ultraschall mechanisch bearbeitet. Eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 15000 rpm ermöglichte ein Abtrennen der Zelltrümmer. Mit Hilfe des Bradford-Assays wurde die Protein-Konzentration im Lysat photometrisch bestimmt, um anschließend die gewünschte Proteinmenge auftragen zu können. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Lysat zunächst mit Auftragepuffer nach Lämmli (Lämmli, 1970) versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die bei der Protein-Isolation verwendeten Geräte und die Zusammensetzung des Auftragepuffers sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Bei der Proteinisolation verwendete Geräte und Auftragepuffer

Auftragepuffer nach Lämmli	20% (v/v) 1.5M Tris-HCl pH 6.8 50% (v/v) Glycerol 5% (v/v) 1% Bromphenol-Blau 25% (v/v) β -Mercaptoethanol 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat
Haereus Biofuge 13	Thermo Scientific, Karlsruhe
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
MS72 Mikrospritze	Bandelin Elektronik, Berlin
Photometer Novaspec II	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD200	Bandelin Elektronik, Berlin

2.4.2 Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wurden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Jeweils 10 μ g Proteingemisch wurde dazu in einem Gesamtvolumen von 40 μ l auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Proteinmarker aufgetragen, um die aufgetrennten Proteine anhand ihrer Größe identifizieren zu können. Die Auftrennung geschah über Nacht mit einer Vertikal-Elektrophoresekammer mit einer konstanten Stromstärke von 7mA. Die Zusammensetzung der verwendeten Acrylamidgele ist in Tabelle 10 aufgeführt. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

	4%-Sammelgel	10%-Trenngel
30% Acrylamid/Bislösung	1,35 ml	8,3 ml
H ₂ O	6,1 ml	9,95 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	6,22 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml	-
10% SDS	100µl	250 µl
TEMED	10µl	25 µl
10% Ammoniumpersulfat	100µl	250 µl

Tabelle 11: Bei der SDS-PAGE verwendete Geräte und Materialien

30 % acrylamid/Bis-solution (37, 5:1)	BioRad, München
Ammonium-Persulfat	BioRad, München
Prestained Protein Marker #7720	Cell signaling, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vertical electrophoresis system, Protean [®] II xi Cell	BioRad, München

2.4.3 Western Blot

Im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurden die Membran und 6 Filterpapiere auf die ungefähre Größe des Gels zugeschnitten und mit Transferpuffer getränkt. Auf die Anodenplatte wurden 3 der 6 Filterpapiere aufgelegt, gefolgt von der Membran, dem Gel und anschließend den 3 restlichen Filterpapieren. Der Transfer erfolgte bei 15V und dauerte

90min. Danach wurde die Membran für 1h in Blockinglösung inkubiert (5% Magermilch in TBST, siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammensetzung der Blockinglösung

Blockinglösung	5% (w/v) Magermilchpulver 8% (w/v) NaCl 0,2% (w/v) KCl 3% (w/v) Tris-Base 0,2% (v/v) 50% Tween 20
----------------	---

Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Die verwendeten Antikörper und die Verdünnung sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Antikörper für Western-Blot-Analyse

Antikörper	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
β-actin	mouse	Sigma	1:5000 in 5 % (w/v) Magermilch in TBST
p21	mouse	BD	1:1000 in 5 % (w/v) Magermilch in TBST
p53 (Pab 1801)	mouse	Santa Cruz	1:1000 in 5 % (w/v) Magermilch in TBST
p53 (DO-1)	mouse	Santa Cruz	1:1000 in 5 % (w/v) Magermilch in TBST
anti-mouse-IgG-HRP	Ziege	Cell Signaling	1:2000 in 5 % (w/v) Magermilch in TBST

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran für 4x15min in TBST gewaschen. Dann folgte die 1-stündige Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper bei RT. Erneut wurde die Membran für 4x15min in TBST gewaschen, bevor die Proteine mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion und Röntgenfilmen sichtbar gemacht wurden. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Bei der SDS-PAGE verwendete Geräte und Materialien

Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Lumi-Film, Chemiluminescence detection film	Roche, Mannheim
Nitrocellulose-Membran	Boehringer, Mannheim
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce Biotechnology, USA
Trans-Blot® semi-dry transfer cell	Bio-Rad, München

Um sicherzustellen, dass in jeder Spur die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, wurde die Membran mit dem β -Aktin Antikörper inkubiert. Zuvor mussten jedoch die an der Membran gebundenen Antikörper entfernt werden. Dazu wurde die Membran für 20min unter Schütteln in einem 52°C warmen „Stripping-Puffer“ (Tabelle 15) inkubiert.

Tabelle 15: Bei der SDS-PAGE verwendete Geräte und Materialien

„Stripping“-Puffer	62,5mM Tris 2%SDS (w/v) 100mM β -Mercaptoethanol pH 6,7
--------------------	--

Dadurch wurden die bereits gebundenen Antikörper entfernt und es konnte nach erneuten Waschschrinen mit der Inkubation des β -Aktin Antikörpers begonnen werden. Es folgten die bereits beschriebenen Schritte, um das β -Aktin Protein sichtbar zu machen.

2.4.4 Herstellung von konditioniertem CAF-Medium

Um den Einfluss von konditioniertem Medium auf die Proliferation der Zelllinie H1299/H2B:eGFP zu untersuchen bzw. die von den CAFs sekretierten Faktoren zu identifizieren, mußte zunächst konditioniertes Medium hergestellt werden. Dazu wurden die CAFs in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Beim Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium getauscht. Um den Einfluss von im FCS enthaltenen Faktoren zu minimieren, wurde RPMI1640 Medium eingesetzt, dem anstelle von 20% FCS lediglich 0,1% FCS zugegeben

wurde. Nach 48 h Stunden wurde das Medium unter sterilen Bedingungen aus den Zellkulturflaschen entnommen und die Suspension bei 1400rpm für 5min bei 4°C zentrifugiert. Abgeschwommene Zellen bzw. Zelltrümmer wurden entfernt, indem der Überstand nach dem Zentrifugieren in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Die so gewonnenen Medien wurden bis zur Benutzung bei -20°C gelagert.

2.4.5 Protein-Arrays zur Identifikation der von CAFs sekretierten Faktoren

Um die Faktoren zu identifizieren, welche von CAFs sekretiert werden, wurde konditioniertes Medium von CAFs mit RayBio® Antibody Arrays analysiert. Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C mit 2ml konditioniertem Medium auf dem Kipper inkubiert. Dadurch konnten die im Medium enthaltenen Faktoren an die an der Membran gebundenen Antikörper binden. Nach anschließenden Waschschritten folgte die Inkubation mit einem Gemisch Biotinyl-konjugierter Antikörper, welche an die gebundenen Faktoren aus dem Medium binden. Nach anschließendem Waschen folgte die Zugabe von markiertem Streptavidin, welches als Substrat für die Biotinyl-markierten Antikörper diente. Die Inkubationsschritte wurden wie im Protokoll des Herstellers angegeben durchgeführt. Die Bindung der im Medium enthaltenen Faktoren wurde mit Röntgenfilmen (Lumi-Film) sichtbar gemacht, die anschließend mit Hilfe eines Scanners digitalisiert wurden. Die relativen Signalintensitäten wurden mit Hilfe der Positivkontrolle im Programm AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt) bestimmt, was den anschließenden Vergleich von CAFs im behandelten bzw. unbehandelten Zustand ermöglichte. Die verwendeten Arrays sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Verwendete Protein-Arrays zur Identifikation sekretierter Faktoren

RayBio® Human Inflammation Cytokine Antibody Array 6	Hoelzel Diagnostika GmbH, Köln
RayBio® Human Growth Factor Antibody Array	Hoelzel Diagnostika GmbH, Köln
RayBio® Human Matrix Metalloproteinase Antibody Array	Hoelzel Diagnostika GmbH, Köln

2.5 Genotypisierung bronchialer Karzinome

Für die Sequenzierung wurde zunächst genomische DNA aus formalinfixiertem Paraffinmaterial gewonnen. Als Ausgangsgewebe dienten Paraffinblöcke, die im Rahmen der Routinediagnostik in der Pathologie des RBK angefertigt wurden. Die Blöcke wurden am Leica Mikrotom in Schnitte mit einer Stärke von 10µm geschnitten und das Gewebe auf Objektträger aufgezogen. Über Nacht wurden die Objektträger bei 56°C inkubiert, um das Gewebe am Glasmaterial zu fixieren. Mit Hilfe eines Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnittes des gleichen Paraffinblockes wurden Bereiche identifiziert, die ausschließlich aus Tumorzellen bestanden. So ließen sich die entsprechenden Bereiche auf den 10µm-Schnitten mit einem Stift markieren und man konnte spezifisch die DNA von Tumorzellen isolieren. Dazu wurden die Schnitte zunächst mit Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (100% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Isopropanol, H₂O) rehydriert. Danach wurden die zuvor markierten Tumorzellbereiche mit einer Pipettenspitze von Objektträger gekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dem Gewebe wurden dann 20µl Proteinase K und 180 µl ATL-Puffer (DNeasy Blood&Tissue Kit, Qiagen, Hilden) zugegeben und der ganze Ansatz wurde über Nacht bei 56°C auf dem Schüttler inkubiert. Die weiteren Schritte wurden mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde anschließend am Nano-Drop (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Die für die DNA-Isolierung verwendeten Materialien sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Materialien für die DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten

Xylol	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Isopropanol 70%	Merck, Darmstadt
Proteinase K (20 mg/ml)	Qiagen, Hilden
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden

2.5.1 Sequenzierung der Exons 18, 19, und 21 von *EGFR*

Für die PCR wurden jeweils 200ng der genomischen DNA als Matrize eingesetzt. Für die PCR der Exons 18, 19 und 21 wurde jeweils ein Mastermix angesetzt. Benutzt wurde das Qiagen Fast Cycling PCR Kit (Qiagen, Hilden). In Tabelle 18 ist die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes aufgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 18: PCR-Reaktionsmix für die *EGFR*-Exons

1µl	forward primer (10pmol/µl)
1µl	reverse primer (10pmol/µl)
10µl	2x Fast cycling master mix
2µl	10x Coral Dye
6µl	DNA (200ng) in H ₂ O

Der PCR-Ansatz wurde gevortext, kurz abzentrifugiert und in den Cycler gegeben. Das Temperaturprofil der PCR-Reaktion ist in der folgenden Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Thermocycler-Programm für die *EGFR*-PCRs der Exons 18, 19 und 21

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	5min	1x
96°C	5s	1x
60°C	5s	1x
68°C	9s	40x
60°C	5s	
72°C	1min	
12°C	beliebig	1x

Im Anschluss an die PCR wurden 5 der 20µl Reaktionsansatz auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die PCR erfolgreich war und ein Produkt vorhanden ist. Zur Größenkontrolle des PCR-Produktes wurde parallel ein 100bp Marker aufgetragen. War ein Produkt vorhanden, wurden die restlichen 15µl des PCR-Ansatzes mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Im Anschluss wurde die Sequenzierreaktion mit Hilfe des BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Dreieich) durchgeführt. Da jedes PCR-Produkt von beiden Seiten sequenziert wurde, wurden ein Mastermix mit forward-Primer und einer mit reverse-Primer hergestellt. In der folgenden Tabelle 20 ist die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes aufgeführt.

Tabelle 20: Reaktionsmix für die *EGFR* Sequenzierreaktion

2µl	2,5x dideoxy sequencing mix
1µl	5x Sequenzierpuffer
1µl	Primer (3,2pmol/µl) forward bzw. reverse
6µl	DNA in H ₂ O

Der Ansatz wurde gevortext, kurz abzentrifugiert und in den Cyclor (PTC, MJ Research, ST. Bruno, Kanada) gegeben. Das Temperaturprofil der Sequenzierreaktion ist in der folgenden Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Thermocycler-Programm für die *EGFR*-Sequenzierreaktionen

Temperatur	Dauer	Zyklen
96°C	1min	1x
96°C	10s	30x
50°C	5s	
60°C	4min	
12°C	beliebig	1

Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss mit Hilfe des BigDye XTerminator® *Purification Kit* aufgereinigt. Dazu wurde zunächst das BDX-Reagenz im Vorratsgefäß mit Hilfe des Heax Top (Heidolph, Schwabach) 30s homogenisiert. Zehn µl des BDX Reagenz wurden dann zu 45µl SAM-Puffer gegeben. Von diesem Gemisch wurden dann 50µl entnommen und zu 10µl

der Sequenzierreaktion gegeben, die zuvor auf einer 96-Loch Platte (*MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate*, Applied Biosystems, Dreieich) vorgelegt wurden. Die Platte wurde mit einem Film (*MicroAmp® Optical Adhesive Film*, Applied Biosystems, Dreieich) dicht verschlossen und für 30min bei 4°C auf einem Rotations-Kipper (Reax2, Heidolph, Schwabach) inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt (900g, 5min), um das BDX-Reagenz, an das sich die nicht eingebauten Nukleotide gebunden haben, zu pelletieren. Anschließend folgte die Sequenzierung am ABI 3500 DX-Sequenzierer (Applied Biosystems, Dreieich). Die Auswertung der Sequenzierungen geschah mit Hilfe der Chromas Lite Software (Technelysium, South Brisbane, Australien). Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Materialien für die Sequenzierung von *EGFR*

Fast Cycling PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Dreieich
BigDye XTerminator® Purification Kit	Applied Biosystems, Dreieich
Hex Top Rotationskipper	Heidolph, Schwabach
100bp ladder	Invitrogen, Darmstadt
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Dreieich
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems Dreieich
PTC-225	MJ Research, St. Bruno, Kanada

2.5.2 Sequenzierung von *KRAS*

Für die PCR wurden jeweils 200ng der genomischen DNA als Matrize eingesetzt. Für die Sequenzierungen des Exons 1 wurde ein Mastermix angesetzt. Benutzt wurde der AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Dreieich). In Tabelle 23 ist die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes aufgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 23: PCR-Reaktionsmix für das *KRAS*-Exon1

5µl	10x PCR-Puffer II
3µ	MgCl ₂ (25mM)
1µl	dNTPs (1,25mM)
1µl	forward primer (10pmol/ml)
1µl	reverse primer (10pmol/ml)
0,25µl	AmpTaq Gold (5U/µl)
38,75µl	DNA (200ng) in H ₂ O

Der PCR-Ansatz wurde gevortext, kurz abzentrifugiert und in den Cycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg) gegeben. Das Temperaturprofil der PCR-Reaktion ist in der folgenden Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Thermocycler-Programm für die *KRAS* PCR-Reaktionen

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	10min	1x
95°C	30s	35x
59°C	30s	
72°C	30s	
72°C	10min	1x
4°C	beliebig	1x

Im Anschluss an die PCR wurden 10 der 50µl Reaktionsansatz auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die PCR erfolgreich war und ein Produkt vorhanden ist. Zur Größenkontrolle des PCR-Produktes wurde parallel ein 50bp Marker aufgetragen. War ein Produkt vorhanden, wurden die restlichen 40µl des PCR-Ansatzes mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Im Anschluss wurde die Sequenzierreaktion mit Hilfe des BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Dreieich) durchgeführt. Der Ansatz der Sequenzierreaktion entspricht hierbei dem Ansatz, der zuvor für die *EGFR*-Sequenzierreaktion verwendet wurde. Das Temperaturprofil für die *KRAS*-Sequenzierreaktion ist in der folgenden Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 25: Thermocycler-Programm für die *KRAS* Sequenzierreaktionen

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	1min	1x
96°C	10s	25x
50°C	5s	
60°C	4min	
4°C	beliebig	1x

Die folgenden Schritte der Aufreinigung, Sequenzierreaktion, erneuter Aufreinigung und Sequenzierung entsprechen den bei der *EGFR*-Sequenzierung durchgeführten Schritten. Die Auswertung der Sequenzierung wurde ebenfalls mit der Chromas Lite Software durchgeführt. Die für die Sequenzierung verwendeten Chemikalien und Geräte finden sich in Tabelle 26.

Tabelle 26: Materialien für die Sequenzierung von *EGFR*

Fast Cycling PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Dreieich
BigDye XTerminator® Purification Kit	Applied Biosystems, Dreieich
Heax Top Rotationskipper	Heidolph, Schwabach
50bp ladder	New Engand Biolabs, Frankfurt a.M.
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Dreieich
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Dreieich

2.5.3 Sequenzierung von *TP53*

Die Sequenzierung der *TP53*-Exons 4, 5, 6, 7, 8, 8-9 und 10 wurde von Kerstin Willecke und Silke Haubeiß durchgeführt. Für die PCR und die Sequenzierreaktion wurden dieselben Primer verwendet. Die Sequenz der Primer wurde der IARC-Datenbank entnommen (www.iarc.fr). In Tabelle 27 sind die Exons und die entsprechenden Primer dargestellt.

Tabelle 27: Für die *TP53*-Sequenzierung verwendete Primer

Exon	Primer
4	P-329 + P-330
5	P-312 + P-271
6	P-239 + P-240
7	P-333 + P-313
8	P-316 + P-319
8 bis 9	P-314 + P-315
10	P-E10Li + P-562

Die PCR wurde am IKP durchgeführt, die Produkte dann für die Sequenzierung zur Firma Genterprise (Mainz) geschickt. Die Auswertung der Sequenzierung wurde ebenfalls mit der Chromas Lite Software durchgeführt.

2.5.4 Verwendete Primer für die *EGFR*- und *KRAS*-Gentotypisierung

Vor den Arbeiten mit den Primern wurden Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 10pmol/µl hergestellt, die bei -20°C gelagert wurden. Die verwendeten Primer und ihre Sequenzen sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Für die Sequenzierungen verwendete Primer

Gen	Exon	Sequenz
<i>EGFR</i>	18	forward: TCA GAG CCT GTG TTT CTA CCA A
		reverse: TGG TCT CAC AGG ACC ACT GAT T
	19	forward: AAA TAA TCA GTG TGA TTC GTG GAG
		reverse: GAG GCC AGT GCT GTC TCT AAG G
	21	forward: GCA GCG GGT TAC ATC TTC TTT C
		reverse: CAG CTC TGG CTC ACA CTA CCA G
<i>KRAS</i>	1	forward: TAC TGG TGG AGT ATT TGA TAG T
		reverse: CAT GAA AAT GGT CAG AGA AAC C

2.6 MTT-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität einer Substanz

Zur Bestimmung der Zytotoxizität einer bestimmten Substanz in einem Zelltyp eignet sich die MTT-Reaktion. Bei dieser Reaktion wird das Tetrazoliumsalz MTT durch eine in

Mitochondrien aktiver Zellen vorkommende Dehydrogenase in eine violette Formazanverbindung (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan) umgesetzt.

In toten Zellen bzw. Zellen deren Metabolismus durch eine bestimmte Substanz gehemmt wird, kann diese Reaktion nicht in normalem Umfang ablaufen und so lassen sich Rückschlüsse auf die Zytotoxizität ziehen.

Für den MTT-Assay wurden 6000-8000 Zellen pro Loch einer 96-Loch Platte ausgesät und nach 24h mit dem zytotoxischen Reagenz behandelt. Nach weiteren 48h wurde in jedes Loch 10µl MTT-Lösung gegeben (10 mg/ml MTT in PBS) und für 2h bei 37°C inkubiert. Danach wurden in jedes Loch 90µl MTT-Lysepuffer (15 % SDS in DMF-Wasser (1:1) gelöst, pH 4,5) gegeben und die Platte über Nacht bei RT im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 570nm die mitochondriale Aktivität in den einzelnen Löchern mit Hilfe eines ELISA-Readers bestimmt werden. Die Auswertung der Rohdaten geschah mit Hilfe der GraphPad Prism software. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Materialien für den MTT-Test

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma, Taufkirchen
Gewebekulturplatte 96-Loch	Greiner Labortechnik, Frickenhäusen
GraphPad Prism 4.0 Software	GraphPad Software, USA

2.7 Durchflusszytometrische Methoden

2.7.1 Annexin-Assay zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen

Um den Anteil lebender und apoptotischer Zellen zu bestimmen, wurde eine Annexin-Färbung durchgeführt. Bei Annexin handelt es sich um ein Protein, das an Phosphatidylserin bindet, welches sich an der Innenseite der Zellmembran befindet. Während der Apoptose gelangt Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran. Somit lassen sich durch

fluoreszenz-markiertes Annexin apoptotische von nicht apoptotischen Zellen unterscheiden. Für die Versuche wurde Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-markiertes Annexin verwendet, dessen Anregungswellenlänge bei 488nm liegt. Der zusätzliche Einsatz von Propidium-Iodid (Anregungswellenlänge: 536nm) ermöglicht die Unterscheidung von früher und später Apoptose. Da der Farbstoff Propidium-Iodid nur durch Membranen gelangt, welche bereits zerstört sind, kann durch eine Propidium-Iodid-Färbung die späte Apoptose bzw. Nekrose sichtbar gemacht werden.

Für die Färbung wurden die Zellen trypsiniert, nach dem Zentrifugieren mit eiskaltem PBS gewaschen und dann ein weiteres Mal in eiskaltem Annexin V Bindepuffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 100µl Annexin V Bindepuffer aufgenommen, dem 5µl Annexin V-Lösung und 2µl Propidium-Iodid-Lösung (50µg/ml in PBS) zugegeben wurden. Nachdem die Lösung für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurden weitere 300µl Annexin V Bindepuffer zugegeben und die Zellen am FACS mit der CELLQuest™ software (Becton Dickinson, CA, USA) gemessen. Die für die Annexin-Färbung verwendeten Materialien sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Materialien für die Annexin-Färbung

Annexin V FITC-Lösung	BD Pharmingen, USA
Propidium iodide stock solution (1mg/ml)	Sigma, Taufkirchen
Annexin V binding buffer	BD Pharmingen, USA
PBS	Biochrom AG, Berlin
Fluorescence Activated Cell Analyzer "FACScan"	Becton Dickinson, USA
CELLQuest™ software	Becton Dickinson, USA

2.7.2 Bromdesoxyuridin- und PI-Färbung zur Zellzyklusanalyse

Mit Hilfe von Propidium-Iodid (PI), welches sich in doppelsträngige DNA und RNA einlagert, läßt sich der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmen und damit die einzelnen Phasen des Zellzyklus.

Mit Hilfe einer parallel durchgeführten Bromdesoxyuridin(BrdU)-Färbung läßt sich die aktive DNA-Synthese in der Population quantifizieren. Dazu wird in den letzten 45min vor dem Ablösen der Zellen BrdU zum Medium gegeben, welches dann anstelle von Thymidin während der Replikation in den DNA-Strang eingebaut wird. Mit einer anschließenden BrdU-Antikörperfärbung kann dann der Anteil von Zellen bestimmt werden, die während den 45min aktiv DNA synthetisierten.

Nach der 45 minütigen Inkubation mit BrdU wurden die Zellen trypsiniert, pelletiert und fixiert, indem das Pellet in eiskaltem Ethanol aufgenommen und anschließend die Suspension über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Am folgenden Tag wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (900rpm, 5min, RT) und danach bei einer 30 minütigen Inkubation in einer 2N HCl-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einer Boraxlösung neutralisiert. Nach mehreren Waschschritten mit einer PBT-Lösung wurden die Zellen für 30min mit 100µl einer verdünnten BrdU-Antikörperlösung (10µl Antikörper + 95µl PBT) bei 4°C inkubiert. Für die Verdünnung wurden 10µl Antikörper zu 95µl PBS/BSA/Tween-Lösung gegeben. Nach weiteren Waschschritten wurden die Zellen für 30min mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Der Antikörper wurde dazu zunächst 1:100 in einer PBS/BSA/Tween-Lösung vorverdünnt. Nach weiteren Waschschritten wurden die Zellen in einer PI-Färbelösung, die neben Propidiumiodid auch RNase A enthielt inkubiert. Durch die RNase wurde die freigewordene RNA zerstört, die ansonsten die Analyse gestört hätte. Nach 10min Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen im FACS mit der CELLQuestTM software (Becton Dickinson, CA, USA) gemessen. Die Materialien für die Zellzyklusanalyse sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31: Lösungen, Chemikalien und Geräte für die Zellzyklusanalyse

PBT-Lösung	1x PBS 1% (w/v) BSA 0,5% (v/v) Tween
Propidium-Iodid-Lösung	1x PBS 50µg/ml Propidium-Iodid 1mg/ml RNase A 10mg/ml Glukose
BrdU	Sigma, Steinheim
BSA	Sigma, Steinheim
PBS	Biochrom AG, Berlin
HCl	Roth, Karlsruhe
Borax	Roth, Karlsruhe
Anti-BrdU	Becton Dickinson, USA
GAM(goat anti mouse)-FITC	Dianova, Hamburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Propidium-Iodid	Sigma, Steinheim
RNase A	Qiagen, Hilden
Fluorescence Activated Cell Analyzer "FACScan"	Becton Dickinson, USA
CELLQuest™ software	Becton Dickinson, USA

2.8 β -Galaktosidase Färbung an Dasatinib-behandelten Fibroblasten

Für die β -Galfärbung wurden CAFs auf Chamber-Slides ausgesät und am folgenden Tag mit 100nM Dasatinib behandelt. Nach 48h wurden das Medium durch Medium ohne Dasatinib ersetzt und die Zellen für weitere 7 Tage kultiviert. Danach wurde mit der β -Galaktosidase-Färbung begonnen, die spezifisch für seneszente Zellen ist. Nur seneszente Zellen exprimieren das Enzym β -Galaktosidase. Für die Färbung wurde das Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) verwendet. Die Färbung wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Als Kontrolle dienten Lungenfibroblasten der Passage 5, welche die Proliferation bereits eingestellt hatten. Die

Materialien, welche für die β -Galaktosidasefärbung verwendet wurden sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Für die Färbung seneszenten Fibroblasten verwendete Materialien

Senescence β -Galactosidase Staining Kit	Cell signaling Technology, Frankfurt a.M.
Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System	Nunc, Wiesbaden

2.9 Transkriptomanalyse

2.9.1 RNA-Isolation für die Untersuchung des Dasatinib-Effekts

Um den Einfluß einer Dasatinib-Behandlung auf das Transkriptom primärer CAFs zu untersuchen, wurden CAFs ausgewählt, die sich zuvor im MTT-Assay oder BrdU-Assay als sensitiv gegenüber Dasatinib erwiesen haben. Von jeder der insgesamt 9 CAFs wurden zwei 175cm²Zellkultur-Flaschen für den Vergleich unbehandelt gegenüber Dasatinib-behandelt vorbereitet. Dazu wurden pro 175er Flasche 500 000 CAFs ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium ersetzt, wobei in eine Flasche Medium ohne Dasatinib gegeben wurde, in die andere Flasche Medium mit 100nM Dasatinib. Nach weiteren 48h wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und in Medium überführt, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Nach dem darauffolgenden Zentrifugationsschritt (5min, 1400rpm und 4°C) wurde das Zellpellet in eiskaltem PBS aufgenommen und ein weiteres Mal, wie zuvor beschrieben, zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die RNA aus den Zellen wurde dann mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Qualität und Konzentration der so erhaltenen RNA wurde anschließend am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) bestimmt.

2.9.2 RNA-Isolation für den Vergleich von CAFs und NAFs

Für den Vergleich von CAFs und NAFs auf Expressionsebene wurden CAFs und NAFs desselben Patienten in 25cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Es wurden je 3 Flaschen mit 150

000, 200 000 bzw. 250 000 Zellen ausgesät. Nach 2-3 Tagen waren die Zellen zu 60-90% konfluent und wurden geerntet. Die Zellen wurden, wie zuvor für die Dasatinib-behandelten CAFs beschrieben, geerntet und später die Qualität und Konzentration der isolierten RNA am 2100 Bioanalyzer bestimmt. Tabelle 33 zeigt die bei der Aufreinigung verwendeten Materialien.

Tabelle 33: Für die RNA-Aufreinigung verwendete Materialien

Rneasy Minikit	Qiagen, Hilden
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA

2.9.3 Transkriptomanalyse an primären Fibroblasten

Für die Untersuchung des Einflusses einer 48-stündigen Dasatinib-Behandlung auf das Transkriptom von CAFs wurden Microarray-Analysen bei der Microarray Facility Tübingen in Auftrag gegeben. Dazu wurden die isolierten RNAs nach Tübingen geschickt, wo die Hybridisierung mit humangene 1.0st Array Chips durchgeführt wurde. Die anschließende Qualitätskontrolle wurde ebenfalls von der Microarray Facility durchgeführt. Mit Hilfe der Genespring GX 10.0.2 Software wurden von Silke Haubeiß die Rohdaten RMA-normalisiert. Um signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten CAFs festzustellen, wurde von ihr ein gepaarter t-test und eine anschließende Benjamini-Hochberg Korrektur durchgeführt, um die Zahl von „Falsch Positiven“ Genen zu reduzieren. Als Grenze für eine differenzielle Expression wurde ein p-Wert $< 0,05$ und ein mindestens 2-facher Unterschied im Expressionslevel eines Gens festgelegt.

Um die Unterschiede zwischen primären CAFs und NAFs aus demselben Patienten festzustellen, wurden die isolierten RNAs von 9 Patienten als biologische Triplikate zu Boehringer Wien geschickt, wo im Labor von Wolfgang Sommergruber die Hybridisierung durchgeführt wurde. Bei den verwendeten Arrays handelte es sich um den GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array. Die Qualitätskontrolle wurde gemeinsam mit Stefan Winter mit der *Affymetrix® Expression Console™* Software durchgeführt. Die anschließende statistische

Auswertung erfolgte mit Hilfe der R-2.15.0 Software mit limma 3.12.1. Die Einzelwerte der Triplikate wurden dabei als technische Replikate behandelt und nicht als ein Wert zusammengefaßt. Um signifikante Unterschiede zwischen CAFs und NAFs festzustellen, wurde ein unadjustierter limma t-Test durchgeführt und anschließend die p-Werte nach Benjamini-Hochberg adjustiert. Als Grenze für eine differenzielle Expression wurde ein p-Wert $<0,05$ und ein mindestens 1,3-facher Unterschied im Expressionslevel eines Gens festgelegt. Die verwendeten Materialien und Programme sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Für die Transkriptom-Analyse verwendete Materialien

GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array	Affymetrix, High Wycombe, U.K.
GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array	Affymetrix, High Wycombe, U.K.
Affymetrix® Expression Console™ Software	Affymetrix, High Wycombe, U.K.
Genespring GX 10.0.2 Software	Agilent Technologies, Santa Clara CA
R software	The R Foundation for Statistical Computing

2.10 Bestimmung der Dasatinib-Konzentration im Gewebe eines Lungenkarzinoms

2.10.1 *Ex vivo* Perfusion humaner Lungenlappen

Das Modell der *ex vivo* perfundierten, isolierten, humanen Lunge wurde verwendet, um die Verteilungskinetik von Medikamenten in der humanen Lunge zu untersuchen (Linder et al, 1996). Das Modell wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer positiv begutachtet (IKP 220, Votum vom 6.2.2006). Dazu wurde ein Lungenlappen eines Tumorpatienten direkt nach der Entnahme aus dem Brustkorb von Prof. Dr. Godehard Friedel mit Hilfe passender Edelstahl-Kanülen über die Pulmonalarterien mit der mechanischen Rollenpumpe einer Herz-Lungen-Maschine (Stöckert Instrumente GmbH, München) verbunden, was die anschließende Perfusion ermöglichte. Vor der Perfusion wurde zunächst das Blut durch die Perfusion mit 1l Puffer (Tabelle 35) aus dem Gewebe entfernt. Dadurch wurde der Verschluss der Gefäße durch eine während der Perfusion eintretenden Koagulation

verhindert. Der Perfusionspuffer mit dem Blut trat über die Lungenvene aus dem Lungengewebe aus.

Tabelle 35: Zusammensetzung des Perfusionspuffers

Perfusions-Puffer	85mM NaCl 4mM KCl 2,5mM CaCl ₂ ·2H ₂ O 1mM MgCl ₂ ·6H ₂ O 2,5mM KH ₂ PO ₄ 25mM NaHCO ₃ 5,5mM Glukose 3% Albumin pH7,4
-------------------	--

Anschließend wurde der Lungenlappen über den Bronchus mit dem Beatmungsgerät verbunden und das Gewebe in die 40*50*30cm³ große Perfusionskammer gegeben. Die Wände der Kammer wurden über einen Thermostat mit integrierter Pumpe kontinuierlich mit 37°C warmem Wasser durchspült, um die Temperatur in der Kammer auf einem physiologischen Niveau zu halten. Die Lunge lag dabei auf einem Edeltstahlgitter auf, welches mit einer Waage verbunden war. Somit konnte während der gesamten Perfusion das Gewicht des Gewebes festgestellt und ein entstehendes Ödem rechtzeitig erkannt werden. Der Aufbau der Perfusionsapparatur ist in Abb. 2 dargestellt.

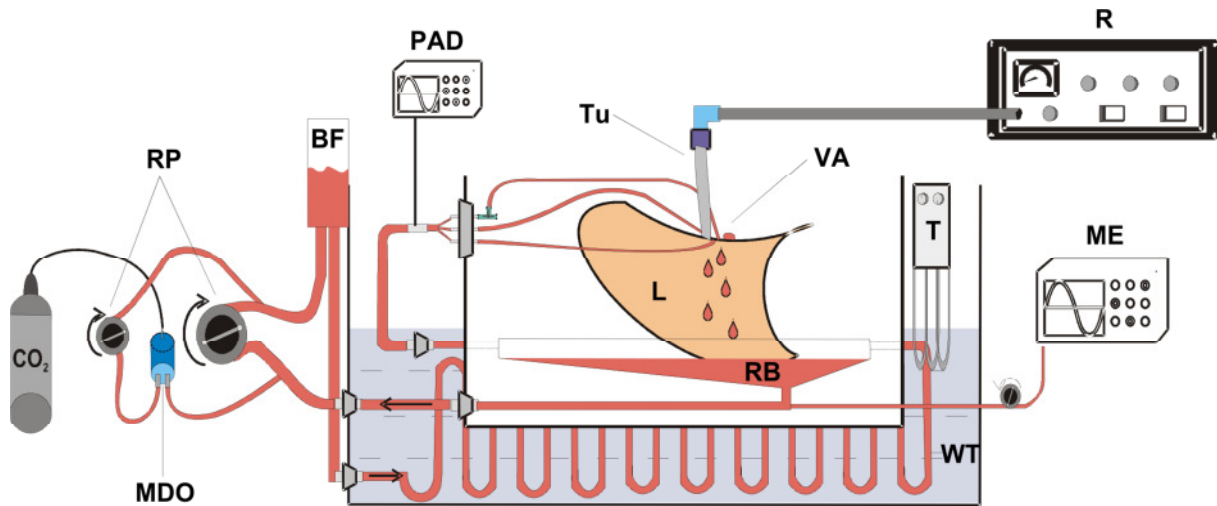


Abb. 2: Aufbau der Lungenperfusion. L: Lunge; RB: Reservoir-Behälter; VA: Venöser Ausgang; T: Thermostat; ME: Messeinheit; R: Respirator; WT: Wärmetauscher; Tu: Tubus; PAD: pulmonal-arterieller Drucksensor; BF: Blasenfalle; RP: Rollenpumpe; MDO: Membran-Deoxygenator. Abbildung verändert nach Friedel (2002).

Während der Perfusion wurden die Parameter pH, Gewicht, Temperatur, Sauerstoff- und Kohlendioxid-Partialdruck gemessen und mit der Pulmodyn software (HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten) aufgezeichnet. Die für die Perfusion verwendeten Materialien sind in Tabelle 36 aufgeführt.

Tabelle 36: Materialien zum Aufbau des Perfusionssystems

Perfusionskammer Moist chamber 869/X	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
Thermostatic circulator Type E103	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
Puffer-Reservoir	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
Pressure Transducer P75 Typ 379	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
Plugsys Basic System Typ 603 Gehäuse	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
TAM-A Plugsys Transducer Type 705/1	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
TCAM Plugsys Thermocouple Type 706	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
Laboratory Balance Mod KPRS-6200-2	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
Analog interface for KPRS-8200-1	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
HSE-USB Data Aquisition Schnittstelle	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
HSE Software Pulmodyn	HSE-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten
Servo ventilator 900C Beatmungsgerät	Siemens-Elema, Schweden
WKL230 Thermostatpumpe	Lauda, Lauda-Königshofen
TRP008 Temperaturregler	Landgraf Laborsysteme GmbH, Langenhagen

Für die Perfusion wurde Perfusionspuffer verwendet, dem Dasatinib in einer Konzentration von 100nM zugegeben wurde und dessen Temperatur mit Hilfe des WKL Thermostats (Lauda, Lauda-Königshofen) konstant auf 37°C gehalten wurde. Eine selbstgebaute Blasenfalle im Perfusionskreislauf sorgte vor dem Lungengewebe dafür, dass keine Luft in die Lungengefäße gelang. Unmittelbar vor Beginn der Perfusion und 5, 10, 15, 20, 25, 35, 45, 55, 65, 85, 105, 125 und 155min nach Beginn der Perfusion, wurden Pufferproben entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine ca. 1cm³ Gewebeprobe wurde ebenfalls vor Beginn der Perfusion aus der Lungenperipherie entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Weitere Gewebeproben wurden nach 5, 13, 22, 40, 75, 115 und 155min entnommen. Nach Abschluss der Perfusion wurde der Lungenlappen in die Pathologie des RBK gebracht, wo Gewebeproben aus der Peripherie der Lunge, dem Zentrum des Tumors und seiner Wachstumszone entnommen wurden. Diese Proben wurden ebenfalls direkt nach der Entnahme schockgefroren.

2.10.2 Bestimmung der Dasatinibkonzentration mittels UHPLC

Die Konzentration von Dasatinib im Perfusionspuffer und in Gewebeproben der peripheren Lunge und des Tumors wurden massenspektrometrisch mittels Isotopenverdünnungsanalyse mit d8-Dasatinib (Toronto Research Chemicals) als internem Standard bestimmt. Die Messungen erfolgten gegen eine Kalibration in Perfusionspuffer (102nM, 51nM, 25,5nM, 12,8nM, 6,4nM, 3,2nM, 0nM) bzw. in Rattenlungengewebe aus Perfusionsexperimenten mit wirkstofffreiem Puffer (510nM, 255nM, 127,5nM, 63,8nM, 31,9nM, 15,9nM, 0nM). Das in ein Reaktionsgefäß eingewogene Gewebe wurde gefriergetrocknet, mit einem Pistill pulverisiert und das feine Gewebepulver danach in Wasser resuspendiert. Das in den Perfusionsproben und resuspendierten Gewebeproben vorhandene Protein wurde durch Fällung mit dem doppelten Volumen Acetonitril + 1% Ameisensäure, dem 20nM d8- Dasatinib zugesetzt war, entfernt. Der klare Überstand wurde in 0,1% Ameisensäure in Wasser 1:5 verdünnt und 20µl injiziert. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Agilent 1200 UHPLC-Anlage mit einer Poroshell 120 EC-C1850 Säule und einem Gradienten von 20 bis 60% 0,2% Ameisensäure in Acetonitril in 0,1% Ameisensäure in Wasser innerhalb von 4,5 Min. Die Detektion des Analyten und des internen Standards

erfolgten nach Elektrosprayionisierung im Multi-Reaktions-Modus bei 488,2 -> 401 für Dasatinib und 496->406 für d8-Dasatinib. Die Auswertung erfolgte mit der MassHunter Software (Agilent Technologies, Waldbronn). Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 37 aufgeführt.

Tabelle 37: Materialien zur Messung der Dasatinib-Konzentration

Dasatinib	Research Chemicals Inc. (Novartis Inc, North York, Kanada)
Dasatinib-d8	Toronto Research Chemicals (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Elchen)
MassHunter software	Agilent Technologies, Waldbronn
6460 TripleQuad LC/MS	Agilent Technologies, Waldbronn
poroshell 120 EC-C1850	Agilent Technologies, Waldbronn
FreeMobile 6	VirTis, New York, USA

2.11 Statistische Auswertung

Die Daten werden mit der Standardabweichung angegeben, wenn nicht anders gekennzeichnet. Beim Vergleich zweier Gruppen wurden t-tests durchgeführt, um Daten auf eine Korrelation zu überprüfen, wurde der Spearman korrelationskoeffizient ermittelt. Zur statistischen Auswertung wurden die Programme in Tabelle 38 verwendet.

Tabelle 38: Für die statistischen Auswertungen verwendete Programme

R	The R Foundation for Statistical Computing
GraphPad Prism 4.0 Software	GraphPad Software, USA
SPSS	IBM, USA

3. Ergebnisse

3.1 Molekulare Unterscheidung von CAFs und NAFs der Lunge

Um CAFs von normalen Lungenfibroblasten molekular zu unterscheiden, wurden genomweite Expressionsprofile von CAFs aus primären Bronchial-Karzinomen erstellt, welche dann mit den Expressionprofilen normaler Lungenfibroblasten derselben Patienten verglichen wurden. Die CAFs wurden dabei direkt aus dem Tumorbereich isoliert, die normalen Fibroblasten aus Normalgewebe desselben Lungenlappens. Insgesamt wurden so die Unterschiede zwischen CAFs und normalen Fibroblasten an Material aus 9 primären Bronchialkarzinomen bestimmt. Bei den Karzinomen handelte es sich um 2 großzellige Karzinome, 1 adenosquamöses Karzinom, 1 Plattenepithelkarzinom und 5 Adenokarzinome. Mit den CAF/NAF-Paaren jedes Patienten wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. Die Zellen wurden schockgefroren und die RNA mit Hilfe des RNeasy Kits isoliert. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration und RNA-Qualität am Agilent BioAnalyzer 2100 bestimmt. Die Hybridisierung der RNA wurde vom Labor von Wolfgang Sommergruber (Boehringer, Wien) durchgeführt, die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Stefan Winter (IKP, Stuttgart) ausgewertet. Die Qualitätskontrolle wurde mit der Expression Console Software (Affymetrix) durchgeführt. Insgesamt 3 Arrays wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da sie den Qualitätsanforderungen nicht genügten. Hierbei handelt es sich um CAF-Arrays von 3 verschiedenen Patienten. Als Grenzen für eine differentielle Expression wurde eine Veränderung der Expression um einen Faktor von mindestens 1,3 und ein p-Wert $<0,05$ nach der Adjustierung nach Benjamini-Hochberg gewählt. Insgesamt 60 Gene erfüllten die so gewählten Anforderung und zeigten eine signifikant veränderte Expression in den untersuchten CAFs. Die 60 Gene werden im Weiteren als CAF-Gene bezeichnet. Von den so bestimmten Genen zeigten 42 eine reduzierte und 18 eine gesteigerte Expression in CAFs. Die 60 Gene und ihre Expression sind in Tabelle 39 aufgeführt.

Tabelle 39: Auflistung der in CAFs und NAFs differenziell exprimierten Gene und die Expression in CAFs im Vergleich zu normalen Fibroblasten. p-Wert adjustiert nach Benjamini-Hochberg.

Gensymbol	Expression in CAFs (Faktor)	adjustierter p-Wert	Gensymbol	Expression in CAFs (Faktor)	adjustierter p-Wert
ABCA1	-1.349	1.7357E-07	MAOB	-1.323	0.00144034
ABCC9	-1.476	1.7357E-07	MCTP2	1.383	4.947E-06
ALDH1A1	-1.821	0.00061112	MME	1.410	0.0435155
APCDD1 LOC100130468	1.315	4.185E-05	MMP3	-1.527	0.00854735
AURKB	1.320	0.00024043	NOV	1.377	3.5701E-05
CCDC102B	-1.340	0.00011386	NRK	-1.364	0.03529516
CD4	-1.337	0.0185041	PAMR1	-1.360	0.00143855
CHRD1	-1.936	8.2695E-06	PAPPA PAPPAS	-1.351	0.00039046
DIRAS3	-1.375	0.00061112	PCDH10	1.322	0.04307689
DSG2	1.311	3.6707E-05	PCOLCE2	-1.352	0.02391319
EDIL3	1.552	0.00259602	PLCB1 LOC100131599	-1.372	4.2619E-06
EREG	1.325	0.00098232	PPARG	-1.505	2.4566E-07
EYA4	-1.343	0.00727039	PPP1R3C	-1.361	0.0003061
FGL2	-1.597	0.01150173	PRKG2	-1.596	0.01115486
FLRT3	-1.920	1.1539E-08	PSG8 PSG1	-1.369	3.1277E-05
GABARAPL1 GABARAPL3	-1.313	0.01754763	RGS4	1.302	0.00018398
GCLC	-1.318	0.00018398	RPS6KA6	-1.542	3.2709E-06

GPX3	-1.351	0.00023551	S100A3 S100A4	1.329	0.03788047
GREM1	1.402	0.0001033	SEMA3D	1.437	0.0215418
HHIP	1.611	7.453E-05	SGIP1	-1.430	3.1277E-05
HSD11B1	-1.356	0.02581098	SLC16A4	-1.337	0.02288726
IL13RA2	-2.109	8.1488E-07	ST6GALNAC5	1.540	1.7357E-07
KCNJ2	-1.370	0.00238902	SULF1	1.417	0.00121351
KCNK2	-1.386	0.00729452	SYTL2	-1.330	7.233E-06
KRT19	-1.358	0.0303555	TFPI2	-2.078	8.1659E-08
KRTAP1-1 KRTAP1-3	-1.394	0.01218466	TLR4	1.493	4.9434E-08
KRTAP1-5	-1.452	0.01803426	TMOD2	-1.349	0.00011102
LIF	-1.342	0.00221257	TRHDE LOC283392	-1.301	0.00412598
LRRC17 FBXL13	-1.535	0.00027512	TSPAN13	-1.494	8.2695E-06
LYRM5	-1.307	0.00259602	VAT1L	1.304	0.00017561

Bei genauerer Analyse der „Gene Ontology-Terms“ (GO-Terms) zeigt sich, dass viele der Gene an denselben Prozessen beteiligt sind. Vierzehn der 60 Gene kodieren für Proteine, die sich im Gewebe im extrazellulären Raum wiederfinden. In CAFs kommt es zudem zur differentiellen Expression von 11 Genen deren Produkte an der Signaltransduktion beteiligt sind bzw. Komponenten von Signalwegen sind. So sind 5 Gene an Signalwegen der Interleukine 1, 2, 6, 8, 12, 15 und 17 beteiligt bzw. regulieren sie deren Sekretion und Biosynthese. Jeweils 3 der 60 gefundenen Gene kodieren für Proteine, die an der Regulation der BMP (Bone Morphogenetic Protein)-Signalwege, des Wnt (Wingless Integrated-1)-Signalweges und des ERK1/ERK2 (Extracellular signal-Related Kinase 1/2)-Signalweges

beteiligt sind. Fünf Gene kodieren für Proteine die regulatorisch in den Prozess der Apoptose eingreifen. Ebenfalls 5 Gene sind mit dem GO Term Zell-Adhäsion assoziiert bzw. mit metabolischen Prozessen. Jeweils 3 Gene werden mit dem Prozess Zell-Adhäsion und – Differenzierung in Verbindung gebracht, zwei Gene mit dem mitotischen Zellzyklus. In CAFs kommt es zudem zur differenziellen Expression von Genen die mit den GO terms *DNA-repair*, *wound healing*, *metalloendopeptidase activity* und dem Prozess Angiogenese assoziiert sind.

3.1.1 CAF-Gene als prognostische Marker

Um zu überprüfen, ob die Expression der CAF-Gene in Bronchialkarzinomen mit einer Veränderung im Gesamtüberleben in Verbindung gebracht werden kann, wurde die Expression der CAF-Gene in einem frei zugänglichen Patientenkollektiv näher untersucht. Hierbei handelt es sich um die *DC Lung study* des *National Cancer Institute (NCI)*, welche das Transkriptom von 462 Lungen-Adenokarzinomen auf Basis des HG-U133A-Arrays quantitativ beschreibt. Bei insgesamt 342 der 462 Patienten waren Informationen zum Gesamtüberleben, Nodal-Status, Tumor-Status, Rauchverhalten und zur Histologie vorhanden. Die übrigen 120 Fälle bei denen diese Informationen nicht zur Verfügung standen, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Insgesamt konnten 46 der 60 CAF-Gene ein eindeutiges Set an Sonden zugewiesen werden. Eine Auflistung dieser Gene und ihrer Expression in CAFs sind in Tabelle 40 zu sehen.

Tabelle 40: CAF-Gene mit bekannter Expression im *DC Lung Study* Kollektiv und deren Expression in CAFs im Vergleich zu normalen Fibroblasten. p-Wert adjustiert nach Benjamini-Hochberg.

Gensymbol	Expression in CAFs (Faktor)	adjustierter p-Wert	Gensymbol	Expression in CAFs (Faktor)	adjustierter p-Wert
ABCA1	-1.349	1.7357E-07	LIF	-1.342	0.00221257
ABCC9	-1.476	1.7357E-07	MAOB	-1.323	0.00144034

ALDH1A1	-1.821	0.00061112	MCTP2	1.383	4.947E-06
AURKB	1.320	0.00024043	MME	1.410	0.0435155
CCDC102B	-1.340	0.00011386	MMP3	-1.527	0.00854735
CD4	-1.337	0.0185041	NOV	1.377	3.5701E-05
CHRD1	-1.936	8.2695E-06	PCOLCE2	-1.352	0.02391319
DIRAS3	-1.375	0.00061112	PPARG	-1.505	2.4566E-07
DSG2	1.311	3.6707E-05	PPP1R3C	-1.361	0.0003061
EDIL3	1.552	0.00259602	PRKG2	-1.596	0.01115486
EREG	1.325	0.00098232	RGS4	1.302	0.00018398
EYA4	-1.343	0.00727039	RPS6KA6	-1.542	3.2709E-06
FGL2	-1.597	0.01150173	SEMA3D	1.437	0.0215418
FLRT3	-1.920	1.1539E-08	SLC16A4	-1.337	0.02288726
GCLC	-1.318	0.00018398	ST6GALNAC5	1.540	1.7357E-07
GPX3	-1.351	0.00023551	SULF1	1.417	0.00121351
GREM1	1.402	0.0001033	SYTL2	-1.330	7.233E-06
HSD11B1	-1.356	0.02581098	TFPI2	-2.078	8.1659E-08
IL13RA2	-2.109	8.1488E-07	TLR4	1.493	4.9434E-08
KCNJ2	-1.370	0.00238902	TMOD2	-1.349	0.00011102
KCNK2	-1.386	0.00729452	TRHDE	-1.301	0.00412598
KRT19	-1.358	0.0303555	TSPAN13	-1.494	8.2695E-06

Um einen Zusammenhang zwischen der Expression der 46 Gene und dem klinischen Verlauf feststellen zu können, wurde eine univariate Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Zunächst wurde festgelegt, ob der Tumor des Patienten eine CAF-ähnliche Expression eines Gens zeigt bzw. eine Expression, die mehr der normaler Lungenfibroblasten entspricht. Dazu wurde für jedes Gen der Median der Expression im gesamten Kollektiv von 342 Patienten bestimmt. Ein Patient zeigt dann eine CAF-ähnliche Expression eines Gens, wenn im Falle eines in CAFs höher exprimierten Gens seine Expression über dem Median des Kollektivs liegt. Für die in CAFs niedriger exprimierten Gene zeigt ein Patient demzufolge dann eine CAF-ähnliche Expression, wenn seine Expression unterhalb der des Medians liegt. Anschließend wurde die Summe aller Gene gebildet, welche eine Expression zeigten, die der normaler Fibroblasten entspricht. Zeigen weniger als 24 der 46 untersuchten Gene eine Expression, die der normaler Fibroblasten entspricht, so wird das Expressionsmuster des Tumors als CAF-ähnlich bezeichnet. Demzufolge zeigen Tumore eine Expression, die der normaler Fibroblasten entspricht, wenn 24 oder mehr Gene eine NAF-ähnliche Expression zeigen. Insgesamt zeigten 221 der untersuchten 342 Tumore ein CAF-ähnliches Expressionsmuster und 121 ein Expressionsmuster, das mehr dem normaler Fibroblasten entspricht. Um festzustellen, ob es in den beiden so festgelegten Gruppen zu Unterschieden im Gesamtüberleben kommt, wurde der Zeitraum der ersten 60 Monate nach der Diagnose näher untersucht. Patienten, welche nach dem 60. Monat verstarben bzw. aus der Studie ausschieden, wurden bei 60 Monaten zensiert und als lebend gewertet. Abb. 3 zeigt die Überlebensrate in den beiden Gruppen für die ersten 5 Jahre.

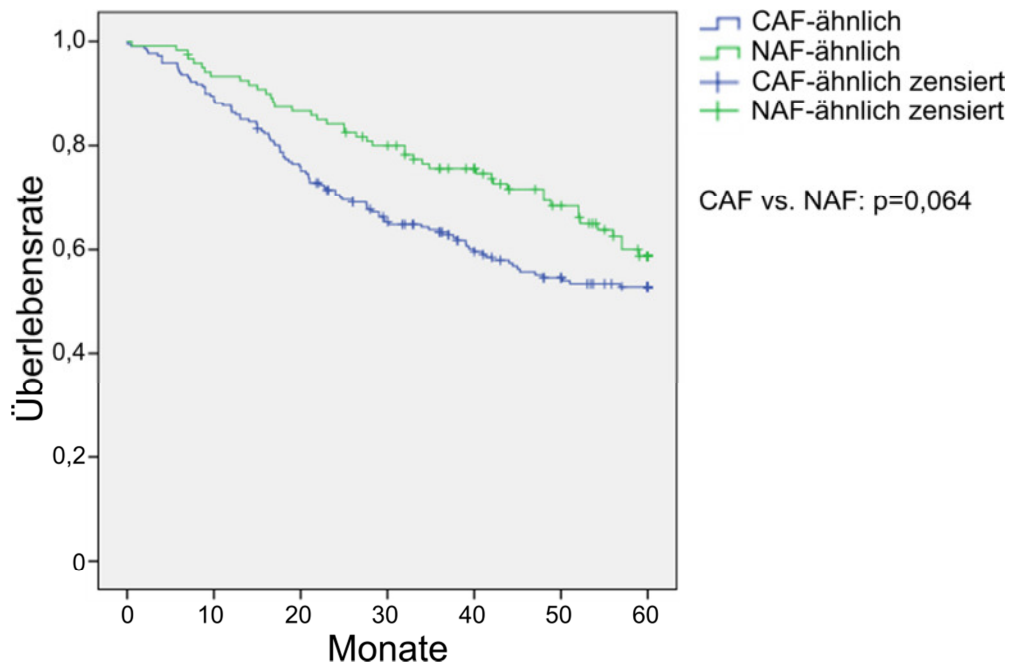


Abb. 3: 5-Jahres Überleben von Tumorpatienten der beiden Gruppen. Blaue Linie: Patienten mit einer CAF-ähnlichen Expression. Grüne Linie: Patienten mit einer NAF-ähnlichen Expression.

Es zeigt sich, dass der Anteil lebender Patienten über den gesamten untersuchten Zeitraum hinweg in der Gruppe der NAF-ähnlichen Tumore höher ist als in der Gruppe der CAF-ähnlichen Tumore. Hierbei handelt es sich jedoch lediglich um einen Trend ($p=0,064$).

Da es sich bei der Einteilung in nur 2 Gruppen um eine sehr grobe Einteilung handelt, wurden die Patienten im Folgenden anhand des Genexpressionsmusters in 3 ungefähr gleich große Gruppen eingeteilt. Die neu gebildete Gruppe des intermediären Expressionsmusters umfasst Fälle, die in 20 bis 24 Genen eine NAF-ähnliche Expression zeigen. Die Fälle, die in weniger als 20 Genen eine NAF-ähnliche Expression zeigen, werden als CAF-ähnlich bezeichnet, die mit mehr als 24 Genen mit NAF-ähnlicher Expression als NAF-ähnlich. Dadurch wird erreicht, dass sich ein NAF-ähnlicher Tumor nicht allein durch die unterschiedliche Expression eines einzigen Gens von einem CAF-ähnlichen Tumor unterscheiden kann. Die Gruppe der CAF-ähnlichen Tumore beinhaltet bei dieser Auswertung 95 Fälle, die Gruppe der NAF-ähnlichen Tumore 109 Fälle und die Gruppe der intermediären Tumore 138 Fälle. Abb. 4 zeigt die Überlebensrate in den 3 Gruppen für die ersten 5 Jahre.

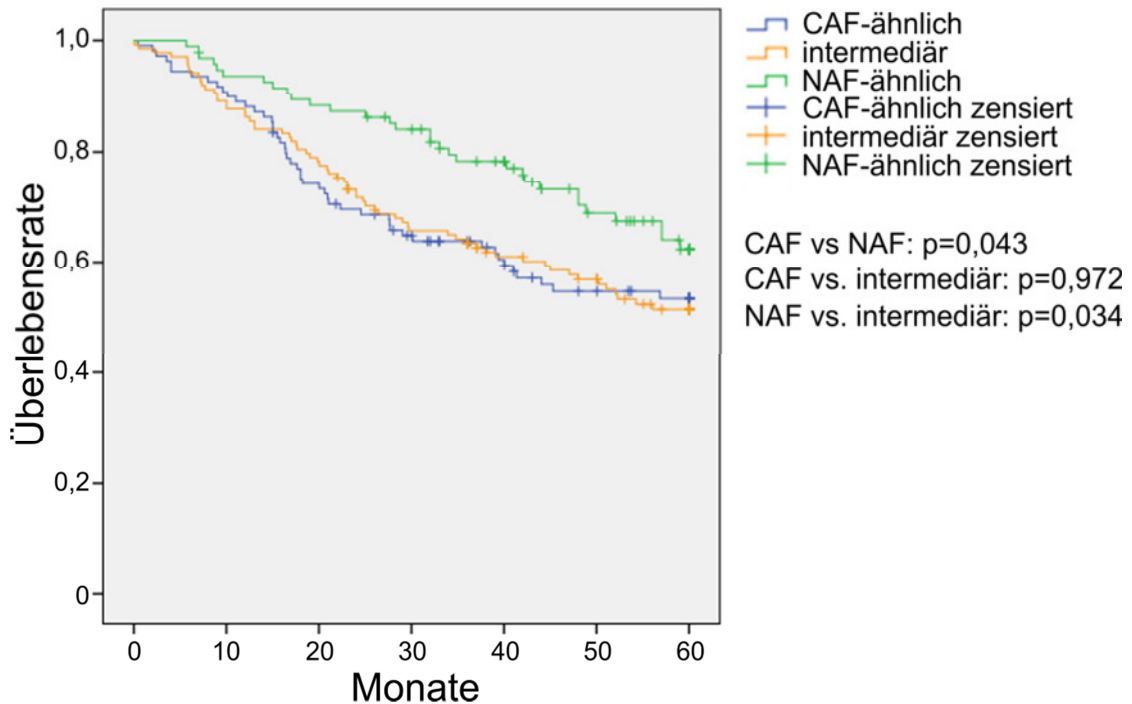


Abb. 4: 5-Jahres Überleben von Tumorpatienten der 3 Gruppen. Blau Linie: Patienten mit einer CAF-ähnlichen Expression. Grüne Linie: Patienten mit einer NAF-ähnlichen Expression. Orange Linie: Patienten mit intermediärer Expression.

Wieder weist die Gruppe der NAF-ähnlichen Tumore zu jedem Zeitpunkt innerhalb der ersten 5 Jahre den höchsten Anteil an lebenden Patienten auf. Zwischen den beiden Gruppen, die sich durch eine CAF-ähnliche bzw. intermediäre Expression auszeichnen, ist kein signifikanter Unterschied im Verlauf festzustellen. Patienten mit einer NAF-ähnlichen Expression in ihren Tumoren haben eine signifikant bessere Prognose als Patienten der CAF-ähnlichen Gruppe ($p=0,043$) bzw. der intermediären Gruppe ($p=0,034$).

Mit Hilfe einer Cox-Regression wurde im Anschluss überprüft, ob es sich beim Expressionsmuster der 46 gefundenen Gene um einen von den bekannten klinischen Parametern unabhängigen prognostischen Faktor handelt. Tabelle 41 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Faktoren, die in der multivariaten Analyse berücksichtigt wurden und die Verteilung der Patienten.

Tabelle 41: Faktoren, die in der multivariaten Analyse berücksichtigt wurden und die Verteilung der Patienten innerhalb der verschiedenen Faktorenuntergruppen.

Parameter	Einteilung	Anzahl Patienten
Tumorstatus	T1	108
	T2	210
	T3	20
	T4	4
Nodalstatus	N0	229
	N1	69
	N2	44
Rauchverhalten	Nichtraucher	48
	ehemaliger Raucher	263
	Raucher	31
Gruppe	NAF-ähnlich	95
	intermediär	138
	CAF-ähnlich	109

Bei den klinischen Parametern handelte es sich um den Nodal-Status, den Tumor-Status und die Morphologie der Tumorzellen bzw. um das Rauchverhalten des Patienten. Eine Beschreibung der verschiedenen Nodal- und Tumorstadien ist in der Literatur zu finden (Collins et al., 2007).

Für die Cox-Analyse wurden die Patienten nach einem binären System in Gruppen eingeteilt. So wurden Patienten mit T1-Tumoren mit Patienten mit Tumoren des Stadiums T2, T3 und T4 verglichen, welche als Gruppe zusammengefasst wurden. Lymphknotenmetastasenfreie Patienten wurden als Gruppe den Patienten gegenübergestellt, welche bereits Lymphknotenmetastasen zeigten. Weiterhin wurde die Gruppe der Nichtraucher der Gruppe der Raucher und ehemaligen Raucher gegenübergestellt. Genauso bildeten Patienten mit gut

differenzierten Tumoren eine Gruppe und Patienten mit mäßig und schlecht differenzierten Tumoren die andere Gruppe. Beim Expressionsmuster wurden ebenfalls zwei Gruppen gebildet. So wurden Patienten, welche Tumore mit einem NAF-ähnlichen Expressionsmuster besitzen den Patienten mit einem intermediären und CAF-ähnlichen Muster gegenübergestellt. Aus der univariaten Analyse ist bereits bekannt, dass es zu keinem signifikanten Unterschied im Überleben zwischen den beiden letztgenannten Patientengruppen kommt. Das Ergebnis der multivariaten Analyse ist in der folgenden Tabelle 42 zu sehen.

Tabelle 42: Multivariate Analyse der klinischen Faktoren und des Expressionsmusters. Gezeigt sind die einzelnen Faktoren, der p-Wert (Signifikanz), die Hazard-Ratio (Exp(B)) und das Konfidenzintervall.

Faktor	Signifikanz	Exp(B)	95,0% Konfidenzintervall für Exp(B)	
			Untere	Obere
Gruppe NAF vs CAF/intermediär	.170	1.326	.886	1.985
Histologie	.728	1.098	.647	1.863
Rauchverhalten	.230	1.377	.817	2.323
N-Status	.000	2.747	1.964	3.841
T-Status	.012	1.669	1.121	2.484

Wie sich aus der multivariaten Analyse ergibt, stellen lediglich der N- und der T-Status Faktoren dar, welche eine prognostische Aussage über den Verlauf von Bronchialkarzinom-Patienten zulassen. So haben Patienten, deren Primärtumor bereits Lymphknotenmetastasen gebildet hat, ein um 175% höheres Risiko, während des untersuchten Zeitraums an ihrer Tumorerkrankung zu versterben als Patienten, deren Tumor keine Metastasen gebildet hat. Gleichzeitig haben Patienten mit einem Tumor der Kategorie T2-T4 ein um 67% höheres Risiko, während des untersuchten Zeitraums zu versterben, als Patienten mit einem T1-Tumor.

Das NAF-ähnliche Expressionsmuster, welches in der univariaten Analyse als prognostischer Faktor ermittelt wurde, stellt sich somit in der multivariaten Analyse als nicht unabhängiger Faktor heraus. Zwar haben Patienten, die eine NAF-ähnliche Expression in ihren Tumoren zeigen eine bessere Prognose als jene, die eine intermediäre bzw. CAF-ähnliche Expression zeigen, wie in der Abb. 4 zu sehen ist, jedoch handelt es sich beim Tumor- und Nodalstatus um stärkere prognostische Marker.

3.2 Therapieansprechen im Gewebekulturmodell

Eine Möglichkeit das Therapieansprechen von Tumorzellen unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen zu untersuchen, stellt das Modell der Frischgewebekultur dar, welches von van der Kuip für das Mammakarzinom und von Sonnenberg für das Bronchialkarzinom beschrieben wurde (van der Kuip et al., 2006; Sonnenberg et al. 2008). Hier lässt sich die Reaktion der Tumorzellen, aber auch die Reaktion des Stromas, auf eine Behandlung mit verschiedenen Medikamenten mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Frischgewebekultur verwendet, um das Therapieansprechen von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten aus Bronchialkarzinomen genauer zu untersuchen. Als Therapie wurden der gegen EGFR gerichtete niedermolekulare Inhibitor Erlotinib bzw. das Chemotherapeutikum Cisplatin verwendet, die auch in der Klinik zur Therapie bronchialer Karzinome eingesetzt werden. Die immunhistochemische Untersuchung und Sequenzierung des Onkogens *EGFR* bzw. des Tumorsuppressorgens *TP53* erlauben hierbei Rückschlüsse auf einen möglichen Einfluss dieser beiden Gene auf das Ansprechen der Tumorzellen.

3.2.1 Validierung des Gewebekulturmodells

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die kultivierten Gewebeschnitte untersuchen zu können, musste zunächst sichergestellt werden, dass die Kulturbedingungen an sich die Viabilität der kultivierten Gewebe nicht negativ beeinflussen. Dazu wurden die Gewebeschnitte nach 96h Kultur bei 37°C und 5% CO₂ in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die so präparierten Gewebe konnten dann mit Tumorgewebe der

entsprechenden Patienten verglichen werden, welche direkt nach der Operation fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Mit Hilfe einer immunhistochemischen Ki67-Färbung und anschließender Hämotoxylin-Gegenfärbung konnte der Anteil proliferierender Zellen bestimmt werden und das kultivierte Gewebe mit dem Originalgewebe bezüglich Zellteilung und Morphologie verglichen werden. In Abb. 5 ist das Ergebnis der Färbungen von direkt fixiertem Routinematerial und kultiviertem Gewebe dargestellt.

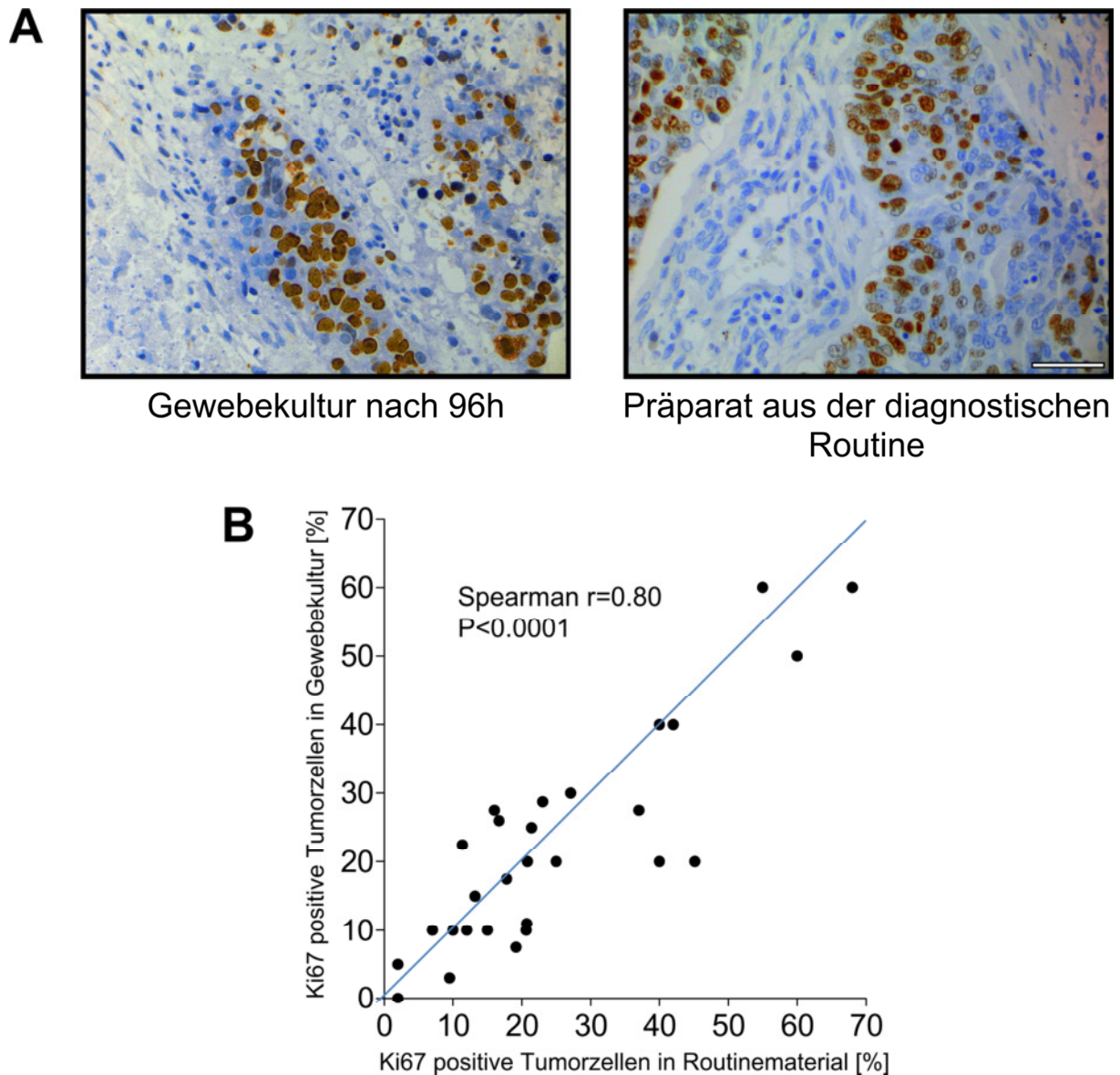


Abb. 5: Vergleich der Proliferation zwischen kultiviertem Tumorgewebe und entsprechendem Originaltumor. A: Im linken Bild ist das Gewebe zu erkennen, welches nach 96h Kultur fixiert wurde, im rechten Bild sieht man Gewebe vom selben Patienten, welches unmittelbar nach der Operation fixiert wurde. Die proliferierenden Zellen sind an den braunen, Ki67-positiven Zellkernen zu erkennen. Balken entspricht 50 μ m. **B:** Signifikante Korrelation zwischen dem Anteil Ki67-positiver Tumorzellen in den Gewebekulturblocken und den Routineblöcken derselben Patienten (n=28; Spearman $r=0.80$; $p<0.0001$). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Wie an dem repräsentativen Beispiel in der Abb. 5 zu sehen ist, kommt es durch die 96-stündige Kultur der Gewebeschnitte zu keiner offensichtlichen Veränderung der Morphologie.

Weiterhin korreliert der Anteil Ki67-positiver Tumorzellen im Gewebeschnitt nach 96h Kultur signifikant mit dem Anteil Ki67-positiver Tumorzellen in dem Tumorgewebe desselben Patienten, welches direkt nach der Operation fixiert wurde (Spearman $r=0.80$, $p<0.0001$). Der Anteil Ki67-positiver Tumorzellen, der in den verschiedenen Patienten ermittelt wurde ist vergleichbar mit den Werten, die für NSCLC-Patienten in der Literatur angegeben werden (Vesselle et al., 2008). Um weiter zu überprüfen, ob die Kultur für das Gewebe einen Stressfaktor darstellt, wurde untersucht, ob es durch die 96-stündige Inkubation der Gewebe zu einer stressbedingten Induktion des p53-Proteins kommt. Wie bereits zuvor im Falle von Ki67 wurde das kultivierte Gewebe daher mit dem Routinematerial der Pathologie des RBK verglichen. Dabei handelt es sich wieder um Tumorgewebe der entsprechenden Patienten, welches direkt nach der Operation fixiert wurde und somit die konstitutive p53-Expression des Tumors widerspiegelt. Das Ergebnis des Vergleichs ist in Abb. 6 dargestellt.

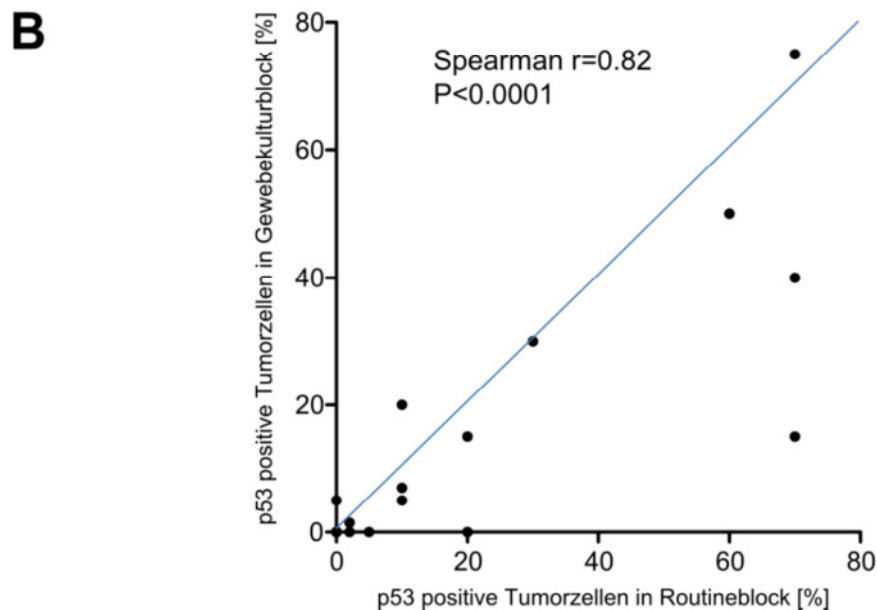
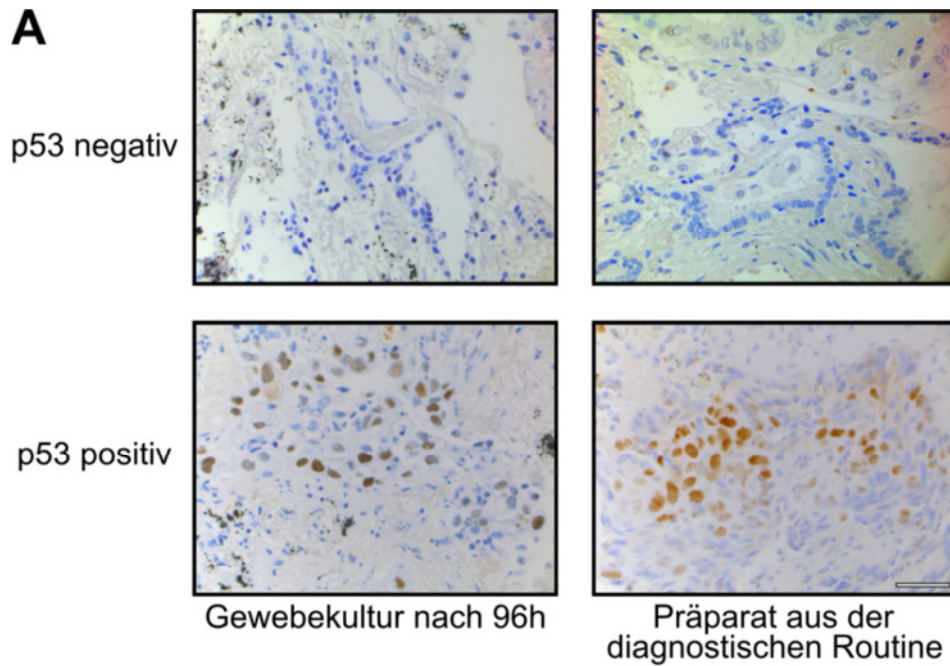


Abb. 6: Vergleich der p53-Expression zwischen kultiviertem Tumorgewebe und entsprechendem Originaltumor. **A:** Im linken Teil ist jeweils das für 96h kultivierte Gewebe zu sehen, rechts das entsprechende Gewebe desselben Patienten, welches direkt nach der Operation fixiert wurde. Die p53-positiven Tumorzellen sind an den braun angefärbten Zellkernen zu erkennen. Im oberen Abschnitt ist beispielhaft ein p53-negativer im unteren Abschnitt ein p53-positiver Tumor zu sehen. Balken entspricht 50 μ m. **B:** Signifikante Korrelation zwischen dem Anteil p53-positiver Tumorzellen in den Gewebekulturblöcken und den Routineblöcken derselben Patienten (Spearman $r=0.82$; $p<0.0001$). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Wie an den beiden exemplarischen Fällen zu erkennen ist, kommt es durch die Kulturbedingungen zu keiner Änderung in der nukleären p53-Expression innerhalb der Tumorzellen. Der Anteil p53-positiver Tumorzellen zwischen kultiviertem Gewebe und Originalgewebe, welches die *in vivo*-nahe Situation widerspiegelt, korreliert signifikant (Spearman $r=0.82$, $p<0.0001$) und die Kultur stellt somit keinen Faktor dar, der bereits alleine zu einer Akkumulation des p53-Proteins führt.

3.2.2 Einfluss des EGFR-Inhibitors Erlotinib

Beim NSCLC liegt häufig eine Störung des EGFR-Signalweges vor, zu der es entweder durch eine Mutation des *EGFR*-Gens (Bell et al., 2008) oder aber durch eine erhöhte Anzahl von Rezeptormolekülen auf der Membran der Tumorzelle kommen kann (Zhang und Chang, 2007). Diese Störung kann dazu führen, dass es im Tumor zu einer verstärkten Proliferation von Tumorzellen kommt, weshalb die Hemmung dieses Signalweges unter Umständen eine Möglichkeit zur Therapie des Tumors darstellt. Möglichkeiten dafür stellen gegen EGFR-gerichtete Antikörper wie z.B. Cetuximab dar (Cunningham et al., 2004) oder aber der niedermolekulare Inhibitor Erlotinib, der die Phosphorylierung des Rezeptors hemmt indem er mit ATP um die Bindungsstelle konkurriert und bereits seit 2005 beim Lungenkarzinom eingesetzt wird (Zhang und Chang, 2007). Die Kultur von Gewebeschnitten aus Bronchialkarzinomen wurde verwendet, um den Einfluss von Erlotinib auf die Proliferation von Tumorzellen zu untersuchen. Aus den zuvor genannten Gründen wurden die Gewebeschnitte zunächst auf eine erhöhte Expression des EGFR-Rezeptors untersucht und im Anschluss daran wurde überprüft, ob das *EGFR*-Gen in den Tumorzellen in wildtypischer Form vorliegt oder aber mutiert, was den Rezeptor in den konstitutiv aktiven Zustand versetzt.

Weiterhin wurde das Gen *KRAS* sequenziert, dessen Genprodukt, eine GTPase, im EGFR-Signalweg nachgeschaltet vom Rezeptor liegt und bei NSCLC-Patienten häufig mutiert vorliegt. Die Mutation führt zu einer verminderten GTPase-Aktivität und dadurch zu einer konstitutiv aktiven Form des Proteins. Daher lässt sich der Signalweg im Falle einer Mutation nicht durch Erlotinib hemmen, welches weiter upstream im Signalweg eingreift (Riely et al., 2009).

3.2.2.1. Immunhistochemische Färbung des EGFR in Tumoren der Lunge

Um festzustellen, ob die Tumoren der einzelnen Patienten eine Überexpression des EGFR auf der Membran der Tumorzellen zeigen, wurden entweder kultivierte, unbehandelte Gewebeschnitte oder aber Originaltumorblöcke von der Pathologie des RBK für die immunhistochemischen Färbungen verwendet. Ab einem Anteil von mindestens 15% positiver Tumorzellen wurde ein Fall als EGFR-positiv gewertet. Abb. 7 zeigt exemplarisch einen immunhistochemisch negativen und einen positiven Tumor aus dem untersuchten Kollektiv.

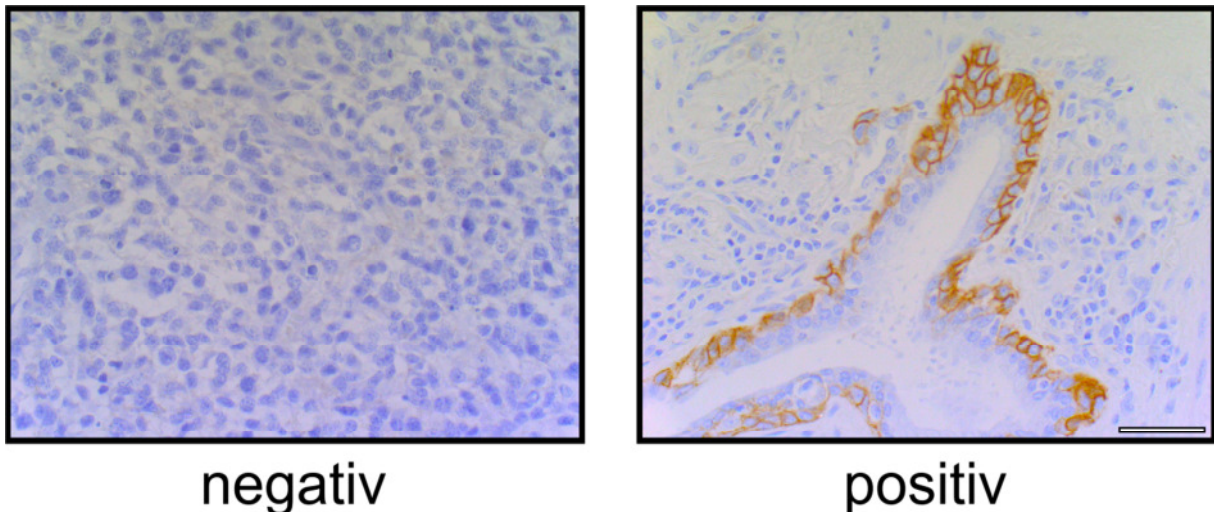


Abb. 7: Immunhistochemische Färbung des EGFR. Im linken Bild ist ein EGFR-negatives Tumorgewebe zu sehen. Im rechten Bild sind immunhistochemisch positive Tumorzellen zu sehen, welche eine membranöse Färbung aufweisen. Balken entspricht 50µm.

Von den 37 gefärbten Fällen zeigten insgesamt 11 eine Überexpression des membranständigen Rezeptors. Die Intensität der Färbung war beim Vergleich der positiven Tumore von Fall zu Fall sehr variabel. Der Anteil positiver Fälle lag etwas unterhalb des in der Literatur angegebenen Anteils von 40-80% bei NSCLC-Patienten (Salomon et al., 1995).

3.2.2.2. Untersuchung des *EGFR*- und *KRAS*-Genstatus in Tumoren der Lunge

Um zu überprüfen, ob ein mögliches Ansprechen der kultivierten Lungengewebe auf die Erlotinib-Behandlung mit einer Mutation im *EGFR*- bzw. *KRAS*-Gen zusammenhängt, wurden die beiden Gene sequenziert. Dazu wurde die genomische DNA aus den Tumorzellen isoliert, wobei als Ausgangsmaterial die Originalblöcke der entsprechenden Patienten aus der Pathologie des RBK dienten. Untersucht wurden in beiden Fällen die Exons, welche routinemäßig im Molekular diagnostischen Zentrum des RBK sequenziert werden. Hierbei handelt es sich im Falle des *EGFR*-Gens um die Exons 18, 19 und 21 und im Falle des *KRAS*-Gens um das Exon 1, welches für die Codons 12 und 13 kodiert und in 97% der Fälle einer *KRAS*-Mutation eine Basensubstitution aufweist (Riely et al., 2008).

Die Sequenzierung des *EGFR*-Gens gelang in 28 Fällen, wobei sich herausstellte, dass 3 Tumore eine Mutation aufweisen und die restlichen 25 Fälle homozygot wildtypisch sind. Bei den Mutationen handelt es sich in allen 3 Fällen um eine Deletion im Exon 19, welches in beinahe 50% aller *EGFR*-mutierten NSCLCs eine Mutation aufweist (Sharma et al., 2007). Bei den Tumoren mit *EGFR*-Mutation handelt es sich um 2 Adenokarzinome und ein Plattenepithelkarzinom. Für das *KRAS*-Gen wurde bei 24 Fällen die Sequenzierung durchgeführt, wobei sich herausstellte, dass 4 Fälle eine Mutation im Gen aufweisen und die restlichen 20 homozygot für das wildtypische Allel sind. Bei den mutierten Fällen handelt es sich um 3 Adenokarzinome und eine Lungenmetastase eines Colonkarzinoms.

Bei den mutierten Fällen handelt es sich bei *EGFR* und *KRAS* um unterschiedliche Patienten. Dies steht in Einklang mit der Aussage von Gaughan, wonach sich Mutationen in den beiden Genen gegenseitig ausschließen (Gaughan und Costa, 2011).

3.2.2.3. Untersuchung der Proliferation in Folge der Erlotinib-Behandlung

Um einen möglichen Effekt der Erlotinib-Behandlung (2µM) festzustellen, wurden die Erlotinib-behandelten Gewebe und die unbehandelten Kontrollgewebe nach 72h Behandlung

in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Durch eine Ki67-Färbung wurde der Anteil proliferierender Zellen in behandelten und unbehandelten Geweben sichtbar gemacht und somit konnte untersucht werden, ob es infolge der Behandlung zu einem veränderten Proliferationsverhalten kommt (Abb. 8).

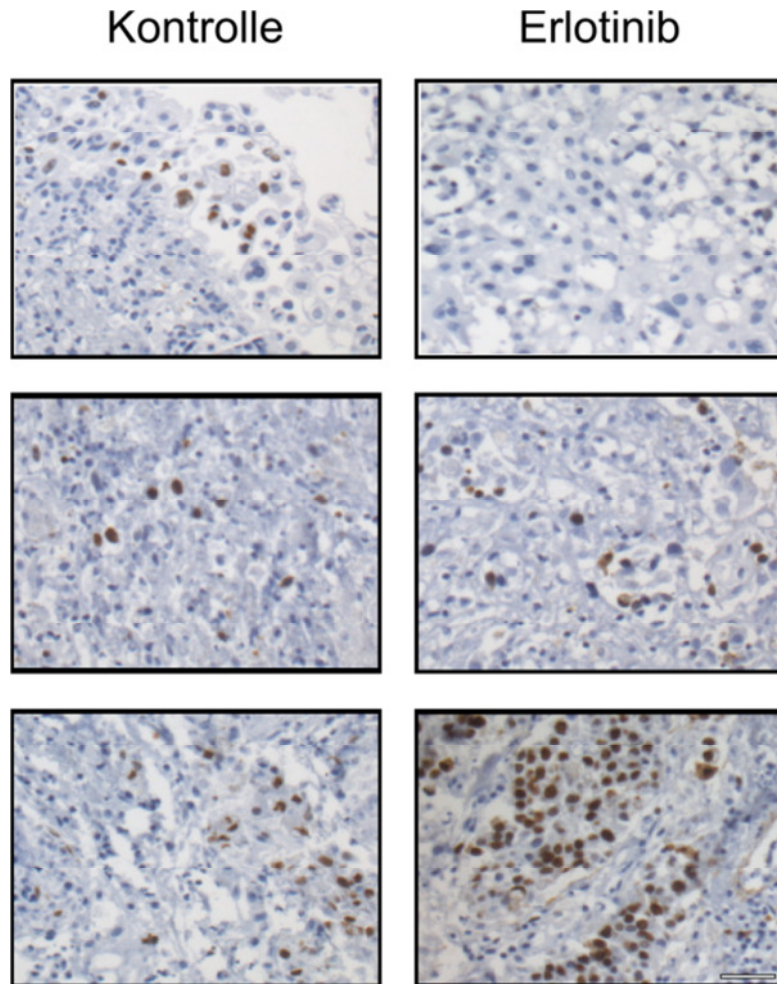


Abb. 8: Veränderung des Anteils Ki67-positiver Tumorzellen in Folge der Erlotinib-Behandlung. Die Gewebeschnitte wurden für 72h mit 2 μ M Erlotinib behandelt. Der Anteil Ki67-positiver Tumorzellen im behandelten Gewebe wurde mit dem Anteil positiver Tumorzellen im unbehandelten Kontrollgewebe verglichen. Oben: Beispiel für die Reduktion des Anteils Ki67-positiver Tumorzellen in Folge der Behandlung. Mitte: Keine Veränderung im Anteil Ki67-positiver Tumorzellen in Folge der Erlotinib-Behandlung. Unten: Beispiel für eine Zunahme des Anteils Ki67-positiver Tumorzellen in Folge der Behandlung. Balken entspricht 50 μ m.

Erlotinib hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Proliferation von Tumorzellen im intakten Gewebe. Während sich in manchen Tumoren der Anteil proliferierender Zellen nicht verändert, kommt es in manchen Fällen zu einer Zu- bzw. Abnahme des Anteils proliferierender Tumorzellen.

Durch die vorangegangene immunhistochemische Untersuchung von EGFR und die Sequenzierung des *EGFR*- und des *KRAS*-Gens konnte ein Zusammenhang zwischen einem Ansprechen auf Erlotinib und dem *EGFR*- und *KRAS*-Status untersucht werden. Für insgesamt 20 Fälle waren Ki67-Daten, Daten zur EGFR-Immunhistochemie und bezüglich des Genstatus von *EGFR* und *KRAS* vorhanden. Das Ergebnis der Analyse ist in der folgenden Abb. 9 zu sehen.

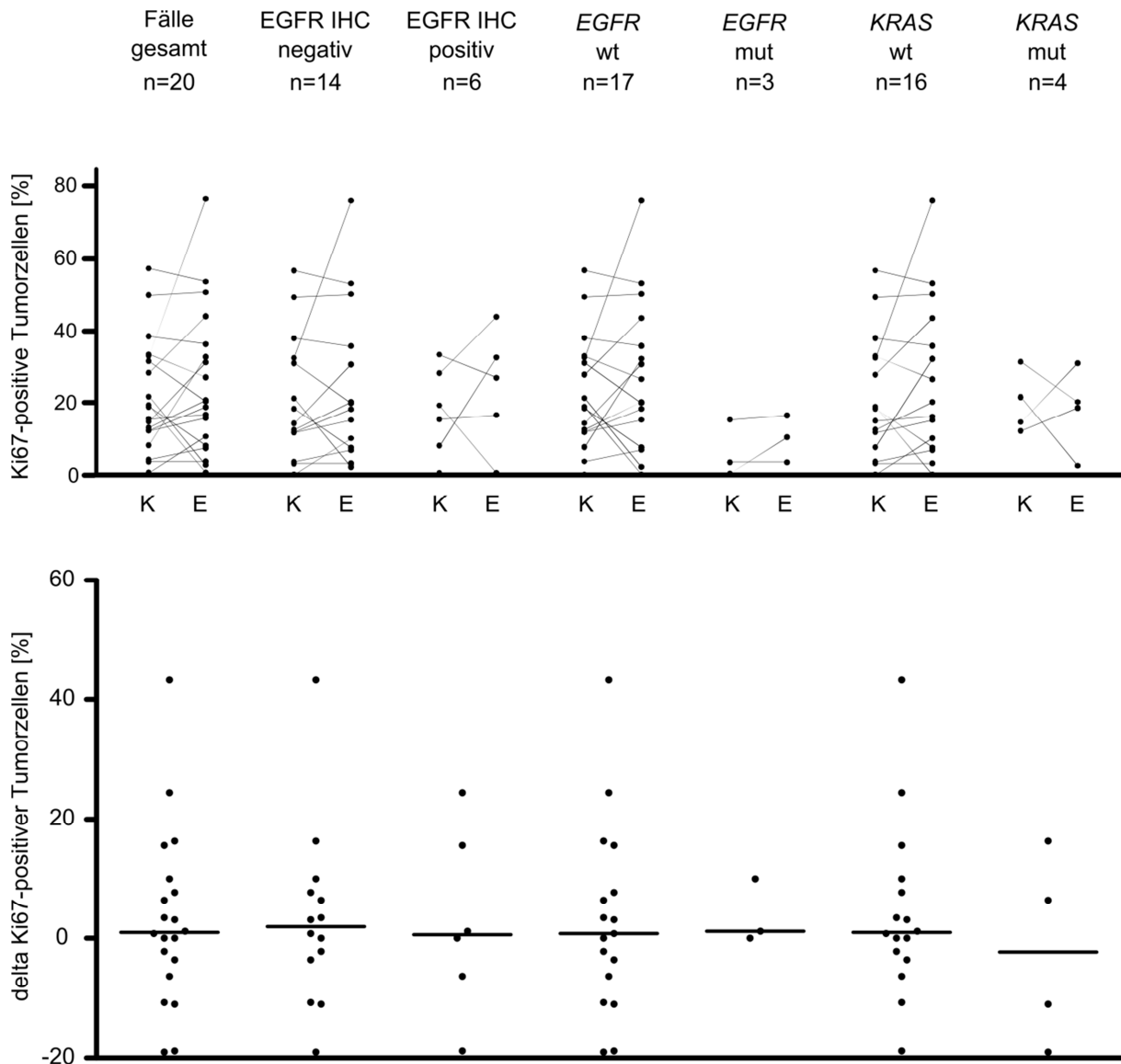


Abb. 9: Änderung im Proliferationsverhalten von Tumorzellen in Folge der 72-stündigen Erlotinib-Behandlung. Oben: Anteil von proliferierenden Tumorzellen im Kontrollgewebe (K) und Erlotinib-behandeltem Gewebe (E) desselben Patienten. Unten: Differenz im Anteil Ki67-positiver Tumorzellen beim Vergleich unbehandelter und Erlotinib-behandelter Gewebeschnitte desselben Patienten. Negative Werte auf der y-Achse zeigen dabei eine Abnahme der Proliferation, positive eine Zunahme der Proliferation an. Das Gesamtkollektiv wurde nach den oben angegebenen Parametern stratifiziert. Waagrechte Linien geben den Median der Differenz innerhalb der Gruppe an.

Wie an den Medianen zu erkennen ist, unterscheiden sich die Untergruppen nicht in ihrer Reaktion auf die Behandlung mit Erlotinib. Weder die Anzahl von EGF-Rezeptoren auf der Zellmembran, noch eine Mutation im *EGFR*- bzw. *KRAS*-Gen scheint Einfluss auf die Reaktion von Tumorzellen im Gewebekulturmodell zu besitzen.

3.2.3 Reaktion von Gewebeschnitten bronchialer Karzinome auf Cisplatin

Um die p53-Antwort von Tumorzellen auf die Behandlung mit Cisplatin unter möglichst *in vivo*-ähnlichen Bedingungen zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte von insgesamt 34 primären Bronchialkarzinomen und einer Lungenmetastase eines primären Bronchialkarzinoms angefertigt. Eingebettet in ihrer natürlichen Umgebung, bestehend aus extrazellulärer Matrix und Stromazellen, konnten so Tumorzellen untersucht werden, deren Verhalten durch parakrine Faktoren der Mikroumgebung aber auch direkten Kontakt zu Komponenten des umliegenden Gewebes moduliert wurde. Weiterhin ließ sich das Verhalten von CAFs untersuchen, welche mengenmäßig einen großen Teil des zellulären Tumorstromas darstellen und bekanntermaßen das Verhalten von Tumorzellen beeinflussen (Addadi et al., 2010).

Neben der immunhistochemischen Untersuchung der p53-Antwort in Folge der Cisplatin-Behandlung wurde die Induktion von p21, die Proliferation und die Induktion von Zelltod in den genannten Zellen immunhistochemisch untersucht. p21 wurde ausgewählt, da es sich beim kodierenden Gen *CDKN1A* um ein p53-Zielgen handelt (Menendez et al., 2009) und sich so die transkriptionelle Aktivität des p53-Proteins untersuchen lässt.

Drei Fälle konnten, aufgrund von nekrotischen Bereichen im unbehandelten Kontrollgewebe, die mehr als 50% der Gesamtfläche ausmachten, nicht ausgewertet werden.

3.2.3.1 Einteilung der Karzinome anhand ihres p53-Akkumulationsverhaltens

Um die p53-Induktion der einzelnen Tumore zu untersuchen, wurden die Gewebeschnitte für 72h mit Cisplatin behandelt (13 μ M) und anschließend fixiert. Dieses Gewebe wurde im Anschluss daran zusammen mit unbehandeltem Kontrollgewebe vom selben Tumor, welches ebenfalls für 72h kultiviert wurde, auf die Expression von p53 immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die Tumore hinsichtlich ihrer nukleären p53-Akkumulationen unterscheiden und dadurch in 3 Gruppen einteilen lassen (Abb. 10).

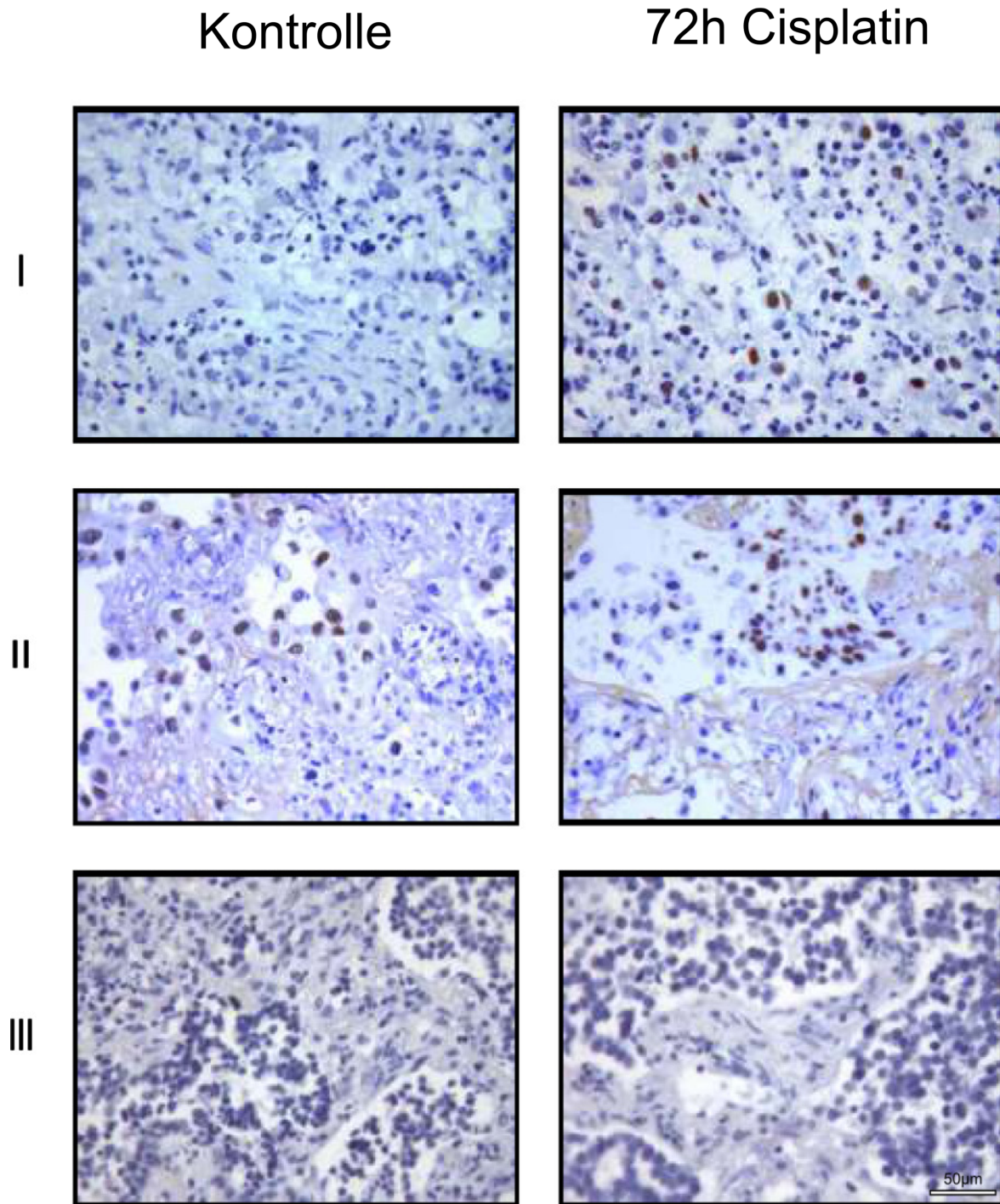


Abb. 10: p53-Akkumulation in Folge der Cisplatinbehandlung in kultivierten Gewebeschnitten. Repräsentative Beispiele für Tumore der 3 Gruppen. Im linken Teil ist das Kontrollgewebe zu sehen, rechts das behandelte Gewebe, welches für 72h mit Cisplatin inkubiert wurde. I: Induktion der p53-Expression nach Cisplatin-Behandlung. II: Konstitutiv hohe p53-Expression ohne weitere Akkumulation nach Behandlung. III: Keine Expression von p53 unabhängig von einer Cisplatin-Behandlung. Balken entspricht 50µm. Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Vierzehn der 32 Tumore wurden Gruppe I zugeteilt. Sie zeigen eine Akkumulation des p53-Proteins, nachdem sie konstitutiv keine bzw. nur wenige p53-positive Tumorzellen (<20%) besitzen. Gruppe II umfasst 7 Tumore, welche konstitutiv bereits einen hohen Anteil p53-positiver Tumorzellen zeigen (>20%) und auf Cisplatin nicht mit einer weiteren Akkumulation des Proteins reagieren. Elf der 32 Tumore wurden Gruppe III zugeteilt und zeigen weder im unbehandelten noch im behandelten Zustand eine Expression des p53-Proteins.

Um zu überprüfen, ob es während der 72-stündigen Behandlung mit Cisplatin (13 μ M) zu Veränderungen in der p53-Expression kommt, wurde Gewebe am Beginn der Behandlung, an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 fixiert und anschließend immunhistochemisch auf eine p53-Expression untersucht. In Abb. 11 ist das Ergebnis der Zeitreihe für je einen Tumor der 3 Gruppen gezeigt.

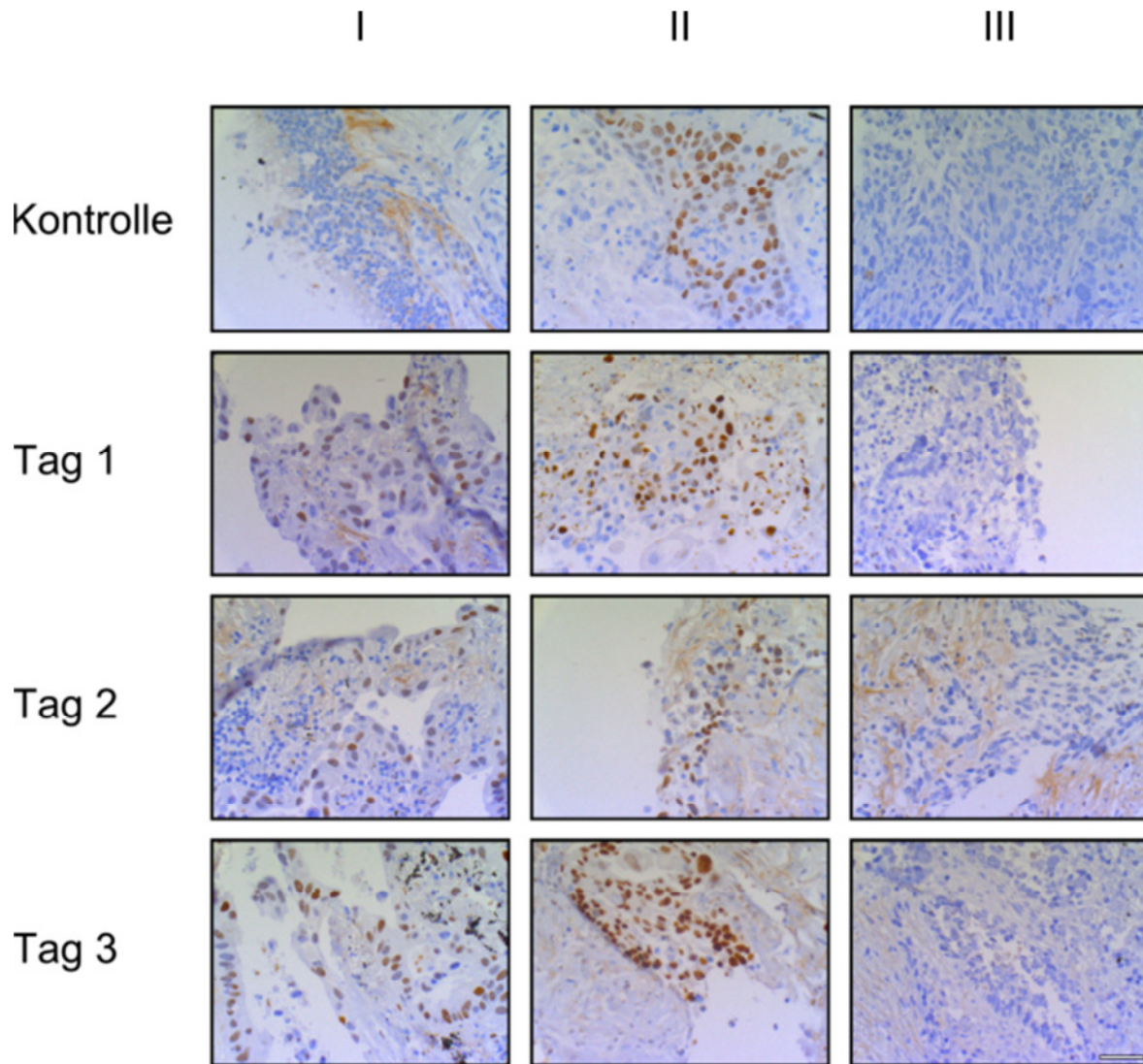


Abb. 11: p53-Kinetik in Tumoren der Gruppe I bis III. Repräsentative Beispiele für Tumore der 3 Gruppen. Gezeigt ist der p53-Status zu Behandlungsbeginn (Kontrolle) und an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 der Cisplatin-Behandlung (13 μ M). p53-positive Zellen sind an einer braunen Kernfärbung zu erkennen. Balken entspricht 50 μ m.

Wie zu sehen ist, kommt es innerhalb der Tage 1 bis 3 zu keinen Änderungen der p53-Expression durch die Behandlung mit Cisplatin. Der Tumor der Gruppe 1 zeigt nach 24h positive Tumorzellkerne, wobei deren Anteil dann bis zum Behandlungsende nach 72h stabil bleibt. Während des gesamten Behandlungsverlaufs kommt es durch Cisplatin in den beiden Tumoren der Gruppe II und III zu keiner Akkumulation des p53-Proteins.

3.2.3.2. Proliferation der Tumorzellen in Abhängigkeit von p53

Um einen Einfluss der Behandlung auf die Tumorzellen zu untersuchen, wurden Ki67-Färbungen durchgeführt. Dadurch ließ sich feststellen, ob die Tumore mit einem Zellzyklusarrest auf die Cisplatin-Behandlung reagieren. Zunächst wurde dazu der Anteil Ki67-positiver Tumorzellen im unbehandelten Kontrollgewebe bestimmt. Da von meiner Kollegin Silke Haubeiß im Rahmen ihrer Promotion der *TP53*-Mutationsstatus der untersuchten Tumorzellen bestimmt wurde, konnte überprüft werden, in wie weit sich *TP53*-mutierte Tumorzellen von wildtypischen hinsichtlich ihrer Proliferation unterscheiden (Abb. 12 A). Im Anschluss daran wurde untersucht, ob sich die verschiedenen Gruppen hinsichtlich ihres Anteils proliferierender Tumorzellen unterscheiden (Abb. 12 B).

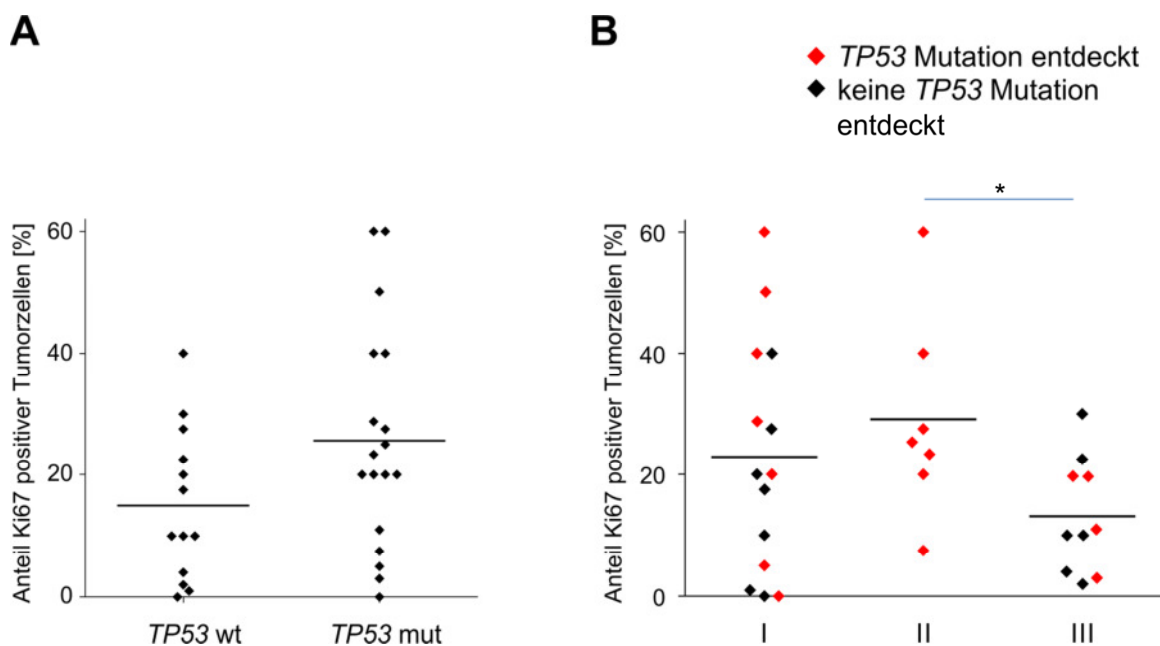


Abb. 12: Anteil Ki67-positiver Tumorzellen in den kultivierten Gewebeschnitten. Waagrechte Linien geben den durchschnittlichen Anteil positiver Zellen innerhalb der Gruppen an. **A:** Anteil der Ki67-positiven Tumorzellen in Abhängigkeit von wildtypischem *TP53* (links) bzw. mutantern *TP53* (rechts). **B:** Anteil Ki67-positiver Tumorzellen in den Gruppen I-III. Gruppe III zeigt die geringste durchschnittliche Ki67-Expression, während die Gruppen I und II nur einen geringen Unterschied im Anteil positiver Zellen zeigen. Der Anteil proliferierender Zellen ist in Gruppe II signifikant höher als in Gruppe III (*:p=0,035; Mann-Whitney-Test). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Tumore mit mutantern *TP53*-Status zeigen einen Trend (Mann-Whitney-Test: $p=0,1039$) zu einem höheren durchschnittlichen Anteil proliferierender Zellen. Dies zeigt sich auch am höchsten durchschnittlichen Anteil Ki67-positiver Zellen in Tumoren der Gruppe II, bei denen es sich ausschließlich um *TP53*-mutante Tumore handelt. In allen 3 gebildeten Gruppen sind Tumore mit mutantern *TP53* zu finden, wobei lediglich Gruppe II ausschließlich aus Fällen besteht, die alle eine *TP53*-Mutation in ihren Tumorzellen aufweisen.

Bei den Tumoren der Gruppe III, die weder im unbehandelten noch im behandelten Zustand eine p53-Expression zeigen, wird im Mittel der geringste Anteil proliferierender Tumorzellen festgestellt. Zwischen den beiden Gruppen I und II kommt es zu keinem Unterschied im mittleren Anteil proliferierender Tumorzellen.

3.2.3.3. Einfluss der Cisplatin-Behandlung auf die Tumorzellproliferation

Durch den Vergleich von behandeltem und unbehandeltem Gewebe hinsichtlich des Anteils Ki67-positiver Tumorzellen, lässt sich untersuchen, ob Cisplatin zu einem verringerten Anteil proliferierender Zellen führt. In wie weit der *TP53*-Genstatus der Tumorzellen dabei eine Rolle spielt, ist in Abb. 13 dargestellt.

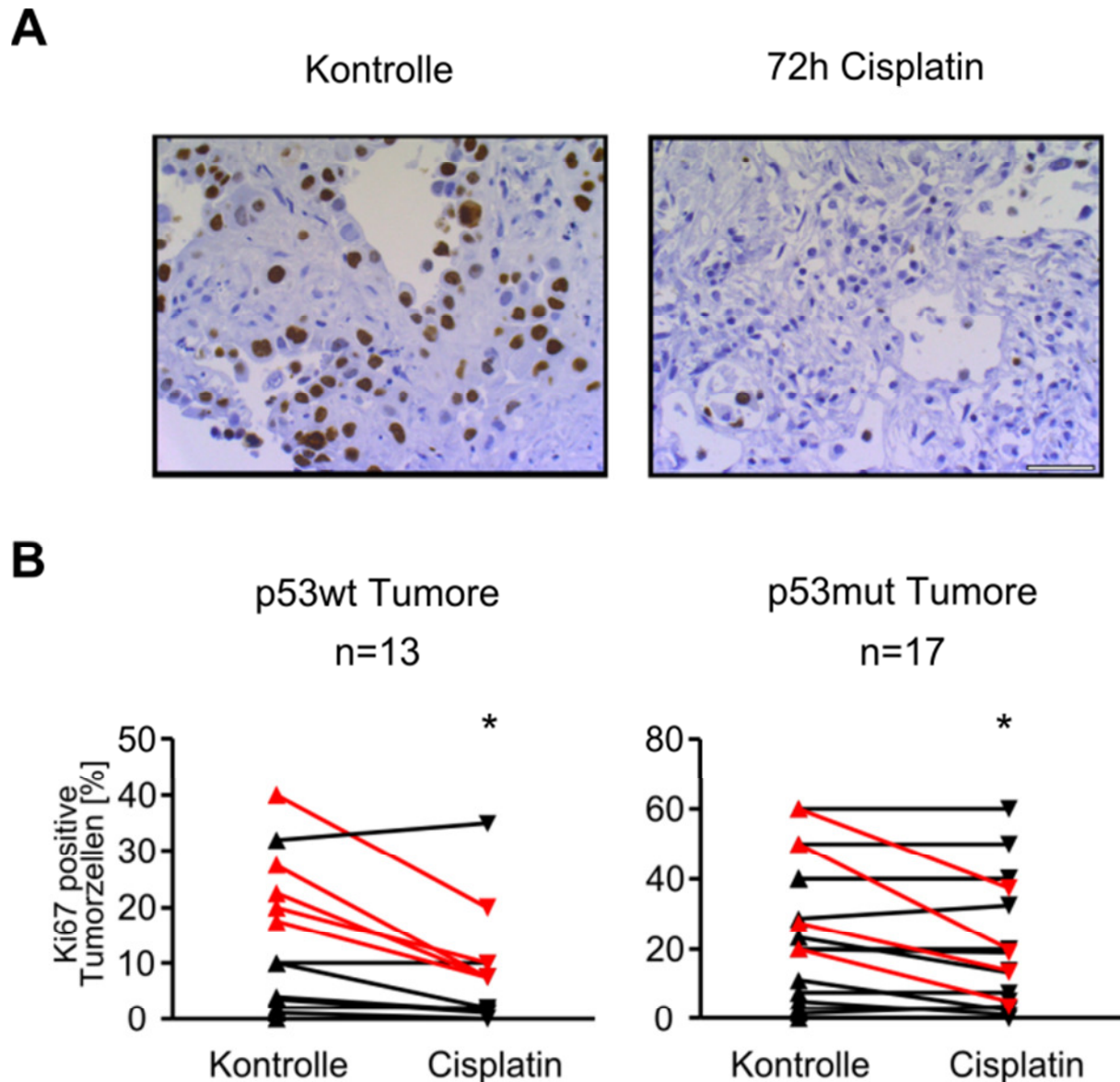


Abb. 13: Veränderung des Anteils Ki67-positiver Tumorzellen in Folge der Cisplatin-Behandlung in Abhängigkeit vom p53-Genstatus. Die Gewebeschnitte wurden für 72h mit Cisplatin behandelt. Der Anteil Ki67-positiver Tumorzellen im behandelten Gewebe wurde mit dem Anteil positiver Tumorzellen im unbehandelten Kontrollgewebe verglichen. Unterschiede von mehr als 10% im Anteil proliferierender Zellen sind durch rote Linien dargestellt. **A:** Beispiel für die Reduktion des Anteils Ki67-positiver Tumorzellen in einem der untersuchten Fälle. Balken entspricht 50µm. **B:** Veränderung des Anteils Ki67-positiver Tumorzellen in den einzelnen untersuchten Fällen. Links: Reaktion der Tumore mit wildtypischem *TP53* auf die Behandlung mit Cisplatin. Rechts: Reaktion der Tumore mit mutantem *TP53* auf die Behandlung. (*: $p < 0.05$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Sowohl bei den *TP53*-wildtypischen als auch bei den *TP53*-mutanten Geweben kommt es durch die 72-stündige Cisplatin-Behandlung zu einer Reduktion im Anteil proliferierender Tumorzellen. Von den 13 wildtypischen Geweben reagieren 5 mit einer deutlichen Reduktion der Tumorzellproliferation, von den 17 mutanten Geweben reagieren 4 deutlich. Somit ist der Anteil von Tumoren, die eine deutliche Reaktion auf die Behandlung mit Cisplatin zeigen in der Gruppe der wildtypischen Tumore höher. Dass dennoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar ist, liegt an der geringen Fallzahl.

Nachdem untersucht wurde, ob der *TP53*-Status einen Einfluss auf die Cisplatin-Reaktion der Gewebe hat, wurde überprüft, ob Gewebe der verschiedenen Gruppen I-III Unterschiede in ihrer Reaktion in Folge der Behandlung zeigen (Abb. 14).

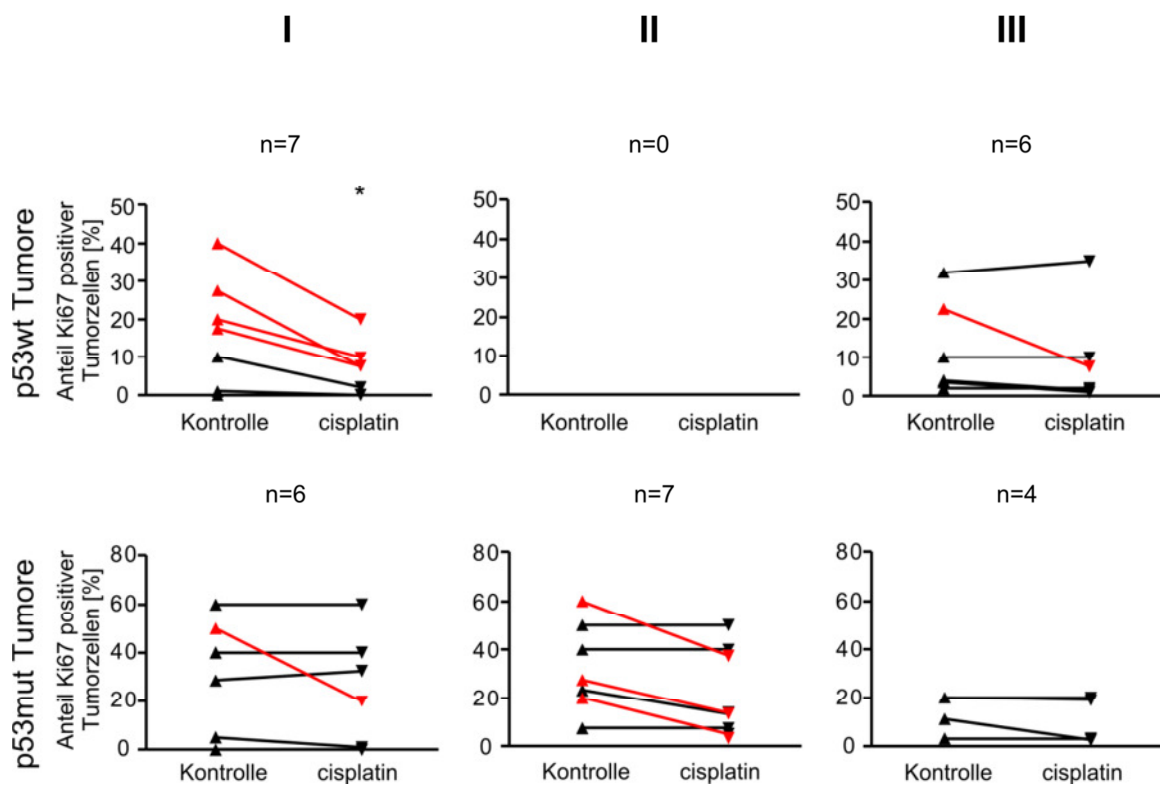


Abb. 14: Veränderung des Anteils Ki67-positiver Tumorzellen in Folge der Cisplatin-Behandlung in den Gruppen I bis III. Oben: Veränderung der Proliferation bei p53-wildtypischen Tumoren der Gruppe I (links), Gruppe II (Mitte) und Gruppe III (rechts). Unten: Veränderung der Proliferation bei mutanten Tumoren der Gruppe I (links), Gruppe II (Mitte) und Gruppe III (rechts). (*: $p < 0.05$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Lediglich bei wildtypischen Tumoren der Gruppe I kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation durch die 72-stündige Behandlung der Gewebeschnitte mit Cisplatin. Hier reagieren 4 der 7 Fälle mit einer deutlichen Abnahme der Proliferation. Bei den Tumoren mit mutiertem p53 im Tumorzellanteil reagiert hingegen nur 1 Fall der Gruppe I mit einer deutlichen Reduktion des Anteils Ki67-positiver Tumorzellen. Die meisten mutierten Tumore, die mit einer deutlichen Reduktion reagieren, gehören der Gruppe II an.

3.2.3.4. Einfluss der Cisplatin-Behandlung auf den Zelltod in Tumorzellen

Um zu überprüfen, ob es durch eine 72-stündige Cisplatin-Behandlung in einem größeren Kollektiv von Gewebeschnitten aus Lungentumoren zu einer Induktion von Zelltod kommt, wurden in Zusammenarbeit mit Silke Haubeiß TUNEL-Färbungen durchgeführt und anschließend die Induktion von Zelltod als Folge der Behandlung untersucht. Mit Hilfe der TUNEL-Färbung lassen sich Strangbrüche der DNA, zu denen es im Zuge der Apoptose kommt, sichtbar machen. Diejenigen primären Bronchialkarzinome, an denen auch schon die Ki67-Färbung durchgeführt wurde, wurden für eine Untersuchung des Zelltods ausgewählt. Insgesamt standen TUNEL-Daten von 26 Fällen zur Verfügung. Die Induktion von Zelltod in Folge einer Cisplatin-Behandlung ist beispielhaft für einen Fall in Abb. 15 A dargestellt. In Abb. 15 B ist die Induktion von Zelltod als Folge der Behandlung in Abhängigkeit vom *TP53*-Genstatus der Tumorzellen dargestellt.

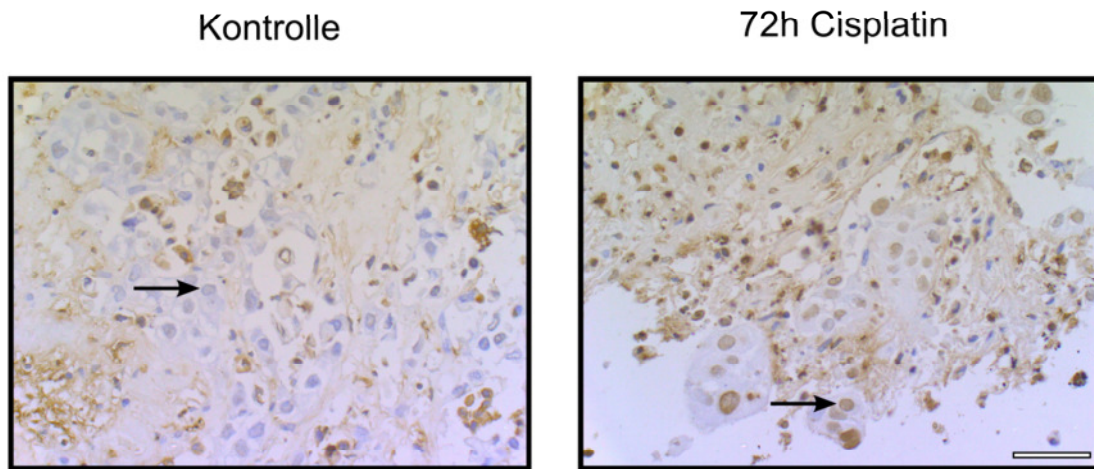
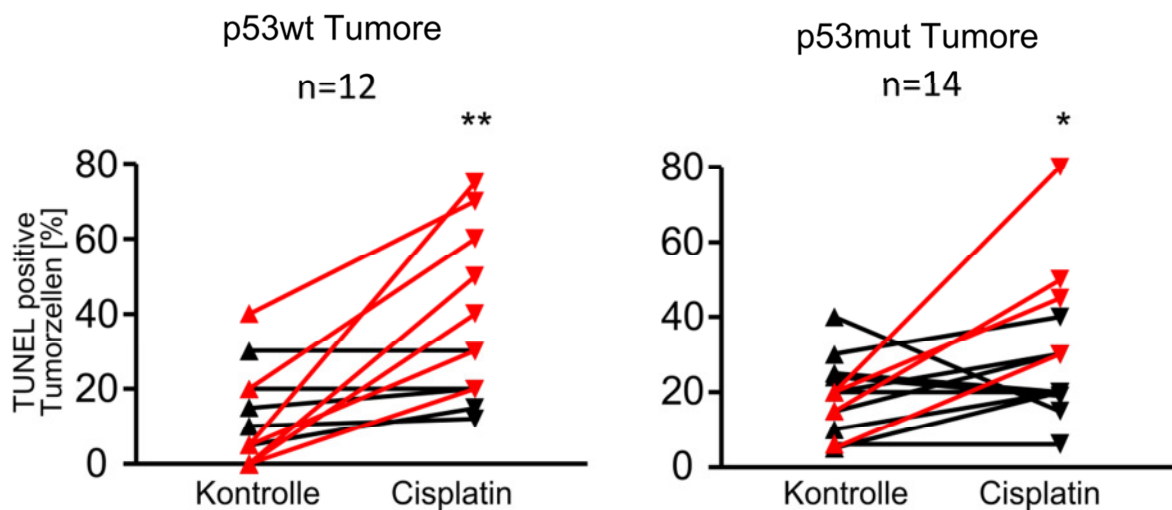
A**B**

Abb. 15: Ciplatin-bedingte Induktion von Zelltod in Tumoren mit wildtypischem und mutantem p53. Die Gewebeschnitte wurden für 72h mit Cisplatin behandelt und anschließend mit unbehandelten Gewebeschnitten der entsprechenden Patienten hinsichtlich der Induktion von Zelltod verglichen. **A:** Beispiel für die Induktion von Zelltod in einem der untersuchten Fälle. Links: Kontrollgewebe mit TUNEL-negativen Tumorzellen (schwarzer Pfeil). Rechts: Cisplatin-behandeltes Gewebe mit TUNEL-positiven Tumorzellen (schwarzer Pfeil). Balken entspricht 50µm. **B:** Induktion des Zelltods durch Cisplatin in den untersuchten Fällen. Fälle, in denen durch die Cisplatin-Behandlung die Fraktion toter Zellen um mehr als 20% ansteigt sind durch eine rote Linie gekennzeichnet. Links: Induktion des Zelltods in Tumorzellen von Tumorgeweben mit wildtypischem p53. Rechts: Induktion des Zelltods in Tumorzellen von Tumorgeweben mit mutantem p53. (*:p<0.05; **:p<0.005). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Sowohl bei den *TP53*-wildtypischen als auch bei den *TP53*-mutanten Tumorgeweben führt die Behandlung mit Cisplatin zu einer signifikanten Induktion des Zelltods in den Tumorzellen (*: $p < 0.05$ bzw. **: $p < 0.005$). Von den untersuchten *TP53*-wildtypischen Tumorgeweben reagieren 7 von 12 mit einer deutlichen Induktion von Zelltod, von den untersuchten mutanten Geweben reagieren lediglich 4 von 14 mit einer deutlichen Induktion von mehr als 20% im Tumorzellanteil. Der Anteil von Geweben, die auf die Behandlung mit einer deutlichen Induktion von Zelltod in ihrem Tumorzellanteil reagieren, ist somit bei den wildtypischen Tumoren höher als bei den mutanten Tumoren. Dass es sich hierbei um keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen handelt ist auf die geringe Fallzahl zurückzuführen.

Bei der Untersuchung der Zelltodinduktion zeigte sich somit, dass die wildtypischen Tumore stärker auf die Behandlung mit Cisplatin reagieren als die mutanten Tumore. Dasselbe Verhalten konnte auch schon bei der Untersuchung der Proliferation beobachtet werden. Hier kam es in 5 der 13 wildtypischen Tumore zu einer stärkeren Reduktion im Anteil proliferierenden Zellen und in 4 der 17 mutanten.

In wie weit Tumore der Gruppen I bis III Unterschiede bei der Induktion von Zelltod infolge der Cisplatin-Behandlung zeigen, ist in Abhängigkeit vom *TP53*-Genstatus in Abb. 16 dargestellt.

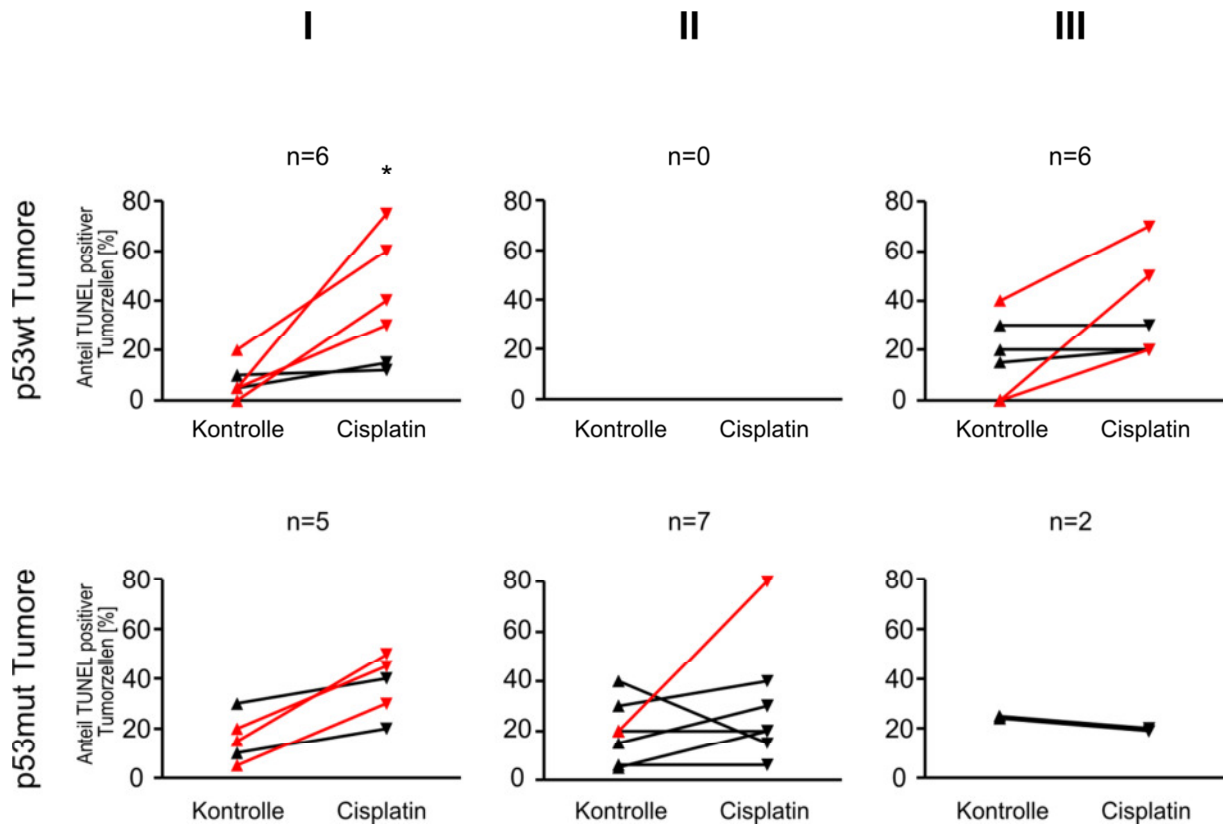


Abb. 16: Veränderung des Anteils TUNEL-positiver Tumorzellen in Folge der Cisplatin-Behandlung in Gruppen I bis III. Oben: Induktion von Zelltod bei p53-wildtypischen Tumoren der Gruppe I (links), Gruppe II (Mitte) und Gruppe III (rechts). Unten: Induktion von Zelltod bei p53-mutanten Tumoren der Gruppe I (links), Gruppe II (Mitte) und Gruppe III (rechts). (*: $p < 0.05$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Die untersuchten wildtypischen Tumore, welche mit einer deutlichen Induktion von Zelltod auf die Behandlung reagieren verteilen sich auf die Gruppen I und III. Jedoch kommt es nur in den wildtypischen Geweben der Gruppe I zu einer signifikanten Induktion von Zelltod in den Tumorzellen der Gewebeschnitte. Bei den Gewebeschnitten mit mutanten Tumorzellen kommt es bei Gewebeschnitten der Gruppe I und II teilweise zu einer deutlichen Induktion von Zelltod, jedoch wird hier keine Signifikanz erreicht.

Insgesamt reagieren Tumore der Gruppe I unabhängig von ihrem *TP53*-Genstatus tendenziell eher mit einer deutlichen Induktion von Zelltod auf die Behandlung als Tumore der beiden anderen Gruppen.

3.2.3.5. Reaktion der Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin

Da eine gegenseitige Beeinflussung von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten bereits in der Literatur beschrieben wurde (Bar et al., 2009; Addadi et al., 2010), sollte untersucht werden, wie Tumor-assoziierte Fibroblasten im Gewebekulturmodell auf eine Behandlung mit Cisplatin reagieren. Dazu wurden die Induktion des p53-Proteins, die Induktion von p21 und die Induktion von Zelltod in den CAFs immunhistochemisch untersucht.

3.2.3.5.1 p53-Akkumulation und Induktion von p21 in CAFs

Zunächst wurden dieselben Gewebeschnitte, die auf eine Akkumulation des p53-Proteins in den Tumorzellen untersucht wurden, auf eine Akkumulation des p53-Proteins in den CAFs untersucht. Es zeigte sich, dass in unbehandelten Geweben keine oder nur sehr wenige (<2%) p53-positive CAFs gefunden werden konnten. Interessanterweise zeigten nur CAFs von Tumoren der Gruppe I eine Akkumulation von p53 nach der Behandlung mit Cisplatin (Abb. 17).

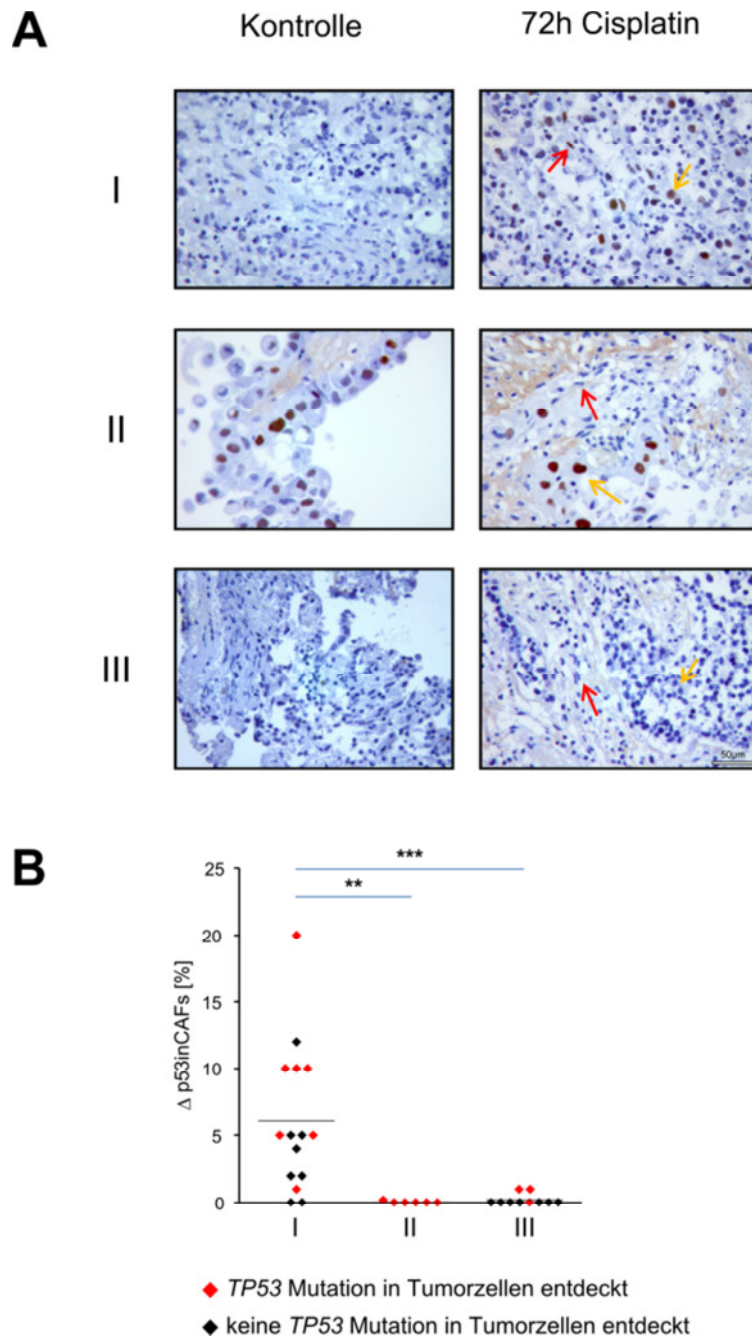


Abb. 17: Akkumulation von p53 in Tumorzellen und CAFs in der Gewebekultur. Nach 72-stündiger Cisplatin-Behandlung wurde das kultivierte Gewebe fixiert und immunhistochemisch auf die Expression des p53-Proteins untersucht. **A:** p53-Akkumulation in Tumorzellen (gelber Pfeil) und CAFs (roter Pfeil) in je einem repräsentativen Tumor der Gruppen I bis III. Links: Unbehandelte Kontrollgewebeschnitte; Rechts: Cisplatin-behandelte Gewebeschnitte. Balken entspricht 50µm. **B:** p53-Akkumulation in CAFs von Geweben der Gruppe I bis III. Fälle mit mutiertem *TP53*-Genstatus in den Tumorzellen der Gewebe sind rot markiert, Fälle mit wildtypischem *TP53* schwarz. Waagrechte Linien geben die durchschnittliche p53-Akkumulation in den CAFs der 3 Gruppen an (**:p=0.0018; ***:p=0.0006, 2-seitiger Mann-Whitney-Test). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Wie man in Abb. 17 B sieht, korreliert die Cisplatin-bedingte Akkumulation von p53 in CAFs sehr stark mit der Akkumulation in den benachbarten Tumorzellen (Spearman $r=0.88$; $p<0.0001$). So zeigen nur die Tumore der Gruppe I, bei denen es nach Cisplatin-Behandlung zu einer p53-Akkumulation in den Tumorzellen kommt, eine Akkumulation von p53 in den benachbarten CAFs. Die Tumore der Gruppen II und III hingegen, bei denen keine Akkumulation durch Cisplatin zu beobachten ist, akkumulieren kein p53 in ihren CAFs. Der *TP53*-Mutationsstatus der Tumorzellen scheint hierbei keinen Einfluss zu haben, da sowohl wildtypische Tumore als auch mutante das p53-Protein in ihren CAFs akkumulieren bzw. nicht akkumulieren.

Um zu überprüfen, in wie weit die Akkumulation des p53-Proteins in CAFs einen Einfluss auf die Induktion von p53-Zielgenen hat, wurden p21-Färbungen an den Gewebeschnitten durchgeführt. Dazu wurden wieder Schnitte der für 72h kultivierten Gewebe verwendet, die bereits auf die p53-Akkumulation hin untersucht wurden (Abb. 18).

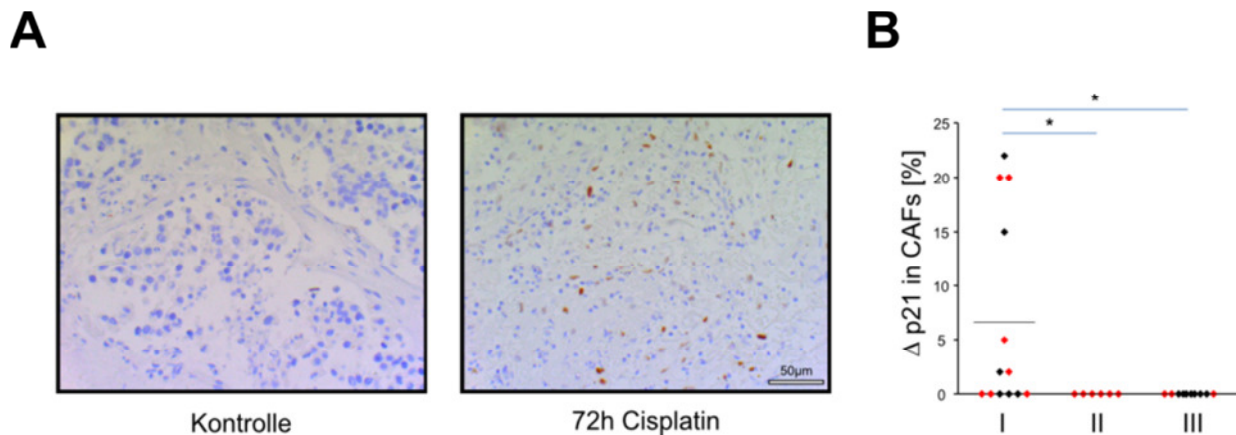


Abb. 18: Induktion der p21-Expression in CAFs der Gruppen I bis III. Nach 72-stündiger Cisplatin-Behandlung wurde das kultivierte Gewebe fixiert und immunhistochemisch auf die Expression des p21-Proteins untersucht. **A:** p21-Induktion in CAFs in einem Tumor der Gruppe I. Links: Unbehandelter Kontrollgewebeschnitt; Rechts: Cisplatin-behandelter Gewebeschnitt. p21-positive CAFs sind an einer braunen Kernfärbung zu erkennen. Balken entspricht 50µm. **B:** p21-Induktion in CAFs von Geweben der Gruppe I bis III. Fälle mit mutiertem *TP53*-Genstatus in den Tumorzellen der Gewebe sind rot markiert, Fälle mit wildtypischem *TP53* schwarz. Waagrechte Linien geben die durchschnittliche p21-Induktion in den CAFs der 3 Gruppen an (*: $p<0.04$, Mann-Whitney-Test, 2-seitiger Test). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Durch die Behandlung mit Cisplatin kommt es in CAFs von 7 der 13 Tumore der Gruppe I zu einer Induktion der p21-Expression. Hingegen zeigen Tumore der Gruppen II und III keine Induktion des p21-Proteins in ihren CAFs. Der *TP53*-Genstatus der Tumorzellen scheint hierbei keinen Einfluss auf die Induktion des p21-Proteins zu besitzen. Die p21-Induktion der CAFs scheint zumindest teilweise mit ihrer p53-Akkumulation in Folge einer Cisplatin-Behandlung zusammenzuhängen und somit mit der p53-Akkumulation in den benachbarten Tumorzellen.

Um zu überprüfen, ob das p53-Akkumulationsverhalten und die p21-Induktion der CAFs von den benachbarten Tumorzellen abhängt, wurden isolierte CAFs auf ihre p53- und p21-Expression hin untersucht. Dazu wurden jeweils 2 CAFs der Gruppen I bis III ausgewählt. Die CAFs wurden nach der Operation aus dem Gewebe isoliert, in der Zellkultur vermehrt und anschließend kryokonserviert. Nachdem sie wieder rekultiviert wurden, konnten die CAFs für 72h mit Cisplatin behandelt werden und mit Hilfe eines Western-Blots auf die Expression von p53 und p21 untersucht werden (Abb. 19).

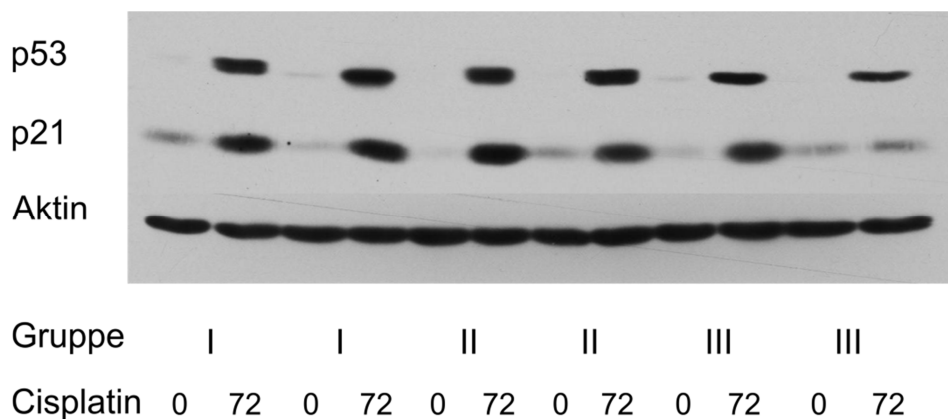


Abb. 19: Induktion der p21- und p53-Expression in CAFs der Gruppen I bis III. Jeweils 2 CAF-Linien der Gruppen I bis III wurden für 72h mit Cisplatin inkubiert. Nach 72h kommt es in den behandelten CAFs zu einer Expression des p21- bzw. p53-Proteins. In den unbehandelten Kontrollzellen sind keine bzw. nur schwache Proteinbanden zu erkennen. Beladungskontrolle: β -Aktin.

Unabhängig davon, aus welcher Gruppe das Ursprungsgewebe der isolierten CAFs stammt, zeigen alle untersuchten CAFs eine starke Induktion des p53-Proteins durch eine 72-stündige Inkubation mit Cisplatin. Die p21-Expression wird ebenfalls in 5 der 6 isolierten CAFs durch die Inkubation mit Cisplatin stark induziert. Lediglich eine CAF der Gruppe III zeigt eine nur schwache Induktion des p21-Proteins.

Aufgrund der Ergebnisse der Gewebekultur und Experimente mit isolierten CAFs kann davon ausgegangen werden, dass die Tumorzellen die p53- und p21-Antwort ihrer benachbarten CAFs maßgeblich beeinflussen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der von Bar gemachten Beobachtung, dass Überstände von *TP53*^{0/0} Tumorzellen die p53-Antwort von CAFs im Zellkulturrexperiment diktieren (Bar et al., 2009).

3.2.3.5.2 Einfluss der Cisplatin-Behandlung auf den Zelltod von CAFs

Nachdem die Induktion von Zelltod durch die Cisplatin-Behandlung in den Tumorzellen untersucht wurde, wurde überprüft, ob es durch die Behandlung in den benachbarten CAFs ebenfalls zu einer Induktion von Zelltod kommt (Abb. 20).

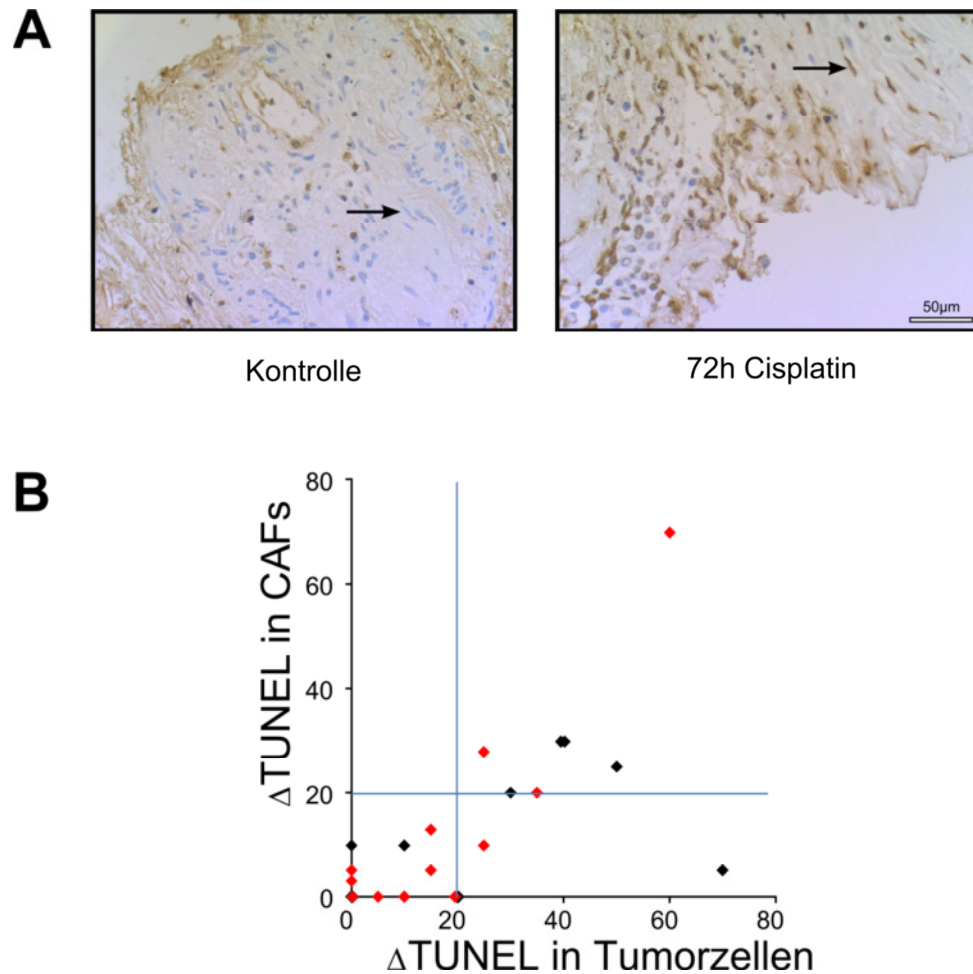


Abb. 20: Zelltodinduktion in CAFs als Folge der Cisplatin-Behandlung. **A:** Beispiel für die Induktion von Zelltod in CAFs durch die 72-stündige Cisplatin-Behandlung. Links: unbehandeltes Kontrollgewebe mit TUNEL-negativen CAFs (schwarzer Pfeil). Rechts: Für 72h behandeltes Gewebe mit TUNEL-positiven CAFs (schwarzer Pfeil). Balken entspricht 50µm. **B:** Korrelation der TUNEL-Induktion in CAFs (y-Achse) und Tumorzellen (x-Achse). Fälle mit mutantem *TP53* im Tumorzellkompartiment sind rot markiert (Spearman $r=0.65$; $p=0.0003$). Abbildung nach Schmid et al., 2012.

Durch die Behandlung mit Cisplatin kommt es in 7 der untersuchten Fälle zu einer deutlichen Induktion von Zelltod in den CAFs (>20%). Hierbei handelt es sich ausschließlich um Fälle, die mit einer parallelen Induktion von Zelltod im Tumorzellkompartiment reagieren. Hingegen zeigen 4 Fälle lediglich eine Induktion in den Tumorzellen, ohne eine parallele Induktion in den benachbarten CAFs. Bei den übrigen Fällen kommt es weder im Tumorzellanteil noch im CAF-Anteil zu einer deutlichen Induktion von Zelltod. Die beiden

Zelltypen reagieren somit in den meisten untersuchten Fällen parallel (Spearman $r=0.65$; $p=0.0003$), was für eine koordinierte Reaktion in Folge der Behandlung spricht.

3.3 Tumor-assoziierte Fibroblasten als Angriffspunkt einer gezielten Therapie

Das Tumorstroma spielt eine zentrale Rolle für die Tumorgenese, die Tumorprogression und die Metastasierung von Karzinomen (Li et al., 2007; Tse und Kalluri; 1997; Fukumura, 2007). Die Tatsache, dass CAFs den zellulären Anteil des Stromas dominieren und durch die Produktion von extrazellulärer Matrix und Wachstumsfaktoren das Stroma aktiv gestalten, macht sie zu einem attraktiven Ziel einer Therapie. Der stimulierende Einfluss, den CAFs dabei auf die benachbarten Tumorzellen ausüben, hängt von einer Vielzahl von Signalwegen ab, in denen Kinasen eine zentrale Rolle spielen (Micke und Ostman, 2005). Daher wurde überprüft, in wie weit der Einsatz niedermolekularer Kinase-Inhibitoren eine Möglichkeit darstellt, den Einfluss der CAFs auf das Tumorwachstum zu hemmen.

3.3.1 Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf Proliferation und Viabilität von CAFs

In Zusammenarbeit mit Michael Dengler und Silke Haubeiß wurde zunächst mit Hilfe des MTT-Assays 160 kleinmolekulare Kinase-Inhibitoren auf ihren hemmenden Effekt auf Proliferation bzw. mitochondriale Aktivität von 2 CAF-Linien aus Bronchialkarzinomen hin untersucht. Es zeigte sich, dass 5 der 160 getesteten Inhibitoren die Proliferation bzw. mitochondriale Aktivität in den beiden CAFs um mehr als 50% hemmen (Abb. 21).

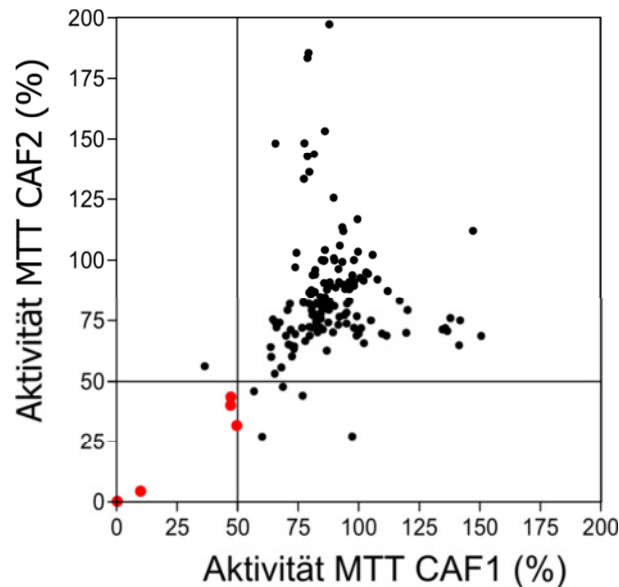


Abb. 21: Einfluss von 160 Kinase-Inhibitoren auf die Aktivität von CAFs. Zwei CAFs wurden für 48h mit 160 verschiedenen Kinaseinhibitoren [1 μ M] inkubiert. Nach 48h wurde der Einfluss auf die Aktivität im MTT-Assays bestimmt. Gezeigt ist die Aktivität bezogen auf die DMSO-Kontrolle. Rote Punkte zeigen eine Reduktion der Aktivität von mehr als 50% in beiden CAFs an. Abbildung nach Haubeiss et al., 2010.

Bei den 5 Inhibitoren handelt es sich um Staurosporin, K-252a, PI-103, einen spezifischen PDGFR-Inhibitor und einen PDK1/Akt/Flt-Inhibitor. Die Inhibitoren und ihre Ziele sind in Tabelle 43 aufgeführt.

Tabelle 43: Inhibitoren, welche die Aktivität der beiden getesteten CAFs im MTT-Assay um mehr als 50% hemmen und ihre Zielkinasen.

Inhibitor	Ziel
Staurosporin, Streptomyces sp. (#569397)	Breites Spektrum an Kinasen, so z.B. CaMK, MLCK, PKA, PKC, PKG
PDK1/Akt/Flt Dual Pathway Inhibitor (#521275)	Kinasen in PDK1/Akt- und Flt/PIM-Signalwegen
PI-103 (#528100)	DNA-PK, PI3K, mTOR
PDGF-Rezeptor Tyrosin-Kinase Inhibitor V (#521233)	PDGFR, c-Abl
K-252a, Nocardopsis sp. (#420298)	Breites Spektrum an Kinasen, so z.B. CaMKII, MLCK, PKA, PKC

Somit handelt es sich bei 3 der 5 aktivsten Substanzen um Inhibitoren des PDGFR. In CAFs kommt es häufig zur Expression des PDGFR (Kitadai et al., 2006), weshalb der Einfluss von 4 von der FDA-zugelassenen PDGFR-Inhibitoren auf die Proliferation von bis zu 37 CAFs im MTT-Modell untersucht wurde (Abb. 22). Hierbei handelt es sich um Dasatinib, Imatinib, Nilotinib und Sorafenib, als Negativkontrolle diente der EGFR-Inhibitor Erlotinib.



Abb. 22: Einfluss 4 zugelassener PDGFR-Inhibitoren auf die Proliferation von CAFs. CAFs wurden für 48h mit Dasatinib (n=37), Imatinib (n=37), Nilotinib (n=21), Sorafenib (n=7) und Erlotinib (n=10) behandelt und später die Proliferation bzw. mitochondriale Aktivität mit Hilfe des MMT-Assays bestimmt. Der spezifische EGFR-Inhibitor Erlotinib diente dabei als Negativkontrolle. **A:** Wachstumshemmende Wirkung der untersuchten Inhibitoren bei verschiedenen Konzentrationen in Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen. **B:** Hemmung der Proliferation durch die untersuchten Inhibitoren bei klinisch relevanten Konzentrationen. (*:p<0,05; ungepaarter Student's T-Test; durchschnittliche Werte +/-SEM). Abbildungen aus Haubeiss et al., 2010.

Die untersuchten Inhibitoren zeigen große Unterschiede bei der Reduktion der Proliferation bzw. Aktivität in den untersuchten CAFs. Dasatinib hemmt bei allen untersuchten Konzentrationen die Proliferation am stärksten, gefolgt von Imatinib. Die beiden übrigen PDGFR-Inhibitoren zeigen ebenfalls eine Hemmung der Proliferation bzw. Aktivität,

wohingegen Erlotinib die Proliferation erst bei sehr hohen Konzentrationen reduziert. Bei der Untersuchung der klinisch relevanten Konzentrationen (Dasatinib: Wang et al.¹, 2008; Imatinib: Peng et al., 2005; Nilotinib: Weisberg et al., 2007; Erlotinib: Chiorean et al., 2008; Sorafenib: Minami et al., 2008) bestätigte sich das Ergebnis der Konzentrationsreihen und Dasatinib (0,11µM: 36.4+/-1.2% SEM) führte, gefolgt von Imatinib (5,3 µM: 31.5+/-1.8%), zur stärksten Reduktion in den untersuchten CAFs. Nilotinib (3,6 µM: 20.5+/-2.4%) und Sorafenib (12µM: 16.3+/-1.2%) führten ebenfalls zu einer Reduktion, wohingegen Erlotinib (3,6µM: 0,4+/-3,7%) die Proliferation, in der klinisch relevanten Konzentration eingesetzt, kaum negativ beeinflusst.

Da es sich bei Dasatinib um den potentesten Inhibitor der CAF-Proliferation bzw. Aktivität handelt, wurde sein Einfluss auf die Proliferation näher untersucht (Abb. 23).

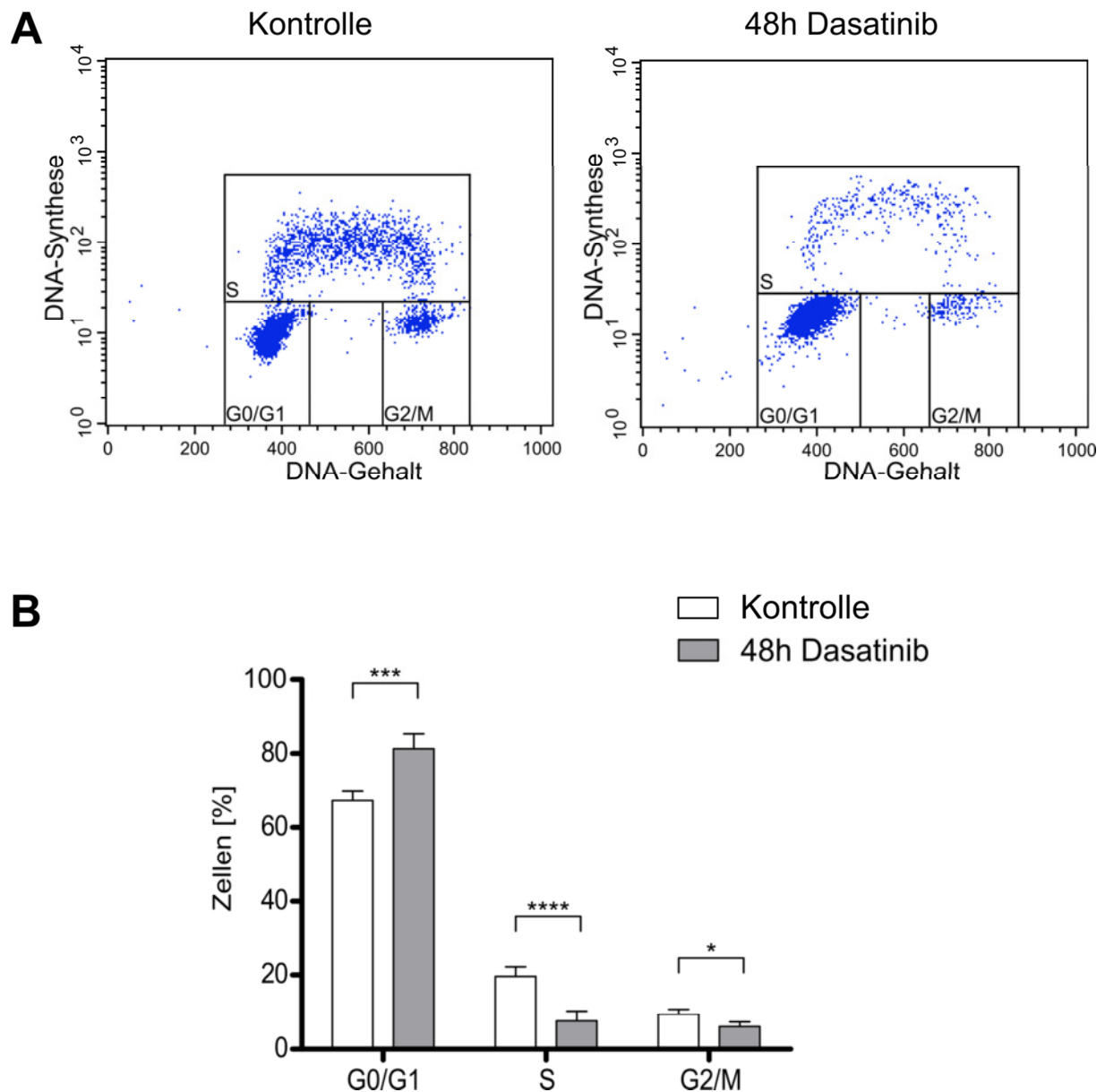


Abb. 23: Anteil proliferierender Zellen in Abhängigkeit von Dasatinib. Die Zellen wurden für 48h mit 100nM Dasatinib behandelt. In den letzten 45min wurden die Zellen mit BrdU inkubiert. Anschließend wurde eine Färbung gegen BrdU durchgeführt und die DNA mit Propidium-Iodid angefärbt, um anschließend den Anteil von Zellen in der S-Phase zu bestimmen. **A:** Abnahme des Anteils von Zellen in der S-Phase (S) durch Dasatinib in einer der untersuchten CAFs. Links: unbehandelte Kontrollzellen. Rechts: für 48h Dasatinib-behandelte CAFs. **B:** Anteil der Zellen in der G0/G1-, S- und G2/M-Phase in Abhängigkeit von Dasatinib (*:p=0.0127, ***:p=0.0003, ****:p<0.0001; 2-seitiger, gepaarter t-Test; durchschnittliche Werte +/-SD von 8 CAF-Linien).

Dasatinib (100nM) führt in den untersuchten CAFs zu einem Proliferationsstopp. Während der Anteil von Zellen in der S-Phase durch die Behandlung mit Dasatinib abnimmt, steigt der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase an. Dasatinib führt dazu, dass die Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus verbleiben. Seneszenz konnte als Ursache für die beobachtete Abnahme des Anteils von Zellen in der S-Phase durch eine β -Galaktosidase-Färbung ausgeschlossen werden (Abb. 24 A). Mit Hilfe einer Annexin-V-Färbung konnte gezeigt werden, dass Dasatinib die Viabilität der behandelten CAFs nicht negativ beeinflusst (Abb. 24 B).

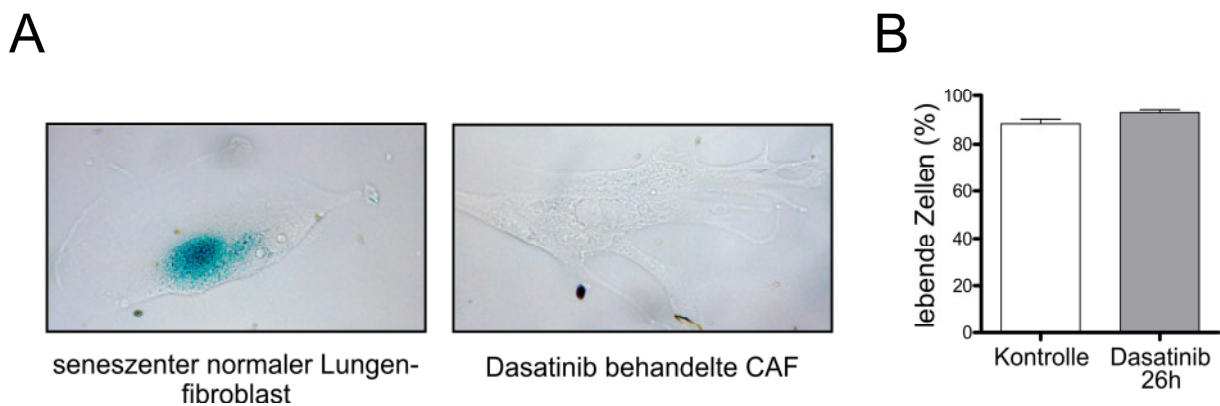


Abb. 24: β -Galaktosidase und Annexin-Färbung an Dasatinib-behandelten CAFs. **A:** β -Galaktosidase-Färbung zum Nachweis seneszenten Zellen. Links: β -Galaktosidase positiver normaler Lungenfibroblast als Positivkontrolle. Rechts: β -Galaktosidase negative Dasatinib-behandelte CAF. Nachdem die CAFs für 48h mit 100nM Dasatinib behandelt wurden, wurden sie weitere 7 Tage ohne Dasatinib kultiviert. Abbildung aus Haubeiss et al., 2010. **B:** Vergleich des Anteils Annexin-negativer, Zellen zwischen unbehandelten und für 26h behandelten CAFs aus 3 Patienten (durchschnittliche Werte +/-SD).

Nachdem mit Hilfe der β -Galaktosidase-Färbung Seneszenz als Ursache für den beobachteten Zellzyklus-Arrest ausgeschlossen wurde, konnte gezeigt werden, dass es sich beim Dasatinib-vermittelten Zellzyklusarrest um ein reversibles Ereignis handelt. Bereits 8h Stundem nach dem Entzug von Dasatinib kommt es in CAFs wieder zur Induktion der Proliferation und zu einem Anstieg des Anteils von CAFs in der S-Phase (Haubeiss et al., 2010).

3.3.2 Verteilung von Dasatinib in der *ex vivo* perfundierten Lunge

Um zu überprüfen, ob der niedermolekulare Inhibitor Dasatinib im Falle eines Bronchialkarzinoms den Tumor als Zielstruktur über die Blutbahn erreicht, wurde das Modell der *ex vivo* perfundierten Lunge verwendet (Linder et al., 1996). Dabei wurde ein humaner Lungenlappen, der aufgrund einer Tumorerkrankung resektiert wurde, mit einem Albumin-Puffer, der Dasatinib in einer Konzentration von 100nM enthielt, über die Lungenarterien perfundiert. Der Puffer verlässt dabei das Organ wieder über die Lungenvene, wird aufgefangen und dann über eine Pumpe erneut dem Gewebe zugeführt.

Im Laufe einer 160-minütigen Perfusion wurden zu bestimmten Zeitpunkten Pufferproben und Gewebeproben aus der Peripherie des Lungenlappens entnommen und die Dasatinib-Konzentration anschließend massenspektrometrisch bestimmt (Abb. 25). Im untersuchten Lungenlappen befindet sich der Tumor in seiner physiologischen Umgebung.

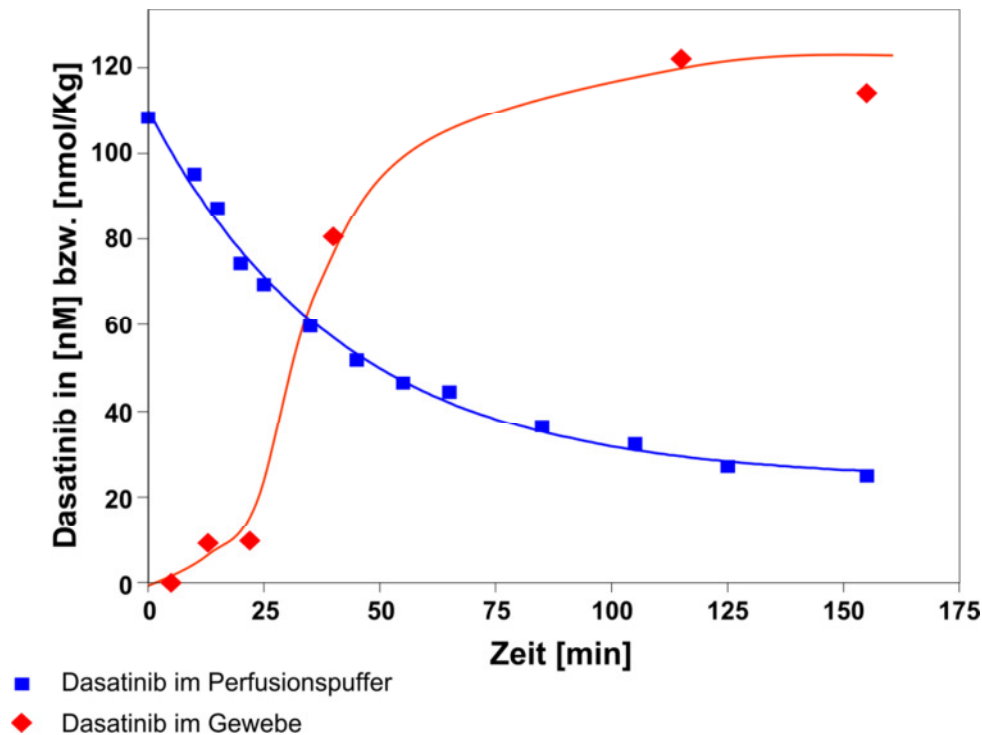


Abb. 25: Dasatinib-Konzentration im peripheren Lungengewebe und Perfusionspuffer zu bestimmten Zeitpunkten der Perfusion. Während der 160-minütigen Perfusion mit 100nM Dasatinib wurden Pufferproben und Gewebeproben aus dem peripheren Lungengewebe entnommen. Die Konzentrationen wurden anschließend massenspektrometrisch für den Puffer (blaue Punkte) und das peripher entnommene Lungengewebe (rote Linie) bestimmt.

Es ist deutlich zu erkennen, wie die Konzentration von Dasatinib im Laufe der Perfusion im Lungengewebe zunimmt. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme der Konzentration im Perfusionspuffer. Um jedoch zu überprüfen, ob Dasatinib im Falle eines Bronchialkarzinoms direkt im Tumorgewebe ankommt, wurde das zu untersuchende Gewebe direkt im Anschluß an die Perfusion in der Pathologie des RBK entnommen und schockgefroren. Dazu wurden Gewebeproben aus der viablen Wachstumszone des Tumors geschnitten und die Dasatinibkonzentration mit der erreichten Konzentration im Perfusionspuffer verglichen (Abb. 26).

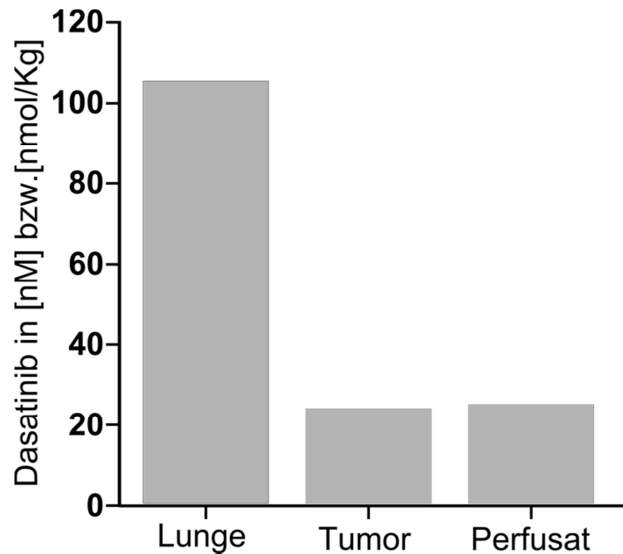


Abb. 26: Dasatinib-Konzentration im peripheren Lungengewebe, im Rand des Tumors und im Perfusat nach Abschluss der Perfusion. Vergleich der Konzentration von Dasatinib in der Lunge (links), in der Peripherie des Tumors (Mitte) und im Perfusat (rechts) nach Ende der Perfusion. Angabe der Konzentration in nM bzw. nM/kg.

Dasatinib erreicht in der Peripherie des normalen Lungengewebes mit einem Wert von 105nM eine Konzentration, die höher liegt, als die Pufferkonzentration zu Beginn der Perfusion. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich Dasatinib im Lungengewebe anreichert. In der Peripherie des Tumors wird eine Konzentration von ca. 23nM erreicht, was ungefähr der Konzentration im Puffer (24nM) nach Abschluß der Perfusion entspricht. Die in der Wachstumszone des Tumors erreichte Konzentration von 23nM führt bereits zu einer Hemmung der CAF-Proliferation nach 48h, wie an den MTT-Ergebnissen der 37 untersuchten CAFs zu sehen ist (Abb. 22).

3.3.3 Molekulare Auswirkungen der Dasatinib-Behandlung in CAFs

Neun CAFs, welche im MTT-Assay besonders sensitiv auf eine Behandlung mit Dasatinib reagieren, wurden ausgewählt, um die Auswirkungen einer Dasatinib-Behandlung auf das Transkriptom näher zu untersuchen. Dazu wurden die CAFs für 48h mit 100nM Dasatinib behandelt und im Anschluss zusammen mit den unbehandelten Kontrollzellen desselben Falles gerntet und schockgefroren. Zellen von drei der so behandelten Paare wurden von

meiner Kollegin Silke Haubeiß gewonnen. RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Sets nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Für die anschließende Microarray-Analyse wurde der humangene 1.0st Array von Affymetrix verwendet. Die Hybridisierung und anschließende Qualitätskontrolle wurden in der Microarray Facility Tübingen durchgeführt.

Die Analyse der Rohdaten erfolgte durch Silke Haubeiß mit dem Programm Genespring und die Ergebnisse wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Dasatinib in 492 Genen zu einer mindestens 2-fachen Veränderung der Expression führt. Bei 104 dieser so identifizierten Gene handelt es sich um Gene, die mit dem Zellzyklus in Verbindung gebracht werden können und die bis auf 7 durch Dasatinib schwächer exprimiert wurden (Haubeiss et al., 2010). Ein hoher Anteil von Genen mit Beteiligung am Zellzyklus konnte erwartet werden, da bereits bekannt war, dass Dasatinib die Proliferation von CAFs sehr potent hemmt. Dies zeigt, dass Dasatinib in CAFs einen Phänotyp induziert, der dem normaler quieszenter Fibroblasten ähnelt (Haubeiss et al., 2010). Ein Vergleich des Sets von durch Dasatinib differenziell regulierten Genen mit einem Set von Genen, welche in CAFs und normalen Fibroblasten aus der Brust differenziell exprimiert werden (Sadlonova et al., 2009), zeigte eine hohe Übereinstimmung (Abb. 27).

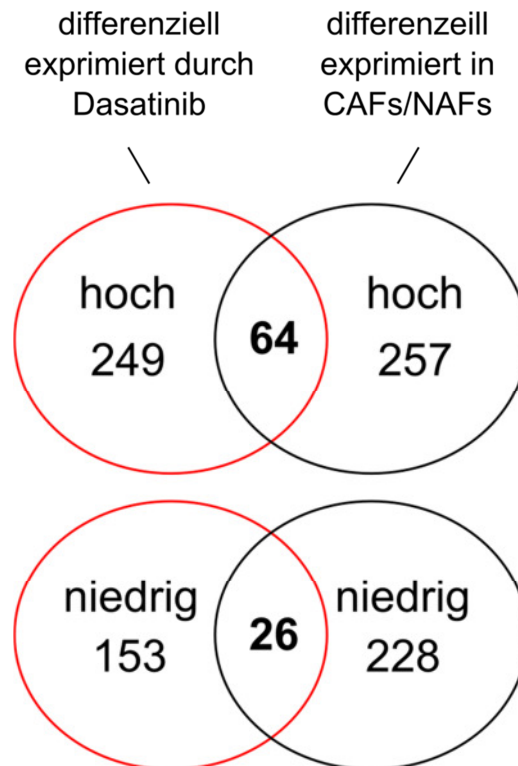


Abb. 27: Venn-Diagramm mit Vergleich der durch Dasatinib differenziell regulierten Gene und der Gene, die in CAFs und NAFs differenziell exprimiert werden. Links: Anzahl der Gene, welche durch Dasatinib in CAFs aus Bronchialkarzinomen mindestens 2-fach differenziell reguliert werden. Rechts: Anzahl der Gene, die in CAFs und NAFs aus der Brust mindestens 2-fach differenziell exprimiert werden. Abbildung nach Haubeiss et al., 2010.

Dasatinib führt zu einer niedrigeren Expression von 64 Genen, die in normalen Fibroblasten ebenfalls niedriger exprimiert sind als in CAFs. Bei 26 Genen, die in normalen Fibroblasten der Brust eine höhere Expression zeigen, kommt es durch Dasatinib ebenfalls zu einer erhöhten Expression in CAFs (Haubeiss et al., 2010).

Die Behandlung mit Dasatinib führt zu einem molekularen Phänotyp, der dem normaler Fibroblasten ähnelt. Welche Konsequenzen diese durch Dasatinib vermittelten molekularen Veränderungen in CAFs für Tumorzellen in ihrer direkten Umgebung haben, wurde mit Hilfe von konditioniertem Medium näher untersucht.

3.3.4 Einfluss Dasatinib-behandelter CAFs auf Tumorzellen

Von Addadi konnte bereits 2010 gezeigt werden, dass Fibroblasten durch sekretierte Faktoren das Wachstum von Tumoren beeinflussen (Addadi et al., 2010). Um zu überprüfen, ob die genannten molekularen Veränderungen in CAFs Konsequenzen für die Proliferation von Tumorzellen haben, wurden die Überstände von CAFs gesammelt. Konfluente CAFs aus 2 Patienten wurden dazu für 48h in RPMI-Medium inkubiert, welches 0.1% FCS enthielt. Dadurch konnte der Einfluss von Wachstumsfaktoren aus dem verwendeten FCS im Kulturmedium minimiert werden. Dem Medium wurde vor der Inkubation Dasatinib in einer Konzentration von 100nM zugegeben bzw. wurde Kontrollmedium verwendet, welches kein Dasatinib enthielt.

Das so gewonnene Medium wurde zu Zellen der Linie H1299 gegeben, welche zuvor für 4h bei 0,1%FCS kultiviert wurden, um den Einfluss von zuvor im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren zu minimieren. Als Kontrollen diente 0,1%-iges RPMI-Medium, welches zuvor nicht mit Fibroblasten inkubiert wurde und kein Dasatinib bzw. Dasatinib in einer Konzentration von 70nM enthielt. Als weitere Kontrolle wurde konditioniertes Medium verwendet, dem nach der Inkubation 70nM Dasatinib zugegeben wurde. Bei 70nM handelt es sich näherungsweise um die durchschnittliche Konzentration an Dasatinib, die nach 48h Inkubation mit zu Beginn 100-nanomolarem Medium massenspektrometrisch im Überstand von 3 getesteten CAFs ermittelt werden konnte (Abb. 28).

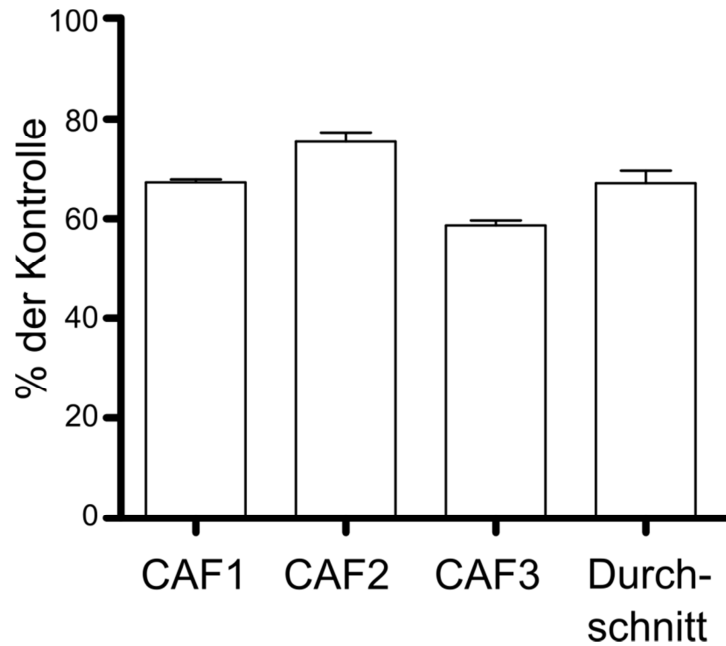


Abb. 28: Dasatinib-Konzentration im Überstand von CAFs nach 48h Kultur. Drei CAFs wurden für 48h mit Medium inkubiert, welches Dasatinib in einer Konzentration von 100nM enthielt. Als Kontrolle diente Medium, das Dasatinib in einer Konzentration von 100nM enthielt. Nach 48h wurde das Medium gesammelt und die Konzentration an Dasatinib massenspektrometrisch bestimmt. Für jede der CAFs wurde die Konzentration durch 3 Messungen bestimmt. Beim Durchschnitt handelt es sich um die durchschnittliche Konzentration aller 9 Einzelmessungen (durchschnittliche Werte +/- SEM).

In den letzten 45min der 48-stündigen Inkubation der Tumorzellen wurde den Zellen BrdU zugegeben, wodurch sich nach anschließender Färbung der Anteil proliferierender Tumorzellen bestimmen ließ. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abb. 29 dargestellt.

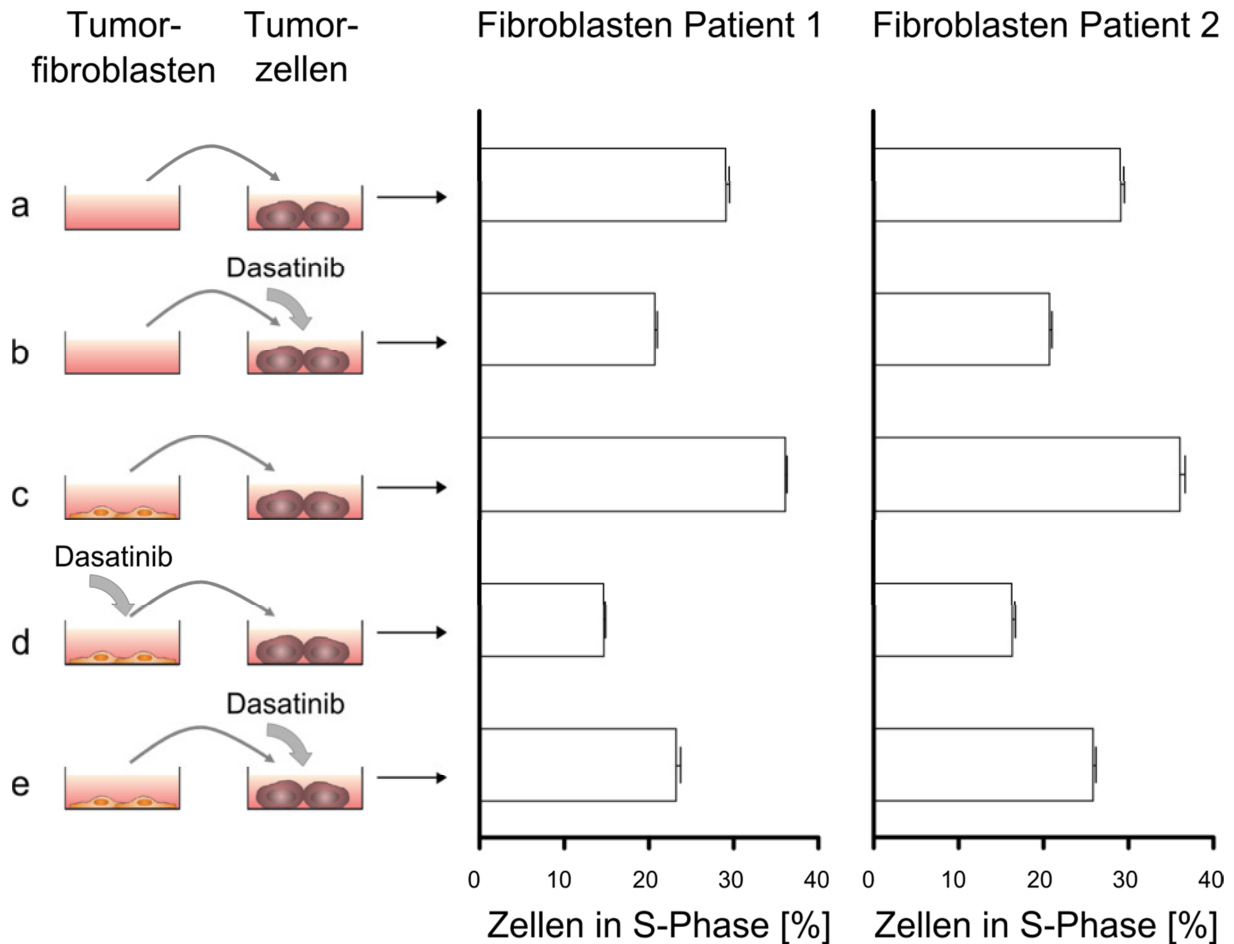


Abb. 29: Konditioniertes Medium von Dasatinib behandelten CAFs hemmt die Tumorzellproliferation. Der Einfluss des konditionierten Mediums auf die Proliferation der H1299 Lungentumorlinie wurde mit Hilfe des BrdU-Assays ermittelt. Die Tumorzellen wurden für 48h mit verschiedenen Medien inkubiert, nachdem sie zuvor für 4h mit Medium inkubiert wurden, welches 0.1% FCS enthielt. Links: Ansätze zur Gewinnung der verschiedenen Medien, die bei der Inkubation der Tumorzellen eingesetzt wurden. a: Medium. b: Medium + 70nM frisch zugesetztes Dasatinib. c: konditioniertes Medium von CAFs. d: konditioniertes Medium von CAFs + 70nM frisch zugesetztes Dasatinib. e: konditioniertes Medium von Dasatinib-behandelten CAFs. Rechts: Einfluss der verschiedenen Medien auf den Anteil von Tumorzellen in der S-Phase des Zellzyklus. Zu sehen ist der Einfluss von konditioniertem Medium, welches mit Hilfe von CAFs zweier Patienten gewonnen wurde. Abbildung nach Haubeiss et al., 2010.

Das konditionierte Medium der beiden CAFs stimuliert die Proliferation der H1299-Zellen bei niedrigen Serumkonzentrationen deutlich. Dieser stimulatorische Effekt entfällt, wenn die CAFs für 48h mit Dasatinib inkubiert werden. Diese Abnahme der Proliferation ist nicht allein durch den direkten Effekt von Dasatinib auf die Tumorzellen zu erklären, was daran zu

erkennen ist, dass konditioniertes Medium bzw. 0.1%-iges Medium, dem Dasatinib zugegeben wurde, die Tumorzellproliferation weit weniger hemmt.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Dasatinib den Phänotyp von CAFs dahingehend verändert, dass sie einen Phänotyp zeigen der dem normaler Fibroblasten ähnelt. Von normalen Fibroblasten ist bekannt, dass sie nicht den stimulatorischen Einfluss der CAFs auf das Tumorstadium besitzen (Räsänen et al., 2009).

Nachdem der Einfluss des konditionierten Mediums auf die Proliferation der H1299-Tumorzelllinie gezeigt werden konnte, wurde mit Hilfe von Protein-Arrays versucht, die von CAFs sekretierten Faktoren zu identifizieren und so möglicherweise die Faktoren zu bestimmen, welche für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Dazu wurden Überstände von CAFs verwendet, die für 48h mit bzw. ohne Dasatinib inkubiert wurden und 0.1%FCS enthielten. Bei den Arrays handelte es sich um den Growth-Factor-Array, den Cytokine-Array und den Matrix Metalloproteinase-Array der Firma RayBiotech. Insgesamt konnten so 3 CAFs im Falle des Growth-Factor- und Cytokin-Arrays bzw. 2 CAFs im Falle des Matrix Metalloproteinase-Arrays auf die Sekretion löslicher Faktoren untersucht werden. Insgesamt handelte es sich um über 100 Faktoren, deren Dasatinib-abhängige Sekretion untersucht wurde (Anhang Abb.xy). Lediglich 3 Faktoren konnten identifiziert werden, deren Sekretion durch Dasatinib in allen untersuchten CAFs in gleicher Weise beeinflusst wird (Abb. 30).

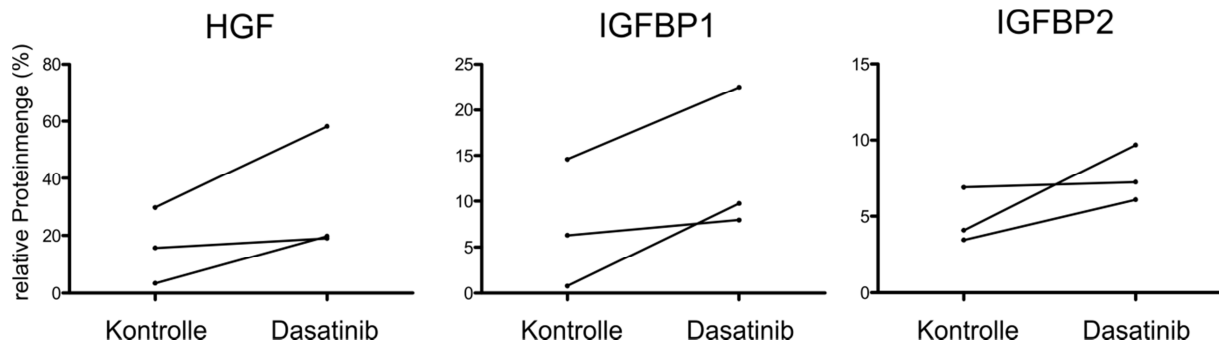


Abb. 30: Zunahme der Sekretion solubler Faktoren in Abhängigkeit von Dasatinib. Drei CAFs wurden für 48h ohne Dasatinib bzw. 48h mit 100nM Dasatinib inkubiert und anschließend die Überstände mit Hilfe von Proteinarrays untersucht. Die Menge an sekretierten Faktoren wurde densitometrisch bestimmt und prozentual in Bezug auf die Positivkontrolle der Arrays angegeben. Links: HGF (Hepatocyte Growth Factor); Mitte: IGFBP1 (Insulin-like growth factor binding protein 1); Rechts: IGFBP2 (Insulin-like growth factor binding protein 2).

Dasatinib führt bei allen 3 untersuchten CAFs zu einer verstärkten Sekretion von HGF, IGFBP 1 und IGFBP 2. Keine der untersuchten Matrix Metalloproteinasen bzw. keines der mit Matrix Metalloproteinasen-assoziierten Proteine wurde durch Dasatinib in den beiden untersuchten CAFs in gleicher Weise in der Sekretion verändert.

4. Diskussion

Der Begriff Bronchialkarzinom ist vielmehr ein Sammelbegriff für eine sehr heterogene Gruppe von Krebserkrankungen der Lunge, als eine genaue Beschreibung eines definierten Krankheitsbildes. Diese Heterogenität betrifft dabei sowohl die morphologischen als auch die genetischen Eigenschaften des Tumors (Petersen, 2011), was eine einheitliche Therapie, die für alle Tumoren gleichermaßen geeignet ist, unmöglich macht. Die beobachtete hohe genetische Instabilität führt weiterhin dazu, dass man beim Bronchialkarzinom nicht nur eine ausgeprägte intertumorale Heterogenität, sondern auch eine sehr hohe intratumorale Heterogenität vorfindet. Durch die intratumorale Heterogenität kommt es zu einer ständigen Selektion desjenigen Zellklons, der am besten an die Bedingungen im Tumor angepasst ist, wodurch dieser zum vorherrschenden Klon wird (Mitrus, 2011). Daher führt die Gabe eines Therapeutikums zur Selektion von Zellklonen, welche eine niedrigere Sensitivität aufweisen. Die Folge ist ein Fortschreiten der Erkrankung nach anfänglichem Ansprechen auf die Therapie. Davon auszugehen, dass lediglich die Eigenschaften der Tumorzellen für den Verlauf der Erkrankung entscheidend sind, lässt jedoch den Einfluss des Tumorstromas auf die Progression völlig außer Acht. In den vergangenen Jahren wurde der wichtige Einfluss des Stromas immer mehr erkannt und so konnte gezeigt werden, dass die Mikroumgebung auf vielfältige Weise das Wachstum des Tumors stimuliert. Das Stroma des Tumors fördert dabei direkt die Proliferation der Tumorzellen und stimuliert die Invasivität und Metastasierung des Tumors (Schäfer und Werner, 2008; Li et al., 2007; Hanahan und Weinberg, 2000). CAFs dominieren dabei zahlenmäßig den Anteil des zellulären Stromas, was sie zu einem attraktiven Ziel einer Therapie macht (Xing et al., 2011).

Von CAFs und NAFs aus der Brust war zu Beginn der Arbeit bereits bekannt, dass sie sich nach der Isolation unterscheiden (Bauer et al., 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob sich CAFs und NAFs der Lunge nach ihrer Isolation ebenfalls molekular unterscheiden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob es im Gewebe zwischen Tumorzellen und CAFs infolge einer DNA-schädigenden Therapie zu einer koordinierten Akkumulation von p53 kommt. Zellkulturexperimente konnten bereits zeigen, dass Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, die p53-Akkumulation in CAFs durch soluble

Faktoren zu inhibieren (Bar et al. 2009). Unklar war jedoch, ob es auch im Gewebe zu solch einer Interaktion kommt oder ob sich dieses Phänomen auf die Zellkultur beschränkt. Dazu musste jedoch zunächst geklärt werden, ob sich das Kulturmodell negativ auf das Gewebe auswirkt. Nach der Validierung des Modells galt es zu klären, ob der niedermolekulare EGFR-Inhibitor Erlotinib, der bei der Therapie bronchialer Karzinome eingesetzt wird, im Gewebe zu einer Reduktion des Anteils proliferierender Tumorzellen führt (Pao et al., 2005). Schließlich sollte untersucht werden, ob sich CAFs durch den Einsatz niedermolekularer Substanzen in ihrer Aktivität hemmen lassen und dadurch ihren stimulatorischen Einfluss verlieren.

4.1 Molekulare Unterschiede zwischen CAFs und NAFs

Für die Transkriptomanalysen wurden CAFs und NAFs verwendet, welche zuvor aus dem Gewebe von Bronchialkarzinompatienten isoliert wurden und dann mindestens 2 Mal in der Zellkultur passagiert wurden. Dabei erhielt man eine homogene Population von Zellen, die als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation verwendet werden konnte. Bei der Verwendung von Zellen, die mittels Mikrodissektion aus dem Gewebe entfernt werden, erhält man hingegen häufig eine Verunreinigung der gewünschten RNA durch RNA anderer Zelltypen, die sich nicht vollständig von den gewünschten Zellen trennen lassen. Die Möglichkeit, dass es sich bei den für den Vergleich verwendeten CAFs nicht fälschlicherweise um Tumorzellen handelt kann ausgeschlossen werden, da die gesamten Zellen, die bei dieser Methode aus dem Tumormaterial gewonnen werden, FAP-positiv sind und keine *TP53*-Mutationen aufweisen (Sonnenberg, 2009). Die verwendeten NAFs wurden auf die gleiche Weise wie die CAFs aus dem Gewebe gewonnen. Jedoch handelte es sich beim Ausgangsmaterial um tumorfreies Lungengewebe desselben Patienten.

Bei der Untersuchung der molekularen Unterschiede zwischen NAFs und CAFs von 9 Patienten mit primärem Bronchialkarzinom zeigten 60 Gene eine differenzielle Expression. Der Befund, dass NAFs und CAFs *ex vivo* die differenzielle Expression einer Reihe von Genen beibehalten, wurde bereits für NAFs und CAFs aus Mammakarzinomen beschrieben (Bauer et al., 2010). Unter normalen physiologischen Bedingungen befinden sich Fibroblasten in einem inaktiven Zustand. Charakteristisch für diesen, auch als Qieszenz bezeichnet

Ruhezustand ist die fehlende Proliferation der Zellen (Coller et al. 2006). Erst durch den Kontakt mit zahlreichen Faktoren wie TGF β , EGF, PDGF und FGF2, die als Folge einer Verletzung des Gewebes freigesetzt werden, kommt es zur Aktivierung der Fibroblasten und diese beginnen zu proliferieren (Kalluri und Zeisberg, 2006). Durch Serum lässt sich in Fibroblasten eine Expression von Genen induzieren, welche mit der Wundheilung in Zusammenhang stehen und ein Phänotyp, der dem aktivierter Myofibroblasten ähnelt (Chang et al., 2002). Die Ursache ist in den zahlreichen Wachstumsfaktoren zu sehen, die im Serum enthalten sind. Es ist davon auszugehen, dass die NAFs, welche für den Vergleich verwendet wurden, durch den Einsatz von FCS im Zellkulturmedium, ebenfalls einen aktivierten Phänotyp zeigen und daher proliferieren. Die Zahl der tatsächlich differenziell regulierten Gene im Gewebe ist somit sicherlich höher, da bei der hier durchgeführten Analyse die Gene, die sich *in vivo* aufgrund des unterschiedlichen Proliferationsverhaltens der beiden Zelltypen in ihrer Expression unterscheiden, nicht erfasst werden. Umso erstaunlicher ist die relativ hohe Zahl differenziell regulierter Gene, die im Rahmen dieser Arbeit festgestellt wurde. Dass es zu einem solchen Unterschied zwischen den aktivierten NAFs und den CAFs kommt, deutet darauf hin, dass es sich bei CAFs nicht einfach um aktivierte normale Fibroblasten handelt, wie sie in Wunden zu finden sind, sondern vielmehr um einen Zelltyp, der seinen Phänotyp dem Einfluss der malignen Zellen in seiner Umgebung verdankt. Beim Vergleich der CAFs und NAFs des gleichen Patienten zeigten sich interindividuelle Unterschiede in den Sets differenziell regulierter Gene (Daten nicht gezeigt). Dies spiegelt die bereits erwähnte hohe interindividuelle Heterogenität wieder, die bei Bronchialkarzinomen zu finden ist. Ob die Ursache für die festgestellten Unterschiede zwischen CAFs und NAFs in Mutationen im CAF-Kompartiment des Tumors liegt, wird kontrovers diskutiert (Bauer et al., 2010). So gibt es Studien, die *TP53*-Mutationen in Fibroblasten des Stromas nachweisen (Patocs et al., 2007), andere Studien hingegen bestreiten das Vorhandensein solcher Mutationen (Qiu et al., 2008). Eindeutige Hinweise gibt es hingegen auf epigenetische Veränderungen in CAFs und so kommt es in CAFs im Vergleich zu NAFs zu einer veränderten Expression bestimmter Gene, die sich auf eine Methylierung der DNA zurückführen lässt (Hu et al., 2005).

Bei der GO-Analyse der 60 differenziell regulierten Gene zeigte sich, dass ein hoher Anteil von Genen für Proteine kodiert, welche an der Signaltransduktion beteiligt sind bzw.

Komponenten von Signalwegen darstellen. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits beim Vergleich von CAFs und NAFs aus dem Mammakarzinom gemacht (Bauer et al., 2010). Hier standen viele der differenziell regulierten Gene mit parakrinen und intrazellulären Signalwegen in Zusammenhang (Bauer et al., 2010). Dies passt ebenfalls zu der in dieser Arbeit gemachten Beobachtung, dass viele der identifizierten Gene die Synthese, Sekretion und Wirkung von Zytokinen regulieren. Durch die Sekretion verschiedenster Zytokine verändern CAFs aktiv das Tumormilieu und sorgen so nachweislich für die Infiltration von Immunzellen und die Vaskularisierung des Tumors (Xing et al., 2011; Kalluri und Zeisberg, 2006; Cirri und Chiarugi, 2012). Die Tatsache, dass viele Produkte der differenziell regulierten Gene mit den Begriffen extrazellulärer Raum bzw. extrazelluläre Matrix in Verbindung gebracht werden, ist als Beleg für die von mehreren Arbeitsgruppen gemachte Beobachtung zu sehen, dass CAFs aktiv die extrazelluläre Matrix des Tumors gestalten (Cirri und Chiarugi, 2012; Gaggioli et al., 2007; Franco et al., 2010). Eine Beteiligung von mehreren Genen an metabolischen Prozessen ist in Zusammenhang mit dem von Martinez-Outschboorn (Martinez-Outschboorn et al., 2011) entdeckten Phänomen zu sehen. Dabei kommt es durch die Kokultur von Tumorzellen und Fibroblasten zu dramatischen Veränderungen im Metabolismus der Fibroblasten. Dieser von den Tumorzellen diktierten Veränderung wird dabei ein supportiver Effekt für das Wachstum der Tumorzellen zugeschrieben. Möglicherweise stellen die hier festgestellten Veränderungen in der Expression mehrerer Gene mit Beteiligung an metabolischen Prozessen die Grundlage für dieses Phänomen dar. Weiterhin wurden bei der Analyse mehrere Gene gefunden, deren Produkte mit Zelladhäsion in Verbindung gebracht werden. Eine veränderte Expression von Genen, die mit Zelladhäsion in Verbindung gebracht werden, wurde ebenfalls bereits bei der Untersuchung von CAFs aus Mammakarzinomen gemacht (Bauer et al., 2010). Die Feststellung, dass die differenziell exprimierten Gene, die beim Vergleich von CAFs und NAFs aus dem Mamma- und Bronchialkarzinom gefunden wurden, teilweise denselben Prozessen zugeordnet werden können, legt den Verdacht nahe, dass CAFs verschiedener Tumorentitäten dieselben Grundfunktionen erfüllen. Eine solche Beobachtung wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gemacht, was diese zu derselben Vermutung veranlasste (Navab et al., 2011).

In der Literatur finden sich Genexpressionsprofile verschiedener Tumorentitäten, die in den untersuchten Kollektiven eine Prognose hinsichtlich des Krankheitsverlaufs zulassen (Hou et al., 2010; Nakamura et al., 2003). Die in diesen Studien für die Expressionsanalyse verwendeten RNAs wurden aus dem Gesamttumor isoliert. Daher ist unklar, wie hoch der Anteil von RNA aus Tumorzellen und wie hoch der Anteil aus Zellen des Stromas ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Gruppe, der in CAFs und NAFs der Lunge differenziell exprimierten Gene eine prognostische Aussage hinsichtlich des Überlebens zulässt. Die Analyse wurde in einem Kollektiv von 342 Adenokarzinomen der Lunge durchgeführt, bei dem Informationen zur Expression von 46 der 60 differenziell exprimierten Gene zur Verfügung standen. Für die univariate Überlebensanalyse wurden die Fälle anhand der Expression der 46 untersuchten Gene in 3 ungefähr gleich große Gruppen eingeteilt, die eine NAF-ähnliche, eine CAF-ähnliche bzw. eine intermediäre Expression der 46 Gene zeigen. Patienten, die eine NAF-ähnliche Expression in ihren Tumoren aufweisen, haben eine signifikant bessere Prognose als Patienten, die eine CAF-ähnliche Expression bzw. eine intermediäre Expression aufweisen. Dass es sich bei der Gruppe der differenziell exprimierten Gene, um ein prognostisches Genset handelt, steht in Einklang mit den Ergebnissen einer weiteren NSCLC-Studie (Navab et al., 2011). Interessanterweise ist es somit die Expression von Genen, welche differenziell im nicht-malignen Anteil des Tumors exprimiert werden, die ausreichend sind, um Prognosen hinsichtlich des Krankheitsverlaufes zuzulassen.

Zwischen den Patienten, die eine CAF-ähnliche und eine intermediäre Expression zeigen, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, weshalb die beiden Patientengruppen in der anschließenden Analyse zu einer Gruppe zusammengefasst wurden. In der multivariaten Analyse war das Expressionsmuster kein unabhängiger prognostischer Faktor. Als unabhängige Faktoren ergaben sich die bekannten prognostischen Faktoren Nodalstatus und Tumorstatus. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Tumorzell-abhängige Expression von Genen in Zellen des Stromas, wobei es in späteren Stadien zu einer eher CAF-ähnlichen Expression kommt.

4.2 Validierung des Gewebekulturmodells und Vergleich mit anderen Modellen

Der Einfluss des Tumorstromas auf das Ansprechen einer Therapie unter möglichst *in vivo*-nahen Bedingungen ist nur schwer zu bestimmen. Die aussagekräftigsten Ergebnisse wären durch die systematische Untersuchung des Tumors im Patienten zu erwarten. Da es aufgrund des Patientenwohls jedoch unmöglich ist, zu beliebigen Zeitpunkten während der Therapie Biopsien für spätere Untersuchungen zu entnehmen, wurden zahlreiche Systeme entwickelt, welche die komplexe Situation *in vivo* mehr oder weniger widerspiegeln. Sie alle besitzen ihre Vor- und Nachteile, was Durchführbarkeit, Kosten, Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der Ergebnisse betrifft.

Eine Möglichkeit das Verhalten von Tumoren unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen zu untersuchen, bietet das bei dieser Arbeit verwendete Modell der Gewebekultur. Die Methode, die im Haus zuvor bereits für das Mammakarzinom (van der Kuip et al., 2006) und das Bronchialkarzinom (Sonnenberg et al. 2008) etabliert wurde, ermöglicht es, das Ansprechen der Tumorzellen und Teilen des Stromas auf eine Behandlung zu untersuchen. Inwieweit dieses Modell die Situation *in vivo* widerspiegelt, wurde durch den Vergleich des kultivierten Gewebes mit dem entsprechenden Patientengewebe aus der diagnostischen Routine überprüft. Die 96-stündige Kultur führt zu keinen offensichtlichen Veränderungen der kultivierten Gewebes hinsichtlich der Morphologie und der Proliferation. Der Anteil Ki67-positiver Tumorzellen war dabei vergleichbar mit dem Anteil proliferierender Tumorzellen, wie er in der Literatur für NSCLCs angegeben wird (Vesselle et al., 2008). Mit Hilfe einer immunhistochemischen p53-Färbung wurde ausgeschlossen, dass es bereits durch die Kultur des Gewebes zu einer stress-bedingten Akkumulation des p53-Proteins in den Tumorzellen des Gewebes kommt. Beim Vergleich von Patientenmaterial aus der diagnostischen Routine mit Gewebekulturmaterial derselben Patienten zeigte sich eine signifikante Korrelation des Anteils p53-positiver Tumorzellen. Die dabei festgestellte hohe Variabilität im Anteil p53-positiver Tumorzellen stimmt mit der von Marchetti in einem anderen NSCLC-Kollektiv gemachten Beobachtung überein (Marchetti et al., 1993). Die Kultur scheint sich somit nicht negativ auf das Wachstum des Tumors auszuwirken, weshalb das Modell die Untersuchung

des Einflusses verschiedener Therapeutika auf die Zellen eines Tumors in ihrem natürlichen Zellverband zulässt. Die Nachteile des Systems liegen in der fehlenden Wiederholbarkeit der Experimente mit demselben Gewebe, die sich aus dem Ursprung des primären Materials ergeben und der begrenzten Menge an Probenmaterial, was z.B. eine transkriptionelle Analyse erschwert.

Der komplexen Architektur primärer Bronchialkarzinome und dem daraus resultierenden Verhalten der Tumorzellen wird im für diese Arbeit verwendeten Gewebekulturmodell im Vergleich zu anderen Modellen am meisten Rechnung getragen. Lediglich Xenografts stellen unter Umständen einen Weg dar, auf ähnliche Weise die Struktur des Tumors *in vivo* widerzugeben (Übersicht in Hoffman, 1999). Der entscheidende Vorteil des Gewebekulturmodells gegenüber Xenografts liegt jedoch im interindividuell sehr heterogenen Proliferationsverhalten der Tumorzellen in der Gewebekultur, was, wie gezeigt werden konnte, der Situation in NSCLC-Kollektiven entspricht. Xenografts weisen hingegen aufgrund ihres schnellen Wachstums eine Proliferationsrate auf, die höher ist als diejenige, die in den entsprechenden Tumoren *in vivo* zu beobachten ist (Parkins et al., 1991). Dies ist von großer Bedeutung, will man die Reaktion der Zellen auf Chemotherapeutika wie z.B. Cisplatin untersuchen, dessen Wirkung zum Teil auf der Inhibition der DNA-Replikation beruht (Jamieson und Lippard, 1999).

Die kurze Kulturdauer verhindert im Gewebekulturmodell die Untersuchung einer längeren Behandlung, wie sie zum Beispiel im Mausmodell möglich ist. Die Vorteile des Systems, nämlich die mögliche Untersuchung diverser Zelltypen und ihrer Interaktion unter Bedingungen, die im Vergleich zu anderen Modellen, die Situation *in vivo* am besten wiedergeben, überwiegen jedoch die zuvor genannten Nachteile bei weitem.

4.3 Einfluss des EGFR-Inhibitors Erlotinib im Gewebekulturmodell

Zunächst wurde der Einfluß einer 72-stündigen Erlotinib-Behandlung auf die Proliferation der Tumorzellen im Gewebekulturmodell untersucht. Dabei wurde überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen einem Ansprechen auf die Therapie und verschiedenen Markern wie EGFR-Überexpression und *EGFR*- und *KRAS*-Mutationsstatus gibt. Bei

immunhistochemischen EGFR-Färbungen an unbehandeltem Gewebekulturmaterial bzw. Routinematerial der Pathologie stellte sich heraus, dass 11 der 37 untersuchten Fälle eine membranöse Expression zeigen, wobei es zu Unterschieden innerhalb desselben Tumors kommt, was in Einklang mit der in der Literatur beschriebenen heterogenen EGFR-Proteinexpression innerhalb eines Tumors steht (Eberhard et al., 2008). Dies entspricht einem Anteil von 30% immunhistochemisch positiven Tumoren, was dem Anteil eines von Suzuki beschriebenen NSCLC-Kollektivs (34%) ungefähr entspricht (Suzuki et al., 2005). Jedoch muss angefügt werden, dass der Anteil positiver Zellen stark zwischen den untersuchten NSCLC-Kollektiven schwankt und in einem Übersichtsartikel mit 40-80% angegeben wird (Zhang und Chang, 2006). Mögliche Gründe für die hohen Unterschiede sind zum einen in der Zusammensetzung der einzelnen Kollektive zu sehen, zum anderen im Fehlen einer einheitlichen Vorgehensweise bei der Bewertung des immunhistochemisch bestimmten Expressionslevels. Bei insgesamt 3 der 28 sequenzierten Fälle ließ sich eine Mutation in *EGFR* nachweisen. Dies entspricht dem in der Literatur angegebenen Prozentsatz von 5-13% (Zhang und Chang, 2006). Drei Fälle wiesen eine Deletion in Exon 19, die häufigsten Mutation im Gen, die in 44% aller mutierten Fälle vorzufinden ist (Wilson und Danson, 2010). Die Tatsache, dass es sich bei 2 der 3 Fälle mit Mutation um Adenokarzinome handelt, stimmt mit der Beobachtung überein, dass es sich beim Adenokarzinom um denjenigen histologischen Subtyp handelt, bei dem am häufigsten Mutationen im *EGFR*-Gen vorzufinden sind (Mitsudomi und Yatabe, 2005). Bei 4 von 24 Fällen konnte eine Mutation in *KRAS* festgestellt werden, was 17% und damit ungefähr dem in der Literatur angegebenen Wert von 20-30% entspricht (Zhang und Chang, 2006). Es konnten keine Mutationen im *KRAS*-Gen bei Patienten mit einer *EGFR*-Mutation festgestellt werden, was zu erwarten war, da die beiden Mutationen sich gegenseitig ausschließen (Pao et al., 2005; Gaughan und Costa, 2011). Der Grund wird in der Tatsache gesehen, dass *KRAS* seine Aufgabe nachgeschaltet von *EGFR* im selben Signalweg ausführt und daher eine Mutation in beiden Genen funktionell redundant wäre und für die Zelle keinen Selektionsvorteil darstellt (Suzuki et al., 2006). Zu 20 Fällen des untersuchten Kollektivs lagen Informationen zum immunhistochemischen Status von *EGFR*, sowie dem Mutationsstaus von *EGFR* und *KRAS* vor. In diesen Fällen wurde mit Hilfe einer Ki67-Färbung überprüft, ob es durch die Inkubation mit Erlotinib in Abhängigkeit von

einem der untersuchten Faktoren zu einer Verringerung des Anteils proliferierender Zellen kommt. Dazu wurden die Fälle zunächst anhand der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung bzw. Sequenzierung in Gruppen eingeteilt und die Erlotinib-bedingte Veränderung in der Proliferation bestimmt. Am Median des Gesamtkollektivs bzw. der einzelnen Gruppen ist zu erkennen, dass Erlotinib jedoch zu keiner Reduktion der Proliferation führte bzw. keiner der untersuchten Faktoren mit einer Reduktion der Proliferation in Zusammenhang steht. Die Überexpression des EGFR hat im untersuchten Kollektiv keinen Einfluss auf das Ansprechen der Therapie. Ein solcher Zusammenhang zwischen der Wirkung niedermolekularer Inhibitoren von EGFR und der Expression des Rezeptors wird in verschiedenen Studien kontrovers diskutiert (Übersicht in Eberhard et al., 2008). Bei den *EGFR*-mutierten Fällen wäre ein Ansprechen auf die Behandlung zu erwarten gewesen, da 70% der Patienten mit einer Mutation in diesem Gen auf eine Behandlung mit niedermolekularen EGFR-Inhibitoren ansprechen, hingegen nur 10% der wildtypischen Patienten (Mitsudomi und Yatabe, 2007). Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass nicht alle Mutationen gleichermaßen zu einer Sensitivität gegenüber TKIs führen. So gibt es einerseits eine Studie, die für die gefundenen Exon 19-Deletionen eine Sensitivität gegenüber Erlotinib beschreibt, die vergleichbar mit der Sensitivität wildtypischer Tumorzellen ist (Ji et al., 2006). Eine andere Studien hingegen zeigt, dass Exon-19 Deletionen zu einem besseren Ansprechen der Tumore führen als Punktmutationen (Politi et al., 2006). In der Studie von Politi werden den Mutationen in *EGFR* ein antiapoptotischer Effekt und Proliferationsstimulus zugeschrieben. Daher kommt es im Mausmodell durch die Behandlung *EGFR*-mutierter Mäuse mit Erlotinib zu einer Verkleinerung des Tumors durch die Induktion von Apoptose und einer verringerten Proliferationsrate der Tumorzellen (Ji et al., 2006). Da jedoch der Anteil proliferierender Tumorzellen in der Kontrolle aller 3 Fälle mit *EGFR*-Mutation bereits unter 20% lag, war keine deutliche Reduktion durch Erlotinib möglich. Die Tatsache, dass der Anteil proliferierender Zellen in den mutierten Tumoren geringer ist als in den meisten wildtypischen Tumoren des Kollektivs stimmt mit der von Zhang et al. gemachten Beobachtung überein, dass *EGFR* mutierte Bronchialkarzinom-Zelllinien eine niedrigere Proliferation aufweisen als wildtypische (Zhang et al., 2006). Im Falle der *KRAS* mutierten Fälle konnte ebenfalls kein Ansprechen auf die Therapie festgestellt werden, was mit der

Beobachtung übereinstimmt, dass Mutationen in *KRAS* zu einer Resistenz gegenüber der Behandlung mit niedermolekularen Tyrosinkinaseinhibitoren führen (Pao et al., 2005). In der Literatur findet sich eine Studie über *EGFR*-mutierte Bronchialkarzinomzelllinien, die eine Aktivierung von Signalwegen, die zur Proliferation führen, in Frage stellt. Sie konnten lediglich eine Aktivierung antiapoptotischer Signalwege nachweisen (Sordella et al., 2004). Sollte diese Beobachtung der Situation *in vivo* entsprechen, dann wäre eine Reduktion der Tumormasse, die man bei der Behandlung mit Erlotinib im Patienten sieht, lediglich auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen. TUNEL-Färbungen an den Erlotinib-behandelten Tumorstücken aus der Gewebekultur könnten Klarheit schaffen, ob es durch die Behandlung zur Apoptose kommt, nachdem keine Reduktion in der Proliferation festgestellt werden konnte.

Dass die Behandlung mit Erlotinib im untersuchten Kollektiv keinen deutlichen Effekt hatte, spiegelt die Situation in der Klinik wider. Hier kommt es nur in einem geringen Teil der Patienten zu einem Ansprechen auf eine Behandlung mit Erlotinib, vorzugsweise in jenen, welche eine Mutation im Gen aufweisen (Mitsudomi und Yatabe, 2007).

4.4 Reaktion von Gewebeschnitten bronchialer Karzinome auf Cisplatin

Das Gewebekulturmodell wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich verwendet, um die Reaktion nicht nur der Tumorzellen, sondern auch der sie umgebenden CAFs auf herkömmliche Chemotherapie innerhalb ihrer individuellen und ursprünglichen Mikroumgebung zu untersuchen. Als Chemotherapeutikum wurde Cisplatin gewählt, welches zur Schädigung der DNA führt und so einen Proliferationsstopp bzw. Apoptose in den Zellen induziert (Jamieson und Lippard, 1999). Die Schäden an der DNA führen dabei zur Aktivierung der ATM-Chk2- bzw. ATR-Chk1-Signalwege, was wiederum die Phosphorylierung von p53 und MDM2 an definierten Aminosäuren bewirkt und so eine Interaktion der beiden Proteine verhindert (Junttila, 2009; Moll, 2003). Dadurch kommt es zur Akkumulation von p53, weshalb die immunhistochemisch feststellbare p53-Akkumulation als ein Readout für die Wirksamkeit von Cisplatin verwendet wurde. Insgesamt betrug im untersuchten Kollektiv der Anteil von Tumoren mit Mutation in *TP53* 56%, was in etwa dem

bekanntem Anteil *TP53* mutanter NSCLCs von ungefähr 50% entspricht (Toyooka et al., 2003).

Die Folgen einer *TP53*-Mutation für die Sensitivität eines Tumors gegenüber Cisplatin werden kontrovers diskutiert und so gibt es Hinweise aus Zellkulturexperimenten, dass eine Mutation mit einer erhöhten Resistenz in Verbindung steht (Eliopoulos et al., 1995), andere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass Mutation den Tumor sensitiver gegenüber Cisplatin machen (Fan et al., 1995). Während p53 im Fokus unzähliger an Zelllinien durchgeführter Studien steht (Übersicht in Levine und Oren, 2009), gibt es keine Studien welche die p53-Reaktion primärer Tumore *ex vivo* beschreiben. Die Gewebekultur ermöglicht eine Untersuchung der Tumorzellen in ihrer natürlichen Mikroumgebung. Somit lässt sich feststellen, ob sich die im vereinfachten System der Zellkultur gemachten Beobachtungen hinsichtlich der p53-Reaktion im komplexen, *in vivo*-nahen System der Gewebekultur bestätigen lassen.

Die Fälle des untersuchten Kollektivs wurden nach der Behandlung mit Cisplatin anhand ihres p53-Akkumulationsverhaltens in 3 Gruppen eingeteilt. Fälle der Gruppe I zeigten im unbehandelten Zustand keinen bzw. nur einen geringen Anteil p53-positiver Tumorzellen und reagierten auf die Behandlung mit einer Akkumulation von p53. Die Fälle der Gruppe II und III zeigten hingegen keine p53-Akkumulation nach der Behandlung, wobei Fälle der Gruppe III konstitutiv immunhistochemisch negativ waren, die der Gruppe II konstitutiv einen Anteil p53-positiver Tumorzellen von mindestens 20% aufwiesen. Allgemein wird das Vorhandensein p53-positiver Tumorzellen mit Mutationen in *TP53* in Verbindung gebracht (Stewart, 2010). Dies stimmt mit den Fällen der Gruppe II überein, welche alle eine Mutation in *TP53* aufweisen und konstitutiv einen hohen Anteil p53-positiver Tumorzellen besitzen. Ein Grund für die Akkumulation von mutiertem p53 wird in der erhöhten Halbwertszeit des Proteins gesehen, die aus der verringerten Fähigkeit von MDM2 mutiertes p53 zu binden resultiert (Freed-Pastor und Prives, 2012; Brosh und Rotter, 2009). Durch die fehlende Interaktion mit MDM2 wird mutiertes p53 nicht polyubiquitiliert und dadurch nicht proteasomal abgebaut. Ob MDM2 tatsächlich nicht in der Lage ist mutiertes p53 zu binden, ist jedoch fraglich und andere Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass MDM2 den

proteasomalen Abbau von wildtypischem sowie mutiertem p53 vermitteln kann (Terzian et al., 2012). Im untersuchten Kollektiv finden sich 50% der Tumore mit mutiertem *TP53* in den Gruppen I und III und zeigen somit immunhistochemisch keine konstitutive Akkumulation des mutierten Proteins. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung von mehreren anderen Arbeitsgruppen, die zeigen, dass eine Mutation in *TP53* nicht zwangsläufig zur Akkumulation des mutierten Proteins führt (Carbone et al., 1994; Hashimoto et al., 1999; Kandioler-Eckersberger et al., 1999). Es wird davon ausgegangen, dass weitere Mutationen nötig sind, damit es zu einer Akkumulation des mutierten Proteins kommen kann, so z.B. im *MDM2*- oder *p16^{INK4a}*-Lokus (Terzian et al., 2012). Dass in der Gruppe I, die sich durch eine Akkumulation von p53 nach der Behandlung auszeichnet, auch Tumore mit mutiertem *TP53* sind, spricht dafür, dass es sich beim mutierten p53 ebenfalls um ein sehr instabiles Protein handelt, das erst in Folge von Zellstress akkumuliert. Dies stimmt mit der Beobachtung von Suh überein, dass wildtypisches und mutiertes p53 *in vivo* in Folge von zellulärem Stress stabilisiert werden kann (Suh et al., 2011). Als Ursache für die Stabilisierung von mutiertem p53 werden dieselben Mechanismen gesehen, die auch zur Stabilisierung von wildtypischem p53 führen (Suh et al., 2011).

Mehrere NSCLC-Studien, welche einen Zusammenhang zwischen der Chemosensitivität eines Tumors und seiner immunhistochemisch bestimmten p53-Expression untersuchten, kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen (Übersicht in Stewart, 2010). Jedoch ist festzuhalten, dass die meisten Studien darauf hindeuten, dass eine Überexpression von p53 mit einer Resistenz gegenüber platinhaltigen Therapeutika in Zusammenhang gebracht wird. Dieser Trend wurde auch bei einer Metaanalyse festgestellt, die mehr als 1000 NSCLC-Patienten umfasste (Wang² et al., 2008). Dieselbe Beobachtung wurde bei Tumoren der Gruppe II gemacht, die immunhistochemisch p53-positiv sind und nach der Behandlung mit Cisplatin keine Induktion des Zelltods zeigen. Demgegenüber zeigen 7 von 11 Tumoren der Gruppe I eine deutliche Induktion des Zelltods von mehr als 20%, wie anhand der TUNEL-Färbung festgestellt wurde. Dabei kommt es sowohl bei *TP53*-wildtypischen als auch bei *TP53*-mutanten Fällen zu einer deutlichen Zunahme im Anteil TUNEL-positiver Tumorzellen (4 von 6 bzw. 3 von 5 Tumoren). Als Erklärung für dieses Phänomen der Zelltodinduktion in Tumoren der Gruppe I kommen 2 unterschiedliche Ursachen in Frage. Zum einen könnte der

Anteil *TP53*-mutierter Tumorzellen im Routinematerial, das zur Isolierung der DNA verwendet wurde, vom Anteil der mutierten Tumorzellen in der entsprechenden Gewebekultur abweichen, wobei das Gewebekulturmateriale einen relativ geringen Anteil mutierter Zellen aufweist. Hierbei handelt es sich jedoch um die unwahrscheinlichere Erklärung, da in einer Studie gezeigt werden konnte, dass *TP53*-Mutationen relativ homogen auf den gesamten Lungentumor verteilt vorliegen, wohingegen der Anteil immunhistochemisch positiver Zellen im Falle von p53 in verschiedenen Tumorbereichen sehr heterogen ist (Ebina et al., 2001). Die weitaus wahrscheinlichere Erklärung für das beobachtete Phänomen ist eine p53-unabhängige Induktion von Zelltod, trotz einer Akkumulation des Proteins infolge der Behandlung (Gruppe I). Dass es in Tumorzellen zu einer p53-unabhängigen Induktion von Zelltod durch Cisplatin kommen kann, ist an den Tumoren der Gruppe III zu sehen. Diese sind im unbehandelten Zustand p53-negativ und reagieren auf die Behandlung mit Cisplatin mit einer teils deutlichen Induktion von Zelltod, wobei eine Akkumulation von p53 ausbleibt. Möglicherweise führen in Tumoren der Gruppe II dieselben Mechanismen zu einer erhöhten Resistenz der Tumorzellen gegenüber Cisplatin, die auch zu einer erhöhten p53-Halbwertszeit führen. Dabei kann es sich um gestörte intrazelluläre Signalwege handeln, die es der Zelle ermöglichen, mit einem dauerhaft erhöhten Stress umzugehen.

Interessanterweise zeigen sich trotz der hohen Variabilität in der Reaktion des Gewebes auf Cisplatin große Übereinstimmungen im Tumorzellkompartiment und den jeweiligen CAFs hinsichtlich der p53-Akkumulation und der Induktion von Zelltod durch Cisplatin. So kommt es ausschließlich bei CAFs von Tumoren der Gruppe I zu einer Akkumulation von p53. CAFs von Tumoren der Gruppen II und III, deren Tumorzellen keine Akkumulation zeigen, weisen hingegen ebenfalls keine p53-Akkumulation auf. Um zu überprüfen, ob es zu Unterschieden zwischen den Gruppen hinsichtlich der transkriptionellen Aktivität von akkumuliertem p53 kommt, wurden immunhistochemische p21-Färbungen durchgeführt. Beim für p21 kodierenden Gen *CDKN1A* handelt es sich um eines der Zielgene von p53 (Gartel, 2009). Wie schon bei der p53-Färbung beobachtet, kommt es nur in CAFs der Gruppe I, deren Tumorzellen p53 akkumulieren, zu einer Induktion der p21-Expression im CAF-Kompartiment. Somit scheint die Akkumulation von p53 als Reaktion auf die Behandlung des

Gewebes mit Cisplatin eine Voraussetzung für die Aktivierung von p53-Zielgenen zu sein. Ein ähnlich-koordiniertes Verhalten, welches bei der p53-Akkumulation zwischen Tumorzellen und CAFs festgestellt wurde, ist auch hinsichtlich der Induktion des Zelltodes zu beobachten. Hier kommt es ebenfalls nur in den CAFs, deren Tumorzellen infolge von Cisplatin den Zelltod induzieren, zu einer deutlichen Zunahme des Anteils TUNEL-positiver Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass es unter *in vivo*-Bedingungen im Falle eines Therapieansprechens nicht nur im Tumorzellkompartiment zu einer Induktion von Zelltod kommt, sondern auch in Teilen des Stromas. Für dieses Phänomen der koordinierten Reaktion zwischen Tumorzellen und CAFs sind die Tumorzellen entscheidend. Dies konnte durch die Kultur isolierter CAFs aus allen 3 Gruppen gezeigt werden, bei denen es nach der Behandlung mit Cisplatin zu einer Akkumulation von p53 kommt. Parallel zur Akkumulation von p53 wurde bei CAFs aller 3 Gruppen eine Induktion von p21 festgestellt.

Es ist davon auszugehen, dass die fehlende p53-Akkumulation im CAF-Kompartiment der Gruppen II und III für den Tumor einen Vorteil darstellt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen mit einem p53-null Hintergrund im Stroma eine höhere Proliferationsrate aufweisen, als Tumorzellen in p53-wildtypischen Mäusen (Kiaris et al., 2005). Tatsächlich konnte in einem weiteren Mausmodell gezeigt werden, dass es während der Tumorprogression zu einem Verlust der Expression wildtypischen p53 in CAFs kommt (Hill et al., 2005). Ein möglicher Grund für die fehlende Expression von p53 im Stromakompartiment stellen Missense-Mutationen in *TP53* dar, die mit Hilfe von Paraffinmaterial nachgewiesen werden konnten (Patocs et al., 2007; Wernert et al., 2000). Studien, die mit Hilfe frischen bzw. kryokonserviertem Tumormaterials durchgeführt wurden, konnten jedoch das Vorhandensein dieser Mutationen im Stroma nicht verifizieren (Sonnenberg et al., 2008; Bar et al., 2009). Die Beobachtung, dass Tumorzellen die p53-Akkumulation in CAFs als Folge genotoxischen Stresses unterdrücken können, wurde bereits in Zellkulturexperimenten mit konditioniertem Medium gemacht, wobei die entscheidenden sekretierten Faktoren im Medium allerdings nicht identifiziert werden konnten (Bar et al., 2009).

Da das p53-Akkumulationsverhalten der CAFs von der Gegenwart ihrer Tumorzellen abhängt, können Mutationen als Grund für die fehlende p53-Akkumulation in CAFs ausgeschlossen werden und es ist anzunehmen, dass es die Tumorzellen der Gruppen II und III sind, welche die p53-Akkumulation in den benachbarten CAFs unterdrücken. Dass es im intakten Gewebe zu einer solchen Interaktion kommt, wurde zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit beschrieben. Interessanterweise ist das Akkumulationsverhalten dabei abhängig vom Akkumulationsverhalten ihrer entsprechenden Tumorzellen, deren *TP53*-Mutationsstatus keine Rolle zu spielen scheint. Eine mögliche Konsequenz der koordinierten p53-Antwort in Tumorzellen und ihren CAFs ist eine tendenziell höhere Resistenz gegenüber Cisplatin, wie sie bei den Tumoren der Gruppe II und III zu sehen ist (Anhang).

Bei der Kultur von Gewebeschnitten primärer bronchialer Karzinome handelt es sich, wie anhand der zuvor genannten Ergebnisse belegt wird, um ein geeignetes System, um im intakten Gewebe die Reaktion von Tumorzellen und Teilen des Stromas auf die Behandlung mit Therapeutika wie Cisplatin zu untersuchen. Wie sich herausstellte, kommt es im Tumor- und CAF-Kompartiment infolge der Behandlung mit Cisplatin zu einer koordinierten p53-Antwort. Versuche mit isolierten CAFs derselben Patienten zeigten, dass sich die p53-Akkumulation isolierter CAFs dabei deutlich von der Akkumulation derselben CAFs im Gewebe unterscheidet, was auf das Fehlen der Tumorzellen zurückgeführt werden kann und auf eine Kommunikation dieser Zelltypen im Tumor schließen lässt. Daraus lässt sich ableiten, dass das Verhalten der Zellen im Gewebe sich deutlich von ihrem Verhalten im isolierten Zustand unterscheidet, weshalb möglichst *in vivo* nahe Systeme benötigt werden, um zu verstehen, was im Tumor eines Patienten als Reaktion auf eine Behandlung geschieht.

4.5 Tumor-assoziierte Fibroblasten als Angriffspunkt einer gezielten Therapie

Wie bereits beschrieben stimulieren CAFs im Tumor wichtige Prozesse wie die Invasion umliegender Gewebe, die Angiogenese, die Metastasierung, die Chemoresistenz, die Tumorzellproliferation und die Infiltration des Tumors durch Zellen des Immunsystems, mit der daraus resultierenden Entstehung eines inflammatorischen Milieus (Cirri und Chiarugi, 2012; Roy et al., 2009; Kalluri und Zeisberg, 2006; Schauer et al., 2011; Worthley et al.,

2010; Xing et al., 2011). Daher wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Proliferation von CAFs gezielt zu hemmen und dadurch ihren stimulierenden Einfluss auf das Tumorwachstum zu reduzieren. Da seit Längerem bekannt ist, dass der stimulierende Einfluss von CAFs von der Aktivität zahlreicher Faktoren wie TGF- β und PDGF und den damit verbundenen Signalwegen abhängig ist (Micke und Ostman, 2005), wurde versucht CAFs durch die pharmakologische Hemmung von Kinasen, welche eine zentrale Rolle in verschiedenen Signalwegen spielen, zu inhibieren. Hierzu wurde der Einfluss von 160 niedermolekularen Kinaseinhibitoren auf die Proliferation und die mitochondriale Aktivität von 2 CAF-Linien untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass zu den wirkungsvollsten Substanzen Inhibitoren des „Platelet Derived Growth Factor“-Rezeptors (PDGFR) gehören, die bereits im nanomolaren Bereich zu einer Hemmung der Proliferation bzw. mitochondrialen Aktivität von mehr als 50% führen. Daraus lässt sich ableiten, dass der PDGFR-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Regulation der CAF-Proliferation spielt, was zusätzlich durch die Beobachtung unterstützt wird, dass PDGF eine zentrale Rolle bei der desmoplastischen Reaktion spielt (Shao et al., 2000). Zusätzlich ist bereits seit längerem bekannt, dass CAFs häufig PDGFR auf ihrer Zellmembran exprimieren und die Expression des aktivierten Rezeptors mit der Metastasierung des Kolonkarzinoms in Verbindung gebracht wird (Kitadai et al., 2006). Bei PDGF handelt es sich um einen sekretierten Faktor, der normalerweise als Folge einer Verletzung freigesetzt wird und zur Aktivierung von Fibroblasten führt (Kalluri und Zeisberg, 2006). In Tumoren wird PDGF von Tumorzellen und von CAFs selbst sekretiert (Kalluri und Zeisberg, 2006). Das von CAFs sekretierte PDGF wirkt somit autokrin auf die sezernierenden Zellen und fördert so möglicherweise deren Proliferation. Wie wichtig der PDGFR-Signalweg für CAFs ist, wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass selbst bei hohen Serumkonzentrationen, wie sie in den Zellkulturexperimenten in der Regel eingesetzt werden und der daraus resultierenden Aktivierung zahlreicher Signalwege, alleine die Hemmung des PDGFR-Signalweges zu einer dramatischen Reduktion der Proliferation und Aktivität führt. Daher wurde im Anschluss an das Screening die Wirkung von 4 von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassenen PDGFR-Inhibitoren auf die Proliferation von bis zu 37 CAF-Linien hin untersucht. Einer der Inhibitoren war Imatinib, ein niedermolekularer Inhibitor, der nachweislich die Proliferation von CAFs in Mammakarzinomen hemmt (Gioni

et al., 2008). Nilotinib und Dasatinib, die ebenfalls PDGFR hemmen, sind 2 niedermolekulare Inhibitoren, die für die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie zugelassen sind (Kantarjian et al., 2006; Talpaz et al., 2006). Schließlich wurde noch Sorafenib untersucht, das seit 2005 von der FDA für die Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen ist und ebenfalls PDGFR neben einer Reihe weiterer Kinasen hemmt (Wilhelm et al., 2006). Es zeigte sich, dass Dasatinib gefolgt von Imatinib, Nilotinib und Sorafenib zur stärksten Hemmung der Proliferation bzw. Aktivität im MTT-Assay führt. Auch bei der Untersuchung klinisch relevanter Konzentrationen stellte sich heraus, dass Dasatinib der potenteste aller 4 untersuchten PDGFR-Inhibitoren ist. Erlotinib, ein EGFR-Inhibitor, der in Kontrollexperimenten verwendet wurde, zeigte in klinisch relevanter Konzentration eingesetzt hingegen keinen Effekt. Der Effekt jedes einzelnen der getesteten Inhibitoren ist dabei in den untersuchten CAF-Linien durchaus variabel, was die interindividuellen Unterschiede zwischen den jeweiligen Patienten widerspiegelt. Dass die verschiedenen Inhibitoren bei klinisch relevanten Konzentrationen einen unterschiedlich starken Effekt im MTT-Assay besitzen, hängt möglicherweise mit dem unterschiedlichen Set an Kinasen zusammen, das neben PDGFR durch die jeweiligen Inhibitoren gehemmt wird. Dasatinib hemmt dabei das breiteste Spektrum an Kinasen, was einen möglichen Grund für die stärkste Hemmung der CAFs durch Dasatinib im MTT-Assay darstellt (Wilhelm et al., 2006; Hantschel et al., 2008). Zu den Kinasen, die durch Dasatinib gehemmt werden, gehören unter anderem Src-Kinasen, TEC-Kinasen, MAP-Kinasen und eine Reihe weiterer Kinasen (Hantschel et al., 2008). Bei der Zellzyklusanalyse am FACS zeigte sich, dass Dasatinib in CAFs aus Bronchialkarzinomen zu einer Hemmung der Proliferation führt. Ein hemmender Effekt von Dasatinib auf die Proliferation von CAFs wurde auch schon bei CAFs aus Mammakarzinomen beschrieben (Gioni et al., 2008). Der Dasatinib-vermittelte Proliferations-Stopp in CAFs steht weder mit Apoptose in Verbindung, noch war Seneszenz die Ursache, was von großer Bedeutung ist, da Seneszenz in Tumor-Fibroblasten zur Sekretion löslicher Faktoren führt, welche ein inflammatorisches Milieu schaffen und so das Tumorstadium stimulieren (Shan et al., 2010). Schließlich ergaben weitere Zellzyklusanalysen, dass es sich beim Dasatinib-vermittelten Proliferations-Stopp um ein reversibles Ereignis handelt und die Zellen bereits wenige Stunden nach dem Entzug von

Dasatinib die Proliferation wieder aufnehmen (Haubeiss et al., 2010). All diese Ergebnisse belegen, dass es sich bei Dasatinib um eine äußerst wirkungsvolle Substanz handelt, was die Hemmung der Proliferation von CAFs aus der Lunge betrifft. Somit würde sich dieser Inhibitor durchaus für die Behandlung von Lungenkarzinomen, vor allem in Kombination mit einer herkömmlichen Therapie, anbieten. Ob Dasatinib jedoch dazu in der Lage ist, über die Blutbahn einen Lungentumor als Zielgewebe zu erreichen, musste zunächst geklärt werden.

Bei der Perfusion des isolierten Lungenlappens eines Bronchialkarzinompatienten zeigte sich, dass Dasatinib sich deutlich im normalen Lungengewebe anreicherte, während seine Konzentration im Puffer während der Perfusion kontinuierlich abnimmt. Auch in der Wachstumszone des Tumors war nach Abschluss der Perfusion Dasatinib in einer Konzentration nachweisbar, die bei 37 CAF-Linien zu einer Hemmung der CAF-Proliferation führt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Dasatinib unter *in vivo* Bedingungen tatsächlich in ausreichender Menge sein Zielgewebe über die Blutbahn erreichen kann. Einen möglichen Grund für die niedrigere Konzentration von Dasatinib im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Lungengewebe stellt der erhöhte interstitielle Druck (ISD) in soliden Tumoren dar, der eine Aufnahme von Therapeutika ins Gewebe erschwert (Fukumura und Jain, 2007).

Um die molekularen Auswirkungen der Dasatinib-Behandlung auf das Transkriptom von CAFs aus der Lunge zu untersuchen, wurden Expressionsarrays durchgeführt. Dabei war festzustellen, dass ein großer Teil der Gene, die differenziell exprimiert werden mit dem Zellzyklus in Zusammenhang stehen. Dies war zu erwarten, nachdem aus den vorangegangenen Experimenten bekannt war, dass es sich bei Dasatinib um einen sehr potenten Inhibitor der CAF-Proliferation handelt. Unter den übrigen 388 Genen befanden sich Gene, die für Proteine kodieren, welche die DNA-Integrität kontrollieren bzw. Rezeptoren, Komponenten der EZM und Zell-Adhäsionsmoleküle darstellen (Haubeiss et al., 2010). Beim Vergleich der durch Dasatinib differenziell regulierten Gene mit einem Set von Genen, welches differenziell zwischen normalen Fibroblasten der Brust und CAFs von Mammakarzinomen exprimiert wurde, ergaben sich signifikante Überschneidungen zwischen den beiden Gengruppen. Da die Zahl der in beiden Gengruppen gleichermaßen regulierten

Gene (90) deutlich über der Zahl liegt, die rein statistisch zu erwarten gewesen wäre (12), lässt sich mutmaßen, dass Dasatinib in CAFs zu einem Phänotyp führt, der dem normaler Fibroblasten ähnelt. Interessanterweise ergab sich beim Vergleich der Dasatinib-regulierten Gene mit einem Genset, welches differenziell zwischen ruhenden und aktivierten Fibroblasten exprimiert wird eine signifikante Übereinstimmung, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass Dasatinib in CAFs zur Quieszenz führt (Haubeiss et al., 2010).

Dass die Dasatinib-bedingten Veränderungen in CAFs einen Effekt auf Tumorzellen haben, wurde mit Hilfe von Experimenten mit Zellkulturüberständen bestätigt. Die Inkubation der Bronchialkarzinom-Zelllinie H1299 mit konditioniertem Medium von CAFs führte dabei zu einem Anstieg des Anteils proliferierender Zellen. Demgegenüber führte die Inkubation derselben Tumorzelllinie mit konditioniertem Medium von Dasatinib behandelten CAFs zu einer deutlichen Reduktion im Anteil proliferierender Zellen. Dabei handelt es sich nicht um einen direkten Effekt, des im konditionierten Medium enthaltenen Dasatinib auf die Tumorzellen, was durch die Inkubation der Tumorzellen mit konditioniertem Medium, dem nachträglich Dasatinib zugesetzt wurde, gezeigt wurde. Die dabei festgestellte Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle war deutlich geringer als beim konditionierten Medium der Dasatinib behandelten CAFs. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Dasatinib in CAFs zu einem Phänotyp führt, der dem normaler Fibroblasten zumindest ähnelt, von denen bekannt ist, dass sie nicht den stimulierenden Einfluss von CAFs auf das Tumorwachstum besitzen (Orimo et al., 2005). Dies macht Dasatinib zu einer äußerst attraktiven Substanz für die Behandlung bronchialer Karzinome, wobei die Effekte einer Kombinationsbehandlung mit herkömmlicher Chemotherapie noch untersucht werden müssen.

Um die von Dasatinib-behandelten CAFs sekretierten Faktoren zu identifizieren, welche zu einer Abnahme der Tumorzellproliferation führen, wurde das konditionierte Medium auf das Vorhandensein von über 100 Faktoren untersucht. Dabei handelte es sich Großteils um Wachstumsfaktoren, Chemokine und diverse andere Zytokine. Es stellte sich heraus, dass Dasatinib in allen 3 untersuchten CAFs zu einem Anstieg der Sekretion von 3 löslichen Faktoren führt. Bei den 3 Faktoren, deren Sekretion gesteigert wurde, handelt es sich um den

„Hepatocyte Growth Factor“ (HGF), „Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1“ (IGFBP 1) und „Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2“ (IGFBP2). Allgemein ist die Überexpression von HGF bzw. seines Rezeptors im Falle des NSCLC mit einer schlechten Prognose verbunden (Siegfried et al., 1997; Ichimura et al., 1996). In wie weit die Dasatinib-vermittelte Zunahme der HGF-Sekretion durch CAFs jedoch zu einem negativen Verlauf führt ist fraglich, da Prozesse wie die Migration und Transformation infolge der HGF/Met-Aktivierung von der Aktivität der SRC-Kinase abhängt (Furge et al., 2000) und es sich bei der SRC-Kinase um eine der Kinasen handelt, die durch Dasatinib gehemmt wird (Hantschel et al., 2008). Der „Insulin-like Growth Factor“ (IGF)-Signalweg, zu dem auch die beiden Proteine IGFBP1 und 2 gehören, stellt einen wichtigen Regulator der Proliferation, Differenzierung und Apoptose dar (Jerome et al., 2003). Wie aus einer Studie einer Kolonkarzinomlinie bekannt ist, kommt es dabei durch die Bindung von IGF an seinen Rezeptor zu einer Stimulation des Wachstums und einer Hemmung der Apoptose (Wolpin et al., 2009). Im Falle des NSCLC kommt es häufig zur Überexpression des „Type I Insulin-like Growth Factor Receptor“ (IGF-IR), welcher die Proliferation von Bronchialkarzinomzelllinien vermittelt (Gualberto et al., 2011). Parallel kommt es in beinahe allen NSCLC-Linien zur Expression der Liganden IGF I und/oder IGF II (Reeve et al., 1993). Jedoch wird die Aktivität des IGF-Signalwegs nicht allein durch das Vorhandensein des Liganden und seines Rezeptors vermittelt, sondern zusätzlich durch die IGFBPs 1-6 reguliert, die alle eine höhere Affinität als IGFR für die IGFs besitzen und mit IGFR um die Bindung konkurrieren (Jerome et al., 2003). Für das NSCLC ist bekannt, dass solubles IGFBP2 die Bindung von IGFs an seinen Rezeptor verhindert und so die DNA-Synthese hemmt (Reeve et al., 1993). Eine ähnliche Rolle konnte für IGFBP1 im Falle kolorektaler Karzinomlinien gezeigt werden, bei denen IGFBP1 das Wachstum und die Migration hemmt (Wolpin et al., 2009). Eine mögliche Ursache für den geringeren Anteil proliferierender Tumorzelllinien, der bei der Inkubation mit konditioniertem Medium Dasatinib behandelte CAFs zu sehen ist, stellt somit die erhöhte Sekretion von IGFBP1 und 2 dar, welche mit IGF um die Bindung an den IGFR konkurrieren. Dadurch käme es zu der Hemmung der IGFR-abhängigen Proliferation, wie sie bei diesem Ansatz zu sehen ist. Ob CAFs die Proliferation der Tumorzellen durch die Aktivierung des

IGFR-Signalweges stimulieren, muss durch die Inhibition des Signalweges durch Substanzen wie den IGFR-Inhibitor Figitumumab geklärt werden.

4.6 Fazit und Ausblick

Beim Vergleich von CAFs und NAFs der Lunge zeigten sich, trotz der anzunehmenden Aktivierung der NAFs durch Faktoren des Serums, deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen. Interessanterweise stellte sich dabei heraus, dass das Set an unterschiedlich regulierten Genen eine Prognose hinsichtlich des Verlaufs in einem 342 Patienten umfassenden NSCLC-Kollektiv zulässt. Vergleichbare Ergebnisse wurden parallel in einem anderen Kollektiv erzielt (Navab et al., 2011). In weiteren Arbeiten sollte das untersuchte Kollektiv von 9 Patienten erweitert werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Unterschiede *in vivo* verifiziert werden können. Dazu müssen die entsprechenden Zellen aus dem Gewebe mittels Mikrodissektion isoliert werden und die Expression, der beim zuvor gemachten Vergleich identifizierten Gene, im Anschluss mit Hilfe des Fluidigm-Systems analysiert werden. Dieses System stellt eine sehr sensitive Methode dar, die Expression einzelner Gene zu überprüfen und erlaubt daher die Expressionsanalyse mit einer relativ geringen Zellzahl durchzuführen. Weiterhin sollte überprüft werden, in wie weit der Tumor durch die Sekretion löslicher Faktoren die Fibroblasten im umliegenden Normalgewebe beeinflusst, welche für den Transkriptomvergleich zwischen CAFs und NAFs verwendet wurden. Dazu müssen Fibroblasten aus Normalgewebe, welches einen unterschiedlichen Abstand zum Tumor aufweist, isoliert werden, um sie anschließend mit genomweiten Arrays hinsichtlich ihrer Genexpression zu vergleichen.

Wie die Versuche im Gewebekulturmodell zeigen, kommt es im intakten Gewebe zu einer Kommunikation zwischen den CAFs und ihren Tumorzellen. Das Ergebnis ist eine koordinierte p53-Akkumulation in Tumorzellen und CAFs infolge einer Behandlung mit Cisplatin unter *in vivo*-nahen Bedingungen. Das Verhalten der untersuchten CAFs im Gewebe unterscheidet sich dabei dramatisch vom Verhalten derselben Zellen im isolierten Zustand. Dies deutet darauf hin, dass Tumorzellen die Reaktion ihrer Mikroumgebung auf Schäden in der DNA kontrollieren, um sich und ihr Stroma vor den Folgen der Chemotherapie zu schützen. Kokulturen von CAFs bzw. NAFs mit Tumorzellen unterschiedlichen *TP53*-Status

sollten ein geeignetes Modell darstellen, die solublen Faktoren bzw. den verantwortlichen Signalweg zu identifizieren. Dass soluble Faktoren bei dem beobachteten Effekt eine Rolle spielen, konnte bereits durch Überstände von *TP53*^{0/0}-Tumorzellen gezeigt werden (Bar et al., 2009).

Bei der Suche nach einer Substanz, mit der sich die tumorstimulierende Aktivität von CAFs gezielt hemmen lässt, wurde der PDGFR-Inhibitor Dasatinib identifiziert. Die Behandlung mit Dasatinib resultiert in den untersuchten CAFs in einem reversiblen Proliferationsstopp und einer Sekretion solubler Faktoren, welche sich negativ auf die Proliferation der Lungenkarzinomzelllinie H1299 auswirkt. Die Identifikation der entscheidenden Faktoren ließe sich über den knock-out von Kandidatengen realisieren, die sich durch Transkriptomanalysen Dasatinib-behandelter CAFs identifizieren lassen. Dasatinib führte in CAFs zur NAF-ähnlichen Expression zahlreicher Gene, was durch den Vergleich mit einem Set an Genen gezeigt werden konnte, welches differenziell zwischen NAFs und CAFs exprimiert wird.

Möglicherweise stellt die Hemmung des CAF-Kompartiments im Gewebe durch Dasatinib einen Weg dar, den Einfluss des Stromas auf die Tumorzellen zu reduzieren. In Zellkulturexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass *TP53*^{0/0}-Tumorzellen die p53-Akkumulation in CAFs infolge einer Cisplatin-Behandlung deutlich besser inhibieren können als in NAFs (Bar et al., 2010). Sollte dies im Gewebe ebenfalls der Fall sein, so ließe sich die Tumorzell-bedingte Inhibition der p53-Akkumulation in CAFs, durch die Behandlung des Gewebes mit Dasatinib möglicherweise verhindern. Die Folge wäre eine erhöhte Sensitivität des Tumors gegenüber Cisplatin, wie sie bei Tumoren der Gruppe I zu sehen ist, die sich durch eine parallele Akkumulation von p53 in CAFs und Tumorzellen auszeichnet. Im Gewebekulturmodell ließe sich diese Frage durch eine Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und Dasatinib klären.

5. Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom ist diejenige Krebserkrankung, die weltweit die meisten Todesopfer fordert, was zum einen an der relativ hohen Häufigkeit der Erkrankung liegt zum anderen an der geringen Überlebensrate, die nach 5 Jahren bei lediglich 15% liegt. Als solider Tumor besteht das Bronchialkarzinom aus einem Tumorzellanteil und einem variablen Stromaanteil, welcher sowohl aus zellulären als auch aus nicht-zellulären Anteilen besteht. Das Tumorstroma beeinflusst dabei zahlreiche Prozesse, zu denen das Wachstum des Tumors, die Invasion umliegender Gewebe, die Metastasierung sowie die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen gehören. Dominiert wird der zelluläre Anteil des Stromas von den „Cancer-Associated Fibroblasts“, den CAFs, die durch die Sekretion löslicher Faktoren und die Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix, aktiv die Mikroumgebung des Tumors gestalten. Während die Unterschiede zwischen CAFs und normalen Fibroblasten (NAFs) der Brust im Fokus zahlreicher Studien standen, ist relativ wenig über diese Unterschiede bei den entsprechenden Fibroblasten der Lunge bekannt.

Ziel der Arbeit war es zunächst die molekularen Unterschiede zwischen CAFs und NAFs der Lunge zu identifizieren. Ein weiterer zentraler Aspekt der Arbeit war es, den Einfluss einer Therapie unter möglichst *in vivo*-nahen Bedingungen zu untersuchen. Hierfür wurde ein *ex vivo*-Modell validiert, welches die Kultur primären Tumorgewebes ermöglicht. Dabei sollte zunächst der Einfluss des EGFR-Inhibitors Erlotinib auf die Proliferation von Tumorzellen untersucht werden. Durch eine chemotherapeutische Behandlung des Gewebes, welche sich sowohl auf die Tumorzellen als auch auf die Zellen des Stromas auswirkt, wurde darüber hinaus überprüft, ob es im Gewebe zu einer koordinierten Antwort dieser beiden Zelltypen kommt. Aufgrund der wichtigen Rolle der CAFs in Tumoren wurde schließlich nach Möglichkeiten gesucht, CAFs in ihrer stimulatorischen Aktivität durch den Einsatz niedermolekularer Inhibitoren zu hemmen.

Der molekulare Vergleich von isolierten CAFs und den entsprechenden NAFs aus 9 Patienten mit primärem bronchialem Karzinom ergab, dass 60 Gene signifikant differenziell exprimiert werden. Da anzunehmen ist, dass es durch die Kulturbedingung zu einer Aktivierung der

NAFs kommt, ist es umso erstaunlicher, dass dennoch Unterschiede zwischen CAFs und NAFs festgestellt wurden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei CAFs nicht nur um aktivierte Fibroblasten handelt, wie sie in verletztem Gewebe vorzufinden sind, sondern vielmehr um einen eigenen Zelltyp, der lediglich Parallelen zu aktivierten Fibroblasten aufweist. Zu 46 der 60 so identifizierten Gene lagen Expressionsdaten in einem 342 Patienten umfassenden NSCLC-Kollektiv vor. Wie sich bei einer Überlebensanalyse zeigte, haben Patienten, welche eine NAF-ähnliche Expression der Gene in ihren Tumoren aufweisen, eine signifikant bessere Prognose als die übrigen Patienten des Kollektivs.

Ein zentrales Thema der vorliegenden Arbeit war es, die Reaktion von Zellen des Tumors auf Antitumor-Medikamente im intakten Gewebe zu untersuchen. Dafür wurde das im Haus bereits etablierte Modell der Gewebekultur verwendet, das zunächst validiert wurde. Dazu wurde Gewebe, welches direkt nach der Operation für die diagnostische Routine fixiert wurde mit Gewebe desselben Patienten, das für 4 Tage kultiviert wurde, verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und der biologischen Funktion festgestellt werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass sich die Kultur negativ auf die Gewebe auswirkt und man konnte davon ausgehen, dass das Modell die Situation *in vivo* in hohem Maße widerspiegelt. Daher stellt das System eine hervorragende Möglichkeit dar, die Folgen einer Therapie unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen zu untersuchen.

Bei der Erlotinib-Behandlung der kultivierten bronchialer Karzinome, die zunächst hinsichtlich ihrer EGFR-Expression bzw. ihres *EGFR*- und *KRAS*-Status charakterisiert wurden, zeigte sich keine Abnahme des Anteils proliferierender Tumorzellen durch den niedermolekularen EGFR-Inhibitor. Diese in der Gewebekultur gemachte Beobachtung spiegelt die Situation in der Klinik wieder, wo nur ein geringer Anteil der NSCLC-Patienten auf eine Therapie mit Erlotinib reagiert.

Anschließend wurde die Reaktion von CAFs und Tumorzellen auf eine chemotherapeutische Behandlung unter *in vivo* nahen Bedingungen im Gewebekulturmodell untersucht. Interessanterweise zeigten sich infolge der Behandlung mit Cisplatin zwischen den Tumorzellen und CAFs desselben Tumors deutliche Parallelen hinsichtlich des p53-Akkumulationsverhalten und der Induktion des Zelltods. Das Akkumulationsverhalten der

CAFs scheint hierbei durch die Kommunikation mit den benachbarten Tumorzellen bestimmt zu werden, da CAFs von Tumoren, welche im Gewebe kein p53 akkumulieren, im isolierten Zustand eine Cisplatin-abhängige Akkumulation aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass Tumorzellen die Reaktion ihrer Mikroumgebung auf Schäden in der DNA kontrollieren, um sich so vor den Folgen der Chemotherapie zu schützen.

Um die tumorunterstützenden Eigenschaften der CAFs zu beeinflussen, wurde nach Möglichkeiten gesucht ihre Proliferation zu hemmen. Durch das Screening einer Substanzbibliothek bestehend aus 160 niedermolekularen Kinase-Inhibitoren wurde die Inhibition des PDGFR-Signalweges als vielversprechender Ansatz identifiziert. Unter den zugelassenen PDGFR-Inhibitoren war Dasatinib der potenteste und Transkriptomanalysen zeigten, dass Dasatinib in CAFs zu einem CAF-ähnlichen Expressionsmuster führt. Die Dasatinib-vermittelten Veränderungen im Phänotyp der CAFs führten dazu, dass die CAFs lösliche Faktoren sekretieren, welche die Proliferation der Lungenkarzinomlinie H1299 hemmen. Unbehandelte CAFs sekretieren hingegen Faktoren, welche die Proliferation stimulieren, wie Versuche mit konditioniertem Medium zeigten. Dasatinib scheint somit eine vielversprechende Möglichkeit darzustellen, den stimulierenden Einfluss des Stromas auf die Tumorprogression zu hemmen.

6. Abstract

Worldwide lung cancer is the leading cause of death among all malignancies. This is largely due to its high frequency of diagnosis and its poor 5-year survival rate of 15%. As a solid tumor, lung cancer consists of tumor cells and a variable stromal part, that is made up of a cellular and a non-cellular fraction. The stroma influences several processes like growth, invasion of surrounding tissues, metastatic spread as well as tumor supply of oxygen and nutrients. Thereby, the stroma is dominated by the cancer-associated fibroblasts (CAFs), actively shaping the microenvironment through the secretion of soluble factors and the synthesis of extracellular matrix (ECM) components. While there are several studies with the aim of identifying the differences between CAFs and normal fibroblasts (NAFs) of the breast, there is only little information about those differences in the corresponding cells of the lung.

One of the aims of the study was the identification of the molecular differences between CAFs and NAFs derived from lung tissue. A further objective was the investigation of therapy effects under conditions that mimic the situation *in vivo*. Therefore, an *ex vivo*-model allowing the culture of primary lung tumor tissue had to be evaluated. Afterwards, the effect of the epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor Erlotinib on tumor cell proliferation was investigated in this model system. To investigate a response of both, tumor cells and their adjacent CAFs to chemotherapy, lung cancer tissue samples were treated with cisplatin. Finally, owing to their important role in tumors, CAFs were chosen as a target for therapy using small molecule inhibitors, with the aim of inhibiting their stimulatory effect.

Molecular comparison of isolated CAFs and the corresponding NAFs of 9 lung cancer patients revealed a significantly different expression of 60 genes. The identification of a set of differentially regulated genes is quite surprising because of the assumable activation of NAFs due to culture conditions. This indicates that CAFs are more than just activated fibroblasts, which are found at sites of tissue injury. Rather, they are a distinct cell type showing parallels to activated fibroblasts. Expression data for 46 of the 60 identified genes were available in a Non-Small Cell Lung Cancer collective comprising of 342 patients. As it turned out, a NAF-like expression of the genes was associated with a significantly better survival prognosis.

Another central objective of the work was the investigation of the tumor cell response to therapy in an intact tissue. An already established tissue culture system required initial validation. This was done by comparing the tissue which has been cultivated for 4 days with the corresponding tissue, that has been fixed immediately after surgery. No significant changes in morphology and biological function were detected. Thus the model system adequately mimics the situation in the patient and a negative effect of the culture could be excluded. This makes the system an excellent opportunity to investigate the effect of a drug under *in vivo*-like conditions.

Treatment of tissue samples, characterized for EGFR expression, and *EGFR*, and *KRAS* gene status, with the small-molecule inhibitor Erlotinib displayed no effect on the proliferation of the analysed tumor cells. This reflects the situation in the clinics quite adequately where only a small proportion of patients benefits from the treatment with the EGFR-inhibitor Erlotinib.

To follow-up, the reaction of CAFs and tumor cells on a chemotherapeutical treatment was investigated under *in vivo*-like conditions. Interestingly, cisplatin led to a parallel accumulation of p53 and induction of cell death in tumor cells and their adjacent CAFs. Thereby, the p53 accumulation of CAFs seems to be dictated by their tumor cells because the same CAFs which do not accumulate p53 in the tissue, respond to cisplatin with the accumulation of p53 in the isolated state. Therefore, it is tempting to speculate that tumor cells modulate the DNA damage response of their microenvironment, with the objective to raise their own chemoresistance.

Inhibiting CAF proliferation was examined as a feasible approach to inhibit their tumor-stimulating properties. Screening of a kinase inhibitor library consisting of 160 small molecule inhibitors resulted in the identification of PDGFR signaling as a promising target. Among the FDA approved PDGFR inhibitors Dasatinib turned out to be the most potent inhibitor of CAF proliferation, resulting in a molecular phenotype comparable to that of normal fibroblasts. Furthermore, the Dasatinib-mediated changes in CAFs led to the secretion of factors, inhibiting the proliferation of lung tumor cells. In contrast, the secreted factors of untreated CAFs stimulated their proliferation. Together, these results indicate that Dasatinib treatment is a promising approach to reduce the tumor promoting capacity of CAFs.

7. Literaturverzeichnis

Addadi Y, Moskovits N, Granot D, Lozano G, Carmi Y, Apte RN, Neeman M, Oren M. p53 status in stromal fibroblasts modulates tumor growth in an SDF1-dependent manner. *Cancer Res.* 2010; 70(23): 9650-9658.

Anderberg A, Pietras K. On the origin of cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle.* 2009; 8(10): 1461-1465.

Augsten M, Hägglöf C, Pena C, Östman A. A Digest Role of the Tumor Microenvironment in Gastrointestinal Cancers. *Cancer Microenvironment.* 2010; 3: 167.176.

Aylon Y, Oren M. Living with p53, Dying of p53. *Cell.* 2007; 130: 597-600.

Bar J, Feniger-Barish R, Lukashchuk N, et al. Cancer cells suppress p53 in adjacent fibroblasts. *Oncogene.* 2009; 28(6): 933-936.

Bar J, Moskovits N, Oren M. Involvement of stromal p53 in tumor-stroma interactions. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; 21(1): 47-54.

Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl A. Heterogeneity of Gene Expression in Stromal Fibroblasts of Human Breast Carcinomas and Normal Breast. *Oncogene.* 2010; 29(12):1732-1740.

Bell D, Brannigan B, Matsuo K, Finkelstein D, Sordella R, Settleman J, Mitsudomi T, Haber D. Increased Prevalence of EGFR-Mutant Lung Cancer in Women and in East Asian Populations: Analysis of Estrogen-Related Polymorphisms. *Human Cancer Biology.* 2008; 14(13):4079-4084.

Bhowmick N, Moses H. Tumor-stroma interactions. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2005; 15: 97-101.

Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews*. 2009; 9: 701-713.

Buccheri G, Ferrigno D. Prognostic Value of Stage Grouping and TNM Descriptors in Lung Cancer. *Chest*. 2000; 117: 1247-1255.

Burdelya LG, Komarova EA, Hill JE, Browder T, Tararova ND, Mavrakis L, DiCorleto PE, Folkman J, Gudkov AV. Inhibition of p53 Response in Tumor Stroma Improves Efficacy of Anticancer Treatment by Increasing Antiangiogenic Effects of Chemotherapy and Radiotherapy in Mice. *Cancer Research*. 2006; 66(19); 9356-9361.

Carbone DP, Mitsudomi T, Chiba I, Piantadosi S, Rusch V, Nowak JA, McIntire D, Slamon D, Gazdar A, Minna J. p53 immunostaining positivity is associated with reduced survival and is imperfectly correlated with gene mutations in resected non-small cell lung cancer. A preliminary report of LCSG 871. *Chest*. 1994; 106(6 Suppl):377S-381S.

Chang H, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS*. 2002; 99(20): 12877-12882.

Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, Chi J, van de Rijn, Botstein D, Brown PO. Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer Progression: Similarities between Tumors and Wounds. *Plos Biology*. 2004; 2(2): 206-214.

Cheng J, Valianou M, Canutescu A, et al. Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2005; 4: 351-360.

Chiorean EG, Porter JM, Foster AE, Olmari ASH, Yoder CA, Fife KL, Strother RM, Murry DJ, Yu M, Jones DR, Sweeney CJ. A Phase I and Pharmacokinetic Trial of Erlotinib in Combination with Weekly Docetaxel in Patients with Taxane-Naive Malignancies. *Clin Cancer Res*. 2008. 14(4): 1131-1137.

- Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011; 1(4): 482-497.
- Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumor cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31: 195-208.
- Coller HA, Sang L, Roberts JM. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol.* 2006; 4: e83.
- Collins L, Haines C, Perkel R, Enck R. *Lung Cancer: Diagnosis and Management.* 2007. American Academy of Family Physicians. www.aafp.org/afp.
- Cunningham D, Humblet I, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, van Cutsem E. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351: 337-345.
- De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer.* 2008; 123: 2229-2238.
- Dolznic H, Walzl A, Kramer N, Rosner M, Garin-Chesa P, Hengstschläger M. Organotypic spheroid culture to study tumor-stroma interaction during cancer development. *Drug Discov Today Dis Models.* 2012; 8(2-3): 7.
- Duda D, Duyverman A, Kohno M, Snuderl M, Steller E, Fukumura D, Jain R. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *PNAS.* 2010; 107(50): 21677-21682.
- Dvorak H, Senger D, Dvorak A. Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance. *Cancer Metastasis Reviews.* 1983; 2: 41-73.
- Dvorak H. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986; 315(26):1650-9.
- Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 4368-4380.

-
- Eberhard A, Giaccone G, Johnson B. Biomarkers of Response to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: Standardization for Use in the Clinical Trial Setting. *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 26(6): 983-993.
- Ebina M, Martínez A, Birrer MJ, Ilona Linnoila R. In situ detection of unexpected patterns of mutant p53 gene expression in non-small cell lung cancers. *Oncogene*. 2001; 20(20): 2579-86.
- Eliopoulos AG, Kerr DJ, Herid J, Hodgkins L, Krajewski S, Reed JC, Young LS. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene*. 1995; 11(7): 1217-28.
- Fan S, Smith ML, Rivert II DJ, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, Fornance Jr AJ, O'Connor PM. Disruption of p53 Function Sensitizes Breast Cancer MCF-7 Cells to Cisplatin and Pentoxifylline. *Cancer Research*. 1995; 55: 1649-1654.
- Franco O, Shaw A, Strand D, Hayward S. Cancer Associated Fibroblasts in Cancer Pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2010; 21(1): 33-39.
- Freed-Pastor W, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev*. 2012;12:1268-1286.
- Friedel G. Verteilungsmuster und Bioaktivierung von Doxorubicin und HMR 1826 unter Normo- und Hyperthermie im humanen *ex-vivo* Lungenperfusionsmodell des Bronchialkarzinoms. Habilitationsschrift. 2002.
- Fukumura D, Jain R. Tumor Microenvironment Abnormalities: Causes, Consequences, and Strategies to Normalize. 2007; 101: 937-949.
- Furge KA, Zhang Y, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*. 2009; 19: 5582-5589.
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9: 1392-1400.

Gartel A. p21^{WAF1/CIP1} and cancer: A shifting paradigm? *BioFactors*. 2009; 35: 161-164.

Gaughan E, Costa B. Genotype-driven therapies for non-small cell lung cancer: focus on *EGFR*, *KRAS* and *ALK* gene abnormalities. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2011; 3(3): 113-125.

Gioni V, Karampinas T, Voutsinas G, Roussidis AE, Papadopoulos S, Karamanos NK, Kletsas D: Imatinib mesylate inhibits proliferation and exerts an antifibrotic effect in human breast stroma fibroblasts. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 706-714.

Goeckenjan G et al. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. *Pneumologie*. 2011; 65: 51-75.

Goldman E. The Growth of Malignant Disease in Man and the lower Animals, with Special reference to the Vascular System. *Lancet*. 1907; 2: 1236-1240.

Green D, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 2009; 458: 1127-1130.

Gualberto A, Dolled-Filhart M, Gustavson M, Christiansen J, Wang YF, Hixon ML, Reynolds J, McDonald S, Ang A, Rimm DL, Langer CJ, Blakely J, Garland L, Paz-Ares LG, Karp DD, Lee AV. Molecular Analysis of Non-Small Cell Lung Cancer Identifies Subsets with Different Sensitivity to Insulin-like Growth Factor I Receptor Inhibition. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(18): 4654-4665.

Hanahan D, Weinberg A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.

Hantschel O, Rix U, Superti-Furga G. Target spectrum of the Bcr-Abl inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leukemia and Lymphoma*. 2008; 49: 615-619.

Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, Kobayashi Y, Nishida K, Hayashi S, Ishikawa Y, Tsuchiya S, Nakagawa K, Hayashi J, Tsuchiya E. p53 null mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early-stage non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res*. 1999; 59(21):5572-7.

Haubeiss S, Schmid JO, Muerdter TE, Sonnenberg M, Friedel G, van der Kuip H, Aulitzky WE. Dasatinib reverses Cancer-associated Fibroblasts (CAFs) from primary Lung Carcinoma to a phenotype comparable to that of normal Fibroblasts. *Mol Cancer*. 2010; 9: 168.

Hill R, Song Y, Cardiff RD, Van Dyke T. Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell*. 2005; 123(6): 1001-11.

Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*. 2010; doi:10.1016/j.biotech.2010.01.012.

Hoffman P, Mauer A, Vokes E. Lung Cancer. *The Lancet*. 2000; 355:479-85.

Hoffman R. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Investigational New Drugs*. 1999; 17: 343-359.

Hou J, Aerts J, den Hamer B, van Ijcken W, den Bakker M, Riegman P, van der Leest P, van der Spek P, Foekens JA, Hoogsteden HC, Grosveld F, Philipsen S. Gene Expression-Based Classification of Non-Small Cell Lung Carcinomas and Survival Prediction. *Plos One*. 2010; 5(4): 1-12.

Hu M, Yao J, Cai L, Bachmann KE, van den Brule F, Velculescu V, Polyak K. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nature Genetics*. 2005; 37(8): 899-905.

Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, Nakamura T. Expression of *c-met*/HGF Receptor in Human Non-small Cell Lung Carcinosis *in vitro* and *in vivo* and Its Prognostic Significance. *Jpn J Cancer Res*. 1996; 87: 1063-1069.

Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Bierie B, Tada M, Mohri D, Miyabayashi K, Asaoka Y, Maeda S, Ikenoue T, Tateishi K, Wright CV, Koike K, Omata M, Moses HL. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Invest*. 2011;121(10):4106-17

Jamieson and Lippard. Structure, Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* 1999; 99: 2467-98.

Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, Donovan M, Cordon-Cardo C, Beug H, Grünert S. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2006; 116(6):1561-1570.

Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin.* 2011; 61: 69-90.

Jerome L, Shiry L, Leyland-Jones B. Deregulation of the IGF axis in cancer: epidemiological evidence and potential therapeutic interventions. *Endocrine-related Cancer.* 2003; 10: 561-578.

Ji H, Li D, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, et al. The impact of human *EGFR* kinase domain mutations on lung tumorigenesis and *in vivo* sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell.* 2006; 9: 485-495.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews.* 2006; 6: 392-401.

Kandioler-Eckersberger D, Kappel S, Mittlböck M, Dekan G, Ludwig C, Janschek E, Pirker R, Wolner E, Eckersberger F. The TP53 genotype but not immunohistochemical result is predictive of response to cisplatin-based neoadjuvant therapy in stage III non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999; 117(4):744-50.

Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG: Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* 2006; 354: 2542-2551.

Kiaris H, Chatzistamou I, Trimis G, Frangou-Plemmenou M, Pafiti-Kondi A, Kalofoutis A. Evidence for nonautonomous effect of p53 tumor suppressor in carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005; 65(5): 1627-30.

Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, Nakamura T, Bucana CD, Fidler IJ. Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. *Am J Pathol.* 2006; 169:2054-2065.

Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.

Lane DP. P53, the guardian of the genome. *Nature.* 1992; 358: 15-16.

Li H, Fan X, Houghton JM. Tumor Microenvironment: The Role of the Tumor Stroma in Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2007; 101: 805-815.

Levine und Oren. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nature reviews.* 2009; 9: 749-758.

Linder A, Friedel G, Fritz P, Kivistö KT, McClellan M, Toomes H. The *ex-vivo* isolated, perfused human lung model: description and potential applications. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1996; 44: 140-146.

Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, Diella D, Pellegrini S, Pepe S, Macchiarini P, Chella A, Angeletti CA, Callahan R, Bistocchi M, Squartini F. *p53* Alterations in Non-Small Cell Lung Cancers Correlate with Metastatic Involvement of Hilar and Mediastinal Lymph Nodes. *Cancer Research.* 1993; 53: 2846-2851.

Martinez-Outschboorn UE, Pavlides S, Howell A, Pestell RG, Tanowitz HB, Sotgia F, Lisanti MP. Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: Integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2011; 43: 1045-1051.

Maulik G, Kijima T, Ma P. Modulation of the c-Met/Hepatocyte Growth Factor Pathway in Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2002; 8; 620-627.

Menendez D, Inga A, Resnick M. The expanding universe of p53 targets. *Nature Reviews.* 2009; 9:724-737.

- Micke P, Ostman A. Exploring the tumor environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2005; 9: 1217-1244.
- Minami H, Kawada K, Ebi H, Kitagawa K, Kim Y, Araki K, Mukai H, Tahara M, Nakajima H, Nakajima K. Phase I and pharmacokinetic study of sorafenib, an oral multikinase inhibitor, in Japanese patients with advanced refractory solid tumors. *Cancer Sci*. 2008; 99(7): 1492-1498.
- Mitrus I, Bryndza E, Sochanik A, Szala S. Evolving models of tumor origin and progression. *Tumor Biol*. 2012; 33: 911-917.
- Mitsudomi E, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci*. 2007; 98: 1817-1824.
- Mohla. Tumor Microenvironment. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007; 101: 810-804.
- Moll U, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Molecular Cancer research*. 2003; 1: 1001-1008.
- Mueller M, Fusenig N. Friends or Foes- Bipolar Effects of the Tumour Stroma in Cancer. *Nature Reviews*. 2004; 4: 839-849.
- Nakamura H, Saji H, Hosaka M, Hagiwara M, Saijo T, Kawasaki N, Kato H. cDNA microarray analysis of gene expression in pathologic Stage IA nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer*. 2003; 97: 2798-2805.
- Navab R, Strumpf D, Bandarchi B, Zhu C, Pintilie M, Ramnarine VR, Ibrahimov E, Radulovich N, Leung L, Barczyk M, Panchal D, To C, Yun JJ, Der S, Shepherd FA, Jurisica I, Tsao M. Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *PNAS*. 2011; 108(17): 7160-7165.
- Nishimura K, Matsumiya K, Miura H, Tsujimura A, Nonomura N, Matsumoto K, Nakamura T, Okuyama A. Effects of hepatocyte growth factor on urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPA receptor in DU145 prostate cancer cells. *Int J Androl*. 2003; 26: 175-179.

Nowell P. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science*. 1976; 194: 23-28.

Ogunwobi O, Liu C. Hepatocyte growth factor upregulation promotes carcinogenesis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via Akt and COX-2 pathways. *Clin Exp Metastasis*. 2011; 28: 721-731.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005; 121: 335-348.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*, 1989, 8(2):98-101

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *PNAS*. 2004; 101(36): 13306-13311.

Pao W, Wang T, Riely G, Miller V, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski M, Heelan R, Kris M, Varmus H. *KRAS* Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *PLOS Medicine*. 2005; 2(1): 57-61.

Parkins CS, Bush C, Price P, Steel GG. Cell proliferation in human tumour xenografts: measurement using antibody labelling against bromodeoxyuridine and Ki-67. *Cell Proliferation*. 1991; 24(2): 171-179.

Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P, Eng C: Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med* 2007, 357:2543-2551.

Peng B, Lloyd P, Schran H: Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacokinet*. 2005; 44:879-894.

Petersen I. The Morphological and Molecular Diagnosis of Lung Cancer. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2011; 108 (31-32): 525-31.

Politi K, Zakowski MF, Fan P, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes & Development*. 2006; 20: 1496-1510.

Qiu W, Hu M, Sridhar A, Opekin K, Fox S, Shipitsin M, Trivett M, Thompson ER, Ramakrishna M, Goringe KL, Polyak K, Haviv I, Campbell IG: No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat Genet* 2008, 40:650-655.

Rabik C, Dolan M. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment*. 2006; 33: 9-23.

Räsänen K, Virtanen I, Salmenperä P, Grenman R, Vaehri A. Differences in the Nemo1 Response of Normal and Cancer-Associated Fibroblasts from Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 4(9): e6879.

Reeve JG, Morgan J, Schwander J, et al. Role for Membrane and Secreted Insulin-like Growth Factor-binding Protein-2 in the Regulation of Insulin-like Growth Factor Action in Lung Tumors. *Cancer Res*. 1993; 53: 4680-4685.

Ribeiro AS, Albergaria A, Sousa B, Correia AL, Bracke M, Seruca R, Schmitt FC, Paredes J. Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. *Oncogene*. 2010; 29: 392–402.

Riely G, Matks J, Pao W. *KRAS* Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Proc Am Thorac Soc*. 2009; 6: 201-205.

Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature*. 2008; 9: 402-412.

Roy R, Yang J, Moses M. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27: 5287-5297.

Sadlonova A, Bowe DB, Novak Z, Mukherje S, Duncan VE, Page GP, Frost AR. Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron.* 2009; 2: 9-21.

Salomon D, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 1995; 19: 183-232.

Schäfer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature.* 2008; 9: 628-638.

Schauer I, Sood A, Mok S, Liu J. Cancer-associated Fibroblasts and Their Putative Role in Potentiating the Initiation and Development of Epithelial Ovarian Cancer. *Neoplasia.* 2011; 13(5): 393-405.

Shan W, Yang G, Liu G. The inflammatory network: bridging senescent stroma and epithelial tumorigenesis. *Front Biosci.* 2010; 14: 4044-4057.

Shao Z, Nguyen M, Barsky SH. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene.* 2000; 19: 4337-4345.

Sharma S, Bell D, Settleman J, Haber D. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2007; 7: 169-181.

Siegfried JM, Gubish CT, Rothstein ME, de Oliveira PEQ, Stabile LP. Signaling Pathways Involved in Cyclooxygenase-2 Induction by Hepatocyte Growth Factor in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Molecular Pharmacology.* 2007; 72: 769-779.

Singh S, Srivastava SK, Bhardwaj A, Owen LB, Singh AP. CXCL12-CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells: a novel target for therapy. *British Journal of Cancer.* 2010; 103: 1671-1679.

Sonnenberg M, van der Kuip H, Fritz P, Haubeiß S, Schroth W, Friedel G, Simon W, Mürdter TE, Aulitzky WE. Highly variable response to cytotoxic chemotherapy in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) from lung and breast. *BMC Cancer.* 2008; 8: 364.

Sonnenberg M. Untersuchung des Einflusses von Chemotherapie auf Tumor-assoziierte Fibroblasten bei Karzinomen der Lunge und Brust *in vivo* und in verschiedenen *ex vivo* Modellen. 2009; Dissertationsschrift.

Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-Sensitizing EGFR Mutations in Lung Cancer Activate Anti-Apoptotic Pathways. *Science*. 2004; 305: 1163-1167.

Sporn, MB. The war on cancer. *Lancet*. 1996; 347: 1377-1381.

Sternlicht M, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516.

Stewart DJ. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2010; 75: 173-234.

Strell C, Rundqvist H, Östman A. Fibroblasts- a key host cell type in tumor initiation, progression, and metastasis. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2012; 117: 187-195.

Sugimoto H, Mundel T, Kieran M, Kalluri R. Identification of Fibroblast Heterogeneity in the Tumor Microenvironment. *Cancer Biology & Therapy*. 2006; 5(12): 1640-1646.

Suh YA, Post SM, Elizondo-Fraire AC, Maccio DR, Jackson JG, El-Naggar AK, Van Pelt C, Terzian T, Lozano G. Multiple stress signals activate mutant p53 *in vivo*. *Cancer Res*. 2011; 71(23):7168-75.

Suzuki M, Shigematsu H, Iizasa T, Hiroshima K, Nakatani Y, Minna J, Gazdar A, Fujisawa T. Exclusive Mutation in Epidermal Growth Factor Receptor Gene, Her-2, and KRAS, and Synchronous Methylation of Nonsmall Cell Lung Cancer. *Cancer*. 2006; 106(10): 2200-2207.

Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H, Nishikawa K, Hanawa M, Ooi A. Protein Overexpression and Gene Amplification of Epidermal Growth Factor Receptor in Nonsmall Cell Lung Carcinomas. *Cancer*. 2005; 103(6): 1265-1273.

Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP,

- Sawyers CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2006; 354: 2531-2541.
- Terzian T, Suh Y, Iwakuma T. The inherent instability of mutant p53 is alleviated by *MDM2* or *p16^{INK4a}* loss. *Genes & Development*. 2008; 22: 1337-1344.
- Tomasek J, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown R. Myofibroblasts and Mechanoregulation of Connective Tissue Remodelling. *Nature Reviews*. 2002; 3: 349-363.
- Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF. The *TP53* Gene, Tobacco Exposure, and Lung Cancer. *Human Mutation*. 2003; 21: 229-239.
- Tse J, Kalluri R. Mechanisms of Metastasis: Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Contribution of Tumor Microenvironment. 2007;101: 816-829.
- Underiner TL, Herbertz T, Miknyoczki SJ. Discovery of small molecule c-met inhibitors: Evolution and profiles of clinical candidates. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010; 10: 7-27.
- Van der Kuip H, Mürdter TE, Sonnenberg M, McClellan M, Gutzeit S, Gerteis A, et al. Short term culture of breast cancer tissue to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer*. 2006; 6: 86.
- Vesselle H, Salskov A, Turcotte E, Wiens L, Schmidt R, Jordan CD, Vallieres E, Wood DE. Relationship Between Non-small Cell Lung Cancer FDG Uptake at PET, Tumor Histology, and Ki-67 Proliferation Index. *Journal of Thoracic Oncology*. 2008; 3(9): 971-977.
- Vousden K, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 137: 413-429.
- Wang D, Lippard S. Cellular Processes of Platinum Anticancer Drugs. *Nature Reviews*. 2005; 4: 307-320.
- Wang² JL, Jiao SC, Ye P, Li JY. [P53 protein expression and chemosensitivity to cisplatin in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2008; 28(5):770-3.

Wang¹ X, Hochhaus A, Kantaijan HM, Agrawal S, Roy A, Pfister M, Chen T, Bleickardt E, Nicaise C, Shah N: Dasatinib pharmacokinetics and exposure-response (E-R): Relationship to safety and efficacy in patients (pts) with chronic myeloid leukemia (CML) [abstract]. *J Clin Oncol.* 2008; 26:s3590.

Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD: Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:345-356.

Wernert N, Löcherbach C, Wellmann A, Behrens P, Hügel A: Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers. *J Mol Med* 2000, 78:B30.

Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S: Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:835-844.

Wilson C, Danson S. Standing the test of time in Europe? Gefitinib in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy.* 2010; 1: 37-51.

Wolpin BM, Meyerhardt JA, Chan AT, Ng K, Chan JA, Wu K, Pollak MN, Giovannucci EL, Fuchs CL. Insulin, the Insulin-Like Growth Factor Axis, and Mortality in Patients With Nonmetastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical oncology.* 2009; 27(2): 176-185.

Worthley D, Giraud A, Wang T. Stromal Fibroblasts in Digestive Cancer. *Cancer Microenvironment.* 2010; 3: 117-125.

Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci.* 2011; 15: 166-179.

Zhang W, Stabile LP, Keohavong P, Romkes M, Grandis JR, Traynor AM, Siegfried JM. Mutation and Polymorphism in the EGFR-TK Domain Associated with Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology.* 2006; 1(7): 635-647.

Zhang X, Chang A. Somatic mutations of the epidermal growth factor receptor and non-small-cell-lung cancer. *J Med Genet.* 2007; 44: 166-172.3.

Zigrino P, Löffek S, Mauch C. Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie*. 2005; 87: 321-328.

8. Eigene Veröffentlichungen

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Originalarbeiten:

Haubeiss S, Schmid JO, Muerdter TE, Sonnenberg M, Friedel G, van der Kuip H, Aulitzky WE. Dasatinib reverses Cancer-associated Fibroblasts (CAFs) from primary Lung Carcinoma to a phenotype comparable to that of normal Fibroblasts. Mol Cancer. 2010; 9: 168.

Schmid JO, Dong M, Haubeiß S, Friedel G, Bode S, Grabner A, Ott G, Mürdter TE, Oren M, Aulitzky WE, van der Kuip H. Cancer Cells Cue the p53 Response of Cancer-Associated Fibroblasts to Cisplatin. Cancer Research. 2012. 72(22): 5824-32.

Abstracts/Vorträge:

Schmid JO, Haubeiss S , Muerdter TE, Friedel G, van der Kuip H, Aulitzky WE. Dasatinib reverses the phenotype of cancer associated fibroblasts (CAFs) to a normal fibroblast (NAF) like phenotype. Proc Amer Assoc Cancer Res. 2010, Apr 17-21. Washington, DC.

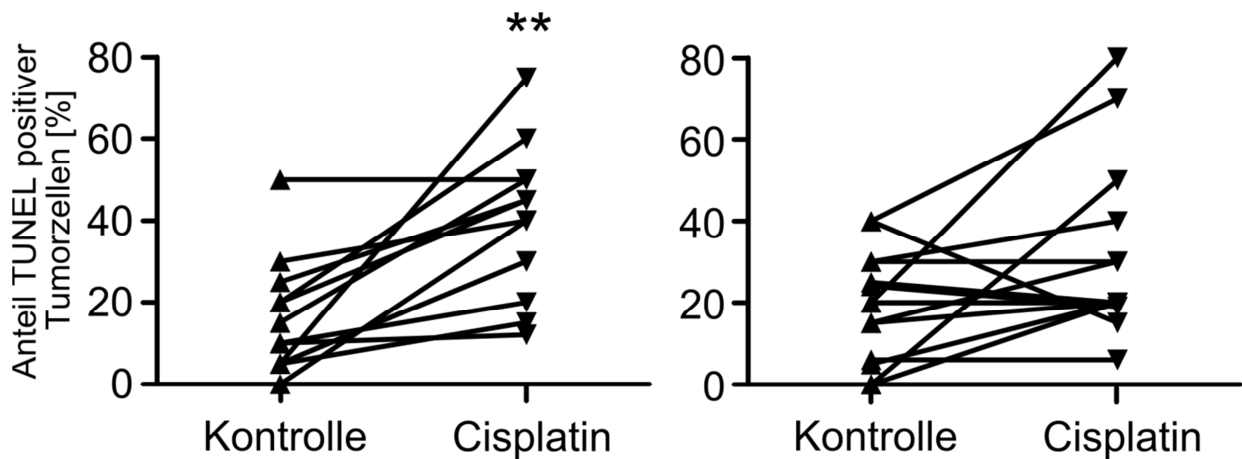
Schmid JO, Haubeiss S , Muerdter TE, Friedel G, van der Kuip H, Aulitzky WE. Dasatinib is a potent inhibitor of cancer-associated fibroblast (CAF) proliferation and may reverse the phenotype of CAFs to a phenotype comparable to that of normal fibroblasts. Onkologie 2010; 33 (suppl.6): 1-294.

JO Schmid, Mürdter TE, Dong M, Haubeiß S, Friedel G, van der Kuip H, Aulitzky WE. Dasatinib reduces the ability of cancer-associated fibroblasts (CAFs) to promote tumor proliferation *in vitro*. Onkologie. 2011; 34 (suppl.6): 1-305.

Schmid JO, Dong M, Haubeiß S, Friedel G, Oren M, Mürdter TE, Aulitzky WE, van der Kuip H. Crosstalk of cancer cells and cancer-associated fibroblasts in the response to cisplatin in intact tissue from NSCLC specimen. Onkologie. 2012; 35(suppl.6): 1-259.

Schmid JO, Dong M, Haubeiß S, Friedel G, Oren M, Mürdter TE, Aulitzky WE, van der Kuip. p53 response of cancer-associated fibroblasts (CAFs) to cisplatin is closely correlated with the p53 response of tumor cells in lung cancer tissue. Proc Amer Assoc Cancer Res. 2012, Mar 31- Apr 4. Chiacago, IL.

9. Anhang



Anhang: Anteil TUNEL-positiver Zellen nach Cisplatin-Behandlung in Abhängigkeit vom p53-Akkumulationsverhalten. Links: Signifikante Induktion von Zelltod bei Tumoren der Gruppe I, die sich durch eine p53-Akkumulation nach der Behandlung mit Cisplatin auszeichnen. Rechts: Induktion von Zelltod bei Tumoren der Gruppe II und III, bei denen es durch Cisplatin zu keiner p53-Akkumulation kommt. (**: $p < 0.01$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

10. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro-
Abb.	Abbildung
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
c	centi-
CAF	<i>Cancer-Associated Fibroblast</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CML	chronisch myeloische Leukämie
DBD	DNA-Bindedomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	epithelial/mesenchymale Transition
EnMT	endothelial/mesenchymalen Transition
ERK	<i>Extracellular signal-Related Kinase</i>

EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FAP	<i>Fibroblast Activation Protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanat</i>
g	Gramm
GAM	<i>goat anti mouse</i>
GO	<i>gene ontology</i>
h	<i>hour</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure,
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
IGF-IR	<i>Type I Insulin-like Growth Factor Receptor</i>
IKP	Institut für klinische Pharmakologie
IL	Interleukin
ISD	interstitieller Druck
k	kilo
l	Liter
m	milli-/Meter
M	Molar
MDM2	<i>Mouse Double Minute2</i>

MDR1	<i>Multidrug-Resistance-Protein1</i>
min	Minute
MMP	Matrix Metalloproteinase
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid))
n	nano-
N	Normal
NAF	normaler Fibroblast
NSCLC	<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>
PI	Propidium-Iodid
RBK	Robert-Bosch-Krankenhaus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCLC	<i>Small Cell Lung Cancer</i>
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of means</i>
Tab.	Tabelle

TAM	Tumor-assoziiertes Makrophage
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	TBS +Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
uPA	<i>Urokinase-Typ Plasminogen Aktivators</i>
uPAR	<i>Urokinase-Typ Plasminogen Aktivators Rezeptors</i>
v	<i>volume</i>
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vs.	versus
w	<i>weight</i>

11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Walter E. Aulitzky für die Bereitstellung des Themas, für seine Unterstützung und zahlreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hanke danke ich für die Bereitschaft, die Betreuung der Dissertation von Seiten der Universität Hohenheim zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Heiko van der Kuip und Herrn Dr. Thomas Mürdter für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihren motivierenden Zuspruch.

Meinen Kollegen Matthias Gutekunst, Michael Dengler, Dr. Meng Dong, Andrea Weilbacher, Kerstin Willecke, Lea Schaaf, Tabea Lieberich und Silke Haubeiß danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe Aulitzky.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des IKPs für die stetige Hilfe danken, vor allem Stefan Winter für die Unterstützung bei statistischen Problemen, Dr. Ulrich Griese für die Hilfe bei den Sequenzierungen und Dr. Peter Fritz für seine Hilfe bei der Beurteilung immunhistochemischer Färbungen.

Prof. Dr. Godehard Friedel und Prof. Dr. German Ott danke ich für die Bereitstellung des Gewebematerials und Dr. Wolfgang Sommergruber von Boehringer Wien für die Durchführung der Expressionsarrays.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung während der Anfertigung dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Claudia Resch, die mich vor allem in den letzten Monaten stets motivierte und oft beruhigend auf mich einwirkte.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Jens Oliver Schmid
Geburtsdatum: 23.9.1982
Geburtsort: Leonberg, Baden-Württemberg
Anschrift: Schelmenäckerstr.12
71277 Rutesheim

Schulbildung:

09/1989 - 07/1993 Grundschule Rutesheim
09/1993 - 07/2001 Gymnasium Renningen
09/2001 - 06/2003 Gymnasium in der Glemsaue, Ditzingen

Studium:

10/2003 – 12/2009 Universität Hohenheim, Studium der Biologie
Schwerpunkte: Genetik, Zoologie, Physiologie
Diplomarbeit am Institut für Genetik, Universität Hohenheim:
„Bestimmung von Zielproteinen der Proteinkinase D in
Drosophila melanogaster“

Promotion:

02/2009-01/2013

Dissertation am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für
Klinische Pharmakologie:

„Charakterisierung primärer Tumor-assoziiertes Fibroblasten
und Tumorzellen aus bronchialen Karzinomen und
Untersuchung ihrer Reaktion auf zielgerichtete und zytotoxische
Therapie“