

Aus der Klinik für Innere Medizin  
Geschäftsführender Direktor: Prof. A. Neubauer  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

**Expression von Differenzierungsmarkern  
in kombinierten kleinzelligen  
Bronchialkarzinomen**

**Inaugural-Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin,  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hannah Starke, geb. Specht

aus Frankfurt am Main

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
30.11.2006.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. M. Schuermann

Korreferent: Prof. Dr. S. Bauer

2. Korreferent: Prof. Dr. R. Moll

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Bronchialkarzinom</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Ursprung und Klassifikation	2
1.1.2.1	Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC)	4
1.1.2.1.1	Plattenepithelkarzinome (SCC)	4
1.1.2.1.2	Adenokarzinome (ADC)	5
1.1.2.1.3	Großzellige Karzinome (LCC)	5
1.1.2.1.4	Adenosquamöse Karzinome	6
1.1.2.2	Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC)	7
1.1.2.2.1	Klassische Kleinzeller (cSCLC)	7
1.1.2.2.2	Variante Kleinzeller (vSCLC)	8
1.1.2.3	Karziinoide	9
1.1.2.4	Karzinome pleomorpher sarkomatoider Struktur	9
<b>1.2</b>	<b>Besonderheiten des kleinzelligen Bronchialkarzinoms</b>	<b>9</b>
1.2.1	Entwicklung von Rezidiven mit varianter Differenzierung	9
1.2.2	Entstehung sekundärer Resistenz	10
1.2.2.1	Multi-Drug Resistenz	11
1.2.2.2	Chemotherapeutika-induzierte Resistenz	11
1.2.2.3	Adhärenz-vermittelte Resistenz	13
<b>1.3</b>	<b>Modell der Entstehung varianter kleinzelliger Lungentumoren (vSCLC)</b>	<b>13</b>
1.3.1	Stand der Forschung	13
1.3.2	Variantenentstehung <i>in vitro</i> - Etablierungsversuch eines Zellkulturmodells	16
<b>1.4</b>	<b>Neuroendokrine Differenzierung</b>	<b>17</b>
1.4.1	L-Dopa-Decarboxylase (key amine-handling enzyme)	17
1.4.2	Synaptophysin	18
1.4.3	Chromogranin A	18
<b>1.5</b>	<b>Extrazelluläre Matrix und Adhäsionsmechanismen</b>	<b>18</b>

---

1.5.1	Integrine	19
1.5.1.1	Struktur und Einteilung	19
1.5.1.2	Funktion und Arbeitsweise	20
1.5.1.3	Integrine in Tumoren	21
1.5.1.4	Integrinexpression in Lungentumoren	21
<b>1.6</b>	<b>Der CD44-Rezeptor</b>	<b>22</b>
1.6.1	Vorkommen und Bedeutung von CD44 in Tumoren	23
1.6.2	CD44 in gesundem Lungengewebe und in Lungentumoren	24
1.6.3	CD44-Expression im kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC)	25
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b>Vergleichende Gen- und Proteinexpression: klassische <i>versus</i> variante Zelllinien</b>	<b>26</b>
<b>2.2</b>	<b>Existiert ein Korrelat von varianten SCLC-Zellen <i>in vivo</i>?</b>	<b>27</b>
<b>2.3</b>	<b>Adhärenz-induzierte Transdifferenzierung – ein reversibles Phänomen?</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>28</b>
3.1.1	Chemikalien	28
3.1.2	Antikörper, Seren, IgG-Fractionen	29
3.1.3	Enzyme, Nukleinsäuren, Fertigpuffer	30
3.1.4	Oligonukleotide	31
3.1.5	Kits und Sonstiges	31
3.1.6	Puffer und Lösungen	32
3.1.7	Gele	34
3.1.8	Reaktionsgemische	34
3.1.9	Geräte und Zubehör	35
3.1.10	Zelllinien	37
3.1.11	Paraffinmaterial	38

---

<b>3.2 Methoden</b>	<b>41</b>
3.2.1 Zellkultur	41
3.2.1.1 Kultivierung	41
3.2.1.2 Generierung adhärenter Subklone	41
3.2.1.3 Kultivierung von Zellen auf unbeschichteten Kulturplatten	42
3.2.1.4 RT-PCR-Analyse	42
3.2.1.5 RNA-Isolierung	42
3.2.1.6 Photometrische RNA-Quantifizierung und Reinheitskontrolle	43
3.2.1.7 c-DNA-Synthese	43
3.2.1.8 PCR-Analyse	43
3.2.1.9 Gelelektrophoresen	44
3.2.1.10 1 % Agarosegel	45
3.2.1.11 6 % Polyacrylamidgel	45
3.2.1.12 Standardisierung über GAPDH-Kontrolle	46
3.2.1.13 Kinasieren eines DNA-Längenstandards	47
3.2.1.14 Western Blot-Analyse	47
3.2.1.15 Proteinextraktion	48
3.2.1.15.1 adhärente Zelllinien	48
3.2.1.15.2 Suspensionszellen	48
3.2.1.16 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration (n. Lowry)	49
3.2.1.17 SDS-Gelelektrophorese	49
3.2.1.18 Semi- <i>dry</i> -Elektroblot	50
3.2.2 Immunhistochemie	52
3.2.2.1 APES-Beschichtung von Objektträgern	53
3.2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	53
3.2.2.3 Immunhistochemische Färbung	54
3.2.2.3.1 Optimierung von Blockierungsschritten	56
3.2.2.3.2 Etablierung von Antikörperverdünnung und Antikörperkontrollen	56
3.2.2.4 Auswertung	57
3.2.3 FACS-Analyse	58
3.2.3.1 Zellzählung	59
3.2.3.2 Färbung und Messung	59
3.2.3.3 Auswertung	60
3.2.3.4 Nachweis apoptotischer Zellen	60

---

3.2.3.5	Ausschluss von Autofluoreszenz	61
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Eigene Vorarbeiten/Seitenäste des Gesamtprojekts</b>	<b>63</b>
4.1.1	Adhärenz-vermittelte epitheliale Transdifferenzierung von SCLC-Linien	63
4.1.2	Differentielle Genexpression in adhärenenten <i>versus</i> Suspensionszellen	65
4.1.2.1	Verlust neuroendokriner Differenzierungsmarker	65
4.1.2.2	Zugewinn epithelialer Differenzierungsmarker	66
<b>4.2</b>	<b>Differentielle Genexpression induziert differenzielle Proteinsynthese</b>	<b>67</b>
4.2.1	Adhärenz bewirkt eine Hochregulierung typischer NSCLC-Marker	68
4.2.2	Verlust von L-Dopa-Decarboxylase nach morphologischer Transdifferenzierung	71
<b>4.3</b>	<b>Adhärenz – ein reversibles Phänomen</b>	<b>71</b>
4.3.1	Redifferenzierung – eine Frage der Zeit?	72
<b>4.4</b>	<b>Differenzielle Expression in Lungentumoren</b>	<b>74</b>
4.4.1	Der CD44-Rezeptor-geeigneter Marker zur Einteilung in SCLC-NSCLC?	75
4.4.1.1	Kein CD44-Nachweis in kleinzelligen Bronchialkarzinomen	76
4.4.1.2	CD44-Expression als typ. Merkmal fast aller NSCLC-Tumore	77
4.4.1.2.1	Plattenepithelkarzinome (SCC)	78
4.4.1.2.2	Adenokarzinome (ADC)	79
4.4.1.2.3	Großzellige Karzinome (LCC)	80
4.4.1.2.4	Differentielle CD44-Expression innerhalb varianter/heterogener Kleinzeller	81
4.4.2	Synaptophysin und Chromogranin als typische SCLC-Marker geeignet zur Unterscheidung neuroendokriner Anteile in Primärtumoren?	85
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
<b>5.1</b>	<b>Adhärenz – erster Schritt in Richtung vSCLC?</b>	<b>88</b>
<b>5.2</b>	<b>Entsprechen adhärenent wachsende SCLC-Kulturen dem morphologisch beschriebenen vSCLC-Typ?</b>	<b>88</b>
5.2.1	Adhärenente Zellen verlieren ihre neuroendokrinen Eigenschaften	88
5.2.2	Welche NSCLC-Eigenschaften besitzen adhärenente SCLC-Zellen?	89

---

5.2.3	Zeitliche Latenz Adhärenz-abhängiger Prozesse	89
5.2.4	Adhärenente Zellen haben eine gesteigerte Chemo- und Radioresistenz	90
5.2.5	Adhärenz-vermittelter Schutz vor Apoptose in den adhärenenten Linien ursächlich für gesteigerte Chemo-Radioresistenz?	91
<b>5.3</b>	<b>Gibt es Hinweise für eine Transdifferenzierung in vivo?</b>	<b>92</b>
<b>5.4</b>	<b>Bedeutung und klinische Relevanz</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>111</b>
8.1	Abkürzungen	111
8.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	113
8.3	Publikationen	113
8.4	Danksagung	113
8.5	Lebenslauf	114
8.6	Ehrenwörtliche Erklärung	115

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Bronchialkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Maligne Tumoren der Lunge zählen zu den am häufigsten diagnostizierten Krebserkrankungen, wobei steigende Inzidenzraten vorzugsweise auf einen Anstieg der Erkrankungshäufigkeit von Frauen zurückzuführen sind.

Zugleich sind die Lungenkarzinome im Vergleich mit anderen bösartigen Tumoren mit der höchsten Sterblichkeitsrate verbunden (1).

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starben in Deutschland allein im Jahre 1998 37.934 Patienten an den Folgen einer bösartigen Erkrankung von Luftröhre, Bronchien oder Lungen.

Als wesentlicher Kausalfaktor für die Entstehung von Bronchialkarzinomen gilt der Tabakabusus (2;3). Der Anteil von Rauchern unter den Lungentumorpatienten beträgt rund 75-85 % und 20 % aller Raucher entwickeln ein Karzinom der Atemwege (3;4).

Ein weiterer Risikofaktor stellt die beruflich bedingte Exposition gegenüber kanzerogenen Schadstoffen, wie z.B. Asbest dar (5). Besonders gravierend wirkt sich die Kombination von Zigarettenrauchen und Asbestexposition aus: das relative Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken steigt auf das 60-fache (6).

Andererseits sind 10-15 % aller betroffenen Patienten Nichtraucher. Seit langem ist eine familiäre Häufung von Lungenkrebs bekannt, die z.T. auf sog. „*Susceptibility*-Gene“ (*Susceptibility* = Anfälligkeit), z.T. auf durch Mutation des p53-Gens verursachte gestörte DNA-Reparaturmechanismen zurückführbar ist.

Kommt es im Verlauf zum Auftreten klinischer Symptome wie z.B. chronischem Husten evtl. mit blutigem Auswurf, Brustschmerz und Gewichtsverlust oder Rekurrenzparese, handelt es sich schon um Zeichen eines fortgeschrittenen malignen Prozesses, der einen kurativen Therapieansatz in 2/3 aller Fälle verhindert und sich in einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 15 % nach Therapie widerspiegelt.

Gründe für die hohen Mortalitätsraten sind vor allem zu suchen in unzureichenden Behandlungsstrategien. Diese sind einerseits auf die fehlende Möglichkeit zur Früherkennung im Rahmen eines Screenings zurückzuführen, andererseits auf die Komplexität der Tumorgenese und der damit verbundenen Heterogenität der Tumoren.



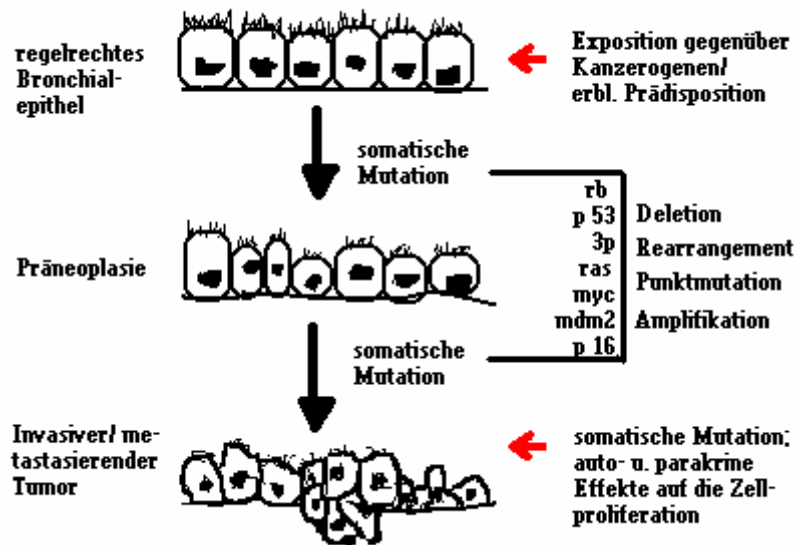
Es ist daher besonders wünschenswert, ein tieferes Verständnis über die Pathogenese von Lungentumoren zu gewinnen, um in der Zukunft neue und effizientere Therapieansätze entwickeln zu können.

### 1.1.2 Ursprung und Klassifikation

Durch die ständige Einwirkung kanzerogener Stoffe wie Nikotin oder Asbest kommt es zu unterschiedlichen, zumeist voneinander unabhängigen genetischen Alterationen im respiratorischen Epithel (7-11). Diese Veränderungen genetischen Materials, die immer größere Genabschnitte auf einem Chromosom umfassen, lassen sich mittels sogenannter *CGH* (*comparative genetic hybridisation*)-Techniken nachweisen, wobei bisher kein direkter Zusammenhang zwischen einzelnen Mutationen und der Entwicklung eines bestimmten histomorphologischen Typs der Lungentumoren nachgewiesen wurde. Es zeigen sich jedoch signifikante Häufungen bestimmter genetischer Alterationen in einzelnen Tumortypen, wie z.B. die *K-ras* Mutation in Adenokarzinomen der Lunge oder der Verlust von Genabschnitten auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 beim kleinzelligen Lungentumor (12;13). Es scheint auch genetisch determinierte Unterschiede in der Fähigkeit, Tabakkarzinogene zu metabolisieren zu geben. So finden sich z.B. individuelle Schwankungen im Expressionslevel des Cytochrom P<sub>450</sub>-Systems und anderer Enzyme, die für die Entgiftung von im Tabakrauch enthaltener Substanzen notwendig sind (14). Eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Lungentumoren spielen neben chromosomalen Abnormitäten Punktmutationen, Amplifikationen bzw. Deletionen kleinerer DNA-Abschnitte sowie die veränderte Expression spezifischer Gene. Diese Art genetischer Veränderungen betreffen überwiegend solche Gene, die direkt oder indirekt an Wachstum, Proliferation oder Differenzierung von Zellen beteiligt sind. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Onkogene und Tumorsuppressorgene. Die verschiedenen Veränderungen sind offensichtlich Teil eines mehrstufigen Prozesses der Tumorgenese, der sich in Initiation, Promotion und Progression gliedern lässt.

Man geht davon aus, dass sämtliche Lungentumoren aus pluripotenten Stammzellen epithelialen Ursprungs hervorgehen, eine Annahme, die gestützt wird durch die Beobachtung, dass innerhalb eines Tumors gleichzeitig mehrere Differenzierungsformen vorhanden sein können (1).

Dabei durchläuft das Bronchialepithel zunächst verschiedene, histologisch klassifizierbare prämaligne Stadien, ehe es schließlich zur Ausbildung eines Karzinoms kommt. Dazu gehören neben der Hyperplasie die Metaplasie und das Carcinoma *in situ* als Vorläufer des invasiven Karzinoms (1).



**Abbildung 1:** Schemat. Darstellung der schrittweisen Transformation von Bronchialepithel unter Einwirkung kanzerogener Substanzen; korrespondierend: Akkumulation verschiedenster genetischer Alterationen in Onko- und Tumorsuppressorgenen

Sowohl Prognose als auch Therapie der Lungentumoren sind ganz entscheidend abhängig von Tumorgöße und -stadium (Vorhandensein von Metastasen) und histopathologischer Charakterisierung zum Zeitpunkt der Diagnose.

Die histologische Primärdiagnostik beruht im Allgemeinen auf lichtmikroskopischer Darstellung 1-2 mm großer Biopsiepräparate unter Zuhilfenahme elektronenmikroskopischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Verfahren (15).

Die letzteren haben in den vergangenen Jahren zu einem tieferen Verständnis für die enorme Heterogenität und biologische Komplexität von Lungentumoren beigetragen, was sich nicht zuletzt in der erweiterten Klassifikation von Lungen- und Pleuratumoren der WHO/IASLC aus dem Jahre 1999 niederschlägt. Annähernd 50 % aller Lungenkarzinome zeigen mehr als einen führenden histologischen Tumortyp (15). Ein Beispiel für die Heterogenität von Tumoren stellt das kleinzellige Bronchialkarzinom dar, welches in 8 % aller Biopsien, in Autopsiepräparaten sogar in 14-20 % der Fälle mehr als ein Differenzierungsmuster aufweist (16). Besondere Beachtung verlangt diese Tatsache insofern, als die Diagnose „kleinzelliges“, bzw. „nichtkleinzelliges“ Karzinom entscheidend für die Prognose und das weitere therapeutische Procedere ist. Zusätzlich weist das variante kleinzellige Karzinom einige vom klassischen Kleinzeller abweichende Besonderheiten auf, die Einfluss auf Tumorprogression, Metastasierung, Chemo- und Radiosensitivität und damit auf die Prognose nehmen.

Trotz variabler Differenzierungsmuster und vielfältiger Kombinationsformen innerhalb eines Tumors besteht nach der neuen Klassifikation in der Mehrzahl der Fälle die Möglichkeit, zu einer eindeutigen und reproduzierbaren Tumordiagnose zu kommen und damit den Weg für eine adäquate Behandlungsstrategie zu bahnen (15).

Dabei haben klinische Erfahrungen hinsichtlich Krankheitsverlauf und Therapie von Lungentumoren zur Einteilung in zwei große Gruppen geführt: die kleinzelligen Bronchialkarzinome (SCLC = *small cell lung cancer*) und die nichtkleinzelligen Karzinome (NSCLC = *non small cell lung cancer*). Die letzte Gruppe gliedert sich in vier Subtypen, dazu gehören Plattenepithel-, Adeno-, großzellige sowie adenosquamöse Karzinome.

Darüber hinaus unterscheidet man die typischen und atypischen Karzinoide und die Gruppe von Karzinomen pleomorpher, sarkomatoider Struktur.

#### **1.1.2.1 Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC)**

Die Tumoren vom nichtkleinzelligen Typ machen circa 75 % der Bronchialkarzinome aus. Sie werden unterklassifiziert anhand ihrer speziellen Differenzierungsmuster.

Wie andere maligne Tumoren werden sie mit Hilfe des TNM-Systems in verschiedene Stadien (Stad. I-IV) eingeteilt, die die Grundlage für Therapie und Prognose bilden. Leider basieren die prognostischen Aussagen des TNM-Systems hier ausschließlich auf den im Rahmen thoraxchirurgischer Eingriffe erhobenen Befunden. Der Nachweis von Mikrometastasen in Knochenmark oder Lymphknoten, von tumorbiologischen prognoserelevanten Blutfaktoren oder der Einfluss der modernen Strahlentherapie und multimodaler Behandlungskonzepte bleiben bis dato unberücksichtigt.

Nichtkleinzeller können unterschiedlich stark differenziert sein: undifferenziert, niedrig-, mäßig- und hochdifferenziert (1;11;17-23). Nach geltender WHO-Klassifikation zählen die unter 1.1.2.1.1-4 genannten Tumoren zu dieser Gruppe.

##### **1.1.2.1.1 Plattenepithelkarzinome (SCC)**

Karzinome vom plattenepithelialen Typ wachsen als isolierte Rundherde vor allem im Bereich der Segment- bzw. Subsegmentbronchien (1). In fortgeschrittenem Stadium kommt es häufig zur Entwicklung von Nekrosen und Kavernen. Histologisch zeigt dieser Tumor vorwiegend epidermisähnliche Epithelverbände und immunhistochemisch nachweisbare, massive Keratinexpression bis hin zur Ausbildung konzentrisch geschichteter Hornperlen in hochdifferenzierten Tumoren. Teilweise finden sich histologische Varianten mit papillären,

basaloiden klar- oder kleinzelligen Komponenten. Die Tumorzellen selbst sind charakterisiert durch gelappt aussehende, atypische Kerne und prominente Nukleoli.

Molekularbiologisch lassen sich in 50-70 % der Plattenepithelkarzinome Mutationen des p53 Gens nachweisen. Darüber hinaus gehen sie häufig mit einer Überexpression des EGF-Rezeptors sowie multiplen Deletionen auf folgenden Chromosomenabschnitten einher: 3p (FHIT), 9p (p16), 17p (p53), 13q (Rb), 5q (APC, MCC), 1q, 2q, 8q.

Dieser Tumortyp ist besonders stark assoziiert mit chronischem Tabakkonsum (24) und verdient daher im Sinne einer wirksamen Primärprävention besondere Beachtung.

#### **1.1.2.1.2 Adenokarzinome (ADC)**

Diese Karzinome wachsen häufig in der Lungenperipherie. Sie zeigen die Tendenz zur schnellen Invasion in Gefäße und neigen damit zu hämatogener Metastasierung (25). Häufig finden sich regressiv bedingte zentrale Nekrosen und Vernarbungen.

In den letzten Jahren zeigt sich eine Häufigkeitszunahme; in manchen Ländern machen sie 50 Prozent aller Lungentumoren aus. Die Assoziation mit langjährigem Tabakabusus scheint nicht so ausgeprägt zu sein wie bei anderen Karzinomen der Lunge.

Histologisch finden sich häufig Mischformen verschiedener Differenzierungsmuster wie azinäre, papilläre, bronchioloalveoläre und solide Formationen. Teilweise lassen sich Schleimsubstanzen oder Sekretvakuolen (Muzin) sowie häufig mehrkernige Riesenzellen nachweisen. Die Tumorzellen sind von polygonaler Gestalt mit großen Kernen, prominenten Kernkörperchen und reichlich Zytoplasma. Sie bilden solide, drüsenförmige Nester.

Die häufigste Mutation in Adenokarzinomen stellt die *K-ras*-Mutation dar, deren prognostische Bedeutung widersprüchlich diskutiert wird. Ähnlich wie beim Plattenepithelkarzinom lassen sich auch hier Mutationen der p53-, p16- und Rb-Gene nachweisen.

Als Subtyp dieser Gruppe ist das bronchioloalveoläre Karzinom (BAC) anzusehen, welches in den terminalen Bronchiolen und Alveoli entsteht (1).

Bei Diagnosestellung können Probleme bei der Abgrenzung primär pulmonaler Adenokarzinome von Metastasen eines extrapulmonalen Primärtumors auftreten. Zur Differenzierung werden heute mit Erfolg immunhistochemische Verfahren eingesetzt.

#### **1.1.2.1.3 Großzellige Karzinome (LCC)**

Karzinome mit vorwiegend großzelliger Komponente sind eher selten. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um führend plattenepitheliale oder adenomatöse Komponenten mit

herdförmiger Anhäufung mehrkerniger Riesenzellen. Häufig findet man größere Nekroseareale und einen relativ hohen Mitoseindex.

Besitzen großzellige Tumoren zusätzlich neuroendokrine Eigenschaften, so werden sie subsumiert unter die Gruppe neuroendokriner Tumoren (LCNEC = *large cell neuroendocrine carcinoma*). Sie zeigen dann die für diese Gruppe charakteristischen Merkmale hinsichtlich Struktur **und** Molekularbiologie, ähnlich den neuroendokrinen SCLC. Nichtsdestotrotz werden sie aus therapeutischen Erwägungen heraus als gesonderte Klasse von den letztgenannten unterschieden.

Als Untergruppe der großzelligen Tumoren sind zuletzt noch die basaloiden Karzinome zu erwähnen; sie machen ca. 3 % aller nichtkleinzelligen Lungentumoren in Europa aus (26).

#### **1.1.2.1.4 Adenosquamöse Karzinome**

Der Vollständigkeit halber soll dieser Subtyp hier nur kurze Erwähnung finden. Es handelt sich um Tumoren, deren Diagnose aus dem Vorhandensein von Plattenepithel- und Adenokarzinom- Anteilen resultiert. Entscheidend ist per definitionem der Nachweis von je 10 % jeden Differenzierungstyps am Gesamttumor.

Wichtigster prognostischer Faktor bei malignen Lungentumoren stellt die Tumorabsiedlung in mediastinale Lymphknoten dar (27). Karzinome der Lunge metastasieren häufig. So zeigen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits 35 % der an nichtkleinzelligem Tumor erkrankten Patienten Fernmetastasen in Leber, Skelettsystem, Nebennieren und ZNS (28). In solch fortgeschrittenem Stadium (St. IV) kann nur noch mit palliativer Zielsetzung therapiert werden, wobei multimodale Therapiekonzepte zum Einsatz kommen. Goldstandard in der Therapie nichtkleinzelliger Tumore ist heute eine Chemotherapie mit Cis- oder Carboplatin in Kombination mit einem Taxan, Gemcitabine oder Vinorelbin, die jedoch unspezifisch und toxisch wirkt (29). In früheren Stadien (St. I/II) lassen sich unter kurativen Gesichtspunkten recht gute operative Ergebnisse mit nachfolgend adjuvanter Radiotherapie erzielen. Neuere Phase-III-Studien weisen auf eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeiten bei neoadjuvanter Applikation von Chemotherapeutika im Stadium IIIA hin (30;31). Im Stadium IIIB kann nach ersten Zwischenergebnissen durch neoadjuvante Radio-Chemotherapie eine Steigerung der Überlebensrate erreicht werden (32).

### 1.1.2.2 Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC)

Nach aktueller WHO/IASLC-Klassifikation aus dem Jahre 1999 unterscheidet man das klassische kleinzellige Karzinom von der heterogen differenzierten Gruppe der kombinierten, auch varianten kleinzelligen Tumoren (*combined small cell carcinoma*). Damit ist die bisher gültige Einteilung in *oat-cell-* bzw. *intermediate-cell carcinoma* ebenso wie die vormals als „*mixed SCLC*“ klassifizierten Kleinzeller mit großzelligem Anteil obsolet (26).

#### 1.1.2.2.1 Klassische Kleinzeller (cSCLC)

Diese Diagnose wird in circa 25 % aller Bronchialkarzinom-Fälle gestellt. Der Kleinzeller tritt zumeist im Bereich zentraler und intermediärer Segment- sowie Subsegmentbronchien auf und zeigt typischerweise ein manschettenförmiges, intramural-bronchiales und perivasales Wachstumsmuster. Nach Stromadestruktion kommt es zum Gefäßeinbruch und damit zur frühzeitigen Entwicklung lymphogener und hämatogener Metastasen- häufig bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (4;33;34).

Die Stadieneinteilung wird nicht nach klassischem TNM-Schema vorgenommen, sondern erfolgt ausschließlich in ein limitiertes (auf eine Thoraxhälfte beschränktes Tumorwachstum) und ein extensives Stadium.

Histopathologisch zeigen sich charakteristische, nacktkernige Zellen mit Durchmessern zwischen 4-9 µm. Sie sind cytoplasmaarm mit meist hyperchromatischen, pleomorphen Kernen. Häufig zeigen sich durch weiches, zellreiches, intramural submuköses Tumorwachstum bedingte Quetschartefakte.

Elektronenmikroskopisch findet sich eine hohe mitotische Aktivität. Das kleinzellige Bronchialkarzinom lässt sich aufgrund eines spezifischen Expressionsmusters neuroendokriner Marker der Gruppe der neuroendokrinen Tumoren zuordnen (35), umgekehrt ist aber die Diagnose eines Kleinzellers nicht notwendigerweise an das Vorhandensein neuroendokriner Eigenschaften gebunden.

Zu der Gruppe neuroendokriner Tumoren gehören außerdem auch die großzelligen Bronchialkarzinome mit neuroendokriner Differenzierung (LCNEC = *Large cell neuroendocrine carcinoma*) sowie die Karzinoide.

Über die Abstammung des Kleinzellers wird bislang diskutiert. Einige Gruppen waren in der Vergangenheit der Auffassung, dass Zellen des APUD-Systems Vorläufer sein könnten (36), andere favorisieren die Theorie einer pluripotenten Stammzelle endodermalen Ursprungs, die sich in sämtliche Lungentumorformen ausdifferenzieren und neuroendokrine Eigenschaften annehmen kann (37). Die Tatsache, dass in Präneoplasien der Lunge sog. amphikrine Zellen

gefunden wurden, die zugleich zur Produktion neuroendokriner und muzinhaltiger Granula wie auch zur Herstellung von Zytokeratinfilamenten befähigt sind, stützt die Hypothese einer gemeinsamen Vorläuferzelle (38).

An neuroendokrinen Markern findet man häufigerweise L-Dopa-Decarboxylase, Gastrin-releasing-peptide (GRP), Bombesin, Chromogranin A, Synaptophysin, Neuronspezifische Enolase (NSE) und das neurale Adhäsionsmolekül NCAM (39-43).

Auf molekularbiologischer Ebene zeigen diese Tumoren häufig p53- sowie Rb-Gen-Mutationen und eine *bcl2/bax*-Imbalance, mit einer Überexpression von *bcl2* und einem verminderten *bax*-Level. Dieses Ungleichgewicht hat ein Überwiegen antiapoptotischer Signale zur Folge und verleiht den Zellen einen relativen Schutz vor der Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose).

#### **1.1.2.2.2 Variante Kleinzeller (vSCLC)**

Der variante Subtyp des kleinzelligen Bronchialkarzinoms wird in 6-15 % bei Erstdiagnose eines Kleinzellers gefunden (44;45), nach Applikation von Chemo- oder Radiotherapie sogar in bis zu 30 % aller kleinzelligen Tumoren (46).

Was charakterisiert nun die Karzinome varianter Differenzierung?

Variante Differenzierung innerhalb eines Tumors ist dadurch gekennzeichnet, dass sich neben dem klassisch kleinzelligen Anteil zusätzlich eine Komponente findet, die vom Aspekt eher großzellig erscheint und jegliche Differenzierung der Nichtkleinzeller aufweisen kann. Dieser Anteil muss per definitionem mindestens 10 % der Gesamttumormasse ausmachen (26). Außer der Morphologie zeigen variante Zellen weitere Charakteristika nichtkleinzelliger Lungentumore, so kommt es beispielsweise zu einem Verlust des neuroendokrinen Expressionsmusters.

Klinische Beobachtungen machen deutlich, dass die ohnehin schlechte Prognose der kleinzelligen Karzinome durch das Vorliegen varianter Anteile weiter verschlechtert wird, da sie mit einer verminderten Ansprechrate auf Chemotherapeutika einhergehen (44). So ist mit einer Überlebenszeit von nur 6 Monaten nach Diagnosestellung zu rechnen, gegenüber 10.5 Monaten bei Patienten mit klassischem Kleinzeller (44-49).

Klinisch zeigen diese „Mischtumoren“ außerdem ein aggressiveres Metastasierungsverhalten (16). Über Herkunft und Entstehungsmechanismen dieser varianten Tumoranteile existieren verschiedene Hypothesen, die unter 1.3 näher dargestellt werden.

### **1.1.2.3 Karzinoide**

Ungefähr 1-2 % aller malignen Primärtumoren der Lunge werden als Karzinoide klassifiziert (50;51). Sie zeichnen sich durch zentrales Wachstum innerhalb der Lunge aus.

Sie werden ebenfalls der Klasse der neuroendokrinen Tumoren zugeordnet, da sie das typische Wachstum in Form organoider, palisaden- bzw. rosettenartiger Strukturen aufweisen. Die Tumorzellen selbst erscheinen uniform mit fein granuliertem Zytoplasma.

Häufig finden sich Karzinoide im Rahmen sog. Multipler endokriner Neoplasien (MEN I).

Unter den Patienten findet sich ein Nichtraucher-Anteil von 20-40 %.

Für die Diagnose reichen lichtmikroskopische Techniken aus, da man sie ausschließlich nach dem Auftreten von Nekrosen und der Anzahl Mitosen/2 mm<sup>2</sup> (*high power field*) in typische sowie atypische Karzinoide klassifiziert.

Die atypischen Karzinoide sind charakterisiert durch mindestens 2-10 Mitosen/2 mm<sup>2</sup> Tumor und punktuelle nekrotische Areale (52), während die typischen Karzinoide keine Nekrosen aufweisen und sich maximal 2 Mitosen/2 mm<sup>2</sup> finden lassen.

Die Karzinoide zeigen nur eine geringe Tendenz zur Metastasierung. Sie können daher primär operativ angegangen werden und haben sehr gute 5-Jahres-Überlebensraten von 92 % (51).

### **1.1.2.4 Karzinome pleomorpher, sarkomatoider Struktur**

Diese Gruppe wenig differenzierter, nichtkleinzelliger Karzinome zeichnet sich durch die Präsenz sarkomatoider bzw. Sarkom-ähnlicher Strukturen aus. Sie werden unter einer Vielzahl unterschiedlicher Termini beschrieben wie z.B. Spindelzell-, Riesenzellkarzinom oder Karzinosarkom; häufig findet man ein Nebeneinander verschiedener Muster.

Fakultativ lassen sich Keratin oder CAM 5.2-Expression an der Oberfläche nachweisen.

Findet sich ein kleinzelliger Tumor mit Sarkom-ähnlichen Anteilen, wird dieser subsumiert unter die Gruppe kombiniert kleinzelliger Tumoren.

## **1.2 Besonderheiten des kleinzelligen Bronchialkarzinoms**

### **1.2.1 Entwicklung von Rezidiven mit varianter Differenzierung**

Das kleinzellige Karzinom der Lunge nimmt hinsichtlich Therapie und Prognose im Vergleich zu anderen malignen Lungentumoren eine besondere Stellung ein.

Der unbehandelte Kleinzeller hat nach Diagnosestellung eine mediane Überlebenszeit von weniger als 3 Monaten und ist mit einer an 100 % grenzenden Letalität innerhalb des ersten Jahres nach Primärdiagnose verbunden.



Dies ist nicht zuletzt auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Mehrzahl aller kleinzelligen Lungentumoren bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen in verschiedenen Organen, bevorzugt Skelett, Leber und ZNS gesetzt hat, sodass sie häufig einer primär operativen Therapie nicht mehr zugänglich sind (53).

Aufgrund hoher Proliferationsraten der Tumorzellen kommt in der Regel als Standardtherapie eine Polychemotherapie über 4-6 Zyklen mit sukzessiver Primärtumorbestrahlung mit 44-45 Gray zum Einsatz. Dabei können Kombinationen aus Adriamycin, Cyclophosphamid und Oncovin (ACO) oder Platin und Etoposid (PE) verwendet werden.

Die Tumoren zeigen im Allgemeinen initial ein sehr gutes Ansprechen auf die Therapie, was sich in einer raschen Abnahme der Tumormasse manifestiert. Abhängig vom prätherapeutischen Stadium erreichen damit ca. 50 % aller Patienten eine komplette Remission.

Leider kommt es bei der Mehrheit aller Patienten innerhalb der ersten 3-12 Monate nach Therapieabschluss zu einem Rezidiv (54), welches sich durch starke Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapeutika auszeichnet und damit zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5 % führt (55).

Die Mechanismen, die der Entwicklung von Resistenzen Vorschub leisten, sind bis heute nicht vollständig bekannt und stehen damit weiterhin einer kurativen Behandlung im Wege.

Histopathologische Untersuchungen solcher Rezidive zeigen eine Korrelation zwischen auftretender Therapieresistenz und dem Nachweis morphologisch vom Originaltumor abweichender Zellverbände (44;55). Diese Zellen zeigen ein eher epithelähnliches Aussehen, das an jenes der Nichtkleinzeller erinnert (56). Untersuchungen der Zellen auf Proteinebene zeigten ein gegenüber dem klassischen Kleinzeller verändertes Genexpressionsmuster.

Diese Ergebnisse geben Anlass zu der Annahme, es handele sich hierbei um Teile eines varianten kleinzelligen Tumors, dessen Ursprung nach wie vor kontrovers diskutiert wird.

### **1.2.2 Entstehung sekundärer Resistenz**

Wie bereits erwähnt, stellt die Entwicklung von Rezidivtumoren, welche relativ strahlen- sowie chemoresistent sind, ein bisher unüberwindbares Hindernis auf dem Wege der Heilung von Patienten mit kleinzelligem Lungentumor dar.

Über die Entstehung resistenter Zellen existieren verschiedene Modelle, wobei im Mittelpunkt des Interesses neben dem klassischen Modell der Multidrogenresistenz eine durch Chemotherapeutika induzierte Inhibition der Apoptose steht.

Ein etwas neueres Modell zur Erklärung sekundär erworbener Resistenz in Tumorzellen basiert auf einem durch Zelladhärenz vermittelten Schutz vor Apoptose (57).

### **1.2.2.1 Multi-Drug Resistenz**

Das bekannteste und bisher beste Modell für die Entstehung sekundärer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika basiert auf dem Konzept induzierbarer Multidrogenresistenz (MDR, engl. *multi-drug resistance*). Im Verlauf einer Chemotherapie kommt es zu einer Überexpression des P-Glykoproteins (P-gp) oder verwandter transmembraner Pumpenproteine (MRP, LRP) (58). Diese sind für einen gesteigerten Efflux der Chemotherapeutika aus der Zelle und damit reduzierter Wirksamkeit derselben verantwortlich. Die Gültigkeit dieses MDR-Modells für das kleinzellige Bronchialkarzinom wird in der Literatur kontrovers diskutiert, da die Dosen experimentell applizierter Chemotherapeutika um ein Vielfaches oberhalb von *in-vivo* erreichbaren Gewebekonzentrationen liegen. Gegensätzliche Beobachtungen verschiedener Gruppen (59-62) machen deutlich, dass dieses Modell zwar eine potentielle Rolle in der Entwicklung sekundärer Resistenzmechanismen des Kleinzellers spielen können, diese jedoch letztlich nicht suffizient erklären können.

### **1.2.2.2 Chemotherapeutika-induzierte Resistenz**

Die Möglichkeit, mittels Anwendung von Zytostatika apoptotische Prozesse in Gang zu setzen, versucht man sich im Rahmen der Chemotherapie zunutze zu machen. Dabei stößt man beim kleinzelligen Lungenkarzinom insofern an Grenzen, als sich hier mangelnde Ansprechraten in Rezidivtumoren zeigen, deren Ursachen weitgehend unbekannt sind, zumal der Tumor primär sehr gute Chemosensitivität zeigt. Es liegt also der Schluss nahe, dass Chemotherapeutika selbst durch Beeinflussung einer der zahlreichen, in die Apoptosekaskade involvierten Faktoren eine Hemmung des Apoptosemechanismus verursachen können. Zu den heute bekannten Schutzmechanismen vor Apoptose gehört unter anderem der PI3K-Proteinkinase B-*Pathway*, in dessen Zentrum die Proteinkinase B (= AKT) steht.

Die Aktivierung dieser Kette erfolgt durch Stimulation von Wachstumsfaktoren oder alternativ über Integrine: es kommt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K), welche durch die Entsendung von *second messengern* AKT aktiviert. Dieser Vorgang hat schließlich eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen, die eine Hemmung der Apoptose bewirken und die Zellen damit vor dem Absterben bewahren. In vielen Tumoren ist eine veränderte Regulation von AKT, beispielsweise in Form einer Überexpression, einer

konstitutiven Aktivierung durch mutierte RAS-Onkogene oder aber einer Inaktivität AKT-hemmender Faktoren, zu finden.

Die Bedeutung einzelner Faktoren soll in dem Maße hervorgehoben werden, in welchem sie nach heutigem Kenntnisstand für das Phänomen sekundärer Chemoresistenz im kleinzelligen Tumor der Lunge relevant sind.

So fanden Moore *et al.* 1998 in 5 untersuchten SCLC-Linien eine erhöhte basale Expression von PI3K sowie PKB. Die Zellproliferation und die Fähigkeit, in semisolidem Agarosemedium Kolonien zu bilden, konnte mittels Inhibition der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K) aufgehoben werden. Diese Beobachtung wurde interpretiert als Fähigkeit der Tumorzellen zu ECM (*extra cellular matrix*)-unabhängigem Wachstum und Überleben. Die Tatsache, dass die untersuchten Zellen sogar nach Entzug sämtlicher Wachstumsfaktoren nicht zugrunde gingen, lässt einen zusätzlichen Aktivierungsmechanismus für PI3K bzw. AKT vermuten. Tatsächlich zeigte sich bei serumfrei gehaltenen Zellen eine persistierend hohe Aktivität des Enzyms (63).

Darüber hinaus vermutet man auch in SCLC-Zellen eine Beeinflussung der Apoptoserate über den in vielen Tumoren nachgewiesenen TNF- $\alpha$ / NF $\kappa$ B-*Pathway*. TNF- $\alpha$  kann sowohl selbst Apoptose initiieren als auch NF $\kappa$ B aktivieren, das als Transkriptionsfaktor zur Aktivierung anti-apoptotischer Faktoren wie Bfl-1 und Mitglieder der IAP-Familie (64) fähig ist. Bfl-1 antagonisiert als Bcl-2-Homolog Apoptosemechanismen (65). Sowohl unter Zytostatika- als auch unter Strahlentherapie konnte eine NF $\kappa$ B-Aktivierung in Tumorzellen induziert werden (66;67). Bei blockierter NF $\kappa$ B-Funktion kommt es über eine I $\kappa$ B- $\alpha$ -Überexpression zur deutlichen Steigerung der Apoptoserate in HT1080 Fibrosarkomzellen (68).

Schließlich findet sich ein AKT-vermittelter Aktivierungsmechanismus für NF $\kappa$ B. Dazu wird zunächst die Kinase IKK $\alpha$  phosphoryliert, die anschließend in Interaktion mit I $\kappa$ B tritt und durch Konformationsänderung die Freisetzung von NF $\kappa$ B bewirkt.

Es stellt sich hier also ein komplexes Geflecht intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden dar, denen die Regulation apoptotischer Prozesse obliegt. Ob dieses für andere Tumorzellen gültige Modell auch auf die Entstehung sekundärer Resistenz des SCLC übertragbar ist, soll an anderer Stelle des Arbeitsprojektes untersucht werden.

Einen direkten Zusammenhang zwischen Chemoresistenz und Adhärenz kleinzelliger Karzinomzellen fanden hingegen 1999 Sethi *et al.* (57).

### 1.2.2.3 Adhärenz-vermittelte Resistenz

Tumorzellen haben im Gegensatz zu gesunden Epithelzellen die Fähigkeit, ohne Kontakt zur extrazellulären Matrix zu überleben (*anchorage independence*), so auch das kleinzellige Bronchialkarzinom. *In vitro* imponiert dieses Phänomen in Form von in Suspension wachsenden SCLC-Linien. *In vivo* zeigt sich jedoch, dass gerade das kleinzellige Lungenkarzinom von reichlich Stroma an extrazellulärer Matrix umgeben ist. Verfügen die Tumorzellen über Adhäsionsmechanismen zur Matrix, so verleiht ihnen dies eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (CAM-DR, engl. *cell adhesion-mediated drug resistance*) (57).

Gab man den kleinzelligen Linien in Kultur die Möglichkeit, sich an eine simulierte Extrazellulärmatrix (ECM) anzulagern, so konnte beobachtet werden, dass die Adhäsion an ECM-Komponenten wie Fibronectin, Kollagen IV, Laminin über eine Gruppe transmembraner Rezeptoren, die Integrine, erfolgte. Wichtigster Subtyp scheint dabei Integrin  $\beta_1$  zu sein. Es kam infolgedessen zur neuronähnlichen Konformationsänderung. Auf die Expression neuroendokriner Marker hatte dies jedoch keine Auswirkung.

Im Folgenden konnte gezeigt werden, welche Vorteile die Tumorzellen durch ihre Adhärenz zur Matrix hatten. Neben der morphologischen Veränderung kam es zur gesteigerten Resistenz der Zellen gegenüber Etoposid und Doxorubicin. Man fand außerdem erhöhte Level aktivierter Tyrosinkinasen, sodass die Schlussfolgerung nahe liegt, dass die Integrin-vermittelte Adhärenz über die Aktivierung von Tyrosinkinasen zu einer Inhibition der Apoptose führt. Bei Einsatz eines die Integrin-Funktion blockierenden Antikörpers (P5D2) konnte sowohl die Adhäsion als auch der Apoptoseschutz aufgehoben werden. Ebenso führte dieser Antikörper wie auch die Benutzung eines selektiven PTK-Inhibitors (Tyrphostin) zur Verminderung der PTK-Aktivität. Dies unterstreicht die mögliche Relevanz des in 1.2.2.2 beschriebenen PI3K/AKT-Pathways, da die Integrine in einem Seitenweg durch Aktivierung der FAK (*Focal Adhesion Kinase*) über PI3K und AKT zur Phosphorylierung des BAD-Proteins und damit zur Hemmung der Apoptose führen.

Auch bei Hartmann *et al.* wird von einer durch verstärkte Adhäsion bedingten Zunahme der Chemoresistenz des kleinzelligen Lungenkarzinoms berichtet, die nach Ansicht der Autoren über einen speziellen Rezeptortyp CXCR 4 (CD 184) vermittelt wird (69).

## 1.3 Modell der Entstehung varianter kleinzelliger Lungentumoren (vSCLC)

### 1.3.1 Stand der Forschung

Der Ursprung varianter kleinzelliger Tumoren wird bislang kontrovers diskutiert.

Unabhängig vom Auftreten klinisch relevanter, variante Tumoranteile enthaltender Kombinationstumoren, die unter 1.1.2.2 beschrieben wurden, konnte das Phänomen varianter Differenzierung auch auf Ebene von Zellkulturexperimenten an SCLC-Linien definiert werden. So zeigten bereits 1985 Carney *et al.* sowie Gazdar *et al.* in 30 % ihrer in Zellkultur gehaltenen SCLC-Linien einen vom klassischen Kleinzeller abweichenden Differenzierungstyp (41;56). In 5 von 10 als variante Kleinzeller diagnostizierten Linien betrafen die Abweichungen sowohl die Morphologie als auch die biochemischen Eigenschaften der Zellen. So wuchsen die betreffenden Linien adhärent und ließen das typische neuroendokrine Expressionsmuster vermissen. Sowohl Proliferationsgeschwindigkeit als auch Effizienz zur Kolonieformung waren in diesen Zelllinien stärker ausgeprägt. In Experimenten mit  $\gamma$ -Strahlen zeigte sich eine erhöhte Resistenz (70).

Shtivelman und Namikawa konnten an SCID-hu-L Mäusen ein verstärktes Metastasierungspotential für den varianten Kleinzeller verglichen mit dem klassischen Subtyp nachweisen (71). Darüber hinaus fand sich in den varianten Linien eine Hemmung Zytostatika-induzierbarer Apoptose (72).

Trotz intensiver Forschungsbemühungen blieb jedoch bislang der eigentliche Mechanismus der Differenzierung vom klassischen zum varianten Phänotyp unklar.

Erster Ansatz für ein gültiges *In-vitro*-Modell könnten die von Goodwin *et al.* 1982 beobachtete spontane Variantenentstehung sein, die mit einem Verlust neuroendokriner Eigenschaften sowie Bestrahlungsresistenz einherging (73). Andere Autoren vertreten hingegen die Auffassung, die Variantenbildung sei kein spontanes Ereignis, sondern Folge einer Amplifizierung des c-myc-Onkogens (74).

Bekannt ist, dass variante Zellverbände gehäuft bei bereits therapierten Patienten (70) und in Autopsiepräparaten von Patienten mit therapieresistentem Tumorleiden (16) zu finden sind.

In einer retrospektiven Studie an 25 Patienten mit kleinzelligem Tumor der Lunge fand man in Biopsien vorwiegend bei solchen variante Tumoranteile, die ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie zeigten (75).

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob es sich bei den varianten Zellen um einen durch echten oder nur scheinbaren Differenzierungswandel aus klassischen Kleinzellern hervorgegangenen Subtyp handelt. Die von o.g. Arbeitsgruppen gemachten Beobachtungen legen die Hypothese nahe, der variante Typ entstehe durch einen bisher unbekanntem Prozess der Transdifferenzierung aus ursprünglich klassisch kleinzelligem Tumormaterial, in dessen Verlauf es neben einem Gestaltwandel auch zu einem Verlust neuroendokriner

Expressionsmarker kommt. Dieser Prozess könnte entweder spontan erfolgen, oder aber durch Therapiemaßnahmen induziert werden.

Andererseits sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass bereits bei der Primärdiagnose eines Kleinzellers ein heterogen differenzierter Tumor vorliegen kann, da die Diagnose meist anhand kleiner Biopsien gestellt wird und damit die Wahrscheinlichkeit, den andersartig gestalteten Tumoranteil nicht zu erfassen, relativ hoch ist (76). Für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass nach heutigen Erkenntnissen nicht nur kleinzellige Tumoren heterogen differenziert sein können, sondern prinzipiell mehr als 50 % aller malignen Lungentumoren mehr als einen der klassischen Differenzierungstypen aufweisen. Dieser Beobachtung wird auch in der aktuellen WHO-Klassifikation Rechnung getragen.

In einem solchen Fall hätte also bereits prätherapeutisch ein heterogener Tumor vorgelegen und es würde sich nur um einen scheinbaren Differenzierungswandel unter Chemotherapie handeln.

Ein anderer Ansatz geht ebenfalls von einem initial vorliegenden „Mischtumor“ aus, dessen quantitativ zunächst vielleicht unbedeutende, nicht-kleinzellige Komponente unter Behandlung selektioniert wird. Dieser Erklärungsansatz wird gestützt durch klinische Erfahrungen bei der Therapie von Patienten, die unter primärer Chemotherapie nur eine partielle Tumorremission erreichen und innerhalb sehr kurzer Zeit erneut Tumorwachstum zeigen, in denen sich dann variante Anteile nachweisen lassen.

Besteht zwischen Auftreten des Erst- und des Zweittumors eine längere zeitliche Latenz, so sollten auch andere Entstehungsmechanismen in Betracht gezogen werden. Beispielsweise kann eine verabreichte Chemotherapie mit eigener onkogener Potenz einen Zweittumor induzieren (77-79). Damit in Einklang zu bringen ist das gehäufte Auftreten eines nichtkleinzelligen Lungentumors nach Therapie eines Kleinzellers (80-82).

Des Weiteren können bei dazu prädisponierten Patienten multiple Tumoren entstehen. Von solchen Hochrisikopatienten aufgrund genetischer Prädisposition wird bei Heyne *et al.*, Johnson *et al.* und Osterlind *et al.* berichtet (81-83).

Nicht zuletzt sollte der als „*field cancerisation*“ bezeichnete Mechanismus erwähnt werden, bei dem es durch chronische Exposition gegenüber Noxen (z.B. Rauchen) zu einem erhöhten Zweittumorrisiko bei Patienten mit malignem Lungentumor kommt (84).

Ein vom primär aufgetretenen Tumor völlig unabhängiges zweites Karzinom der Lunge sollte nur angenommen werden, wenn eine vom Primärtumor abweichende Histologie gefunden wird, der Tumor in einem anderen Lungenlappen lokalisiert ist und ein rezidivfreies Intervall von mindestens 2 Jahren vorgelegen hat (85).

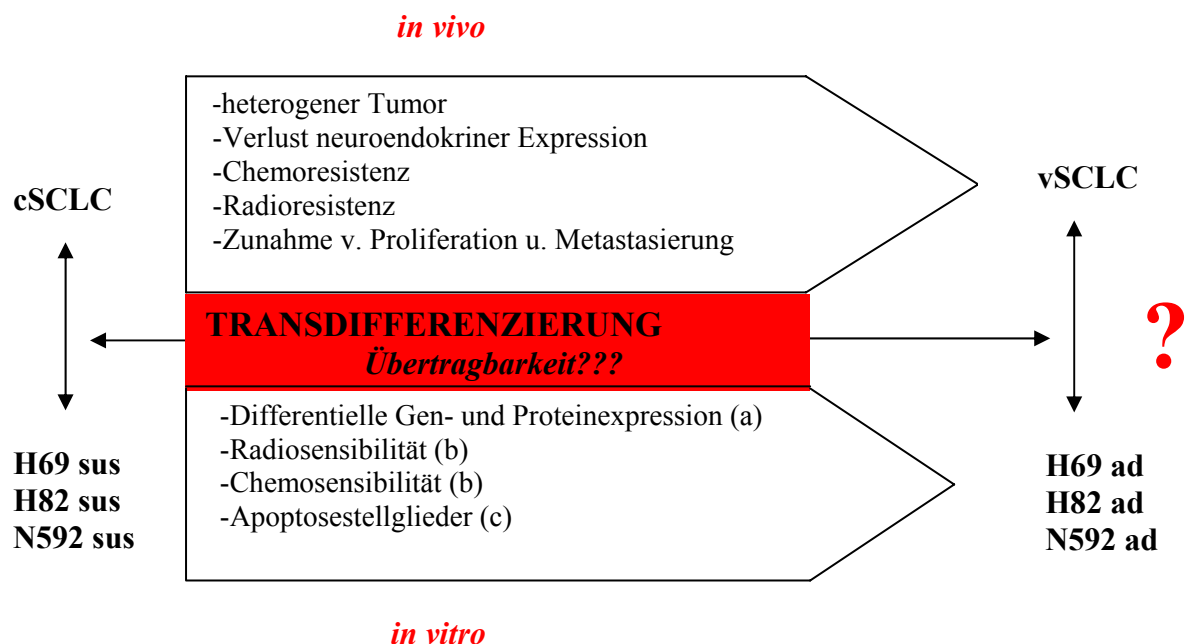
### 1.3.2 Variantenentstehung *in vitro* - Etablierungsversuch eines Zellkulturmodells

Basis für die Entwicklung eines umfassenden Projekts zur Etablierung eines *In-vitro*-Modells für die Entstehung varianter kleinzelliger Lungenkarzinome *in vivo* bildet die im Rahmen der Routinekultur kleinzelliger Karzinomlinien gemachte Beobachtung der spontanen Transdifferenzierung der Zellen. Es kam zu einer veränderten Zellmorphologie mit epithelähnlichem Aussehen sowie zur Adhärenz der ursprünglich frei flottierend in Suspension wachsenden Zellen.

Die Etablierung eines adhärennten Subklons gelang zunächst für die klassisch kleinzellige Karzinomlinie NCI-H69 und deren transfizierte Klone und später auch für die Linien H82 und N592.

Durch DNA-Analyse wurde sichergestellt, dass beide Zellformen genetisch identisch sind und die Adhärenz nicht Folge einer Kontamination durch andere Zelllinien war.

An den transfizierten H69 Linien konnten sodann mittels RT-PCR-Analysen erste Hinweise über differentielle Genexpression in Suspensions- versus adhärennten Sublinien gewonnen werden. Diese Ergebnisse sowie die erfolgreiche Ausdehnung der Etablierung adhärennt wachsender Subtypen für weitere zwei Zelllinien begründeten die Hoffnung der Entdeckung eines *in-vitro*-Korrelats für die Genese varianter Lungenkarzinome. Sie bildeten den Hintergrund für das nachfolgend skizzierte Gesamtprojekt.



**Abbildung 2:** Modellvorstellung über die Entstehung varianter kleinzelliger Lungenkarzinome *in vitro* mit Gegenüberstellung der Beobachtungen *in vivo*. Experimente zur Ermittlung der Chemo-/Radiosensibilität (b) und des Aktivierungszustandes verschiedener Apoptoseregulatoren (c) sind Inhalt anderer Arbeiten und werden im Rahmen des Gesamtkontextes erwähnt.

Untersuchungen, deren Ergebnisse die Grundlage dieser Arbeit bilden, werden in Kapitel 2 erläutert. Alle weiteren Experimente, die von anderen Personen im Rahmen des Projektes durchgeführt wurden, werden dort erwähnt, wo dies zum Verständnis des Gesamtkontextes erforderlich ist.

#### **1.4 Neuroendokrine Differenzierung**

Neuroendokrine Zellen gibt es in kleiner Anzahl in Gewebetypen ganz unterschiedlicher Herkunft; sie ähneln in ihrem Aufbau neural differenziertem Gewebe. Sie sind nestförmig organoid angeordnet und bilden palisaden- oder rosettenartige Strukturen und Trabekel. Sie sind in der Lage, Hormone und biogene Amine sowie Neurotransmitter zu produzieren, welche intrazellulär in elektronenmikroskopisch sichtbaren neurosekretorischen Granula gespeichert und bei Bedarf aus diesen sezerniert werden können (39;85-87). Einige der produzierten Substanzen besitzen mitogene Eigenschaften und sind durch Bindung an zelleigene Rezeptoren zu auto- bzw. parakriner Wachstumsstimulation fähig (88). Grundsätzlich nachweisbar für alle neuroendokrine Zellen sind L-Dopa-Decarboxylase, Chromogranin A, Synaptophysin sowie das neurale Adhäsionsmolekül (N-CAM) (39). Andere Faktoren sind Neuronspezifische Enolase (NSE), GRP, Bombesin.

Als für den Kleinzeller relevant hat sich neben NSE (36) und Bombesin (89) auch L-Dopa-Decarboxylase herauskristallisiert (90).

Abgesehen davon können auch in ca. 5-10 % aller nichtkleinzelligen Lungentumoren neuroendokrine Marker gefunden werden, ohne dass konsekutiv neuroendokrine (organoide) Strukturen enthalten sind (26). Bis auf die Gruppe der LCNEC werden diese Tumoren jedoch nicht gesondert behandelt.

Welche Bedeutung die neuroendokrine Differenzierung für die Eigenschaften eines Tumors und damit letztlich auch für die Behandlung und Prognose der Patienten hat, ist noch unklar. In NSCLC konnte neuroendokrine Differenzierung korreliert werden mit einer besseren Ansprechbarkeit auf Chemotherapie (91;92).

##### **1.4.1 L-Dopa-Decarboxylase (*key amine-handling enzyme*)**

Bei L-Dopa-Decarboxylase handelt es sich um ein 85-90 kD schweres Enzym, das eine wichtige Rolle bei der Synthese verschiedener Transmitterstoffe wie z.B. Serotonin und Dopamin spielt. Es benötigt für seine Aktivität den Cofaktor Pyridoxalphosphat. So führt es einerseits zur Umwandlung von 5-Hydroxytryptophan in 5-Hydroxytryptamin (= Serotonin); andererseits decarboxyliert es L-Dopa zu Dopamin in sowohl dopaminergen als auch



noradrenergen Neuronen. Man findet dieses Enzym nicht nur im ZNS, sondern auch in Lunge, Leber und Niere.

#### **1.4.2 Synaptophysin**

Synaptophysin ist ein integrales Membran-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, welches in einer Vielzahl normaler und neoplastischer Gewebe exprimiert wird. Neben Chromogranin ist es der typische Marker neuroendokriner Tumoren. Es spielt eine wichtige Rolle in der Steuerung von Endo-/Exozytose synaptischer Vesikel (93).

#### **1.4.3 Chromogranin A**

Chromogranin A gehört der Gruppe der sog. „Granine“ an: es handelt sich um sekretorische, lösliche Glykoproteine, die zuerst in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks nachgewiesen wurden (94). Im Rahmen einer neuroendokrinen Tumorerkrankung kommt es zur Überproduktion und Freisetzung biologisch aktiver Substanzen, die schwere paraneoplastische Syndrome auslösen können. Dem Kliniker dienen diese als Tumormarker zur Dokumentation des Krankheitsverlaufs. Für „biochemisch stille“ neuroendokrine Tumoren ist z.Zt. Chromogranin A aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität der effektivste und zuverlässigste Marker für Diagnose, Prognose und Verlaufsbeobachtung bei diesen Patienten (95).

### **1.5 Extrazelluläre Matrix und Adhäsionsmechanismen**

Unabdingbare Voraussetzung für das Überleben von Epithelzellen ist die Bindung an die Extrazellulärmatrix (ECM), da sie hierdurch vor Apoptose geschützt werden. Eine Zelle, die diesen Kontakt verliert, unterliegt normalerweise dem programmierten Zelltod.

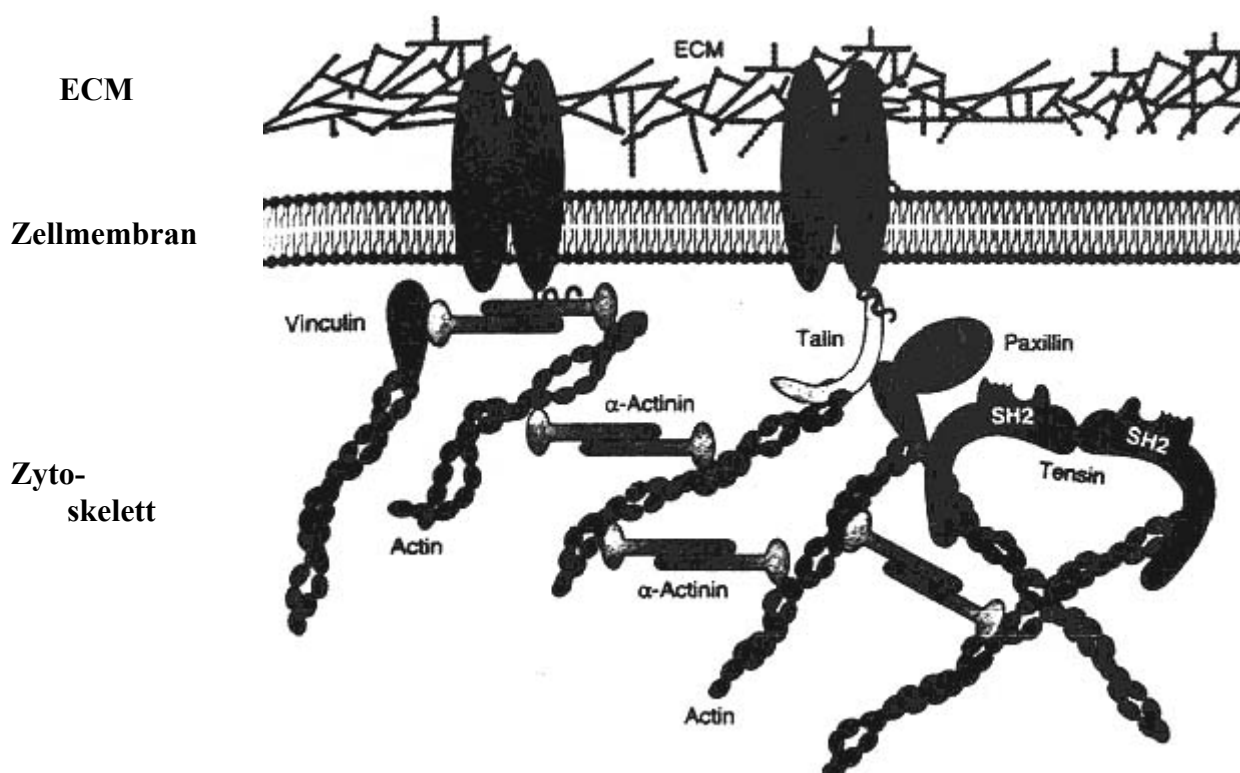
Die extrazelluläre Matrix besteht aus amorpher Grundsubstanz sowie kollagenen und elastischen Fasern. Die Grundsubstanz setzt sich zusammen aus Proteoglykanen (Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat), interstitieller Flüssigkeit und verschiedenen adhäsiven Glykoproteinen wie Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Tenascin etc. Diese Strukturglykoproteine stehen über spezifische Adhäsionsrezeptoren, den Integrinen, mit dem Zytoskelett der Zellen in Verbindung. Über diesen Kontakt ist die extrazelluläre Matrix in der Lage, Einfluss auf grundsätzliche Zellphänomene wie Proliferation, Differenzierung und Migration u.a. während der Embryogenese zu nehmen. In gleicher Weise sind neben den Integrinen eine Vielzahl weiterer Oberflächenrezeptoren, so auch der CD44 Rezeptor, für die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix Interaktionen verantwortlich und nehmen dadurch an einem

breiten Spektrum biologischer Prozesse teil, wie z.B. Lymphozyten-*Homing* und -Aktivierung (96-98) ebenso wie Adhäsion (99) und Migration von Zellen (100).

Eine Störung dieser Interaktionen kann zu pathologischen Prozessen im betroffenen Gewebe führen.

### 1.5.1 Integrine

Die Integrine sind ursprünglich als eine Familie reiner Oberflächenrezeptoren beschrieben worden, die an Zell-Zell-, bzw. Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind (101;102).



**Abbildung 3:** Integrine als Bindeglied zwischen Zytoskelett der Zelle und Extrazellulärmatrix (modifiziert nach Clark *et al*, 1995)

Erst später erkannte man die Bedeutung der Integrine für intrazelluläre Signalwege und Genexpression in sowohl normalem als auch Tumorgewebe mit Einfluss auf Migration, Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen.

#### 1.5.1.1 Struktur und Einteilung

Alle Integrine sind Heterodimere, bestehend aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Beide Untereinheiten sind transmembrane Glykoproteine, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Nach bisherigen Erkenntnissen unterscheidet man acht verschiedene  $\beta$ - und sechzehn verschiedene  $\alpha$ -Ketten, die variabel miteinander kombiniert werden können.

Das Spektrum möglicher Integrin-Typen wird durch alternative Spleißvorgänge auf m-RNA-Ebene zusätzlich erweitert (103), sodass nach heutigem Kenntnisstand 22 verschiedene Rezeptoren gebildet werden können.

Die Integrine können anhand ihrer jeweils enthaltenen  $\beta$ -Komponente in mehrere Untergruppen gegliedert werden, wobei die Gruppe der  $\beta_1$ -Integrine die größte ist. Manche Autoren empfehlen eine funktionelle Einteilung in Integrinrezeptoren, die bevorzugt Bestandteile der Basalmembran wie Kollagen und Laminin erkennen ( $\alpha_2, \alpha_3, \alpha_6, \beta_4$ ) und solche, die Matrixproteine (Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen) im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen binden ( $\alpha_5, \alpha_v, \beta_3, \beta_6$ ) (102).

### 1.5.1.2 Funktion und Arbeitsweise

Integrine können mehrere Liganden spezifisch erkennen und binden. Dazu sind die Anwesenheit beider Untereinheiten sowie die von Kationen nötig, wobei man annimmt, die Ligandenspezifität werde durch die A-Kette determiniert.

Mögliche Liganden sind ECM-Bestandteile wie Fibronectin, Kollagen, Vitronectin ebenso wie gelöste Faktoren wie Fibrinogen oder auch Gegenrezeptoren an der Oberfläche benachbarter Zellen (ICAMs = *intracellular adhesion molecules*).

Die Integrinrezeptoren sind erst in der Lage, ihre Liganden zu binden, wenn ihre Anzahl einen gewissen Schwellenwert überschreitet (z.B. formiert als Hemidesmosomen). Hinzu kommt eine relativ niedrige Affinität zu ihren Liganden ( $10^6$ - $10^9$  l/mol) sowie eine 10-100-fach höhere Konzentration an der Zellmembran. Diese Besonderheiten im Vergleich zu anderen Oberflächenrezeptoren erklären die außergewöhnliche Arbeitsweise der Integrine, die ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Adhäsion einerseits und Motilität andererseits ermöglicht (103).

Die Bindung des spezifischen Liganden führt zu einer Quervernetzung der Integrine, bzw. Bildung sog. *Cluster*, sodass es zur Addition der eher schwachen Bindungskräfte jedes einzelnen Bindungsverhältnisses und damit zur Anhaftung der Zellen an die Membran kommen kann.

Dies ist gleichzeitig Stimulus für die Induktion intrazellulärer Signalkaskaden (104) wie Phosphorylierung der Tyrosinkinase FAK, Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels, Synthese von Inositollipiden und Cyclinen (105) und die Expression sog. „*immediate early genes*“ (106).

Darüber hinaus sind die Integrine an der Regulation des Zellzyklusses beteiligt (105-107). Behindert man experimentell die Bindung der Liganden an den Integrinrezeptor, wird das Zellwachstum supprimiert und Apoptose induziert (106;108-111).

Weiterhin konnte eine Integrin-vermittelte Aktivierung diverser Kinasen wie Proteinkinase C (112), MAP-Kinase (113-115), PI-3-Kinase (115;116) sowie die Induktion von p21 Ras (117) und NF $\kappa$ B (118) nachgewiesen werden.

### 1.5.1.3 Integrine in Tumoren

Die Integrinfunktionen für die Adhäsionsmechanismen von Zellen erklärt ihre Schlüsselposition für Prozesse, die mit der Tumorentstehung assoziiert sind, wie die Regulation von Proliferation und Apoptose, Motilität und Invasion bis hin zu Angiogenese und Metastasierung.

Maligne Zellen können im Gegensatz zu gesunden Zellen ohne Kontakt zur Basalmembran/ECM wachsen und überleben (*anchorage independence*). Diese Fähigkeit könnte bedingt sein durch eine Abkopplung vom Zellzyklusgeschehen normaler Zellen, das von den Signalen der ECM abhängig ist. Diese Signale werden aufgrund der Mittlerposition der Integrine zwischen ECM und Zytoskelett durch diese in die Zelle fortgeleitet (105).

Integrine können sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die Wachstumsregulation haben. Häufig finden sich in Tumoren Defekte bei Molekülen, die an der Zellproliferation beteiligt sind. Andererseits kann es im Laufe der Tumorentwicklung zu einem Verlust oder aber zu gesteigerter Expression solcher Moleküle kommen. Es bestehen einige Schwierigkeiten bei dem Versuch, ein für das Verhalten von Tumoren allgemeingültiges Bild der Adhäsionsmoleküle zu zeichnen. Der erfolgreiche Prozess der Metastasierung setzt zunächst eine Ablösung von Tumorzellen vom Primärtumor (mit verminderter Adhäsion) voraus. Anschließend erfolgt die Migration ins Gefäßsystem, die wiederum eine gesteigerte Adhäsionsfähigkeit erfordert (119).

Das Muster der Integrinexpression ist in einzelnen Tumortypen unterschiedlich und damit ausschlaggebend für die jeweilige Entwicklung der Tumorzellen.

### 1.5.1.4 Integrinexpression in Lungentumoren

Alterationen, die die adhäsiven Eigenschaften betreffen, sind in Lungentumorzellen häufig zu finden und Voraussetzung für den stufenweisen Entstehungsprozess des Tumors. Die Integrine könnten dabei entweder direkt an Tumorwachstum und -progression beteiligt oder aber Ausdruck des malignen Geschehens sein.

In gesundem Bronchialepithel zeigten Damjanovich *et al.* 1992 eine starke Expression der Untereinheiten  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  und eine schwächere Expression von  $\alpha_1$ . Aus der zweiten Gruppe von Rezeptoren war allein  $\alpha_v$  stark vertreten (120).

Im Vergleich dazu ist nach Gogali *et al.* die Menge der Integrinrezeptoren in pulmonalen Tumorzellen gegenüber dem normalen Bronchialepithel stets vermindert (121).

In nichtkleinzelligen Lungentumoren ließ sich eine verringerte Expression der Laminin/Kollagenrezeptoren ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$ ) und von  $\alpha_v$  ablesen (120).

Costantini *et al.* machten 1990 die Beobachtung, dass die Integrinexpression in wenig differenzierten Tumoren schwächer ausfällt als in gut differenzierten Karzinomen (122).

Ähnliche Ergebnisse fanden Smythe *et al.* 1995 bei immunhistochemischer Untersuchung nichtkleinzelliger Lungentumoren, wobei in undifferenzierten Tumoren der Expressionsabfall für Integrin  $\alpha_3$  am stärksten ausgeprägt war. Der Versuch, eine Korrelation zwischen Integrinexpression und klinischem Verlauf der Tumorerkrankung herzustellen, schlug fehl; die Expression zeigte keinerlei Zusammenhang zum Lymphknotenstatus. Zusätzlich fand man eine Hochregulierung der  $\beta_6$ -Untereinheit in 50 % aller untersuchten Tumoren, die Mehrzahl von ihnen hochdifferenziert und mit negativem Lymphknotenbefund (123).

Auch für die Kleinzeller ergibt sich ein heterogenes Spektrum der Integrinexpression. Der Verlust der  $\alpha_1$ -Untereinheit scheint ein frühes Ereignis in der Pathogenese des Kleinzellers zu sein. Auch über eine nachlassende Expression von  $\alpha_2$  bzw. das Auftauchen von  $\alpha_v$  wird berichtet (124). SCLC-Tumoren mit einer gesteigerten  $\beta_1$ -Expression im Zusammenhang mit einem erhöhten p53-Level wird bei Oshita *et al.* eine besonders schlechte Prognose zugeschrieben (125). Weiter oben wurde bereits auf die von Sethi *et al.* beschriebenen Rolle von Integrin  $\beta_1$  im Zusammenhang mit einer gesteigerter Chemoresistenz beim Kleinzeller hingewiesen (57).

Schlussendlich muss gesagt werden, dass die Expression von Integrin-Subtypen innerhalb verschiedener Tumoren anders ausfällt. Des Weiteren ist festzuhalten, dass sich die Expression zu unterschiedlichen Zeiten der Tumorentwicklung dynamisch verhält (119).

## 1.6 Der CD44 Rezeptor

Dieser auch als HCAM (96) oder Hermes-Antigen (126) bekannte Rezeptor lässt sich in Epithelien, Fibroblasten, glatter Muskulatur, vielen hämatopoetischen Zellen und in einer Vielzahl verschiedener Tumoren nachweisen (127-130). Es handelt sich um ein integrales Membran-Glykoprotein mit zytoplasmatischer, transmembraner sowie extrazellulärer Domäne. Sein zugehöriges Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p13)

lokalisiert. Durch alternatives Spleißen nach Abschrift des entsprechenden Abschnittes können bis zu 17 verschiedene Isoformen des Proteins entstehen (131). Alle Isotypen werden durch Glykosylierung und die Ankopplung von Chondroitinsulfatgruppen weiter modifiziert. Zur Klassifizierung dieser Subtypen hat sich die Bezeichnung CD44s für die Standardform und CD44v für die, variable Kombinationen von Exons enthaltenden varianten Formen durchgesetzt. Des Weiteren unterscheidet man eine epitheliale Form CD44E. Die Standardform, von der in dieser Arbeit weiterhin die Rede sein wird, besteht aus einem 37 kD Proteinrückgrat, das durch N- und O-terminale Glykosylierung zu einer 85-90 kD schweren Form wird.

Als typischer Oberflächenrezeptor stellt CD44 insbesondere durch spezifische Bindung von Hyaluronsäure den Kontakt zur ECM her (132). Auch andere Bestandteile der extrazellulären Matrix kommen als Liganden in Betracht, so z.B. Kollagen, Fibronectin, Laminin etc.

Die Mehrzahl der CD44-Funktionen ist mit der Fähigkeit zur Interaktion mit Hyaluronsäure assoziiert, wobei diese Funktion durch mehrere Mechanismen reguliert werden kann. Zum einen konnte in Lymphozyten gezeigt werden, dass für diese Bindung eine Phosphorylierung des zytoplasmatischen Abschnittes notwendig ist (133). Zum anderen wird die extrazelluläre Komponente des Rezeptors durch alternative Spleißvorgänge und variable Insertion verschiedener Exons moduliert (134;135). Dadurch entstehen die verschiedenen CD44-Isoformen. Darüber hinaus finden posttranslational Glykosylierungsvorgänge in diesem Bereich statt, die sowohl negativen als auch positiven Einfluss auf die Hyaluronbindungskapazität haben kann (136-138). Diese Regulationsmechanismen scheinen nicht nur im physiologischen Bereich, d.h. in normalen Zellen, sondern auch im Rahmen von Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung eine bedeutende Rolle zu spielen (139-143).

### **1.6.1 Vorkommen und Bedeutung von CD44 in Tumoren**

Wie bereits weiter oben erwähnt, kann dieser Rezeptor auch in einer Vielzahl neoplastischer Gewebe nachgewiesen werden. Dabei scheinen für die Genese einiger Tumorarten spezifische Spleißvarianten charakteristisch zu sein, wobei die Funktionen einzelner Isoformen bis dato nicht beschrieben sind und auf die organ- bzw. tumorspezifische Verteilung hier nicht im Einzelnen eingegangen werden soll. Erwähnenswert ist jedoch, dass die Mehrzahl aller bisher untersuchten Tumoren multiple CD44-Isoformen exprimieren, wobei die Standardform über die anderen quantitativ dominiert. Weiterhin festzuhalten ist, dass durch Hyaluronbindung an CD44 die Aussaat von Tumorzellen durch Unterstützung von Tumorzelladhäsion, -motilität und -aktivierung von für die Metastasierung notwendigen Genen begünstigt wird (144).

Welche Bedeutung kommt dem Nachweis dieses Rezeptortyps in verschiedenen Tumoren zu und welchen Status hat dieser im jeweiligen Gewebe? Bisher ließ sich kein für alle Tumoren gültiges Muster der CD44 Expression belegen.

Eine Reihe verschiedener Untersuchungen zeigten mögliche Variationen der CD44-Expression. Zunächst fand sich für die allermeisten malignen Tumoren eine hochregulierte Transkription für dieses Molekül, so z.B. für Karzinome von Magen (130;145), Kolon (146), Mamma (147;148), Blase (149;150) und Cervix (151).

Andererseits können unübliche Transkripte des Rezeptors, bedingt durch genetische Fehlregulation oder auch fehlerhaft zusammengebautes Protein als Merkmal pathologischer Prozesse im Rahmen von Tumorgeschehen auftreten (146;152). Unklar bleibt hierbei, ob diese Veränderungen Ursache oder Folge neoplastischer Prozesse sind.

Schließlich erfordert die Migration jedoch eine dynamische Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix, sodass eine Tumorzelle im Zellverband nicht in der Lage ist, zu metastasieren. Eine verminderte Expression von CD44 könnte den Lösungsvorgang und damit die Dissemination von malignen Zellen unterstützen. Tatsächlich wurde in Endometriumkarzinomen eine supprimierte Expression dieses Rezeptors im Vergleich zu gesundem Endometrium gefunden und Zelllinien ohne jeglichen CD44-Nachweis verfügten über ein gesteigertes Metastasierungsvermögen (153).

Auch für andere bösartige Tumoren, darunter das kleinzellige Bronchiolarkarzinom, zeigten sich erniedrigte CD44-Level bzw. überhaupt keine Expression (154).

### **1.6.2 CD44 in gesundem Lungengewebe und Lungentumoren**

Grundsätzlich finden sich neben der Standardform CD44s die Variantenformen CD44v3, v6 und v9 in Epithelzellen aus Haupt- und Segmentbronchien sowie peripherem Lungengewebe. In der Gruppe nichtkleinzelliger Lungentumoren (NSCLC) gibt es ein breites Spektrum nachweisbarer Spleißvarianten, das in einzelnen Zelllinien individuell ausgeprägt ist (154). Dominierend ist auch hier die Standardform CD44s. Wimmel *et al.* wiesen 1997 in allen Subtypen der nichtkleinzelligen Karzinome CD44 nach, wobei die Stärke in der Reihenfolge SCC>BAC>ADC>LCC. abnahm. Auch hier zeigten sich in jedem Tumortyp unterschiedliche Isoformen (v5, v6, v7, v8). Das jeweilige Expressionsmuster ließ jedoch keinen Rückschluss auf Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Proliferationsstatus oder das Tumorgrading zu (155).

### 1.6.3 CD44-Expression im kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC)

Wie bereits angedeutet, zeigt sich in kleinzelligen Lungentumoren eine abgeschwächte Expression für CD44, wobei in SCLC-**Linien** die CD44-Expression assoziiert war mit dem typischen, zu Aggregaten zusammengeballten Wachstum. Nach Transfektion mit dem H-ras Onkogen konnte die Expression auf das Vierzigfache gesteigert werden (156).

In primären **Tumoren** dagegen konnte überhaupt kein CD44 nachgewiesen werden, weder die Standard- noch eine der varianten Formen, sodass davon ausgegangen werden muss, dass der Rezeptor hier nicht maßgebend für den Prozess der Metastasierung ist (154). Dieser Verdacht erhärtet sich vor dem Hintergrund, dass auch Hirnmetastasen kleinzelliger Lungenkarzinome keinerlei CD44 aufwiesen (157). Denkbar wäre andererseits auch ein früher Verlust der Verankerung von Zellen im Verband unterstützenden CD44-Rezeptors während der Tumorentwicklung, der die Aussaat maligner Zellen überhaupt erst ermöglicht. Interessanterweise konnte jedoch in varianten Zelllinien der Nachweis für sowohl CD44s als auch für die Spleißvariante CD44v5 erbracht werden (156;158).

In Untersuchungen an an SCLC erkrankten Patienten zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Grad der CD44-Expression und den Überlebenszeiten (159).



## 2 Aufgabenstellung

Im Rahmen des unter 1.3 skizzierten, auf mehreren Ebenen angesiedelten Projektes, lag der Schwerpunkt dieser Arbeit zunächst auf einer detaillierten Charakterisierung des Differenzierungsmusters adhärenter Zellen im Vergleich zu den Suspensionszellen.

Nachfolgend durchgeführte Experimente basierten einerseits auf den im Vorfeld anhand von RT-PCR-Analysen erhobenen Befunden typischer SCLC- bzw. NSCLC-Markergenexpression sowie andererseits auf ersten Hinweisen auf ein verändertes Genexpressionsmuster in adhärenen Subtypen transfizierter H69 Zelllinien im Vergleich zur jeweils zugehörigen Ursprungszelllinie.

Als Vertreter der Nichtkleinzeller diente die als Großzeller beschriebene Linie NCI-H103.

### 2.1 Vergleichende Gen- und Proteinexpression: klassische *versus* variante Zelllinien

Als besonders interessant und aussagekräftig für die Darstellung eines vom Urtyp abweichenden Expressionslevels erwiesen sich dabei Markermoleküle aus drei Gruppen:

<u>(A)Neuroendokrine Marker</u>	<u>(B)Adhäsionsmoleküle</u>	<u>(C)Wachstums-/Angiogenesefaktoren</u>
- L-Dopa-Decarboxylase	- CD44	- Thrombospondin
- Chromogranin A	- Integrine $\alpha_2, \alpha_3, \beta_1$	
- Synaptophysin	- Thrombospondin	

Alle Linien wurden im ersten Schritt mittels RT-PCR Analysen auf die Stärke der m-RNA-Expression untersucht und im zweiten Schritt durch Untersuchungen auf Proteinebene durch Western Blot-Techniken sowie Fluoreszenzzytometrie ergänzt.

Dabei lag die Zielsetzung angewandter Techniken darauf, ein möglichst detailliertes Bild über die durch die Adhärenz von Zellen bedingten Veränderungen in den Zellen und die sich daraus ergebenden Konsequenzen zu gewinnen. Aus diesem Grund wurden neben rein deskriptiven Verfahren an anderer Stelle des Projektes Experimente zur Strahlen- bzw. Chemosensibilität und zur Aktivität von für das Überleben von Zellen bedeutender, intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden (Apoptoseregulatoren wie z.B. AKT, Bad, NF $\kappa$ B) durchgeführt. (s. Kap. 5).

## **2.2 Existiert ein Korrelat von varianten SCLC-Zellen *in vivo*?**

Die zweite große Säule dieser Arbeit bildeten immunhistochemische Färbungen maligner Lungentumoren. Die Anwendbarkeit des vorher postulierten Zellkulturmodells sollte geprüft werden, indem das Expressionsmuster von Lungenkarzinomen verschiedener histologischer Subgruppen aufgeklärt und mit den Eigenschaften der untersuchten Zelllinien verglichen wurde. Besonderes Interesse lag dabei auf den durch histopathologische Begutachtung für „variant“ befundenen Tumoren.

Das in Paraffin eingebettet vorliegende Gewebe wurde freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation von Professor Müller (Pathologisches Institut der Bergmannsheil-Kliniken Bochum) und Professor Rüschoff (Pathologie der Städtischen Kliniken Kassel) zur Verfügung gestellt.

## **2.3 Adhärenz-induzierte Transdifferenzierung - ein reversibles Phänomen?**

Abschließend wurde die vorher durch langfristige Kultur und Passage von Zellen etablierte Adhärenz experimentell aufgehoben und die nunmehr erneut in Suspension vorliegenden Zellen im Rahmen eines zeitlich definiertes Zwei-Punkt-Experimentes auf ein verändertes Expressionsmuster getestet.

Entzog man den über mehrere Zyklen in Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturflaschen gehaltenen Zelllinien das für die Adhärenz notwendige Substrat (Beschichtung simuliert die Extrazellulärmatrix), indem man diese auf unbeschichteten Kulturschalen kultivierte, so wurde innerhalb weniger Tage ein Verlust der epithelialen Morphologie sowie der Adhäsion beobachtet.

Es sollte ermittelt werden, welche Faktoren durch Adhärenz beeinflusst werden, wobei ein Beobachtungszeitraum von 15 Tagen ausgewählt wurde und die Zellen mittels RT-PCR- sowie FACS-Analysen an den Tagen 5 und 15 nach Anzüchten auf polylysinfreien Kulturplatten untersucht wurden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Alle Chemikalien sind in p.a. Qualität bezogen worden.

##### 3.1.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin, Bovine	Sigma, USA
3-Aminospropyltriethoxysilane (Apes)	Sigma, USA
APS	Sigma, USA
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Aqua bidest	Hausinterne Anlage
Aquamount, improved	BDH, Großbritannien
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Albumin, Bovine)	Sigma, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
Di- Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
DTT	Gibco Brl, Schottland
ECL Western Blotting Detection Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
EDTA 0,02 % in PBS, steril, (Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> -free)	Boehringer Mannheim
Eisessig	Merck, Darmstadt
$\epsilon$ -Amino-n-caproid-acid	Sigma, USA
Ethanol absolut	Riedel de Haen, Seelze
Ethanol vergällt	Klinikumsapotheke
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Foetales Kälberserum (FKS)	Gibco Brl, Schottland
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Vector Laboratories, USA
Isopropanol	Riedel de Haen, Seelze
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
PAA-Fertiglösung 30 % (rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
PBS	Behring, Marburg
Penicillin/Streptomycin/Neomycin Solution	Sigma, USA
Perhydrol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Sigma, USA
PMSF	Roche, USA
Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate (Tween 20)	Sigma, USA
RNA <sub>zol</sub> <sup>TM</sup> B	Cinna/ Biotecx, Laboratories, Inc, Texas
Rotihistol	Roth, Karlsruhe
RPMI-Medium mit L-Glutamin	Gibco Brl, Schottland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Skim Milk (Magermilchpulver)	Becton Dickinson, USA
TEMED	Sigma, USA
Tris Base	Sigma, USA
Trizma Hydrochlorid	Sigma, USA
Trypsin 2,5 %	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

### 3.1.2 Antikörper, Seren, IgG-Fraktionen

#### Primärantikörper

monoclonal mouse anti human CD 44 std Ab	Biogenesis, England
monoclonal mouse anti human CD 44 std Ab	Acris, DPC Biermann, Bad Nauheim
monoclonal mouse anti human $\beta_1$ Integrin Ab	abcam, Cambridge
monoclonal mouse anti human $\alpha_2$ Integrin Ab	Acris, DPC Biermann, B. Nauheim
polyclonal rabbit anti human Aromatic L-Aminoacid Decarboxylase (AADC) Ab	Acris, DPC Biermann, B. Nauheim
polyclonal goat anti Actin Ab	Santa Cruz, USA

#### Sekundärantikörper:

biotinylierter Ziege anti Maus Antikörper	Dako, Dänemark
biotinylierter Schwein anti Kaninchen Antikörper	Dako, Dänemark
FITC konjugierter Ziege anti Maus	Pharmingen, USA

**IgM und IgG Antikörper**

HRP gekoppelter anti Maus Antikörper	New England Biolabs, USA
HRP gekoppelter anti Kaninchen Antikörper	New England Biolabs, USA
HRP gekoppelter anti Biotin Antikörper	New England Biolabs, USA
HRP gekoppelter donkey anti goat Antikörper	Santa Cruz, USA

**Seren:**

Ziegenserum	Sigma, USA
Schweineserum	Dako, Dänemark

**IgG-Fractionen:**

Kaninchen IgG	Sigma, USA
Maus IgG	Sigma, USA
Mouse IgG <sub>1</sub> Isotyp Kontrolle	R&D Systems, Wiesbaden

**3.1.3 Enzyme, Nukleinsäuren, Fertigpuffer****Desoxynukleotide:**

$\alpha$ - <sup>33</sup> P dCTP	ICN
Desoxynukleotidtriphosphate (100 mM dNTP Set)	Gibco BRL, USA

**DNA- Längenstandards:**

1 kB DNA Leiter	Gibco BRL
pUC Mix Marker 8; kinasiert mit $\alpha$ - <sup>33</sup> P dCTP	MBI Fermentas, Litauen
pBR 322 Marker, kinasiert mit $\alpha$ - <sup>33</sup> P dCTP	MBI Fermentas, Litauen
DTT 0,1 M	Gibco BRL, USA
5 x Exchange Puffer	Gibco BRL
5 x First Strand Puffer (RT-Buffer)	Gibco BRL, USA
Loading Buffer	MBI Fermentas, Litauen
Oligo (dT) <sub>12-18</sub> Primer 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l	Gibco BRL, USA
Oligonukleotide (3`und 5`-Primer)	MWG Biotech GmbH/ TIB MolBiol

**Proteinstandards:**

Biotinylated Protein Marker, Broad Range	New England BioLabs, USA
--	--------------------------

Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range	Biorad, USA
RNAse Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	Boehringer Mannheim
Superscript <sup>TM</sup> Rnase H Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Schottland
Taq DNA-Polymerase 5 U/ $\mu$ l	Boehringer Mannheim
T <sub>4</sub> -Polynukleotidkinase	Gibco BRL, Schottland
10 x Zell-Lyse-Puffer	New England Biolabs, USA

### 3.1.4 Oligonukleotide

Primer	Produkt (bp)	PCR-Bed. Zyklen	Temp.	5'-Sequenz	3'-Sequenz
CD 44	310	30	59°C	5'-CAG CAA CCC TAC TGA TGA CG-3'	5'-GCC AAG AGG GAT GCC AAG ATG A-3'
Chrom. A	222	30	63°C	5'-CCG CTG TGT TTC TTC TGC TGA TGT G-3'	5'-TGA ATA AAG GGG ATA CCG AGG TG-3'
ET-1	452	27	61°C	5'-GCC CTA GGT CCA AGA GAG CCT TGG-3'	5'-GCA GAG TCG GCC ACA GGG CTC TCC G-3'
GAPDH	299	20	58°C	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3'	5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'
Int. $\alpha_2$	242	30	56°C	5'-ATG TTG TGG TTG TGT GTG ATG-3'	5'-TCC GAA TGT GTT TGT GAG G-3'
Int. $\alpha_3$	306	32	55°C	5'-CGA GAG GAA AGA GGA AGT AGG-3'	5'-AGG GAA TAG CCG AAG GTG-3'
Int. $\alpha_6$	219	32	56°C	5'-TGC TTG CTC TAC CTG TCG-3'	5'-CGT TCT GTT GGC TCT CTG-3'
Int. $\beta_1$	239	30	52°C	5'-GCA AAT CCC ACA ACA CTG-3'	5'-AGG TCA AAA AGG CAC AAT G-3'
Int. $\beta_3$	246	32	58°C	5'-AGA GCA AAA TGG GAC ACA G-3'	5'-TGA GGA GAA AGA AGA GAA TGA G-3'
Int. $\beta_4$	466	32	56°C	5'-ATC AGC GTC AGC CTC TCT-3'	5'-TGC CAA ATC CAA TAG TGT AGT C-3'
Int. $\beta_6$	339	35	56°C	5'-ACC AAC CTG TGA ACG ATG TC-3'	5'-ACC CCG ATG AGA AGA GTA GC-3'
LDD	219	27	61°C	5'-AGA GGG AAG GAG ATG GTG GAT TAC-3'	5'-TGG GGA AGT AGG CGA AGA AGT AG-3'
TSP	466	32	55°C	5'-AAG CAA GTC ACC CAG TCC-3'	5'-TCA AGC CCA TAG TTC CAG A-3'

**Tabelle 1:** Oligonukleotide für die RT-PCR

### 3.1.5 Kits und Sonstiges

ABC Vectastain	Vector Laboratories, USA
AEC Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, USA
D <sub>c</sub> -Proteinassay	Biorad, USA
Rneasy Total RNA Kit (250)	Qiagen, Hilden

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht gesondert angegeben, mit entmineralisiertem Wasser hergestellt und gegebenenfalls steril gefiltert. Der jeweilige pH-Wert wurde, wenn nicht anders bezeichnet, mit Salz- sowie Natronlauge eingestellt.

AEC Detektionssystem	5 ml A. dest 2 Tropfen Puffer (pH = 5,3) 3 Tropfen AEC Farbstoff 2 Tropfen Hydrogen Peroxid
Anodenpuffer I	0.3 M Tris Base 20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris Base 20 % Methanol
Antikörperlösung	0,5 % BSA 0,5 % Tween 20; in 50 ml 1-fach PBS
Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex)	1600 µl 1-fach PBS 10 µl Lösung A 10 µl Lösung B
Bläuungslösung	6 ml Na <sub>4</sub> OH 394 ml 70 % EtOH
Blockpuffer	1-fach TBS 0,1 % Tween 20 5 % Magermilchpulver
BSA- Lösung	2µg/µl in sterilem Wasser als Standard für Eichkurve
EDTA 0,02 %	100 ml EDTA mit 3 ml Trypsin
Ethanolreihe	100, 98, 96, 90, 80, 70% Ethanol absolut mit Aqua dest gelöst
4x SDS-PAA-Gellade (= Sample-) puffer (10 ml)	0,9 ml deionisiertes Wasser 0,6 ml 1 M Tris Base (pH = 7,6)

	5 ml 50 % Glycerol 2 ml 10 % SDS 0,5 ml $\beta$ -Mercaptoethanol 1 ml 1% Bromphenolblau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,3 %	2 ml 30 % Perhydrol 198 ml Methanol
Medium	500 ml RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin 10 % FKS (deaktiviert) 5 ml Streptomycin/Neomycin/Penicillin
PBS: 10 x (für 1-fache PBS wurde 1/10 mit A. dest verdünnt)	80 g NaCl 2 g KCl 7,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 2 g KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS steril (1-fach)	Phosphat Puffer Konzentrat (20 fach) Aqua ad iniectabilia
Proteinassay für Digitalphotometer	1 ml Reagenz A 20 $\mu$ l Reagenz S jeweils 100 $\mu$ l pro Küvette jeweils 800 $\mu$ l Reagenz B pro Küvette
Protein-Lyse-Puffer	10 x Lysis-Puffer 100 mM PMSF Aqua ad iniectabilia
Reinigungslösung (2 % Eisessig)	8 ml 100 % Eisessig 392 ml A. dest
10 x SDS-Laufpuffer (für 1-faches SDS wurde mit A.dest. 1/10 verdünnt)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS
1 x STE-Puffer	100 mM NaCl 20 mM Tris HCl (pH = 7.5) 10 mM EDTA
10 x TBE-Puffer (pH = 8,0) (für 1-fache TBE wurde mit A. dest. 1/10 verdünnt)	240 g Borsäure 200 ml 0,5 M EDTA 540 g Tris
10 x TBS-Puffer (pH = 7,6)	25,2 g Tris Base 80 g NaCl; mit Aqua dest auf 1 l auffüllen



1 M Tris-Cl (pH = 6,8/ pH= 8,0)	157,6 g Tris-Cl mit A. dest auf 1 l auffüllen
Wasch-Puffer	1-fach TBS 0,1 % Tween 20
Zitronensäurepuffer (0,01 M; pH= 6,0) (für 1-fachen Zitratpuffer wurde mit A. dest 1/10 verdünnt)	2,1 g Citratmonohydrat 900 ml A. dest 13 ml 2 N NaOH; mit A. dest auf 1 l Lösung auffüllen

**Tabelle 2:** Puffer und Lösungen

### 3.1.7 Gele

1 % Agarosegel	0,4 g Agarose-Pulver 40 ml 0,5- fache TBE 8 µl Ethidiumbromid
6 % PAA-Gel	25 ml 6 % PAA-Mischung: 375 ml Aqua dest 100 ml Rotiphorese 30 25 ml 10-fach TBE  250 µl APS 25 µl TEMED
SDS-Gele für Minikammer <u>Laufgel</u> 1,33 ml 30 % PAA-Fertiglösung 1 ml 1 M Tris-Cl, pH = 8,8 15 µl 20 % SDS 1,66 ml H <sub>2</sub> O 15 µl 10 % APS 10 µl TEMED	<u>Sammelgel</u> 418 µl 30 % PAA-Fertiglösung 313 µl 1 M Tris- Cl, pH = 6,8 1,75 ml H <sub>2</sub> O 13 µl 10 % APS 12,5 µl 20 % SDS 10 µl TEMED

**Tabelle 3:** Zusammensetzung von Gelen

### 3.1.8 Reaktionsgemische

<b>Master Mix (c DNA-Synthese):</b>	<b>30 µl Gesamtvolumen pro Ansatz</b>
RNA 1 µg/7,5 µl steriles Wasser	7,5 µl
Oligo (dT) <sub>16-18</sub> Primer 0,5 µg/µl	2 µl
RT- <i>Buffer</i>	6 µl
DTT 0,1 M	3 µl

d NTP's, je 1,25 mM	8 $\mu$ l
RNAse Inhibitor	1,5 $\mu$ l
Reverse Transkriptase Superscript II	2 $\mu$ l

**Tabelle 4:** Ansatz für c-DNA-Synthese

<b>PCR Mix:</b>	<b>50,3 <math>\mu</math>l Gesamtvolumen pro Ansatz</b>
c DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
steriles Wasser	26 $\mu$ l
dNTP's ( je 1,25 mM)	8 $\mu$ l
10 x Reaktiospuffer + MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
Taq DNA-Polymerase (1 U)	0,2 $\mu$ l
3'Primer (0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
5'Primer (0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
$\alpha$ ( <sup>33</sup> P) dCTP (0,1 $\mu$ l = 1 $\mu$ Ci)	0,1 $\mu$ l

**Tabelle 5:** Ansatz für PCR-Amplifikation

<b>Kinasierungsmix:</b>	<b>25 <math>\mu</math>l Gesamtvolumen pro Ansatz</b>
DNA-Längenstandard	10 $\mu$ g
5 x <i>Exchange</i> Puffer	5 $\mu$ l
( $\alpha$ - <sup>33</sup> P) d CTP	5 $\mu$ l
T <sub>4</sub> - Polynukleotidkinase	5 U
H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l

**Tabelle 6:** Ansatz für die Kinasierung eines DNA-Größenstandards

### 3.1.9 Geräte und Zubehör

Laborgrundausrüstung wie Färbetanks, Schlitten und Küvetten aus Glas sowie Metallspatel, Bechergläser, Erlenmeyer-Kolben etc. wurden von der Firma Kobe in Marburg bezogen.

A. dest/bidest Anlage

Millipore, Bedford

Autoklav Typ 24

Melag

Bakterienplatten

Sarstedt, Nümbrecht

Bench

Heraeus, Hanau

---

Blotkammer semidry	Phase, Lübeck
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Deckgläschen	Marienfeld
Digitalphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Schweden
Digitalkamera Coolpix 950	Nikon
Eis	Scotsman
Elektrophorese-Ausstattung	Bio-Rad, München
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg
Geltrockner Modell 583	Bio-Rad, München
Gewebekulturflaschen 250 ml	Greiner; Frickenhausen
Handschuhe	SafeMed, Schweiz
Heizblock Techne Dri- Block DB 3	Thermo-Dux, Wertheim
Falcon Röhrchen (50 ml, 15 ml)	Greiner, Frickenhausen
FACScan Gerät	
Filme: Kodak Biomax MR	Eastman Kodak, USA
Filterpapier (Zuschnitte) 2 x gelocht	Schleicher & Schuell, Dassel
Gelkammer Mini trans blot	Biorad, München
Glasplatten: outer plates 8,3 x 10,2 cm	Biorad, München
inner plates 7,3 x 10,2 cm	Biorad, München
Magnetrührgerät IKA Combimag RCO	IKA Werk, Staufen i. Breisgau
Micro Tubes (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroküvetten 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroskope	Leitz; Wetzlar
Millipore Immobilion P Transfer-Membran	Millipore, Bedford
Neubauer-Zählkammern (improved)	
Objektträger	Menzel-Gläser
Objektträger-Clips	Shandon, England
PAP-Pen	Kobe, Marburg
PCR-Robocycler Gradient 40	Stratagene, USA
PH-Meter, CG 840	Wissensch.-techn. Werkstätten Weilheim
Pipetten: 1000, 200, 100, 20, 10, 2 µl	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen: Gilson	Gilson, Frankreich
Präparatekästen	Ceesem
Präzisions-Küvetten aus Quarzglas, Suprasil	Hellma

Probenkammern	Shandon, England
Reaktionsgefäße: Falcon Tubes 15, 50 ml	Falcon, USA
Eppendorf Tubes 0,5; 1; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm-Entwicklungsgerät QX 60	Sakura, Japan
Röntgenkassetten	Eastman Kodak, USA
Quadriperm Kammern	Heraeus, Hanau
Schüttelinkubator Köttermann 4010	Köttermann, Ütze- Hänigsen
Sephadex G 50 Push Columns	
Thermometer	Brand
Vortex Reax 2000-12-07	Heidolph, Hamburg
Waagen: PE 360 Delta Range	Mettler, Schweiz
AE 160	Mettler, Schweiz
Wasserbad	Haake
Western-Blot-Kammer	Phase, Lübeck
Whatman-Papier	Whatman Lab Sales, USA
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugen: Cytozentrifuge Cytospin 2	Shandon, England
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau Seratech
Zellkulturzentrifuge Biofuge 15 R	Heraeus, Hanau Seratech

### 3.1.10 Zelllinien

<b>NCI-H69</b>	klassisches kleinzelliges Bronchialkarzinom eines 55-jährigen Patienten im <i>extensive disease</i> -Stadium; Nichtraucher; Z. n. Chemotherapie
<b>NCI-H82</b>	variantes kleinzelliges Bronchialkarzinom isoliert aus dem Pleuraerguß eines 41-jährigen Patienten im <i>extensive disease</i> -Stadium; Raucher; Z. n. Radiochemotherapie
<b>NCI-N592</b>	klassisches kleinzelliges Bronchialkarzinom, isoliert aus Knochenmetastase eines männlichen Patienten; Nichtraucher
<b>LCLC-H103</b>	großzelliges Bronchialkarzinom, isoliert aus dem Pleuraerguss eines 61-jährigen Patienten; Z. n. Radiochemotherapie

**Tabelle 7:** Beschreibung der Zelllinien der Firma ATCC (NCI)

Die SCLC-Linien wurden in drei verschiedenen Wachstumsformen subkultiviert: die Ausgangszelllinien, die frei flottierend in Suspension wachsen (im Folgenden mit „sus“

benannt), die subkultivierte, adhären wachsenden Form („ad“) sowie die auf unbeschichteten Kulturplatten wieder in Suspension revertierte Form nach 5 („ad B V“) sowie nach 15 Tagen („ad B XV“).

### 3.1.12 Paraffinmaterial

#### IA) cSCLC

Laborinterne Bezeichnung	Histopathologische Diagnose	TNM Klassifikation
c-SCLC 01	Kleinzell. Ca d. re. Lungenunterlappens	pT1 N1 MX G3
c-SCLC 02	Kleinzell. Ca d. linken Lungenoberlappens	pT1 N0 MX
c-SCLC 03	Kleinzell. Ca d. Lungenunterlappens	pT2 N1MX G3
c-SCLC 04	Kleinzelliges Ca	pT1 N0 MX G3
c-SCLC 05	Kleinzelliges Ca d. linken Lunge	pT2 N1 MX
c-SCLC 06	Kleinzelliges Ca	pT2 N0 MX G3
c-SCLC 07	Kleinzelliges Ca d. re. Lungenoberlappens	pT2 N0 MX G2
c-SCLC 08	Kleinzelliges Ca d. li. Lungenunterlappens	pT3 N1 MX G3
c-SCLC 09	Kleinzelliges squamöses Ca d. li OL	pT2 N0 MX G2
c-SCLC 10	Kleinzelliges Ca d. rechten Oberlappens	pT3 N2 MX G2
c-SCLC 11	Kleinzelliges Ca d. li. Lungenunterlappens	pT1 N2 MX G2
c-SCLC 12	Kleinzelliges Ca d. rechten Lunge	pT2 N1 MX G4

#### IB) vSCLC

Laborinterne Bezeichnung	Histopathologische Diagnose	TNM Klassifikation
vSCLC 01	teilnekrot. teilw. kleinzelliges, teilw. nicht verhornendes, undifferenziertes plattenepitheliales Karzinom d. re. OL	pT2 N0 MX G3-4
vSCLC 02	Kleinzelliges Ca mit Anteilen eines geringgradig differenzierten Adenokarzinoms	
vSCLC 03	Kleinzelliges Ca mit Ansätzen e. papillären Frühkarzinoms v. plattenepithel. Typ; reaktiv hyperplastisches Plattenepithel mit massiver Entzündung	
vSCLC 04	Kleinzelliges Ca mit plattenepithel.- großzelliger Komponente mit ungewöhnlichen zwiebelschalenartige Verkalkungs- und Verhornungsstrukturen; teilweise hoch ausgereifte plattenepithel. Strukturen	

hSCLC 01	Kleinzelliges Ca mit Pleomorphie der Zellen und Tendenz zur Nekrose; langstreckige, partiell dysplastische Plattenepithelmetaplasien
hSCLC 02	Heterogenes kleinzelliges Ca; niedrig differenziert mit fokaler Tendenz z. Entwicklung plattenepithel. Strukturen

**Tabellen 8 u. 9:** Diagnostische Typisierung verwendeter Paraffinschnitte: klassische und variante Kleinzeller

## II NSCLC

### A) Plattenepithelkarzinome (SCC)

Laborinterne Bezeichnung	Histopathologische Diagnose	TNM Klassifikation
SCC 01	Schwach verhornendes, niedrig differenziertes, zentrales PE-Ca d. re. OL	pT4 N1 MX G3
SCC 02	Mäßig differenziertes teilnekrotisches verhornendes PE Ca d. re. UL	pT2 N0 MX G2
SCC 03	Mäßig differenziertes, nicht verhorn. PE Ca d. UL	pT2 N1 MX G2
SCC 04	Mittelgradig differenziertes PE Ca d. re ML	pT3 N0 MX G2
SCC 05	Mittelgradig differenziertes, schwach verhornendes PE Ca d. ML	pT2 NX MX G2
SCC 06	Peripheres schwach verhorn. PE Ca d. re. OL	
SCC 07	Unreifes, herdförmig nekrotisches PE Ca mit klarzelligen Abschnitten ohne Verhornung	pT1 NX MX G3
SCC 08	Mittelgradig differenziertes, nicht verhornendes PE Ca in Peripherie d. re. OL	pT2 N0 MX G2
SCC 09	Zentrales, schwach verhorn. PE Ca d. re. UL	pT2 N0 MX
SCC 10	Mäßig bis wenig differenziertes PE Ca d. re OL	pT2 N1 MX G3
SCC 11	Aufgedehntes, zentr. nekrot. zerfallenes Fremdgewebe; helle polygon. Zellen e. basalzell. PE Ca: 1e mit stärker basalzell. Komponente mit ausgeprägter Verhornungstendenz	

**Tabelle 10:** Diagnostische Typisierung verwendeter Paraffinschnitte: Plattenepithelkarzinome

**B) Adenokarzinome (ADC)**

<b>Laborinterne Bezeichnung</b>	<b>Histopathologische Diagnose</b>	<b>TNM Klassifikation</b>
ADC 01	Vornehmlich papillär differenziertes Adeno Ca d. re. OL	pT N2 MX G2
ADC 02	Peripheres mäßig differenziertes Adeno Ca mit bronchiolo- alveolärer Komponente d. li. UL	pT1 N0 MX G2
ADC 03	Hoch differenziertes Adeno Ca d. re. UL	pT1 N0 MX G1
ADC 04	Peripheres partiell verschleimendes Adeno Ca d. li. OL	pT1 N0 MX G2
ADC 05	Relativ hoch differenziertes, peripheres Adeno Ca d. re. OL	p1 N0 MX G1-2
ADC 06	Gering differenziertes Adeno Ca d. li UL	p2 N2 MX G3
ADC 07	Mittelgradig differenziertes Adeno Ca	
ADC 08	Mäßig differenziertes, teilnekrot., herdförmig verschleimendes Adeno Ca d. li. OL	
ADC 09	Adenosquamöses Ca d. re OL	p2 N0 MX G3
ADC10	Teils tubulo- alveolär-, teils solide gestaltetes Adeno Ca d. re. UL	pT2 N0 MX G2-3

**Tabelle 11:** Diagnostische Typisierung verwendeter Paraffinschnitte: Adenokarzinome**C) Großzellige Karzinome (LCC)**

<b>Laborinterne Bezeichnung</b>	<b>Histopathologische Diagnose</b>	<b>TNM Klassifikation</b>
LCC 01	Ausgedehntes solid wachsendes groß-, herdförmig auch hellzelliges Ca d. linken Lunge	pT3 (4?) N0 MX G4
LCC 02	Solide wachsendes großzell. Ca d. li. OL	pT2 N0 MX G4
LCC 03	Peripher gelegenes, gering differenziertes großzelliges Ca, am ehesten einem gering diff. Adeno Ca entsprechend mit pseudozystischer Umwandlung; lokalis. li. Lunge	pT2 N0 MX
LCC 04	Fortgeschrittenes großzell. Ca d. li. OL	pT2 N1 MX
LCC 05	Groß- und polymorphzelliges Ca mit squamöser Komponente i. re. OL	pT2 n0 MX G3

**Tabelle 12:** Diagnostische Typisierung verwendeter Paraffinschnitte: Großzellige Karzinome

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

#### **3.2.1.1 Kultivierung**

Ausgangsmaterial für die Arbeiten in der Zellkultur bildeten verschiedene, aus malignen Lungentumoren isolierte Zelllinien, die unter 3.1.10 genauer beschrieben werden.

Alle Linien wurden unter Beachtung steriler Kautelen in Poly-L-Lysin beschichteten Gewebekulturflaschen routinemäßig passagiert. In angereichertem RPMI-1640-Medium zeigten die Ausgangszelllinien H69, H82 und N592 ein zu Aggregaten zusammengeballtes Wachstum, frei schwimmend ohne Bezug zum Boden der Zellkulturflasche.

In Abhängigkeit vom Zellwachstum wurden regelmäßige Medienwechsel vorgenommen und die Zellen in frischen Kulturflaschen ausgesät, um Kontamination und Absterben von Zellen zu vermeiden. Bei schräggestellter Kulturflasche sanken die Suspensionszellen ab, bevor das verbrauchte Medium abpipettiert, durch neues Medium aufgefüllt wurde und die Zellen danach in einem Verhältnis von 1:10 in eine neue Flasche gegeben werden konnten.

Bei den primär adhären (H103) wie auch bei den später sekundär subkultivierten adhären Klonen wurde das Medium abpipettiert, sobald sich ein konfluierender Zellrasen am Boden fand. Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen, um apoptotische Zellen und Zelldebris zu entfernen und anschließend zur schonenden Ablösung vom Flaschenboden mit 2 ml Trypsin pro 250 ml Kulturflasche versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C konnten die Zellen mühelos abgeklopft und mit frischem Medium ebenfalls im Verhältnis 1:10 in einer neuen Flasche ausgesät werden. Die Menge des zugegebenen Mediums betrug jeweils 15 ml, was einen Wechsel alle 3-5 Tage erforderlich machte.

#### **3.2.1.2 Generierung adhärenter Subklone**

Im Laufe der Kultur oben beschriebener Zelllinien wurde innerhalb der Arbeitsgruppe das Phänomen beobachtet, dass einige wenige Zellen in einer Kulturflasche nicht in Suspension sondern adhären am Boden wuchsen. Durch Entnahme dieser Zellen und Subkultivierung (erstmalig A. Wimmel für H69, dann A. Kraus für H82 und N592) gelang es, für alle 3 kleinzelligen Linien, ein dem Suspensionstyp korrespondierenden adhären Subtyp anzuzüchten.

Zum Ausschluss einer einfachen Kontamination durch andere Zellen erfolgte der Nachweis genetischer Identität beider Typen mittels DNA *finger printing* über Mikrosatelliten-DNA Vergleich.



### 3.2.1.3 Kultivierung von Zellen auf unbeschichteten Kulturplatten

Als zweites Phänomen, das auf die enorme Plastizität und Variationsbreite von Karzinomzellen hinweist, ließ sich zeigen, dass die neu aufgetretene Adhärenz der Subklone reversibel war, wenn man diese nach Ablösen nicht wie gewöhnlich in eine beschichtete Kulturflasche pipettierte, sondern auf unbeschichteten Kulturschalen anzüchtete. Auf diesen fehlte den Zellen die durch Poly-L-Lysin simulierte extrazelluläre Matrix (ECM) und damit das für die Adhärenz notwendige Substrat.

Alle unter den drei obigen Punkten genannten Wuchsformen der Zellen wurden im Folgenden auf mehreren Ebenen hinsichtlich ihres Expressionsmusters für die unterschiedlichsten Marker untersucht.

### 3.2.2 RT-PCR-Analyse

Die Polymerase-Kettenreaktion, die 1987 von Kary B. Mullis entwickelt wurde, dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz *in vitro*.

Diese Amplifikation erlaubt damit Analysen von nur in geringen Mengen vorliegenden DNA-Sequenzen und stellt damit ein revolutionäres Verfahren in der Gentechnik dar.

Das Prinzip der RT-PCR basiert zunächst auf c-DNA-Erststrangsynthese mit isolierter genomischer RNA als Matrize mit angeschlossener PCR, in der die zuvor gebildete c-DNA als Matrize dient.

Damit ein ausgewählter Abschnitt der DNA amplifiziert werden kann, wird ein sequenzspezifisches Primerpärchen, das hochspezifisch an die Komplementärsequenz des gesuchten Genabschnittes bindet, benutzt. Durch Anlagerung der Primer wird ein DNA-Fragment definierter Länge eingegrenzt und damit für die DNA-Polymerase als zu verlängernder Abschnitt gekennzeichnet.

Durch mehrmalige Wiederholung dieses Vorganges werden immer neue DNA-Stränge synthetisiert; es kommt zu einer exponentiellen Amplifikation des ausgewählten Genlocus.

Die Einzelschritte werden in nachfolgenden Unterpunkten erläutert.

#### 3.2.2.1 RNA-Isolierung

Die Extraktion der gesamten RNA aus den Bronchialkarzinomzelllinien erfolgte mit dem Rneasy Total RNA Kit der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll.

Je nach vorhandener Menge an Zellen wurde die RNA im letzten Schritt mit 30 bis 50 µl RNase freiem Wasser aus den Säulen eluiert und sofort im Anschluss in c-DNA

umgeschrieben, da diese wesentlich stabiler als RNA ist. 4 µl jeder RNA wurden aliquotiert und für die Quantifizierung bzw. Reinheitskontrolle verwendet.

### 3.2.2.2 Photometrische RNA-Quantifizierung und Reinheitskontrolle

Jeweils 4 µl jeder RNA wurden in 76 µl sterilem Wasser aufgenommen und nacheinander zur photometrischen Messung in eine Quarzküvette gegeben. Initial wurde das Photometer mittels 80 µl reinen Wassers geeicht. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Küvette mit Wasser gespült.

Gemessen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 320 nm. Dabei wurde neben der Konzentration in µg/µl auch die Reinheit bestimmt. Bei Werten zwischen 1,8-2 lag reine RNA vor.

### 3.2.2.3 c-DNA-Synthese

Arbeiten mit RNA müssen mit äußerster Sorgfalt ausgeführt werden. Bei allen Arbeitsschritten wurde daher mit Handschuhen und speziellen Pipettenspitzen gearbeitet.

Die RNA ist durch den Angriff von RNAsen bedroht und kann v. a. durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren sehr leicht brechen. Das Risiko von Kontamination und Degradation lässt sich durch sofortiges Umschreiben frisch gewonnener RNA in komplementäre DNA (= c-DNA) umgehen.

Dazu wurde jeweils 1 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 7,5 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O gelöst und 10 Minuten im Heizblock bei 70°C denaturiert, um Sekundärstrukturen zu zerstören. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wurde der Master Mix vorbereitet (s. Material). Je 22,5 µl des Master Mix wurden zu der in 7,5 µl gelösten RNA pipettiert. Auf diese Weise erhielt man für jeden Ansatz ein Gesamtvolumen von 30 µl. Die Cups wurden dann für zwei Stunden bei 37°C im Heizblock inkubiert, um optimale Arbeitsbedingungen für das Enzym *Superscript* zu schaffen.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion durch 10-minütiges Aufheizen der Proben im Heizblock bei 95 °C gestoppt.

Die c-DNA konnte nun aliquotiert und dauerhaft bei -20 °C gelagert werden.

### 3.2.2.4 PCR-Analyse

Um Qualität und gleiche Konzentrationen von c-DNA aller Zelllinien zu prüfen, wurde vor Benutzung spezieller Primer zunächst die Expression des sog. *housekeeping* Gens GAPDH, eines in den meisten Geweben konstant exprimierten Gens, in allen Linien nachgewiesen.

Für jeden c-DNA Typ wurde ein beschriftetes 0.5 ml Eppendorfgefäß mit je 26 µl sterilem H<sub>2</sub>O vorbereitet. In diesem wurde anschließend je 1 µl der zu untersuchenden c-DNA gelöst, sodass in jedem Gefäß die identische Konzentration DNA von 1 µg/µl vorlag.

Auch bei diesen Arbeitsschritten ist auf besondere Sauberkeit und kurze Auftauzeiten der Materialien zu achten.

Die Ansätze wurden nun auf Eis gelagert, während man den PCR-Mix herstellte. Dabei wurde das Enzym, die Taq-Polymerase im letzten Schritt hinzugefügt, um einen vorzeitigen Reaktionsbeginn und damit die Entstehung unspezifischer Produkte zu vermeiden.

Zu jedem c-DNA Ansatz wurden nun 23.3 µl des PCR-Mix hinzugefügt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Das Reaktionsvolumen beträgt also ungefähr 50 µl für jeden Ansatz.

Die Reaktionsgefäße konnten dann in die PCR-Cycler gestellt und das nach immer gleichem Profil ablaufende Programm gestartet werden:

Anzahl Zyklen	Vorgang	Zeit	Temperatur
1	initiale Denaturierung	5 Min	94°C
2-35	Hitzenaturierung	1 Min	94°C
	Annealing	1 Min	52-63°C
	Elongation	2 Min	72°C
1	finale Extension	5 Min	6°C

**Tabelle 13:** PCR-Zyklen: Der erste Zyklus dient der Trennung der DNA-Doppelhelix durch Hitzenaturierung. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung der Primer an ihre spezifische Sequenz („*Annealing*“) unter den für jedes Primerpaar optimalen Bedingungen hinsichtlich Temperatur und Anzahl der Zyklen. Vor jedem neuen *Annealing* wurde noch mal kurzfristig denaturiert, um ein erneutes „Verkleben“ der DNA-Doppelstränge zu verhindern.

Unter optimalen Bedingungen konnten auf diese Weise auch geringste Mengen c-DNA hochspezifisch amplifiziert werden. Die Darstellung erfolgte durch radioaktive Kopplung. Der Nachweis der entstandenen DNA-Fragmente erfolgte durch Auftrennung mittels Gelelektrophorese.

### 3.2.2.5 Gelelektrophoresen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten basiert auf der Eigenschaft negativer Ladungen von DNA-Molekülen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes unter Verwendung von Agarose- bzw. Polyacrylamidgelen können somit spezielle Abschnitte der Doppelhelix nach Amplifikation anhand ihrer Größe getrennt und sichtbar gemacht werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente variiert einerseits in Abhängigkeit von Größe und Konformation des Moleküls sowie Gesamtladung und andererseits von elektrischer Feldstärke und Konzentration des gewählten Gels.

#### **3.2.2.5.1 1% Agarosegel**

Schnell und einfach durchzuführen ist die Agarosegelelektrophorese. Diese eignet sich für Fragmente von 200 bis zu 50 000 Basenpaaren. Die Benutzung von Ethidiumbromid, einem aromatischen Kation, das sich zwischen die Stränge der Doppelhelix lagert, ermöglicht das Sichtbarmachen gesuchter Fragmente unter UV-Licht.

Für ein 1 %-iges Gel werden 0,4 g Agarose Pulver mit 0,5-fachem TBE-Puffer aufgefüllt und in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgeköcht, bis das Pulver vollkommen gelöst ist. Dieses Gemisch wird bis auf 70°C heruntergekühlt und anschließend mit 8 µl Ethidiumbromid versetzt.

In der Zwischenzeit wird die Gelkammer durch Einspannen des Schlittens präpariert. Nun kann die Gelmischung luftblasenfrei in die Kammer gegossen und der Kamm für die Geltaschen eingelegt werden.

Nach circa 30 Minuten ist das Gel ausreichend polymerisiert, sodass es nach Entfernung des Kamms sowie Auffüllen der Kammer mit 0.5-facher TBE bis das Gel gerade eben mit Flüssigkeit bedeckt ist, mit den zu testenden Proben beladen werden kann.

In diesem Fall wurden als erstes die aus frisch isolierter RNA gewonnene c-DNA auf ihre Menge an exprimiertem GAPDH untersucht. Des Weiteren wurde bei sämtlichen zu testenden Primern zunächst eine Gelelektrophorese auf Agarose durchgeführt, um optimale Bedingungen für jedes Primerpärchen zu etablieren, bevor radioaktiv markierte PCR-Proben zum Einsatz kamen. In allen Fällen wurde zum Auffinden der jeweiligen Bandenhöhe ein 1-kB-DNA Längenstandard benutzt. Von diesem wurden 5 µl in die erste Geltasche pipettiert. Von den PCR Proben wurden jeweils 10 µl mit 2 µl Ladepuffer versetzt und anschließend je 10 µl auf das Gel aufgetragen.

Nachdem die Gelkammer mit den Elektroden verbunden wurde, konnten die aufgetrennten Banden nach einer Laufzeit von 45 Minuten bei einer Spannung von 100 V auf einem Transilluminator durch UV-Licht der Wellenlänge 320 nm visualisiert werden.

#### **3.2.2.5.2 6 % Polyacrylamidgel**

Eine weitaus sensitivere Möglichkeit, vor allem radioaktiv markierte PCR-Produkte mittels Elektrophorese nach ihrer Größe aufzutrennen, bietet die Benutzung von Polyacrylamidgelen.

Dazu wird pro Gel ca. 25 ml einer Gelmischung hergestellt, die zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und mit einem Taschenkamm versehen wird. Anschließend muss das Gel etwa eine Stunde lang auspolymerisieren und kann dann in die mit 0.5-fachem TBE-Puffer gefüllte Gelkammer eingespannt und mit den Proben beladen werden.

Zuvor sollten allerdings die Geltaschen durch Einspritzen von TBE-Puffer von kleinsten Partikeln und Luftblasen befreit werden, damit die Proben optimal in die Taschen absinken können und damit ein gleichmäßiger Lauf der Banden erreicht werden kann.

In die erste Geltasche wurden hier jeweils 0.5-2  $\mu$ l eines Längenstandards pipettiert, der vorher radioaktiv markiert wurde.

Je 10  $\mu$ l jeder PCR-Probe wurden mit 2  $\mu$ l Ladepuffer versetzt und davon 10  $\mu$ l auf das Gel aufgetragen.

Der Ladepuffer erleichtert einerseits das schnelle Absinken der Proben in ihre Taschen und vermeidet dadurch Vermischung von Proben; andererseits dient der in dem Puffer enthaltene Farbstoff zur Bestimmung der Gellaufzeiten.

Um ein langsames Austreten der Proben aus den Taschen zu ermöglichen, startete man die Elektrophorese mit einer Spannung von 80 V und steigerte dann auf 125 V. Unter diesen Bedingungen betrug die Auftrennungszeit bis der Farbstoff komplett unten ausgetreten war ca. 3 Stunden.

Danach muss das Gel 2 h lang in einem Gelrockner gelagert werden, bevor es schließlich zur Bandendetektion für 1-3 Tage auf einen Röntgenfilm gelegt wird. Die jeweilige Expositionsdauer hing dabei vom Alter der verwendeten Radioaktivität ab. Die Halbwertszeit des für diese Arbeit verwendeten  $\alpha$ -<sup>33</sup>P-d CTP betrug  $t_{1/2} = 25.4$  d. Der Röntgenfilm wird im letzten Schritt in einer Dunkelkammer entwickelt.

Die Auswertung erfolgte auch hier anhand des DNA-Längenstandards (pUC-Mix-Marker, pBR 322).

### **3.2.2.6 Standardisierung über GAPDH-Kontrolle**

Wie bereits erwähnt, ist eine vorherige Sicherung von Qualität und identischen Konzentrationen der c-DNA aller Zelllinien für eine aussagekräftige Interpretation der Expression untersuchter Marker unerlässlich.

Dazu verwendete man das ubiquitär vorhandene Strukturgen GAPDH. Für dieses werden entsprechend normaler PCR-Bedingungen Primer eingesetzt und die Stärke der Expression in den einzelnen Zelllinien anhand der Bandenstärke ermittelt. Nur bei gleich stark ausgeprägtem Bandenmuster in allen Linien kann davon ausgegangen werden, dass in allen

Extrakten gleiche Ausgangskonzentrationen vorhanden sind und damit später für andere Marker nachweisbare Expressionsunterschiede nicht etwa durch Vorliegen unterschiedlicher Gesamt-DNA Konzentrationen bedingt sind.

Die gesuchte GAPDH-Bande konnte mit Hilfe eines DNA-Längenstandards mit einer Größe von 299 bp identifiziert werden.

### **3.2.2.7 Kinasieren eines DNA-Längenstandards**

Um Aussagen über die Verteilung von Banden und damit das Expressionsmuster spezifischer Marker in verschiedenen Zelllinien machen zu können, ist die Verwendung eines geeigneten Längenstandards unabdingbar.

Es handelt sich dabei um durch Restriktionsverdau entstandene Plasmid-DNA, die, um sie auch für den Einsatz autoradiographischer Gele nutzbar zu machen, an ihrem 5'-Ende mit radioaktivem Phosphat markiert wird.

Dazu wurde ein 25 µl Ansatz wie unter 3.1.8 beschrieben hergestellt und 30 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert, anschließend 5 Minuten bei 85°C denaturiert. Es folgte ein Reinigungsschritt, um verbleibende freie Nukleotide aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Dazu wurden spezielle Reinigungssäulen mit Hilfe einer Spritze mehrmals hintereinander mit 70 µl 1 x STE-Puffer überschichtet. Am unteren Ende der Säule austretende Tropfen wurden aufgefangen. Trat der erste Tropfen aus, konnte mit dem Auftragen des Ansatzes begonnen werden. Dazu fügte man zunächst 45 µl 1-fach STE zu der Probe hinzu, bevor diese ebenfalls mittels einer geeigneten Spritze durch die Säule gedrückt werden konnte. Direkt im Anschluss gab man erneut 70 µl 1-fach STE-Puffer über die Säule und sammelte schließlich das am unteren Säulenende austretende Eluat in einem Reaktionsgefäß und verfügte damit über einen an <sup>33</sup>Phosphor gekoppelten DNA-Längenstandard.

### **3.2.3 Western Blot-Analyse**

Die Western Blot Analyse, ursprünglich hervorgegangen aus einer Bestimmungsmethode für Molekulargewichte von Proteinen (160;161), dient dem Nachweis spezifischen Proteins innerhalb einer Proteinmischung.

Der klassische Western Blot besteht aus folgenden drei Säulen: denaturierende SDS-Gelelektrophorese, elektrophoretischer Transfer und immunchemischer Nachweis über Farb- oder Chemolumineszenzvisualisierung.

Die einzelnen Schritte von der Proteingewinnung über Gelelektrophorese, Elektroblothing bis hin zur Visualisierung werden nachfolgend detailliert beschrieben.

### **3.2.3.1 Proteinextraktion**

Die Qualität des zu trennenden Proteingemischs ist für das Gelingen eines Protein-Blotting-Experiments von ausschlaggebender Bedeutung. Es ist daher bei der Gewinnung und Verarbeitung von Proteinextrakt besondere Vorsicht geboten, um einer Kontamination durch Fremdproteine einerseits und proteolytischem Abbau z.B. durch unsachgemäße Lagerung oder wiederholtes Auftauen und Einfrieren von Proben andererseits vorzubeugen.

Um den Einfluss von im Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die Expression ausgesuchter Proteine auszuschalten, wurden die Zellen in Kultur 24 h vor Versuchsbeginn serumfrei gehalten.

#### **3.2.3.1.1 Adhärenz Zellen**

Bei den adhärenz wachsenden Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt und der verbleibende Zellrasen durch zweimaliges Waschen mit 1 x PBS von Mediumresten und Zelltrümmern befreit.

Die Kulturflaschen wurden dann auf Eis gelagert, während man den Lyse-Puffer vorbereitete. Dazu benötigte man pro 250 ml Gewebekulturflasche ein Volumen von 700-750 µl, je nach Konfluenz angewachsener Zellen.

Der Lysis-Puffer konnte zugesetzt werden und durch Schwenken der Flaschen sorgfältig auf allen Zellen verteilt werden. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten, bevor die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und erneut für 5 Minuten auf Eis gelagert wurden.

Es waren nun zuverlässig sämtliche Zellen von Lyse-Puffer umgeben. Das gesamte Volumen wurde sodann in 1.5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und in der Tischzentrifuge 10 Minuten bei 10.000 U/min und Raumtemperatur abzentrifugiert.

Der Überstand, in dem das Gesamtprotein enthalten war, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in kleineren Mengen aliquotiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

Ein Aliquot jeden Extraktes wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt.

#### **3.2.3.1.2 Suspensionszellen**

Bei in Suspension wachsenden Zellreihen pipettierte man die Zellen samt Medium in ein 50 ml Falconröhrchen und zentrifugierte 10 Min. bei 800 U/min bei Raumtemperatur, bis sich in der Röhrchenspitze alle Zellen in Form eines Pellets angesammelt hatten.

Der Überstand wurde entfernt und das verbleibende Pellet in 5 ml eiskalter PBS gelöst. Nach erneutem Abzentrifugieren bei 4°C für 10 min. und 800 U/min. konnte der Überstand

verworfen und das Zellpellet in je 700-750  $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer aufgenommen werden. Es wurde 10 Minuten lang auf Eis inkubiert und anschließend die gesamte Suspension in ein Eppendorfgefäß gegeben und weiter behandelt wie unter 3.2.3.1.1 beschrieben.

### **3.2.3.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration (n. Lowry)**

Um die Konzentration einer Proteinlösung zu bestimmen, wurde ein kolorimetrischer Assay benutzt. Das Nachweisprinzip basiert auf einer Reaktion der im Extrakt enthaltenen Proteine in einer alkalischen Kupfer-Tartrat Lösung mit Folin-Reagenz. Dabei kommt es zu einer charakteristischen Blaufärbung, deren Absorption im Digitalphotometer bei einer Wellenlänge von 750 nm ermittelt wurde.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde anhand einer durch Messung eines Proteinstandards erzielten Eichkurve durchgeführt. Man erstellte also zunächst eine Verdünnungsreihe einer Proteinlösung aus Bovinem Serum Albumin, deren Ausgangskonzentration bei 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  lag. Diese Reihe enthielt folgende Verdünnungsstufen: 1/100, 1/50, 1/40, 1/30, 1/20, 1/10. Unter Verwendung des  $D_c$ -Protein Assays der Firma BIO-RAD wurden die Absorptionswerte aller Verdünnungsstufen bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen und zur Erstellung einer Eichkurve herangezogen. Vorher wurde das Digitalphotometer mit Hilfe eines Leerwertes, der aus 200  $\mu\text{l}$  A. ad iniect. in einer Quarzküvette bestand, geeicht.

Von den zu bestimmenden Proteinextrakten wurden je zwei Verdünnungsstufen hergestellt, z.B. 1/100 und 1/20. Dazu wurden entsprechende Mengen des Proteins in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  gelöst.

In der Zwischenzeit setzte man die Reagenzien wie folgt an: 1 ml des Reagenz A wurden zusammenpipettiert mit 20  $\mu\text{l}$  des Reagenz S und von dieser Mischung in jede Küvette 100  $\mu\text{l}$  gegeben. Es wurden je 800  $\mu\text{l}$  des Reagenz B zu jeder Küvette hinzugefügt, vorsichtig gevortext und die Küvetten anschließend für die Dauer von 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte dann nach Eichung des Gerätes die Bestimmung der Absorption im Digitalphotometer. Die Absorptionswerte konnten dann mit Hilfe der Eichkurve in Konzentrationen umgerechnet werden.

### **3.2.3.3 SDS-Gelelektrophorese**

Die Proteinmischung kann nach verschiedenen Kriterien aufgetrennt werden. In den meisten Fällen und so auch unserem Anspruch genügt die elektrophoretische Separation nach Molekulargewicht durch Anwendung der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese. Dieses



Verfahren liefert ein hohes Maß an Trennleistung und Bandenschärfe und erlaubt einen effizienten Transfer.

Das verwendete Gel bestand aus zwei Teilkomponenten: dem kleineren Sammelgel, in dem sich die Geltaschen befinden und dem größeren Laufgel. Es wurde zunächst die Mischung für das Laufgel zwischen die abgedichteten Glasplatten gegossen und dieses mit 100 % Ethanol überschichtet, um Blasenbildung und Austrocknung während des Polymerisationsvorganges zu vermeiden.

Nach 15-30 Minuten wurde das Ethanol durch einen kräftigen Wasserstrahl entfernt und die Platten sorgfältig getrocknet. Man konnte nun das Sammelgel eingießen, den Kamm einlegen und das Gel erneut 15-20 Minuten auspolymerisieren lassen.

Die zusammengebaute Gelkammer wurde mit 1 x SDS Puffer gefüllt und die Geltaschen mit Hilfe einer Spritze für die Auftragung der Proben präpariert.

Während dieser Vorarbeiten wurden die Proteinproben für die Elektrophorese vorbereitet. Dazu wurden in 1 ml Eppendorfgefäßen Proteinlösungen jedes Extraktes in einer Konzentration von 20 µg vorgelegt, sodass identische Ausgangskonzentrationen für alle Proteinextrakte herrschten. Zu diesen gab man ein definiertes Volumen an 5-fachem Probenpuffer (Sample-Buffer), das  $\frac{1}{4}$  des Volumens der Proteinlösung betrug. Das Gesamtvolumen jeder Probe sollte dabei nicht über 30 µl liegen, da die Aufnahmekapazität der Geltaschen begrenzt ist. Es wurde 10 Sek. in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

Zur Denaturierung des Proteins wurden die Proben für 5 min bei 95°C in den Heizblock gestellt, danach erneut kurz zentrifugiert.

Hieran schloss die Beladung des Gels an, wobei neben den Proteinextrakten ein Proteinstandard definierter Größe verwendet wurde, der später zum Auffinden der Banden beim richtigen Molekulargewicht herangezogen wurde.

Ein auf dem Gel sichtbarer Marker (Regenbogenmarker) diente der Laufzeitbestimmung.

Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte mit individuellen Unterschieden für den Nachweis verschiedener Proteine durchschnittlich für 90-120 Minuten bei 120 V.

#### **3.2.3.4 *Semi-dry*-Elektroblot**

Voraussetzung für den Nachweis bestimmter Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper ist der Transfer und die Immobilisation der elektrophoretisch separierten Proteinextrakte vom Gel auf eine Membran. Für diesen Transfer macht man sich die einheitlich negative Ladung der Proteine in einem SDS-Gel zunutze und lässt diese im eigentlichen Blotting von der Anode zur Kathode wandern.

Für den Blot-Vorgang existieren verschiedene Verfahren, von denen sich jedoch als Standard nur der sog. *Wet-oder Tankblot* und der *Semi-dry-Blot* durchgesetzt haben. Der letztgenannte bietet dabei den Vorteil kürzerer Blottingzeiten und einen geringeren Bedarf an Transferpuffer. Außerdem können mehrere Gele gleichzeitig geblottet werden.

Vorbereitend wurden je drei Filterpapiere, zwischen denen die Membran während des Transfers positioniert ist, in drei verschiedenen Methanol-Tris-Puffern eingeweicht. Währenddessen wurde die Membran selbst zunächst 5 Minuten in 100 % Methanol gebadet, um enthaltenes Wasser zu entfernen und sie positiv aufzuladen. Anschließend wurde sie kurz in A. dest und zuletzt in Anodenpuffer II geschwenkt, wobei darauf zu achten war, dass die Membran niemals austrocknete.

Die Semi-Dry-Blotting-Apparatur wurde nach Beendigung der SDS-Gelelektrophorese in dieser Reihenfolge zusammengebaut: ganz unten befindet sich die Kathode; auf diese werden, zwischen ausreichend Filterpapier das Gel mit der Membran gelagert und oben kommt die Anode zu liegen.

Wichtig ist es, vor dem Start des Transfers sämtliche Luftblasen zu entfernen und die Membran so zu kennzeichnen, dass man weiß, auf welcher Seite sich nach dem Blotting die Proteine befinden. Die Membran selbst muss dabei mit größter Vorsicht behandelt werden, damit ihre Struktur unversehrt bleibt. Andernfalls kann es zur unvollständigen Darstellung von Banden und damit zu mangelnder Verwertbarkeit des Ergebnisses kommen.

Der eigentliche Proteintransfer dauerte bei 200 mA und 80 V bei Verwendung einer einzelnen Membran ca. 1 Stunde.

Anschließend konnte die Membran mit Antikörpern beschichtet werden. Dabei wurde als erstes ein Kontroll-Blot nach dem Standard-Protokoll für die extrahierten Proteine durchgeführt, um sicherzustellen, dass in allen Extrakten gleiche Ausgangskonzentrationen vorlagen.

Dazu verwendete man einen gegen  $\beta$ -Actin (= ubiquitär vorkommendes Protein) gerichteten Antikörper, der nach Detektion ein gleichstarkes Bandenmuster in allen Proteinextrakten zeigen musste, bevor diese für den Nachweis spezieller Proteine eingesetzt wurden.

Vor Beginn der eigentlichen Nachweisreaktion, des sog. *Overlays*, die für jeden Antikörper individuell abgestimmt und optimiert wurde, wurden überschüssige Proteinbindestellen der Membran durch einen Blockierungsschritt von einer Stunde Dauer saturiert. Die Membran wurde in einer Lösung von 5 % Magermilchpulver in TTBS-Puffer eingelegt. Alternativ konnte die Membran auch über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert werden.

Für den Nachweis eines bestimmten Proteins wurde der spezifische Antikörper in individuell getesteter Verdünnung in Blockierungslösung auf die Membran gegeben. Je nach Antikörper wurde eine Stunde bei Raumtemperatur oder aber über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. In jedem Fall wurde die Membran für diese Zeit in Plastikfolie eingeschweißt, um das Austrocknen zu verhindern und eine gleichmäßige Benetzung der Membran durch den Antikörper zu gewährleisten.

Nach dreimal 5-minütigem Waschen auf dem Schüttler zur Entfernung überschüssigen Antikörpers, wurde zur Visualisierung des Signals Zweitantikörper auf die Membran gegeben. Dazu kamen HRP- (= *Horseradishperoxidase*) gekoppelte Antikörper zum Einsatz, die gegen konstante Bereiche des Erst-Antikörpers gerichtet sind und durch Bindung mehrerer Zweit-Antikörper an einen Erst-Antikörper zur Verstärkung des Signals führen. Der Zweit-Antikörper war, je nach Spezies des Erst-Antikörpers gegen Maus oder Kaninchen-Antigen gerichtet. Er wurde ebenfalls in Blockierungslösung in einer Verdünnung von 1:2000 angesetzt und 30 Minuten inkubiert.

Ungebundener Antikörper wurde wiederum durch 3-maliges Waschen in TTBS-Puffer auf dem Schüttler eliminiert. Zur indirekten Detektion wurde ein auf Chemolumineszenz basierendes Verstärkersystem der Firma amersham pharmacia verwendet.

Die Reaktionslösungen werden dabei 1:1 angesetzt und für 1 Minute auf die Membran gegeben. Durch Einwirkung des an den Sekundär-Antikörper gebundenen Enzyms entsteht ein Licht-emittierendes Produkt (Chemolumineszenz), welches durch Auflegen eines Röntgenfilmes aufgefangen und damit sichtbar gemacht werden kann.

Dazu wurde die Membran gut abgestreift in eine Filmkassette eingelegt und ein Röntgenfilm unter Lichtausschluss für 60-90 Sekunden exponiert; anschließend wurde der Film entwickelt. Die von dem Molekulargewicht abhängige zu bestimmende Bande wurde durch den Vergleich mit einem Proteinstandard ermittelt.

### **3.2.4 Immunhistochemie**

Der Nachweis spezifischer Proteine in Lungentumoren erfolgte durch immunhistochemische Färbungen an Präparaten, welche uns freundlicherweise im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der Universitätskliniken Bergmannsheil/Bochum sowie der Pathologie der Städtischen Kliniken/Kassel zur Verfügung gestellt wurden.

Das Gewebe lag in Paraffin eingebettet in Schnitten von 4 µm Dicke vor und wurde auf APES-beschichteten Objektträgern für die Experimente vorbereitet.

### 3.2.4.1 APES-Beschichtung von Objektträgern

Um Paraffinschnitte auf Objektträgern für die Behandlung in Mikrowelle oder Autoklaven haltbar zu machen, wurden die Objektträger vorher sialinisiert, d.h. mit APES beschichtet. Dazu wurden 200 Objektträger einzeln in Glasschlitten positioniert und diese nach folgendem Schema behandelt:

Tauchvorgänge	Zeit
200 ml Aceton	5 min.
2 % APES in 200 ml Aceton	5 min.
2 x Spülen in A. dest	einige sec.
über Nacht unter Abzug Trocknen lassen	

**Tabelle 15:** APES-Beschichtung von Objektträgern

### 3.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für jeden verwendeten Paraffinblock wurden zur besseren Übersicht und Differenzierung einzelner Gewebstrukturen und zum Vergleich mit den Färbungen mit speziellen Antikörpern zunächst einfache HE-Färbungen durchgeführt.

Je ein Schnitt von jedem Block wurde zunächst von Paraffin befreit. Dazu wurden die Objektträger wiederum einzeln in Schlitten gestellt und nacheinander für 15, 10 und 10 Minuten in 3 mit 200 ml Rotihistol gefüllten Gefäßen gebadet.

Anschließend wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe rehydriert: je 2 Minuten in 100%, 96%, 90%, 86%, 70% Ethanol. Zum Schluss einmaliges Tauchen in A. dest.

Die eigentliche Färbung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tauchvorgang	Zeit
100 % Hämalaun	7-10 min.
Aqua dest.	einige sec.
fließendes Leitungswasser	einige sec.
Aqua dest.	einige sec.
1 % Eosin in 50 % EtOH	30-60 sec.

**Tabelle 16:** Hämalaun-Eosin-Färbung

Danach wurden die Schnitte in einer Ethanolreihe aufsteigender Konzentrationen je 2 x 2 Minuten differenziert und unter dem Mikroskop die Intensität der Färbung geprüft.

Es folgte ein abschließendes Bad in Histol für 2 x 10 Minuten, bevor die Schnitte zur Ansicht und Aufbewahrung mit Korbid-Balsam eingedeckt werden konnten.

Im Mikroskop stellten sich Zellkerne, Kalk und Knorpelgrundsubstanz durch Hämalaun blau dar, wohingegen sich Cytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten durch Eosin rot anfärbten.

### **3.2.4.3 Immunhistochemische Färbung**

Auch für die Anwendung spezieller Antikörper bestand der erste Schritt in der Entparaffinisierung im Histolbad (s.o.) und nachfolgendem Rehydrieren in absteigender Ethanolreihe: je 2 Minuten in 96, 90, 80 und 70 % Ethanol.

Anschließend wurden die Schnitte für 20 Minuten in einem durch 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angereicherten Methanol-Bad zur Blockierung der endogenen Peroxidase gelagert.

Es erfolgte kurzes Spülen in A. dest, bevor die Präparate in hitzestabilen Behältern in 0.01 M Zitratpuffer (pH = 6) für 20 Minuten bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 1 bar im Autoklav behandelt wurden. Dieser Schritt kann alternativ unter äquivalenten Bedingungen in der Mikrowelle durchgeführt werden. Er dient der Freilegung von Epitopen zur besseren Detektierbarkeit durch die Antikörper. Wichtig war es, jegliches Austrocknen der Gewebsschnitte nach einmal erfolgtem Färbebeginn zu vermeiden, da dies zu nicht verwertbaren Färbeergebnissen führen kann.

Danach kühlten die Präparate ca. 15 Minuten ab und wurden dann kurz in 1-facher PBS gespült.

Um ein unspezifisches Binden der Antikörper an Proteine zu verhindern, wurde zur Blockierung Normalserum verwendet, welches der Tierspezies des später eingesetzten Sekundärantikörpers entsprach. Es kamen hier Kaninchen- sowie Schweineserum zum Einsatz.

Um die notwendigen Mengen an Serum und Antikörper so gering wie möglich zu halten, wurden die Gewebsschnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet, der ein Abfließen der jeweils aufgetragenen Lösung und damit auch das Austrocknen der Schnitte vor Ablauf der Inkubationszeit verhinderte. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:20 in PBS eingesetzt und 20 Minuten inkubiert.

Um das an die unspezifischen Stellen gebundene Serum nicht wieder abzulösen, wurde dieses nur durch vorsichtiges Abklopfen entfernt und anschließend der gegen das zu detektierende Antigen gerichtete Erstantikörper in individuell ausgetesteter Verdünnung aufgetragen. Dazu wurde zuvor eine Antikörperlösung aus 0.5% BSA und 0.5% Tween in 1-facher PBS

hergestellt, in welche der Antikörper aufgenommen wurde. Pro Objektträger wurde, je nach Größe des Gewebeausschnittes, ein Volumen von 80-100 µl benötigt.

Zur Inkubation wurden die einzelnen Schnitte in Quadriperm-Kammern eingelegt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

Am zweiten Tag begann man mit einem Spülvorgang in PBS und trug dann den Zweitantikörper, ebenfalls speziell in Antikörperlösung verdünnt, auf. Die verwendeten Sekundärantikörper stammten entweder von Ziege oder Schwein, waren biotinyliert und an HRP (*Horseradish*-Peroxidase) gekoppelt. Er war jeweils gegen den benutzten Primärantikörper gerichtet (Maus oder Kaninchen). Vorher wurde jegliche Flüssigkeit vom Spülvorgang sorgfältig durch vorsichtiges Abtupfen vom Präparat entfernt. Der Zweitantikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen, anschließend ungebundene Reste des Antikörpers durch PBS-Spülung entfernt.

Zur Amplifizierung des durch die Färbung erzielten Signals wurde als Verstärkersystem das ABC-Kit der Firma Vector eingesetzt. Dieses enthält zwei Lösungen A und B, von denen 30 Minuten vor Benutzung gleiche Mengen in PBS gelöst wurden und schließlich für 30 Minuten zur Inkubation auf jeden Schnitt pipettiert wurden. Die Lösungen enthielten einerseits Biotin-gekoppeltes Enzym (HRP) und andererseits ein zu Biotin hochaffines Glykoprotein Avidin. Durch Zusammenpipettieren beider Lösungen bildete sich ein Komplex (AB-Komplex), der durch Bindung mehrerer Biotinmoleküle die Funktion eines Brückenantikörpers ausübte. Aus dieser Fähigkeit resultierte letztendlich eine Quervernetzung einzelner Sekundärantikörper, durch die im nachfolgenden Detektionsschritt mittels AEC als Substrat der Farbumschlag verstärkt werden konnte, ohne dass dabei unspezifische Farbreaktionen auftraten.

Circa 10 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit setzte man die AEC-Lösung an (3- Amino 9- Ethylcarbazol). Dazu wurden je 2 Tropfen Puffer und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie 3 Tropfen Farbstoff in 5 ml A. dest aufgenommen und gut durchmischt. Vor dem Auftragen wurden die Schnitte einem kurzen Spülvorgang in PBS unterzogen. Beim Hantieren mit der Farblösung war aufgrund ihrer Toxizität auf das Tragen von Handschuhen zu achten. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten und war exakt einzuhalten, da sonst flächige Farbstoffauflagerungen entstehen konnten und damit die Interpretation der Ergebnisse nicht möglich war.

Die Lösung wurde dann vorsichtig abpipettiert und gesondert entsorgt. Die Objektträger wurden erneut in PBS, dann in Wasser gespült.

Zur Gegenfärbung stellte man sie 30 s lang in 20% Hämatoxylin. Durch die Gegenfärbung war es möglich, einzelne Gewebsstrukturen und verschiedene Zelltypen besser voneinander

abzugrenzen. Anschließend mussten alle Präparate so lange in Wasser ausgespült werden, bis dieses völlig klar blieb.

Zur Reinigung und Entfernung ungebundenen Hämatoxylins spülte man die Objektträger ca. 1 Minute in 2% Essigsäure, anschließend 1 Minute in Bläuungslösung.

Es erfolgte der letzte Waschschrift in A. dest, dann wurden alle Präparate zum Trocknen senkrecht aufgestellt und Wasserreste vorsichtig abgetupft.

Um die Gewebeproben mikroskopisch betrachten zu können und sie dauerhaft haltbar zu machen, deckte man sie am Schluß in wässriger Aquamount-Lösung ein.

#### **3.2.4.3.1 Optimierung von Blockierungsschritten**

Unmittelbar vor Einsatz des primären Antikörpers versuchte man, unspezifische Bindungsstellen, die dem verwendeten Antikörper als Andockstellen dienen könnten, abzublocken. Es wurden verschiedene Methoden miteinander verglichen. Es zeigte sich dabei, dass die Benutzung eines der Spezifität des Zweitantikörpers entsprechenden Normalserums der Blockierung mit 5% Magermilchpulver überlegen war.

#### **3.2.4.3.2 Etablierung von Antikörperverdünnung und Antikörperkontrollen**

Wichtigste Vorbereitung vor der Färbung an ausgesuchten Präparaten war einerseits die Durchführung von Verdünnungsreihen für jeden Antikörper, um die für jeden Antikörper individuelle, optimale Konzentration zu ermitteln sowie andererseits die Etablierung von Antikörperkontrollen.

Üblicherweise wurde dabei zunächst eine Positivkontrolle für jedes Antiserum ermittelt, indem man ein Gewebsschnitt auswählte, in dem der Nachweis des gesuchten Antigens nach Literaturangaben positiv zu erwarten war. Zum Teil wurde dazu einfach normales Lungengewebe benutzt, für andere Antigene, insbesondere die neuroendokrinen Marker kamen Gewebe wie Prostata, Pankreas, Darm etc. zum Einsatz. Anschließend verdünnte man den Antikörper, je nach Herstellerangaben in der Regel in einer Reihe von 1: 10, 1: 20, 1:50, 1:100 und 1:200. Die Färbung wurde nach Standardprotokoll vollzogen und anschließend unter dem Mikroskop bei 3 verschiedenen Vergrößerungen ausgewertet.

Dabei entschied man sich für diejenige Verdünnungsstufe, bei der sich ein spezifisches Reaktionsmuster an zu erwartender Stelle (bei epithelialen Antikörpern z.B. membranständige Färbung) unter Ausschluss unspezifischer, häufig flächenhaft erscheinender Farbstoffbindungen zeigte.

Die jeweils ausgetestete Konzentration wurde sorgfältig dokumentiert und nachfolgend für alle immunhistochemischen Färbungen beibehalten. Teilweise wurden die Antikörper auch für andere Methoden verwendet. In diesem Fall musste die für das betreffende Verfahren entsprechende Verdünnung neu bestimmt werden.

Die für alle Färbungen applizierten Zweitantikörper (Ziege- gegen Maus- sowie Schwein- gegen Kaninchen-Antikörper) der Firma Dako zeigten beide bei einer Verdünnung von 1:50 ein gutes Ergebnis.

Im nächsten Schritt sollte die Spezifität der Antikörper überprüft werden. Um eine Falschinterpretation positiver Färbungen, die durch Erkennen und Binden des Antikörpers an andere als die gesuchte Antigenstruktur verursacht werden können, zu vermeiden, wurde für jeden Färbevorgang eine Negativkontrolle mitgeführt. Für diese verwendete man ein der Spezifität des Primäantikörpers entsprechendes IgG-Serum. Bei monoklonalen Antikörpern handelte es sich um Maus IgG, bei polyklonalen Antikörpern um Kaninchen IgG. Diese IgG-Fractionen wurden analog den Erstantikörpern in Antikörperlösung suspendiert.

Die Konzentration wurde entsprechend der vorher etablierten Antikörperkonzentration errechnet und damit vergleichbar gemacht.

#### **3.2.4.4 Auswertung**

Die Begutachtung sämtlicher Gewebsschnitte erfolgte im Lichtmikroskop nach standardisierten Schemata unter Anleitung des Pathologischen Instituts der Städtischen Kliniken Bergmannsheil/Bochum.

Allgemein wird ein Tumor nur dann als positiv für ein bestimmtes Antigen bezeichnet, wenn sich in seinem epithelialen Anteil gefärbte Bereiche finden lassen, nicht jedoch bei ausschließlich positiver Stromareaktion. Ist ein Präparat durchgehend negativ, d.h. auch in originärem Lungengewebe findet sich keine positive Farbreaktion, obwohl dies eigentlich zu erwarten gewesen wäre, so ist anzunehmen, dass die Detektion des Antigens nicht gelungen ist. In diesen Fällen wurde das entsprechende Präparat von der Bewertung ausgeschlossen.

Die Auswertung der mit CD44 Antikörper gefärbten Gewebsschnitte wurde in Anlehnung an die für die Beurteilung von Brustkarzinomen entwickelten „*Guidelines for Scoring Hercep Test*“ für membranständige Färbungen mit erb-2 vorgenommen.

Dabei lassen sich die Färbungen vier Gradstufen (Score 0, 1+, 2+, 3+) zuordnen.



Score	Beurteilung	Färbung
0	negativ	keine oder weniger als 10 % aller Tumorzellen sind gefärbt
1+	negativ	schwache Färbung in mehr als 10 % der Tumorzellen; nur Teile der Membranen sind angefärbt
2+	positiv	schwache bis mäßig starke Anfärbung von mehr als 10 % aller Tumorzellen
3+	positiv	starke Anfärbung kompletter Membranen in mehr als 10 % aller Tumorzellen

**Tabelle 17:** Auswertungsschema für membranständige Färbungen, angelehnt an die „Guidelines for Scoring Hercep Test“ für erb-2 in Brustkarzinomen

Für intrazelluläre Färbungen wie Synaptophysin oder Chromogranin eignet sich der Immunoreaktive Score (= IRS) nach Remmele/Stegner (162). Dieser berechnet sich aus dem Produkt von Farbreaktion und Anzahl gefärbter Zellen. Man unterscheidet Farbreaktionen von 0 bis 3 (= negativ bis stark positiv); bei der Anzahl gefärbter Zellen teilt man in 4 Stufen ein, wobei 0 = keine Zellen, 1 = < 10 % der Zellen, 2 = 10-50 % der Zellen, 3 = 50-80 % der Zellen und 4 = > 80 % der Zellen entspricht. Es kann also durch Multiplikation ein Maximalwert IRS von 12 erreicht werden. Im Falle von Artefakten unterschiedlicher Ursache wurden betreffende Präparate von der Bewertung ausgenommen.

### 3.2.5 FACS-Analyse

Das FACS-Gerät dient der Analyse von Signalen einer Einzelzellsuspension, die dadurch entstehen, dass diese Suspension in einem Flüssigkeitsstrahl durch das Feld eines Argon-Lasers geführt wird.

Dabei dient eine Trägerflüssigkeit (*sheat fluid*) dem Transport der Suspension durch das Gerät. Voraussetzung für diese Messung ist immer das Vorliegen der Zellen in einer Lösung, d.h. Zellen aus Gewebsverbänden oder adhärent wachsende Zellen müssen zuvor in schonender Weise herausgelöst werden. Die Zellen können anschließend durchflusszytometrisch auf die unterschiedlichsten Eigenschaften untersucht werden, wobei Größe und innere Struktur (FSC und SSC) auf rein physikalischen Gegebenheiten beruhen. Alle anderen Parameter können erst nach Behandlung der Zellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen, welche durch die im Durchflusszytometer vorhandene Lichtquelle anregbar sind und deren Fluoreszenzlicht von verschiedenen Photozellen im Gerät detektiert werden kann, bestimmt werden. Mit dieser Methode können in 10 Sekunden ca. 10.000 Zellen untersucht werden. Die Auswertung der durch die Messung erzielten Rohdaten erfolgt durch ein spezielles Computerprogramm (*Cellquest*).

Unsere Untersuchungen mittels FACS-Analyse dienen der Detektion ausgewählter Proteine in verschiedenen Zelllinien. Dazu wurden die adhären wachsenden Linien vorher durch Trypsin, versetzt mit EDTA, abgelöst. Anschließend wurden alle Zellen in Neubauer-Kammern ausgezählt, sodass in jeder Probe mindestens 0.5-1 Millionen ( $10^6$ ) Zellen in 100  $\mu$ l PBS vorlagen.

### **3.2.5.1 Zellzählung**

Zählkammer und Deckgläschen wurden vorbereitend mit 70 % Ethanol gereinigt. Das Deckgläschen wurde dann mit sanftem Druck auf die Kammer aufgebracht, bis das Erscheinen sog. Newton'scher Ringe den richtigen Sitz anzeigte.

Nun wurden 100  $\mu$ l einer zu bestimmenden Zellsuspension in eine der beiden vorgegebenen Rinnen pipettiert, bis der Zentralkanal vollständig gefüllt erschien.

Unter mikroskopischer Sicht konnten anschließend alle 4 großen Zählquadrate (jeder zu 16 kleinerer Quadrate) ausgezählt, ein Mittelwert gebildet und das Ergebnis mit  $10^4$  multipliziert werden. Es ergab sich hieraus die Zellzahl/Milliliter.

### **3.2.5.2 Färbung und Messung**

Die optimale Antikörperkonzentration wurde in Verdünnungsstufen von 1:10, 1:50, 1:100 und 1:500 ausgetestet. Die verwendeten Antikörper selbst waren nicht an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, daher wurde zur Detektion ein FITC-markierter, gegen den Erstantikörper gerichteter Sekundärantikörper benutzt, dessen optimale Konzentration laut Herstellerangaben bei 25  $\mu$ g/ml lag. Von jeder zu untersuchenden Zelllinie wurden zwei FACS-Röhrchen mit gleicher Zellzahl präpariert.

In die erste Probe wurde der Antikörper in individueller Verdünnung pipettiert, die zweite Probe wurde mit der Isotypkontrolle behandelt. Es handelte sich dabei um Maus- oder Kaninchen IgG, das wie bei der Immunhistochemie dem Nachweis der Spezifität des verwendeten Antikörpers diente (Negativkontrolle).

Alle Proben wurden behutsam gevortext und 20 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Anschließend füllte man die Röhrchen bis auf  $\frac{3}{4}$  mit 1-facher PBS auf und zentrifugierte bei 1300 U/min 5 Minuten lang in gekühlter Zentrifuge. Der Überstand wurde dekantiert und je 100  $\mu$ l des verdünnten Zweitantikörpers (gegen Maus oder Kaninchen gerichtet) in jedes Röhrchen gegeben. Dieser inkubierte 10 Minuten lang im Kühlschrank. Wiederum wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 300  $\mu$ l PBS resuspendiert.

Die Proben konnten entweder sofort oder aber in 500 µl 1% Formaldehyd resuspendiert und innerhalb der nächsten 1-3 Tage bei Kühlschranklagerung gemessen werden.

Für die Messungen wurden die einmal definierten Parameter wie Schwellenwert (*threshold*) und Kompensation abgespeichert und für alle Messungen innerhalb einer Messreihe konstant gehalten. Nur so ist eine vergleichende Messung verschiedener Zelllinien unter gleichen Bedingungen möglich.

### 3.2.5.3 Auswertung

Zur Darstellung einer spezifischen Antikörperbindung an die Zellen ist es notwendig, für jede Zelllinie eine Nullkontrolle mittels Isotyp-IgG zu etablieren, da es bei allen Antikörperreaktionen auch zur unspezifischen Anlagerung des Antikörpers an F<sub>c</sub>-Rezeptoren kommen kann. Im Zwei-Parameter-Histogramm werden mit Hilfe von Statistikregionen 98 % aller von der Isotyp-(= Null-) kontrolle ausgehenden Fluoreszenzsignale eingegrenzt und somit als negativ oder unspezifisch definiert (hier als Region M1 bezeichnet).

Bei der nachfolgenden Messung der mit speziellem Antikörper versetzten Proben werden diese gesetzten Statistikregionen beibehalten, sodass Zellen, die den Antikörper nur unspezifisch gebunden haben, ausgesondert werden können.

Durch Definieren eines Schwellenwertes werden außerdem sehr kleine Partikel, deren Impulse unterhalb dieses Schwellenwertes liegen, automatisch von der Analyse ausgeschlossen.

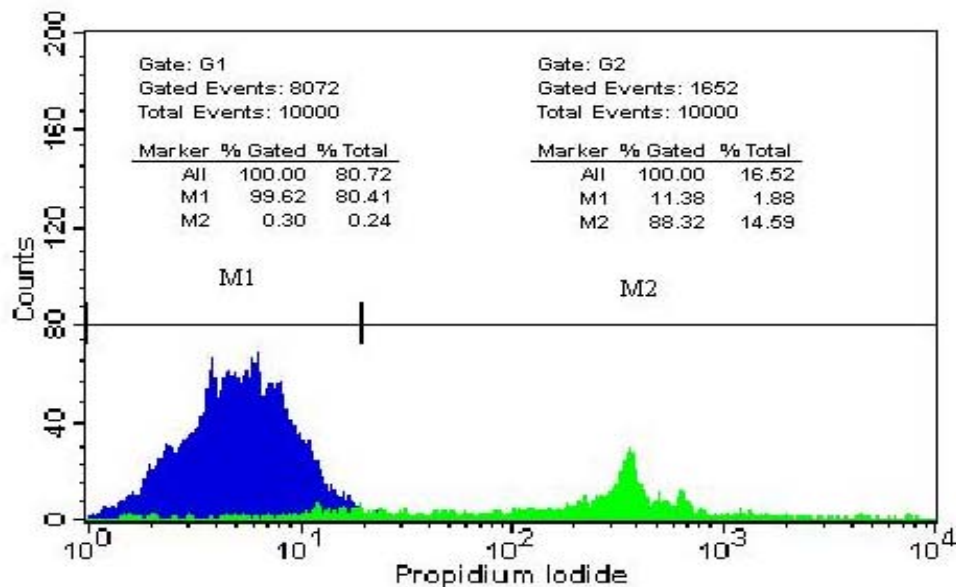
Zur weiteren Differenzierung der Zellen in Populationen ist es sinnvoll, zwei voneinander unabhängige Parameter einer Zelle in einem Zwei-Parameter-Histogramm miteinander zu verknüpfen, sodass sich verschiedene Gruppen von Zellen unterscheiden lassen. Diese können anschließend durch Setzen sog. *Gates (Bitmaps)* ausgewählt und gesondert auf ihr Fluoreszenzverhalten hin untersucht werden.

Auch für diese ausgesuchten Populationen können mittels definierter Statistikregionen die genauen Zellzahlen bestimmt werden.

### 3.2.5.4 Nachweis apoptotischer Zellen

Gerade bei den länger in Suspension wachsenden Zelllinien zeigten sich bei der Messung im FACS-Gerät immer wieder tote Zellen, die dazu neigten, Antikörper unspezifisch zu binden und damit sehr stark zu fluoreszieren. Um diese apoptotischen Zellen von der Analyse vitaler Zellen zu trennen, wurden Proben mit Propidiumjodid-Fluoreszenzfarbstoff behandelt, dessen

Eigenschaft, sich in die DNA-Doppelhelix abgestorbener Zellen einzulagern, man sich zur Darstellung toter Zellen zunutze macht. Exemplarisch wurde eine Probe der H69 Suspensionszellen mit dem gut etablierten Antikörper CD44 gefärbt, anschließend Propidiumjodid in einer Konzentration von 1  $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$  Zellsuspension dazugegeben. Bei der Auswertung im Zwei-Parameter-Streulichthistogramm ließen sich Zellen, die den PI-Farbstoff eingelagert hatten von den PI-negativen Zellen getrennt darstellen.



**Abbildung 4:** Bestimmung apoptotischer Zellen mittels Propidiumjodidfärbung an H69-Zellen: Im Doppelfluoreszenzhistogramm stellen sich die PI-positiven Zellen als abgrenzbare Population dar. Mittels Setzen eines Statistikquadranten lässt sich die Anzahl der einzelnen Populationen berechnen.

In dieser Abbildung zeigt sich eine Gesamtmenge von 14,83 % aller Zellen, welche Propidiumjodid-Farbstoff gebunden haben und damit als tote Zellen demaskiert werden.

### 3.2.5.5 Ausschluss von Autofluoreszenz

Zellen haben durch unterschiedliche Morphologien eine unterschiedlich stark ausgeprägte Neigung zur Autofluoreszenz. Das bedeutet, dass die Zellen auch ohne Behandlung durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper Fluoreszenzlicht emittieren können.

In unseren Experimenten zeigte sich bei dem adhärent wachsenden Subtyp der Linie N592 ein nicht klar zu definierendes Phänomen, das dazu führte, dass die Kurven für die Isotypkontrollen im Diagramm auf der y-Achse im Vergleich zu anderen Zelllinien weiter rechts vom Nullpunkt lagen. Um zu differenzieren, ob diese Zellen eine starke Tendenz zur Autofluoreszenz haben oder aber dazu neigen, unspezifisch IgG über den F<sub>c</sub>-Teil zu binden, wurde eine Kontrollreihe durchgeführt, die aus drei Proben bestand: einer Leerprobe, einer

---

Antikörperprobe und einer IgG-Isotypkontrolle. In entsprechenden Verdünnungen dazugegeben zeigte sich, dass die Kurven für Leerprobe und IgG-Isotypkontrolle beinahe deckungsgleich verlaufen. Somit ist ein unspezifisches Bindungsverhalten abgrenzbar und man muss annehmen, dass diese Zellen durch einen nicht bekannten Mechanismus, der offensichtlich mit dem Differenzierungswandel der Zellen assoziiert ist, stärkere Autofluoreszenz aufweisen, da die Ausgangslinie der in Suspension vorliegenden Zellen dieses Phänomen vermissen lässt.

## 4 Ergebnisse

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist es, die Gültigkeit eines *in vitro* beobachteten Prozesses der Transdifferenzierung von Zellen als Erklärungsmodell für die Genese varianter kleinzelliger Lungentumoren *in vivo* zu überprüfen.

Dabei werden im ersten Schritt zwei etablierte klassisch-kleinzellige Lungenkarzinomzelllinien NCI-H69 und -N592 und die variante Linie NCI-H82 auf Ebene von sowohl Gen- als auch Proteinexpression charakterisiert.

Jeder der in Suspension wachsenden Ausgangszelllinie wird der adhären gewordenen Subtyp gegenübergestellt. Als Kontrolle und Vertreter der nichtkleinzelligen Tumoren wird die großzellige Linie H103 mitgeführt.

In einem zweiten Schritt wird eine Auswahl von Lungentumoren verschiedener Entitäten mittels immunhistochemischer Färbung auf die Expression ausgewählter Proteine untersucht.

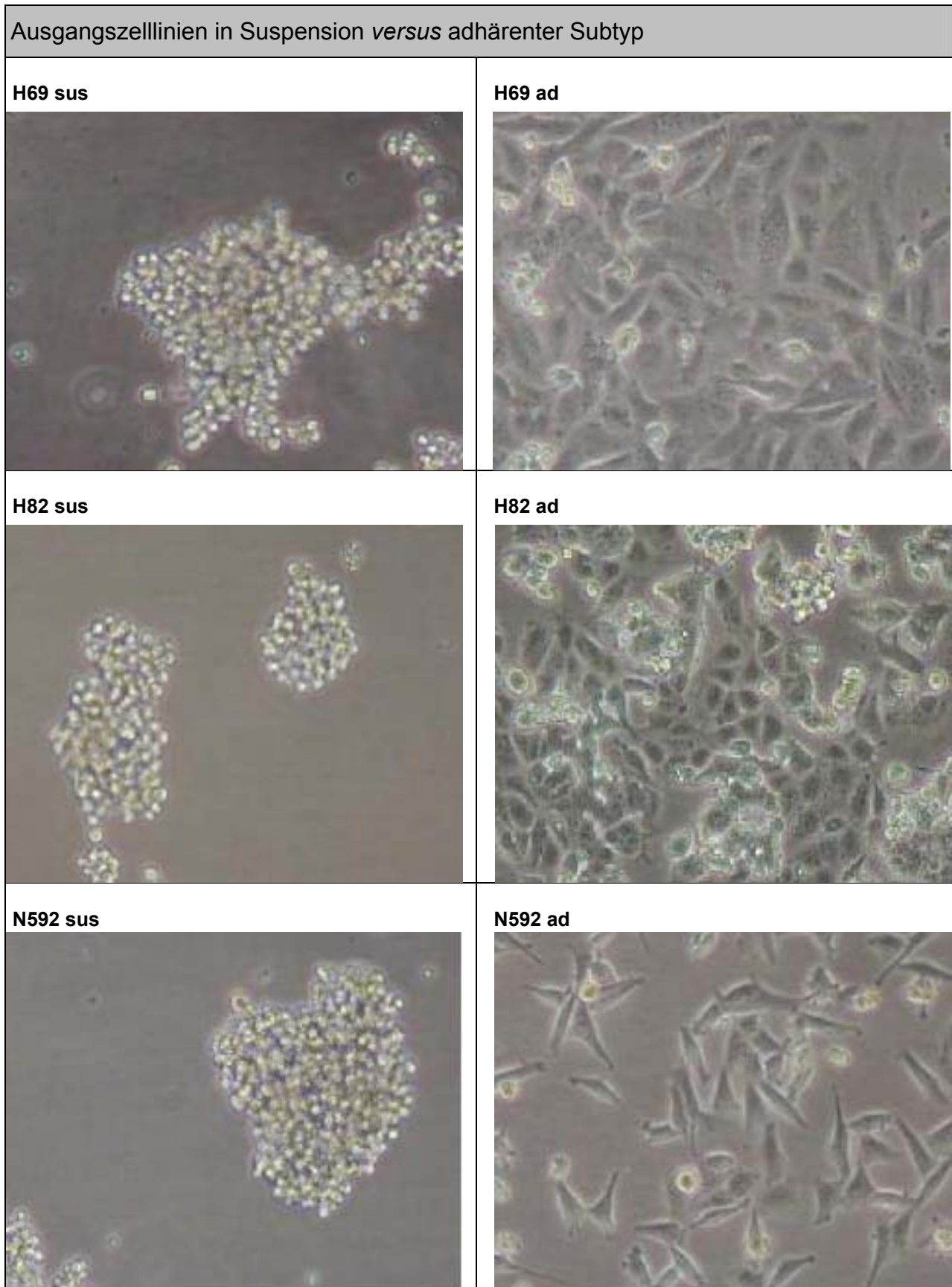
Als Nebenaspekt wird die erworbene Adhärenz von Zellen experimentell aufgehoben und die Auswirkungen auf die Expression ausgesuchter Marker durch RT-PCR-Analysen sowie Fluoreszenzzytometrie ermittelt.

### 4.1 Eigene Vorarbeiten/Seitenäste des Gesamtprojekts

#### 4.1.1 Adhärenz-vermittelte epitheliale Transdifferenzierung von SCLC-Linien

Ausgangsmaterial für alle Experimente bilden die Karzinomzelllinien H69, H82 und N592. Die durch Kultur auf Poly-L-Lysin beschichteten Flaschen angezüchteten adhären Sublinien zeigen im Gegensatz zur jeweiligen Ursprungszelllinie einen durch multiple Zellkontakte geprägten epithelialen Phänotyp, der an die Morphologie der Nichtkleinzeller erinnert.

Die folgenden Abbildungen zeigen die stark ausgeprägte morphologische Transdifferenzierung der adhären Zellen im Vergleich zum ursprünglichen Wachstumsmuster.



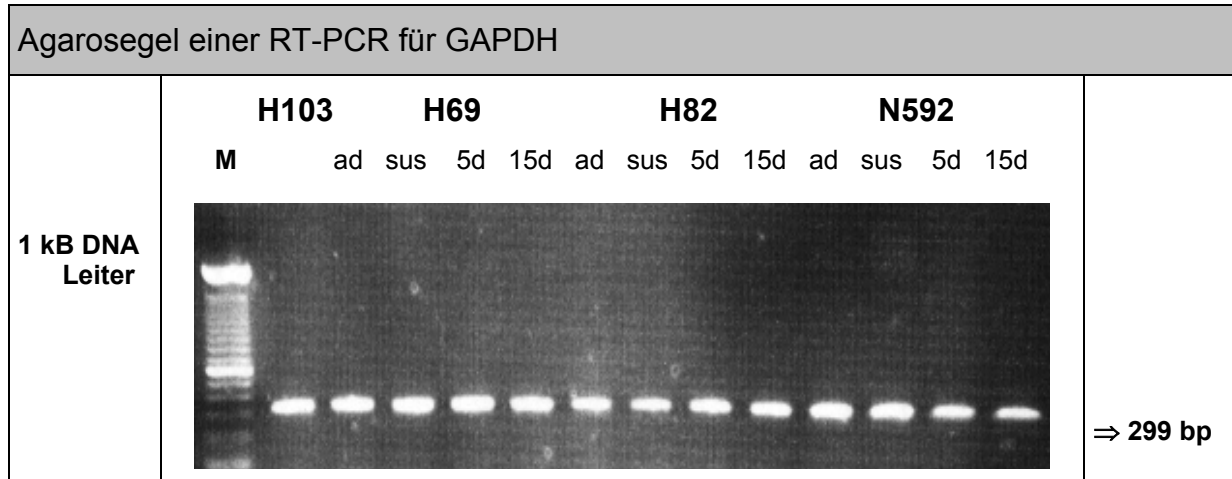
**Abbildung 5:** Digitale Aufnahmen von Zellkulturen: Gegenüberstellung der ursprünglichen, frei flottierend in Suspension wachsenden Zelllinien („sus“) links mit korrespondierendem adhärenthem Subtyp („ad“) nach epithelialer Transdifferenzierung rechts.

In dem Versuch, potentielle Auslöser für dieses Phänomen zu identifizieren, wurde die Linie NCI-H69 mit verschiedenen Genen (ras, fra-1, axl..) transfiziert, wobei keines dieser Gene selbst für die Transdifferenzierung der Zellen verantwortlich zu machen war. Für jede transfizierte Linie konnte indessen ebenfalls eine adhärenente Wuchsform erzeugt werden. Diese Pärchen aus in Suspension wachsender Ausgangszelllinie und adhärenentem Typ zeigen in PCR-Analysen deutlich zwei für nachfolgende Experimente richtungsweisende Tendenzen: im jeweils adhärenenten Subtyp kommt es einerseits zu einem Verlust neuroendokriner Expression, andererseits zu einer verstärkten Expression epithelialer Marker.

#### 4.1.2 Differentielle Genexpression in adhärenenten versus Suspensionszellen

Diese Beobachtung begründet die für nachfolgende Experimente getroffene Auswahl von Markern, die im zweiten Kapitel aufgeführt sind.

Zur späteren Quantifizierung von Expressionsunterschieden für spezifische Marker dient der Vergleich mit einer initial durchgeführten Amplifikation des gleichbleibend in allen Zellen exprimierten Strukturgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase).



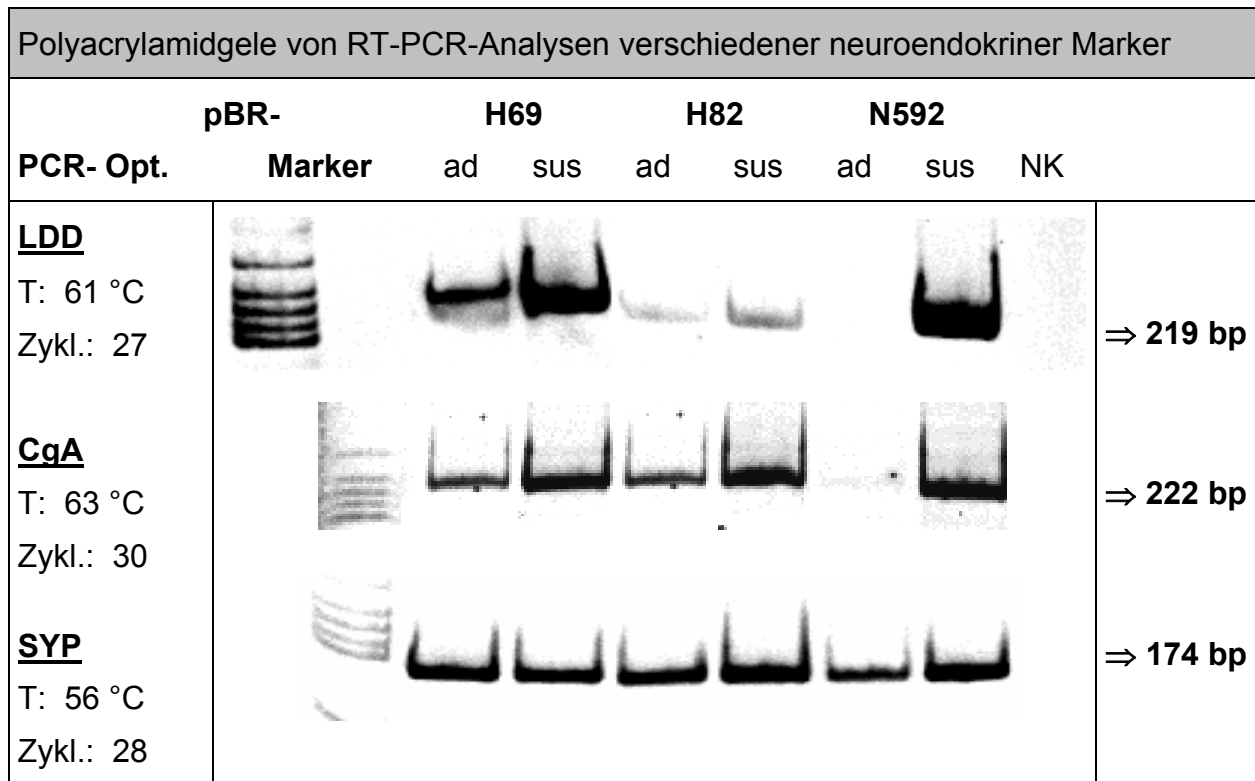
**Abbildung 6:** GAPDH-Kontroll-PCR nach 20 Zyklen bei 58°C; es finden sich gleichstarke Expressionslevel in allen verwendeten Zelllinien.

##### 4.1.2.1 Verlust neuroendokriner Differenzierungsmarker

Wie sich bereits in PCR-Analysen an transfizierten H69-Linien abzeichnet, bestätigt sich auch für die zusätzlich getesteten Linien H82 sowie N592 eine nachlassende Aktivität für verschiedene neuroendokrine Marker in den adhärenent etablierten Zellklonen. Dabei sind Intensitätsunterschiede im Expressionslevel besonders deutlich für L-Dopa-Decarboxylase,



welches in H103 überhaupt nicht nachweisbar ist. Zur Kontrolle wird jeweils ein Leerwert (NK = Nullkontrolle) mitgeführt.

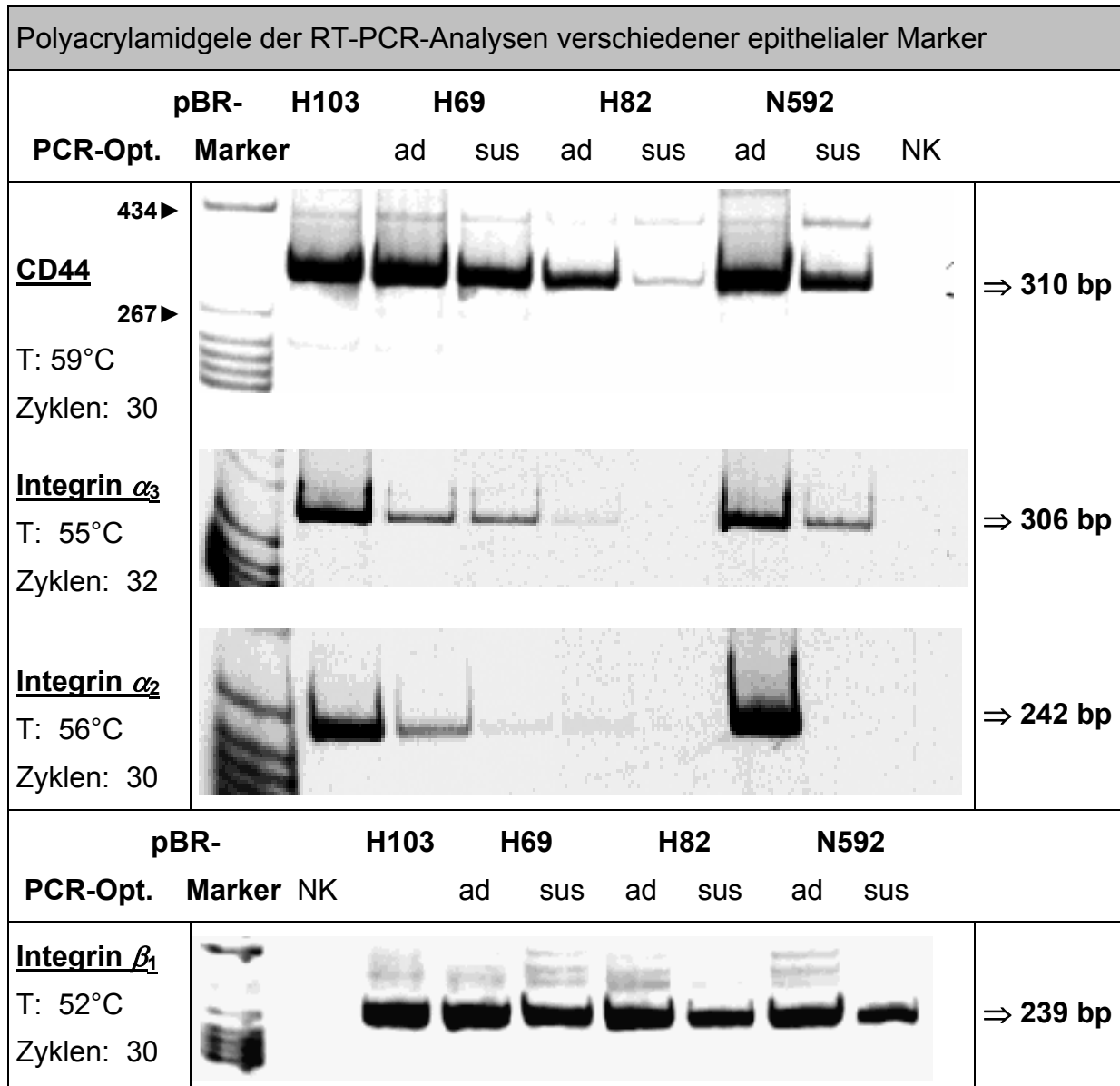


**Abbildung 7:** RT-PCR-Ergebnisse für L-Dopa-Decarboxylase (LDD), Chromogranin A (CgA) und Synaptophysin (SYP) bei optimierter Temperatur und Zyklenzahl

Die Abbildungen zeigen deutlich einen Verlust der m-RNA-Expression von für das klassisch kleinzellige Lungenkarzinom charakteristischen neuroendokrinen Markermolekülen in den adhären wachsenden Subklonen. Dieser Verlust im Vergleich zur Ausgangszelllinie ist am stärksten ausgeprägt für L-Dopa-Decarboxylase und in geringer Intensität für Synaptophysin nachweisbar.

#### 4.1.2.2 Zugewinn epithelialer Differenzierungsmarker

Die zweite, sich in Vorversuchen bereits abzeichnende Veränderung in den adhären Linien kann ebenfalls für unsere Zelllinien verifiziert werden: unter kontinuierlicher Adhärenz der Zellen kommt es zur Induktion von ansonsten nur in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomlinien nachweisbaren Genprodukten. Dazu gehören neben dem CD44-Rezeptor auch das an Adhäsion, Wachstum und Angiogenese-Prozessen beteiligte Thrombospondin sowie mehrere Mitglieder einer Familie transmembraner Oberflächenrezeptoren: die Integrine. Dabei zeigen sich für die einzelnen Marker unterschiedlich stark veränderte Expressionslevel.



**Abbildung 8:** RT-PCR-Ergebnisse für CD44 sowie eine Auswahl von Vertretern der Integrinfamilie Integrin  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  und  $\beta_1$ ; jeweils nach Optimierung der PCR-Bedingungen

Die Abbildungen zeigen teils gering, teils stark erhöhte Expression typisch epithelialer Markermoleküle in den adhären Linien im Vergleich zu den Suspensionszellen.

#### 4.2 Differentielle Genexpression induziert differentielle Proteinsynthese

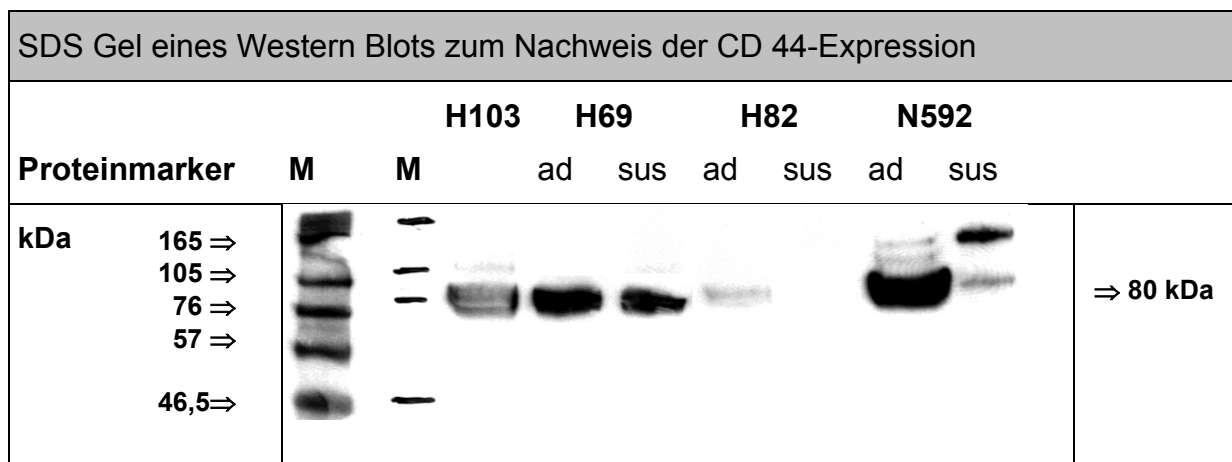
Da die Transkription eines Gens nicht zwangsläufig zur Synthese des entsprechenden Proteins führt, werden die Ergebnisse vorgeschalteter RT-PCR-Untersuchungen mittels Western Blot sowie Fluoreszenzzytometrie auf Proteinebene überprüft. Es kann bestätigt werden, dass das mit der morphologischen Transdifferenzierung adhären gewordenen Zellen veränderte Genexpressionsmuster nicht auf Ebene der Transkription stehen bleibt, sondern konsekutiv in die Synthese des entsprechenden Genprodukts (= Protein) mündet. Diese Experimente sind

damit Bindeglied zwischen den auf Zellekulturebene gewonnenen Daten (*in-vitro*-Bedingungen) und den nachfolgend durchgeführten immunhistochemischen Färbungen an Tumorgewebe (*in vivo*). Es wurde jeweils die Technik gewählt, für die ein geeigneter Antikörper verfügbar war.

#### 4.2.1 Adhärenz bewirkt eine Hochregulierung typischer NSCLC-Marker

Vor Durchführung der speziellen Western Blot Analysen wurde jeweils ein Kontroll-Blot mit einem Antikörper gegen ein in allen Zellen gleichermaßen vorkommendes Strukturprotein  $\beta$ -Aktin durchgeführt, um sicherzustellen, dass Unterschiede in der Proteinexpression nicht durch ungleiche Proteinmengen vorgetäuscht werden.

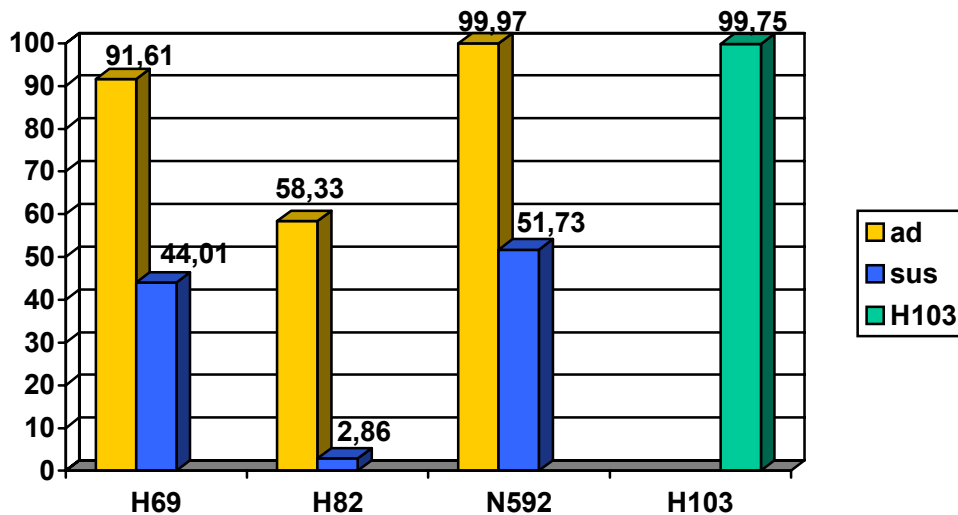
In den Suspensionszellen findet sich im Western Blot keine (H82 sus) oder schwache (N592 sus) bis mäßiggradige Expression für CD44. Der größte differentielle Effekt ist in Linie N592 zu verzeichnen: hier kommt es im adhärensten Typ zu einer maximalen Hochregulierung. Auch in den beiden anderen Linien kommt es zur gesteigerten Expression im adhärensten Subtyp, trotz der Tatsache, dass sich in H82 sus vorher keinerlei CD44 nachweisen ließ.



**Abbildung 9:** Expression von CD44 bei 30µg aufgetragenem Gesamtprotein; Gelelektrophorese: 2h bei 90V; AK-Verdünnung: 1/200 aus 0,1 mg/ml

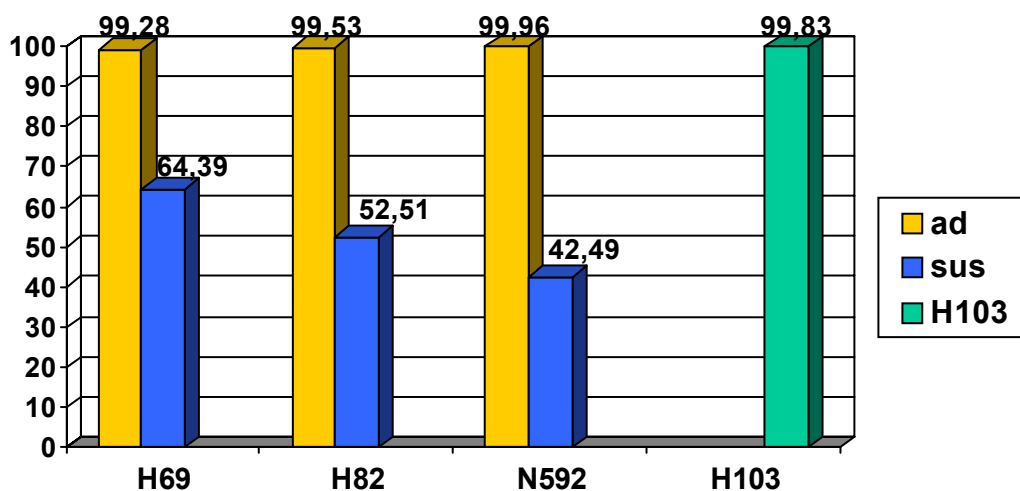
Durch die Anwendung der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen neben allgemeinen Eigenschaften wie Größe und Granularität unter anderem auch auf die Anwesenheit spezifischer Oberflächenantigene testen. Dabei ist zuvor die Etablierung einer Negativkontrolle notwendig, mit deren Hilfe man unspezifisch über Fc-Rezeptoren entstandene Bindungsverhältnisse von spezifisch gebundenem Antikörper abgrenzen kann. Auf diese Weise stellen sich die echten Expressionsunterschiede dar. In Übereinstimmung mit PCR- und Western Blot-Analysen kann mittels Fluoreszenzzytometrie in allen drei adhären

gewordenen Sublinien eine gegenüber den klassischen Kleinzellerlinien (sus) verstärkte Expression des Oberflächenmarkers CD44 nachgewiesen werden. Auf die Darstellung einzelner Histogramme für jede Zelllinie wird zugunsten einer vergleichenden Übersicht verzichtet. In der zu Vergleichs- und Kontrollzwecken benutzten Linie H103 findet sich erwartungsgemäß ein besonders hoher CD44-Level.



**Abbildung 11:** Zusammenfassende Darstellung der Expressionsunterschiede für CD44 in adhärenenten vs. Suspensionszelllinien. Angegeben ist jeweils der Anteil fluoreszierender Zellen in Prozent (%). Zum Vergleich die großzellige Linie H103 als Vertreter der Nichtkleinzeller.

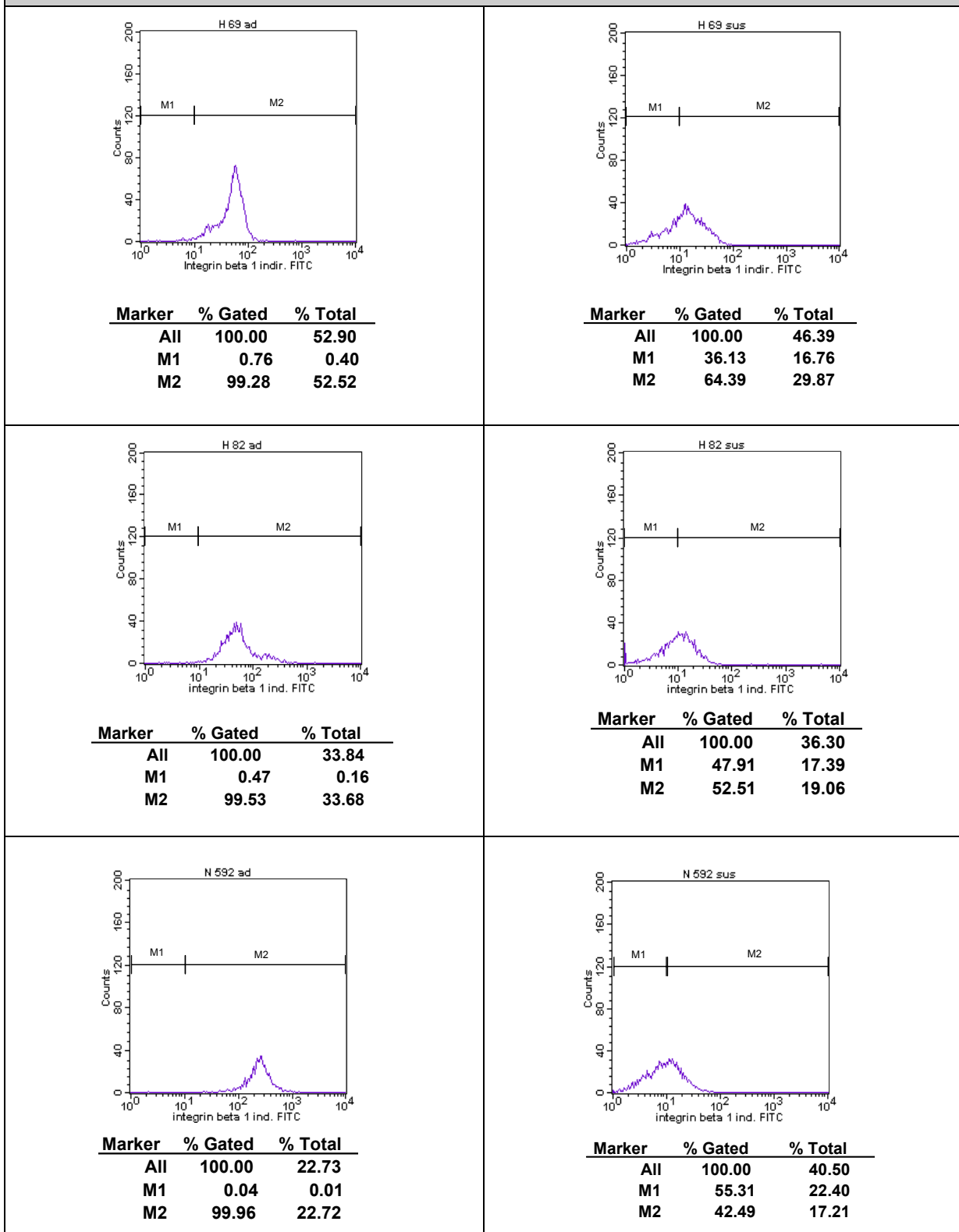
Nicht ganz so ausgeprägt wie bei CD44, lässt sich ein erhöhter Spiegel von Integrin  $\beta_1$  als Vertreter der Integrinfamilie, in den adhärenenten gegenüber den Ausgangszelllinien nachweisen.



**Abbildung 12:** Gut erkennbar ist das hier in allen drei adhärenenten Subtypen erhöhte Vorkommen von Integrin  $\beta_1$ , ähnlich hoch wie in Nichtkleinzellern (hier vertreten durch H103). Andererseits ist der differentielle Effekt des adhärenenten gegenüber dem Suspensionstyp innerhalb der einzelnen Linien nicht so ausgeprägt wie für CD44.

Durch die direkte Gegenüberstellung der jeweils korrespondierenden Pärchen wird der Anstieg der Integrin  $\beta_1$ -Expression in den adärenten Wuchsformen evident.

### Fluoreszenzzytometrische Untersuchung auf Expression von Integrin $\beta_1$

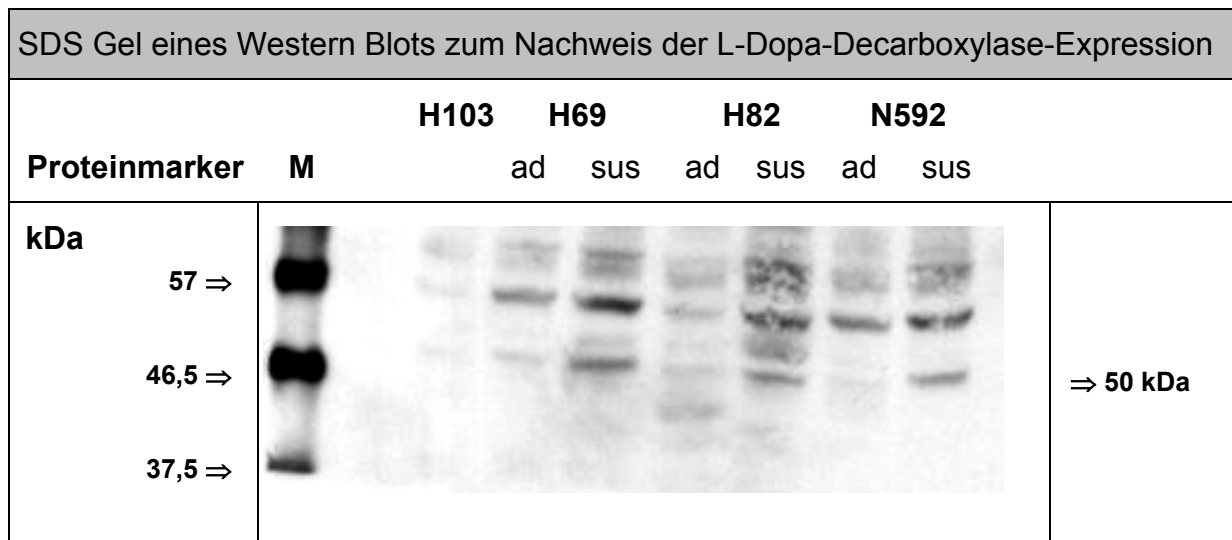


**Abbildung 13:** Gegenüberstellung von Zwei-Parameter-Histogrammen, in denen die Menge positiv gefärbter Zellen durch die Rechtsverschiebung auf der y-Achse ausgedrückt wird. Der Bereich M1 wird definiert durch die Nullkontrolle und ist damit maßgebend für die Anzahl im

Bereich M2 befindlichen (= positiven) Zellen. Unter dem Histogramm ist die in beiden Bereichen liegende Anzahl Zellen angegeben in Prozent.

#### 4.2.2 Verlust von L-Dopa-Decarboxylase nach morphologischer Transdifferenzierung

Ebenso lässt sich ein Verlust des Proteins für L-Dopa-Decarboxylase in den adhärennten Zellen belegen, wenn sich auch die Unterschiede nicht so markant wie auf Genebene darstellen.



**Abbildung 10:** Expression von L-Dopa-Decarboxylase bei 30µg aufgetragenem Gesamtprotein; Gelelektrophorese: 12h bei 27V; Antikörperverdünnung: 1/1500 aus 1mg/ml

Zu Abb. 10: Das Enzym L-Dopa-Decarboxylase hat in der Gelfiltration ein Molekulargewicht von 100 kDa. Nach SDS-Gelelektrophorese lassen sich Banden von 50 kDa nachweisen, da es sich bei humaner L-Dopa-Decarboxylase um ein Dimer handelt und polyklonale Antikörper mit der 50 kDa schweren Untereinheit des Enzyms reagieren.

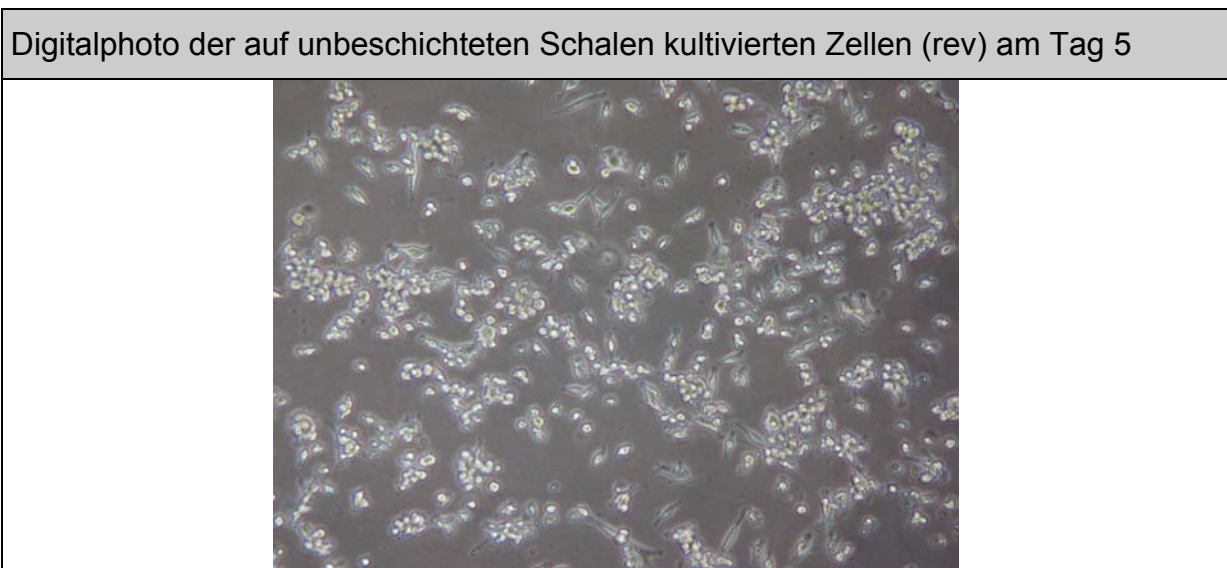
#### 4.3 Adhärenz - ein reversibles Phänomen

In einem weiteren Schritt wurde den über viele Passagen auf Poly-L-Lysin beschichteten Kulturflaschen gehaltenen Zellen das Substrat für die Anheftung entzogen, indem man sie auf unbeschichteten Kulturschalen anzüchtete. Es konnte beobachtet werden, dass innerhalb weniger Tage sowohl die Zellmorphologie als auch die Adhärenz der Zellen verloren ging. Im Rahmen eines zeitlich definierten Zwei-Punkt-Experiments wurde untersucht, welche Faktoren unmittelbar durch den Verlust der Adhärenz beeinflussbar waren. Für die weiter oben geschilderten intrazellulären Signalwege konnte beispielsweise durch andere Personen der Arbeitsgruppe bereits nach einer Woche ein direkter Effekt im Sinne eines deutlichen

Rückgangs der Akt-Aktivität (und damit Rückgang antiapoptotischer Potenz) in diesen Zellen nachgewiesen werden (163).

Für diese Arbeit wurde einerseits L-Dopa-Decarboxylase als neuroendokriner Marker sowie als Nichtkleinzeller-Marker CD44 und Integrin  $\beta_1$  ausgewählt, die sich als Differenzierungsmarker bereits bewährt hatten.

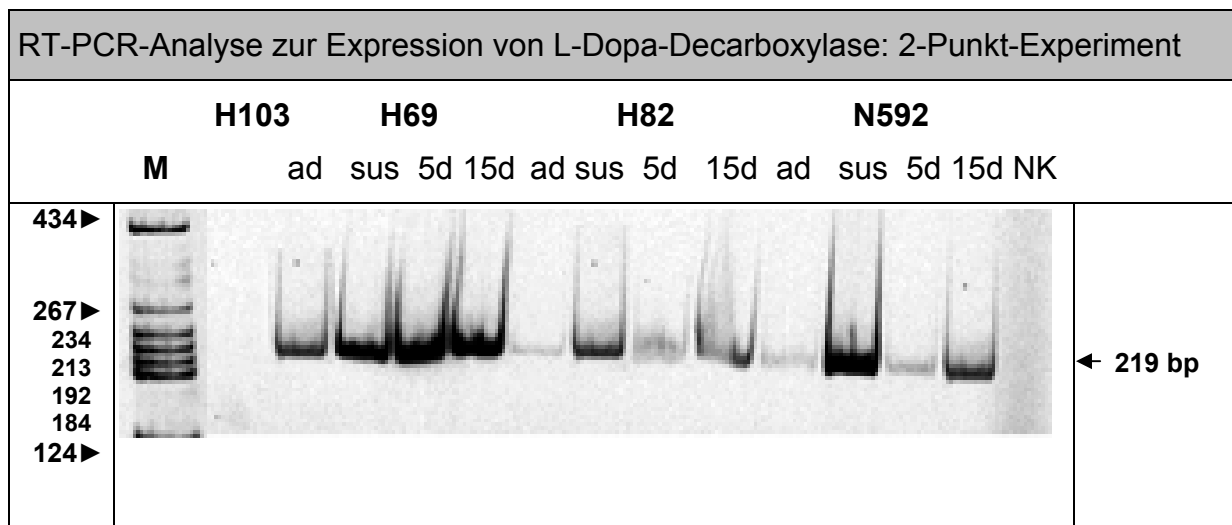
Am Tag 1 wurden die bis dato adhären wachsenden Subklone aller drei Linien auf die Kulturschalen gegeben. Untersuchungszeitpunkte waren jeweils Tag 5 und Tag 15, an dem die Zellen nach standardisierten Protokollen auf alterierte Expression getestet wurden.



**Abbildung 14:** Beginn der morphologischen Rückdifferenzierung der Linie N592 ad am 5. Tag nach Aussaat auf unbeschichteten Kulturschalen. Gut erkennbar das Nebeneinander noch epithelial konfigurierter Zellen und bereits wieder vollständig in Suspension befindlicher, zu Aggregaten zusammengeballter Zellgruppen.

#### 4.3.1 Redifferenzierung - eine Frage der Zeit?

Interessanterweise zeigte sich für L-Dopa-Decarboxylase in der RT-PCR ein langsamer Anstieg der Expression, der am deutlichsten in den Linien H82 und N592 erkennbar wird. Während am fünften Tag nach Umsetzen der Zellen auf die Kulturschalen der Expressionslevel ungefähr dem der adhären Zellen entspricht, sind am Tag 15 bereits stärkere Banden nachweisbar. Die Linie H69, deren adhärenter Subtyp eine gegenüber den anderen adären Klonen erhöhten Spiegel für L-Dopa-Decarboxylase hat, weist bereits an Tag 5 eine starke Expression auf.

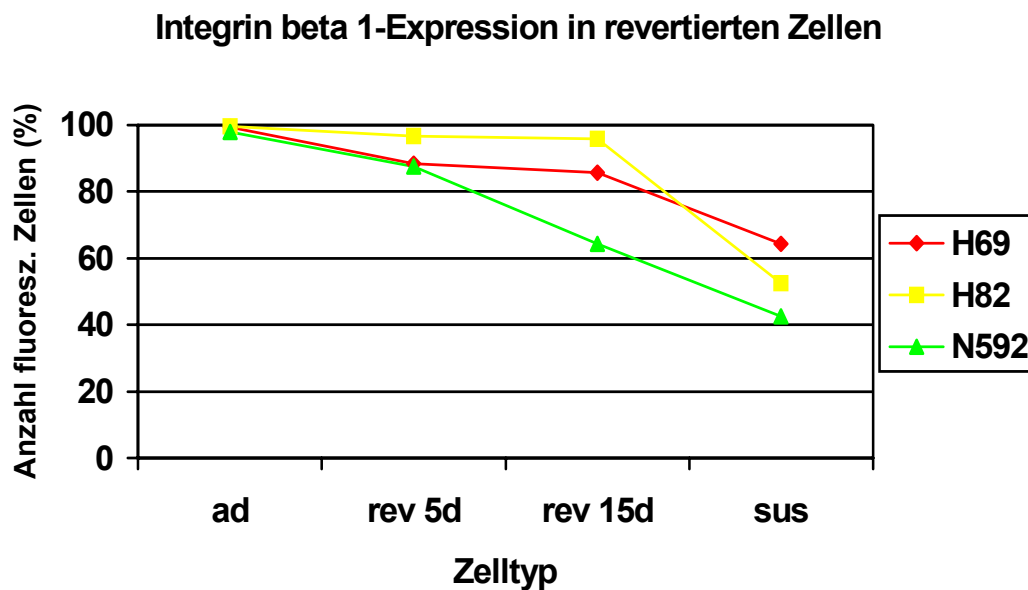


**Abbildung 14:** Stufenweiser Wiedergewinn neuroendokriner Expression im Sinne einer Rückdifferenzierung am Beispiel von L-Dopa-Decarboxylase; Zustand nach 5 bzw. 15 Tagen Zellkultur auf unbeschichteten Kulturplatten.

Auch für die Vertreter der typisch nichtkleinzelligen Marker waren Tendenzen für eine beginnende Rückdifferenzierung in Richtung der ursprünglichen Suspensionszellen erkennbar. Für CD44 war ein signifikanter Abfall von 99,21 auf 80,66 Prozent allerdings lediglich in Linie N592 zu beobachten.

Auch für Integrin  $\beta_1$  war in der Linie N592 der stärkste Verlust der Expression zu verzeichnen. So war am Tag 15 nach Aussaat der Zellen auf Bakterienplatten bereits ein Rückgang der Integrinexpression von ursprünglich 98 Prozent im adhären Typ auf 64,37 Prozent zu verzeichnen. Im gleichen Zeitraum betrug der Abfall in der Linie H69 13,59 Prozent, in der Linie H82 nur 3,58 Prozent.





**Abbildung 15:** Stufenweiser Verlust der Integrin  $\beta_1$ -Expression in allen drei Zelllinien an den Tagen 5 und 15 nach Aussaat der Zellen auf unbeschichtete Kulturplatten. Zum Vergleich ist jeweils der Expressionslevel in den Ausgangszelllinien („sus“) angegeben. Stärkster Effekt in Linie N592.

Die Beobachtung, dass die durch Langzeitkultur gewonnene Adhärenz der Zellen innerhalb weniger Tage experimentell aufgehoben werden kann, ermöglicht es, deren direkten Einfluss auf verschiedene Eigenschaften der Zelle zu untersuchen. Für die genannten Differenzierungsmarker kann in der Linie N592 die Fähigkeit zur realen Rückdifferenzierung mit einer Reexpression von L-Dopa-Decarboxylase sowie einem deutlichen Verlust der Expression des CD44-Rezeptors und des Integrintyps  $\beta_1$  gezeigt werden.

Für die anderen Linien lässt sich kein einheitliches Muster der Redifferenzierung aufzeigen; in der Linie H69 kommt es neben verstärkter L-Dopa-Decarboxylase-Expression innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu einem Verlust von mehr als 13 % der Menge an Integrin  $\beta_1$ , nicht hingegen von CD44.

Im Gegensatz dazu findet sich für die Linie H82 zusätzlich zur Reexpression von L-Dopa-Decarboxylase ein geringer Verlust von ca. 4 % der Integrin  $\beta_1$ -Menge.

#### 4.4 Differentielle Expression in Lungentumoren

Im letzten Teil dieser Arbeit soll die Übertragbarkeit des auf Zellkulturebene postulierten Erklärungsmodells für die Entstehung varianter kleinzelliger Bronchialkarzinome überprüft werden. Dazu wurde eine Auswahl in Paraffin eingebetteter Lungentumoren verschiedener

Entitäten zusammengestellt und mit bereits etablierten und paraffingängigen Antikörpern immunhistochemisch untersucht. Es sollte eruiert werden, ob sich unter *in-vivo*-Bedingungen gleiche Muster differentieller Expression nachweisen lassen, die die Genese kleinzelliger Tumoren mit varianten Anteilen gemäß des *in-vitro*-Modells erklären könnten.

Die Gruppe der kleinzelligen Lungentumoren bestand aus insgesamt 18 Präparaten, wobei davon 12 der Untergruppe der klassischen Kleinzeller (cSCLC) und 6 der Untergruppe der heterogen differenzierten Kleinzeller (vSCLC) zuzuordnen waren.

Die Gruppe der Nichtkleinzeller wurde vertreten durch 11 Plattenepithelkarzinome, 10 Adenokarzinome und 5 Großzeller. Zusätzlich wurden 10 Schnitte aus gesundem Lungengewebe mitgeführt. Unter Punkt 3.2.4.4 werden die Ein- bzw. Ausschlusskriterien für die Auswertung der gefärbten Präparate erläutert.

Da sich zum Zeitpunkt der immunhistochemischen Untersuchungen insbesondere der CD44 Rezeptor als Repräsentant der epithelialen Differenzierungsmarker durch konstant reproduzierbare Ergebnisse auszeichnete und zudem in der für Paraffinmaterial verwendbaren Form verfügbar war, wurde dieser für die Färbungen ausgewählt. Auf der Seite der neuroendokrinen Marker standen demgegenüber Synaptophysin und Chromogranin A, wobei gesagt werden muss, dass für diese Gruppe zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen nur eine begrenzte Auswahl paraffingängiger Antikörper erhältlich waren.

Für jedes Präparat wurde zur besseren Übersicht bzw. Erkennen der einzelnen Strukturen zunächst ein Schnitt mit HE-Färbung angefertigt.

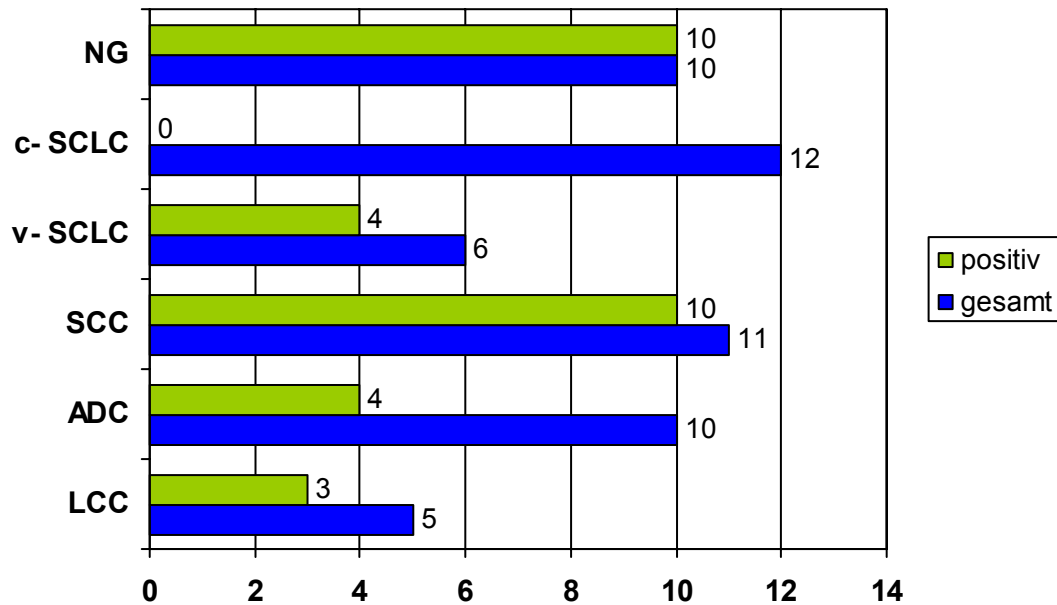
#### **4.4.1 Der CD44-Rezeptor - geeigneter Marker zur Einteilung in SCLC-NSCLC?**

In Anlehnung an den Hercep Test für Mammakarzinome wurde für jeden mit monoklonalem CD44 Antikörper gefärbten Tumorschnitt der sog. Hercep-Score ermittelt. Dieser gibt Auskunft über Farbintensität und Anzahl gefärbter Zellen.

Übereinstimmend mit den Angaben in der Literatur waren alle 10 Präparate mit normalem Lungengewebe positiv für CD44: es fand sich eine Betonung der Basalreihe der Bronchialschleimhaut. Daneben färbten sich auch Drüsenanschnitte und Bronchioli, sowie Makrophagen, Fibroblasten und Entzündungszellen an.

Die Lungentumoren zeigten einen von ihrer Entität abhängigen variablen Grad der Immunogenität.

Nachfolgende Übersicht fasst die Ergebnisse für die CD44 Färbung zusammen.



**Abbildung 16:** Übersichtsstatistik der immunhistochemischen Färbung mit CD44-Antikörper an einer Gruppe ausgewählter, in Paraffin eingebetteter, klein- sowie nichtkleinzelliger Lungentumoren. Der grüne Balken steht für den Anteil CD44-positiver Schnitte an der Gesamtzahl gefärbter Präparate (blauer Balken); (NG= Normalgewebe)

#### 4.4.1.1 Kein CD44 Nachweis in kleinzelligen Bronchialkarzinomen

Auf den ersten Blick fällt, passend zu den zuvor *in vitro* erhobenen Daten auf, dass sich in keinem der klassisch kleinzelligen Bronchialtumoren CD44 nachweisen lässt (154).

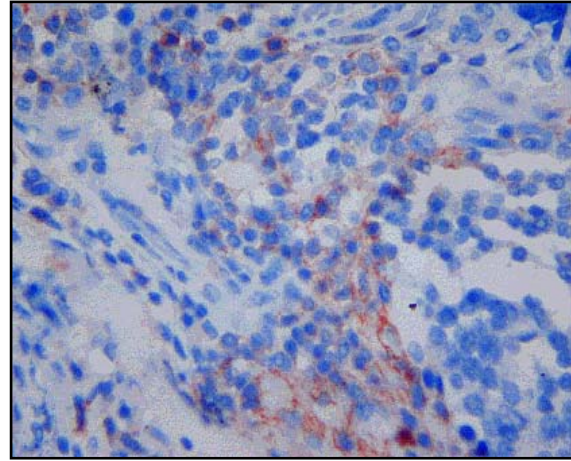
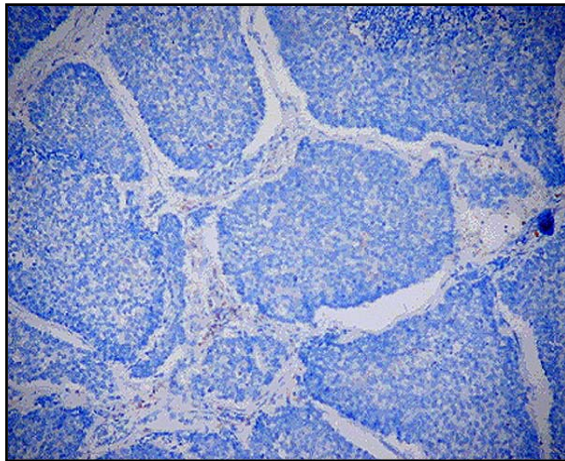
Laborinterne Bezeichnung	Histopathologische Diagnose	TNM-Klassifikation	Grading	Hercep-Score
cSCLC 01	Kleinzelliges Ca d. re. UL	pT1 N1 MX	G3	0
cSCLC 02	Kleinzelliges Ca d. li. OL	pT1 N0 MX		0
cSCLC 03	Kleinzelliges Ca d. UL	pT2 N1MX	G3	0
cSCLC 04	Kleinzelliges Ca	pT1 N0 MX	G3	0
cSCLC 05	Kleinzelliges Ca d. li. Lunge	pT2 N1 MX		0
cSCLC 06	Kleinzelliges Ca	pT2 N0 MX	G3	0
cSCLC 07	Kleinzelliges Ca d. re. OL	pT2 N0 MX	G2	0
cSCLC 08	Kleinzelliges Ca d. li. UL	pT3 N1 MX	G3	0

cSCLC 09	Kleinzelliges squamöses Ca d. li OL	pT2 N0 MX	G2	0
cSCLC 10	Kleinzelliges Ca d. re. OL	pT3 N2 MX	G2	0
cSCLC 11	Kleinzelliges Ca d. li. UL	pT1 N2 MX	G2	0
cSCLC 12	Kleinzelliges Ca d. re. Lunge	pT2 N1 MX	G4	0

**Tabelle 18:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit CD44-Antikörper an insgesamt 12 klassischen kleinzelligen Lungentumoren. Unabhängig vom TNM-Stadium, dem Differenzierungsgrad oder der Lokalisation lässt sich in keinem der verwendeten Tumoren ein signifikanter CD44-Rezeptor Anteil nachweisen.

#### Immunhistochemische Färbung mit monoklonalem CD44-Antikörper

##### cSCLC 09



**Abbildung 17:** Kleinzelliges squamöses Bronchialkarzinom des linken Lungenoberlappens, mäßig differenziert; gut erkennbar ist der für Kleinzeller typische Aufbau: dichte Lagerung der kleinen Tumorzellen (Bild li.) mit schmalen Zytoplasmasaum, feingranuliertem nukleärem Chromatin und fehlenden Nukleoli (Bild re.).

Dieser Tumor zeigt stellvertretend für die Gruppe der klassischen Kleinzeller keine CD44-Färbung und erhält damit den Hercep-Score 0. Lediglich bei höherer Auflösung im Bild rechts findet sich eine schwache positive Anfärbung des spärlich vorhandenen Stromas. Als endogene Positivkontrolle im Sinne eines gelungenen Färbevorganges finden sich hier positiv gefärbte Histiozyten.

#### 4.4.1.2 CD44-Expression als typisches Merkmal fast aller NSCLC-Tumore

Im Gegensatz dazu findet sich in der Gruppe der Nichtkleinzeller ein erheblicher Anteil CD44-positiver Tumoren. Plattenepithelkarzinome färbten sich mit 10 von 11 positiven Präparaten deutlich stärker und einheitlicher als Adenokarzinome. Großzeller weisen häufiger nur einen geringen Prozentsatz positiver Zellen auf, der weniger als 10% des Gesamttumors

ausmacht. Laut Richtlinien des Hercep-Tests sind allerdings Präparate mit einem Score von 1+ als negativ zu werten. Die einzeln vergebenen Scores sind jeweils tabellarisch zusammengefasst.

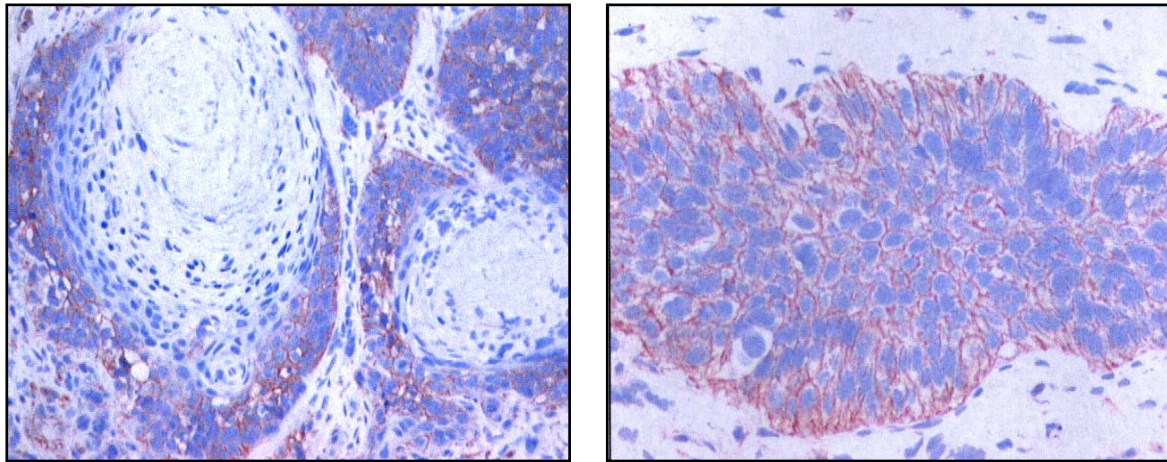
#### 4.4.1.2.1 Plattenepithelkarzinome (SCC)

Laborinterne Bezeichnung	Histopathologische Diagnose	TNM-Klassifikation	Grading	Hercep Score
SCC 01	Schwach verhornendes, niedrig differenziertes, zentrales PE- Ca d. re. OL	pT4 N1 MX	G3	2+
SCC 02	Mäßig differenziertes teilnekrotisches verhornendes PE Ca d. re. UL	pT2 N0 MX	G2	1+
SCC 03	Mäßig differenziertes, nicht verhorn. PE Ca d. UL	pT2 N1 MX	G2	1+
SCC 04	Mittelgradig differenziertes PE Ca d. re ML	pT3 N0 MX	G2	3+
SCC 05	Mittelgradig differenziertes, schwach verhornendes PE Ca d. ML	pT2 NX MX	G2	2+
SCC 06	Peripheres schwach verhorn. PE Ca d. re. OL			1+
SCC 07	Unreifes, herdförmig nekrotisches PE Ca mit klarzelligen Abschnitten ohne Verhornung	pT1 NX MX	G3	1+
SCC 08	Mittelgradig differenziertes, nicht verhornendes PE Ca in Peripherie d. re. OL	pT2 N0 MX	G2	1+
SCC 09	Zentrales, schwach verhorn. PE Ca d. re. UL	pT2 N0 MX		0
SCC 10	Mäßig bis wenig differenziertes PE Ca d. re OL	pT2 N1 MX	G3	1+
SCC 11	Aufgedehntes, zentr. nekrot. zerfallenes Fremdgewebe; helle polygon. Zellen e. basalzell. PE Ca: 1e mit stärker basalzell. Komponente mit ausgeprägter Verhornungstendenz			2+

**Tabelle 19:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit CD44-Antikörper an insgesamt 11 Plattenepithelkarzinomen (SCC).

### Immunhistochemische Färbung mit monoklonalem CD44-Antikörper

#### SCC 11

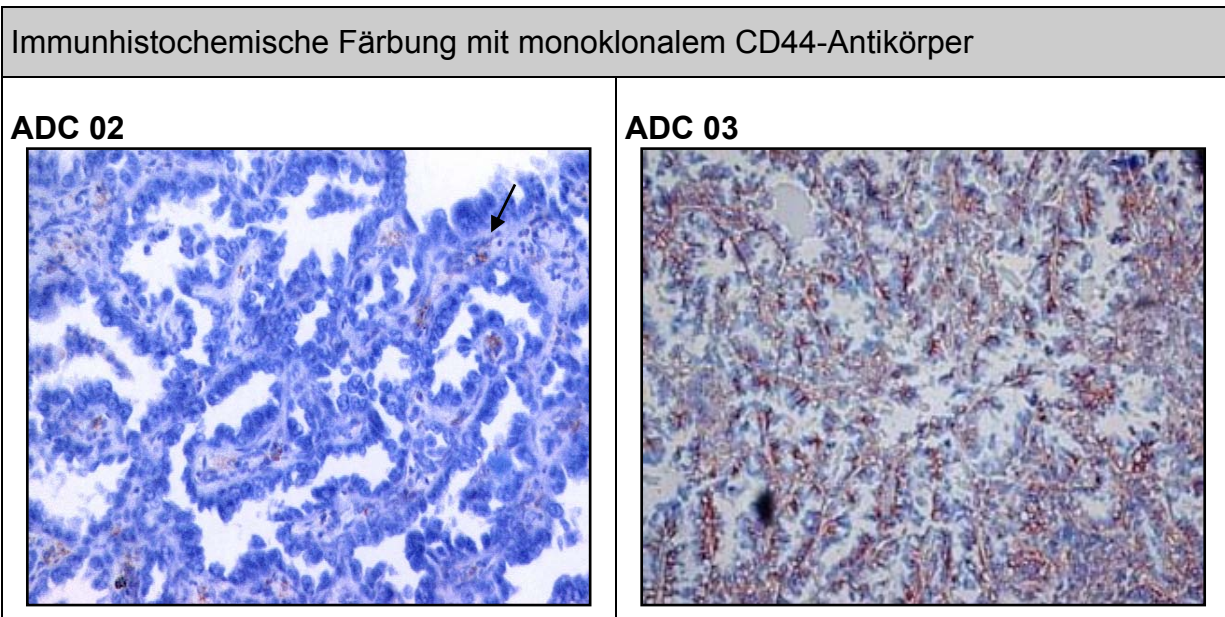


**Abbildung 18:** Basalzelliges Plattenepithelkarzinom mit ausgeprägter Verhornungstendenz: auffallend die typisch basaloide Formation mit hellen polygonalen Zellen im re. Bild. Links gut sichtbar die palisadenartige Anordnung der Tumorzellen mit zentraler Ansammlung von Keratin. Die Membranfärbung mit CD44-Antikörper zeigt eine herdförmige, mäßig positive Verteilung im nicht-verhornenden Bereich des Tumors; stellenweise erscheinen die Membranen vollständig gefärbt (s. rechts). Im verhornenden Anteil kommt es zu einem Verlust der Membrananfärbung von außen nach innen (links). Hercep-Score: 2+.

#### 4.4.1.2.2 Adenokarzinome (ADC)

Laborinterne Bezeichnung	Histopathologische Diagnose	TNM-Klassifikation	Grading	Hercep Score
ADC 01	Vornehmlich papillär differenziertes Adeno Ca d. re. OL	pT2 N2 MX	G2	0
ADC 02	Peripheres mäßig differenz. Adeno Ca mit bronchiolo-alveol. Komponente d. li. UL	pT1 N0 MX	G2	0
ADC 03	Hoch differenziertes Adeno Ca d. re. UL	pT1 N0 MX	G1	3+
ADC 04	Peripheres partiell verschleimendes Adeno Ca d. li. OL	pT1 N0 MX	G2	0
ADC 05	Relativ hoch differenziertes, peripheres Adeno Ca d. re. OL	pT1 N0 MX	G1-2	0
ADC 06	Gering differenziertes Adeno Ca d. li UL	pT2 N2 MX	G3	0
ADC 07	Mittelgradig differenziertes Adeno Ca			1+
ADC 08	Mäßig differenziert., teilnekrot., herdförmig verschleimendes Adeno Ca d. li. OL	pT1 N0 MX	G2	0
ADC 09	Adenosquamöses Ca d. re OL	p2 N0 MX	G3	1+
ADC 10	Teils tubulo- alveolär-, teils solide gestaltetes Adeno Ca d. re. UL	pT2 N0 MX	G2-3	1+

**Tabelle 20:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit CD44-Antikörper an insgesamt 10 Adenokarzinomen (ADC).



**Abbildung 19:** Zwei Beispiele einer immunhistochemischen Färbung mit CD44 an Adenokarzinomen der Lunge. Im Bild links ein mäßig differenziertes ADC mit bronchioloalveolärer Komponente, das CD44-negativ erscheint: es erhält den Hercep-Score 0. Als endogene Positivkontrolle dienen die rot gefärbten, einzeln liegenden Entzündungszellen (schw. Pfeil). Hier nicht zu sehen eine mäßiggradige Färbung von Tumorstroma. Im rechten Bild ist ein hoch differenziertes ADC zu sehen, in dem sich neben einer intensiven Stromareaktion ein Hercep-Score von 3+ diagnostizieren lässt.

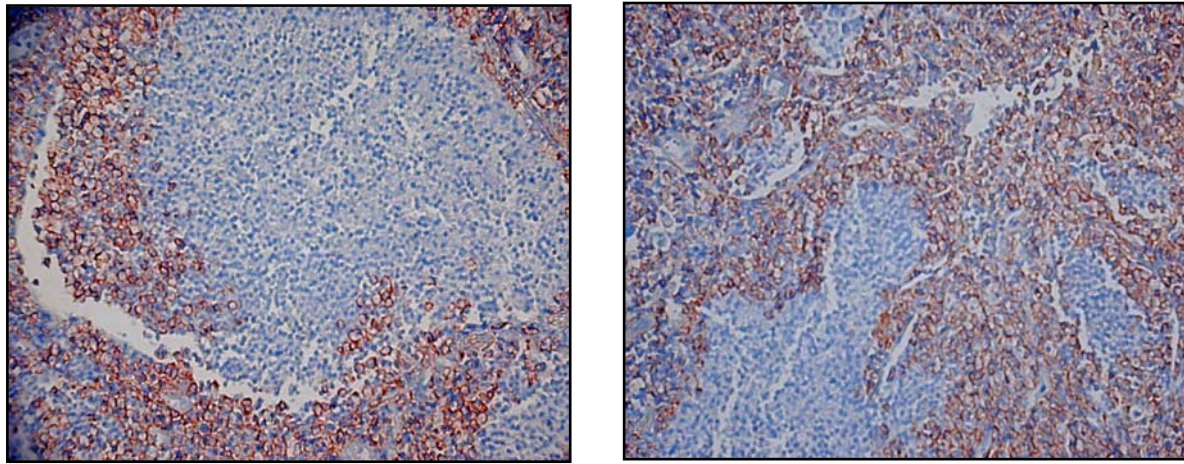
#### 4.4.1.2.3 Großzellige Karzinome (LCC)

Laborinterne Bezeichnung	Histopathologische Diagnose	TNM-Klassifikation	Grading	Hercep-Score
LCC 01	Ausgedehntes solid wachsendes groß-, herdförmig auch hellzelliges Ca d. linken Lunge	pT3 (4?) N0 MX	G4	3+
LCC 02	Solide wachsendes großzelliges Ca d. li. OL	pT2 N0 MX	G4	0
LCC 03	Peripher gelegenes, gering differenziertes großzelliges Ca, am ehesten einem gering diff. Adeno Ca entsprechend mit pseudozystischer Umwandlung; lokalis. li. Lunge	pT2 N0 MX		0
LCC 04	Fortgeschrittenes großzelliges Ca d. li. OL	pT2 N1 MX		1+
LCC 05	Groß- und polymorphzelliges Ca mit squamöser Komponente i. re. OL	pT2 n0 MX	G3	1+

**Tabelle 21:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit CD44-Antikörper an insgesamt 5 großzelligen Bronchialkarzinomen (LCC).

## Immunhistochemische Färbung mit monoklonalem CD44-Antikörper

## LCC 01



**Abbildung 20:** Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem ausgedehnten, solide wachsenden großzelligen, herdförmig auch hellzelligen Lungenkarzinom. Auffallend hier das heterogene Färbemuster mit bevorzugter Anfärbung exzentrisch gelegener Tumorzellen. Ermittelter Hercep-Score: 3+.

## 4.4.1.2.4 Differentielle CD44-Expression innerhalb varianter/heterogener Kleinzeller

Laborinterne Bezeichnung	Histopathologische Diagnose	Hercep-Score
vSCLC 01	Teilnekrotisches, teilweise kleinzelliges, teilw. nicht verhornendes, undifferenziertes plattenepitheliales Karzinom d. rechten OL; p T2 N0 MX G3-4	SCLC: 0 SCC: 1+
vSCLC 02	Kleinzelliges Karzinom mit Anteilen eines geringgradig differenzierten Adenokarzinoms	SCLC: 0 SCC: 2+
vSCLC 03	Kleinzelliges Karzinom mit Ansätzen eines papillären Frühkarzinoms v. plattenepithel. Typ; reaktiv hyperplastisches Plattenepithel mit massiver Entzündung	SCLC: 0 SCC: 2+
vSCLC 04	Kleinzelliges Karzinom mit plattenepithel.-großzelliger Komponente mit ungewöhnlich zwiebelschalenartigen Verkalkungs- u. Verhornungsstrukturen; teilweise hoch ausgereifte plattenepitheliale Strukturen	SCLC: 0 SCC: 2+
hSCLC 01	Kleinzelliges Karzinom mit Pleomorphie der Zellen und Nekrosetendenz; langstreckige, partiell dysplastische Plattenepithelmetaplasien	SCLC: 0 SCC: 3+
hSCLC 02	Teilnekrotisches, teilweise kleinzelliges, teilw. nicht verhornendes, undifferenziertes plattenepitheliales Karzinom d. rechten OL; p T2 N0 MX G3-4	SCLC: 0 SCC: 1+

**Tabelle 22:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit CD44-Antikörper an vier echten Mischtumoren (vSCLC) und zwei heterogen differenzierten kleinzelligen

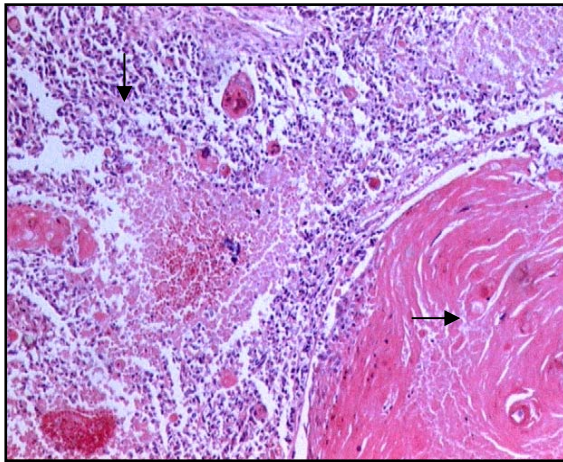


Bronchialkarzinomen (hSCLC). In der Spalte rechts wird ersichtlich, dass der kleinzellige Anteil des Mischtumors durchweg CD44-negativ erscheint. Im Gegensatz dazu lässt sich dieses im jeweils nichtkleinzelligen Abschnitt in unterschiedlicher Quantität und Intensität nachweisen.

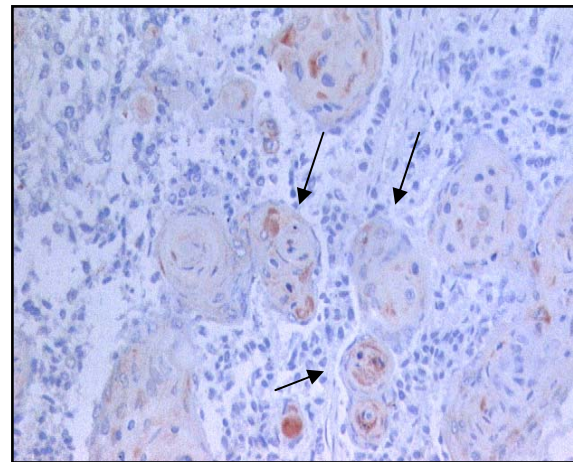
In den folgenden Abbildungen werden die zwei Anteile eines Mischtumors einander gegenüber gestellt und erläutert. Die zwei heterogen differenzierten Tumoren, d.h. die Kleinzeller, die zusätzlich lediglich plattenepitheliale Strukturen (im Sinne einer Metaplasie als mögliches Vorläuferstadium eines invasiven Karzinoms) enthalten, zeigen eine vergleichbar differente Verteilung des CD44-Rezeptors. Der klassisch kleinzellige Tumorteil wird jeweils mit einem Hercep-Score von 0 beurteilt; die jeweils nichtkleinzellige Komponente zeigt sich positiv.

## Immunhistochemische Färbung mit monoklonalem CD44-Antikörper

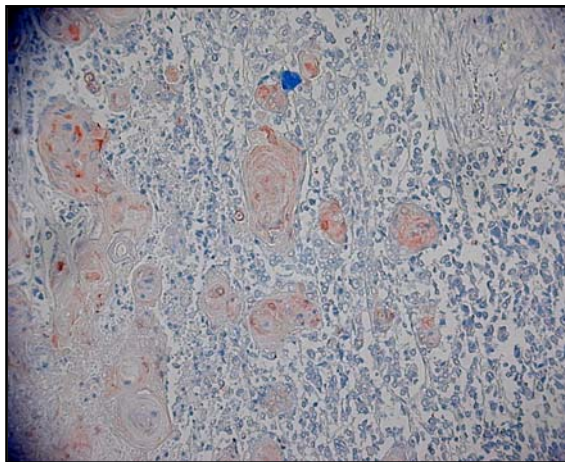
## vSCLC 04



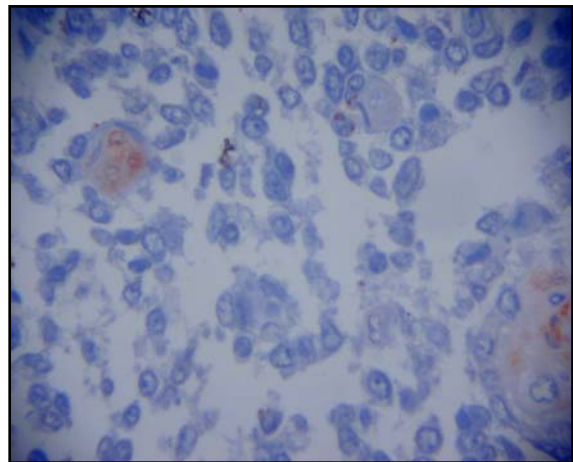
**A: HE-Färbung:** Es zeigen sich zwei verschiedene Histologien innerhalb eines Tumors. Li. im Bild der klassisch-kleinzellige Anteil (↓) mit den typischerweise dicht gepackten kleinen Tumorzellen und wenig Stroma. Im Bild rechts dem plattenepithelial-großzelligen Tumorteil zugehörige Keratinmassen (→).



**B: CD44-Färbung:** Mittig befinden sich die für Plattenepithelialkarzinome kennzeichnenden konzentrisch geschichteten Zellen mit zentral eingemauertem Keratin (↖). Deutlich sichtbar der differenzielle Nachweis für CD44: Ausschließlich Bestandteile des Plattenepithelialkarzinoms erscheinen positiv gefärbt. Details s. Bilder C/ D



**C:** Andere Einstellung innerhalb desselben Tumors: Offensichtliche Verteilung des CD44-Rezeptors im nichtkleinzelligen Tumorsegment.

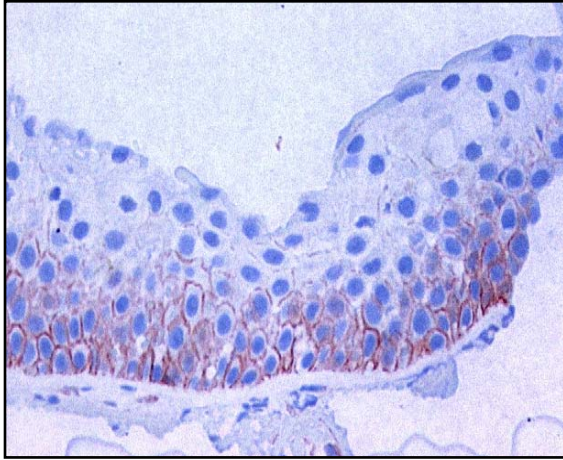


**D:** Der klassisch-kleinzellige Tumorteil zeigt bei höherer Auflösung keinen Hinweis einer Membranfärbung für CD44.

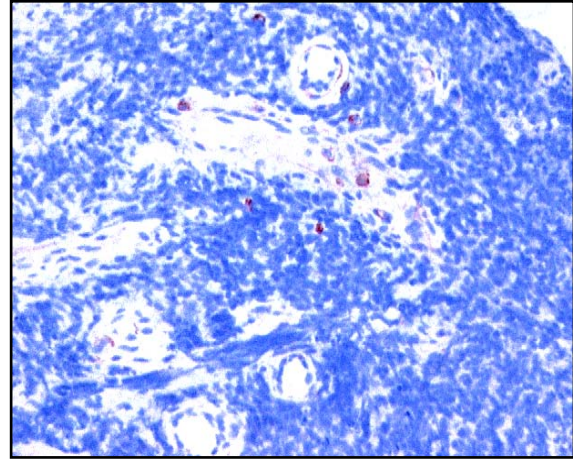
**Abbildung 22:** Immunhistochemischer Nachweis von CD44 in varianten kleinzelligen Bronchialkarzinoms am Beispiel von vSCLC 04. Der ausgewählte Tumor ist diagnostiziert als ein kleinzelliges Karzinom der Lunge mit einer plattenepithelialen-großzelligen Komponente mit ungewöhnlichen zwiebelschalenartigen Verkalkungs- und Verhornungsstrukturen. Teilweise finden sich hoch ausgereifte plattenepitheliale Strukturen. Einzig im plattenepithelialen Abschnitt kann CD44-Expression nachgewiesen werden; die Farbintensität wird mit einem Hercep-Score von 2+ beurteilt.

## Immunhistochemische Färbung mit monoklonalem CD44-Antikörper

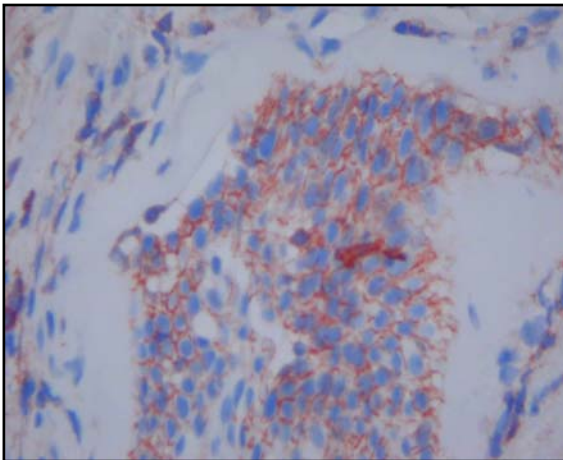
## hSCLC 01



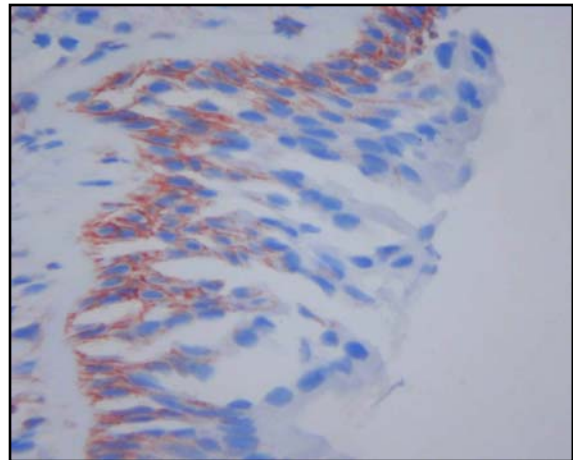
**A:** Beispiel eines gelungenen CD44-Nachweises: typisches Muster in Form einer Membranfärbung. Der gezeigte Ausschnitt stammt aus dem Präparat hSCLC 01 und zeigt die basalständige Anfärbung des respiratorischen Epithels (= endogene Positivkontrolle).



**B:** Auch in diesem Tumor zeigt sich der klassisch kleinzellige Anteil durchweg negativ für CD44. Hercep-Score: 0



**C:** Ausschnitt aus einer im Tumor befindlichen Plattenepithelmetaplasie; interessanterweise kann hier, im Gegensatz zum kleinzelligen Tumor der Nachweis für CD44 erbracht werden.

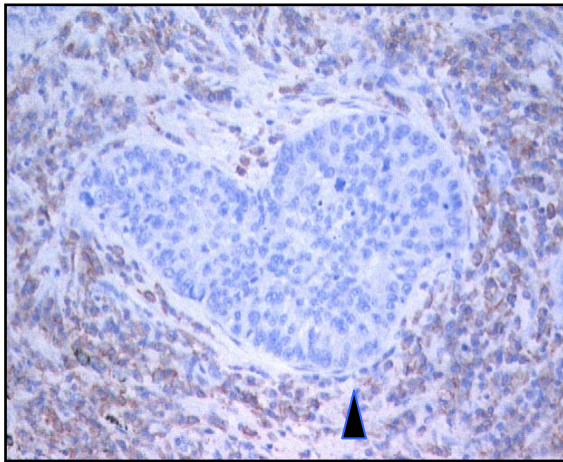


**D:** Anschnitt einer Plattenepithelmetaplasie: stark positive Reaktion in basalen Zellschichten, die sich nach apikal hin verliert. Der Hercep-Score beträgt 3+.

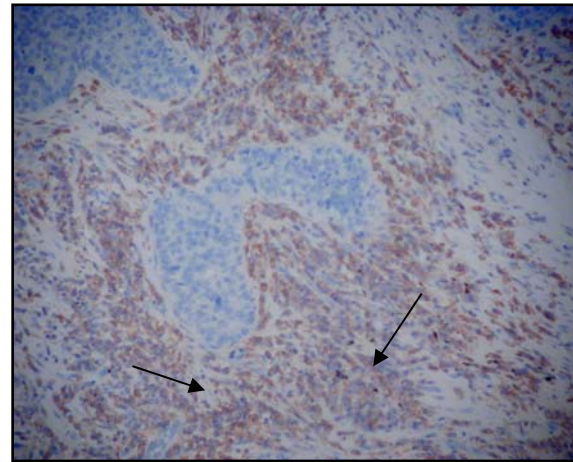
**Abbildung 23:** Verschiedene Ausschnitte aus einem heterogen differenzierten kleinzelligen Tumor, die wiederum keine CD44-Färbung im klassisch kleinzelligen Tumoranteil, dafür jedoch in den konsekutiv vorhandenen Plattenepithelmetaplasien, die Vorläuferstadien eines Karzinoms sein können, aufweisen.

## Immunhistochemische Färbung mit monoklonalem CD44-Antikörper

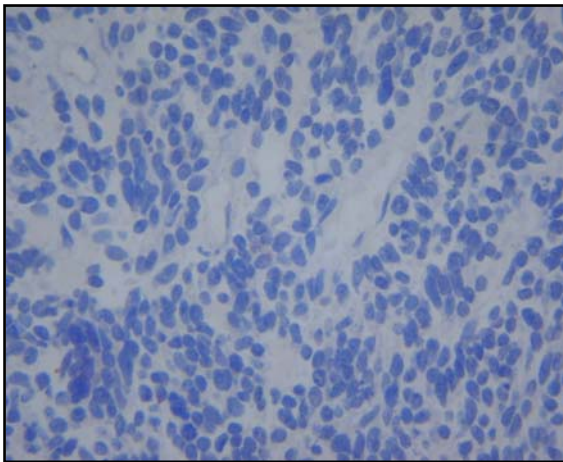
## vSCLC 02



A



B



C

**Abb. 23:** Ansichten aus einem Misch tumor mit klassisch-kleinzelligem Anteil und einem geringgradig differenzierten Adenokarzinom. In **Abb. A u. B** sieht man den Kleinzeller inselförmig eingebettet in umgebendes Gewebe (▲). Die Tumorzellen sind allesamt negativ für CD44 (Hercep-Score = 0), wohingegen in **Abb. B** vereinzelt adenoide Strukturen des Tumors erkennbar sind, die eine intensive Membranfärbung zeigen (↗) (Hercep-Score = 2+). Nebenbefundlich zahlreiche Histozyten u. Entzündungszellen. **Abb. C** zeigt noch einmal den kleinzelligen Anteil in höherer Auflösung.

**Abbildung 24:** Zusammenstellung verschiedener Ausschnitte eines Mischtumors der Lunge (hSCLC 02) nach Färbung mit CD44-Antikörper.

#### 4.4.2 Synaptophysin und Chromogranin als typische SCLC-Marker geeignet zur Unterscheidung neuroendokriner Anteile in Primärtumoren?

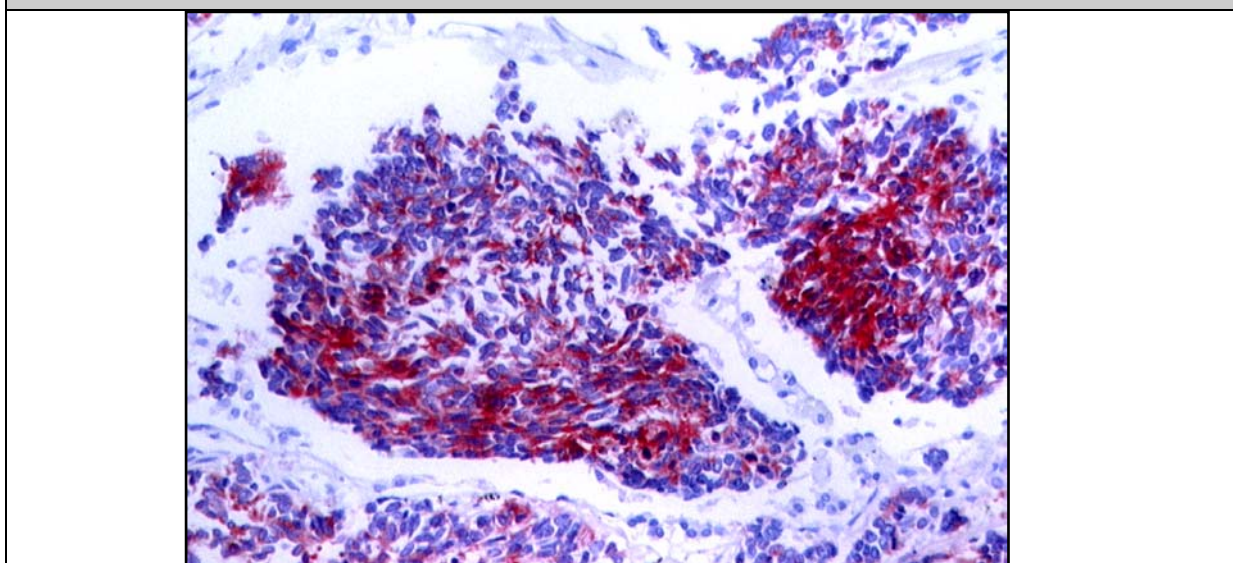
Chromogranin A und Synaptophysin werden in der Literatur als typische Marker für das klassisch kleinzellige Bronchialkarzinom beschrieben. In unserem Modell fand sich auf immunhistochemischer Ebene an einer kleinen Auswahl von Tumoren ebenfalls ein differenzieller Effekt: keiner der fünf Nichtkleinzeller zeigte positive Färbungen für Synaptophysin oder Chromogranin. Die positiv gefärbten Präparate werden mittels Immunoreaktivem Score (IRS) quantifiziert. So färbten sich für Synaptophysin zwei der fünf

klassischen Kleinzeller positiv, wovon in einem Fall ein IRS von 9, im anderen Fall von 8 vergeben wird; für Chromogranin A war lediglich einer von fünf soliden Tumoren positiv. Bei den heterogen differenzierten Kleinzellern verhält es sich ähnlich: zwei von sechs zeigten Reaktivität für Synaptophysin, nur einer von 6 war positiv für Chromogranin A. Interessanterweise war hier allerdings nur die klassisch kleinzellige Komponente der Tumoren angefärbt, nicht jedoch der jeweils nichtkleinzellige Anteil.

	Synaptophysin	Chromogranin A
<b>Klassische SCLC</b>	2/5	1/5
<b>IRS</b>	1 x 9; 1 x 8	1 x 3
<b>„Variante“ SCLC</b>	2/6	1/5
<b>IRS</b>	1 x 6; 1 x 2	1 x 2
<b>Plattenepithelkarzinome</b>	0/3	0/3
<b>Adenokarzinome</b>	0/1	0/1
<b>Großzellige Karzinome</b>	0/1	0/1

**Tabelle 23:** Ergebnisse einer kleinen Auswahl von Tumorschnitten, untersucht mit neuroendokrinen Markern. Der Immunoreaktive Score (IRS) nach Remmele/Stegner (1987) bezeichnet das Produkt aus Farbintensität (0-3) und Anzahl gefärbter Zellen (0-4). Er eignet sich zur Beurteilung intrazellulärer Färbungen. Es kann ein Maximalwert von 12 erreicht werden.

#### Immunhistochemische Färbung mit monoklonalem Synaptophysin-Antikörper



**Abbildung 3:** Immunhistochemischer Nachweis von Synaptophysin in einem klassischen Kleinzeller. Hier findet sich im Gegensatz zur CD44-Färbung eine intrazelluläre Farbverteilung. Starke Anfärbung einer großen Zahl von Tumorzellen (50-80% aller Zellen) ergibt einen IRS von  $3 \times 3 = 9$ .

## 5 Diskussion

Die Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms stellt den Kliniker vor eine besondere Problematik, da es nicht nur früh metastasiert, sondern in der Mehrheit der Fälle innerhalb von 3-12 Monaten nach Abschluss einer initial hochwirksamen Polychemotherapie rezidiert und sich in aller Regel einer weiteren Chemotherapie aufgrund sekundärer Resistenz entzieht. Histopathologische Untersuchungen von Rezidivtumoren zeigen ein gehäuftes Vorkommen sog. „varianter“ Anteile, die sich durch einen Nichtkleinzeller-ähnlichen Phänotyp und einen Verlust ihrer neuroendokrinen Differenzierung auszeichnen (56). Klinisch zeigen variante Kleinzeller eine verstärkte Metastasierungstendenz (16), die sich auch auf experimenteller Ebene reproduzieren ließ (71). Darüber hinaus konnte in varianten Zelllinien eine Hemmung Zytostatika-induzierbarer Apoptose in Korrelation mit der Unterexpression des Gens CC3 nachgewiesen werden (72).

Der eigentliche Prozess der Transdifferenzierung, d.h. die Auslöser und Mechanismen, die die Entwicklung varianter Tumoranteile initiieren oder sekundäre Chemoresistenz triggern, blieb bislang unerforscht, da ein geeignetes Zellkulturmodell nicht verfügbar war.

Zwar beobachteten bereits Goodwin et al. im Jahre 1982 eine spontane Morphologieänderung der in Kultur gehaltenen Kleinzellerlinie OH-1, die mit einem Verlust neuroendokriner Expression einherging, allerdings blieben sie eine molekularbiologische Erklärung damals schuldig (73).

Die spontane Transdifferenzierung dreier Zelllinien vom Suspensionstyp in einen adhären wachsenden Typ während routinemäßiger Zellkulturpassagen bildet den Ausgangspunkt für die Entstehung dieser Arbeit. Detaillierte Charakterisierung der Zellen auf sowohl Gen- als auch Proteinebene im Rahmen der hier durchgeführten experimentellen Analyse weist ein differentielles Expressionsmuster neuroendokriner und epithelialer Marker in adhären versus Suspensionszellen nach.

Im Umkehrschluss findet zumindest in Ansätzen eine Form der Rückdifferenzierung in den Zellen statt, wenn man ihnen die Adhärenz entzieht, d. h. in die Suspensionsform „zwingt“.

Weiteren Untersuchungen zufolge geht zelluläre Adhärenz mit einer erhöhten Chemo- und Radioresistenz sowie einer verstärkten Aktivität Apoptose-inhibierender Faktoren einher. Im letzten Schritt wurde der Versuch unternommen, den Prozess der Transdifferenzierung *in vivo* nachzuvollziehen. Hier konnten erste Hinweise für eine dem Zellkulturmodell entsprechende Verteilung des Markers CD44 in soliden Tumoren gefunden werden.

## **5.1 Adhärenz – erster Schritt in Richtung vSCLC?**

Erst die Etablierung adhärenter Kleinzellerlinien macht eine vergleichende Untersuchung mit den Ausgangszelllinien unter definierten Bedingungen möglich. Begünstigend für die spontane Adhärenz zunächst einzelner, später vieler Zellen innerhalb der Suspensionskultur scheinen suboptimale Kulturbedingungen wie seltenerer Mediumwechsel oder hohe Zelldichte zu sein. Während der weiteren Subkultivierung der adhärenen Zellen in eigenen Kulturflaschen kommt es in allen drei Linien zur kontinuierlichen Adhärenz der Zellen mit epithelartigem Aussehen, besonders ausgeprägt in der Linie N592. Auch für die aus einem varianten Kleinzeller isolierte Linie H82 sus kann eine adhärenente Wuchsform erzeugt werden. Die Linie H82 zeigt jedoch im Vergleich mit den klassisch kleinzelligen Linien H69 und N592 einige Besonderheiten.

## **5.2 Entsprechen adhärenent wachsende SCLC-Kulturen dem morphologisch beschriebenen vSCLC-Typ?**

### **5.2.1 Adhärenente Zellen verlieren ihre neuroendokrinen Eigenschaften**

Die morphologische Veränderung der klassischen Kleinzellerlinien lässt vermuten, dass auch andere Zelleigenschaften, sei es ursächlich oder als Folge der Transformation verändert sein können. Carney *et al.* unterschieden vier morphologische Gruppen, die den Übergang von der Suspensionszelle zu Aggregaten zusammengeballt mit/ohne Nekrose über die locker adhärenen Zellhaufen bis hin zur fest adhärenen Zelle demonstrieren (40). Die Subgruppen untersuchte er auf die Expression verschiedener biochemischer Marker und stellte fest, dass die Gruppe neuroendokriner Marker (LDD, BLI, NSE, CK-BB) in den klassisch kleinzelligen Linien stärker exprimiert werden als in den varianten oder den Nichtkleinzellern und somit zur Differenzierung der klassischen Kleinzeller von beiden letztgenannten Gruppen herangezogen werden können (40). Auf dieser Grundlage erfolgte bereits im Jahre 1985 auf Zellkulturebene die Einteilung der Kleinzeller in eine klassische und eine variante Form (40;56).

In den verwendeten Linien kann in Übereinstimmung mit den Daten von Carney *et al.* einerseits sowie von Gazdar *et al.* andererseits ein Verlust der neuroendokrinen Expressionsmarker in den varianten Linien dargestellt werden. Wie bei Gazdar kommt es zu einem vollständigen Verlust von L-Dopa-Decarboxylase in der Linie N592 ad, zu einem partiellen Verlust in den Linien H69 ad und H82 ad. Zusätzlich findet sich in eine nachlassende Expression von Chromogranin und Synaptophysin, zwei der klassischen

Kleinzeller-Marker sowie NSE, Bombesin und c-kit. Für L-Dopa-Decarboxylase kann dieser Verlust exemplarisch auch auf Proteinebene gezeigt werden.

Darüber hinaus zeigen die adhärenen Linien Eigenschaften, die als charakteristisch für die nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome gelten.

### 5.2.2 Welche NSCLC-Eigenschaften besitzen adhärenente SCLC-Zellen?

In RT-PCR-Analysen zeigt sich eine Hochregulation typischer Adhärenz-Marker, die sich sonst nur in den Nichtkleinzellern nachweisen lassen. Dazu gehören u .a. Thrombospondin, Endothelin, Axl, Cyclin D1, CD44 und einige Vertreter der Integrinfamilie ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_1$ ).

Durch Western Blot und FACS-Analysen ist belegbar, dass die veränderte Genexpression nicht auf Ebene der Transkription stehen bleibt, sondern in der Konsequenz zu einem Verlust (im Fall von L-Dopa-Decarboxylase (s.o.)) bzw. Zugewinn des entsprechenden Genprodukts (= Protein) in diesen Zellen führt. Mittels Western Blot lässt sich eine verstärkte Expression von CD44 in den adhärenen Zellen verglichen mit den Ursprungszelllinien ermitteln. In gleicher Weise bestätigt die FACS-Analyse gestiegene Integrin- $\beta_1$ -Level in den adhärenen Linien.

Zusammenfassend lässt sich eine mit der Genexpression kongruente Proteinexpression in den adhärenen Zellen gegenüber den Ausgangszelllinien belegen. Geringe Unterschiede in der Ausprägung des differentiellen Effekts können auf technischen Ursachen der Nachweismethode beruhen oder auf eine unvollständige Translation des entsprechenden Genabschnitts hindeuten.

### 5.2.3 Zeitliche Latenz Adhärenz-abhängiger Prozesse

Die über einen Zeitraum von vielen Monaten persistierende Adhärenz der Zellen kann aufgehoben werden, indem man den Zellen das Substrat für die Anheftung (die Poly-L-Lysin Beschichtung simuliert ECM) entzieht: Auf unbeschichteten Kulturschalen kommt es innerhalb weniger Tage in allen drei Linien zu einem Verlust der Adhärenz und zu einer morphologischen Rückdifferenzierung der Zellen von ihrem epithelartig verzweigten Aussehen zurück zu der Suspensionszellenmorphologie. Innerhalb eines definierten Zeitraumes von 15 Tagen kann neben der phänotypischen „Regression“ zumindest eine beginnende bzw. partielle biochemische Rückdifferenzierung beobachtet werden.

In der Linie N592 scheint die Fähigkeit zur reellen Rückdifferenzierung mit einer Reexpression von L-Dopa-Decarboxylase sowie einem deutlichen Verlust der Expression des CD44-Rezeptors und des Integrintyps  $\beta_1$  am stärksten ausgeprägt zu sein.



Am Tag 15 finden sich ein Abfall der CD44-Expression von knapp 19 % und ein Verlust von fast 34 % der Integrin- $\beta_1$ -Expression.

Für die anderen Linien lässt sich kein einheitliches Muster der Redifferenzierung aufzeigen; in der Linie H69 kommt es neben verstärkter L-Dopa-Decarboxylase-Expression innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu einem Verlust von mehr als 13 % der Menge an Integrin  $\beta_1$ , nicht hingegen von CD44.

Im Gegensatz dazu findet sich für die Linie H82 zusätzlich zur Reexpression von L-Dopa-Decarboxylase ein geringer Verlust von ca. 4 % der Integrin- $\beta_1$ -Menge.

Ursächlich für die Diskrepanz der einzelnen Zelllinien untereinander scheinen auf den für jede Linie charakteristischen Eigenschaften zu beruhen.

Die Tatsache, dass allein die Linie N592 zu den gemessenen Zeitpunkten bereits ein homogenes Muster im Sinne einer im Gange befindlichen bzw. bereits vollzogenen Redifferenzierung aufweist, könnte auf die gewählte Zeitperiode von nur 15 Tagen zurückzuführen sein. Da die Zellen über viele Monate hinweg in ihrer adhärennten Wuchsform kultiviert worden sind und sich somit ein breites Spektrum an von Adhärenz abhängigen Prozessen abgespielt und etabliert hat, ist dieser Zeitraum möglicherweise zu kurz, um eine vollständige Rückentwicklung hinsichtlich aller getesteter Marker in allen Linien beobachten zu können. Möglicherweise lassen sich innerhalb dieser Zeitspanne nur die Anfänge dieses Prozesses erfassen oder aber nur solche Parameter, die in schneller Folge auf die entzogene Adhäsion reagieren. Eventuell lässt sich hier eine frühe von einer Gruppe eher langfristig variabler Faktoren unterscheiden. Zu dieser Hypothese würde auch das prompte „Abschalten“ des Akt-Signalweges in den revertierten Zellen passen (s.u.) (163).

#### **5.2.4 Adhärennte Zellen haben eine gesteigerte Chemo- und Radioresistenz**

Nachlassende neuroendokrine Expression, die mit den phänotypischen Veränderungen des Kleinzellers einhergeht, wird als typisches Merkmal des varianten Subtyps beschrieben, die in Korrelation mit einer schlechteren Ansprechbarkeit der varianten Tumoren sowohl auf Chemotherapie als auch auf Bestrahlung steht, was die signifikant schlechtere Prognose und die kürzeren Überlebenszeiten erklärt (44;45;47-49;54).

Untersuchungen der adhärennten Zellen in unserem Modell im Vergleich mit den Eltern- (=Suspensions-) zellen hinsichtlich Chemo- und Radiosensibilität bestätigen diese Ergebnisse (163). Die Linie N592 ad reagiert auf die Applikation von Etoposid mit einer 71.4fach höheren Resistenz als ihr Suspensionspartner. Gegenüber Cyclophosphamid ist die Resistenz 5.6-fach erhöht. Auch die Linie H69 ad zeigt sich um den Faktor 27.5 resistenter auf

Etoposid-Behandlung im Vergleich zu ihrer Herkunftszelle H69 sus (163). Damit ist die Chemoresistenz in diesen beiden Linien höher als die in den von Gazdar/Minna und Carney als variant beschriebenen Zelllinien NCI-H841 und NCI-H82 (40;164).

Die Radiosensitivität war in den adhärennten Linien von sowohl N592 als auch H69 reduziert. So sind am dritten Tag nach Radiatio bei 8 Gray von N592 ad noch fast 83.6% der Zellen vital im Vergleich zu 58.4% der Suspensionszellen. Die Apoptoserate beträgt 4.5% versus 11.6%. H69 ad weist eine Vitalitätsrate von 71.2% gegenüber 58.9% in H69 sus und eine Rate apoptotischer Zellen von 4.4% versus 7.8% auf (163).

### **5.2.5 Adhärenz-vermittelter Schutz vor Apoptose in den adhärennten Linien ursächlich für gesteigerte Chemo-/Radioresistenz ?**

Die veränderte Expression beschriebener Markergene kann als biochemisches Korrelat für das *in vivo* zu beobachtende aggressivere Verhalten der varianten Kleinzeller im Sinne eines verstärkten Metastasierungspotentials, Chemoresistenz und dem damit verbundenen Schutz vor Apoptose interpretiert werden.

Da die bislang erforschten Modelle zur Chemoresistenz das Verhalten des Kleinzellers nur unzureichend zu erklären scheinen, ist die hohe Aktivität von Akt, einer Proteinkinase, die im Mittelpunkt apoptose-regulierender Signalkaskaden steht, in den adhärennten Linien von besonderem Interesse. Neben einer erhöhten Akt-Aktivität findet sich in allen drei adhärennten Subtypen ein hoher Level phosphorylierten Bad-Proteins (phosphoryliert = inhibiert), das als pro-apoptotisches Mitglied der bcl-2 Familie an der Apoptosekontrolle mitwirkt (163).

Es kann damit ein Zusammenhang zwischen Adhärenz und Chemoresistenz über diesen Signalweg nachgewiesen werden (163). Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit einer von Sethi et al. 1999 vorgeschlagenen *CAM-DR*, einem Adhärenz-vermittelten Schutz vor Apoptose und dadurch verliehenen Chemoresistenz (57). Ob dabei die Integrine, speziell die  $\beta_1$ -Untereinheit wie von Sethi angenommen die zentralen Vermittler dieser Adhärenz auch in unserem Modell sein könnten, bleibt zu prüfen. Da verschiedene Integrine in den getesteten adhärennten Linien ebenso wie die Proteinkinase B hochreguliert sind und man um die Rolle der Integrine als Vermittler von ECM-Signalen ins Zellinnere sowie einen alternativen Aktivierungsweg für Akt via Integrine weiß, scheint dieser Schluss nahe zu liegen. In den in die Suspensionsphase zurückgeführten varianten Klonen zeigt sich außerdem wenige Tage nach Aussaat auf den Schalen ein promptes Abschalten von Akt (163). Im Widerspruch dazu steht allerdings die zunächst nur zögerlich nachlassende Expression von Integrin  $\beta_1$ , die den vollständigen Rückgang der Akt-Aktivität somit nicht erklären kann. Dies lässt eine

Beteiligung weiterer in die Adhärenz involvierter Faktoren an der Regulation des Akt-Pathways vermuten. Um diese Fragen zu klären, könnte beispielsweise ein die Integrinfunktion blockierender Antikörper benutzt werden, um den Einfluss der Integrine auf den Aktivierungszustand der Proteinkinase B zu herauszuarbeiten.

### 5.3 Gibt es Hinweise für eine Transdifferenzierung *in vivo*?

Die Gültigkeit des im ersten Teil der Arbeit formulierten Zellkulturmodells für die Entstehung varianter kleinzelliger Bronchialkarzinome wird beispielhaft durch immunhistochemische Färbungen mit einem gegen die Standardform des Oberflächenrezeptors CD44 gerichteten monoklonalen Antikörper an Tumorgewebe getestet. Sämtliche Präparate mit Normalgewebe färbten sich mit dem benutzten Antikörper an.

Bei den Tumoren ist wie bei Ariza *et al.* und anderen Arbeitsgruppen ein deutlich differentieller Effekt darstellbar: Keiner der klassischen Kleinzeller ist positiv für CD44 (154), wohingegen in 21 von 32 nichtkleinzelligen Karzinomen CD44 nachgewiesen werden kann.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Wimmel *et al.* findet sich die stärkste Immunoreaktivität in Plattenepithelkarzinomen (155). Auf den Differenzierungsgrad der Tumoren lässt die Höhe der CD44-Expression in unserem Modell keinen Rückschluss zu.

Die Gruppe der varianten Kleinzeller weist in sich eine differentielle Verteilung des CD44-Rezeptors auf: Alle echten Mischtumoren werden positiv für CD44 getestet. Dabei finden sich lediglich in der varianten Komponente positiv gefärbte Zellen während der klassisch kleinzellige Abschnitt wie die reinen kleinzelligen Präparate negativ ist.

Darüber hinaus waren beide der zwei heterogen differenzierten Tumoren, d.h. kleinzellige Karzinome mit Plattenepithelmetaplasien, einem potentiellen Vorläuferstadium des invasiven Karzinoms CD44-positiv. Auch hier gelingt der Nachweis in der plattenepithelialen Komponente, nicht jedoch im kleinzelligen Tumor selbst.

Für die neuroendokrinen Marker Synaptophysin und Chromogranin A konnte anhand einer kleineren Serie von Paraffinschnitten kein eindeutiges Bild skizziert werden. Zwar sind die nichtkleinzelligen Tumoren durchweg negativ für beide Marker, jedoch färbt sich auch in den Kleinzellern nur ein geringer Prozentsatz (Synaptophysin: 2/5 und Chromogranin A: 1/5) positiv. In den varianten Kleinzellern verhielt es sich ähnlich: Lediglich einer der 4 echten Mischtumoren und die zwei heterogen differenzierten Tumoren zeigen Immunoreaktivität für Synaptophysin; für Chromogranin je ein Tumor.

Die Untersuchung von in Paraffin eingebetteten Präparaten ist in vielen Fällen der Untersuchung von frisch gefrorenem Gewebe unterlegen, da die Detektion spezieller Antigene durch die Fixierung und Konservierungsprozesse beeinträchtigt werden kann. So ist beispielsweise von Jensen *et al.* an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material in 11 von 14 Präparaten (=79%) eine reduzierte Immunreaktivität für Synaptophysin im Vergleich zu frisch in Ethanol fixiertem Material gezeigt worden (86). Ob für die verwendeten Präparate technische Probleme ursächlich für die geringe Anzahl positiver Präparate war oder de facto keine neuroendokrine Differenzierung vorlag oder eventuell eine höhere „Ausbeute“ mit anderen Kleinzeller-spezifischen Antigenen wie bspw. NCAM zu erzielen ist, bleibt zu prüfen.

Darüber hinaus ist anzumerken, dass die Rekrutierung geeigneter Präparate mit einer Reihe von Problemen behaftet ist. Zunächst waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur eine kleine Anzahl echter Mischtumoren im Sinne der WHO-Klassifikation von 1999 verfügbar. Dies beruht einerseits auf der Tatsache, dass SCLC nicht primär operiert werden. Die Diagnose wird häufig anhand kleiner Stanzbiopsien gestellt; einen größeren Ausschnitt aus dem Tumor ist häufig erst post mortem zu erhalten. Dies begründet wohl auch den relativ höheren Anteil varianter Tumoren in Autopsiematerial (16). Andererseits geht man heute davon aus, dass mehr als 50 % aller Bronchialkarzinome heterogen differenziert sind (15), sodass mit heutigem Kenntnisstand sicherlich von einer höheren Anzahl varianter Kleinzeller unter den bislang als klassisch kleinzellig diagnostizierten Tumoren ausgegangen werden muss.

Darüber hinaus sind teilweise keine speziellen paraffingängigen Antikörper für ein spezielles Antigen verfügbar, sodass manchmal ein direkter Vergleich zwischen Zellkultur und *in vivo* Bedingungen nicht möglich ist (Bsp. L-Dopa-Decarboxylase).

Bekanntermaßen sind über einen längeren Zeitraum in Kultur gehaltene Zellen in der Lage, von ihrem ursprünglichen Typ abzuweichen, sodass sichergestellt werden sollte, ob die Ergebnisse nicht auf einem durch Langzeitpassagen induzierten Artefakt beruhen.

So können diese Ergebnisse als ein erster Schritt für den Transfer der auf Zellkulturebene gewonnenen Daten auf *in vivo*-Verhältnisse gewertet werden.

Um ein detailliertes Bild zeichnen zu können, wäre eine Ausweitung immunhistochemischer Färbungen mit weiteren etablierten Antikörpern für Differenzierungsmarker wünschenswert. Es sollte versucht werden, nach aktueller WHO-Klassifikation weitere echte Mischtumoren zu identifizieren, um eine größere Anzahl varianter Tumoren untersuchen zu können.

Weiterhin wäre eine Gegenüberstellung immunhistochemischer Färbungen mit klinischen Verlaufsdaten des betreffenden Patienten von Interesse, da nur so der Frage nach der Herkunft varianter Kleinzeller suffizient auf den Grund gegangen werden kann.

#### **5.4 Bedeutung und klinische Relevanz**

Da das gefundene differentielle Muster der Expression auf Gen- sowie Proteinebene demjenigen varianter Tumoranteile in soliden Tumoren gleicht, wird die Hypothese eines *in-vitro*-Modells aufgestellt, welches die Variantenentstehung *in vivo* als einen spontanen Prozess versteht, der sich analog zu den suboptimalen Bedingungen in Kultur auch im Innern eines schnellwachsenden Tumors wie dem Kleinzeller, wo hohe Zelldichte und Mangel an Sauer- und Nährstoffen herrschen, vollziehen könnte. Darüber hinaus zeigen die adhärennten Linien mit einer verstärkten Chemoresistenz einerseits, die in Korrelation gebracht werden kann mit erhöhter Aktivität der Proteinkinase B sowie einer verstärkten Radioresistenz andererseits weitere Charakteristika varianter Tumoren *in vivo*.

Ob es allerdings in soliden Tumoren zu einem realen oder nur scheinbaren Differenzierungswandel kommt, darüber besteht in der Literatur bislang keine Einigkeit. Es wird diskutiert, ob nicht bereits vor einer therapeutischen Intervention in vielen Fällen ein heterogen differenzierter Tumor vorliegt, der aufgrund unzureichender histopathologischer Diagnostik oftmals nicht erfasst werden kann (76). Diese Annahme schließt allerdings nicht die These aus, dass es unter Chemotherapie zu einer Selektion des varianten Tumorteils kommen könnte (165;166). Hierfür spricht die Zahl der Patienten, die auch bei der ersten Chemotherapie nur eine partielle Remission erreichen (167).

Andererseits könnte auch die Chemotherapie selbst einen echten Prozess der Umdifferenzierung zur Entstehung eines varianten Kleinzellers in Gang setzen (54). Aufgrund der ausgesprochen großen Heterogenität bösartiger Lungentumoren, die insbesondere auch unabhängig vom Therapieverfahren als primäre Tumorerheterogenität zu beobachten ist, scheint ein tatsächlicher Differenzierungswandel allerdings eher unwahrscheinlich (167).

Die Bedeutung des Verlustes der neuroendokrinen Marker einerseits und die Hochregulierung von in Adhärenzmechanismen involvierten Faktoren andererseits ist für den einzelnen Tumor im Detail nur schwer zu erfassen, da die physiologischen Funktionen z.B. der neuroendokrinen Marker zum Teil noch unbekannt oder widersprüchlich diskutiert werden. Die mit Adhärenz in Verbindung stehenden Marker wie die Integrine und auch der CD44-Rezeptor sind bekanntermaßen an Differenzierungs- und Metastasierungsvorgängen beteiligt (119;131;139-143).

Die nur spärlich vorhandene CD44-Expression in den Suspensionszelllinien könnte darauf hindeuten, dass es bereits in einem frühen Stadium der Entwicklung der Kleinzeller zu einem Verlust eines der Verankerung von Zellen im Gewebe dienenden Proteins (=CD44) gekommen ist und damit die frühe Loslösung und Dissemination der Tumorzellen bis zur Manifestation von Fernmetastasen begünstigt wird. Die andere Möglichkeit ist ein von CD44 gänzlich unabhängiger Metastasierungsprozess, wie er von Ariza *et al.* postuliert wird (154). Gleiches gilt für die Gruppe der Integrine, von denen man weiß, dass ihre Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorprogression unterschiedlich reguliert wird. So könnte die niedrige Expression in den Suspensionzellen die Aussaat der Zellen in die Umgebung unterstützen. Da andererseits für den erfolgreichen Prozess der Metastasierung eine gesteigerte Fähigkeit zur Adhäsion erforderlich ist (119), kann die Hochregulierung der Integrine ebenso wie die von CD44 in den adhären Linien auch als Ausdruck einer verstärkten Metastasierungstendenz der varianten Kleinzeller, so von verschiedenen Autoren beobachtet, gedeutet werden (16). Durch Bindung von Hyaluron an den CD44-Rezeptor wird die Adhäsion und Motilität von Tumorzellen unterstützt und es kommt zur Aktivierung von Genen, die für die Metastasierung notwendig sind (144).

Diese These wird durch den Nachweis von CD44-Isoformen in varianten Kleinzellerlinien im Gegensatz zu den klassischen Linien unterstützt (156).

Diese Arbeit hat dazu beigetragen, das Phänomen der Genese varianter Tumoren anhand eines Zellkulturmodells zu veranschaulichen und damit erklärbar zu machen. Es wurden wichtige Erkenntnisse über verschiedene, mit der morphologischen Transdifferenzierung in Zusammenhang stehenden Zelleigenschaften gewonnen. Dazu gehört die Regulation spezieller Markergene ebenso wie die entstandene Chemoradioresistenz und der Apoptoseschutz, letzteres Inhalt zusätzlicher Arbeiten der Arbeitsgruppe. Mittels Aufhebung der Adhärenz konnte auf beeindruckende Weise die zeitliche Dimension der Transdifferenzierung deutlich gemacht und die unmittelbar durch Adhärenz steuerbaren Faktoren aufgezeigt werden. In einem Experiment von längerer zeitlicher Dauer könnte die Entwicklung von „Langzeitparametern“ weiter verfolgt werden. Außerdem könnte untersucht werden, ob die entstandene Chemo- sowie Radioresistenz der adhären Zellen im Umkehrschluss mit nachlassender Akt-Aktivität – wie es nach unserer Hypothese zu erwarten wäre – abnimmt. Dies wäre besonders im Hinblick auf mögliche therapeutische Interventionen ein interessanter Aspekt, da sich hier die Möglichkeit bietet, über den Einsatz

bestimmter pharmakologischer Substanzen („Sensitizer“) Tumoren wieder sensibel gegenüber Chemotherapeutika bzw. Bestrahlung zu machen.

## 6 Zusammenfassung

Bronchialkarzinome stellen eine Gruppe heterogen differenzierter Tumoren dar. Insbesondere die Untergruppe der kleinzelligen Karzinome ist aufgrund der Entwicklung sekundärer Resistenz im Rahmen der Behandlung durch Chemotherapie mit dem Stigma einer inkurablen Erkrankung behaftet. Die Resistenz korreliert mit dem Nachweis varianter Zellen in histopathologischen Untersuchungen, die einen Verlust ihrer neuroendokrinen Differenzierung erlitten haben.

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen, die auf die Entwicklung eines *in-vitro*-Modells, das die Pathogenese varianter Tumoren *in vivo* erklären könnte, abzielten, war die Beobachtung einer spontanen Transdifferenzierung dreier klassisch kleinzelliger Bronchialkarzinomlinien von der typischen Suspensionsform in einen adhärenenten Typ. Die morphologische Transdifferenzierung führte in den betreffenden Linien zu einer Konformationsänderung der Zellen in einen eher epithelialen Typ. Durch die detaillierte Charakterisierung dieser Varianten auf sowohl Gen- als auch Proteinebene stets im Vergleich mit den Ursprungslinien ließen sich die „Begleiterscheinungen“ des Transdifferenzierungsprozesses aufzeigen: Es resultierte ein Verlust verschiedener neuroendokriner Markergene (L-Dopa-Decarboxylase, Chromogranin A, Synaptophysin etc). Konsekutiv kam es in den adhärenenten Linien zu einem Zugewinn von ansonsten in Nichtkleinzellern vertretenen Genprodukten (CD44, Integrine, Thrombospondin).

Des Weiteren wurde die prinzipielle Reversibilität dieses Transdifferenzierungsprozesses überprüft, indem in einem zeitlich definierten Zwei-Punkt-Experiment die Adhärenz aufgehoben wurde. Es konnte eine teils ausgeprägte, teils unvollständige oder noch in Anfängen befindliche Rückdifferenzierung der adhärenenten Zellen in Richtung Suspensionszelle beobachtet werden. Am deutlichsten trat dieser Effekt in der Linie N592 zutage, die sich durch ausgeprägte Adhärenz auszeichnete. Zu zeigen war ein Anstieg der Expression für L-Dopa-Decarboxylase und ein leichtes Absinken der CD44-Expression. Integrin  $\beta_1$  sank in etwas stärkerem Maße ab. Auch in den beiden anderen Linien fanden sich Ansätze einer zumindest partiellen Rückdifferenzierung.

Im letzten Schritt wurde der Versuch unternommen, die Erkenntnisse des zuvor postulierten Zellkulturmodells auf Mischtumoren von Bronchialkarzinomen zu übertragen. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen für den bewährten Differenzierungsmarker CD44 an paraffin-konservierten Lungentumoren durchgeführt. Es zeigte sich eine dem *in-vitro*-Modell ähnliche Verteilung des Oberflächenrezeptors innerhalb der Untergruppen der Bronchialkarzinome: Sämtliche klassische kleinzellige Tumoren waren negativ für diesen



Oberflächenrezeptor, wohingegen 65,5% aller NSCLC eine CD44-Immunoreaktivität aufwiesen. Für eine kleine Auswahl echter kombinierter (varianter) Kleinzeller konnte ein differentielles CD44-Verteilungsmuster innerhalb desselben Präparates gefunden werden. So färbte sich ausschließlich der jeweils enthaltene nichtkleinzellige Tumoranteil an, während der Kleinzeller selbst negativ war. Dies galt ebenso für die zwei heterogen differenzierten Tumoren, die als zusätzliche Komponente lediglich plattenepitheliale Metaplasien als potentiell Vorläuferstadium eines invasiven Karzinoms enthielten.

Diese Arbeit hat dazu beigetragen, den Prozess der spontanen Variantenentstehung unter *in-vitro*-Bedingungen gezielt zu charakterisieren und detailliert die Veränderungen in den Linien zu beschreiben. Die vorliegenden Ergebnisse können in Zusammenschau mit in der Arbeitsgruppe vorgenommenen Untersuchungen zur erhöhten Chemoradioresistenz und zur verstärkten Aktivität von Apoptoseinhibitoren dazu helfen, ein Modell für die Entstehung varianter Kleinzeller *in vitro* zu beschreiben. Die Übertragbarkeit dieses Erklärungsmodells für die Pathogenese varianter Tumoren *in vivo* scheint aufgrund erster immunhistochemischer Daten für CD44 möglich, ist allerdings durch diese Resultate nicht ausreichend zu bestätigen. Insbesondere im Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen für die betroffenen Patienten wäre die Ausweitung von Zellkulturexperimenten auf weitere kleinzellige Linien und die Suche nach geeigneten Differenzierungsmarkern für Untersuchungen an soliden Tumoren wünschenswert, um das Verständnis für die Besonderheiten der varianten kleinzelligen Bronchialkarzinome zu vertiefen und damit letztlich die Behandlungsstrategien zu optimieren.

## 7 Literaturverzeichnis

### Reference List

- (1) Carbone DP. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1997; 24(4):388-401.
- (2) Jahn I, Jockel KH, Ahrens W, Drescher K, Muller KM, Witzko KH. [Results of the epidemiology of lung cancer in females]. *Pneumologie* 1990; 44(1):14-23.
- (3) Kreuzer M, Kreienbrock L, Gerken M, Heinrich J, Bruske-Hohlfeld I, Muller KM et al. Risk factors for lung cancer in young adults. *Am J Epidemiol* 1998; 147(11):1028-1037.
- (4) Mannino DM, Ford E, Giovino GA, Thun M. Lung cancer deaths in the United States from 1979 to 1992: an analysis using multiple-cause mortality data. *Int J Epidemiol* 1998; 27(2):159-166.
- (5) Haugen A, Ryberg D, Mollerup S, Zienolddiny S, Skaug V, Svendsrud DH. Gene-environment interactions in human lung cancer. *Toxicol Lett* 2000; 112-113:233-7.:233-237.
- (6) Hammond EC, Selikoff IJ, Seidman H. Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann N Y Acad Sci* 1979; 330:473-90.:473-490.
- (7) Chan CK, Leung CC, Tam CM, Yu TS, Wong TW. Lung cancer mortality among a cohort of men in a silicotic register. *J Occup Environ Med* 2000; 42(1):69-75.
- (8) Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118(6):1136-1152.
- (9) Gazdar AF. The molecular and cellular basis of human lung cancer. *Anticancer Res* 1994; 14(1B):261-267.
- (10) Muller KM, Nakhosteen JA, Khanavkar B, Fisseler-Eckhoff A. [Bronchopulmonary preneoplasia. Diagnosis using LIFE system and pathology panel of the European Early Lung Cancer Study Group (EELCSG)]. *Pathologie* 1998; 19(5):388-394.
- (11) Roth JA. Molecular events in lung cancer. *Lung Cancer* 1995; 12 Suppl 2:S3-15.:S3-15.
- (12) Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y et al. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 1992; 7(3):445-449.
- (13) Brauch H, Tory K, Kotler F, Gazdar AF, Pettengill OS, Johnson B et al. Molecular mapping of deletion sites in the short arm of chromosome 3 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1990; 1(3):240-246.
- (14) Shields PG, Caporaso NE, Falk RT, Sugimura H, Trivers GE, Trump BF et al. Lung cancer, race, and a CYP1A1 genetic polymorphism. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2(5):481-485.

- (15) Muller KM. [New aspects of lung tumor pathology]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1999; 83:168-83.:168-183.
- (16) Fushimi H, Kikui M, Morino H, Yamamoto S, Tateishi R, Wada A et al. Histologic changes in small cell lung carcinoma after treatment. *Cancer* 1996; 77(2):278-283.
- (17) Gazdar AF. The molecular biology of lung cancer. *Tohoku J Exp Med* 1992; 168(2):239-245.
- (18) Testa JR, Siegfried JM. Chromosome abnormalities in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52(9 Suppl):2702s-2706s.
- (19) Minna JD. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest* 1993; 103(4 Suppl):449S-456S.
- (20) Kalemkerian GP. Biology of lung cancer. *Curr Opin Oncol* 1994; 6(2):147-155.
- (21) Muller KM, Theile A. [Lung tumors. Pathologic-anatomic diagnosis]. *Internist (Berl)* 1994; 35(8):710-723.
- (22) Tockman MS. Clinical detection of lung cancer progression markers. *J Cell Biochem Suppl* 1996; 25:177-84.:177-184.
- (23) Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(18):1366-1373.
- (24) Ives JC, Buffler PA, Greenberg SD. Environmental associations and histopathologic patterns of carcinoma of the lung: the challenge and dilemma in epidemiologic studies. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128(1):195-209.
- (25) Fisseler-Eckhoff A, Muller KM. [The pathology of the pulmonary arteries in lung tumors]. *Dtsch Med Wochenschr* 1994; 119(42):1415-1420.
- (26) Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001; 18(6):1059-1068.
- (27) Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997; 111(6):1710-1717.
- (28) Junker K, Dasbach G, Muller KM. [Mediastinal lymph node metastases in bronchial cancer--CT analog horizontal section of an autopsy patient sample]. *Pneumologie* 1990; 44 Suppl 1:261-2.:261-262.
- (29) Carney DN. Lung cancer--time to move on from chemotherapy. *N Engl J Med* 2002; 346(2):126-128.
- (30) Rosell R, Gomez-Codina J, Camps C, Maestre J, Padille J, Canto A et al. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1994; 330(3):153-158.

- (31) Roth JA, Fossella F, Komaki R, Ryan MB, Putnam JB, Jr., Lee JS et al. A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(9):673-680.
- (32) Thomas M, Rube C, Semik M, von Eiff M, Freitag L, Macha HN et al. Impact of preoperative bimodality induction including twice-daily radiation on tumor regression and survival in stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(4):1185.
- (33) Bulzebruck H, Bopp R, Drings P, Bauer E, Krysa S, Probst G et al. New aspects in the staging of lung cancer. Prospective validation of the International Union Against Cancer TNM classification. *Cancer* 1992; 70(5):1102-1110.
- (34) Drings P. Poster review of the 4th International Symposium: Supportive Care in Cancer, 24-27 February 1993, St. Gallen, Switzerland. *Support Care Cancer* 1993; 1(4):218-221.
- (35) Hofler H. [Neuroendocrine tumors of the lung]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997; 81:118-24.:118-124.
- (36) Marangos PJ, Gazdar AF, Carney DN. Neuron specific enolase in human small cell carcinoma cultures. *Cancer Lett* 1982; 15(1):67-71.
- (37) Brambilla E, Lantuejoul S, Sturm N. Divergent differentiation in neuroendocrine lung tumors. *Semin Diagn Pathol* 2000; 17(2):138-148.
- (38) Gonzalez S, von Bassewitz DB, Grundmann E, Nakhosteen JA, Muller KM. The ultrastructural heterogeneity of potentially preneoplastic lesions in the human bronchial mucosa. *Pathol Res Pract* 1986; 181(4):408-417.
- (39) Carbone DP, Koros AM, Linnoila RI, Jewett P, Gazdar AF. Neural cell adhesion molecule expression and messenger RNA splicing patterns in lung cancer cell lines are correlated with neuroendocrine phenotype and growth morphology. *Cancer Res* 1991; 51(22):6142-6149.
- (40) Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW et al. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res* 1985; 45(6):2913-2923.
- (41) Carney DN, Bepler G, Gazdar AF. The serum-free establishment and in vitro growth properties of classic and variant small cell lung cancer cell lines. *Recent Results Cancer Res* 1985; 99:157-66.:157-166.
- (42) Gazdar AF, Carney DN, Russell EK, Sims HL, Baylin SB, Bunn PA, Jr. et al. Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res* 1980; 40(10):3502-3507.
- (43) Gazdar AF, Helman LJ, Israel MA, Russell EK, Linnoila RI, Mulshine JL et al. Expression of neuroendocrine cell markers L-dopa decarboxylase, chromogranin A, and dense core granules in human tumors of endocrine and nonendocrine origin. *Cancer Res* 1988; 48(14):4078-4082.

- (44) Radice PA, Matthews MJ, Ihde DC, Gazdar AF, Carney DN, Bunn PA et al. The clinical behavior of "mixed" small cell/large cell bronchogenic carcinoma compared to "pure" small cell subtypes. *Cancer* 1982; 50(12):2894-2902.
- (45) Hirsch FR, Osterlind K, Hansen HH. The prognostic significance of histopathologic subtyping of small cell carcinoma of the lung according to the classification of the World Health Organization. A study of 375 consecutive patients. *Cancer* 1983; 52(11):2144-2150.
- (46) Abeloff MD, Eggleston JC, Mendelsohn G, Ettinger DS, Baylin SB. Changes in morphologic and biochemical characteristics of small cell carcinoma of the lung. A clinicopathologic study. *Am J Med* 1979; 66(5):757-764.
- (47) Sehested M, Hirsch FR, Osterlind K, Olsen JE. Morphologic variations of small cell lung cancer. A histopathologic study of pretreatment and posttreatment specimens in 104 patients. *Cancer* 1986; 57(4):804-807.
- (48) Aisner SC, Finkelstein DM, Ettinger DS, Abeloff MD, Ruckdeschel JC, Eggleston JC. The clinical significance of variant-morphology small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 1990; 8(3):402-408.
- (49) Fushimi H, Kukui M, Morino H, Hosono Y, Fukuoka M, Kusunoki Y et al. Detection of large cell component in small cell lung carcinoma by combined cytologic and histologic examinations and its clinical implication. *Cancer* 1992; 70(3):599-605.
- (50) Okike N, Bernatz PE, Woolner LB. Carcinoid tumors of the lung. *Ann Thorac Surg* 1976; 22(3):270-277.
- (51) McCaughan BC, Martini N, Bains MS. Bronchial carcinoids. Review of 124 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985; 89(1):8-17.
- (52) Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. Atypical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972; 64(3):413-421.
- (53) Dearing MP, Steinberg SM, Phelps R, Anderson MJ, Mulshine JL, Ihde DC et al. Outcome of patients with small-cell lung cancer: effect of changes in staging procedures and imaging technology on prognostic factors over 14 years. *J Clin Oncol* 1990; 8(6):1042-1049.
- (54) Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brichon PY, Nagy-Mignotte H, Morel F et al. Cytotoxic chemotherapy induces cell differentiation in small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 1991; 9(1):50-61.
- (55) Worden FP, Kalemkerian GP. Therapeutic advances in small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9(3):565-579.
- (56) Gazdar AF, Carney DN, Nau MM, Minna JD. Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res* 1985; 45(6):2924-2930.
- (57) Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a

- mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 1999; 5(6):662-668.
- (58) Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM et al. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1995; 1(6):578-582.
- (59) Abe Y, Ohnishi Y, Yoshimura M, Ota E, Ozeki Y, Oshika Y et al. P-glycoprotein-mediated acquired multidrug resistance of human lung cancer cells in vivo. *Br J Cancer* 1996; 74(12):1929-1934.
- (60) Supino R, Binaschi M, Capranico G, Gambetta RA, Prosperi E, Sala E et al. A study of cross-resistance pattern and expression of molecular markers of multidrug resistance in a human small-cell lung-cancer cell line selected with doxorubicin. *Int J Cancer* 1993; 54(2):309-314.
- (61) Savaraj N, Wu CJ, Xu R, Lampidis T, Lai S, Donnelly E et al. Multidrug-resistant gene expression in small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 1997; 20(4):398-403.
- (62) Dingemans AM, Ark-Otte J, van d, V, Apolinario RM, Scheper RJ, Postmus PE et al. Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues. *Ann Oncol* 1996; 7(6):625-630.
- (63) Moore SM, Rintoul RC, Walker TR, Chilvers ER, Haslett C, Sethi T. The presence of a constitutively active phosphoinositide 3-kinase in small cell lung cancer cells mediates anchorage-independent proliferation via a protein kinase B and p70s6k-dependent pathway. *Cancer Res* 1998; 58(22):5239-5247.
- (64) Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996; 274(5288):784-787.
- (65) Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13(4):382-387.
- (66) Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(12):1099-1109.
- (67) Das KC, White CW. Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 1997; 272(23):14914-14920.
- (68) Wang CY, Cusack JC, Jr., Liu R, Baldwin AS, Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 1999; 5(4):412-417.
- (69) Hartmann TN, Burger M, Burger JA. The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18(2):126-130.
- (70) Carney DN, Mitchell JB, Kinsella TJ. In vitro radiation and chemotherapy sensitivity of established cell lines of human small cell lung cancer and its large cell morphological variants. *Cancer Res* 1983; 43(6):2806-2811.

- (71) Shtivelman E, Namikawa R. Species-specific metastasis of human tumor cells in the severe combined immunodeficiency mouse engrafted with human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(10):4661-4665.
- (72) Shtivelman E. A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1997; 14(18):2167-2173.
- (73) Goodwin G, Baylin SB. Relationships between neuroendocrine differentiation and sensitivity to gamma-radiation in culture line OH-1 of human small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1982; 42(4):1361-1367.
- (74) Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 1983; 306(5939):194-196.
- (75) Kasimis BS, Wuerker RB, Hunt JD, Kaneshiro CA, Williams JL. Relationship between changes in the histologic subtype of small cell carcinoma of the lung and the response to chemotherapy. *Am J Clin Oncol* 1986; 9(4):318-324.
- (76) Muller KM. [Problems in the histological classification of bronchial carcinomas]. *Onkologie* 1980; 3(3):127-132.
- (77) van Bodegom PC, Wagenaar SS, Corrin B, Baak JP, Berkel J, Vanderschueren RG. Second primary lung cancer: importance of long term follow up. *Thorax* 1989; 44(10):788-793.
- (78) Molimard M, Lebeau B. [Occurrence of an epidermoid bronchial carcinoma 8 years after a small cell carcinoma treated with only 3 courses of chemotherapy]. *Rev Med Interne* 1992; 13(6):441-442.
- (79) Sagman U, Lishner M, Maki E, Shepherd FA, Haddad R, Evans WK et al. Second primary malignancies following diagnosis of small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10(10):1525-1533.
- (80) Craig J, Powell B, Muss HB, Kawamoto E, Breyer R. Second primary bronchogenic carcinomas after small cell carcinoma. Report of two cases and review of the literature. *Am J Med* 1984; 76(6):1013-1020.
- (81) Johnson BE, Ihde DC, Matthews MJ, Bunn PA, Zabell A, Makuch RW et al. Non-small-cell lung cancer. Major cause of late mortality in patients with small cell lung cancer. *Am J Med* 1986; 80(6):1103-1110.
- (82) Osterlind K, Hansen HH, Hansen M, Dombernowsky P. Mortality and morbidity in long-term surviving patients treated with chemotherapy with or without irradiation for small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1986; 4(7):1044-1052.
- (83) Heyne KH, Lippman SM, Lee JJ, Lee JS, Hong WK. The incidence of second primary tumors in long-term survivors of small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10(10):1519-1524.
- (84) Ihde DC, Tucker MA. Second primary malignancies in small-cell lung cancer: a major consequence of modest success. *J Clin Oncol* 1992; 10(10):1511-1513.

- (85) Martini N, Melamed MR. Multiple primary lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 70(4):606-612.
- (86) Jensen SM, Gazdar AF, Cuttitta F, Russell EK, Linnoila RI. A comparison of synaptophysin, chromogranin, and L-dopa decarboxylase as markers for neuroendocrine differentiation in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1990; 50(18):6068-6074.
- (87) Linnoila RI, Mulshine JL, Steinberg SM, Funa K, Matthews MJ, Cotelingam JD et al. Neuroendocrine differentiation in endocrine and nonendocrine lung carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1988; 90(6):641-652.
- (88) Johnson BE, Kelley MJ. Biology of small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1995; 12 Suppl 3:S5-16.:S5-16.
- (89) Moody TW, Pert CB, Gazdar AF, Carney DN, Minna JD. High levels of intracellular bombesin characterize human small-cell lung carcinoma. *Science* 1981; 214(4526):1246-1248.
- (90) Baylin SB, Abeloff MD, Goodwin G, Carney DN, Gazdar AF. Activities of L-dopa decarboxylase and diamine oxidase (histaminase) in human lung cancers and decarboxylase as a marker for small (oat) cell cancer in cell culture. *Cancer Res* 1980; 40(6):1990-1994.
- (91) Graziano SL, Mazid R, Newman N, Tatum A, Oler A, Mortimer JA et al. The use of neuroendocrine immunoperoxidase markers to predict chemotherapy response in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7(10):1398-1406.
- (92) Gazdar AF, Kadoyama C, Venzon D, Park JG, Tsai CM, Linnoila RI et al. Association between histological type and neuroendocrine differentiation on drug sensitivity of lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1992;(13):191-196.
- (93) Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 2004; 26(4):445-453.
- (94) Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 2003; 348(12):1134-1149.
- (95) Ferrari L, Seregini E, Martinetti A, Van Graafeiland B, Nerini-Molteni S, Botti C et al. Chromogranin A measurement in neuroendocrine tumors. *Int J Biol Markers* 1998; 13(1):3-9.
- (96) Goldstein LA, Zhou DF, Picker LJ, Minty CN, Bargatze RF, Ding JF et al. A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 1989; 56(6):1063-1072.
- (97) Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P et al. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 1992; 257(5070):682-685.
- (98) Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, Habuchi H, Tobita Y, Kimata K, Miyasaka M. Widespread expression of chondroitin sulfate-type serglycins with CD44 binding ability in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1997; 272(42):26714-26719.



- (99) Culty M, Nguyen HA, Underhill CB. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol* 1992; 116(4):1055-1062.
- (100) Thomas L, Byers HR, Vink J, Stamenkovic I. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol* 1992; 118(4):971-977.
- (101) Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48(4):549-554.
- (102) Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4(11):2868-2880.
- (103) Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69(1):11-25.
- (104) Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; 120(3):577-585.
- (105) Guadagno TM, Ohtsubo M, Roberts JM, Assoian RK. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 1993; 262(5139):1572-1575.
- (106) Varner JA, Emerson DA, Juliano RL. Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 1995; 6(6):725-740.
- (107) Dike LE, Farmer SR. Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(18):6792-6796.
- (108) Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993; 4(9):953-961.
- (109) Montgomery AM, Reisfeld RA, Cheresch DA. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(19):8856-8860.
- (110) Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79(7):1157-1164.
- (111) Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995; 267(5199):891-893.
- (112) Vuori K, Ruoslahti E. Activation of protein kinase C precedes alpha 5 beta 1 integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J Biol Chem* 1993; 268(29):21459-21462.
- (113) Morino N, Mimura T, Hamasaki K, Tobe K, Ueki K, Kikuchi K et al. Matrix/integrin interaction activates the mitogen-activated protein kinase, p44erk-1 and p42erk-2. *J Biol Chem* 1995; 270(1):269-273.

- (114) Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der GP. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994; 372(6508):786-791.
- (115) Chen HC, Guan JL. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(21):10148-10152.
- (116) Guinebault C, Payrastre B, Racaud-Sultan C, Mazarguil H, Breton M, Mauco G et al. Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1995; 129(3):831-842.
- (117) Kapron-Bras C, Fitz-Gibbon L, Jeevaratnam P, Wilkins J, Dedhar S. Stimulation of tyrosine phosphorylation and accumulation of GTP-bound p21ras upon antibody-mediated alpha 2 beta 1 integrin activation in T-lymphoblastic cells. *J Biol Chem* 1993; 268(28):20701-20704.
- (118) Yebra M, Filardo EJ, Bayna EM, Kawahara E, Becker JC, Cheresch DA. Induction of carcinoma cell migration on vitronectin by NF-kappa B-dependent gene expression. *Mol Biol Cell* 1995; 6(7):841-850.
- (119) Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993; 68(1):4-17.
- (120) Damjanovich L, Albelda SM, Mette SA, Buck CA. Distribution of integrin cell adhesion receptors in normal and malignant lung tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6(2):197-206.
- (121) Gogali A, Charalabopoulos K, Constantopoulos S. Integrin receptors in primary lung cancer. *Exp Oncol* 2004; 26(2):106-110.
- (122) Costantini RM, Falcioni R, Battista P, Zupi G, Kennel SJ, Colasante A et al. Integrin (alpha 6/beta 4) expression in human lung cancer as monitored by specific monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1990; 50(18):6107-6112.
- (123) Smythe WR, LeBel E, Bavaria JE, Kaiser LR, Albelda SM. Integrin expression in non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14(3):229-239.
- (124) Suzuki S, Takahashi T, Nakamura S, Koike K, Ariyoshi Y, Takahashi T et al. Alterations of integrin expression in human lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84(2):168-174.
- (125) Oshita F, Kameda Y, Hamanaka N, Saito H, Yamada K, Noda K et al. High expression of integrin beta1 and p53 is a greater poor prognostic factor than clinical stage in small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 2004; 27(3):215-219.
- (126) Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 1992; 116(3):817-825.
- (127) Hofmann M, Rudy W, Zoller M, Tolg C, Ponta H, Herrlich P et al. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991; 51(19):5292-5297.

- (128) Birch M, Mitchell S, Hart IR. Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res* 1991; 51(24):6660-6667.
- (129) Kuppner MC, Van Meir E, Gauthier T, Hamou MF, de Tribolet N. Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours. *Int J Cancer* 1992; 50(4):572-577.
- (130) Heider KH, Hofmann M, Hors E, van den BF, Ponta H, Herrlich P et al. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 1993; 120(1):227-233.
- (131) Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 1993; 14(8):395-399.
- (132) Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61(7):1303-1313.
- (133) Pure E, Camp RL, Peritt D, Panettieri RA, Jr., Lazaar AL, Nayak S. Defective phosphorylation and hyaluronate binding of CD44 with point mutations in the cytoplasmic domain. *J Exp Med* 1995; 181(1):55-62.
- (134) Jackson DG, Buckley J, Bell JI. Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J Biol Chem* 1992; 267(7):4732-4739.
- (135) Screatton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(24):12160-12164.
- (136) Katoh S, Zheng Z, Oritani K, Shimosato T, Kincade PW. Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan. *J Exp Med* 1995; 182(2):419-429.
- (137) Lesley J, English N, Perschl A, Gregoroff J, Hyman R. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med* 1995; 182(2):431-437.
- (138) Bartolazzi A, Nocks A, Aruffo A, Spring F, Stamenkovic I. Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J Cell Biol* 1996; 132(6):1199-1208.
- (139) Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65(1):13-24.
- (140) Sy MS, Guo YJ, Stamenkovic I. Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J Exp Med* 1991; 174(4):859-866.
- (141) Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A, Stamenkovic I. Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J Exp Med* 1994; 180(1):53-66.

- (142) Takahashi K, Stamenkovic I, Cutler M, Saya H, Tanabe KK. CD44 hyaluronate binding influences growth kinetics and tumorigenicity of human colon carcinomas. *Oncogene* 1995; 11(11):2223-2232.
- (143) Sheng Y, Yoshimura M, Inoue S, Oritani K, Nishiura T, Yoshida H et al. Remodeling of glycoconjugates on CD44 enhances cell adhesion to hyaluronate, tumor growth and metastasis in B16 melanoma cells expressing beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III. *Int J Cancer* 1997; 73(6):850-858.
- (144) Sy MS, Mori H, Liu D. CD44 as a marker in human cancers. *Curr Opin Oncol* 1997; 9(1):108-112.
- (145) Yokozaki H, Ito R, Nakayama H, Kuniyasu H, Taniyama K, Tahara E. Expression of CD44 abnormal transcripts in human gastric carcinomas. *Cancer Lett* 1994; 83(1-2):229-234.
- (146) Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992; 340(8827):1053-1058.
- (147) Bolodeoku J, Yoshida K, Sugino T, Churchman M, Woodman A, Goodison S et al. CD44 expression in human breast cancer cell lines is related to oestrogen receptor (ER) status and confluency in vitro. *Biochem Soc Trans* 1997; 25(2):356S.
- (148) Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P. CD44 isoforms in prognosis of breast cancer. *Lancet* 1995; 346(8973):502.
- (149) Matsumura Y, Hanbury D, Smith J, Tarin D. Non-invasive detection of malignancy by identification of unusual CD44 gene activity in exfoliated cancer cells. *BMJ* 1994; 308(6929):619-624.
- (150) Sugino T, Gorham H, Yoshida K, Bolodeoku J, Nargund V, Cranston D et al. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol* 1996; 149(3):873-882.
- (151) Dall P, Heider KH, Hekele A, von Minckwitz G, Kaufmann M, Ponta H et al. Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res* 1994; 54(13):3337-3341.
- (152) Tarin D, Bolodeoku J, Hatfill SJ, Sugino T, Woodman AC, Yoshida K. The clinical significance of malfunction of the CD44 locus in malignancy. *J Neurooncol* 1995; 26(3):209-219.
- (153) Fujita N, Yaegashi N, Ide Y, Sato S, Nakamura M, Ishiwata I et al. Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues: possible implication of reduced expression of CD44 in lymph-vascular space involvement of cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54(14):3922-3928.
- (154) Ariza A, Mate JL, Isamat M, Lopez D, Uexkull-Guldeband C, Rosell R et al. Standard and variant CD44 isoforms are commonly expressed in lung cancer of the non-small cell type but not of the small cell type. *J Pathol* 1995; 177(4):363-368.

- (155) Wimmel A, Schilli M, Kaiser U, Havemann K, Ramaswamy A, Branscheid D et al. Preferential histiotypic expression of CD44-isoforms in human lung cancer. *Lung Cancer* 1997; 16(2-3):151-172.
- (156) Penno MB, August JT, Baylin SB, Mabry M, Linnoila RI, Lee VS et al. Expression of CD44 in human lung tumors. *Cancer Res* 1994; 54(5):1381-1387.
- (157) Li H, Hamou MF, de Tribolet N, Jaufeerally R, Hofmann M, Diserens AC et al. Variant CD44 adhesion molecules are expressed in human brain metastases but not in glioblastomas. *Cancer Res* 1993; 53(22):5345-5349.
- (158) Givehchian M, Woerner SM, Lacroix J, Zoller M, Drings P, Becker H et al. Expression of CD44 splice variants in normal respiratory epithelium and bronchial carcinomas: no evidence for altered CD44 splicing in metastasis. *Oncogene* 1996; 12(5):1137-1144.
- (159) Sloman A, D'Amico F, Yousem SA. Immunohistochemical markers of prolonged survival in small cell carcinoma of the lung. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120(5):465-472.
- (160) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(9):4350-4354.
- (161) Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112(2):195-203.
- (162) Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987; 8(3):138-140.
- (163) Kraus AC, Ferber I, Bachmann SO, Specht H, Wimmel A, Gross MW et al. In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene* 2002; 21(57):8683-8695.
- (164) Gazdar AF, Minna JD. NCI series of cell lines: an historical perspective. *J Cell Biochem Suppl* 1996; 24:1-11.:1-11.
- (165) Junker K, Krapp D, Muller KM. [Small cell bronchial carcinoma following chemotherapy. Morphological findings]. *Pathologe* 1995; 16(3):217-222.
- (166) Junker K, Wiethage T, Muller KM. Pathology of small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126(7):361-368.
- (167) Langner K, Muller KM, Junker K. [Changes in differentiation of small cell lung cancer after chemotherapy]. *Pathologe* 2000; 21(5):358-363.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

A	Absorption
A	Ampère (Einheit d. Stromstärke)
Abb.	Abbildung
ad	adhärent
ACO-Schema	Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin (Polychemotherapieschema)
ADC	Adenokarzinom
APES	Aminospropyltriethoxysilane
APUD	amine precursor uptake and decarboxylation
BAC	Bronchioalveoläres Karzinom
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD44	cluster of differentiation 44
Cg A	Chromogranin A
CGH	comparative genetic hybridisation
cSCLC	classic Small cell lung cancer (klassische kleinzellige Lungenkarzinome)
DNS/ DNA	Desoxyribonucleidacid (-säure)
ECM	Extrazellulärmatrix
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting/ scanning
FAK	Focal Adhesion Kinase
G	Grading (Grad der Differenzierung)
GRP	Gastrin related peptide
Gy	Gray
IASCL	International Association for the Study of Lung Cancer
ICC	Intermediate cell carcinoma (mittelgroßzelliges Karzinom)
Int	Integrin
kDa	kilo Dalton
LCC	large cell carcinoma (großzelliges Karzinom)
LDD	L-Dopa-Decarboxylase
Li	links

---

LRP	Lung resistance protein
mA	Milliampère (Einheit d. Stromstärke)
MDR	Multidrug Resistance
min	Minute
ML	Mittellappen (Lunge)
mRNS/ RNA	messenger Ribonucleidacid (-säure)
nm	Nanometer
NCI	National Cancer Institute
NSCLC	non small cell lung cancer (nichtkleinzellige Lungenkarzinome)
NSE	neurone specific enolase
OL	Oberlappen (Lunge)
OT	Objekträger
PE-Schema	Cisplatin, Etoposid (Polychemotherapie)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PKB	Proteinkinase B (= AKT)
PTK	Phosphotyrosinkinase
Re	Rechts
RNA/ RNS	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase- Kettenreaktion
sec	Sekunde
sus	Suspensionszellen
SYP	Synaptophysin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	WHO Klassifikation maligner Tumoren nach Sitz des Primärtumors (T), Lymphknotenstatus (N) und Fernmetastasen (M)
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
UL	Unterblassen (Lunge)
vSCLC	variant small cell lung cancer (variante kleinzellige Lungenkarzinome)
V	Volt (Einheit d. Spannung)
WHO	World Health Organization

## **8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität zu Marburg von Oktober 1995 bis April 2002 waren die Damen und Herren Professoren:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Beato, Berger, Bertalanffy, Berndt, Daut, Doss, Engel, Engenhardt-Cabillic, Czubayko, Fruhstorfer, Fuhrmann, Gemsa, Geus, Görg, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Grzeschik, Habermehl, Happle, Hasilik, Havemann, Herzum, Joseph, Kern, Klenk, Klaus, Klose, Koolmann, Kretzschmer, Krieg, Kroll, Lange, Lennartz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Peters, Pfab, Prinz, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schmitz-Moormann, Schmidt, Schneider, Schüffel, Schulz, Seitz, Seyberth, Siegrist, Slencka, Steininger, Vogelmeier, Voigt, Werner, von Wichert, Wulf, Zelder.

## **8.3 Publikationen**

### **Oncogene, 2002 Dec 12; 21 (57): 8683-95**

AC Kraus, I Ferber, SO Bachmann, H Specht, A Wimmel, MW Gross, J Schlegel, G Suske and M Schuermann: In vitro chemo- and radioresistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways.

## **8.4 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Marcus Schuermann für die Bereitstellung des Themas der hier vorliegenden Doktorarbeit, für das Überlassen des Laborplatzes, die Betreuung und die Diskussionsbereitschaft.

Für ihre exzellente fachliche Anleitung und moralische Unterstützung während der experimentellen Arbeitsphase möchte ich mich vor allem bei Frau Dr. Alison Kraus bedanken.

Für die gute kollegiale Arbeitsatmosphäre danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Schuermann.

Darüber hinaus gilt mein Dank

Prof. Müller aus Bochum und Prof. Rüschoff aus Kassel für die Auswahl und Bereitstellung der Tumorpräparate.

Frau Dr. Conny Brendel für die Einweisung in die Fluoreszenzzytometrie

Meiner Familie für die fortwährende Ermutigung und Rücksichtnahme während intensiver Arbeitsphasen.



## 8.5 Lebenslauf

### ➤ Persönliche Daten

Name: Hannah Starke, geb. Specht  
Geburtsdatum/-ort: 26.12.1975 in Frankfurt am Main  
Nationalität: deutsch  
Anschrift: Liebensteiner Str. 11, 28205 Bremen  
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

### ➤ Schulbildung:

1982-1986 Grundschule Lübbecke-Gehlenbeck  
1986-1990 Söderblom Gymnasium Espelkamp  
1990-1995 Städt. Gymnasium Moltkestraße Gummersbach  
1995 Abitur

### ➤ Hochschulbildung:

1995-2002 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität/Marburg  
1997 Ärztliche Vorprüfung  
1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
04/2003-04/2004 Praktisches Jahr im Krankenhaus St. Joseph Stift/Bremen  
2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Georg-August-Universität/Göttingen

### ➤ Wissenschaftliche Tätigkeiten

07/1999-08/2001 Doktorandin im Labor Prof. Dr. M. Schuermann, Abt. Hämatologie/Onkologie/Immunologie

### ➤ Klinische Tätigkeiten

1998 Famulatur in der Inneren Medizin

2000	Famulatur in der Pathologie
2000	Famulatur in der Gynäkologie/Geburtshilfe
2001	Praxisfamulatur in der Allgemeinmedizin
1998-2002	Studentische Hilfskraft im Schlaflabor/Marburg
04/2003-04/2004	Praktisches Jahr im Krankenhaus St. Joseph Stift/Bremen mit dem Wahlfach Gynäkologie/Geburtshilfe
seit 07/2005	Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Osterholz- Scharmbeck, Abt. Gynäkologie/Geburtshilfe
09/2005-12/2005	Hospitation in der Ultraschall-Sprechstunde der Pränataldiagnostik des Klinikums Bremen Mitte

### 8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Expression von Differenzierungsmarkern in kombinierten kleinzelligen Bronchialkarzinomen“ unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Marcus Schuermann im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Hämatologie/Onkologie/Immunologie, Direktor Professor Dr. med. A. Neubauer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe. Bei der Abfassung der Arbeit habe ich keine anderen, als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet. Ich habe bisher weder an einem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden folgendermaßen veröffentlicht:

#### **Oncogene, 2002 Dec 12; 21 (57): 8683-95**

AC Kraus, I Ferber, SO Bachmann, H Specht, A Wimmel, MW Gross, J Schlegel, G Suske and M Schuermann: In vitro chemo- and radioresistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways.

Bremen, 15.05.2006

---

**Ort, Datum**

---

**Hannah Starke**

