

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Arnold

Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie,

Onkologie und Immunologie

Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer

Prognosefaktoren beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom

Inzidenz von p53, bcl-2, HER-2, HSP27, HSP60 und HSP70 im nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom des Stadiums IIIA

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Uwe Schwindel

aus Papenburg

Marburg, 2002

AngenommenvomFachbereichHumanmedizin
derPhilipps-UniversitätMarburgam18.09.2003

GedrucktmitGenehmigungdesFachbereich

Dekan.Prof.Dr.B.Maisch

Referent:Prof.Dr.M.Wolf

Korreferent:PDDr.Herz

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	EpidemiologiemalignerErkrankungen	1
1.2	Karzinogenese	2
1.3	Bronchialkarzinome	4
1.4	NachweisvonPrognosefaktoren	7
1.5	Aufgabenstellung	16
2.	<u>MaterialundMethoden</u>	17
2.1.	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	ReagenzienundChemikalien	19
2.1.3	Antikörper	21
2.1.4	PufferundAdhäsivlösung	22
2.2	Patientenproben	23
2.3	KontrollprobenundAntikörpertestung	24
2.4.	Methoden	25
2.4.1.	Präparateherstellung	25
2.4.1.1	Objektträgervorbehandlung	25
2.4.1.2	Gewebebearbeitung	25
2.4.1.3	EntparaffinierungundRehydrierung	25

2.4.2.	Färbemethoden		26
2.4.2.1	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode(APAAP)		26
2.4.2.2	Avidin-Biotin-Komplex-Methode(ABC)		27
2.4.2.3	Biotin-Streptavidin-Methode(B-SA)		28
2.4.3.	Auswertung		28
2.4.3.1	AuswertungimmunhistochemischerPräparate		28
3.	<u>Ergebnisse</u>		29
3.1.	Färbungvonp53		30
3.1.1	FärbungderPrimärtumorenmitdemp53-Antikörper	er	30
3.1.2	FärbungderLymphknotenmitdemp53-Antikörper		30
3.2.	Färbungvonbcl-2		31
3.2.1	FärbungderPrimärtumorenmitdembcl-2-Antikörper	per	31
3.2.2	FärbungderLymphknotenmitdembcl-2-Antikörper	r	32
3.3.	FärbungvonHer-2		32
3.3.1	FärbungderPrimärtumorenmitdemHER-2-Antikörper	rper	32
3.3.2	FärbungderLymphknotenmitdemHER-2-Antikörper	er	33
3.4.	FärbungvonHSP27		34
3.4.1	FärbungderPrimärtumorenmitdemHSP27-Antikörper	rper	34
3.4.2	FärbungderLymphknotenmitdemHSP27-Antikörper	er	35
3.5.	FärbungvonHSP60		36
3.5.1	FärbungderPrimärtumorenmitdemHSP60-Antikörper	rper	36
3.5.2	FärbungderLymphknotenmitdemHSP60-Antikörper	er	36
3.6.	FärbungvonHSP70		37
3.6.1	FärbungderPrimärtumorenmitdemHSP70-Antikörper	rper	37
3.6.2	FärbungderLymphknotenmitdemHSP70-Antikörper	er	38
3.7	VergleichderFärbungenvonPrimärtumorundLymphknoten	hkn	39

4.	<u>Diskussion</u>	40
5.	<u>Anhang</u>	48
6.	<u>Zusammenfassung</u>	55
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	57
8.	<u>Verzeichnis der akademischen Lehrer</u>	73
9.	<u>Danksagung</u>	74

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie maligner Erkrankungen

Tumorerkrankungen sind in Deutschland die zweithäufigste Todesursache. Derzeit verstirbt etwa jeder zweite Mensch (395.043 Fälle im Jahr 2000) an einer Kreislauferkrankung und etwa jeder Vierte (210.738 Fälle im Jahr 2000) an einer bösartigen Neoplasie [Statistisches Bundesamt Deutschland 2002; <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab3.htm>]. Bedingt durch die steigende Lebenserwartung der deutschen Bevölkerung hat die absolute Zahl der Krebstodesfälle zugenommen, wobei die altersbereinigte Sterblichkeit an Krebserkrankungen für beide Geschlechter abnehmend ist. Dieser Rückgang ist aber noch ausgeprägter bei Kreislauferkrankungen, so daß bei Anhalten der heutigen Trends davon auszugehen ist, daß Krebserkrankungen in 15 bis 20 Jahren die Todesursachenstatistik in Deutschland anführen werden.

Im Jahr 2000 wurde bei Männern die Aufstellung der Tumorerkrankungen, die am häufigsten tödlich verlaufen sind, von bösartigen Tumoren der Verdauungsorgane angeführt (35.000 von 109.700 Krebstodesfällen), dicht gefolgt von bösartigen Tumoren der Atmungsorgane (30.900 von 109.700 Krebstodesfällen) [Statistisches Bundesamt Deutschland 2002, <http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2001/p3840092.htm>]. Bei Frauen nimmt das Bronchialkarzinom (8.090 von 101.300 Krebstodesfällen) nach Brust- und Darmkrebs die dritte Position ein. Während die Inzidenz des Bronchialkarzinoms (BC) bei Männern in Deutschland seit den achtziger Jahren leicht rückläufig ist, verzeichnet man bei Frauen eine permanente Zunahme [Becker und Wahrendorf, 1997].

1.2 Karzinogenese (Tumorentwicklung)

Krebs ist ein Sammelbegriff für verschiedene Erkrankungen, die ihren Ursprung auf genetischer Ebene nehmen und in Phasen ablaufen. Man unterscheidet das Stadium der genetischen Prädisposition, welches über die prämaligen Zwischenstufen der Hyperplasie, Metaplasie, Dysplasie und Carcinoma in situ in das maligne Stadium des invasiven Karzinoms mit Metastasierung übergehen kann. Die Dauer und Ausprägung der einzelnen Stadien sind individuell unterschiedlich, wobei das erste Stadium insbesondere für erbliche Tumoren von Bedeutung ist.

Entscheidend für die Entstehung maligner Tumorzellen ist die Schädigung von Genen, die das Zellwachstum regulieren. Hierzu werden Proto-Onkogene gezählt, die durch aktivierende Mutationen bereits eines Allels (dominante Mutation) zu Onkogenen werden können [Hunter, 1997]. Zu den Proto-Onkogenen wird das Produkt des bcl-2-Gens gezählt, welches die Fähigkeit besitzt, Apoptose abzuwenden. Auch das HER-2-Genprodukt, ein Wachstumsfaktorenrezeptor, kann durch eine Mutation zu einem Onkogen werden.

Ebenso kann es infolge inaktivierender Mutationen von Tumor-Suppressor-Genen (Antionkogene) entweder zu unkontrolliertem Zellwachstum durch Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Zellteilung und Zelltod kommen oder zum Ausbleiben der DNS-Reparatur während der G₂-Phase.

Sofern nur ein Allel durch Mutation ausgeschaltet ist, kann das andere, noch gesunde, diesen Mißstand kompensieren. Treten im Verlauf jedoch auch Veränderungen des gesunden Allels auf, kann die reguläre Funktion des Tumor-Suppressor-Gens aufgehoben sein (rezessive Mutation) [Knudson, 1985; Kinzler und Vogelstein, 1996].

Man unterscheidet bei den Tumor-Suppressor-Genen anhand der Funktionsweise ihrer Genprodukte zwei Klassen. *Gatekeeper*-Gene kodieren für Proteine, die die Zellproliferation hemmen oder Apoptose einleiten können. Eine Mutation in diesen Genen kann eine vermehrte Zellteilung oder eine geringere Apoptoserate bewirken und läßt sich bereits in prämaligen Läsionen nachweisen. Die gesteigerte Teilungsaktivität birgt das erhöhte Risiko neuer Mutationen, die letztlich zur malignen Entartung führen können. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Genprodukt von p53, welches sowohl Richter über Leben und Apoptose einer Zelle als auch Wächter über DNS-Reparaturen ist. Die zweite Klasse bilden die *Caretaker*-Gene der

für die Integrität des Genoms zuständigen DNS-Reparaturenzyme [Kinzler und Vogelstein, 1997]. Der Ausfall ihrer Funktion bedingt eine erhöhte Mutationsrate in den betroffenen Zellen. Dies erklärt die schnelle Progression solcher Tumoren. Meist liegt nur ein kurzer Zeitraum zwischen dem Auftreten der ersten Vorläuferläsion und der Entstehung des Karzinoms [Kinzler und Vogelstein, 1996].

Ein Sicherungssystem gegen die Entstehung einer Tumorerkrankung ist die körpereigene Immunabwehr. Einen wichtigen Anteil hieran haben die sogenannten Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die eine Subpopulation der T-Lymphozyten darstellen. Hinsichtlich ihrer Reifung und Funktion nehmen sie eine Sonderstellung unter den Lymphozyten ein. Sie sind für die angeborene Immunantwort verantwortlich und können ohne vorherige Stimulation Tumorzellen aufspüren und eliminieren. T-Lymphozyten erkennen Tumorzellen mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors (TZR) anhand von HLA-Molekülen auf Zellen, die Tumorantigene präsentieren. Ist das HLA-Molekül jedoch durch noch nicht geklärte Mechanismen modifiziert oder nicht vorhanden, können T-Lymphozyten Tumorzellen schlechter erkennen. Bei Natürlichen Killerzellen löst die Präsentation intakter HLA-Moleküle ein Abschalten der Killeraktivität aus. Sind die HLA-Moleküle jedoch modifiziert oder nicht vorhanden, kommt es zur Zerstörung der Zielzelle [Karrere, 1991]. Beide Systeme ergänzen somit einander und können zur Eliminierung von Tumorzellen führen. Neben veränderten HLA-Molekülen kann aber auch das Vorhandensein von Hitzeschockproteinen (HSP) auf der Tumorzelloberfläche dazu beitragen, daß diese von Natürlichen Killerzellen und auch von zytotoxischen T-Lymphozyten durch noch nicht bekannte Prozesse besser erkannt und eliminiert werden können [Udon und Srivastava, 1993]. Ein Fehlen der Oberflächenpräsentation der Hitzeschockproteine könnte somit die Eliminierung dieser Tumorzellen durch das Immunsystem beeinträchtigen.

1.3 Bronchialkarzinome

Die Unterteilung der Bronchialkarzinome erfolgt histopathologisch in zwei Hauptgruppen, kleinzellige (engl. small cell lung cancer, SCLC) und nichtkleinzellige (engl. non small cell lung cancer, NSCLC) Bronchialkarzinome [Muller und Theile, 1994]. Wobei man davon ausgeht, daß alle ihren Ursprung in einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle haben [Carbone, 1997]. Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome machen mit 75-80% den Großteil der Fälle aus. Sie stellen eine histologisch heterogene Gruppe dar, deren Hauptvertreter Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und großzellige Karzinome sind. Davon abgegrenzt werden die restlichen 20-25 % der Fälle, bei denen ein SCLC histologisch diagnostiziert wird. Wobei etwa ein Fünftel als Mischtumoren zu bezeichnen sind, da sie zusätzlich Merkmale nichtkleinzelliger Bronchialkarzinomtypen aufweisen [Zochbauer et al., 1994]. Diese Beobachtung stützt die These einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle.

Das Plattenepithelkarzinom ist mit 30-40 % die häufigste Form des Bronchialkarzinoms. Es tritt bevorzugt in zentralen Lungensegmenten auf, stellt jedoch gleichzeitig 50 % der peripheren Pancoasttumoren dar. Überwiegend peripher und auch in Narbengewebe entstehen Adenokarzinome, die etwa 25-30% der Fälle mit steigender Tendenz ausmachen. Von der zunehmenden Inzidenz sind insbesondere Frauen betroffen. Histologisch erfolgt eine weitere Unterteilung in azinäre, papilläre und solide Karzinome mit Schleimbildung und bronchoalveoläre Adenokarzinome. Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom sind diese Tumoren geringer mit dem Zigarettenrauchen assoziiert, so daß es nicht verwundert, daß das Adenokarzinom auch der bei Nichtrauchern am häufigsten diagnostizierte Lungentumor ist [Zochbauer et al., 1994; Capewell et al., 1991]. Großzellige Bronchialkarzinome treten in 10-15 % der Fälle auf. Sie weisen weder kleinzellige Merkmale auf, noch lassen sie sich eindeutig den anderen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomtypen zuordnen. Man nimmt an, daß sie gering differenzierte Plattenepithel- oder Adenokarzinome darstellen, da sie deren immunhistochemische Marker exprimieren. Andererseits weisen 10% der großzelligen Bronchialkarzinome eine neuroendokrine Differenzierung auf, die für die anderen NSCLC eher untypisch ist [Zochbauer et al., 1994].

Das kleinzellige Bronchialkarzinom wird bislang von den eben beschriebenen Histologien abgegrenzt, da es sich sowohl im Wachstums- und Ausbreitungsverhalten als auch in der Therapie und Prognose von den nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen unterscheidet. In 90 % der Fälle wird es in zentralen Lungenabschnitten gefunden.

Häufigste Ursache des Bronchialkarzinoms ist mit 85 % das inhalative Rauchen. Weitere wichtige Faktoren sind berufliche Karzinogenexposition (8 %) und Luftverschmutzung (5 %) [Samet, 1993]. Das Risiko, ein Bronchialkarzinom zu entwickeln, ist bei Rauchern 22 mal und bei Raucherinnen 12 mal so hoch wie bei Nichtrauchern bzw. Nichtraucherinnen [Shopland et al., 1990]. Dabei korreliert das Karzinomrisiko mit der Menge der gerauchten Zigaretten und dem Beginn des Nikotinabusus (1-14 Zigaretten/Tag ergeben ein 8-faches Risiko, während der Genuß von mehr als 25 Zigaretten pro Tag ein 25-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms darstellt). Bei einem Beginn mit 15 Jahren verdoppelt sich das Risiko gegenüber einem Beginn mit 25 Jahren. [Wiencke et al., 1991]. Die wichtigsten Kanzerogenklassen im Tabakrauch sind dabei polyzyklische und aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen, aromatische Amine und Nitrosamine. Raucher gefährden nicht nur sich, sondern auch Personen in ihrer Umgebung durch den sogenannten Nebenstromrauch. Denn auch Passivrauchen erhöht das Lungenkrebsrisiko. Schon eine dauernde Belastung am Arbeitsplatz von über 10 Jahren kann das Krebsrisiko verdoppeln [Denson, 1999].

Bei der beruflichen Karzinogenexposition ist an erster Stelle Asbest zu nennen. Liegt bei einer Person neben einer Asbestexposition auch eine langjährige Rauchanamnese vor, ist das Lungenkarzinomrisiko, insbesondere für Plattenepithelkarzinome, bis auf das 90-fache gegenüber Nichtrauchern erhöht. Man nimmt an, daß der karzinogene Effekt der Kombination von Rauchen und Asbest multiplikativ ist [Rosler und Woitowitz, 1995]. Da die durchschnittliche Latenzzeit zwischen Asbestexpositionsbeginn und Manifestation eines Bronchialkarzinoms im Mittel 40 Jahre beträgt, steht der Häufigkeitsgipfel asbestassoziierter Lungentumoren noch aus [Hillerdal, 1994; Baur und Konietzko, 1996]. Ebenfalls zu den berufsbedingten Karzinogenen der Klasse A, für die ein gesicherter krebserzeugender Kausalzusammenhang besteht, werden Arsen, Dichlordiäthylsulfid, Chrom-6-Verbindungen, Uran, Halogenoether und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe gezählt [Häußinger und Köhler, 1997].

Ferner kann die Schadstoffbelastung der Außenluft zur Erhöhung des Lungenkrebsrisikos führen. Vor allem Dieselruß, Benzol und polyaromatische Kohlenwasserstoffe werden zu den relevanten krebserregenden Luftverunreinigungen gezählt. Dabei ist die Belastung der Stadtbevölkerung höher als die der Landbevölkerung, was sich auch in der etwas höheren Inzidenz von Lungenkarzinomen widerspiegelt. Auch bei der Kombination von Rauchen und Schadstoffbelastung der Außenluft wird von einer multiplikativen Wirkung ausgegangen [Becker und Wahrendorf, 1997].

Für die Therapie ist entscheidend, kleinzellige von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen abzugrenzen. Kleinzellige Mischtumoren werden dabei wie kleinzellige Bronchialkarzinome behandelt. Desweiteren ist für die Therapieplanung die genaue Kenntnis der Tumorausbreitung von Bedeutung. Die Metastasierung stellt dabei das Hauptproblem dar. Die lymphogene Metastasierung erfolgt dabei zunächst in die benachbarten Lymphknoten des Primärtumors. Hämatogen metastasiert das Bronchialkarzinom bevorzugt in Leber, Knochen, periphere Lymphknoten, Nebennieren, Gehirn und Knochenmark.

Die Prognose eines Patienten mit einem Bronchialkarzinom ist streng mit der Größe des Tumors und der erfolgten Metastasierung assoziiert. Aus diesem Grund werden Bronchialkarzinome nach der TNM respektive UICC-Klassifizierung (siehe Anhang) eingeteilt. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Patienten mit einem NSCLC des Stadiums IIIA untersucht. Die Prognose des Bronchialkarzinoms hat sich in den letzten 20 Jahren trotz vielfacher Modifizierung der Therapiekonzepte nicht wesentlich gebessert. Insgesamt überleben nur etwa 12% der Patienten die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung [Khuri et al., 1997]. Dabei überleben je nach Studienur bis zu 25% der Patienten mit einem Tumorstadium IIIA länger als 5 Jahre, wenn eine kurative Operation (R0-Resektion) durchgeführt werden konnte. Aus diesem Grunde erscheint es notwendig, die Therapiekonzepte zu optimieren. Ein möglicher Weg ist die Erstellung eines individuellen Risikoprofils eines Patienten anhand der molekularbiologischen Charakteristika seines Tumors. Hierüber könnten zukünftig individuelle Therapiekonzepte erstellt werden, die dann hoffentlich eine Verbesserung der Prognose dieser Patienten verwirklichen können. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, molekularbiologische Charakteristika zu finden, die als Prognosefaktoren geeignet sind.

1.4 Nachweis von Prognosefaktoren

Sowohl in normalem Lungengewebe als auch in Bronchialkarzinomen lassen sich eine Reihe an regulatorischen Proteinen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in unterschiedlicher Intensität nachweisen. Mutationen in den hierfür kodierenden Genen können zur Dysregulation des Zellstoffwechsels, vermehrter Proliferation und weiterer genetischer Instabilität der betroffenen Zellen führen. Es bilden sich sogenannte Zellklone mit unterschiedlichen molekularen Profilen aus, die durch fortlaufende Selektion auswachsen und den Charakter des Tumors definieren und dynamisch verändern. Die individuellen Kombinationen der Genveränderungen bestimmen wahrscheinlich das unterschiedliche Wachstums- und Metastasierungsverhalten der Tumoren. Viele Veränderungen, die zur Progression und Metastasierung von Bronchialkarzinomen führen, sind jedoch noch nicht geklärt. Die Suche nach Markern, die Aufschluß über das Potential eines Bronchialkarzinoms zur Progression und Metastasierung geben, wird durch die histologische Vielfalt und das Vorkommen von Mischtumoren erschwert. Die pathologische Klassifikation der Lungentumoren erfolgt bislang nach rein morphologischen Kriterien wie Histologie, Tiefenwachstum, Differenzierungsgrad, mitotischer Teilungsaktivität oder Lymph- und Blutgefäßinvasion. Hiermit lassen sich aber nur beschränkt Aussagen zum biologischen Verhalten des Tumors machen. Das Ziel ist es, Faktoren zu finden, die eine Aussage über das maligne Potential sowie das Ansprechen auf Strahlen- und oder Chemotherapie eines Tumors zulassen, um so eine individuell angepaßte Therapie und Prognose zu ermöglichen. Ein besonderer Stellenwert wird hierbei Faktoren zugerechnet, die eine Rolle in der Steuerung des Zellzyklus spielen.

Als wichtiger Vertreter ist hier das Tumor-Suppressor-Gen p53 (Protein 53) zu nennen. Es liegt auf dem Chromosom 17p13.1 und kodiert für ein 53 kDa schweres, nukleäres Phosphoprotein. Es fungiert als Wächter über DNS-Reparaturen sowie als Richter über Leben und Apoptose einer Zelle. Die kurze Halbwertszeit von etwa 10 Minuten und die geringe Konzentration von p53 in diesem Zeitraum wird dafür verantwortlich gemacht, daß es nicht eindeutig mit immunhistochemischen Methoden in gesunden Zellen nachzuweisen ist.

Das Genprodukt von p53 besitzt die Fähigkeit, den Zellzyklus einer Zelle zu arretieren, um deren DNS auf mögliche Fehler zu untersuchen. Dieser Wachstumsstopp kann über die Aktivierung von p21 (waf1/Cip1), welche seinen

G₁-Phasestop durch Hemmung der cyclinabhängigen Kinasen (CDK) erreichen kann, ausgelöst werden. Diese sind dann nicht in der Lage das Retinoblastomgenprodukt (pRb) zu phosphorylieren, welches in diesem Zustand nicht an den E2F-Transkriptionsfaktor binden kann. Hierdurch werden Gene, die für die Überführung in die S-Phase des Zellzyklus notwendig wären, nicht mehr aktiviert [Hengstschläger et al., 1999]. Desweiteren aktiviert pRb in seinem hypophosphorylierten Zustand die Histondeacetylase 1 (HDAC1), welche die Transkription durch Nukleosomenverdichtung verhindern kann [Brehm et al., 1998]. Es kann somit durch p53 unter normalen Bedingungen verhindert werden, daß sich eine geschädigte Zelle teilen respektive vermehren kann.

Protein 53 kann aber auch p21 unabhängig zum G₁-Phasestop führen. Durch Bindung an Cyclin-H und p36 (mat1) hindert es den CDK 7/Cyclin-H1/p36-Komplex (CAK-Kinase) daran, die CDK2/CyclinA-Kinase zu aktivieren, die für die G₁-S-Phasenüberführung notwendig ist [Schneider et al., 1998]. Kommt es während des G₁-Phasestopps nicht zur Beseitigung der DNS-Schäden, so kann es auch zur Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose, PCD) kommen. Zur Auslösung der Apoptose durch p53 sind mehrere Möglichkeiten bekannt. Die Vermittlung kann dabei über zwei unterschiedliche Proteinfamilien erfolgen. Die eine umfaßt Regulatoren von Signalrezeptoren, die andere direkte Stimulatoren von PCD-Effektorproteinen [Buckbinder et al., 1995; Prisco et al., 1997; Hueber et al., 1997; Susini et al., 1999]. Die Schutzfunktion durch p53 ist wichtig für Lebewesen, da zu einem beschädigten Zellen noch nicht endgültig verloren sind, und zum anderen der gesunde Organismus vor entarteten und nicht mehr zu rettenden Zellen geschützt wird.

Veränderungen am p53 durch Mutationen können jedoch zu einer Verminderung oder sogar Aufhebung der Funktion des Genprodukts führen. Bei über 50 % der Bronchialkarzinome findet man Allelverluste (LOH), die dann meist von Mutationen im zweiten Allel begleitet sind [Greenblatt et al., 1994]. Dieses äußert sich entweder durch nicht nachweisbares p53 oder durch überexprimierte, teils mutiertes p53 (mutp53). Meist führen die Mutationen zur Stabilisierung des Proteins, sodaß dessen Halbwertszeit verlängert wird und es zur Akkumulation kommt. Hierdurch gelingt dann meist ein immunhistochemischer Nachweis [Levine, 1997].

Die Mutationen im p53-Gen zählen zu den am häufigsten in menschlichen Tumoren gefundenen Veränderungen. Meist ist hier bei die Exon 5 bis 8 umfassende

Mittelregion betroffen. In 80-90% der Fälle handelt es sich um sogenannte missense-Mutationen, bei denen durch Punktmutation nur eine Base ausgetauscht wird [Raybaud-Diogene et al., 1996]. Speziell Codon 248 und 273 sind häufig beim Bronchialkarzinom betroffen, während beim Kolonkarzinom oder hepatozellulärem Karzinom vor allem Codon 175 und 249 betroffen sind. Bei Letzteren findet man häufig Transitionen, bei denen Purinbasen gegeneinander ausgetauscht werden [Hollstein et al., 1991]. Während man bei rauchinduzierten Karzinomen häufiger auf Transversionen stößt, bei denen Purin und Pyrimidinbasen an die Stelle der anderen treten. Diese Transversionen werden in Verbindung mit den im Zigarettenrauch vorhandenen mutagenen Benzopyrenen eingebracht [Greenblatt et al., 1994; Ruggeriet al., 1993]. Obwohl die meisten Mutationen von Tumor-Suppressor-Genen rezessiv agieren, genügt hier bereits die Veränderung in nur einem Allel. Ursächlich hierfür ist die Möglichkeit der Komplexbildung ausgehend vom mutierten Protein mit dem Wildtyp. Auch virale und bakterielle Proteine können den Wildtyp binden und seine Funktion behindern, ohne daß eine Mutation vorliegen muß [Raybaud-Diogene et al., 1996]. Komplexbildung oder Mutation im p53-Gen ist allerdings nicht gleichzusetzen mit vollständigem Funktionsverlust des Proteins, denn es konnte gezeigt werden, daß auch mutiertes p53 wie der Wildtyp Apoptose auslösen kann, dies aber langsamer und weniger effizient [Haupt et al., 1995].

Die Fertigkeit, Apoptose ohne Wachstumsstopp abwenden zu können, wird als onkogene Potenz einer Zelle bezeichnet. Hieran beteiligt ist das Produkt des bcl-2-Gens. Dabei handelt es sich um ein integrales 24 kDa Protein der äußeren Mitochondrienmembran, des endoplasmatischen Retikulums und der Zellkernmembran [Hockenbery et al., 1990; Chen-Levy et al., 1989]. Es verhindert die Bildung von Sauerstoffradikalen und die Freisetzung von AIF (apoptosis-inducing factors) und Cytochrom C aus den Mitochondrien [Hockenbery et al., 1993; Dragovich et al., 1998]. Das bcl-2-Gen (B-cell leukaemia / lymphoma 2) ist auf Chromosom 18q21 lokalisiert [Tsujimoto et al., 1984]. Bei gesunden Erwachsenen findet sich bcl-2 in proliferierenden Knochenmarksstammzellen, Duktuszellen von exokrinen Drüsen und in hormonsensitivem Gewebe von Mamma, Prostata und Endometrium [Lu et al., 1993; Hockenbery et al., 1991]. Es wurde erstmals im Zusammenhang mit folliculären Lymphomen beschrieben, bei denen in 85 % der Fälle eine charakteristische t(14;18) Translokation gefunden wurde [Yunis et al., 1987]. Die Folge ist eine Verlagerung des Chromosomenabschnitts 18q21 neben

den von 14q32, welcher für die schweren Ketten der Immunglobuline kodiert [Bakhshiet al., 1985]. Hierdurch gerät die Regulation von bcl-2 außer Kontrolle, was aber alleine noch keine Karzinogenese auslösen kann. Im Gegensatz zu anderen Onkogenen war bcl-2 eines der ersten, die nicht die Proliferation steigern, sondern durch Abwendung der Apoptose wirksam wurden [Korsmeyer, 1992]. Es gibt eine Vielzahl an Beispielen die belegen, daß PCD, ausgelöst durch bestimmte Stimuli, durch bcl-2 abgewehrt werden kann [Yang und Korsmeyer, 1996]. Wird jedoch Apoptose durch Lymphokine oder zytotoxische Killerzellen ausgelöst, so bleibt bcl-2 meist wirkungslos [Vaux et al., 1992].

Zur Ausübung seiner antiapoptotischen Wirkung ist ein 19 Aminosäuren umfassender hydrophober Bereich am c-terminalen Ende des Proteins von Bedeutung, der als Membrananker fungiert. Wird diese Sequenz entfernt, so ist die Funktion des Proteins eingeschränkt. Die Lokalisation von bcl-2 an der Außenmembran der Mitochondrien scheint bedeutend für seine Anti-Apoptose-Funktion zu sein, da es hier an der Regulation der Zytocrom c-Freisetzung beteiligt ist [Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997]. Diese Freisetzung wurde lange als endgültiger Punkt in der Signalkette der Auslösung des programmierten Zelltodes gesehen. Es wurde jedoch entdeckt, daß bcl-2 auch dann noch Apoptose verhindern kann, wenn bereits Zytocrom c freigesetzt wurde, was auf zumindest einen weiteren Mechanismus schließen läßt [Rosse et al., 1998].

Da man bcl-2 bereits in hyperplastisch und dysplastisch veränderten Epithelien nachweisen kann, wird angenommen, daß es bereits in der Frühphase der Karzinogenese eine Rolle spielt [Bronner et al., 1995]. Der Chromosomenabschnitt 18q21, auf dem sich auch das bcl-2-Gen befindet, kann bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) bereits im Tumorstadium „gelöscht“ sein [Shisekiet al., 1994; Tsuchiya et al., 1992]. So könnte der fehlende Nachweis des Proteins bei immunhistochemischen Färbungen auch als Ausfall des Gens selbst betrachtet werden. Neben Onkogenen, die wie bcl-2 Apoptose verhindern können, gibt es auch solche, die das Wachstum von Tumorzellen beeinflussen können. Hierzu zählen auch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, die sich sowohl in normalem Lungengewebe als auch in Bronchialkarzinomen in unterschiedlicher Intensität nachweisen lassen. Dies läßt vermuten, daß eine Reihe autokriner und parokriner Wachstumsstimulationsvorgänge bei der Entwicklung von Lungentumoren beteiligt sind. Eine zentrale Rolle bei Wachstumsprozessen und somit auch der Tumorentstehung

wird insbesondere Tyrosinkinase-Rezeptoren zugesprochen. Hierzu zählen auch Mitglieder der epidermalen Wachstumsfaktorenrezeptorfamilie (EGFR), die wegen ihrer starken Ähnlichkeit mit dem Transformationsgen des avianen Erythroblastosevirus c-erbB-Familie genannt wird [Downward et al., 1984]. Derzeit sind vier Mitglieder dieser Familie bekannt. Das Proto-Onkogen für den von uns untersuchten Transmembranrezeptor HER-2 (p185) ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert. Es kodiert für ein 185 kDa schweres Glykoprotein. Es wird in der Literatur sowohl als HER-2, c-erbB-2 oder HER-2/neu bezeichnet. Das intrazelluläre Segment des Proteins beinhaltet eine ATP-Bindungsstelle und den für die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität verantwortlichen Bereich. Der HER-2-Rezeptor weist bis zu 40 % Übereinstimmung in seiner extrazellulären Portion und bis zu 82 % in seiner intrazellulären Tyrosinkinasedomäne mit dem EGF-Rezeptor (c-erbB-1) auf. Die typischen EGF-Rezeptorliganden EGF (epidermal growth factor) und TGF α (transforming growth factor alpha) verfügen nur über eine geringe Bindungsaffinität zum HER-2-Rezeptor. Typischer Repräsentant der HER-2-Liganden ist Heregulin. Es bindet an den Rezeptor und aktiviert die Tyrosinkinase, wodurch die Zellproliferation gesteigert wird [Holmes et al., 1992]. Gleiches gilt für den Liganden p75 [Harris et al., 1992]. Ein weiterer Vertreter ist ein 30 kDa schweres Glykoprotein, auch gp30 genannt [Lupu et al., 1990].

Man nimmt an, daß c-erbB-2 eine untergeordnete Rolle für die Proliferation eines Tumors spielt. Vielmehr scheint es bedeutend für die Invasivität, Angiogenese und Metastasierungstendenz eines Tumors zu sein [Warri et al., 1991; Yu et al., 1991]. Es wird vermutet, daß für die bevorzugte Absiedlung von Tumorzellen unter anderem parakrine Faktoren des Wirtsgewebes eine wesentliche Rolle spielen. Bei der Ansiedlung von metastasierenden Tumorzellen kann das Gastgewebe sowohl diesen Vorgang durch lokale Abwehrmechanismen behindern, als auch durch parakrine Produktion von Wachstumsfaktoren und proteolytischen Enzymen unterstützen. Man postuliert, daß HER-2 Einfluß auf die Beweglichkeit, das Invasionsverhalten und die Reaktion auf chemotaktische Signale einer Zelle nimmt. Dafür spricht, daß HER-2 in chemotaktisch gereizten Mammakarzinomzellen vor allem an Mikrovilli und Plasmamembranvorstülpungen nachgewiesen wurde, die zum Reiz gerichtet waren (Motilitätstheorie) [DePotter und Quatacker, 1993]. Auch bei Lungenkarzinomen wird ein Zusammenhang zwischen HER-2 und der Invasivität, sowie dem Metastasierungsverhalten vermutet [Yu et al., 1994].

Neben den Prognosefaktoren, die Bedeutung für die Apoptose und das Wachstum von Tumorzellen haben, spielen auch solche eine Rolle, die es dem Immunsystem vermutlich erleichtern, Tumorzellen zu entdecken. Hier zu werden auch Mitglieder der Hitzeschockproteinfamilie (HSP) gezählt, die der Gruppe der Streßproteine angehören. Daß sie dabei nicht nur bei Hitzeschockbehandlungen nachzuweisen sind, ist in vielfältigen Untersuchungen belegt worden [Neidhardt et al., 1984; Subjeck und Shyy, 1986; Watson et al., 1990]. Zuden Streßproteinen werden neben den HSP's auch die GRP's (glucose-regulated protein) gezählt, welche bei Zuckermangelversorgung entdeckt worden sind.

Da es sowohl konstitutive als auch induzierte Hitzeschockproteine gibt, wird vorgeschlagen, erstere als HSC und nur zweitere als HSP zu bezeichnen. Die Klassifizierung erfolgt nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine. Die wichtigsten Vertreter der HSP70-Familie sind dabei HSP72 und HSP73, wobei man nach der oben angebrachten Klassifikation HSP72 als HSP70 bezeichnen würde. Ebenso müßte man dann bei HSP73, welches die konstitutive Form darstellt, von HSC70 sprechen [Welch, 1992; Subjeck und Shyy, 1986].

Sowohl konstitutive als auch die induzierte Form des Proteins kommen im Zytoplasma, Zellkern, Mitochondrien (GRP75) und endoplasmatischem Retikulum (GRP78 (BIP)) vor. HSC70 ist beteiligt bei der Translokation von Proteinen aus dem Zytoplasma ins endoplasmatische Retikulum oder in die Mitochondrien. Es übernimmt in der Zelle Funktionen einer Amme (engl. Chaperon). Die Ammenfunktion umfaßt dabei das Überwachen der richtigen Formierung nativer Polypeptide sowie Wiederherstellung denaturierter Proteine [McKay, 1993; Bukau und Horwich, 1998]. Hitzeschockproteine verhindern das Ausbilden falscher Tertiär- und Quartärstrukturen sowie Interaktionen zwischen neusynthetisierten Polypeptiden und ihrer Umgebung. Der Reiz für die Expression von HSP's kann die Akkumulation von nicht oder falsch gefalteten Proteinen im Zytoplasma oder einem anderen Zellkompartiment sein [Ananthan et al., 1986; Kiang et al., 1994; Mivechi et al., 1994].

Die bisher erwähnten Punkte treffen sowohl für die konstitutive als auch für die induzierbare Form des Hitzeschockproteins 70 zu. Die konstitutive Form ist meistens in so geringer Konzentration in Zellen vorhanden, daß der Nachweis mit herkömmlichen immunhistochemischen Methoden schwerfällt. Die Ursachen, die dazu führen, daß HSP70 nachweisbar wird, lassen sich zusammenfassend als

Streßsituationen für die jeweilige Zelle bezeichnen. Dazu zählen Hitzeschock, Bestrahlung, Behandlung mit Schwermetallionen, Oxidantien, TNF α und andere chemische und physikalische Streßauslöser [Watson, 1990]. Unter gewissen Umständen können Zellen dem durch diese Streßsituationen auslösbaren Tod entrinnen. Wird der Streßreiz zum Beispiel in sublethaler Dosis über längere Zeit appliziert, kann die Zelle durch die sogenannte adaptive Zytoprotektion gerettet werden. Wann und wie nun genau entschieden wird, ob die gestreßte Zelle dem programmierten Zelltod zugeführt wird oder doch ein Rettungsversuch über eine mögliche Hitzeschockproteinaktivierung versucht wird, ist bis heute noch nicht genau geklärt. Jedoch ist bekannt, daß HSP70 Zellen vor dem Zelltod auch dann noch bewahren kann, wenn in diesen bereits durch TNF die Aktivierung der Effektorcaspasen der Apoptose ausgelöst wurde. Ebenso kann es noch eingreifen, wenn bereits Zytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wurde, was früher als irreversibles Todesurteil für die Zelle angesehen wurde. Dies geschieht ebenfalls durch Hemmung der entscheidenden Effektorcaspasen. Die betroffenen Zellen können schon kurze Zeit später wieder normale Wachstumsraten aufweisen [Jaattela et al., 1998].

Anhand chemisch induzierter Tumoren wurde entdeckt, daß Hitzeschockproteine möglicherweise auch als tumorspezifische Antigene agieren können. Sie verleihen dem Immunsystem des Betroffenen einen Angriffspunkt und sind spezifisch für diesen Tumor. Es sind nun aber nicht die Hitzeschockproteine selbst, die für die Tumorummunisierung verantwortlich sind. Nimmt man aus gesundem Gewebe gewonnenes HSP, so läßt sich hiermit keine Immunität bei einem Versuchstier gegen Tumorzellen erzielen, obwohl die Aminosäuresequenz der Proteine mit der von aus dem Tumor gewonnenem HSP übereinstimmt. Möglicherweise fungieren HSP als Antigencarrier. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, daß sowohl HSP90 als auch HSP70 bei Zugabe von ATP ihre Antigenität verlieren, unter Freisetzung eines noch unerforschten niedermolekularen Substrates [Srivastava et al., 1994; Tamura et al., 1993]. Dies führt zu der Vermutung, daß nicht die Hitzeschockproteine selbst, sondern die gebundenen Substrate als Antigene fungieren. Diese Stoffe scheinen antigen und tumorspezifisch zu sein, denn in normalen Zellen binden Hitzeschockproteine zwar auch Peptide, jedoch agieren diese nicht antigen. Daß HSP70 eine Rolle in der Antigenpräsentation spielt, überrascht nicht bei der großen Ähnlichkeit zu den Proteinen der MHCKlasse-1 [Gething und Sambrook, 1992].

Bei verschiedenen Malignomen entdeckte man, daß das Auftreten von HSP's neben der Aktivierung von antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten auch zur Bildung von gegen den jeweiligen Tumor gerichteten Antikörpern führt [Udono und Srivastava, 1993; Srivastava, 1993, Robert et al., 2002, Yoshino et al., 1994]. Die körpereigene Immunantwort spielt für den Verlauf einer Tumorerkrankung eine elementare Rolle. Somit könnte die Mindereexpression von HSP's dazu führen, daß einzelne Tumorzellen durch das Immunsystem nicht erkannt werden und somit im Körper verbleiben können, was die Prognose der Tumorerkrankung nachhaltig beeinflussen würde. Bestärkt wird diese Annahme durch die Entdeckung, daß die Oberflächenexpression von HSP70 mit einer erhöhten Sensitivität von Bronchialtumorzellen für durch Natürliche Killerzellen ausgelöste Lyse einhergeht [Botzler et al., 1996].

Die HSC60-Familie besteht aus den GroEL-verwandten Proteinen in Eubakterien, Mitochondrien und Chloroplasten, der TCP-1-Gruppe (CCCT oder TriC) im Eukaryontenzytosol und GroEL in *E. coli*. Es handelt sich um große Proteine, die eine zentrale Vertiefung als Substratbindungsdomäne besitzen. Die Regulation erfolgt durch Chaperonin 10 (cpn10). HSC60 ist vor allem in Mitochondrien zu finden und besteht aus einem Doppelring. Ebenso wie HSC70 ist auch HSC60 an den Faltungsprozessen neuer Proteine beteiligt. HSC60 weist wie HSC70 ein ATP-abhängiges Bindungsverhalten auf und verhindert ebenfalls das Ausbilden falscher Tertiär- und Quatärstrukturen, ohne aktiv in den Faltungsprozeß einzugreifen [Cheng et al., 1989; Hightower, 1980; Hartman et al., 1992]. Das humane Hitzeschockprotein 60 weist übereinstimmende Sequenzabschnitte mit einer Vielzahl an Autoantigenen auf. Gefunden wurden solche Homologien zu Autoantigenen bei insulinabhängigem Diabetes mellitus, Hashimoto-Thyreoiditis, Glomerulonephritis, Sklerodermie, Pemphigoid, rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose, Morbus Addison und anderen Autoimmunerkrankungen [Jones et al., 1993]. Auch HSC60 respektive HSP60 kann, wie HSP70, als tumorspezifisches Antigen reagieren. Dabei fungiert es nicht selbst als Antigen, sondern ebenfalls als Antigen-carrier.

Die kleinsten Hitzeschockproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 12-43 kDa werden zu einer Gruppe zusammengefaßt. HSC27 läßt sich nicht nur in Tumoren finden, sondern auch in gesunden Proben von Mamma, Uterus, Zervix, Plazenta, Haut, Thrombozyten und anderen [Ciocca et al., 1993]. Die meisten von ihnen werden aber nur unter Streßbedingungen produziert. Sie können in vitro bereits

denaturierte Proteine binden und deren Aggregation verhindern. Im Gegensatz zu größeren Hitzeschockproteinen ist das Bindungsverhalten ATP-unabhängig und sehr beständig. Vermutlich ermöglichen sie hierdurch HSC70, die an sie gebundenen Proteine in Phasen höherer ATP-Verfügbarkeit zu renaturieren. Dem kleinsten von uns untersuchten Hitzeschockprotein wird, wie den anderen beiden ebenfalls, eine zytoprotektive Funktion zugeschrieben. HSP27 bietet wie HSP70 einen wirksamen Schutz gegenüber Hitzestress und anderen physikalischen Apoptosesignalen, mit Ausnahme von UV-Strahlung. Hitzeschockprotein 27 kann Apoptose zum einen direkt, durch seine Funktion als Chaperon über Schutz von Proteinen vor Oxidation, als auch indirekt, durch Anhebung des Glutathionspiegels und daraus resultierendem Schutz vor oxidativem Stress, verhindern [Mehlen et al., 1996; Preville et al., 1999]. Die Möglichkeit von HSP27 und HSP70 den programmierten Zelltod abzuwenden, beschränkt sich nicht nur auf natürliche Vorgänge, sondern limitiert auch den Behandlungserfolg bestimmter Chemotherapeutika, welche gerade über die Aktivierung der Apoptose wirken. Hitzeschockproteine werden auch mit Therapieresistenz und MDR (multi drug resistance) in Verbindung gebracht. Diese stellen ein großes Problem in der Behandlung maligner Tumoren dar, da hierdurch die Tumoren mit der Zeit unempfindlich gegen die angewandte Therapie werden können. Dabei kann HSF1, eines der Regulatorproteine der HSP-Expression, ebenfalls an die Promotorregion des MDR1-Gens binden mit der Folge eines erhöhten P-Glykoprotein-Levels [Vilaboa et al., 2000]. Möglicherweise sind deshalb Patienten, deren Tumoren HSP überexprimieren, weniger empfindlich für bestimmte Chemotherapeutika, was wiederum einen wichtigen prognostischen Faktor für die Patienten darstellen würde. In Zelllinien von Ovarialkarzinomen konnte gezeigt werden, daß die Expression von HSP27 mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin einherging, während das Blockieren der HSP27-Expression die Zellen empfindlicher für Cisplatin werden ließ [Yamamoto et al., 2001]. Ähnliche Ergebnisse wurden bei 98 untersuchten Kopf-Hals-Tumoren gefunden. Es wurde zusätzlich ein Zusammenhang zwischen HSP27-Expression und Thermotherapie-resistenz ermittelt, nicht jedoch eine Korrelation mit der ebenfalls untersuchten Bestrahlungsresistenz, sodaß hierbei wahrscheinlich andere Mechanismen eine Rolle spielen [Fortin et al., 2000]. Bei Mammakarzinomen korreliert eine HSP70-Überexpression signifikant mit einer geringeren Differenzierung und einer schlechteren Prognose [Lazaris et al., 1997].

Es ist offensichtlich, daß es nicht den mustergültigen Prognosefaktor gibt. Vielmehr muß man sich auf die Suche nach einem geeigneten Muster von möglichen Prognosefaktoren begeben, um in Zukunft eine individuelle Prognose und angemessene Therapie für jeden einzelnen Patienten anfertigen zu können.

1.5 Aufgabenstellung

Die Prognose des NSCLC hat sich mit Ausnahme der Stadien IIIA und IIIB in den letzten 15 Jahren nicht verbessern lassen. Die limitierenden Faktoren in der Therapie des NSCLC stellen das Auftreten von Fernmetastasen und die Entwicklung von Lokalrezidiven dar. Sie sind als Zeichen des malignen Potentials des Primärtumors zu werten, welches wahrscheinlich durch bestimmte genetische Veränderungen in der DNS des Tumors begründet ist und Ausdruck in einem veränderten Proteinmuster der Tumorzelle findet. Welche betroffenen Proteine als krebsassoziierte Marker bzw. Prognosefaktoren für das NSCLC in Frage kommen, soll anhand immunhistochemischer Färbungen von Primärtumoren und dazugehörigen Lymphknoten aus einer Therapievergleichsstudie überprüft werden. Hierbei handelt es sich um ein besonderes Patientenkollektiv. Denn es werden ausschließlich Patienten mit einem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom im Stadium IIIA mit pathologisch gesichertem N2-Befall nach vollständiger Tumorresektion untersucht, die keine neoadjuvante Strahlen- oder Chemotherapie erhalten haben. Die oben beschriebenen Proteine (p53, bcl-2, HER-2, HSP70, HSP60 und HSP27) stellen aufgrund der vorliegenden Daten zentrale Regulatoren im Zellzyklus oder in der Immunantwort auf maligne Zellen dar. Aus diesem Grund soll ihre prognostische Bedeutung für das NSCLC überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Immunhistochemie und Immunzytochemie

- Brutschrank Heraeus (Hanau)
- Copeline-Gefäße Sigma (München)
- Deckgläser (24x60mm) Menzel-Gläser (Braunschweig)
- Färbeküvetten Kochembe (Marburg)
- Feuchtkammer eigene Herstellung
- Filterpapier für Feuchtkammer Schleicher & Schüll (Dassel)
- Mikrotom 1515 Leitz (Wetzlar)
- Mikrowelle 650 Watt Privileg (Fürth)
- Nagellack Nivea Beaute (klar) Beiersdorf AG (Hamburg)
- Objektträger (26x76mm) Menzel-Gläser (Braunschweig)
- Objektträgerkasten für 100 Objektträger Kobe (Marburg)
- PapPen (Fettstift) Immunotechemie (Hamburg)
- Wasserbecken Kobe (Marburg)

Mikroskopie:

- Filme: Kodak Ektachrome 64 professional Kodak (USA)
- Kamera: Wild MPS 12 Wild (Schweiz)
- Mikroskop: Labovert (Fotos und Zellzählung) Leitz (Wetzlar)
- Mikroskop: Orthoplan (Präparateauswertung) Leitz (Wetzlar)

Zellzählung:

- ZählkammernachNeubauer Kobe(Marburg)

Zentrifugen:

- BiofugeA Heraeus(Hanau)
- Cryofuge5000 Heraeus(Hanau)
- Cytospin2 Shandon(England)

Zytozentrifugation:

- Aufschleudertrichter($\varnothing=7\text{mm}/12\text{mm}$) Shandon(England)
- Deckgläser(24x24mm) Menzel- Gläser(Braunschweig)
- Einfrierkastenfür50Objektträger Kobe (Marburg)
- FilterpapierfürZytozentrifugenpräparate Schlei cher&Schull(Dassel)
- Objektträger(26x76mm) Menzel- Gläser(Braunschweig)
- ObjektträgerhalterungfürZytozentrifuge Shandon(England)

2.1.2.ReagenzienundChemikalien

A

- AB-Serum Biotest(Dreieich)
- Azeton Baker(Holland)
- Aminopropyltriethoxysilane(APES) Sigma(München)
- Aquadestillata Kliniksapotheke

B

- B-SASuperSensitivImmunostainingKit BioGene x(Hamburg)

D

- DAB(3,3´-Diaminobenzidin)SubstrateKit Vector(USA)
- Dinatriumhydrogenphosphat Merck(Darmstadt)

E

- Entellan Merck(Darmstadt)
- Ethanol(vergällt) Kliniksapotheke
- Ethylendiamintetraazetizazid(EDTA)0,02% Gibco BRL(Eggenstein)

F

- FastRedSubstratePack BioGenex(Hamburg)
- FötalesKälberserum(10%) GibcoBRL(Eggenstein)

H

- Häkalaun Kliniksapotheke

K

- KaisersGlyzeringelatine Merck(Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat Merck(Darmstadt)
- Kaliumhydrogenkarbonat Merck(Darmstadt)

L

- Levamisol Sigma (München)

M

- Methanol Kliniksapotheke

N

- Natriumchlorid Merck(Darmstadt)
- Natronlauge(1N) Merck(Darmstadt)
- NewFuchsinSubstrateSystem Dako(Hamburg)
- NormalHorseSerum Vector(USA)

R

- RPMI1640(+2mmolL-Glutamin) GibcoBRL(E ggenstein)

S

- Salzsäure(1N) Merck(Darmstadt)

T

- Trypanblau Kliniksapotheke

V

- VectastainEliteABCKit Vector(USA)

W

- Wasserstoffperoxid Merck(Darmstadt)

X

- Xylol M erck(Darmstadt)

Z

- Zitronensäuremonohydrat Merck(Darmstadt)

2.1.3. Antikörper

Primärantikörper(monoklonalMausAnti-Human):

- BCL-2Oncoprotein(Klon124;M0887) Dako(Hamburg)
- c-erbB-2Oncoprotein(KlonCBE1) NovoC astra(England)
- c-erbB-2Oncoprotein(KlonCB11) NovoCast ra(England)
- HeatShockProtein27(KlonG3.1) BioG enex(Hamburg)
- HeatShockProtein60(KlonLK1) Si gma(München)
- HeatShockProtein70(KlonBRM-22) Sigm a(München)
- HeatShockProtein70(KlonBRM-22) BioG enex(Hamburg)
- HeatShockProtein70(Klon8B11) N ovoCastra(England)
- p53Protein(KlonDO-7) NovoCastra(England)
- p53Protein(KlonDO-7) BioGenex(Hamburg)

Primärantikörper(Negativkontrolle):

- MouseIgG1(MOPC-21) Sigma(München)

Sekundärantikörper:

- RabbitAnti-MouseImmunglobulins(Z0259) Dako(Hamburg)

KonjugierterSekundärantikörper:

- BiotinyliertesAnti-ImmunglobulininPBSmit BioGenex(Hamburg)
Trägerproteinund0,09%Natriumazid
- BiotinyliertesAnti-MouseIgG(H+L) Vector(USA)

Konjugierte Tertiärantikörper:

- Alkaline Phosphatase and mouse monoclonal Anti-Alkaline Phosphatase (APAAP/D0651) Dako (Hamburg)
- Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin in PBS mit Trägerprotein und 0,09% Natriumazid BioGenex (Hamburg)
- Vectastain Elite ABC Reagent Vector (USA)

2.1.4. Puffer und Adhäsivlösung

- 10x PBS (Waschpuffer für die Immunhistochemie):
 - 1,35 M NaCl
 - 0,08 M Na_2HPO_4
 - 0,015 M KH_2PO_4
 - pH=7,6
- Zitratpuffer (Antigendemaskierung):
 - 2,1g Zitratmonohydrat
 - 900ml Aquadestillata
 - ca. 13ml NaOH
 - pH=6,0
- Adhäsivlösung (Schnitthaftungsverbesserung):
 - 4ml Aminopropyltriethoxysilane (APES)
 - 200ml Aceton

2.2 Patientenproben

Die Primärtumoren und dazugehörigen Lymphknoten stammen von NSCLC-Patienten aus einer Therapievergleichsstudie. Hierbei handelt es sich ausschließlich um Patienten mit einem pathologisch gesicherten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom im Stadium IIIA mit N2-Befall nach vollständiger Tumorresektion, die keine neoadjuvante Strahlen- oder Chemotherapie erhalten haben. Die Proben wurden mit Formalin fixiert und in Paraffineingeleitet.

Tumorproben

<u>Gesamt</u>	(n=34)
– Plattenepithelkarzinome	(n=19)
– Adenokarzinome	(n=11)
– bronchoalveoläre Karzinome	(n=2)
– adenosquamöse Karzinome	(n=2)

Lymphknotenproben

<u>Gesamt</u>	(n=32)
– Plattenepithelkarzinome	(n=17)
– Adenokarzinome	(n=11)
– bronchoalveoläre Karzinome	(n=2)
– adenosquamöse Karzinome	(n=2)

2.3 Kontrollproben und Antikörper-Testung

Zur Überprüfung der eingesetzten Antikörper und des Färbeverfahrens wurden Kontrollproben verwendet, die vom Hersteller des betreffenden Primärantikörpers zum Nachweis empfohlen wurden. Die Kontrollproben wurden freundlicherweise von der hiesigen Pathologie und der eigenen Abteilung bereitgestellt.

An den Kontrollproben wurde die optimale Verdünnung des Primärantikörpers mit 1:10 PBS-verdünntem AB-Serum getestet. Hierzu wurden Verdünnungen des Antikörpers von 1:10, 1:50, 1:100 und 1:400 erstellt. Die verwendeten Primärantikörper sind mit den optimalen Verdünnungen angegeben.

- Mammakarzinom (MAM1) für HSP27 BioGenex (Klon G3. 1) 1:100
- Mammakarzinom (MAM2) für HSP60 Sigma (Klon LK1) 1:400
- Mammakarzinom (5810) für HSP70 BioGenex (Klon BRM-22) 1:100
- Pankreaskarzinom (13689/98) für p53 NovoCastra (Klon DO-7) 1:100
- Mammakarzinom (A4500/95a) für BCL-2 DAKO (Klon 124; M0887) 1:50
- Mammakarzinom (5400/96) für HER-2 NovoCastra (Klon CB11) 1:50
- Negativkontrolliertes jeweiliges Tumorsigma (M OPC-21) 1:400

2.4. Methoden

2.4.1 Präparateherstellung

2.4.1.1 Objektträgervorbehandlung

Durch die häufige Abspülung der Gewebeschnitte beim Färbeprozess können sie vom Objektträger gelöst werden. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurden die Objektträger mit einer Adhäsivlösung vorbehandelt. Dazu wurden die Objektträger für jeweils 10 Minuten zunächst in ein Azetonbad, dann in eine APES-Azetonlösung getaucht. Danach folgten für je 5 Minuten zwei Bäder in Aqua destillata. Abschließend wurden die Objektträger bei 60°C im Wärmeschrank getrocknet.

2.4.1.2 Gewebearbeitung

Die eingesandten Tumor- und Lymphknotenparaffinblöcke wurden bei -20 °C gelagert. Mit einem Serienmikrotom wurden 4 µm dicke Schnittpräparate angefertigt und sofort in ein 35°C warmes Wasserbad verbracht. Von dort wurden sie auf einen vorbereiteten Objektträger gezogen. Zur Verbesserung der Gewebefixierung wurden die so erstellten Präparate zum Trocknen für eine Stunde bei 60°C in den Wärmeschrank gestellt. Danach wurden sie in Objektträgerkästen kühl und trocken gelagert.

2.4.1.3 Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Präparate wurden zuerst für 30 Minuten in einen Wärmeschrank (60°C) gestellt. Anschließend wurden sie für 10 Minuten in ein Xylolbad gelegt. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Danach folgte ein Bad in Ethanolabsolut für 10 Minuten, welches im Anschluß nochmals der Reihe nach mit 96%igem, 80- und 70%igem Ethanol durchgeführt wurde (Alkoholreihe). Bis zu diesem Punkt der Vorbereitung ist das Vorgehen bei den drei angewandten Färbemethoden identisch. Da sie sich ab hier in den Folgeschritten unterscheiden, werden sie einzeln vorgestellt.

2.4.2.Färbemethoden

2.4.2.1 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP)

Der sogenannten Alkoholreihe folgte bei dieser Methode das Spülen der Schnitte in Aqua destillata für 5 Minuten. Gleichzeitig wurden Copeline-Gefäße mit Zitratpuffer aufgefüllt, in denen die Objektträger für 10 Minuten in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt wurden, um eine bessere Demaskierung von Antigenen zu erreichen. Die Pufferverluste durch die Mikrowellenbehandlung wurden etwa alle 2 Minuten ausgeglichen, so daß die Schnitte stets vollständig von Zitratpuffer bedeckt waren. Nachdem dieser Vorgang nochmals mit neuem Puffer wiederholt wurde, erfolgte das Abkühlen der Schnitte für 15 Minuten in den Copeline-Gefäßen. Anschließend erfolgte das Spülen mit PBS für 5 Minuten. Um das Färben zu erleichtern und die zu verbrauchende Menge an Substanzen gering zu halten, wurden die Tumorschnitte nun mit dem Pap Pen in sicherem Abstand umrandet und in feuchte Kammern gelegt. Im Anschluß wurde die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit AB-Serum bedeckt, welches 1:10 mit PBS versetzt war. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um unspezifische Bindungen im Gewebe abzudecken. Nachdem das AB-Serum vorsichtig abgetropft wurde, erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper für eine Stunde bei 37 °C in einem Wärmeschrank. Nach dieser Stunde wurden die Objektträger dreimal für je 2 Minuten in PBS getaucht. Im Anschluß daran wurde bei Raumtemperatur der Sekundärantikörper Z259, 1:20 verdünnt mit AB-Serum, für eine Stunde aufgebracht. Erneut wurden die Objektträger dreimal für je 2 Minuten in PBS getaucht. Nachfolgend wurden die Schnitte für eine Stunde mit APAAP, welches 1:100 mit AB-Serum verdünnt war, benetzt. Abschließend wurden die Objektträger dreimal für je 2 Minuten in PBS getaucht. Gleichzeitig wurden für die Neufuchsinanfärbung das Chromogen und der Substratansatz nach Protokoll vorbereitet. Dem Mischen beider Lösungen folgte das Aufbringen auf die Objektträger. Die Schnitte wurden nach 10 Minuten Einwirkzeit mit Aqua destillata abgespült, mit Hämalaun gegengefärbt und mit warmem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden sie mit vorgewärmter Glyzerin-gelatine eingedeckt. Zur besseren Konservierung der Schnitte wurden die Ränder des Deckglases mit Nagellack abgedichtet.

2.4.2.2 Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC)

Der Alkoholreihe schloß sich bei dieser Methode, um eine übermäßige Hintergrundfärbung zu vermeiden, das Blocken der endogenen Peroxidase an. Die Schnitte wurden hierzu bei Raumtemperatur für 30 Minuten in ein Bad aus 200 ml Methanol und 6 ml 30%igem Wasserstoffperoxid gestellt. Anschließend erfolgte eine Mikrowellenbehandlung, wie sie bei der APAAP-Methode beschrieben wurde. Um die Demaskierung von Antigenen zu forcieren, wurde eine Trypsinandaugung für 15 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank durchgeführt. Die Schnitte wurden dann gründlich mit Aquadestillat abgespült, mit dem PapPen umrandet und in die feuchten Kammern gelegt. Es wurde dann eine Vorinkubation mit 1:10 PBS-verdünntem Normal Horse Serum zur Abdeckung unspezifischer Bindungen im Gewebe vorgenommen. Dem Abtropfen des Normal Horse Serums nach 20 Minuten folgte das Aufbringen des Primärantikörpers auf die Gewebeschnitte. Die Objektträger wurden so für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es wurde weiterhin, wie bei der APAAP-Methode beschrieben, mit PBS gespült. Im Anschluß wurde die Schnitte mit dem konjugierten Sekundärantikörper für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur bedeckt. Nach dem erneuten Spülen mit PBS, wurde eine ABC-Komplex-Lösung für eine halbe Stunde aufgebracht. Ein letztes Mal wurde mit PBS gespült und die Schnitte mit dem vorbereiteten DAB-Substrat-Kit für zehn Minuten inkubiert. Der Gegenfärbung mit Hämalaun und dem Bläuen in warmem Leitungswasser folgte dann eine aufsteigende Alkoholreihe. Abschließend wurde die Objektträger dann in 3 Xylolbäder für je 5 Minuten getaucht. Das Eindecken erfolgte mit Entellan. Zur besseren Konservierung der Schnitte wurden auch hier die Ränder des Deckglases mit Nagellack abgedichtet.

2.4.2.3 Biotin-Streptavidin-Methode (B-SA)

Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Methoden folgte hier nicht eine Mikrowellenbehandlung, sondern eine 10 stündige Inkubation der Objektträger mit Zitratpuffer in einem Wärmeschrank bei 60 °C. Danach wurden sie für 5 Minuten mit PBS abgespült. Anschließend wurden die Schnitte mit einem PapPen umrandet, in feuchte Kammern gelegt und für 20 Minuten mit 1:10 PBS-verdünntem AB-Serum versetzt. Danach wurde für 45 Minuten bei 37 °C die Inkubation mit dem Primärantikörper durchgeführt. Es folgte, wie bei der APAAP-Methode beschrieben, das Spülen mit PBS. Hieranschloß sich das Aufbringen des Linkantikörpers für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur an. Nach erneutem Spülen mit PBS, wurden die Schnitte mit dem Labelantikörper für eine halbe Stunde inkubiert. Dem letzten Spülen mit PBS folgte das Aufbringen der vorbereiteten Fast-Red-Lösung für 10 Minuten. Danach wurden die Objektträger in Aquadestillatagesteilt. Nach dem die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt und in Wasser gebläut wurden, erfolgte das Eindecken mit vorgewärmter Glyzerin-gelatine. Auch hier wurden die Deckglasränder mit Nagellack abgedichtet.

2.4.4 Auswertung

2.4.4.1 Auswertung immunhistochemischer Präparate

Die gefärbten Tumorschnitte wurden von drei Personen mit einem Phasenkontrastmikroskop bei 100facher und 400facher Vergrößerung unabhängig voneinander beurteilt. Die Bewertung der Färbung als positiver Nachweis für das jeweils gesuchte Antigen richtete sich nach vorgegebenen pathologischen Kriterien bezüglich der Quantität und der Lokalität der Anfärbung. Desweiteren mußte immer durch eine mitzuführende Negativkontrolle eine unspezifische Anfärbung ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung von Positivkontrollen wurde das korrekte Einhalten des Färbeprotokolls überprüft und die Möglichkeit falscher Ergebnisse aufgrund von Färbefehlern minimiert. Bei unterschiedlicher Beurteilung eines Präparates wurde eine erneute Färbung des jeweiligen Tumors unter gleichen Bedingungen durchgeführt und erneut unabhängig voneinander beurteilt.

3. Ergebnisse

Das durchschnittliche Alter der 34 Patienten betrug 57,6 Jahre (39–73 Jahre). In 50 % der analysierten Primärtumoren bestand ein Differenzierungsgrad G2 und in 50 % ein Differenzierungsgrad G3. Alle vorhandenen 34 Tumorschnitte wurden auf die vorgestellten möglichen Prognosefaktoren untersucht.

<u>Gesamt</u>	(n=34)
– Plattenepithelkarzinome	(n=19)
– Adenokarzinome	(n=11)
– bronchoalveoläre Karzinome	(n=2)
– adenosquamöse Karzinome	(n=2)

dabei lagen von 27 Patienten sowohl eine Tumorprobe als auch eine Lymphknotenprobe vor.

Lymphknotenprobe von Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom

<u>Gesamt</u>	(n=27)
– Plattenepithelkarzinome	(n=14)
– Adenokarzinome	(n=9)
– bronchoalveoläre Karzinome	(n=2)
– adenosquamöse Karzinome	(n=2)

3.1. Färbung von p53

3.1.1 Färbung der Primärtumoren mit dem p53-Antikörper

Von den 34 auf p53 untersuchten Tumoren waren 16 (47,05 %) positiv (s. Abb. 1 im Anhang). Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologien stellen sich wie folgt dar:

– Plattenepithelkarzinome(8/19)	42,10%
– Adenokarzinome(7/11)	63,63%
– bronchoalveoläre Karzinome(0/2)	0%
– adenosquamöse Karzinome(1/2)	50%

Vergleich von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen bezüglich p53 Überexpression

Plattenepithelkarzinome(8/19)	42,10%
Adenokarzinome(7/11)	63,63%
Fisher exact test	p=0,3216

p53 Überexpression und Differenzierungsgrad

G2(9/14)	64,28%
G3(6/15)	40,00%
Fisher exact test:	p=0,2584

3.1.2 Färbung der Lymphknoten mit dem p53-Antikörper

Von den 27 auf p53 untersuchten Lymphknoten waren 15 (55,55 %) positiv. Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologien stellen sich wie folgt dar:

– Plattenepithelkarzinome(8/14)	57,14%
– Adenokarzinome(6/9)	66,66%
– bronchoalveoläre Karzinome(0/2)	0%
– adenosquamöse Karzinome(1/2)	50%

Vergleich der Lymphknoten von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen bezüglich p53-Überexpression

Plattenepithelkarzinome(8/14)	57,14%
Adenokarzinome(6/9)	66,66%
Fisher exact test	p=0,6223

p53-Überexpression und Differenzierungsgrad der Lymphknoten	
G2(7/11)	63,63%
G3(7/11)	63,63%
Fisher exact test:	p=0,6821

Bei 3 p53 negativen Plattenepithelkarzinomen war der dazugehörige Lymphknoten positiv für das untersuchte Antigen. Gleiches wurde bei einem p53 negativen Adenokarzinom gefunden. Umgekehrt lagen bei einem Plattenepithelkarzinom und einem Adenokarzinom, die beide p53 positiv waren, p53 negative Lymphknoten vor.

3.2. Färbung von bcl-2

3.2.1 Färbung der Primärtumoren mit dem bcl-2-Antikörper

Alle 34 Primärtumorproben stellten sich in der immunhistochemischen Analyse für bcl-2 negativ dar. Durch das Mitführen einer mehrfach kontrollierten Positivkontrolle (s. Abb. 2 im Anhang) und zweimaligem Wiederholen der Färbung aller Schnitte konnte ein methodisch bedingter Fehler ausgeschlossen werden.

3.2.2 Färbung der Lymphknoten mit dem bcl-2-Antikörper

Von den 27 auf bcl-2 untersuchten Lymphknoten wies keiner eine als eindeutig positiv zu bewertende Anfärbung auf. Auch hier konnte ein methodisch bedingter Fehler ausgeschlossen werden.

3.3. **Färbung von HER-2**

3.3.1 Färbung der Primärtumoren mit dem HER-2-Antikörper

Von den 30 auf HER-2 untersuchten Tumoren waren 3 (10%) positiv (s. Abb. 3 im Anhang). Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologien stellen sich wie folgt dar:

– Plattenepithelkarzinome (1/15)	6,66%
– Adenokarzinome (1/11)	9,09%
– bronchoalveoläre Karzinome (1/2)	50%
– adenosquamöse Karzinome (0/2)	0%

Vergleich von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen bezüglich HER-2 Überexpression

Plattenepithelkarzinome (1/15)	6,66%
Adenokarzinome (1/11)	9,09%
Fisher exact test	p=1,3538

HER-2 Überexpression und Differenzierungsgrad

G2 (1/11)	9,09%
G3 (1/11)	9,09%
Fisher exact test:	p=1,5238

3.3.2 Färbung der Lymphknoten mit dem HER-2-Antikörper

Von den 23 auf HER-2 untersuchten Lymphknoten waren 3 (13,04%) positiv. Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologien stellen sich wie folgt dar:

– Plattenepithelkarzinome(0/10)	0%
– Adenokarzinome(2/9)	22,22%
– bronchoalveoläre Karzinome(1/2)	50%
– adenosquamöse Karzinome(0/2)	0%

Vergleich der Lymphknoten von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen bezüglich HER-2 Überexpression

Plattenepithelkarzinome(0/10)	0%
Adenokarzinome(2/9)	9,09%
Fisher exact test	p=n.b.

HER-2 Überexpression und Differenzierungsgrad der Lymphknoten	
G2(2/11)	18,18%
G3(0/11)	0%
Fisher exact test:	p=n.b.

Der dem positiven Plattenepithelkarzinom zugehörige Lymphknoten war negativ für HER-2. Der Lymphknoten eines HER-2 negativen Adenokarzinoms war positiv für HER-2.

3.4. Färbung von HSP27

3.4.1 Färbung der Primärtumoren mit dem HSP27-Antikörper

Von den 34 auf HSP27 untersuchten Tumoren waren 29 (85,29%) positiv (s. Abb. 10 im Anhang). Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologien stellen sich wie folgt dar:

– Plattenepithelkarzinome (17/19)	89,47%
– Adenokarzinome (8/11)	72,72%
– bronchoalveoläre Karzinome (2/2)	100%
– adenosquamöse Karzinome (2/2)	100%

Vergleich von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen bezüglich HSP27 Überexpression

Plattenepithelkarzinome (17/19)	89,47%
Adenokarzinome (8/11)	72,72%
Fisher exact test	p=0,4025

HSP27 Überexpression und Differenzierungsgrad

G2 (13/14)	92,85%
G3 (12/15)	80,00%
Fisher exact test:	p=0,6513

3.4.2 Färbung der Lymphknoten mit dem HSP27-Antikörper

Von den 27 auf HSP27 untersuchten Lymphknoten waren 25 (92,59%) positiv (s. Abb. 9 im Anhang). Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologien stellen sich wie folgt dar:

– Plattenepithelkarzinome(14/14)	100%
– Adenokarzinome(7/9)	77.77%
– bronchoalveoläre Karzinome(2/2)	100%
– adenosquamöse Karzinome(2/2)	100%

Vergleich der Lymphknoten von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen bezüglich HSP27-Überexpression

Plattenepithelkarzinome(14/14)	100%
Adenokarzinome(7/9)	77.77%
Fisher exact test	p=n.b.

HSP27-Überexpression und Differenzierungsgrad

G2(11/11)	100%
G3(9/11)	81,81%
Fisher exact test:	p=n.b.

Bei 2 HSP27 negativen Adenokarzinomen war der dazugehörige Lymphknoten positiv für das Hitzeschockprotein 27. Gleiches wurde bei einem HSP27 negativen Plattenepithelkarzinom gefunden. Umgekehrt lagen bei 2 Plattenepithelkarzinomen, die beide HSP27 positiv waren, negative Lymphknoten vor.

3.5. Färbung von HSP60

3.5.1 Färbung der Primärtumoren mit dem HSP60-Antikörper

Von den 34 auf HSP60 untersuchten Tumoren waren 21 (61,76%) positiv (s. Abb. 7 im Anhang). Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologien stellen sich wie folgt dar:

– Plattenepithelkarzinome (13/19)	68,42%
– Adenokarzinome (5/11)	45,45%
– bronchoalveoläre Karzinome (1/2)	50%
– adenosquamöse Karzinome (2/2)	100%

Vergleich von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen bezüglich HSP60-Überexpression

Plattenepithelkarzinome (13/19)	68,42%
Adenokarzinome (5/11)	45,45%
Fisher exact test	p=0,2898

HSP60-Überexpression und Differenzierungsgrad

G2 (9/14)	64,28%
G3 (10/15)	66,66%
Fisher exact test	p=0,6006

3.5.2 Färbung der Lymphknoten mit dem HSP60-Antikörper

Von den 27 auf HSP60 untersuchten Lymphknoten waren 12 (44,44%) positiv (s. Abb. 8 im Anhang). Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologien stellen sich wie folgt dar:

– Plattenepithelkarzinome (5/14)	35,71%
– Adenokarzinome (5/9)	55,55%
– bronchoalveoläre Karzinome (1/2)	50%
– adenosquamöse Karzinome (1/2)	50%

Vergleich der Lymphknoten von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen bezüglich HSP60-Überexpression

Plattenepithelkarzinome(5/14)	35,71%
Adenokarzinome(5/9)	55,55%
Fisher exact test	p=0,4410

HSP60-Überexpression und Differenzierungsgrad der Lymphknoten	
G2(6/11)	54,54%
G3(5/11)	45,45%
Fisher exact test:	p=0,6051

Bei 5 HSP60 positiven Plattenepithelkarzinomen war der zugehörige Lymphknoten negativ für das Hitzeschockprotein 60. Gleiches wurde bei einem HSP60 positiven adenosquamösen Karzinom gefunden.

3.6. Färbung von HSP70

3.6.1 Färbung der Primärtumoren mit dem HSP70-Antikörper

Von den 34 auf HSP70 untersuchten Tumoren waren 8 (23,52%) positiv (s. Abb. 5 im Anhang). Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologien stellen sich wie folgt dar:

– Plattenepithelkarzinome(6/19)	31,57%
– Adenokarzinome(1/11)	9,09%
– bronchoalveoläre Karzinome(0/2)	0%
– adenosquamöse Karzinome(1/2)	50%

Vergleich von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen bezüglich HSP70Überexpression

Plattenepithelkarzinome(6/19)	31,57%
Adenokarzinome(1/11)	9,09%
Fisherexacttest	p=0,3427

HSP70ÜberexpressionundDifferenzierungsgrad

G2(2/14)	14,28%
G3(3/15)	20,00%
Fisherexacttest	p=0,7479

3.6.2 FärbungderLymphknotenmitdemHSP70-Antikörper

Vonden27aufHSP70untersuchtenLymphknotenwaren4 (14,81%) positiv (s. Abb. 6 im Anhang). Die Resultate im Hinblick auf die unterschiedlichen Histologienstellensichwiefolgt dar:

– Plattenepithelkarzinome(2/14)	14,28%
– Adenokarzinome(1/9)	11,11%
– bronchoalveoläreKarzinome(1/2)	50%
– adenosquamöseKarzinome(0/2)	0%

Vergleich der Lymphknoten von Plattenepithelkarzinomen und AdenokarzinomenbezüglichHSP70Überexpression

Plattenepithelkarzinome(2/14)	14,28%
Adenokarzinome(1/9)	11,11%
Fisherexacttest	p=1,3360

HSP70ÜberexpressionundDifferenzierungsgradderLymphknoten

G2(2/11)	18,18%
G3(1/11)	9,09%
Fisherexacttest:	p=1,000

Bei 3 Plattenepithelkarzinomen und einem adenosquamösen Karzinom, die alle vier positiv für HSP70 waren, lagen negative Lymphknoten vor. Umgekehrt wurden bei 2 Plattenepithelkarzinomen und einem Adenokarzinom, welche alle dreinegativ waren, HSP70 positive Lymphknoten gefunden.

3.7 Vergleich der Färbungen von Primärtumor und Lymphknoten

Vergleicht man die Ergebnisse der Färbungen von Primärtumor und dazugehörigem Lymphknoten fällt auf, daß in mehreren Fällen das Proteinmuster von Ursprungsgewebe (Primärtumor) und Tumorzellabsiedlung (Lymphknotenmetastase) Modifikationen unterliegen. Dies läßt vermuten, daß es in den lymphogenen Metastasen des Tumors oder in diesem selbst zu weiteren Veränderungen kommen kann, die möglicherweise ein unterschiedliches biologisches Verhalten von Primärtumor und dessen Absiedlung erklären könnte.

4. Diskussion

Die Prognose des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms hat sich in den letzten 20 Jahren nicht wesentlich gebessert. Das unterschiedliche biologische Verhalten der Primärtumoren hat dabei erheblichen Einfluß auf die Prognose des einzelnen Patienten. Es scheint daher sinnvoll, das biologische Verhalten stärker bei zukünftigen Therapiekonzepten zu berücksichtigen. Da sich das biologische Verhalten im veränderten Proteinmuster von Tumorzellen widerspiegelt, ist es erforderlich, die entscheidenden Veränderungen zu erfassen und ein individuelles Risikoprofil zu erstellen. Bisher ist jedoch nicht eindeutig geklärt, welche Faktoren bei der Vielzahl an Veränderungen eine wichtige Rolle spielen. Wir haben uns auf Faktoren (p53, bcl-2, HER-2, HSP70, HSP60 und HSP27) konzentriert, die nach den vorliegenden Daten als zentrale Regulatoren im Zellzyklus agieren oder von Bedeutung für die Immunantwort auf maligne Zellen sind.

Das sehr selektive Patientenkollektiv stellt das ideale Modell einer solchen Analyse dar, da alle Patienten dasselbe Tumorstadium aufwiesen und in einem definitiven Therapieprotokoll behandelt wurden. Im Gegensatz zu anderen Studien fällt bei der vorliegenden Analyse die Problematik unterschiedlicher Tumorstadien und/oder unterschiedlicher Therapien innerhalb des untersuchten Kollektivs weg. Aufgrund dieses Umstandes war es allerdings nur schwer möglich, vergleichbare Arbeiten in der Literatur zu finden. Insbesondere der Nachweis von Hitzeschockproteinen beim NSCLC wurde bislang erst in 5 anderen Arbeiten untersucht. Da die Langzeitergebnisse der Patienten noch ausstehen, wird nur am Rande auf die prognostische Bedeutung der Ergebnisse, die Teil einer weiteren Arbeit werden, eingegangen.

Die Frequenz der p53 Mutationen wird bei NSCLC mit etwa 40-60 % angegeben, wobei nur bestimmte Formen von Mutationen zu einer Konformationsänderung mit verlängerter Halbwertszeit des p53 und so zu immunhistochemisch detektierbarer Akkumulation führen. Ebenso kann eine Überexpression von p53 auch ohne Mutation auftreten. Dies hat beim Vergleich von molekularbiologischen Nachweisen der p53 Mutation mit immunhistologischer Detektion der Proteinüberexpression eine eingeschränkte Konkordanzrate von 50-80% zur Folge.

In dieser Arbeit ließ sich bei 16 (47,05 %) von 34 nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen p53 immunhistochemisch nachweisen. Dieses Ergebnis entspricht den in der Literatur gefundenen Häufigkeiten von 30-60 % anderer Arbeiten. *Schiller et al.* konnten bei 180 immunhistochemisch auf p53 untersuchten NSCLC des Stadiums II und IIIA bei 99 (55,0 %) eine Überexpression detektieren [2001]. *Vega et al.* gelang bei 81 immunhistochemisch untersuchten, primär resezierten NSCLC (Stadium I-IV) in 46,9 % der Fälle ein positiver p53 Nachweis [1997]. *Grossi et al.* konnten in 269 untersuchten NSCLC der Stadien I-III A in 95 (35,31 %) Fällen eine p53 Überexpression erfassen [2002]. Auch *Laudanski et al.*, fanden in 55 (53,92%) von 102 untersuchten, primär resezierten NSCLC eine p53 Überexpression [2001]. Alle drei Gruppen sahen eine p53 Überexpression im Zusammenhang mit einem kürzeren Langzeitüberleben gegenüber p53 negativen Fällen. Demgegenüber stehen die Arbeiten von *Lee et al.* und *Passlick et al.*, die eine p53 Überexpression im Zusammenhang mit einer besseren Prognose gegenüber p53 negativen Fällen sahen [1995; 1994]. Letztlich gibt es aber auch Arbeiten, wie die von *Schiller et al.* und *Tonato et al.*, die keinen Zusammenhang zwischen p53 Status und der Prognose bei NSCLC finden konnten [2001, 2002]. Der prognostische Wert des p53 Status bei NSCLC bleibt also weiterhin unklar. Auch die Studien mit sehr hohen Patientenzahlen kommen zu divergenten Ergebnissen. Während die Rolle von p53 als Prognosefaktor kontrovers diskutiert wird, verdichten sich die Hinweise, daß p53 Mutationen in Tumoren mit einem fortgeschrittenen, also nodal metastasiertem Stadium einhergehen. *Tammemagi et al.* zeigten bei 111 NSCLC-Patienten (Stadium I-III), von denen 48 (43,24 %) p53 positiv waren, daß eine p53 Überexpression mit einem höheren Lymphknotenstatus korrelierte ($p = 0.091$, Fisher exact test) [2000]. Zu dem gleichen Ergebnis kommen *Dalquen et al.*, die bei 247 primär resezierten NSCLC einen signifikanten Zusammenhang zwischen p53 Überexpression und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ermittelten ($p = 0,0259$, Fisher exact test) [1996]. *Borner et al.*, stellten bei 49 untersuchten NSCLC-Patienten (Stadium I-III), von denen 30 (61,22%) p53 positiv waren, fest, daß nur Patienten mit einer p53 Überexpression im Follow-up Metastasen entwickelten. Die Patienten ohne Überexpression wiesen in der Folgezeit keine Metastasen auf ($p < 0,01$, Fisher exact test) [1999]. *Ohsaki et al.* konnten bei 46 untersuchten NSCLC im Stadium I-II ein p53 Überexpression in 19 (41,30%) Fällen und bei 53 untersuchten NSCLC im Stadium III-IV in 25 (47,17%)

Fällen nachweisen. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorstadium und p53 Expression [1996]. In unserer Arbeit alle 34 Patienten das Tumorstadium IIIA und den Lymphknotenstatus N2 aufwies, ist ein Vergleich mit diesen Arbeiten nur für die metastasierte Gruppe möglich. In unserer Studie fand sich bei 47% der untersuchten Tumoren ein positiver p53 Nachweis. Diese Zahlen decken sich mit der Beobachtung der Arbeitsgruppe von *Ohsaki* [1996].

Wir konnten bezüglich der p53 Expression keinen signifikanten Unterschied zwischen Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen finden ($p > 0,05$, Fisher exact test). Auch die Arbeitsgruppen von *Schiller, Tonato, Borner und Apolinario* konnten keine signifikante Korrelation zwischen p53 Expression und histologischem Tumortyp feststellen [2001, 2002; 1999; 1997]. Während *Laudanski et al.*, *Dalquen et al.* und andere eine p53 Überexpression signifikant häufiger in Plattenepithelkarzinomen als in Adenokarzinomen nachweisen konnten [2001, 1996]. *Ohsaki et al.* und *Borner et al.* konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen p53 Überexpression und Differenzierungsgrad des Primärtumors finden [1996; 1999]. Zu dem gleichen Resultat kommen auch unsere Untersuchungen, obwohl sich ein Trend häufigerer p53 Überexpression im Differenzierungsgrad 2 abzeichnete (G2 64,28% zu G3 40,00%, $p > 0,05$, Fisher exact test). In einem Fall lagen zwei Proben aus unterschiedlichen Bereichen des Primärtumors vor. Dabei war eine positiv und die andere negativ für p53, was den Verdacht nahelegt, daß es bereits intratumoral zu Veränderungen des Proteinmusters kommen kann, was die teilweise sehr divergenten Ergebnisse anderer Arbeiten, die ebenfalls den p53 Status nur über eine Probe bestimmten, erklären könnte.

Ein weiterer, die Apoptose bestimmender Faktor ist das bcl-2 Genprodukt, welches den programmierten Zelltod verhindern kann und so eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen könnte. *Ritter et al.* konnten bei 47 (37%) von 126 T1N0M0 NSCLC bcl-2 immunhistochemisch nachweisen [1995]. *Han et al.* beschrieben bei 85 NSCLC-Patienten mit einem Stadium I in 46 % der Fälle einen positiven bcl-2 Nachweis [2002]. Kongruent hierzu sind die Beobachtungen von *Laudanski et al.*, die bei 84 NSCLC 39 (46,42 %) bcl-2 positive Fälle fanden. Dabei ließ sich bcl-2 signifikant häufiger ($p = 0,037$, Fisher exact test) in Plattenepithelkarzinomen (59%) nachweisen als in den anderen histologischen Typen (28-38%) [1999]. Mit 19,2% ist der Anteil der bcl-2 positiven Tumoren bei 99 untersuchten NSCLC der Gruppe

Ohsaki wesentlich geringer als in den oben genannten Arbeiten. Dabei waren 14 (30,43%) von 46 Primärtumoren der Stadien I-II positiv für bcl-2 und nur 5 (9,43%) von 53 Primärtumoren der Stadien III-IV ($p < 0,05$, Fisher exact test) [1996]. *Dosaka-Akita et al.* registrierte ebenfalls bei 116 untersuchten NSCLC von denen 40 (34,48%) bcl-2 positiv waren, daß diese signifikant häufigere in niedrigeres Tumorstadium aufwiesen ($p = 0,0152$, Fisher exact test) [1999]. Wir konnten weder in einem der 34 untersuchten Primärtumoren des Stadiums IIIA noch in den dazugehörigen Lymphknoten eine verwertbare, als eindeutig positiv ($> 10\%$ der Tumorzellen) zu beurteilende Überexpression von bcl-2 nachweisen, wenngleich bcl-2 positive Tumorzellen detektiert wurden. Ein Vorgehensfehler konnte durch Kontrolle und Austausch des Antikörpers, Mitführen von Positivkontrollen und Wiederholung der gesamten Färbung ausgeschlossen werden. Aufgrund der in diesen Proben nur vereinzelt positiven Zellen entschlossen wir uns, diese Proben als negativ zu werten. Inwieweit in den oben genannten Studien solche Proben als positiv gewertet wurden ist nicht zu eruieren. Dies mag eine Erklärung für die divergente Inzidenz von bcl-2 in unserer Arbeit und der Literatur sein. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt möglicherweise in der geringen Fallzahl ($n = 34$) unserer Studie. Eine andere Erklärung könnte die von *Ohsaki et al.* und anderen Autoren gemachte Beobachtung sein, daß bcl-2 seltener in Tumorstadium III-IV gefunden wird als in den Tumorstadien I-II [1996]. Unter der Annahme, daß ein höheres Tumorstadium aus aggressiverem biologischen Verhalten des Primärtumors resultiert, geben die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um *Koukourakis* einen weiteren Hinweis, warum bcl-2 seltener respektive überhaupt nicht in höheren Tumorstadien gefunden wird. Sie konnten zeigen, daß bcl-2 in NSCLC hemmend auf Gene wirkt, die zum einen bei der Angiogenese (VEGF und TP) und zum anderen bei der Zellmigration von Tumorzellen (HER-2) beteiligt sind [1999]. Wenn also bcl-2 seine hemmende Funktion aus noch unbekanntem Gründen nicht ausführen kann, könnte dies verbesserte Bedingungen für das Tumorstadium und die Migration von Tumorzellen bedeuten und folglich bei bcl-2 negativen Tumoren zu einem ausgedehnteren Befund führen. Der fehlende Nachweis von bcl-2 könnte auch Ausdruck des „gelöschten“ respektive hypermethylierten bcl-2 Gens sein. Dieses Phänomen beschrieb die Arbeitsgruppe um *Shiseki* in fortgeschrittenen NSCLC [1994]. Bezüglich der Prognose sei noch die Arbeit von *Cox et al.* genannt, die bei 178 NSCLC-Patienten den Nachweis von bcl-2 in drei unterschiedlichen Stufen einteilte und

herausfanden, daß Tumoren mit sehr hoher Intensität eine vergleichbar schlechte Prognose hatten wie bcl-2 negative Tumoren [2000]. Zu einem anderen Ergebnis kommt die Gruppe um *Kim*, die bei 238 untersuchten NSCLC bcl-2 in 171 (71,8%) Fällen nachweisen konnte und dies im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose gegenüber bcl-2 negativen Fällen sah [1998].

Nicht alle sogenannten Prognosefaktoren sind im Einzelfall für den Verlauf des einzelnen Patienten von signifikanter, prognostischer Bedeutung. Vielmehr scheint es wichtig, eine größere Anzahl an möglichen Prognosefaktoren zu untersuchen, um durch ein breiteres Screening sowohl eine bessere Aussage für eine größere Gruppe, als auch für den Einzelnen machen zu können. Aus diesem Grund sollten innerhalb dieses Projektes auch neue Ansätze, wie die Bestimmung sogenannter Hitzeschockproteine (HSP) beim NSCLC, überprüft werden. Da Hitzeschockproteine Zellen vor Stress schützen, wäre es durchaus denkbar, daß Zellen, die diese Proteine nicht exprimieren, sehr anfällig für exogene Noxen wie Zigarettenrauch sind. Daß Rauchen Stress für das Lungengewebe respektive mit der Expression von Hitzeschockproteinen assoziiert ist, demonstrieren die Ergebnisse von *Koomagi et al.*, die zeigten, daß Raucher mit einem Bronchialkarzinom gegenüber Nichtrauchern mit einem Bronchialkarzinom sowohl im Tumorgewebe als auch im normalen Lungengewebe höhere Expressionsraten von HSP70 aufwiesen [1996]. Diese Ergebnisse für Tumorgewebe konnten von *Volmetal.* bestätigt werden [1995].

Ein weiterer Grund warum HSP möglicherweise als Prognosefaktoren dienen könnten, ist der Hinweis, daß HSP wichtige Tumorantigene für T-Lymphozyten sind [Robert et al., 2002, Yoshino et al., 1994]. Denn die körpereigene Immunantwort spielt für den Verlauf einer Tumorerkrankung eine elementare Rolle. Somit könnte die Minderexpression von HSP dazu führen, daß einzelne Tumorzellen durch das Immunsystem nicht erkannt werden und somit im Körper unbemerkt persistieren könnten, was den Verlauf und die Prognose beeinflussen würde.

Bislang gibt es erst eine vergleichbare Veröffentlichung, die die Inzidenz von HSP27 und HSP70 beim NSCLC untersucht hat [Malusecka et al., 2001]. In dieser Arbeit waren 95 (89,62 %) von 106 Fällen HSP70 positiv. Dabei wurden die intensivsten Ergebnisse in dysplastischen Läsionen und Tumoren des Stadium I gefunden. Von den 34 Primärtumoren unserer Arbeit waren 8 (23,52 %) HSP70 positiv. Da alle das Stadium IIIA aufwiesen, könnte man annehmen, daß es mit zunehmender Tumorprogression zu einer Abnahme der HSP70 Expression kommt.

Diese Hypothese würde auch zu den Beobachtungen anderer Arbeiten passen, daß nämlich eine HSP70 Überexpression im Zusammenhang mit einer besseren Prognose bei Ösophaguskarzinomen, Nephroblastomen und Melanomen gesehen wird [Noguchi et al., 2002; Efferth et al., 2001; Ricciardi et al., 2001]. Im Vergleich dazu fand die Gruppe um Lazaris bei HSP70 positiven Kolonkarzinomen eine schlechtere Prognose gegenüber HSP70 negativen Tumoren. Des Weiteren korrelierte in dieser Arbeit die HSP70 Überexpression mit einem geringeren Differenzierungsgrad und einem fortgeschrittenen Tumor stadium [1995]. Wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen HSP70 Überexpression und dem Differenzierungsgrad respektive den verschiedenen Histologien der untersuchten Primärtumoren finden ($p < 0,05$, Fisher exact test).

Unser Ergebnis für HSP27 liegt mit 85,29% positiver Primärtumoren höher als das Ergebnis der oben bereits erwähnten Arbeit. Die Arbeitsgruppe konnte bei den untersuchten 106 nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen des Stadiums I-III 70% HSP27 positive Primärtumoren nachweisen [Malusecka et al., 2001]. Dies könnte wiederum zu der Vermutung veranlassen, daß es mit zunehmender Tumorprogression zu einem Anstieg der HSP27 Expression kommt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen anderer Arbeit gestützt, die eine HSP27 Überexpression in Verbindung mit einer schlechteren Prognose bei Ovarialkarzinomen und hepatozellulären Karzinomen sahen [Art et al., 1999.; King et al., 2000]. Bei Mammakarzinomzellen wird eine HSP27 Überexpression in Verbindung mit ausgeprägtem Tumorzellwachstum und höherem Metastasierungspotential gebracht [Oesterreich et al., 1993; Mairesse et al., 1996]. Auch diese Resultate würden unsere Annahme bestätigen, daß eine HSP27 Überexpression mit einem nodal metastasiertem Tumor stadium korreliert. Keinen signifikanten Zusammenhang konnten wir hingegen in unserer Arbeit zwischen HSP27 Überexpression und Tumordifferenzierungsgrad respektive den verschiedenen Histologien ermitteln ($p > 0,05$, Fisher exact test).

Für HSP60 gibt es keine vergleichbare Arbeit bezüglich dem Vorkommen in NSCLC. Es konnte lediglich eine Arbeit gefunden werden, die sich mit der HSP60 Expression bei Ovarialkarzinomen befaßt [Schneider et al., 1999]. Von den 247 immunhistochemisch untersuchten Ovarialkarzinomen waren 47 (19%) HSP60 positiv. Dabei hatten 12 das Tumor stadium I ($n=29$), während 35 ein höheres Stadium ($n=218$) aufwiesen. Bezogen auf die Stadium acht diese einen positiven

Anteil von 41,4 % für das Tumorstadium I und nur 16,1 % für die höheren Stadien aus. HSP60 trat bei den untersuchten Ovarialkarzinomen in frühen Tumorstadien signifikant häufiger ($p=0,004$, Fisher exact test) auf und war zudem mit einer besseren Prognose verbunden ($p=0,02$, logranktest). Wir konnten in 21 (61,76%) der 34 untersuchten NSCLC-Primärtumoren des Stadiums II IA HSP60 nachweisen. Die prognostische Bedeutung dieses Ergebnisses für die von uns untersuchten NSCLC ist Teil einer weiteren Untersuchung, die wir bei Erhalt der Langzeitergebnisse fertigstellen werden.

Der letzte untersuchte mögliche Prognosefaktor ist der Wachstumsfaktorenrezeptor HER-2, der in 20-60 % primär resezierter nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome, insbesondere in Adenokarzinomen, detektiert werden kann. Dabei ist HER-2 jedoch nach unseren und den in der Literatur gefundenen Daten in den meisten untersuchten NSCLC nur in geringer Konzentration nachzuweisen. Therapeutisch ist dies relevant, da erst ab einem Expressionsgrad von 3+ eine zusätzliche Antikörpertherapie als sinnvoll angesehen wird. Wir konnten in 3 (10 %) von 30 untersuchten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen eine HER-2-Überexpression der Intensitätsstufe 1+ nachweisen. *Hirsch et al.* konnten in 238 untersuchten NSCLC der Stadien I-III in 68 (28,57 %) eine HER-2-Überexpression feststellen [2002]. Zu ähnlichen Resultaten kommt die Gruppe um *Koukourakis*, die bei 216 überprüften Fällen 50 (23,14 %) für HER-2 positive nichtkleinzellige Bronchialkarzinome fanden [1999]. In der Arbeit von *Kristiansen et al.* konnte in 33 (37%) von 89 analysierten Fällen eines NSCLC (Stadium I-IV) HER-2 nachgewiesen werden [2001]. Über die prognostische Bedeutung beim NSCLC gibt es divergente Ergebnisse. *Hirsch et al.* konnten keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Überlebens in Abhängigkeit vom HER-2 Status bei 238 untersuchten NSCLC finden [2002]. Auch *Reinmuth et al.* konnten keine prognostische Bedeutung von HER-2 für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom feststellen [2000]. Demgegenüber stellte die Arbeitsgruppe um *Brabender* fest, daß eine hohe HER-2 Expression mit einer schlechten Prognose bei 83 Patienten mit NSCLC assoziiert war [2001]. Zu ähnlichen Resultaten kamen *Diez et al.* bei 94 untersuchten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen [1997]. Analog hierzu ist die Beobachtung der Arbeitsgruppe um *Lopez-Guerrero*, daß NSCLC-Patienten mit HER-2 Überexpression häufiger zu Rezidiven neigen [1999]. *Kristiansen et al.* registrierten bei 89 untersuchten Patienten einen Zusammenhang zwischen HER-2 Überexpression, höherem Tumorstadium und Lymphknotenstatus

bei Adenokarzinomen der Lunge [2001]. Scheurle *et al.* fanden heraus, daß HER-2 selten in normalem Lungengewebe überexprimiert ist, ebenso selten in gut differenziertem Tumorgewebe von NSCLC-Patienten. Entsprechend sahen sie eine HER-2 Überexpression am häufigsten in schlecht differenzierten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen [2000]. Wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen HER-2 Überexpression und dem Differenzierungsgrad respektive den verschiedenen Histologien der untersuchten Primärtumoren finden ($p < 0,05$, Fisher exacttest).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß es zu vielfältigen Veränderungen im Proteinmuster eines NSCLC und seiner Absiedlungen kommt. Da diese im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die verschiedenen Therapieoptionen gebracht werden, erscheint es sinnvoll sie mit in neue Therapiekonzepte zu integrieren, um den Betroffenen eine individuell angepaßte Behandlung zu ermöglichen. Insbesondere der Nachweis von Hitzeschockproteinen könnte dabei neue Wege im Bereich der Immuntherapie bieten. Es bleibt jedoch auch nach Sichtung der Literatur unklar, welche Relevanz die untersuchten Faktoren für den Verlauf und die Prognose des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms haben. Ein großes Problem ist dabei, daß für den Nachweis häufig unterschiedlichste Methoden insbesondere Antikörper eingesetzt werden, was den direkten Vergleich mit anderen Arbeiten erheblich einschränkt. Es sollte deshalb versucht werden, einheitliche Nachweismethoden für zukünftige Studien festzulegen, um nicht nur den Vergleich sondern möglicherweise auch die Zusammenfassung mehrerer Arbeiten zu ermöglichen. Dies könnte unter Umständen zu aussagekräftigeren und weniger widersprüchlichen Resultaten der einzelnen Arbeitsgruppen führen.

5. Anhang

TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms (UICC und AJCC 1987)

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)
T2	Tumor mit einem der folgenden Kennzeichen hinsichtlich Größe oder Ausbreitung: Tumor mehr als 3 cm in größter Ausdehnung Tumor mit Befall des Hauptbronchus, 2 cm oder weiter distal der Carina Tumor infiltriert viscerale Pleura assozierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
T3	Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: Brustwand (einschließlich Tumorendes Sulcus superior), Zwerchfell, mediastinale Pleura, parietales Pericard oder Tumor im Hauptbronchus weniger als 2 cm distal der Carina, aber Carina selbst nicht befallen oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina; oder Tumor mit malignem Pleuraerguß
N	Regionäre Lymphknoten
Nx	Regionäre Lymphknoten (LK) können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknoten-Metastasen
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen LK und/oder in ipsilateralen Hilus-LK (einschließlich einer direkten Ausbreitung des Primärtumors)
N2	Metastasen in ipsilateralen, mediastinalen und/oder subcranialen LK
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraclaviculären LK
M	Metastasen
MX	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

zu T1 Seltener, sich oberflächlich ausbreitender Tumor jeder Größe mit einer nur auf die Bronchialwand begrenzten Infiltration wird auch dann, wenn sich weiter proximal ausdehnt, als T1 klassifiziert.

Zu T4 Die meisten Pleuraergüsse bei BKS sind durch den Tumor verursacht. Soweit die maligne Genese durch mehrfache zytologische Untersuchungen oder zuverlässiger thorakoskopisch ausgeschlossen wurde, kann der Tumor als T1, T2 oder T3 eingestuft werden.

Stadiengruppierung(UICC1987)

OkkultesKarzinom	T _X	N ₀	M ₀
Stadium0	Tis	N ₀	M ₀
StadiumIA	T ₁	N ₀	M ₀
StadiumIB	T ₂	N ₀	M ₀
StadiumIIA	T ₁	N ₁	M ₀
StadiumIIB	T ₂	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₀	M ₀
StadiumIIIA	T ₁	N ₂	M ₀
	T ₂	N ₂	M ₀
	T ₃	N _{1,N2}	M ₀
StadiumIIIB	T ₄	jedesN	M ₀
	jedesT	N ₃	M ₀
StadiumIV	jedesT	jedesN	M ₁

aus: Sobin LH, Wittekind C. (1997) TNM classification of malignant tumors. 5th edition. John Wiley & Sons, New York

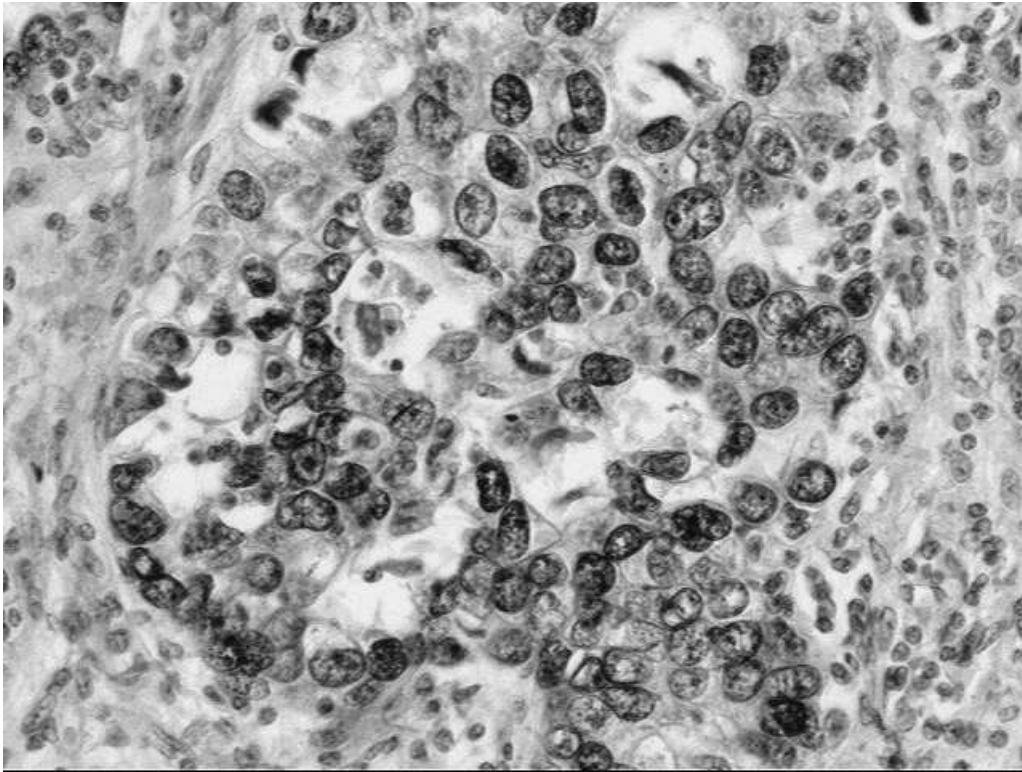


Abb.1 p53 Färbung eines Tumorschnittes (T56) nach der ABC-Methode. Anfärbung erfolgt mit DAB.

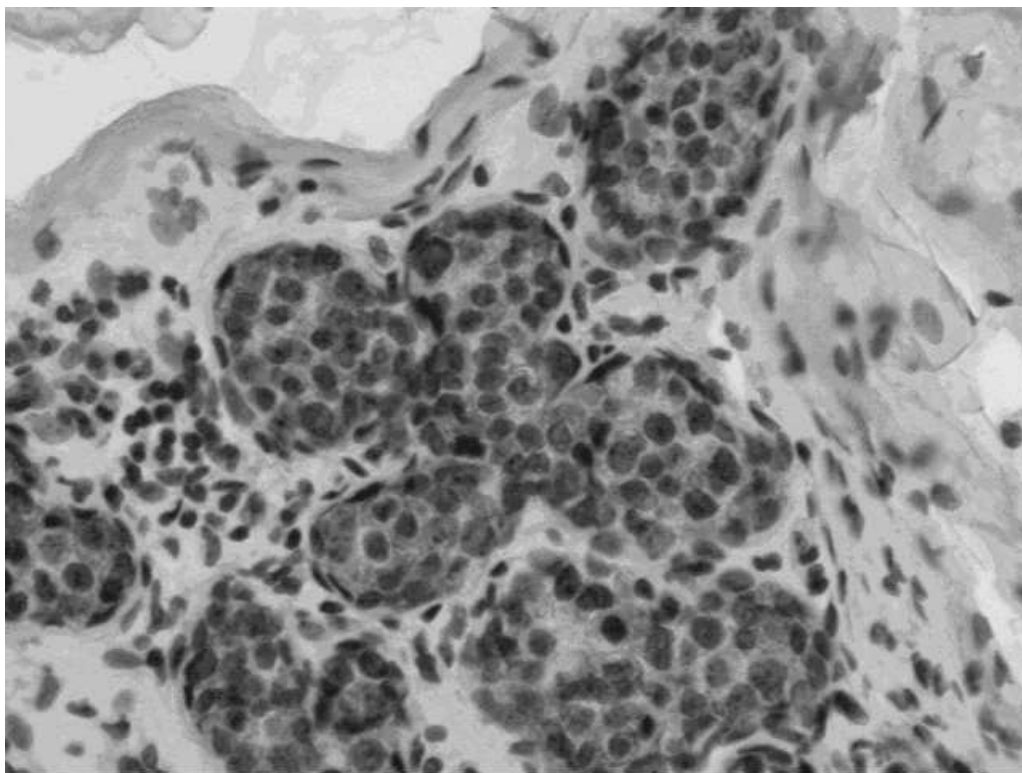


Abb.2 BCL-2 Färbung eines Mammakarzinoms (Positivkontrolle) mit der B-SA Methode. Anfärbung erfolgt mit Fast-Red-Lösung.

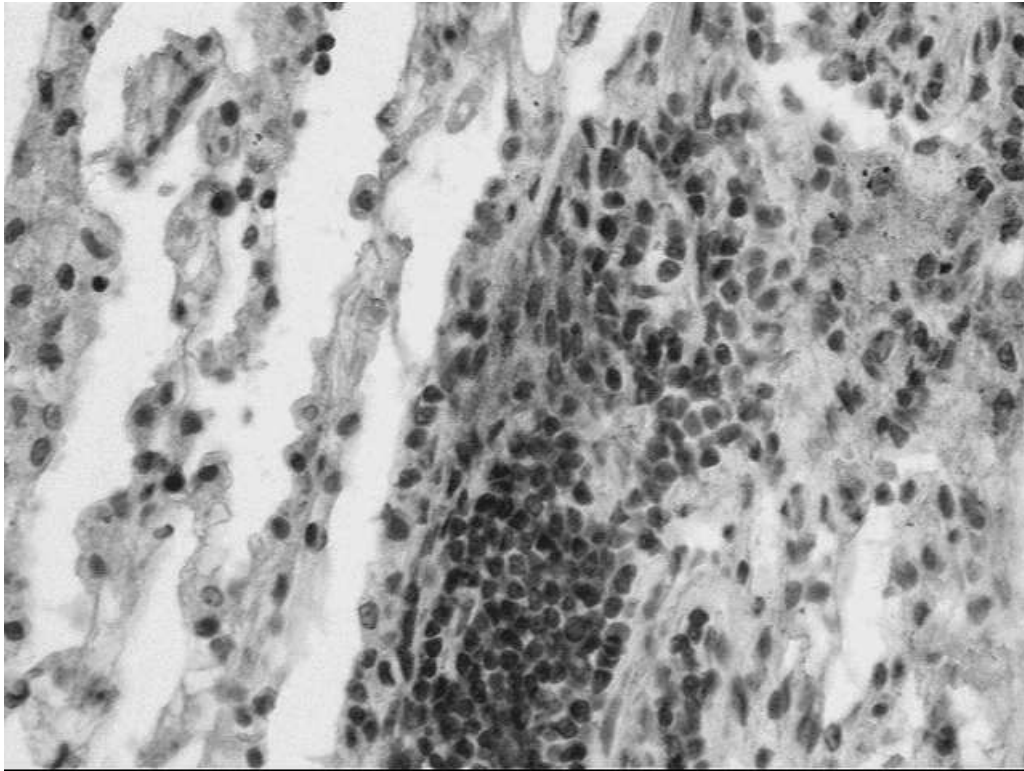


Abb.3HER-2FärbunganeinemBronchialkarzinom(T5 0)mitB-SAMethode.
AnfärbungmitFast-Red-Lösung.

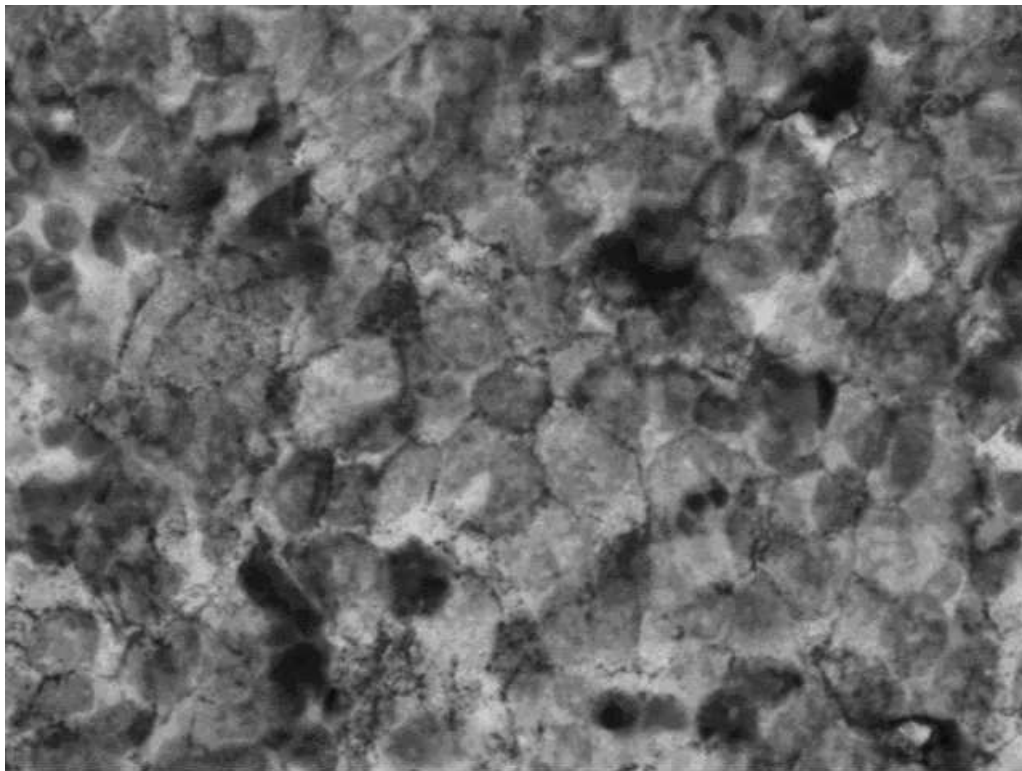


Abb.4HER-2FärbungderPositivkontrolle(4500)mit B-SAMethode.
AnfärbungmitFast-Red-Lösung.

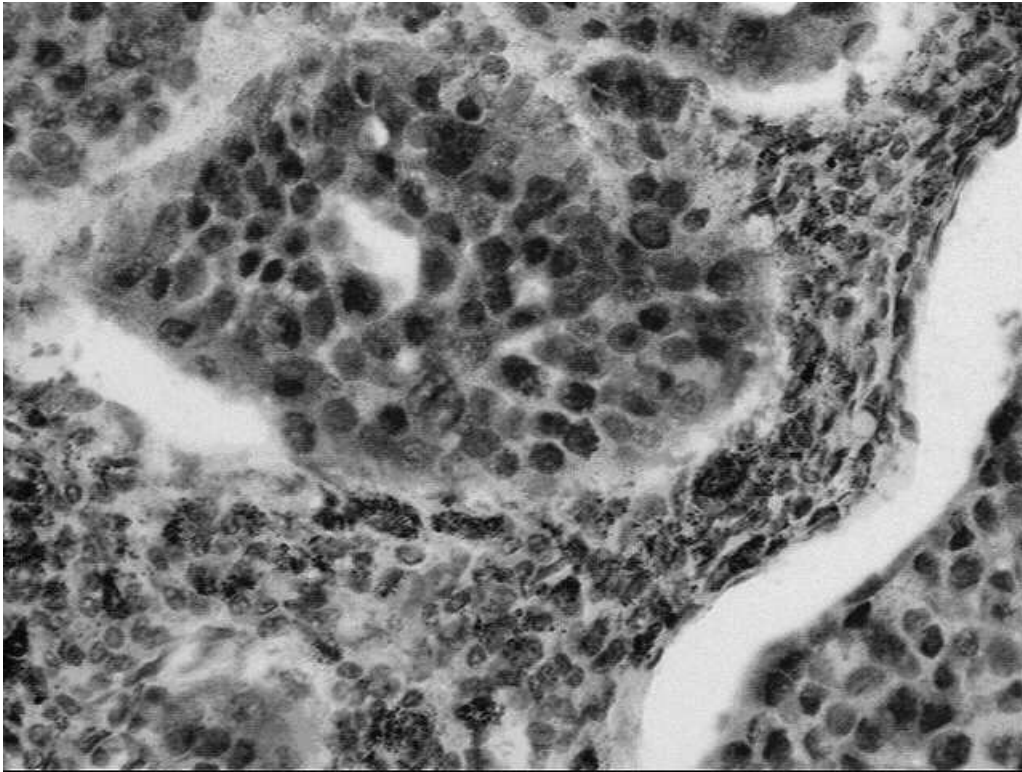


Abb.5 HSP70 Färbung eines Bronchialkarzinom (T23) mit der B-SA-Methode.
Anfärbung mit Fast-Red-Lösung

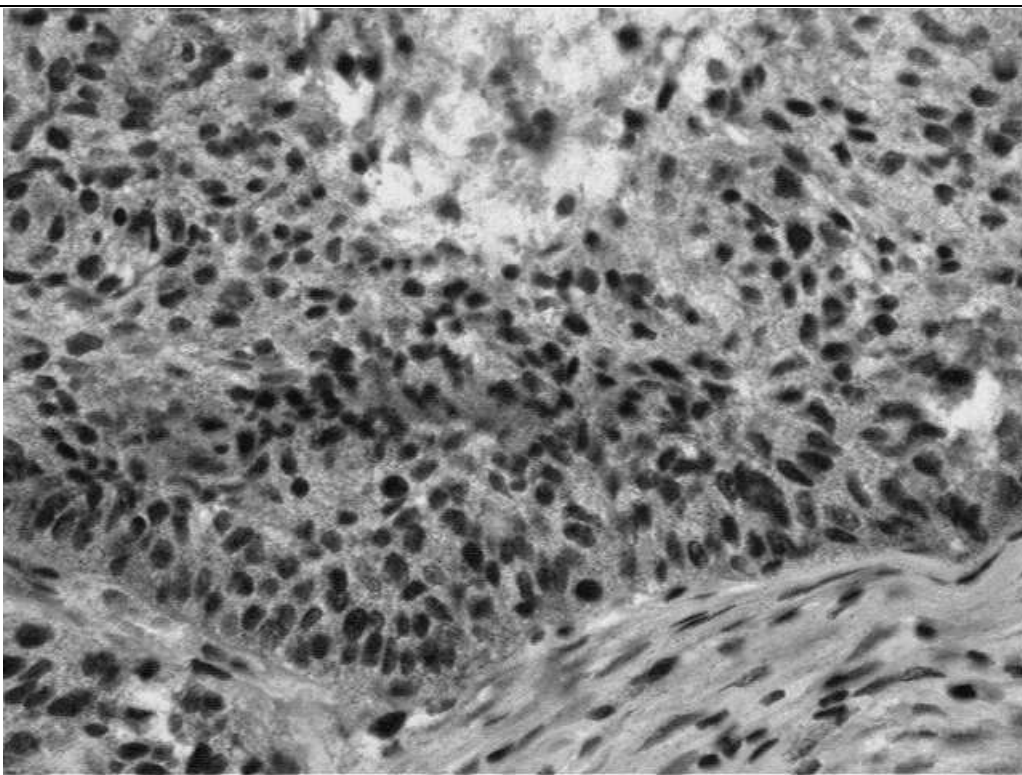


Abb.6 HSP70 Färbung eines Lymphknotens (LK115) mit der B-SA-Methode.
Anfärbung mit Fast-Red-Lösung

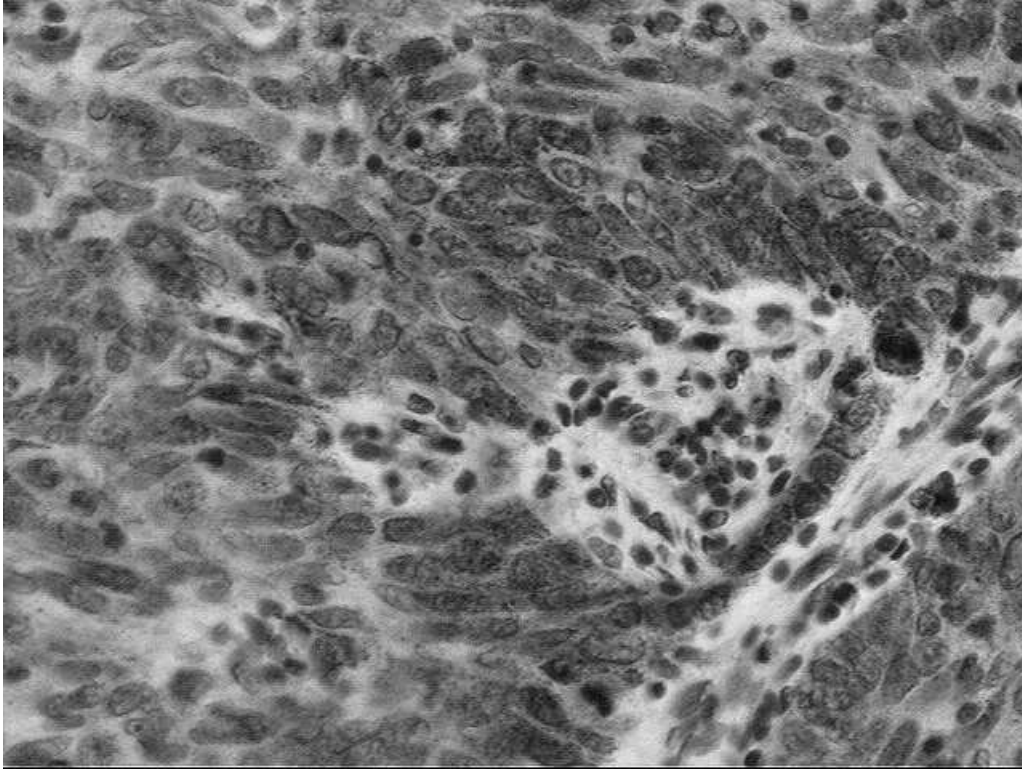


Abb.7 HSP60 Färbung eines Bronchialkarzinoms (T23) mit der B-SA-Methode.
Anfärbung mit Fast-Red-Lösung

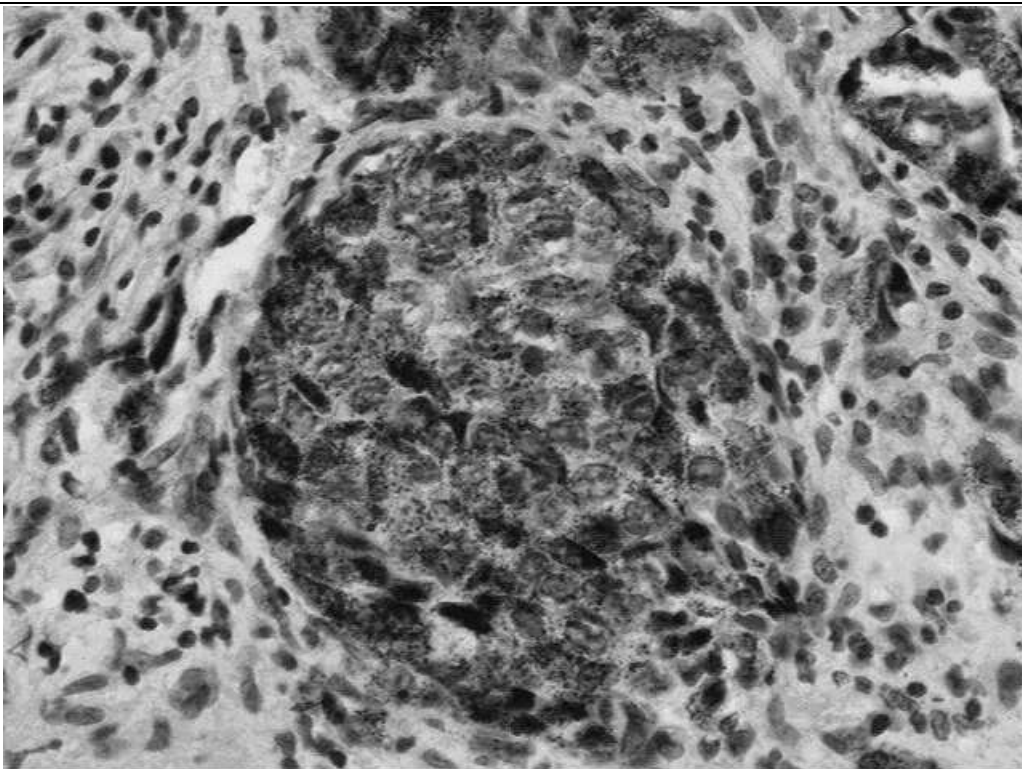


Abb.8 HSP60 Färbung eines Lymphknotens (LK54) mit der B-SA-Methode.
Anfärbung mit Fast-Red-Lösung.

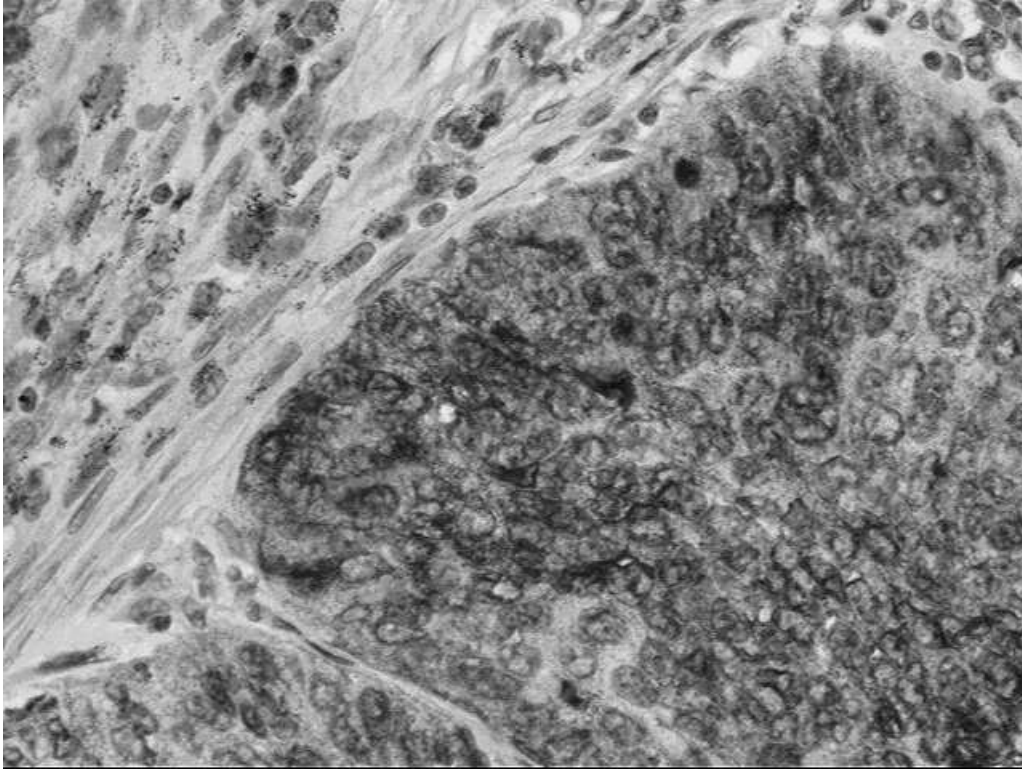


Abb.9 HSP27 Färbung eines Lymphknotens (LK19) mit der rB-SA-Methode.
Anfärbung mit Fast-Red-Lösung

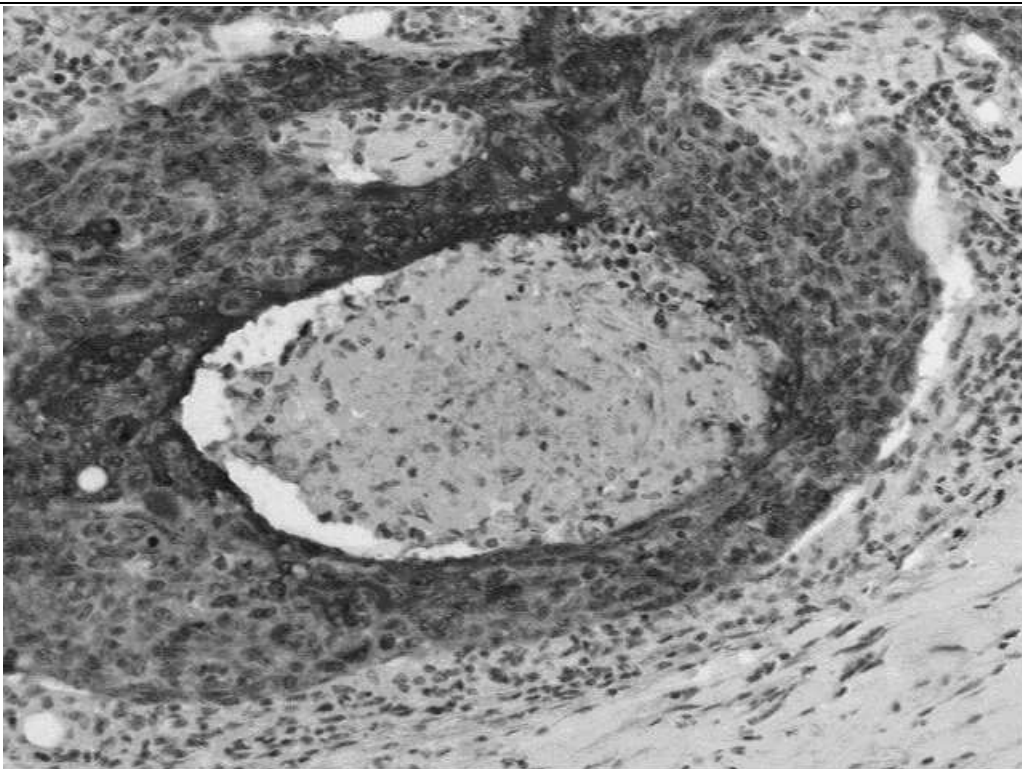


Abb.10 HSP27 Färbung eines Bronchialkarzinoms (T24) mit der rB-SA-Methode.
Anfärbung mit Fast-Red-Lösung

6. Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom stellt weltweit 25% aller durch Tumoren bedingten Todesfälle dar. Die Prognose von Patienten mit einem NSCLC Stadium IIIA konnte durch den Einsatz multimodaler Therapien in den letzten 5 Jahren deutlich verbessert werden. Dennoch beträgt die 5-Jahresüberlebenszeit dieser Patienten nur 25%. Um eine weitere Verbesserung der Prognose zu erreichen, erscheint die Erstellung individueller Therapiekonzepte notwendig. Aus diesem Grunde ist es unabdingbar, das biologische Verhalten von Primärtumoren intensiver zu berücksichtigen, um für den Einzelnen durch Erstellung eines Risikoprofils eine adaptierte Therapie zu ermöglichen. Bisher ist jedoch nicht eindeutig geklärt, welche Faktoren bei der Vielzahl an Veränderungen eine wichtige Rolle spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, geeignete Marker bei 34 Patienten mit einem nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom des Stadiums IIIA zu finden, die eine Aussage über das maligne Potential sowie das Ansprechen auf Strahlen- und oder Chemotherapie eines Tumors zulassen, um so eine individuell angepasste Therapie und Prognose in Zukunft zu ermöglichen. Wir haben uns dabei auf Faktoren (p53, bcl-2, HER-2, HSP70, HSP60 und HSP27) konzentriert, die nach den vorliegenden Daten als zentrale Regulatoren im Zellzyklus agieren oder von Bedeutung für die Immunantwort auf maligne Zellen sind.

Für den immunhistochemischen Nachweis dieser Faktoren wurde die Biotin-Streptavidin-Methode eingesetzt. Einzig der Nachweis von p53 erfolgte durch die Avidin-Biotin-Komplex-Methode aufgrund des eingesetzten Antikörpers. Von den in Formalin fixierten und in Paraffin eingelegten Tumor- und Lymphknotenproben wurden dazu 4 µm dicke Schnittpräparate angefertigt. Diese wurden entparaffiniert und rehydriert und dann nach den methodenspezifischen Färbeprotokollen weiterbearbeitet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte p53 in 16 von 34 (47,05%), HER-2 in 3 von 30 (10%), HSP27 in 29 von 34 (85,29%), HSP60 in 21 von 34 (61,76%) und HSP70 in 8 von 34 Fällen (23,52%) als eindeutig positiv ermittelt werden. Von dem ebenfalls untersuchten bcl-2 Genprodukt konnte in keinem der untersuchten Primärtumoren eine verwertbare, als eindeutig positiv (>10% der Tumorzellen) zu beurteilende Überexpression festgestellt werden. Es konnten für die einzelnen Faktoren keine signifikanten Korrelationen mit den vorliegenden

histopathologischen Daten der Patienten ermittelt werden. In 27 Fällen lagen auch Lymphknotenproben vor. Beim Vergleich der Färbungen der Primärtumoren mit denen der dazugehörigen Lymphknoten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, obwohl es in einzelnen Fällen zu Veränderungen im nachgewiesenen Proteinmuster gekommen war. Auch intratumorale Veränderungen des Proteinmusters konnten anhand von unterschiedlichen Proben eines Primärtumors festgestellt werden. Inwieweit der immunhistochemische Nachweis der genannten Parameter eine prognostische Relevanz besitzt, wird in einer zweiten Untersuchung geprüft werden.

7. Literaturverzeichnis

AnanthanJ,GoldbergAL,VoellmyR.

Abnormalproteinsserveaseukaryoticstresssignalsandtriggerttheactivationof
heatshockgenes.

Science.1986Apr25;232(4749):522-4.

PMID:3083508

ApolinarioRM,vanderValkP,deJongJS,DevilleW, vanArk-OtteJ,Dingemans
AM,vanMourikJC,PostmusPE,PinedoHM,GiacconeG.

Prognosticvalueoftheexpressionofp53,bcl-2,andba
neovascularizationinpatientswithradicallyresectedn on-small-celllungcancer.

JClinOncol.1997Jun;15(6):2456-66.

PMID:9196162

ArtsHJ,HollemaH,LemstraW,WillemsePH,DeVriesEG ,KampingaHH,Vander
ZeeAG.

Heat-shock-protein-27(hsp27)expressioninovariancarcin oma:relationinresponse
tochemotherapyandprognosis.

IntJCancer.1999Jun21;84(3):234-8.

PMID:10371339

BakhshiA,JensenJP,GoldmanP,WrightJJ,McBrideOW,E psteinAL,Korsmeyer
SJ.

Cloningthechromosomalbreakpointoft(14;18)human lymphomas:clustering
aroundJHochromosome14andnearatranscriptionalu niton18.

Cell.1985Jul;41(3):899-906.

PMID:3924412

BaurX,KonietzkoN.

[Environmentalandoccupationaldiseases]

Pneumologie.1996Sep;50Suppl2:604-6

PMID:9157425

BeckerN.,WahrendorfJ.

AtlasofthecancermortalityintheFederalRepublico fGermany1981-1990,3rd
Edition

Springer-Verlag,Berlin,Heidelberg(1997)

BornerMM,BroussetP,Pfanner-MeyerB,BacchiM,Vonla nthenS,HotzMA,
AltermattHJ,SchlaiferD,ReedJC,BetticherDC.

ExpressionofapoptosisregulatoryproteinsoftheBcl-2 familyandp53inprimary
resectednon-small-celllungcancer.

BrJCancer.1999Feb;79(5-6):952-8.

PMID:10070896

Botzler C, Issels R, Multhoff G.

Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells.

Cancer Immunol Immunother. 1996 Dec; 43(4):226-30.

PMID:9003468

Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, Holscher AH, Danenberg PV.

Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival.

Clin Cancer Res. 2001 Jul; 7(7):1850-5.

PMID:11448895

Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T.

Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription.

Nature. 1998 Feb 5; 391(6667):597-601.

PMID:9468139

Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE.

The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model.

Am J Pathol. 1995 Jan; 146(1):20-6.

PMID:7856728

Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Fabbro D, Seizinger BR, Kley N.

Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53.

Nature. 1995 Oct 19; 377(6550):646-9.

PMID:7566179

Bukau B, Horwich AL.

The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines.

Cell. 1998 Feb 6; 92(3):351-66

PMID:9476895

Capewell S, Sankaran R, Lamb D, McIntyre M, Sudlow MF.

Lung cancer in lifelong non-smokers. Edinburgh Lung Cancer Group.

Thorax. 1991 Aug; 46(8):565-8.

PMID:1656541

Carbone DP.

The biology of lung cancer.

Semin Oncol. 1997 Aug; 24(4):388-401

PMID:9280218

ChengMY,HartlFU,MartinJ,PollockRA,KalousekF, NeupertW,HallbergEM, HallbergRL,HorwichAL.

Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria.

Nature. 1989 Feb 16;337(6208):620-5.

PMID:2645524

Chen-LevyZ,NourseJ,ClearyML.

The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the (14;18) translocation.

Mol Cell Biol. 1989 Feb;9(2):701-10.

PMID:2651903

CioccaDR,OesterreichS,ChamnessGC,McGuireWL,Fuqua SA.

Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27):

J Natl Cancer Inst. 1993 Oct 6;85(19):1558-70

PMID:8411230

CoxG,WalkerRA,MullerS,AbramsKR,StewardWP,O' ByrneKJ.

Does immunointensity account for the differences in prognostic significance of Bcl-2 expression in non-small cell lung cancer?

Pathol Oncol Res. 2000;6(2):87-92.

PMID:10938137

DalquenP,SauterG,TorhorstJ,SchultheissE,JordanP,LehmannS,SolerM, StulzP,MihatschMJ,GudatF.

Nuclear p53 overexpression is an independent prognostic parameter in node-negative non-small cell lung carcinoma.

J Pathol. 1996 Jan;178(1):53-8

PMID:8778317

DensonKW.

Re: Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe.

J Natl Cancer Inst. 1999 May 5;91(9):803-4

PMID:10328113

DePotterCR,QuatackerJ.

The p185 erbB2 protein is localized on cell organelles involved in cell motility.

Clin Exp Metastasis. 1993 Nov;11(6):453-61.

PMID:7900945

DiezM,PollanM,MaestroM,TorresA,OrtegaD,GomezA,SanchezA,Hernando F,BalibreaJL.

Prediction of recurrence by quantification of p185 neu protein in non-small-cell lung cancer tissue.

Br J Cancer. 1997;75(5):684-9.

PMID:9043025

Dosaka-Akita H, Katabami M, Hommura H, Fujioka Y, Katoh H, Kawakami Y.
 Bcl-2 expression in non-small cell lung cancers: higher frequency of expression in squamous cell carcinomas with earlier pT status.
 Oncology. 1999 Apr;56(3):259-64.
 PMID:10202283

Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrase G, Totty N, Stockwell IP, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD.
 Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences.
 Nature. 1984 Feb 9-15;307(5951):521-7.
 PMID:6320011

Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB.
 Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death.
 Oncogene. 1998 Dec 24;17(25):3207-13
 PMID:9916983

Efferth T, Schulten HG, Thelen P, Bode ME, Beniers AJ, Granzen B, Ringert RH, Mertens R, Gefeller O, Jakse G, Fuzesi L.
 Differential expression of the heat shock protein 70 in the histological compartments of nephroblastomas.
 Anticancer Res. 2001 Jul-Aug;21(4B):2915-20.
 PMID:11712786

Fortin A, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Deschenes R, Huot J, Landry J.
 Overexpression of the 27 kDa heat shock protein is associated with thermoresistance and chemoresistance but not with radioresistance.
 Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000 Mar 15;46(5):1259-66.
 PMID:10725639

Gething MJ, Sambrook J.
 Protein folding in the cell.
 Nature. 1992 Jan 2;355(6355):33-45
 PMID:1731198

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC.
 Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis.
 Cancer Res. 1994 Sep 15;54(18):4855-78
 PMID:8069852

F. Grossi, M. Loprevite, M. Chiaramondia, P. Ceppa, C. Pera, G. B. Ferrara, G. B. Ratto, J. Serrano, L. Boni, A. Ardizzoni
 Prognostic significance of k-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected NSCLC: An analysis of 269 patients
 -nochnichtveröffentlichte Arbeit-

- Häußinger K.E., Kohlhäufel M.
Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität (Hrsg.): Tumore der Lunge und des Mediastinums; Empfehlungen und Nachsorge; Tumorzentrum München; 4. Auflage; 1997 zur Diagnostik, Therapie
- Han H., Landreneau R.J., Santucci T.S., Tung M.Y., Macherey R S., Shackney S.E., Sturgis C.D., Raab S.S., Silverman J.F.
Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. Hum Pathol. 2002 Jan; 33(1):105-10. PMID: 11823980
- Harris J.R., Lippman M.E., Veronesi U., Willett W.
Breast cancer (3). N Engl J Med. 1992 Aug 13; 327(7):473-80. PMID: 1625737
- Hartman D.J., Hoogenraad N.J., Condron R., Hoj P.B.
Identification of a mammalian 10-kDa heat shock protein, 10 homologues essential for assisted folding of trimeric in vitro. Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Apr 15; 89(8):3394-8. PMID: 1348860
- Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Vousden K.H., Oren M.
Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. Genes Dev. 1995 Sep 1; 9(17):2170-83. PMID: 7657168
- Haussinger K., Huber R.M.
[Bronchial carcinoma (lung cancer)] Pneumologie. 1996 Sep; 50 Suppl 2:599-603. PMID: 9157424
- Hengstschlager M., Braun K., Soucek T., Miloloza A., Hengstschlager-Ott E.
Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. Mutat Res. 1999 Jan; 436(1):1-9. PMID: 9878675
- Hightower L.E.
Cultured animal cells exposed to amino acid analogues synthesize several polypeptides. J Cell Physiol. 1980 Mar; 102(3):407-27. PMID: 6901532
- Hillerdal G.
Pleural plaques and risk for bronchial carcinoma and mesothelioma. A prospective study. Chest. 1994 Jan; 105(1):144-50. PMID: 8275722

HirschFR,Varella-GarciaM,FranklinWA,VeveR,Chen L,HelfrichB,ZengC, BaronA,BunnPAJr.
 EvaluationofHER-2/neugeneamplificationandprote inexpressioninnon-smallcell lungcarcinomas.
 BrJCancer.2002May6;86(9):1449-56.
 PMID:11986780

HockenberyD,NunezG,MillimanC,SchreiberRD,Korsme yerSJ.
 Bcl-2isaninnermitochondrialmembraneproteinthat blocksprogrammedcelldeath.
 Nature.1990Nov22;348(6299):334-6.
 PMID:2250705

HockenberyDM,ZutterM,HickeyW,NahmM,KorsmeyerSJ.
 BCL2proteinistopographicallyrestrictedintissueschara cterizedbyapoptoticcell death.
 ProcNatlAcadSciUSA.1991Aug15;88(16):6961-5.
 PMID:1871110

HockenberyDM,OltvaiZN,YinXM,MillimanCL,Korsme yerSJ.
 Bcl-2functionsinanantioxidantpathwaytoprevent apoptosis.
 Cell.1993Oct22;75(2):241-51.
 PMID:7503812

HollsteinM,SidranskyD,VogelsteinB,HarrisCC.
 p53mutationsinhumancancers.
 Science.1991Jul5;253(5015):49-53
 PMID:1905840

HolmesWE,SliwkowskiMX,AkitaRW,HenzelWJ,LeeJ,Pa rkJW,YansuraD, AbadiN,RaabH,LewisGD,etal.
 Identificationofheregulin,aspecificactivatorofp18 5erbB2.
 Science.1992May22;256(5060):1205-10.
 PMID:1350381

HueberAO,ZornigM,LyonD,SudaT,NagataS,Evan GI.
 RequirementfortheCD95receptor-ligandpathwayin c-Myc-inducedapoptosis.
 Science.1997Nov14;278(5341):1305-9.
 PMID:9360929

HunterT.
 Oncoproteinnetworks.
 Cell.1997Feb7;88(3):333-46
 PMID:9039260

JaattelaM,WissingD,KokholmK,KallunkiT,EgebladM.
 Hsp70exertsanti-apoptoticfunctiondownstreamofca spase-3-likeproteases.
 EMBOJ.1998Nov2;17(21):6124-34.
 PMID:9799222

JonesDB,CoulsonAF,DuffGW.

Sequence homologies between hsp60 and autoantigens.
Immunol Today. 1993 Mar; 14(3):115-8
PMID:846626

KarreK.

MHC gene control of the natural killer system at the level of the target and the host.
Semin Cancer Biol. 1991 Oct; 2(5):295-309.
PMID:1773046

KhuriFR,KurieJM,HongWK.

Chemoprevention of respiratory tract cancer.
Hematol Oncol Clin North Am. 1997 Jun; 11(3):387-408
PMID:9209902

KiangJG,CarrFE,BurnsMR,McClainDE.

HSP-72 synthesis is promoted by increase in $[Ca^{2+}]_i$ or activation of G proteins but not pHi or cAMP.
Am J Physiol. 1994 Jul; 267(1 Pt 1):C104-14.
PMID:8048473

KimYC,ParkKO,KernJA,ParkCS,LimSC,JangAS,Yan gJB.

The interactive effect of Ras, HER2, P53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients.
Lung Cancer. 1998 Dec; 22(3):181-90.
PMID:10048471

KingKL,LiAF,ChauGY,ChiCW,WuCW,HuangCL,L uiWY.

Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival.
Cancer. 2000 Jun 1; 88(11):2464-70.
PMID:10861421

KinzlerKW,VogelsteinB.

Lessons from hereditary colorectal cancer.
Cell. 1996 Oct 18; 87(2):159-70
PMID:8861899

KinzlerKW,VogelsteinB.

Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers.
Nature. 1997 Apr 24; 386(6627):761,763
PMID:9126728

GluckRM,Bossy-WetzelE,GreenDR,NewmeyerDD.

The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.
Science. 1997 Feb 21; 275(5303):1132-6.
PMID:9027315

KnudsonAGJr.

Hereditarycancer, oncogenes, andantioncogenes.
CancerRes. 1985Apr;45(4):1437-43
PMID:2983882

KoomagiR, StammlerG, ManegoldC, MatternJ, VolmM

Expressionofresistance-relatedproteinsintumoraland peritumoraltissuesof
patientswithlungcancer.
CancerLett. 1996Dec20;110(1-2):129-36.
PMID:9018091

KorsmeyerSJ.

Bcl-2initiatesanewcategoryofoncogenes:regulatorso fcelldeath.
Blood. 1992Aug15;80(4):879-86
PMID:1498330

KoukourakisMI, GiatromanolakiA, O'ByrneKJ, CoxJ, KramerB, GatterKC, Harris
AL.

bcl-2andc-erbB-2proteinsareinvolvedintheregul ationofVEGFandofthymidine
phosphorylaseangiogenicactivityinnon-small-celllung cancer.
ClinExpMetastasis. 1999;17(7):545-54.
PMID:10845553

KristiansenG, YuY, PetersenS, KaufmannO, SchlunsK, DietelM, PetersenI.

Overexpressionofc-erbB2proteininon-smallcelllungcancer correlateswithdisease -stageandchromosomal
gainatthec-erbB2locusinnon-smallcelllungcancer.
EurJCancer. 2001Jun;37(9):1089-95.
PMID:11378338

LaudanskiJ, ChyczewskiL, NiklinskaWE, KretowskaM, FurmanM , SawickiB,
NiklinskiJ.

Expressionofbcl-2proteininnon-smallcelllungcancer :correlationwith
clinicopathologyandpatientsurvival.
Neoplasma. 1999;46(1):25-30.
PMID:10355530

LaudanskiJ, NiklinskaW, BurzykowskiT, ChyczewskiL, Niklinski J.

Prognosticsignificanceofp53andbcl-2abnormalitiesin operablenonsmallcelllung
cancer.
EurRespirJ. 2001Apr;17(4):660-6.
PMID:11401061

LazarisAC, TheodoropoulosGE, DavarisPS, PanoussopoulosD, NakopoulouL,
KittasC, GolematisBC.

Heatshockprotein70andHLA-DRmoleculistissueexpression .Prognostic
implicationsincolorectal cancer.
DisColonRectum. 1995Jul;38(7):739-45.
PMID:7607036

- LazarisACh,ChatzigianniEB,PanoussopoulosD,TzimasG N,DavarisPS, GolematisBCh.
Proliferatingcellnuclearantigenandheatshockprote in70immunolocalizationin
invasiveductalbreastcancernototherwispecified.
BreastCancerResTreat.1997Mar;43(1):43-51.
PMID:9065598
- LeeJS,YoonA,KalapurakaISK,RoJY,LeeJJ,TuN,HittelmanWN,HongWK.
Expressionofp53oncoproteininnon-small-celllungca ncer:afavorableprognostic
factor.
JClinOncol.1995Aug;13(8):1893-903.
PMID:7636531
- LevineAJ.
p53,thecellulargatekeeperforgrowthanddivision .
Cell.1997Feb7;88(3):323-31
PMID:9039259
- Lopez-GuerreroJA,Bolufer-GilabertP,Vera-Sempere FJ,MarugandelaConchal, Barragan-GonzalezE.
C-erbB-2expressionanditsrelationshipwithploidy, p53abnormalitiesand
epidermalgrowthfactorreceptorcontentinhumannon -smallcelllungcancer.
ClinChimActa.1999Jul;285(1-2):105-20.
PMID:10481927
- LuQL,PoulsomR,WongL,HanbyAM.
Bcl-2expressioninadultandembryonicnon-haematopoe tictissues.
JPathol.1993Apr;169(4):431-7.
PMID:8501540
- LupuR,ColomerR,ZugmaierG,SarupJ,ShepardM,S lamonD,LippmanME.
DirectinteractionofaligandfortheerbB2oncogene productwiththeEGFreceptor
andp185erbB2.
Science.1990Sep28;249(4976):1552-5.
PMID:2218496
- MairesseN,HormanS,MosselmannR,GalandP.
Antisenseinhibitionofthe27kDaheatshockproteinpr oductionaffectsgrowthrate
andcytoskeletalorganizationinMCF-7cells.
CellBiolInt.1996Mar;20(3):205-12.
PMID:8673069
- MaluseckaE,ZborekA,Krzyzowska-GrucaS,KrawczykZ.
ExpressionofheatshockproteinsHSP70andHSP27inpri marynon-smallcelllung
carcinomas.Animmunohistochemicalstudy.
AnticancerRes.2001Mar-Apr;21(2A):1015-21.
PMID:11396134

McKayDB.

Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related protein.
 Adv Protein Chem. 1993;44:67-98
 PMID:8317298

Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP.

Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death.
 EMBO J. 1996 Jun 3;15(11):2695-706.
 PMID:8654367

Mivechi NF, Murai T, Hahn GM.

Inhibitor of tyrosine and Ser/Thr phosphatases modulates the heat shock response.
 J Cell Biochem. 1994 Feb;54(2):186-97.
 PMID:8175893

Muller KM, Theile A.

[Lung tumors. Pathologic-anatomic diagnosis]
 Internist (Berl). 1994 Aug;35(8):710-23
 PMID:7960551

Neidhardt FC, Van Bogelen RA, Vaughn V.

The genetics and regulation of heat-shock proteins.
 Annu Rev Genet. 1984;18:295-329
 PMID:6442118

Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W.

Expression of heat shock protein 70 in grossly resected esophageal squamous cell carcinoma.
 Ann Thorac Surg. 2002 Jul;74(1):222-6.
 PMID:12118763

Oesterreich S, Weng CN, Qiu M, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Fuqua SA.

The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines.
 Cancer Res. 1993 Oct 1;53(19):4443-8.
 PMID:8402609

Ohsaki Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, Matsui H, Hirata S, Miyokawa N, Kubo Y, Kikuchi K.

bcl-2 and p53 protein expression in non-small cell lung cancers: correlation with survival time.
 Clin Cancer Res. 1996 May;2(5):915-20.
 PMID:9816250

Passlick B, Izbicki JR, Riethmuller G, Pantel K.

p53 in non-small-cell lung cancer.
 J Natl Cancer Inst. 1994 May 18;86(10):801-3
 PMID:8169981

Preville X, Salvemini F, Giraud S, Chaufour S, Paul C, Stepien G, Ursini MV, Arrigo AP.

Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery.

Exp Cell Res. 1999 Feb 25; 247(1): 61-78.

PMID: 10047448

Prisco M, Hongo A, Rizzo MG, Sacchi A, Baserga R.

The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal.

Mol Cell Biol. 1997 Mar; 17(3): 1084-92.

PMID: 9032235

Raybaud-Diogene H, Tetu B, Morency R, Fortin A, Monteil RA.

p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature.

Eur J Cancer B Oral Oncol. 1996 May; 32B(3): 143-9

PMID: 8762869

Reinmuth N, Brandt B, Kunze WP, Junker K, Thomas M, Achatzy R, Scheld HH, Semik M.

Ploidy, expression of erbB1, erbB2, P53 and amplification of erbB1, erbB2 and erbB3 in non-small cell lung cancer.

Eur Respir J. 2000 Nov; 16(5): 991-6.

PMID: 11153605

Ricaniadis N, Kataki A, Agnantis N, Androulakis G, Karakousis CP.

Long-term prognostic significance of HSP-70, c-myc and HLA-DR expression in patients with malignant melanoma.

Eur J Surg Oncol. 2001 Feb; 27(1): 88-93.

PMID: 11237497

Ritter JH, Dresler CM, Wick MR.

Expression of bcl-2 protein in stage T1N0M0 non-small cell lung carcinoma.

Hum Pathol. 1995 Nov; 26(11): 1227-32.

PMID: 7590697

Robert J, Gantress J, Rau L, Bell A, Cohen N.

Minor histocompatibility antigen-specific MHC-restricted CD8 T cell responses elicited by heat shock proteins.

J Immunol. 2002 Feb 15; 168(4): 1697-703.

PMID: 11823499

Rosler JA, Weitowitz HJ.

Recent data on cancer due to asbestos in Germany.

Med Lav. 1995 Sep-Oct; 86(5): 440-8.

PMID: 8684294

Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C.
 Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c.
 Nature. 1998 Jan 29; 391(6666):496-9.
 PMID:9461218

Ruggeri B, Di Rado M, Zhang SY, Bauer B, Goodrow T, Klein-Szanto AJ.
 Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumor sex exhibit frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene.
 Proc Natl Acad Sci USA. 1993 Feb 1; 90(3):1013-7.
 PMID:8430068

Samet JM.
 The epidemiology of lung cancer.
 Chest. 1993 Jan; 103(1 Suppl):20S-29S.
 PMID:8416770

Scheurle D, Jahanzeb M, Aronsohn RS, Watzek L, Narayana nR.
 HER-2/neu expression in archival non-small cell lung carcinoma using FDA-approved Herceptest.
 Anticancer Res. 2000 May-Jun; 20(3B):2091-6.
 PMID:10928158

Schiller JH, Adak S, Feins RH, Keller SM, Fry WA, Livingston RB, Hammond ME, Wolf B, Sabatini L, Jett J, Kohman L, Johnson DH.
 Lack of prognostic significance of p53 and K-ras mutations in primary resected non-small-cell lung cancer on E4592: a Laboratory Ancillary Study on an Eastern Cooperative Oncology Group Prospective Randomized Trial of Postoperative Adjuvant Therapy.
 J Clin Oncol. 2001 Jan 15; 19(2):448-57.
 PMID:11208838

Schneider E, Montenarh M, Wagner P.
 Regulation of CAK kinase activity by p53.
 Oncogene. 1998 Nov 26; 17(21):2733-41.
 PMID:9840937

Schneider J, Jimenez E, Marenbach K, Romero H, Marx D, Meden H.
 Immunohistochemical detection of HSP60-expression in human ovarian cancer. Correlation with survival in a series of 247 patients.
 Anticancer Res. 1999 May-Jun; 19(3A):2141-6.
 PMID:10470162

Shiseki M, Kohno T, Nishikawa R, Sameshima Y, Mizoguchi H, Yokota J.
 Frequent allelic losses on chromosomes 2q, 18q, and 22q in advanced non-small cell lung carcinoma.
 Cancer Res. 1994 Nov 1; 54(21):5643-8.
 PMID:7923210

ShoplandDR,PechacekTF,CullenJW.

Towardatobacco-freesociety.
SeminOncol.1990Aug;17(4):402-12
PMID:2201086

SrivastavaPK.

Peptide-bindingheatshockproteinsintheendoplasmic reticulum:roleinimmune
responsetocancerandinantigenpresentation.
AdvCancerRes.1993;62:153-77
PMID:8109317

SrivastavaPK,UdonoH,BlachereNE,LiZ.

Heatshockproteinstransferpeptidesduringantigenpro cessingandCTLpriming.
Immunogenetics.1994;39(2):93-8
PMID:8276462

StatistischeBundesamtDeutschland2002

<http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab3.htm>

StatistischeBundesamtDeutschland2002

<http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2001/p3840092.htm>

SubjeckJR,ShyyTT.

Stressproteinsystemsofmammaliancells.
AmJPhysiol.1986Jan;250(1Pt1):C1-17
PMID:3510555

SusinSA,LorenzoHK,ZamzamiN,Marzol,SnowBE,B rothersGM,MangionJ,

JacototE,CostantiniP,LoefflerM,LarochetteN,Good lettDR,AebersoldR,
SiderovskiDP,PenningerJM,KroemerG.

Molecularcharacterizationofmitochondrialapoptosis-ind ucingfactor.
Nature.1999Feb4;397(6718):441-6.
PMID:9989411

TammemagiMC,McLaughlinJR,MullenJB,BullSB,John stonMR,TsaoMS,
CassonAG.

Astudyofsmoking,p53tumorsuppressorgenealteratio nsandnon-smallcelllung
cancer.
AnnEpidemiol.2000Apr;10(3):176-85.
PMID:10813511

TamuraY,TsuboiN,SatoN,KikuchiK.

70kDaheatshockcognateproteinisatransformation-associ atedantigenanda
possibletargetforthehost'santi-tumorimmunity.
JImmunol.1993Nov15;151(10):5516-24.
PMID:8228242

Tonato M., on behalf of the ALPI/EORTC-LCG investigators, Policlinico Hospital, Perugia, Italy
 Final report of the Adjuvant Lung Project Italy (ALPI): an Italian/EORTC-LCG randomised trial of adjuvant chemotherapy in completely resected non-small cell lung cancer (NSCLC).
 ASCO Year: 2002 Abstract No: 1157 Category: Non-Small-Cell Lung Cancer

Tsuchiya E, Nakamura Y, Weng SY, Nakagawa K, Tsuchiya S, Sugano H, Kitagawa T.
 Allelotype of non-small cell lung carcinoma--comparison between loss of heterozygosity in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma.
 Cancer Res. 1992 May 1; 52(9):2478-81.
 PMID: 1314694

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM.
 Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cell with the t(14;18) chromosome translocation.
 Science. 1984 Nov 30; 226(4678):1097-9.
 PMID: 6093263

Udono H, Srivastava PK.
 Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity.
 J Exp Med. 1993 Oct 1; 178(4):1391-6.
 PMID: 8376942

Vaux DL, Aquila HL, Weissman IL.
 Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing.
 Int Immunol. 1992 Jul; 4(7):821-4.
 PMID: 1498090

Vega FJ, Iniesta P, Caldes T, Sanchez A, Lopez JA, de Juan C, Diaz-Rubio E, Torres A, Balibrea JL, Benito M.
 p53 exon 5 mutations as a prognostic indicator of shortened survival in non-small-cell lung cancer.
 Br J Cancer. 1997; 76(1):44-51.
 PMID: 9218731

Vilaboa NE, Galan A, Troyano A, de Blas E, Aller P.
 Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1).
 J Biol Chem. 2000 Aug 11; 275(32):24970-6.
 PMID: 10816597

Volm M, Mattern J, Stammer G.
 Up-regulation of heat shock protein 70 in adenocarcinoma of the lung in smokers.
 Anticancer Res. 1995 Nov-Dec; 15(6B):2607-9.
 PMID: 8669833

WarriAM,LaineAM,MajasuoKE,AlitaloKK,Harkonen PL.
 EstrogensuppressionoferbB2expressionisassociatedwith increasedgrowthrate
 ofZR-75-1humanbreastcancercellsinvitroandinnud emice.
 IntJCancer.1991Oct21;49(4):616-23.
 PMID:1680817

WatsonK.
 Microbialstressproteins.
 AdvMicrobPhysiol.1990;31:183-223
 PMID:2264523

WelchWJ.
 Mammalianstressresponse:cellphysiology,structure/functionofstressproteins,
 andimplicationsformedicineanddisease.
 PhysiolRev.1992Oct;72(4):1063-81
 PMID:1438579

WienckeJK,ThurstonSW,KelseyKT,VarkonyiA,WainJC, MarkEJ,ChristianiDC.
 Earlyageatsmokinginitiationandtobaccocarcinogen DNA damageinthelung.
 JNatlCancerInst.1999Apr7;91(7):614-9.
 PMID:10203280

YamamotoK,OkamotoA,IsonishiS,OchiaiK,OhtakeY.
 Heatshockprotein27wasup-regulatedincisplatinresist anthumanovariantumor
 celllineandassociatedwiththecisplatinresistance.
 CancerLett.2001Jul26;168(2):173-81.
 PMID:11403922

YangE,KorsmeyerSJ.
 Molecularathanatopsis:adiscourseontheBCL2familyand celldeath.
 Blood.1996Jul15;88(2):386-401
 PMID:8695785

YangJ,LiuX,BhallaK,KimCN,IbradoAM,CaiJ,Pe ngTI,JonesDP,WangX.
 PreventionofapoptosisbyBcl-2:releaseofcytochrome cfrommitochondria
 blocked.
 Science.1997Feb21;275(5303):1129-32.
 PMID:9027314

YoshinoI,GoedegebuurePS,PeoplesGE,LeeKY,Eber leinTJ.
 Humantumor-infiltratingCD4+TcellsreacttoBcelll inesexpressingheatshock
 protein70.
 JImmunol.1994Nov1;153(9):4149-58.
 PMID:7930618

YuDH,HungMC.
 Expressionofactivatedratneoncogeneissufficientto induceexperimental
 metastasisin3T3cells.
 Oncogene.1991Nov;6(11):1991-6.
 PMID:1682865

YuD,WangSS,DulskiKM,TsaiCM,NicolsonGL,HungM C.
c-erbB-2/neuoverexpressionenhancesmetastaticpotential ofhumanlungcancer
cellsbyinductionofmetastasis-associatedproperties.
CancerRes.1994Jun15;54(12):3260-6.
PMID:7911396

YunisJJ,FrizzeraG,OkenMM,McKennaJ,TheologidesA,A rnesenM.
Multiplerecurrentgenomicdefectsinfollicularlymphom a.Apossiblemodelfor
cancer.
NEnglJMed.1987Jan8;316(2):79-84.
PMID:3537802

ZochbauerS,KrainikG,HuberH.
[Bronchialcancer--development,diagnosis,therapy,prog nosis]
WienKlinWochenschr.1994;106(14):431-47
PMID:7941590

8. Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Arnold	Aumüller	Barth	Bartsch
Basler	Baum	Berger	Bertalanffy
Beyer	Bien	Bolm	Brilla
Cetin	Christiansen	Daut	Effendy
Engel	Fischer	Fruhstorfer	Fuhrmann
Geus	Görg	Gotzen	Grau
Gressner	Griss	Habermehl	Happle
Hasilik	Hasse	Hebebrand	Hellinger
Hellwig	Herzum	Hesse	Höffken
Hofmann	Joseph	Kaiser	Kaluza
Katschinski	Kern	Klenk	Klose
Köhler	Koolmann	Kretschmer	Krieg
Kuhn	Lang	Lange	Lennartz
Löffler	Lorenz	Maisch	Mennel
Moll	Moosdorf	Mueller	Müller
Neubauer	Nies	Oertel	Pfab
Pfeiffer	Radsak	Remschmidt	Richter
Röhm	Rogausch	Rothmund	Schachtschabel
Schäfer	Schneider	Schneyer	Schulz
Sedlacek	Seifart	Seitz	Seyberth
Simon	Sommer	Steiniger	Stief
Stinner	Storck	Sturm	Ukrow
Vogelmeier	Vogt	Vohland	Voigt
Wagner	Weihe	Werner	Westphal
Wichert von	Wilke	Wolf	Zielke

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Wolf und Herrn Dr. U. Seifart danke ich für die Themenstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. U. Seifart danke ich weiterhin für die hervorragende Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft, uneingeschränkte Hilfe bei auftretenden Problemen sowie Begutachtung der Arbeit.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. U. Seifart und Frau Dr. Ramaswamy für die gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.

Herrn Prof. Dr. Moll und Frau Dr. Ramaswamy danke ich zudem für die freundliche Bereitstellung von Tumorproben zur Antikörpertestung sowie die uneingeschränkte Hilfe bei auftretenden Problemen bezüglich der Methoden.

Bei Frau Wachtel, Frau Loechelt, Frau Dr. Henrich und Frau PD Dr. Jaques danke ich mich für das überaus nette Arbeitsklima und die praktische Unterstützung bei meinen Experimenten.

Bei Frau Dr. Wild, Frau L. Aschmoneit und Herrn Dr. Seifart danke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich mich bei Elmar Faber für die Unterstützung beim Umgang mit der für diese Arbeit erforderlichen Software.

Ausdrücklich sei allen Mitarbeitern der Abteilung Hämatologie/Onkologie für das nette Arbeitsklima gedankt.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie und meiner Freundin Insa für das entgegengebrachte Verständnis sowie die finanzielle und moralische Unterstützung bedanken, ohne die ich niemals soweit gekommen wäre.