

**Reaktion Tumor-assoziiierter Fibroblasten
aus Lungenkarzinomen
auf Kinase-Inhibitoren und Chemotherapeutika
in verschiedenen Kulturmodellen**

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Silke Haubeiß
aus Erfurt

Hauptberichter: Prof. Dr. Scheurich
Mitberichter: Prof. Dr. Aulitzky

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2013

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

2012

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation

Reaktion Tumor-assoziiertes Fibroblasten aus Lungenkarzinomen auf Kinase-Inhibitoren
und Chemotherapeutika in verschiedenen Kulturmodellen

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Silke Haubeiß

Stuttgart, 4. April 2013

“A model is a lie that helps you see the truth.”

Howard Skipper

(1915 - 2006)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	10
1 Zusammenfassung	13
2 Summary	15
3 Einleitung	17
3.1 Tumor-assoziierte Fibroblasten	17
3.1.1 Bedeutung der Tumor-assoziierten Fibroblasten	17
3.1.2 Eigenschaften der Tumor-assoziierten Fibroblasten	18
3.1.3 Herkunft der Tumor-assoziierten Fibroblasten	20
3.2 Lungenkarzinome	22
3.3 Das Tumorsuppressor-Gen <i>tp53</i>	23
3.4 PDGF-Rezeptor-Signalweg und Kinase-Inhibitoren	26
3.5 Ziel der Arbeit	28
4 Material und Methoden.	31
4.1 Material	31
4.1.1 Bezugsquellen	31
4.1.2 Zelllinien, primäre Fibroblasten und Tumorgewebe	32
4.1.3 Lösungen	33
4.1.4 Software zur Datenanalyse	33
4.2 Methoden	34
4.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren	34
4.2.2 Arbeiten mit Zellkulturen	37
4.2.3 Arbeiten mit Tumorgewebe	40
4.2.4 Statistik	42
5 Ergebnisse	43
5.1 Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Kinase-Inhibitoren	43
5.1.1 Sensitivität gegenüber Kinase-Inhibitoren - <i>Screen</i> der <i>Inhibitor Select</i> Substanzbibliothek	43
5.1.2 Effekte zugelassener PDGFR-Inhibitoren	44
5.1.3 Molekulare Effekte von Dasatinib auf Tumor-assoziierte Fibroblasten	46
5.1.4 Funktionelle Konsequenzen der Dasatinib-Behandlung in Tumor-Modellen	53
5.2 Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin	59
5.2.1 Cisplatin hemmt den Zellzyklus von Tumor-assoziierten Fibroblasten	59

5.2.2	Ursachen der Variabilität der Cisplatin-Sensitivität	59
5.2.3	Einfluss der Wechselwirkungen zwischen Tumor-assoziierten Fibroblasten und Tumorzellen - Etablierung eines Modellsystems	61
5.2.4	Wechselseitiger Einfluss von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Tumorzellen auf die Cisplatin-Sensitivität	68
5.2.5	<i>tp53</i> -Mutationen im Lungentumor-Kollektiv	70
5.3	Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin bei Kombination mit PDGFR-Inhibitoren	79
5.3.1	Einfluss von PDGFR-Inhibitoren auf die Cisplatin-Sensitivität der Tumor-assoziierten Fibroblasten	79
5.3.2	Einfluss von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Dasatinib auf die Cisplatin-Sensitivität von H1299-Tumorzellen im Kokultur-Modell	80
5.3.3	Einfluss von Dasatinib auf die Cisplatin-Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Tumorzellen in Gewebeschnitten	80
5.4	Vergleich von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten	83
5.4.1	Genexpressionsanalyse von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten	83
5.4.2	Wachstum der Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten	85
5.4.3	Sensitivität von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Medikamente der Prestwick-Substanzbibliothek	87
5.4.4	Sensitivität von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten auf PDGFR-Inhibitoren	88
5.4.5	Sensitivität von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin	90
5.4.6	Sensitivität von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin in Kombination mit PDGFR-Inhibitoren	94
6	Diskussion.	97
6.1	Pharmakologische Modulation des Phänotyps der Tumor-assoziierten Fibroblasten zur Reduktion ihrer Tumor-unterstützenden Eigenschaften	98
6.2	Gegenseitige Beeinflussung der Cisplatin-Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Tumorzellen	104
6.3	Wirkung einer pharmakologischen Modulation der Tumor-assoziierten Fibroblasten mit Dasatinib in Kombination mit Cisplatin	116
6.4	Unterschiede zwischen Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten	119

7	Ausblick	123
A	Anhang	125
	Literaturverzeichnis	135
	Danksagung	149

Abkürzungsverzeichnis

ACT	<i>actin</i>
Akt	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
ANKRD1	<i>ankyrin repeat domain 1</i>
AS	Aminosäure
ASR	Alters-standardisierte Rate, Fälle pro 100 000 Einwohner
BBC3	<i>BCL2 binding component 3</i> (alias PUMA)
BMC	<i>bone marrow derived cell</i> , aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzelle
c-Abl	<i>c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
CaMK	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CDC	<i>cell division cycle</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i> (alias p21, Cip1)
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , Gegenstrang zur RNA
CHEK2	<i>checkpoint kinase 2</i>
C _{max}	maximale im Blut eines Patienten erreichte Konzentration eines Medikaments nach einmaliger Dosis (Plasmaspiegel); Angaben in dieser Dissertation beziehen sich auf die durchschnittlichen C _{max} -Werte mehrerer Patienten der angegebenen Studien
COL	<i>collagen</i>
CUB	<i>complement proteins C1r/C1s, UEGF and BMP1</i>
CXCL12	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>
DBD	DNA-Bindedomäne
DEPC	Diethyldicarbonat, auch Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>Desoxy Ribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFEMP1	<i>EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMT	<i>epithelial to mesenchymal transition</i> , Epitheliale-mesenchymale Transition
EndMT	<i>endothelial to mesenchymal transition</i> , Endotheliale-mesenchymale Transition
FAP	<i>fibroblast activation protein, alpha</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FC	<i>fold change</i> , x-fache Änderung
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR2	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
Flt	<i>fms-related tyrosine kinase 1</i> (<i>vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor</i>)

FOXM1	<i>forkhead box M1</i>
FSC	<i>forward scatter</i> , Streulicht im Durchflusszytometer, korreliert mit der Zellgröße
fw	<i>forward</i>
gDNA	genomische DNA
GI ₅₀	<i>growth inhibitory concentration 50</i> , Konzentration, die das Wachstum zu 50 % hemmt
GRPR	<i>gastrin-releasing peptide receptor</i>
GSEA	<i>gene set enrichment-Analyse</i>
HAPLN1	<i>hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i>
HBEGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)</i>
HIPK2	<i>homeodomain interacting protein kinase 2</i>
IFNG	<i>interferon, gamma</i>
IGF2	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IHC	Immunhistochemie
IL6	<i>interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>
KI67	Ki67 Antigen
KITLG	<i>KIT ligand</i> (alias SCF)
LRRFIP1	<i>leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1</i>
MFGE8	<i>milk fat globule-EGF factor 8 protein</i>
MKI67	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
mt	mutiert
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
MW ± SD	Mittelwert ± Standardabweichung
MYLK	<i>myosin light chain kinase</i>
NAF	Normalgewebe-assoziierte Fibroblasten, aus histologisch normalem Gewebe eines Tumor-befallenen Organs
NES	<i>nuclear export signal</i> , nukleäres Exportsignal
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , nukleäres Lokalisierungssignal
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i> , Nicht-Kleinzelliger Lungentumor
OD	Oligomerisierungsdomäne
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFRB	<i>platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide</i>
PDK1	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
PIK3	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> (alias PI3K)
PIM1	<i>pim-1 oncogene</i>
PMAIP1	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i> (alias NOXA)

POSTN	<i>periostin, osteoblast specific factor</i>
PRD	Prolinreiche Domäne
<i>Primer</i>	Oligonukleotid für die <i>Priming</i> -Reaktion der PCR
PRKACA	<i>protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha</i> (alias PKA)
PRKDC	<i>protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide</i> (alias DNA-PK)
PRKG1	<i>protein kinase, cGMP-dependent, type I</i> (alias PKG)
PRRT2	<i>proline-rich transmembrane protein 2</i> (alias PKC)
PRUNE2	<i>prune homolog 2</i>
PSAP	<i>prosaposin</i>
PTPN11	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i> (alias SHP2)
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
rev	<i>reverse</i>
RMA	<i>Robust Multi-Array Average</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SCLC	<i>small cell lung cancer</i> , Kleinzelliger Lungentumor
SEM	<i>standard error of mean</i> , Standardabweichung
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
α SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
SSC	<i>side scatter</i> , seitliches Streulicht im Durchflusszytometer, korreliert mit der Granularität der Zellen
STMN1	<i>stathmin 1</i>
SVEP1	<i>sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i> (Protein)
TGFB2/3	<i>transforming growth factor, beta 2/3</i> (Gen/RNA)
TGFBI	<i>transforming growth factor, beta-induced</i>
THBS1	<i>thrombospondin-1</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
tp53	<i>tumor protein p53</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) werden in zunehmendem Maß als bedeutender Zelltyp in soliden Tumoren erkannt. Sie beeinflussen Entstehung, Wachstum, Invasion und Metastasierung der Tumore. Der wechselseitige Einfluss von TAF und Tumorzellen entscheidet mit über das Therapie-Ansprechen von Karzinomen. Über TAF aus Lungentumoren gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. In dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, wie die TAF aus dieser Tumorentität auf herkömmliche Chemotherapie (Cisplatin) reagieren und ob sie mit einer Behandlung gezielt so verändert werden können, dass sie ihren Tumor-unterstützenden Phänotyp verlieren.

Um effektive Substanzen zur pharmakologischen Modulation des TAF-Phänotyps zu identifizieren, wurde die Wirkung von 151 Kinase-Inhibitoren auf TAF untersucht und gezeigt, dass die Viabilität von TAF vor allem durch PDGFR-Inhibitoren gehemmt werden kann. Von den klinisch zugelassenen PDGFR-Inhibitoren hemmte Dasatinib die Proliferation der TAF effizienter als Imatinib, Nilotinib und Sorafenib. *Microarray*-Analysen der Genexpressionsänderungen von neun TAF bei einer Behandlung mit 0,1 μM Dasatinib identifizierten eine 492 Gene umfassende „Dasatinib Response Signatur“. Vergleiche mit bereits veröffentlichten Genexpressions-Signaturen ergaben Überschneidungen mit Signaturen der Wundheilung und *Quiescence*. Darüber hinaus wurde ein tendenziell längeres Überleben von Patienten festgestellt, deren Tumor-Genexpressions-Signatur einer Schnittmenge der „Dasatinib Response Signatur“ mit einer TAF-NAF-Signatur ähnelt. Funktionelle Experimente mit konditioniertem Medium bestätigten die Reduktion der Tumor-fördernden Eigenschaften primärer TAF auf die H1299-Lungentumor-Zelllinie nach einer Dasatinib-Behandlung der TAF. Zusätzlich wurde in der Gewebeschnitt-Kultur mit frischem Tumoren gezeigt, dass Dasatinib in individuellen Tumoren die Proliferation von Tumorzellen hemmen und den Zelltod von TAF und Tumorzellen induzieren kann. Bei einer Dasatinib-Behandlung wird der Phänotyp der TAF demnach so moduliert, dass deren Tumor-fördernde Eigenschaften verringert werden können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Reaktion von TAF auf Cisplatin näher untersucht. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass TAF aus verschiedenen Patienten heterogen auf eine Behandlung mit Cisplatin reagieren. Als Ursachen dafür wurden in der vorliegenden Arbeit Patientencharakteristika wie Alter und Geschlecht sowie die Tumorphistologie ausgeschlossen, ebenso wie *tp53*-Mutationen und der SNP rs1042522, die eine wichtige Rolle beim Ansprechen von Tumorzellen auf Chemotherapie spielen. Dagegen wurden in Kokultur-Experimenten mit TAF und H1299-Lungentumorzellen Hinweise gefunden, dass die wechselseitige Beeinflussung der Zelltypen die Cisplatin-Sensitivität moduliert und die Heterogenität der TAF verringert. TAF sind in Kokultur resistenter gegen Cisplatin und reagieren homogener als in Monokultur, H1299 sind sensitiver. Auch im Gewebekulturmodell konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen die Reaktion der TAF auf Cisplatin beeinflussen können. Unabhängig von *tp53*-Mutationen der Tumore wurde ei-

ne p53-Stabilisierung in TAF humaner Lungentumore nur dann nachgewiesen, wenn die Tumorzellen selbst mit einer p53-Stabilisierung auf die Cisplatin-Behandlung reagierten. Im Gewebe ist auch der Cisplatin-induzierte Zelltod von Tumorzellen und TAF linear korreliert, je stärker ein Zelltyp mit Zelltod reagiert, desto stärker reagiert auch der andere Zelltyp. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die Reaktion der TAF auf Chemotherapie durch Tumorzellen beeinflusst werden kann.

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss die Dasatinib-induzierte Verminderung des TAF-Phänotyps auf die Cisplatin-Sensitivität von TAF und Tumorzellen hat. TAF zeigten bei einer solchen Kombinations-Behandlung eine reduzierte Sensitivität gegenüber Cisplatin. Im Kokultur-Experiment wurden hingegen keine Unterschiede zu einer alleinigen Behandlung der TAF oder H1299-Zelllinie mit Cisplatin identifiziert. Interessanterweise war die Reaktion der Tumorzellen und TAF in humanem Tumorgewebe individuell sehr unterschiedlich. So gab es sowohl Tumore, bei denen TAF und Tumorzellen auf die Cisplatin-Dasatinib-Kombinations-Behandlung im Vergleich zur Cisplatin-Mono-Behandlung in erheblichem Maß mit Zelltod reagierten, als auch solche, bei denen beide Zelltypen deutlich weniger Zelltod zeigten. In einem Fall, bei dem TAF und Tumorzellen mit nur 10 % Zelltod reagierten, wurde eine deutliche Reduktion der Proliferation der Tumorzellen beobachtet. Dasatinib steigert somit wahrscheinlich nur in einem Teil der primären Tumore die Wirkung von Chemotherapie.

Um Zielstrukturen für wirksame Medikament-Kombinationen zu identifizieren, wurden Unterschiede zwischen TAF und Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten (NAF) untersucht. Auf funktioneller und molekularer Ebene wurden aber nur sehr geringe konstitutive Unterschiede festgestellt. Ein Screen mit 1120 zugelassenen Medikamenten konnte keine Substanz identifizieren, die selektiv die Viabilität von TAF hemmt. Auf Chemotherapie mit Cisplatin reagierten NAF schneller als TAF mit Zellzyklus-Arrest. Außerdem wurde die Cisplatin-induzierte *HIPK2*-Expression von TAF und NAF durch H1299-konditioniertes Medium unterschiedlich beeinflusst. Bei einer kombinierten Behandlung mit zugelassenen PDGFR-Inhibitoren und Cisplatin wurden Hinweise auf unterschiedliche Sensitivitäts-Spektren von TAF und NAF identifiziert. Bei TAF bewirken Dasatinib und Imatinib eine verringerte Cisplatin-Sensitivität, bei NAF hat Nilotinib die entgegengesetzte Wirkung.

Zusammenfassend stellt die vorliegende Arbeit erstmals eine umfassende Untersuchung der Reaktion von TAF auf Kinase-Inhibitoren und Cisplatin dar. In drei Modellsystemen wurde der Einfluss von TAF und Tumorzellen aufeinander gezeigt und die Verringerung der Tumor-fördernden Eigenschaften der TAF mittels Dasatinib-Behandlung erreicht. Somit ist es nun möglich, das Netzwerk der Abhängigkeiten von TAF und Tumorzellen zu beeinflussen. So könnten Tumore gezielt geschwächt und für andere Therapien sensitiviert werden.

2. Summary

The impact of Cancer-associated Fibroblasts (CAFs) as a prominent cell type in tumours is increasingly appreciated. CAFs affect tumour emergence, growth, invasion and metastasis. A reciprocal influence between CAFs and cancer cells may also determine the response to therapy. There are only a few studies focusing on the role of CAFs in lung tumours. Therefore, the goal of the present study was to determine the response of CAFs from lung tumours to conventional chemotherapy (Cisplatin) and to investigate the possibility to modulate their phenotype in a way that they lose their tumour-supporting function.

To identify compounds inhibiting the CAF phenotype the effect of 151 kinase inhibitors was screened. The inhibition of PDGFR was most effective in reducing CAFs' proliferation. Out of a panel of approved PDGFR inhibitors Dasatinib showed improved efficacy as compared to Imatinib, Nilotinib and Sorafenib. Use of gene expression data comparing CAFs from nine patients treated with Dasatinib or left untreated as a control yielded the so called „Dasatinib Response Signature“ comprising 492 genes whose expression changed upon treatment with 0,1 μ M Dasatinib. Overlaps of this signature with already published ones identified genes involved in wound healing and quiescence. Furthermore, an overlap with a signature derived from a comparison of CAFs and normal-associated fibroblasts (NAFs), established a group of genes that predicted an improved survival of patients if their expression pattern was similar to CAFs treated with Dasatinib. More importantly, using conditioned medium from CAFs treated with Dasatinib reduced the growth promoting effect on H1299 lung cancer cell line cells as compared to treatment with conditioned medium from CAFs plus Dasatinib. In tissue slice culture of treated *versus* untreated fresh tumour tissue Dasatinib inhibited proliferation of cancer cells and induced cell death in some of the tumours. These data show that Dasatinib is a new means of inhibiting CAFs' phenotype in a way that the promotion of tumour growth is reduced.

In the second part of this work, the effect of Cisplatin treatment on CAFs was analyzed. Preliminary results showed that CAFs isolated from individual patients responded quite heterogeneously to this kind of treatment. The current work excluded patient characteristics like age and sex as well as tumour histology as possible causes. In addition, there were no *tp53* mutations detected in CAFs from lung tumours and the *tp53* SNP rs1042522 had no influence on CAFs' response to Cisplatin. So no cause for CAFs' variability could be identified in this study. Interestingly, co-culture with H1299 lung cancer cell line reduced this heterogeneity of CAFs, indicating an influence of cancer cells on CAFs. Furthermore, both cell types affected the sensitivity of the other cell type to Cisplatin. CAFs became more resistant in co-culture, while H1299 cells got more sensitive. Also in the tissue slice culture model there was an influence of cancer cells on CAFs. A Cisplatin-induced p53 stabilisation of CAFs could only be detected if the neighbouring cancer cells were also able to respond to Cisplatin treatment with a stabilisation of p53.

This effect was independent of *tp53* mutations in these primary lung tumours. Furthermore, cell death induced through Cisplatin treatment in CAFs and cancer cells showed a linear correlation in primary tumour tissue. Therefore, it could be shown that cancer cells influence CAFs' response to Cisplatin.

By treating CAFs with Dasatinib and thereby reducing their tumour promoting activities, one could possibly sensitize tumours to Cisplatin treatment. Thus, the effects of this drug combination on CAFs and cancer cells were analyzed in addition to the single treatments. In mono-culture CAFs showed reduced sensitivity to Cisplatin when Dasatinib was added. In contrast, in co-culture there were no differences between Cisplatin alone or combined with Dasatinib regarding Cisplatin sensitivity of CAFs and H1299 cells. Interestingly, in the tissue slice culture model there were marked differences in the response of CAFs and cancer cells from individual patients. On the one hand there was a number of tumours where both cell types showed enhanced cell death upon addition of Dasatinib. On the other hand some CAFs and cancer cells showed reduced sensitivity if both drugs were combined. One tumour showed only 10 % cancer cell death induction if treated with the combination as compared with Cisplatin alone, but proliferation of the cancer cells was markedly reduced. Probably the combination of Dasatinib with Cisplatin does only show preferable results in a subset of tumours.

If there were differences between CAFs and NAFs it would be worth considering them a clue to new treatments. There were only minor constitutive differences between CAFs and NAFs regarding all investigated molecular and functional levels. Therefore, a search of signs of discrimination upon treatment with various drugs was initiated by screening a library containing 1120 approved substances. There was no drug that could selectively inhibit CAF's viability while sparing NAF's viability. Cell cycle arrest induced by treatment with Cisplatin was faster in NAFs than in CAFs. Furthermore, the induction of *HIPK2* expression by treatment with Cisplatin was differentially influenced by conditioned medium from H1299 cells in CAFs *versus* NAFs. In addition, CAFs and NAFs responded to co-treatment with Cisplatin and PDGFR inhibitors in a way that CAFs were less sensitive to Cisplatin when co-treated with Dasatinib or Imatinib, while NAFs showed enhanced sensitivity upon addition of Nilotinib.

In summary, the current work is the first one to comprehensively analyze the response of CAFs to treatment with kinase inhibitors and Cisplatin. A mutual interaction between CAFs and cancer cells could be identified in three model systems. Importantly, a reduction of the tumour growth promoting phenotype of CAFs could be achieved by treatment with Dasatinib. Using this tool kit it is now possible to affect the interwoven dependencies between CAFs and cancer cells and to systematically sensitize the tumour against conventional tumour therapy.

3. Einleitung

3.1. Tumor-assoziierte Fibroblasten

3.1.1. Bedeutung der Tumor-assoziierten Fibroblasten

Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) bilden einen großen Teil des Tumor-Stromas (Übersichtsartikel McAllister und Weinberg 2010). Das Stroma, oder auch Grundgewebe, aller Organe ist sowohl für die Homöostase von normalem Gewebe als auch für die Unterstützung der epithelialen Tumorzellen in Neoplasien verantwortlich. Das Stroma besteht hauptsächlich aus Zellen wie Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen der Gefäße. Außerdem umfasst es die extrazelluläre Matrix (ECM) inklusive der Basalmembran, die die Stromazellen im gesunden Gewebe und frühen Tumorstadien von den epithelialen Zellen abgrenzt (McAllister und Weinberg 2010). Die meisten Stromazellen hemmen anfangs das Wachstum von Tumorzellen (Mueller und Fusenig 2004; Trimboli *et al.* 2009). Beispielsweise wurde an einem Maus-Modell mit humanisiertem Brust-Stroma der Einfluss von Fibroblasten-Implantation auf eingepflanzte Organoide aus humanen Brust-Epithelzellen untersucht (Kuperwasser *et al.* 2004). Die Organoide enthielten tumorfördernde, Wachstumsfaktor-überexprimierende Fibroblasten. Von den Autoren konnte gezeigt werden, dass die Zugabe normaler Fibroblasten diese tumor-fördernden Effekte unterdrücken kann. Aber Signale der Tumorzellen umgehen diese Hemmung während der Tumorentwicklung und verändern die Stromazellen, so dass diese schließlich das Wachstum und Überleben von Tumorzellen, die Invasion in die Blutbahn und die Metastasierung in andere Organe aktiv fördern (Polyak *et al.* 2009).

Fibroblasten, die in der Nähe von Tumorzellen durch deren Signale verändert wurden, werden Tumor-assoziierte Fibroblasten genannt (Übersichtsartikel Kalluri und Zeisberg 2006). Viele dieser TAF exprimieren α -smooth muscle actin (α SMA), daher ist auch der Begriff Myofibroblasten gebräuchlich. Fibroblasten sind längliche Zellen mit fusiformem oder Spindel-ähnlichem Erscheinungsbild. In Gewebeschnitten werden Fibroblasten morphologisch anhand ihres länglichen Zellkerns identifiziert. Sie zeichnen sich durch die Abwesenheit von Markern anderer Zelllinien aus. Ein Marker, den alle Fibroblasten und keine anderen Zelltypen exprimieren, wurde bisher nicht gefunden. Im normalen Gewebe ruhen die Zellen, sie können aber während Entzündungen oder der Wundheilung aktiviert werden. Ein Marker der die meisten aktivierten Fibroblasten auszeichnet, ist *fibroblast activation protein* (FAP). Zu den Funktionen von Fibroblasten gehören die Produktion von extrazellulärer Matrix, die Regulation der Differenzierung von Epithelzellen, die Wundheilung und die Regulation von Entzündungen (Kalluri und Zeisberg 2006).

Veränderungen der Gewebe um einen Tumor herum wurden schon früh kontrovers diskutiert (Levin 1912). Die erhöhte Anzahl von Fibroblasten in Tumoren geht mit einer erhöhten Menge extrazellulärer Matrix einher und wird als Desmoplasie oder desmoplastische Reaktion bezeichnet. Auch der Begriff reaktives Stroma ist gebräuchlich. Da sich

die Forschung zunächst auf die Tumorzellen konzentrierte, wurden Interaktionen zwischen Fibroblasten und Tumorzellen erst spät gezielt untersucht (zum Beispiel Adam *et al.* 1994). Erst Olumi *et al.* (1999) konnten zeigen, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten die Progression von initiierten, aber nicht-tumorigenen epithelialen Zellen *in vitro* und *in vivo* stimulieren können. Als Hauptproduzenten der veränderten extrazellulären Matrix in Tumoren und durch die Produktion von Wachstumsfaktoren für viele verschiedene Zelltypen erhalten die TAF inzwischen zunehmend Aufmerksamkeit in der Tumorforschung. Das letzte Jahrzehnt hat auf diesem Gebiet daher einen deutlichen Wissenszuwachs gebracht. Die Relevanz für die Klinik zeigten Finak *et al.* (2008). Sie identifizierten in Brusttumorstroma eine spezifische Genexpressions-Signatur mit Transkripten, die im Vergleich zu normalem Stroma verändert exprimiert wurden. Die Expression dieser Transkripte wurde von den Autoren aus Genexpressionsdaten von Gesamttumoren gefiltert und konnte zwei Patientengruppen mit unterschiedlicher Prognose identifizieren. Die Stromazellsignatur als Teil des Tumor-Genexpressionsmusters hatte prognostischen Wert und identifizierte ein für das Überleben der Patienten wichtiges Genset.

Als zugrundeliegende Ursache wird gesehen, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Tumor-Progression erhöhen können (Tlsty und Hein 2001; Elenbaas und Weinberg 2001; Shimoda *et al.* 2010). Das schnellere Tumorstromawachstum und die begünstigte Metastasierung führen dazu, dass für den Patienten kaum Heilungschancen bestehen. Damit tragen TAF erheblich zum meist tödlichen Ausgang von Krebserkrankungen bei. Eine Normalisierung der Eigenschaften dieser aktivierten Fibroblasten könnte im Umkehrschluss auch die Prognose für den Patienten verbessern (Müller und Fusenig 2004).

3.1.2. Eigenschaften der Tumor-assoziierten Fibroblasten

Reaktives Stroma zeigt eine erhöhte Anzahl von Fibroblasten, eine erhöhte Gefäßdichte sowie Typ I-Collagen und Fibrin in der ECM (Rønnov-Jessen *et al.* 1996). Die Tumor-assoziierten Fibroblasten verändern die Tumor-Mikroumgebung dabei nicht nur durch eine höhere Zellzahl. Der aktivierte Phänotyp zeichnet sich auch durch eine höhere Expression extrazellulärer Matrix und erhöhte Proliferation aus (Rodemann und Müller 1991, siehe Abbildung 3.1 auf der nächsten Seite). Quantitativ veränderte Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix und Re-Expression sogenannter onkofetaler ECM-Komponenten sind ein Teil dieser Veränderungen. Zu den veränderten Faktoren gehören strukturelle Matrixproteine ebenso wie extrazelluläre Proteasen und immunmodulierende Proteine (Silzle *et al.* 2004). Dieser Prozess und Zustand wird als desmoplastische Reaktion bezeichnet und ist mit der Invasion des Tumors in umliegendes Gewebe und einer schlechten Prognose korreliert (Kalluri und Zeisberg 2006).

Außerdem sekretieren Fibroblasten Wachstumsfaktoren, die die anderen Zelltypen im Tumor beeinflussen, wie *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factors*

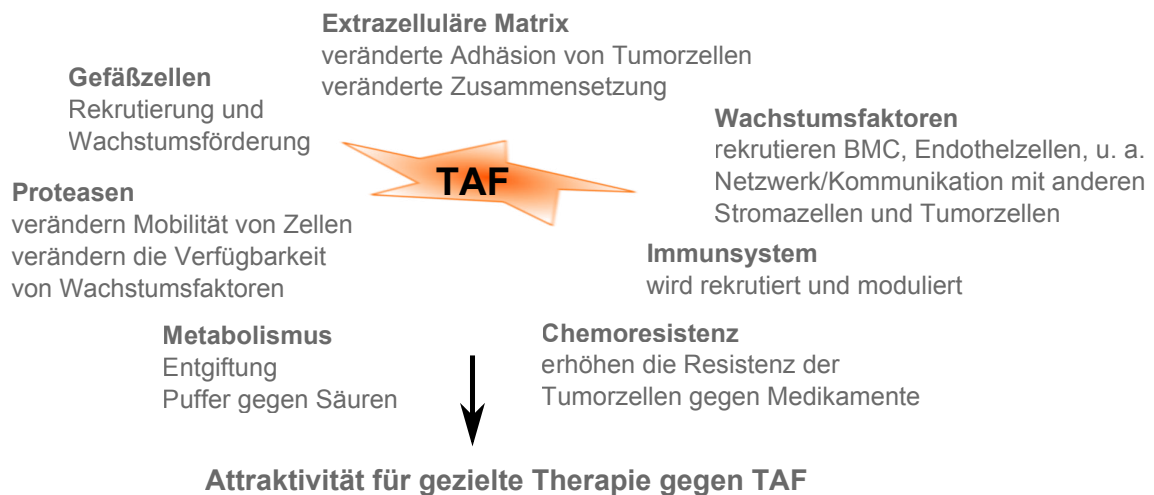


Abbildung 3.1.: Zentrale Rolle Tumor-assoziierten Fibroblasten bei der Tumorentwicklung.

Auswahl der Einflüsse von TAF auf den Tumor: TAF beeinflussen die extrazelluläre Matrix (ECM), sekretieren Wachstumsfaktoren für verschiedene andere Zelltypen, rekrutieren Immun- und Gefäßzellen, unterstützen die Tumorzellen auch metabolisch und können die Resistenz der Tumorzellen modulieren (BMC: *bone marrow derived cell*).

(TGFs), *platelet-derived growth factors* (PDGFs), *fibroblast growth factors* (FGFs), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *insulin-like growth factors* (IGFs), *hepatocyte growth factor* (HGF), *nerve growth factor* (NGF) und *KIT ligand* (KITLG (alias SCF)) (Powell *et al.* 1999; Bhowmick *et al.* 2004b). Die meisten dieser Wachstumsfaktoren bewirken primär eine erhöhte Proliferation von Zellen, die die entsprechenden Wachstumsfaktor-Rezeptoren exprimieren. Der Einfluss einzelner dieser Wachstumsfaktoren hat sich aber als sehr vielschichtig herausgestellt. So kann VEGF die Gefäß-Permeabilität erhöhen, woraufhin Plasmaproteine wie Fibrin aus den Gefäßen in umliegendes Gewebe gelangen können, was wiederum Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen anlockt. Diese produzieren daraufhin eine ECM, die günstig für Gefäßneubildung ist (Brown *et al.* 1999; Carpini *et al.* 2010). Die Zusammensetzung der sekretierten Wachstumsfaktoren variiert bei verschiedenen Ursprungsorganen der Fibroblasten (Mücke *et al.* 2007) und wird in Tumoren verändert (Allinen *et al.* 2004). Darüber hinaus wirken diese Faktoren nicht unabhängig voneinander, sondern in einem Netzwerk. Dabei kann die Rolle einzelner Proteine wie $TGF\beta$ durchaus in verschiedenen Tumorstadien unterschiedlich und sogar entgegengesetzt sein (Bhowmick *et al.* 2004b; Ao *et al.* 2007). Zusätzlich wird durch die veränderte Expression von Proteasen wie *matrix metalloproteinase 2* (MMP2), MMP3 und MMP9 auch die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren in der ECM verändert (Rodemann und Müller 1991; Yu und Stamenkovic 2000). Einige Faktoren werden auch erst durch Proteasen aktiviert.

Von TAF sezernierte immunmodulierende Faktoren wie IGF und HGF haben sowohl direkte als auch indirekte Wirkungen auf das Tumorwachstum. Sie fördern die Angiogenese (Moschos und Mantzoros 2002; Maulik *et al.* 2002) und modulieren die Immunantwort. Doch im etablierten Tumor können häufig keine aktiven Immunzellen identifiziert wer-

den. Ein Ungleichgewicht verschiedener T-Helferzellen (Th1 und Th2) weist darauf hin, dass deren normale Funktion im Tumor unterdrückt wird (Shurin *et al.* 1999). Auch *interferon gamma* (IFNG), *interleukin 6* (IL6) und *tumor necrosis factor* (TNF) werden von TAF sekretiert (Silzle *et al.* 2004).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch der Metabolismus der TAF tumorfördernd wirken kann, indem die Fibroblasten toxische Stoffwechselprodukte der Tumorzellen entgiften und das saure Milieu der Tumore puffern (Koukourakis *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang zeigen Studien auch, dass die TAF die Sensitivität der Tumorzellen gegen eine Chemotherapie verringern können. In *in vitro*-Assays wurde die erhöhte Resistenz von Pankreas-Tumorzellen gegen Etoposid gezeigt, sowohl bei Kokultur mit TAF als auch hervorgerufen durch konditioniertes Medium, das von TAF sekretierte Wachstumsfaktoren enthielt (Müerköster *et al.* 2004). Auch für Brust- und Ovarialtumore wurde eine erhöhte Resistenz festgestellt, bei Ovarialtumoren durch eine starke *transforming growth factor, beta-induced* (TGFBI)-Expression (Shekhar *et al.* 2007; Ahmed *et al.* 2007).

3.1.3. Herkunft der Tumor-assoziierten Fibroblasten

Die Ursprungszelle, aus der sich TAF entwickeln, wird unter Wissenschaftlern kontrovers diskutiert. Übersichtsartikel beschreiben verschiedene Möglichkeiten der Entstehung, die sich nicht ausschließen und die sich ergänzen könnten (Haviv *et al.* 2009; Shimoda *et al.* 2010).

Es wird vermutet, dass die meisten TAF aktivierte Fibroblasten sind, die schon vorher in ruhendem Zustand im Gewebe vorhanden waren (Kalluri und Zeisberg 2006). In Zellkultur-Experimenten kann der Wachstumsfaktor *transforming growth factor beta* (TGF β) die Aktivierung von Fibroblasten verursachen (Rønnov-Jessen und Petersen 1993). Das lässt eine entsprechende Rolle *in vivo* plausibel erscheinen. Maus-Tumormodelle mit TGF β -Rezeptor-*knockout* zeigen jedoch auch ohne TGF β -Signale die desmoplastische Reaktion (Bhowmick *et al.* 2004a). Das ist ein Hinweis darauf, dass weitere Faktoren, beispielsweise *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *fibroblast growth factor 2* (FGF2), eine Rolle bei diesem Prozess spielen (Elenbaas und Weinberg 2001). Dass diese Aktivierung der TAF auch die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Auswirkungen auf Epithelzellen hat, zeigt eine Studie im Maus-Modell, wobei Fibroblasten, die TGF β oder HGF exprimieren, die Entstehung von Brusttumoren aus normalen Epithelzellen verursachen (Kuperwasser *et al.* 2004). Hier erleichtern die aktivierten Fibroblasten also die Tumorgenese. Viele andere Wachstumsfaktoren erhöhen die Proliferation der TAF, ohne dass andere für die Aktivierung typische Eigenschaften wie erhöhte ECM-Produktion oder die Expression von α SMA induziert werden (Kalluri und Zeisberg 2006). Diese Art der Aktivierung von vorhandenen Fibroblasten wird seit Dvorak (1986) häufig mit den Prozessen während der Wundheilung verglichen, bei der Fibroblasten und Epithelzellen proliferieren, um die Wunde zu schließen. Entsprechend gibt es in einem

Maus-Modell auch Hinweise, dass ohne diese desmoplastische Reaktion die lokale Invasion und die Metastasenbildung in späteren Tumorstadien verstärkt auftreten (Barsky und Gopalakrishna 1987). Dies deutet darauf hin, dass die Desmoplasie als Schutzmechanismus fungieren sollte.

Zusätzlich können TAF aus rekrutierten Zellen wie Fibrozyten und mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (*bone marrow derived cell*, BMC) entstehen, die aus der Blutbahn in den Tumor einwandern und dort differenzieren. In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass der Anteil der aus BMC entstandenen TAF bis zu 40 % betrug (Ishii *et al.* 2003; Quante *et al.* 2011) und diese auch funktionelle Marker der TAF exprimieren (Direkze *et al.* 2006). Außerdem wurden im Tumor einer Patientin mit einer vorangegangenen Knochenmarkstransplantation eines männlichen Spenders Fibroblasten dieses Donors nachgewiesen (Worthley *et al.* 2009). In 14 von insgesamt 15 untersuchten Tumoren und zwei von drei untersuchten Präkanzerosen fanden sich jedoch keine Spender-Fibroblasten, wobei diese Tumore nur einen geringen TAF-Anteil aufwiesen. Das Ausmaß dieser Transdifferenzierung zu TAF ist daher in menschlichen Tumoren unklar und möglicherweise auch vom Tumortyp abhängig.

Außerdem wurde auch die Umwandlung von Endothelzellen zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen nachgewiesen. Dieser Prozess wird als Endotheliale-Mesenchymale Transition bezeichnet (*endothelial to mesenchymal transition* (EndMT), Zeisberg *et al.* 2007). Auch Marker für Perizyten wurden in diesen Fibroblasten-ähnlichen Zellen im Tumor identifiziert (Sugimoto *et al.* 2006).

Die TAF, die durch Wachstumsfaktor-Aktivierung oder BMC-Differenzierung entstehen, weisen keine genetischen Veränderungen auf. Anders sieht es bei den zwei im Folgenden beschriebenen Hypothesen der TAF-Entstehung aus, die darauf gründen, dass auch Mutationen in den TAF gefunden wurden. Die zugrunde liegenden Experimente sind allerdings technisch umstritten. So wurde in verschiedenen Publikationen für oder gegen das Vorhandensein von Mutationen (Patocs *et al.* 2007; Allinen *et al.* 2004) und Variationen der Anzahl von Gen-Kopien argumentiert (Tuhkanen *et al.* 2004; Qiu *et al.* 2008).

Die erste Hypothese lautet, die TAF können möglicherweise aus einer kleinen Population genetisch veränderter Fibroblasten entstehen. Die Ursache der Mutation kann ein Karzinogen gewesen sein und die Folge eine erhöhte Proliferation und damit Verdrängung der nicht-mutierten Fibroblasten - als direkte Folge der Mutation oder als Antwort auf Stress. Einerseits kann die Mutation gleichzeitig die Ursache für die Aktivierung sein, andererseits könnte sie aber auch keine Relevanz für den aktivierten Phänotyp der TAF haben. Maffini *et al.* (2004) zeigten in Ratten, dass im Epithel-freien Fettgewebe der Brust mit einem Karzinogen behandelte Fibroblasten die Tumorgenese von behandelten und unbehandelten implantierten Epithelzellen induzieren. Leider wurden weder die implantierten Zellen auf Fibroblasten-Marker, noch die behandelten Fibroblasten im Fettgewebe auf Mutationen untersucht.

Die zweite Hypothese basiert auf der Beobachtung der Transition von Epithelzellen zu Fibroblasten bei fibrotischen Prozessen. Dieser Prozess wird als Epitheliale-mesenchymale Transition (*epithelial to mesenchymal transition* (EMT)) bezeichnet. Mit Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) behandelte Epithelzellen reagieren mit der Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies, die die Transdifferenzierung zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen erleichtern (Radisky *et al.* 2007). Ähnliche Vorgänge können in Tumoren stattfinden (Petersen *et al.* 2003), so dass mutierte Epithelzellen durch EMT zu mutierten Fibroblasten werden.

3.2. Lungenkarzinome

Die Mortalität bei Lungenkrebs ist hoch. Weltweit starben 2008 1,4 Millionen Menschen an Lungenkrebs (Jemal *et al.* 2011). Obwohl in den letzten Jahren viele Mechanismen der Tumorentstehung und -progression aufgeklärt wurden und neue Medikamente die klinische Zulassung erhielten, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur bei 16 % und ist seit 1975 nur geringfügig gestiegen (Siegel *et al.* 2011). In Deutschland sind Lungentumore die vierthäufigste Tumorerkrankung mit fast 50 000 Erkrankungen im Jahr 2008 (Ferlay *et al.* 2011¹). Damit liegt die Alters-standardisierte Erkrankungsrate bei 28,1 Fällen pro 100 000 Einwohnern, bei einer nur wenig geringeren Mortalität von fast 42 000 Fällen (ASR 22,6 pro 100 000 Einwohner). Lungenkarzinome sind damit die häufigste Tumorbedingte Todesursache in Deutschland. Männer erkranken und sterben 2,3fach häufiger als Frauen an Lungenkrebs (Abbildung 3.2, A).

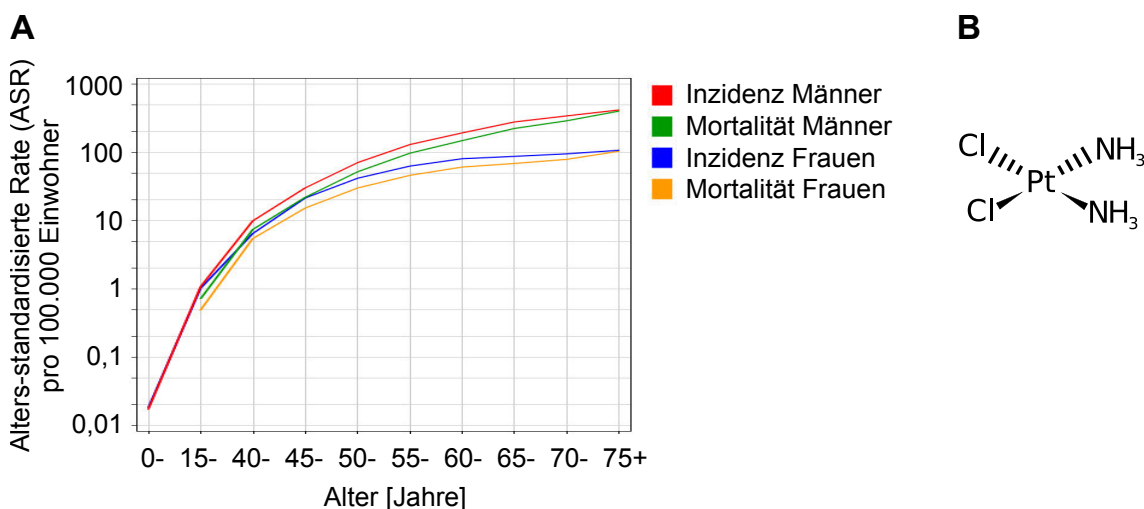


Abbildung 3.2.: Inzidenz und Mortalität von Lungentumoren sowie Struktur von Cisplatin.

A: Alters-standardisierte Rate der Inzidenz und Mortalität von Lungentumoren bei Männern und Frauen pro 100 000 Einwohner, Deutschland 2008. Inzidenz und Mortalität sind sehr ähnlich und steigen mit zunehmendem Alter an (Ferlay *et al.* 2011¹). **B:** Strukturformel von Cisplatin, dem Zytostatikum, das Basis der meisten Chemotherapien gegen Lungentumore ist.

¹<http://globocan.iarc.fr/>

Lungentumore sind eine sogenannte Alters-Erkrankung mit einem medianen Erkrankungsalter von 69 Jahren, deren Hauptursache das Rauchen ist (Kaiser *et al.* 2011). Es werden zwei histologische Typen unterschieden: Die selteneren, sehr aggressiven, früh metastasierenden Kleinzelligen (SCLC) und die häufigeren, langsamer metastasierenden Nicht-Kleinzelligen Lungentumore (NSCLC) (Brambilla *et al.* 2001). NSCLC werden weiter in Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome (squamöse Tumore), Adenosquamöse Karzinome und Großzellige Tumore unterschieden.

Patienten mit NSCLC können in frühen Tumorstadien operiert werden, ebenso wie solche mit Metastasen anderer Tumore in der Lunge. Nur selten können die Tumore vollständig entfernt werden, daher kann im Anschluss an die Operation eine Chemotherapie, Bestrahlung oder eine Kombination aus beiden Therapien für den Patienten von Vorteil sein (Pfister *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006; Wakelee *et al.* 2007). Bei fortgeschrittenem Kleinzelligen Karzinom stehen nur Chemotherapie und Bestrahlung zur Verfügung, da aufgrund des schnellen Krankheitsverlaufs keine Operation mehr möglich ist. Cisplatin ist das bevorzugte Chemotherapeutikum bei Lungentumoren (Ceppi *et al.* 2009, Abbildung 3.2, B), meist in Kombination mit anderen Medikamenten, beispielsweise Gemcitabin, Vinorelbin oder Paclitaxel. In den letzten Jahren wurden zunehmend gezielte Therapien in die Behandlung einbezogen. Dabei stehen *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Inhibitoren wie Gefitinib bereits als primäre Therapie zur Verfügung, wenn EGFR im Tumor verstärkt exprimiert wird oder mutiert ist (Mok *et al.* 2009). Auch Erlotinib ist für die Behandlung von Lungenkarzinomen zugelassen (Cohen *et al.* 2010). Außerdem wird die anti-angiogene Therapie mit Bevacizumab in Kombination mit Chemotherapeutika verwendet, um die Blutversorgung der Tumore zu hemmen (Laskin und Sandler 2005).

3.3. Das Tumorsuppressor-Gen *tp53*

Das Tumorsuppressorgen *tumor protein p53* (*tp53*), welches das p53-Protein codiert, ist eines der am häufigsten inaktivierten Gene in Tumoren (Hollstein *et al.* 1991). p53 hat vielfältige Funktionen bei der Regulation von Zellzyklus, Apoptose, Seneszenz, Zelldifferenzierung, DNA-Metabolismus und -Stabilität und der Immunantwort (Suzuki und Matsubara 2011). Diese Wirkungen werden durch unterschiedliche Aktivierung von Zielgenen im Zellkern (nukleäre Funktionen) oder die Bindung an verschiedene Proteine in der Zelle (zytoplasmatische Funktionen), vor allem am Mitochondrium erzielt (Voussen und Prives 2009). Die Hauptfunktion ist dabei die Regulation der Balance zwischen Proliferations-Stopp und Apoptose-Induktion. Als Marker für diese Prozesse wird üblicherweise die Transkription von *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (*p21*) (*CDKN1A*) bei der Hemmung der Proliferation und von *BCL2 binding component 3* (*BBC3*) und *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (*PMAIP1*) für die Induktion von Apoptose verwendet (Soussi und Bérout 2001).

Das p53-Protein enthält 393 Aminosäuren und ist 53 kDa groß (Übersichtsartikel May und May 1999). Vom N- zum C-Terminus besitzt es eine Transaktivierungs- (TAD), eine Prolinreiche (PRD), eine DNA-Binde- (DBD) und eine Oligomerisierungs-Domäne (OD) (Abbildung 3.3, A). Nach Bindung der DBD an die Erkennungssequenz in der DNA der Zielgene kann die TAD die Transkription dieser Gene aktivieren. Mit Hilfe der OD bildet p53 Tetramere aus, die die aktive Form des Proteins in der Zelle sind. In der TAD und in und um die OD befinden sich Signale für die Lokalisation im Zellkern (*nuclear localisation signal*, NLS) und den Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma (*nuclear export signal*, NES) (May und May 1999). Auch weitere Interaktionen mit anderen Proteinen an allen Aminosäuren von p53 sowie posttranslationale Modifizierungen regulieren die Aktivität und Verfügbarkeit von p53 (*p53 knowledgebase*¹).

Das p53-Protein ist normalerweise nur in geringen Mengen in den Zellen vorhanden, da es von *Mdm2 p53 binding protein homolog* (MDM2) zum proteasomalen Abbau markiert wird. p53 wird durch verschiedene Stressfaktoren nach Phosphorylierung stabilisiert, unter anderem durch die in Tumorzellen wichtige Onkogen-Aktivierung oder durch Hypoxie (May und May 1999). Vousden und Prives (2009) schlagen ein Modell vor, in dem die p53-Stabilisierung von vielen Variablen abhängig ist. Danach erfüllt p53 als Antwort auf ein niedriges Stresslevel seine normalen Funktionen im Zellzyklus-Arrest, der Apoptose, dem Metabolismus und der DNA Reparatur (Abbildung 3.3, B). Bei hohem Stressniveau wird das Gleichgewicht in Richtung Apoptose und Seneszenz verschoben. So kann p53 die Entstehung von Tumoren zum Beispiel aufgrund zu großer DNA-Schäden verhindern.

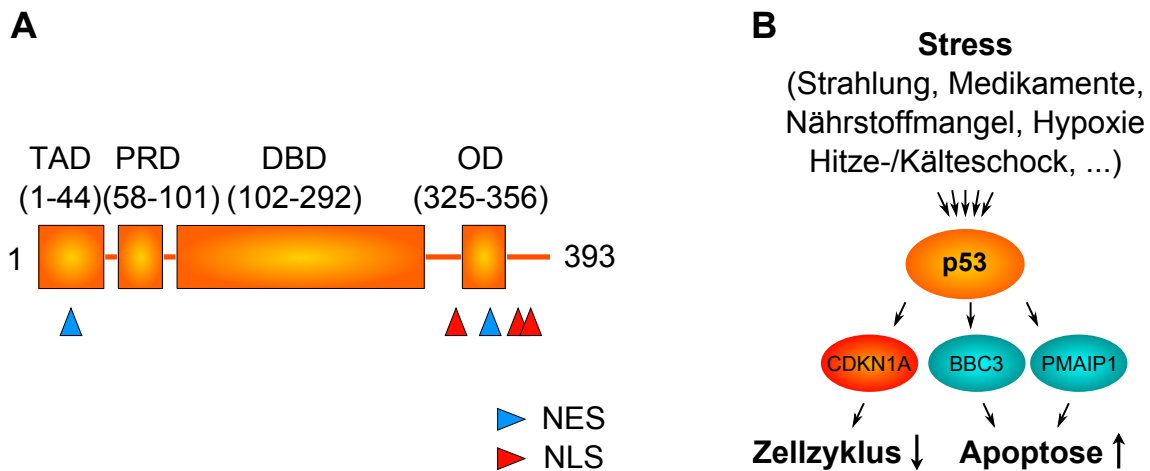


Abbildung 3.3.: p53.

A: Domänenstruktur des p53-Proteins, TAD Transaktivierungs-Domäne, PRD Prolinreiche Domäne, DBD DNA-Binde-Domäne, OD Oligomerisierungs-Domäne, NES nukleäres Exportsignal, NLS nukleäres Lokalisierungssignal. **B:** Schema des p53-Signalweges mit Betonung der Eingangssignale, der Marker für die Aktivierung von p53 und der Reaktion der Zelle.

¹<http://p53.bii.a-star.edu.sg>

In der IARC-TP53-Mutations-Datenbank (Petitjean *et al.* 2007, Release 15¹) sind 27 580 somatische *tp53*-Mutationen aufgeführt. Mutiertes p53 kann häufig seine normalen Funktionen nur eingeschränkt erfüllen, was zur Tumorentstehung beiträgt. In Patienten mit vererbten p53-Mutationen, dem sogenannten Li-Fraumeni-Syndrom, ist die Mutation eine häufige Ursache der Tumorentstehung. Obwohl jede Zelle dieser Patienten eine *tp53*-Mutation trägt, entwickeln sich relativ wenige Tumore, wovon nur 2,5 % Tumore der Lunge sind (Kleihues *et al.* 1997; Petitjean *et al.* 2007). Li-Fraumeni-Patienten entwickeln während ihres Lebens im Median weniger als 2 Tumore, was zu der Ansicht führte, dass in Tumoren mit somatischer p53-Mutation diese eine Folgemutation ist, die dem Tumor ein besseres Wachstum ermöglicht (Vogelstein 1990). Xue *et al.* (2007) konnten zeigen, dass die Reaktivierung von normalem p53 dies rückgängig machen kann und die Regression von Tumoren in Mäusen auslöst.

Meist ist die DNA-Bindedomäne mutiert, so dass die Transkription von Zielgenen verändert wird (Funktionsverlust). Es sind jedoch auch Mutationen beschrieben, durch die p53 neue Funktionen zur Förderung des Tumorwachstums erhält. Insgesamt spielen also sehr viele Faktoren wie die Art der Mutation, des Stressauslösers und sogar des Gewebetyps und der Mikroumgebung im Tumor eine Rolle dabei, wie die Zelle beispielsweise auf eine Behandlung reagieren wird (Vousden und Prives 2009).

Für Lungentumore wurde eine somatische Mutationsrate von 37,4 % ermittelt (Petitjean *et al.* 2007¹). Laut der *p53 knowledgebase* sind über 870 unterschiedliche Mutationen in den Exons von *tp53* allein aus Lungen- und Bronchusgewebe bekannt, die unterschiedliche funktionelle Konsequenzen haben (Lim *et al.* 2007²). Dabei korreliert die Häufigkeit somatischer Mutationen mit dem Grading der Tumore. In einer Untersuchung von 188 Lungen-Adenokarzinomen fanden Ding *et al.* (2008) *tp53*-Mutationen in 13 %, 24 % beziehungsweise 52 % der Tumore mit Grading 1 bis 3. Die Mutationen korrelieren auch mit erhöhter genomischer Instabilität und Verlust von DNA-Kopien. Die Autoren fanden 26 in Lungentumoren häufig mutierte Gene, von denen *tp53* am häufigsten mutiert war. Diese Mutationen werden als relativ frühe Ereignisse bei der Entwicklung von Lungentumoren angesehen, die möglicherweise für die Erhaltung der malignen Eigenschaften benötigt werden. So wurde zwischen primären Lungentumoren und Lymphknoten-Metastasen eine Übereinstimmung der Mutationen von 93 % identifiziert (Chang *et al.* 2011).

Ob *tp53*-Mutationen sich auf die Prognose der Patienten auswirken, ist noch nicht abschließend geklärt. Laut der IARC-TP53-Datenbank³ gibt es acht Publikationen mit Kohorten von mindestens 50 Patienten, die einen Zusammenhang zwischen einer *tp53*-Mutation und einer schlechten Prognose für Lungentumor-Patienten zeigen, sechs Publikationen konnten jedoch keinen Zusammenhang nachweisen. Auch Meta-Analysen verschiedener Studien ergaben widersprüchliche Resultate (Huncharek *et al.* 2000; Mitsudo-

¹www-p53.iarc.fr

²<http://p53.bii.a-star.edu.sg>

³<http://www-p53.iarc.fr/Slideshow.html>

mi *et al.* 2000). Tsao *et al.* (2007) untersuchte die Auswirkungen von *tp53*-Mutationen auf den Nutzen einer Cisplatin-Vinorelbin-Chemotherapie und fand weder prognostische noch prädiktive Eigenschaften einer Mutation. Dafür war die immunhistochemisch nachgewiesene p53-Überexpression in 52 % der Tumore sowohl mit dem schlechteren Überleben ohne Behandlung als auch mit einem besseren Ansprechen auf die Behandlung korreliert.

3.4. PDGF-Rezeptor-Signalweg und Kinase-Inhibitoren

Der *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) ist ein zentraler Wachstumsfaktor-Rezeptor für Fibroblasten (Übersichtsartikel Andrae *et al.* 2008). Die Aktivierung des Signalwegs ist abhängig von der Bindung der *platelet-derived growth factors* (PDGFs) an die Rezeptoren (Abbildung 3.4 auf der nächsten Seite, A) und führt zur Proliferation der Fibroblasten und damit auch zur desmoplastischen Reaktion.

Die PDGF-Liganden werden von vier Genen codiert (*PDGF-A*, *-B*, *-C*, *-D*). Das PDGF-AB-Heterodimer wurde zuerst aus Blutplättchen isoliert, *in vivo* wird aber eine dominante Rolle der Homodimere aufgrund zellspezifischer Expression angenommen (Andrae *et al.* 2008). Ein PDGF-Monomer ist circa 15 kDa groß. Die PDGFs haben eine gemeinsame Wachstumsfaktor-Kerndomäne (*core domain*) mit den *vascular endothelial growth factors* (VEGFs) und die frühere Unterscheidung von PDGFs und VEGFs wird wegen neu gefundener überlappender Rezeptor-Bindung wieder diskutiert (Ball *et al.* 2007). Für eine Bindung an die Rezeptoren ist die Kerndomäne notwendig. Sie ist auch für die Aktivierung der Signalwege verantwortlich. Diese Domäne enthält konservierte Cysteine, die sowohl innerhalb eines Proteins als auch zwischen zwei PDGF-Proteinen Bindungen ausbilden (Heldin und Westermark 1999). Die vier PDGFs zeigen aufgrund von Bindungen an die extrazelluläre Matrix nur eine eingeschränkte Diffusion. Bei der PDGF-A- und -B-Unterfamilie wird diese durch ein C-terminales Motiv vermittelt (*basic retention motif*), PDGF-C und -D haben eine N-terminale CUB-Domäne (für *complement proteins C1r/C1s*, *UEGF* and *BMP1*). Die ECM-Bindung wird durch alternatives Splicing reguliert oder die Domäne kann proteolytisch entfernt werden (Andrae *et al.* 2008).

Mesenchymale Zellen exprimieren zwei PDGF-Rezeptoren, PDGFR- α und - β , die circa 170 und 180 kDa groß sind. Diese besitzen extrazellulär jeweils fünf Immunglobulin-Domänen zur Ligandenbindung und Stabilisierung der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion und intrazelluläre Tyrosinkinase-Domänen (Abbildung 3.4, A). Bei einer Ligandenbindung dimerisieren die Rezeptoren als Homo- und Heterodimere. Diese zeigen für verschiedene PDGF-Dimere unterschiedliche Bindungsspezifitäten, wobei *in vitro* mehr Möglichkeiten gezeigt wurden, als bisher *in vivo* gefunden wurden (Andrae *et al.* 2008). Die Dimerisierung induziert PDGFR-Autophosphorylierung an verschiedenen Stellen der Proteine. Die Phosphorylierung eines konservierten Tyrosinrestes in der Kinasedomäne erhöht die katalytische Effizienz (Keating *et al.* 1988), während

Tyrosin-Phosphorylierungen außerhalb dieser Domäne Bindestellen für Proteine mit einer SH2-Domäne schaffen. An diese Phosphotyrosine binden entweder Adapter-vermittelt oder direkt Proteine zentraler Signaltransduktionsketten wie *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase* (PIK3, alias PI3K), *phospholipase C, gamma* (PLC γ), *v-src sarcoma viral oncogene homolog* (SRC), *Ras* und andere (Andrae *et al.* 2008). Negative Rückkopplungen regulieren die Aktivität der PDGF-Rezeptoren und der Signalkettenproteine, beispielsweise über *RAS p21 protein activator* (*GTPase activating protein*, GAP), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11* (PTPN11). Außerdem wird die Aktivität der PDGF-Rezeptoren durch die Interaktion mit Integrinen und die Internalisierung der Rezeptoren gesteuert. Die Effekte der Rezeptor- und Signalketten-Aktivierung bestehen aus veränderter Genexpression, Wachstumsstimulation, Aktinskelett-Reorganisation, Regulation von Chemotaxis und Hemmung der Apoptose. Dabei haben die verschiedenen Rezeptor-Dimere überlappende, aber nicht deckungsgleiche Effekte (Heldin und Westermark 1999). Außerdem kann die Art der Regulation, beispielsweise die Stimulation oder Hemmung der Chemotaxis, zelltypabhängig sein. Im Zusammenhang mit Tumoren wirken sich PDGF-Signale auf Wachstum, Angiogenese, Metastasenbildung und das Vermeiden der Immunantwort aus, also auf vier der *Hallmarks of Cancer* (Hanahan und Weinberg 2011), sowie auf die Resistenz gegen Chemotherapie. Damit ist der PDGF-Signalweg ein attraktives Ziel für eine Krebstherapie.

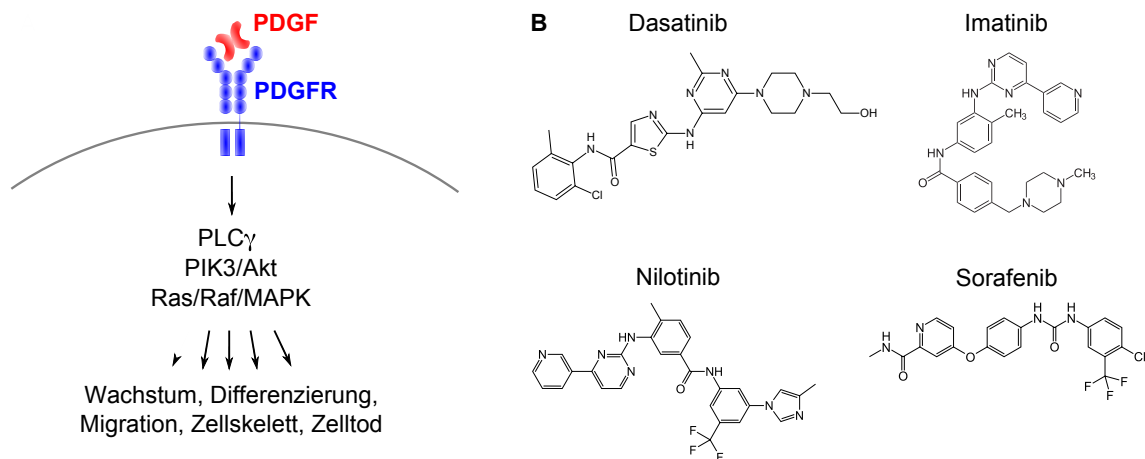


Abbildung 3.4.: Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR)-Signalweg und -Inhibitoren.

A: Schema des PDGFR-Signalweges mit Betonung der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindung, der Haupt-Signaltransduktionswege und der Reaktion von Fibroblasten. **B:** Strukturformeln der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, klinisch zugelassenen PDGFR-Inhibitoren.

Die Bedeutung des PDGFR-Signalweges in Tumoren wurde vor allem durch Studien an Maus-Modellen validiert. So wurde die Bedeutung von PDGF für die desmoplastische Reaktion mit Hilfe von Xenotransplantaten mit der humanen Tumorzelllinie MCF7 untersucht (Shao *et al.* 2000). Aufgrund einer Transfektion mit dominant-negativem PDGFA sekretierten diese Tumorzellen nur noch wenig PDGF. In diesem Modell fehlte die desmo-

plastische Reaktion der entstehenden Tumore. In einer anderen Studie führten parakrine PDGF-Signale von transfizierten Tumorzellen zu deutlich verringerter Nekrose der Tumore, begleitet von der Rekrutierung von Bindegewebszellen in den Tumor und der Bildung neuer Blutgefäße (Forsberg *et al.* 1993). Die Hemmung von PDGFR durch Kinase-Inhibitoren führt außerdem zu direkten anti-Tumor-Effekten. So zeigte sich im Modell die Hemmung der Progression und ein langsames Tumorstadium, mit verursacht durch die verminderte Sekretion von Wachstumsfaktoren der TAF (Pietras *et al.* 2008). Vergleichbare Effekte wurden auch für eine Kombinationstherapie mit einem PDGFR-Inhibitor und Irinotecan gefunden (Kitadai *et al.* 2006). PDGFR-Inhibitoren vermindern auch den Flüssigkeitsdruck in Tumoren, der ein Grund für die schlechte Aufnahme von chemotherapeutischen Medikamenten ist (Pietras *et al.* 2001).

Epithelzellen in humanen Lungentumoren sind PDGFR-negativ. Lungentumorgewebe-Microarrays zeigten hingegen PDGFR-Expression in Fibroblasten und Perizyten. Dabei wurde eine mehr als zweifach stärkere Expression von PDGF- β -Rezeptor- als PDGF- α -Rezeptor detektiert (Paulsson *et al.* 2009). Diese Studie wies außerdem für Brusttumore eine Korrelation zwischen PDGFR-positiver Färbung der TAF und halbiertes Erkrankungs-spezifischer Überlebenszeit nach. Andererseits zeigten Nakamura *et al.* (2003), dass *PDGFB* schon in Lungentumoren des Stadiums IA niedriger exprimiert ist als in Normalgewebe. Das Ausmaß des PDGF-Einflusses in humanen Lungentumoren muss also noch weiter untersucht werden.

Die PDGFR-Aktivität kann mittels Kinase-Inhibitoren gehemmt werden (Abbildung 3.4, B). Diese sind meist Substanzen mit geringem Molekulargewicht und hemmen die Kinasen in der Regel reversibel durch Bindung an die ATP-Bindestelle (Buchdunger *et al.* 2000; Montero *et al.* 2011). Die meisten klinisch zugelassenen Inhibitoren wurden gegen das Onkogen *Bcr/Abl* entwickelt und hemmen neben dem PDGF-Rezeptor auch ein unterschiedliches Spektrum anderer Kinasen. Auch die Hemmung der Kinase-Domäne erfolgt durch Bindung an unterschiedliche Konformationen und mit unterschiedlicher Effektivität (Bauman *et al.* 2007; Weisberg *et al.* 2005; Vajpai *et al.* 2008). Einige dieser Inhibitoren wurden in klinischen Studien bereits gegen Fibrose eingesetzt, eine krankhafte Vermehrung des Bindegewebes. Diese Erkrankung ist auch durch aktivierte Fibroblasten gekennzeichnet, doch die ausgeprägte Gefäßneubildung wie in Tumoren fehlt hier.

3.5. Ziel der Arbeit

Tumor-assoziierte Fibroblasten modulieren verschiedenste Tumoreigenschaften und spielen eine aktive und zentrale Rolle im Netzwerk der Tumore. Daher sind sie ein attraktives Therapieziel, um die Behandlung zu verbessern. Die Aktivität von Kinasen ist in allen zellulären Signalketten nötig, sowohl in TAF als auch in Tumorzellen. In zahlreichen Tumorerkrankungen wurde eine deregulierte Kinase-Aktivität als Ursache oder Nebeneffekt festgestellt (Shchemelinin *et al.* 2006a,b). Über die Wirkung von Kinase-Inhibitoren auf

TAF liegen aber keine systematischen Untersuchungen vor. Ein bei Lungentumoren häufig verwendetes Chemotherapeutikum ist Cisplatin. Auch dessen Wirkung auf TAF ist in Lungentumoren nur wenig untersucht worden.

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Punkte geklärt werden:

1. Die Wirkung von Kinase-Inhibitoren auf TAF

Ein *Screen* sollte klären, welche Inhibitoren die TAF am stärksten hemmen und damit für weitere Untersuchungen am lohnenswertesten erscheinen. Der Effekt dieser Inhibitoren sollte sowohl funktionell als auch auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Ziel ist die Identifizierung von Substanzen, die auf TAF wachstumshemmend wirken und ihre im Tumor veränderten Eigenschaften normalisieren, um so das Gesamtsystem des Tumors zu destabilisieren.

2. Die Wirkung von Cisplatin auf TAF

Voruntersuchungen zeigten eine hohe Variabilität der TAF-Anwort auf die Cisplatin-Behandlung in MTT-Experimenten (Sonnenberg *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von Cisplatin weiter funktionell untersucht und die Ursachen der Heterogenität der TAF aus verschiedenen Patienten eingegrenzt werden. Ein Schwerpunkt stellte dabei die Untersuchung der Cisplatin-induzierten p53-Antwort von TAF und Tumorzellen im etablierten Gewebekulturmodell dar.

3. Die Wirkung von Cisplatin in Kombination mit Kinase-Inhibitoren auf TAF

Monotherapien mit einem Medikament zeigen nach klinischer Erfahrung selten langfristige Erfolge bei der Behandlung der Patienten. Daher sollten auch die Auswirkungen der kombinierten Behandlung aus Cisplatin und solchen Kinase-Inhibitoren, die in Punkt 1 als wirksam identifiziert wurden, funktionell untersucht werden.

4. Die Unterschiede zwischen TAF und NAF

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit ein Vergleich von TAF und Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten (NAF) angestrebt. Sowohl basale Unterschiede in unbehandeltem Zustand als auch Unterschiede in der Sensitivität auf die verwendeten Medikamente sollten im Zellkultur-Modell untersucht werden.

Bisher wurden in der Arbeitsgruppe die TAF-Zellkultur und die *ex vivo*-Kultivierung von Tumor-Schnitten als sich ergänzende Modelle verwendet. Während die Monokultur das am stärksten vereinfachte Modell ist, stellt die Gewebeschnittkultur das Modell dar, das der Realität im menschlichen Tumor am nächsten kommt. Durch verschiedene Tumorphistologien, unterschiedliche Anteile der Zelltypen und andere Faktoren ist die Heterogenität im Tumorgewebe aber sehr hoch. Außerdem ist das Material nur einige Tage lang kultivierbar und die Verfügbarkeit ist begrenzt. Daher war ein weiteres, technisches Ziel der vorliegenden Arbeit:

5. Die Etablierung eines Kokultur-Modells aus TAF und Tumorzellen

Das Kokultur-Modell sollte die Untersuchung der Wechselwirkungen von TAF und Tumorzellen im vereinfachten System, standardisierter und leichter wiederholbar erlauben. In diesem System spielen sowohl soluble Wachstumsfaktoren als auch direkte Zell-Zell-Kontakte eine Rolle, was es von einfacheren Modellen mit konditioniertem Medium abgrenzt.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Bezugsquellen

Die verwendeten Chemikalien wurden hauptsächlich von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) und Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) bezogen, Medienzusätze und Enzyme von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Zellkultur-Gefäße von Corning GmbH (Kaiserslautern), Multimed Wicker GmbH (Kirchheim/Teck), Greiner Bio One (Frickenhausen) und Nalgene Nunc International (Wiesbaden), sowie Geräte wie beispielsweise Zentrifugen und Sterilbänke von Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen) und Heraeus (Hanau). Die Bezugsquellen für weitere Geräte, *Kits*, Antikörper und Zellkulturbedarf finden sich in den folgenden Tabellen 4.1 bis 4.4.

Tabelle 4.1.: Bezugsquellen für Geräte

Gerät	Hersteller
5100 Cryo 1°C Box ‚Mr. Frosty‘	Nalgene Nunc International, Wiesbaden
Cell Strainer 70 µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Dako Automation Stainer	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikroskop DM 4000 B mit Zweifach-Einblicksystem	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Krumdieck Tissue Slicer	Krumdieck, Alabama Research and Development Corp., Munford, USA
LightCycler® 480	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
Mikrotom RM2255	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
NanoDrop™ 2000c	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Tabelle 4.2.: Bezugsquellen für Kits

Kit	Hersteller
ApopTag Plus Peroxidase <i>In Situ</i> Apoptosis Detection Kit S7101	Merck Millipore, Darmstadt
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
EnVision™ G 2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

Tabelle 4.3.: Bezugsquellen für Antikörper und Färbereagenzien

Substanz	Hersteller
AnnexinV-FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
AnnexinV-Alexa568	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
anti-BrdU	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-ESA-FITC, FM010	Biomeda Corp., USA
anti-FAP	Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart
anti-IgG-FITC	Immunoresearch, Jackson
anti-Ki67 MIB1	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
anti-p53 DM082, DO-7	Acris, Herford
BrdU	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
Count bright™ absolute counting beads	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
gam-DyLight488	dianova GmbH, Hamburg

Tabelle 4.4.: Bezugsquellen für Zellkultur-Medien und Medikamente

Medium/Medikament	Hersteller
Airway Epithelial Medium	PromoCell, Heidelberg
Cisplatin	Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart
Dasatinib	Research Chemicals Inc., Canada (Novartis Inc.)
Erlotinib	Research Chemicals Inc., Canada (Novartis Inc.)
Fetal Bovine Serum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Imatinib-Mesylat	Research Chemicals Inc., Canada (Novartis Inc.)
Liforlab Transportmedium	Onconscience AG, Wedel
Nilotinib	Research Chemicals Inc., Canada (Novartis Inc.)
RPMI1640	Biochrom AG, Berlin
Sorafenib	Research Chemicals Inc., Canada (Novartis Inc.)

4.1.2. Zelllinien, primäre Fibroblasten und Tumorgewebe

Die Bezugsquellen für die verwendeten Zellen, Zelllinien und Gewebe finden sich in Tabelle 4.5. Die demographischen Daten der Patienten, aus denen die TAF isoliert wurden, sind in Tabelle A.1 auf Seite 125 im Anhang dargestellt.

Tabelle 4.5.: Zelllinien, primäre Fibroblasten und Tumorgewebe

Material	Herkunft
Primäre Fibroblasten und Tumorgewebe	Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses, Stuttgart (Patienten der Klinik Schillerhöhe, Gerlingen), primäre Lungentumore und Metastasen
H1299/H2B:eGFP	Moshe Oren, <i>Weizmann Institute of Science</i> , Rehovot, Israel (Kanda <i>et al.</i> 1998)

4.1.3. Lösungen

Die Zusammensetzung verwendeter Lösungen finden sich in den Tabellen 4.6 und 4.7.

Tabelle 4.6.: Lösungen für die Zellkultur

Lösung	Zusammensetzung
Cell Rinse Puffer	120 mM NaCl, 15,6 mM Glukose, 2,5 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O, 5,4 mM KCl, 1 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM HEPES, pH 7,2
Einfriermedium	10 % DMSO, 90 % FBS
Medienzusätze	500 ml RPMI1640 wurden supplementiert mit 10 % oder 20 % (v/v) FBS, 0,1 g/l Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES pH 7,4, 2 mM L-Glutamin, 0,13 mM L-Asparagin, 0,05 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Natrium-pyruvat, 3 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren

Tabelle 4.7.: Lösungen für die Arbeit mit Nukleinsäuren

Lösung	Zusammensetzung
DNA-Isolationspuffer	75 mM 1 M NaCl, 0,5 % Tween20, 25 mM EDTA
6x Gel-Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 30 % Glycerol in H ₂ O
50x TAE	4 M Trisacetat, 0,1 M EDTA, pH 8,3
TE-Puffer	10 mM TRIS-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0

4.1.4. Software zur Datenanalyse

Die verwendete Software und Datenbanken finden sich in Tabelle 4.8.

Tabelle 4.8.: Software, Internet-Tools, Datenbanken

Software	
Excel, Visual Basic	Genset-Schnittmengen
Genespring GX	Microarray-Analyse
Prism5	Abbildungen und Statistik
Internet-Tools und Datenbanken	
Gene Ontology	www.geneontology.org – Gene Ontology Datenbank
GSEA	http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp – Microarray-Analyse, Gene Set Enrichment Analysis
IARC TP53 Datenbank	http://www-p53.iarc.fr – p53-Datenbank
NCBI BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ – Blasten von DNA- und Proteinsequenzen
NetAffx™	http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx – Microarray-Analyse

Netprimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html – Primerdesign
p53 knowledgebase Primer3	http://p53.bii.a-star.edu.sg/index.php – p53-Datenbank http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi – Primerdesign
qPrimerDepot	http://primerdepot.nci.nih.gov – Primerdatenbank für qRT-PCR-Primer
SOURCE	http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceBatchSearch – Vergleich der IDs verschiedener Microarrays
WebGestalt	http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt – Microarray-Analyse, GO-Slim

4.2. Methoden

4.2.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.2.1.1. Isolierung und Analyse von DNA

Isolierung genomischer DNA aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Tumormaterial

Von Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE)-Tumormaterial der Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses wurden jeweils sechs 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Falls nach Beurteilung der H&E-Färbungen der gesamte Schnitt aus Tumorgewebe bestand, wurden die Schnitte direkt im Reaktionsgefäß entparaffiniert. Sollte nur ein Teil des Schnittes verwendet werden, wurden diese auf Objektträgern getrocknet, der Bereich des Tumorgewebes mit Hilfe des H&E-Schnittes markiert und nach der Entparaffinierung mit einer Pipettenspitze vom Objektträger gekratzt.

Das FFPE-Gewebe wurde zweimal für jeweils 5-10 min mit 1 ml Microclear auf einer Rüttelplatte bei circa 150 rpm entparaffiniert, bei 13000 rpm 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Gewebe zweimal mit 1 ml Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach dem Verwerfen des Überstands bei 37 °C für 1-4 h getrocknet. Der anschließende Proteinase-Verdau zur Freisetzung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1 ml DNA-Isolationspuffer und 100 µl Proteinase K und Inkubation über Nacht bei 65 °C und 350 rpm im Thermomixer. Die klare Lösung wurde mit dem zweifachen Volumen an Roti[®]-Phenol versetzt, 15 min bei RT bei 800 rpm gemischt, 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde unter Verwendung von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol und anschließend mit Chloroform wiederholt. Danach folgte die Fällung der gDNA mit 25 µl 3 M Na-Acetat und 1 ml Ethanol bei -20 °C für 30 min. Nach Zentrifugation bei RT und 13000 rpm für 15 min wurde das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in 50-100 µl TE-Puffer resuspendiert. Der DNA-Gehalt wurde am NanoDrop[™] 2000c bestimmt.

PCR

Ein 50 µl-Standard-Reaktionsansatz beinhaltet 50 ng gDNA oder 4 µl verdünnte cDNA, je 1 µl Primer fw und rev (10 µM), 1 µl 10 mM dNTPs, 5 µl 10x PCR-Puffer und 0,5 µl DNA-Polymerase. Ein Standard-PCR-Programm besteht aus drei sich wiederholenden Schritten: Dem Aufschmelzen des dsDNA-Templates bei 94 °C, der Hybridisierung der Primer an komplementäre DNA-Sequenzen bei 50–65 °C (abhängig von der Primerlänge und -sequenz) und der Elongation der Primer bei 68–72 °C (abhängig von der verwendeten Polymerase). Die PCR zur Sequenzierung von *tp53* wurde nach einem Protokoll des IARC¹ durchgeführt (Primersequenzen siehe Tabelle A.7 auf Seite 132 im Anhang).

Aufreinigung von PCR-Produkten

Zu 15 µl PCR-Ansatz wurde ein Mix aus 6,84 µl ddH₂O, 2,5 µl CIAP-Puffer, je 0,33 µl ExoI (20 U/µl) und CIAP (1 U/µl) gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und danach 20 min bei 85 °C inaktiviert.

Gelelektrophorese

Die Länge der PCR-Produkte wurde mittels Gelelektrophorese im 1%igen Agarose-Gel analysiert.

Gelextraktion

Bei mehreren PCR-Produkten unterschiedlicher Länge wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten, zwischen zwei Stück Parafilm gequetscht und die DNA aus der austretenden Flüssigkeit mit einer Ethanol-Fällung gereinigt.

Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden nach Anleitung mit dem gewünschten Primer gemischt und durch die Firma StarSeq sequenziert. Die Primersequenzen finden sich in Tabelle A.7 auf Seite 132 im Anhang.

4.2.1.2. Isolierung und Analyse von RNA

Isolierung von RNA

Gefrorene Zellpellets wurden mit RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers behandelt, um die RNA zu isolieren. Eventuelle Kontaminationen mit gDNA wurden mittels DNase nach Anleitung des Herstellers entfernt. Die RNA-Konzentration wurde am NanoDropTM 2000c gemessen.

cDNA-Synthese

Die RNA wurde mittels RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des Oligo-dT-Primers behandelt. Die gewünschte Menge an RNA hierfür variierte in Abhängigkeit von der folgenden Anwendung (für qRT-PCR 2 µg, sonst 5 µg). Die erhaltene cDNA wurde nach der Abkühlung auf Eis 1:5 mit DEPC-Wasser verdünnt.

¹www-p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf

Messung der RNA-Menge durch Quantitative Real-Time PCR

Bei der qRT-PCR wird die Menge eines spezifischen Transkripts durch die Verwendung entsprechender Primer gemessen. Alle Primer wurden mit einer Anlagerungs-Temperatur von circa 57 °C geplant, damit viele PCRs parallel durchgeführt werden konnten. Die Länge der PCR-Produkte variierte zwischen 200 und 500 bp. Die Primer wurden möglichst so gewählt, dass sie in verschiedenen Exons lagen, um abzusichern, dass nur die mRNA und nicht mögliche gDNA-Verunreinigungen amplifiziert wurden. Viele der Primer wurden der qPrimerDepot-Datenbank entnommen (Cui *et al.* 2007¹). Bei der Etablierung wurde auf die Abwesenheit von Primer-Dimeren geachtet.

Für die qRT-PCR wurden 4 µl cDNA, je 1 µl Primer fw und rev (10 µM), 10 µl Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG und 4 µl DEPC-Wasser verwendet. Jede Reaktion wurde in technischen Triplikaten durchgeführt. Eine Reaktion ohne cDNA diente der Primer-Dimer-Kontrolle. Die PCR und Messung wurden am LightCycler[®] 480 (Roche) durchgeführt und die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode der zugehörigen LightCycler[®] 480-Software, version 1.5.

Für jede untersuchte Behandlung erfolgte eine Messung für β -Aktin oder GAPDH, welche als Normierung verwendet wurde. β -Aktin wurde aufgrund von Microarray-Daten ausgewählt, da es durch die Behandlung mit Dasatinib nicht reguliert wird. GAPDH wurde für Experimente verwendet, die mit denen unseres Kooperationspartners Moshe Oren (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) vergleichbar sein sollten. Nach der Normierung erfolgte die Berechnung des Unterschieds unbehandelter zu behandelten Zellen nach folgenden Formeln.

$$\text{Expressionslevel in unbehandelten Zellen} = 2^{Ct(TK) - Ct(AK)}$$

$$\text{Expressionslevel in behandelten Zellen} = 2^{Ct(TE) - Ct(AE)}$$

Ct = Zykluszahl

TK = Transkript in unbehandelten Zellen (Kontrolle)

AK = Aktin/GAPDH in unbehandelten Zellen (Kontrolle)

TE = Transkript in behandelten Zellen (Experiment)

AE = Aktin/GAPDH in behandelten Zellen (Experiment)

$$\begin{aligned} \text{Expressionslevel-Änderung} &= FC_{up} \\ &= \frac{\text{Expressionslevel in unbehandelten Zellen}}{\text{Expressionslevel in behandelten Zellen}} \\ &= 2^{[Ct(TK) - Ct(AK)] - [Ct(TE) - Ct(AE)]} \end{aligned}$$

$$FC_{down} = \frac{1}{FC_{up}}$$

Messung der RNA-Menge durch Microarray-Analyse

Die RNA neun verschiedener TAF und zwei NAF wurde mittels des *humangene1.0st-v1-Array* (Affymetrix) untersucht. Auf diesem Microarray sind die Proben für 28 132 Transkripte gespottet, die die *Ensembl*-Datenbank² als Gene annotiert.

Die TAF und NAF wurden für 48 h mit 0,1 µM Dasatinib behandelt (drei TAF und zwei

¹<http://primerdepot.nci.nih.gov>

²<http://www.ensembl.org>

NAF durch Silke Haubeiß, sechs TAF durch Jens Schmid). Als Kontrolle dienten unbehandelte TAF, die nach 48stündiger Behandlungsphase circa 90% Konfluenz erreichten. Von drei TAF und zwei NAF wurde ein Aliquot der geernteten Zellen mit PI-Färbung untersucht, um die Proliferationshemmung zu prüfen.

Die RNA-Hybridisierung wurde von MFTServices (Tübingen) durchgeführt. Die erhaltenen Signalstärken wurden mit Genespring GX mittels *Robust Multi-Array Average* (RMA) normalisiert und transformiert. Anschließend wurden mit einem gepaarten t-Test und Benjamini-Hochberg *False Discovery Rate*-Korrektur diejenigen Transkripte identifiziert, deren Expression durch Dasatinib-Behandlung mindestens zweifach signifikant ($p < 0,05$) erhöht oder verringert wurde. Für den Vergleich von TAF und NAF wurden nur die Expressionsänderungen betrachtet.

4.2.2. Arbeiten mit Zellkulturen

4.2.2.1. Isolierung und Kultur von Fibroblasten

Die Tumor-assoziierten und Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten (TAF und NAF) wurden aus Frischgewebe von Lungenkrebs-Patienten isoliert. TAF stammen aus Gewebe, das ein Pathologe makroskopisch als Tumor identifizierte. Die H&E- und immunhistochemischen Färbungen in der Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses bestätigten diese Diagnose. NAF stammen aus normalem Gewebe, das einem deutlich abgegrenzten Tumor benachbart lag. Die Frischgewebeproben wurden in Cell Rinse Puffer mit Protease (0,25 mg/ml), Kollagenase (167 U/ml) und DNaseI (250 U/ml) behandelt. Die Zellen wurden durch den *Cell Strainer* 70 μm gefiltert und anschließend in RPMI1640 mit 20 % FBS und weiteren Zusätzen (siehe Tabelle 4.6 auf Seite 33) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt und die Zellen wöchentlich circa 1:10 subkultiviert. Fibroblasten aus den Passagen 1, 2 und 3 wurden in Aliquots in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff gefroren und gelagert. Die Experimente erfolgten in den Passagen 3 bis 6 nach der Isolierung oder frühestens eine Woche nach dem Auftauen der kryokonservierten Zellen.

4.2.2.2. Kultur der H1299-Lungentumorzelllinie

Die H1299/H2B:eGFP wurden in RPMI1640 mit 10 % FBS und weiteren Zusätzen (siehe Tabelle 4.6 auf Seite 33) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt und die Zellen zweimal wöchentlich circa 1:10 gesplittet. Die Fluoreszenz des eGFP wurde regelmäßig und nach dem Reaktivieren der kryokonservierten Zellen getestet.

4.2.2.3. MTT

Die Zellviabilität kann mit Hilfe des Tetrazoliumsalzes MTT analysiert werden, das von Zellen zu einer violett gefärbten Formazanverbindung (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan) umgesetzt werden kann. Es wurden 7000 Zellen pro Loch der 96-Loch-Platte eingesät und 48 Stunden mit einer festen Konzentration der zu screenenden Substanzen einer Bibliothek oder steigenden Konzentrationen weiterer zu testender Medikamente inkubiert. TAF wachsen bei Konfluenz weiter und wachsen dann übereinander, was die Genauigkeit des MTT-Tests beeinträchtigen kann. Für die Vergleichbarkeit mit NAF wurde daher auf eine subkonfluente Kontrolle geachtet und die MTT-Experimente gegebenenfalls mit verringerter Zellzahl wiederholt. Bei der medikamentösen Behandlung von Patienten steigt die Medikament-Konzentration im Blut zunächst stark an, um danach langsam abzusinken. Der höchste Plasmaspiegel der Substanz wird als C_{\max} bezeichnet. Tabelle 4.9 zeigt den Konzentrations-Bereich der untersuchten Substanzen und die für die funktionellen Experimente verwendeten C_{\max} -Konzentrationen. Diese Konzentrationen wurden für die Vergleiche in Abbildung 5.2 auf Seite 45 und anderen verwendet.

Tabelle 4.9.: Konzentration der im MTT-Experiment untersuchten Medikamente und die durchschnittliche C_{\max} .

Medikament	Konzentration	C_{\max}	Referenz C_{\max}
Cisplatin	0-417,5 μM	11 μM	Ikeda <i>et al.</i> (1998)
Dasatinib	0-10 μM	0,11 μM	Wang <i>et al.</i> (2008)
Imatinib	0-20 μM	5,3 μM	Peng <i>et al.</i> (2005)
Nilotinib	0-20 μM	3,6 μM	Weisberg <i>et al.</i> (2007)
Erlotinib	0-20 μM	3,6 μM	Chiorean <i>et al.</i> (2008)
Sorafenib	0-20 μM	12 μM	Minami <i>et al.</i> (2008)

Fibroblasten reagieren ähnlich wie Tumorzelllinien mit einer Abnahme der Viabilität bei Zunahme der Cisplatin-Konzentration, deren Kurve einen sigmoidalen Verlauf zeigt. Abbildung 4.1 auf der nächsten Seite zeigt beispielhaft die Messergebnisse von *batch*-Triplikaten einer TAF. Betrachtet man die Viabilität der Fibroblasten bei der C_{\max} , so erhält man ein Maß für die Wirksamkeit des Medikaments. Für sigmoidale Kurven ist außerdem die GI_{50} (*growth inhibitory concentration 50*) ein übliches Maß für die Wirksamkeit von Medikamenten. Die Rohdaten wurden auf 1 normiert, *lg*-transformiert und anschließend mit Prism eine sigmoidale Dosis-Reaktions-Kurve mit variablem Anstieg extrapoliert (Grenzen zwischen 0 und 1). Die GI_{50} -Konzentration kann dann bei 50% relativer Viabilität ermittelt werden.

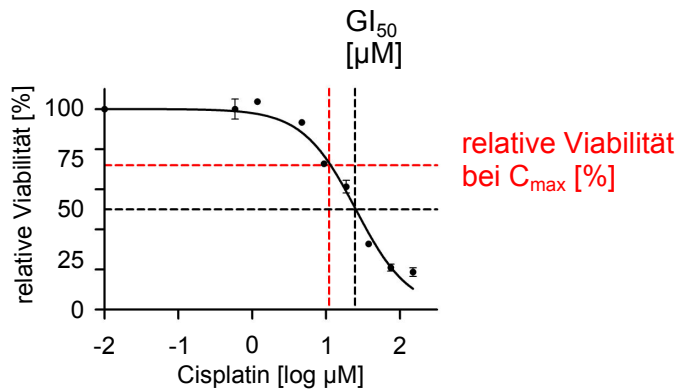


Abbildung 4.1.: Beispiel einer sigmoidalen Wachstumshemmung im MTT-Experiment mit steigenden Konzentrationen von Cisplatin.

gestrichelt, rot: Die Serumkonzentration von Cisplatin (C_{max}) liegt bei $11 \mu\text{M}$ ($\lg 11 = 1,04$), das zugehörige relative Wachstum der TAF liegt im Beispiel bei 72 %. **gestrichelt, schwarz:** Die GI_{50} wird bei 50 % relativer Viabilität bestimmt, bei diesem Beispiel liegt die zugehörige Cisplatin-Konzentration bei $22,9 \mu\text{M}$.

4.2.2.4. Detektion von Zelltod und Zellzyklusphasen mittels AnnexinV-PI-Färbung und BrdU-PI-Färbung der Zellen

Zur Detektion des Zelltods wurde AnnexinV eingesetzt, das an Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite sterbender Zellen bindet. Für die Untersuchung des Zellzyklus wurden die Zellen mit BrdU markiert, das in die DNA eingebaut und dort von einem Antikörper detektiert werden kann. Die Zellen wurden für 24 Stunden in der Regel mit der C_{max} -Konzentration des zu untersuchenden Medikaments behandelt. Unbehandelte Kontrollen blieben nach dieser Inkubationsdauer subkonfluent. Zelllinien wurden für 45 Minuten, Fibroblasten für eine Stunde 1:1000 mit BrdU inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, $\frac{2}{3}$ mit Ethanol fixiert und $\frac{1}{3}$ direkt mit AnnexinV-FITC und PI nach Angaben des Herstellers gefärbt. Die fixierten Zellen wurden über Nacht bis 3 Monate bei 4°C gelagert und nach Angaben des Herstellers mit anti-BrdU, gam-dylight488 und PI gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur. Die Versuche wurden nicht gewertet und wiederholt, wenn der Zelltod in der unbehandelten Kontrolle $>20\%$ betrug.

4.2.2.5. Behandlung der TAF mit konditioniertem Medium der H1299-Lungentumorzelllinie

Für die Behandlung der TAF mit konditioniertem Medium von H1299-Lungentumorzellen wurden die H1299 in Normalmedium kultiviert, bis sie 90-95 % Konfluenz erreichten. Anschließend wurde das Medium gewechselt und mit RPMI1640 für 48 Stunden kultiviert, um konditioniertes Medium herzustellen. Als Kontrolle diente Medium ohne FBS, das 48 Stunden im Inkubator aufbewahrt wurde. Die TAF und NAF aus dem gleichen Patienten (Fibroblasten-Paare) wurden anschließend für 8 und 16 Stunden mit dem kon-

ditionierten oder Kontroll-Medium behandelt. Die Auswertung der anschließenden BrdU-PI-Färbung erfolgte mittels Durchflusszytometer.

4.2.2.6. Kokultur

Die verwendete humane H1299-Zelllinie exprimiert ein Histon-GFP-Fusionskonstrukt mit humanem Histon 2B und Condon-optimiertem, verbesserten GFP (H2B:eGFP, Kanda *et al.* 1998). Es wurde überprüft, dass die Zellen weiter grün fluoreszieren, auch wenn sie mit 13 μM Cisplatin behandelt wurden. Für die Kokultur-Experimente wurden an Tag 1 die TAF und an Tag 2 die H1299 mit entsprechender Zellzahl in eine 6-Loch-Platte eingesät, so dass an Tag 3 160 000 Zellen pro Loch im Verhältnis 1:1 wuchsen. Diese wurden mit 13 μM Cisplatin für 24 Stunden behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Anschließend wurde mit AnnexinV-Alexa568 gefärbt und die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur. Zusätzlich wurden Monokulturen der H1299 und der TAF als Kontrollen untersucht. Ein Schema der Durchführung der Kokultur-Experimente findet sich in Abbildung 5.19 auf Seite 67 im Ergebnis-Teil dieser Arbeit. Zur Auswertung der Zellzahl pro Loch wurden *count brightTM absolute counting beads* nach Anleitung des Herstellers zugegeben. Nach Auswertung von *batch*-Duplikaten erwies sich die AnnexinV-Färbung als verlässlicher und wurde für die Darstellung der Behandlungseffekte verwendet.

4.2.3. Arbeiten mit Tumorgewebe

4.2.3.1. Herstellung und Kultivierung von Frischgewebe-Schnitten

Tumor-Frischgewebe aus der Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses wurde kurzzeitig in Transportmedium gelagert. Mit einer 5 mm-Stanze wurden zylinderförmige Gewebestücke aus dem Tumor gestanzt (Tumorareale), die mit dem *Krumdieck Tissue Slicer* in 200 μm dünne *Slices* geschnitten wurden. Die Schnitte wurden einzeln in 1 ml AEM-Medium mit zugesetzten Wachstumsfaktoren in die Vertiefungen von 24-Loch-Platten überführt und dort für mindestens 12 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Danach erfolgte die Behandlung durch Zugabe von 1 ml Medikament-enthaltendem Medium für 72 h.

4.2.3.2. Fixierung der Frischgewebe-Schnitte und Herstellung von FFPE-Dünnschnitten

Die Frischgewebe-Schnitte wurden mit Hämalaun gefärbt, mit Formalin fixiert und in der Abteilung für Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses eingebettet. Von diesem FFPE-Gewebe konnten mit dem Rotationsmikrotom 3 μm -Dünnschnitte für immunhistochemische Färbungen angefertigt und auf Objektträgern über Nacht bei 56 °C getrocknet werden.

4.2.3.3. Immunhistochemische Färbungen

Die Tumor-*Slices*-Dünnschnitte wurden zur Vorbereitung der Färbungen 15-30 min mit Microclear entparaffiniert. Die anschließende absteigende Alkoholreihe (Isopropanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol für je 3-5 min) diente zur Überführung in wässrige Medien.

KI67-Färbung zur Darstellung proliferierender Zellen

Die Dünnschnitte wurden für 20 min mit *target retrieval solution* pH 6,0 (Dako) im Dampfgerar vorbehandelt. Die Färbung wurde mit dem Dako EnVision™ Kit mit einem DakoAutomation Stainer mit 1:50 verdünntem Ki67-Antikörper durchgeführt. Danach wurde mit Hämalaun gefärbt, entwässert und mit DEPEX *mounting medium* konserviert.

TUNEL-Färbung zur Darstellung apoptotischer Zellen

Die Schnitte wurden nach Anleitung des Herstellers mit Proteinase K vorbehandelt, endogene Peroxidasen mit H₂O₂ gequench und mit Äquilibriumspuffer behandelt. Die folgende Inkubation mit TdT-Enzym wurde mit *Stop/Wash*-Puffer gestoppt und nach drei Waschschrinen in PBS mit Anti-Digoxigenin-Konjugat inkubiert. Nach weiteren Waschschrinen in PBS erfolgte die Färbung mit Peroxidase-Substrat, welche mit Wasser gestoppt wurde. Nach einer Gegenfärbung mit Hämalaun wurde das Gewebe wieder entwässert und mit DEPEX *mounting medium* eingedeckt.

p53-Färbung zur Darstellung von Zellen mit p53-Deregulation

Die Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte erfolgte in Puffer S1699 pH6 (Dako) für 20 min im Dampfgerar. Die Färbung wurde mit dem EnVision™ System und 1:40 verdünntem p53-Antikörper auf dem Dako Automation Stainer durchgeführt.

Die Einordnung der Tumore in die Gruppen 1-3 erfolgte anhand der % positiven Tumorzellen. Gruppe 1: bis 15 % p53-positive Tumorzellen (und deutliche p53-Stabilisierung nach Cisplatin-Behandlung), Gruppe 2: ab 15 % p53-positive Tumorzellen (ohne Stabilisierung bei Cisplatin-Behandlung), Gruppe 3: nur sehr geringer Anteil p53-positiver Tumorzellen (ohne Stabilisierung bei Cisplatin-Behandlung).

Auswertung immunhistochemischer Färbungen

Die Gewebe-Dünnschnitte wurden in Bezug auf die Behandlung verblindet. Die Färbungen wurden von mindestens zwei Beobachtern unabhängig mikroskopisch ausgewertet, wobei stets die % positiven TAF und Tumorzellen im gesamten Dünnschnitt bewertet wurden. Durch simultane Betrachtung an einem Mikroskop mit Zweifach-Einblicksystem wurden Diskrepanzen gelöst. Wenn mehrere Stanzen, also unterschiedliche Tumoreale für jede Behandlung vorhanden waren, wurde der Mittelwert gebildet. Um ein Ansprechen zu definieren, das über einem normalen Maß an Hintergrundfärbung liegt, wurde die in der Immunhistochemie gängige 10 %-Grenze verwendet, da die Färbung häufig ab 10 % positiver Zellen als positive Färbung klassifiziert wird (Koda *et al.* 2007).

4.2.4. Statistik

Statistische Auswertungen wurden hauptsächlich mit Prism durchgeführt. Der D'Agostino-Pearson Test auf Normalverteilung entschied über die Verwendung der nachfolgenden Tests. Für zwei zu vergleichende Gruppen wurden zweiseitige t-Tests (gepaart oder ungepaart) und Wilcoxon- oder Mann-Whitney-Tests verwendet, für mehrere Gruppen ANOVA (gegebenenfalls als *repeated measures* ANOVA) und Kruskal-Wallis- oder Friedmann-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % gewählt und bei signifikanten Unterschieden gegebenenfalls post-Tests zur Identifizierung der unterschiedlichen Gruppen durchgeführt.

Für die statistische Auswertung der Microarrays wurden Genespring GX und die unter 4.1.4 auf Seite 33 angegebenen Internet-Tools verwendet, der χ^2 -Test wurde mit Prism durchgeführt.

Für die Abbildungen mit Balkendiagrammen wurden Mittelwert und Standardabweichung verwendet, soweit nicht anders angegeben.

5. Ergebnisse

5.1. Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Kinase-Inhibitoren

5.1.1. Sensitivität gegenüber Kinase-Inhibitoren - Screen der *Inhibitor Select* Substanzbibliothek

Bei der Aktivierung von Fibroblasten spielen Kinasen eine zentrale Rolle, sowohl als intrazelluläre Domäne vieler Rezeptoren als auch in den nachfolgenden Signaltransduktionsketten. Um die Unterstützung der Tumorzellen durch die TAF zu hemmen, bieten Kinase-Inhibitoren daher eine attraktive Möglichkeit. Um die wirksamsten Inhibitoren zu finden, wurde die Sensitivität zweier TAF auf zwei verschiedene Konzentrationen von 151 Kinase-Inhibitoren der *Inhibitor Select* Bibliothek untersucht (Abbildung 5.1). Hier wurde als Maß für die Sensitivität die Viabilität im MTT-Experiment benutzt, das die Wirkung auf verschiedene Parameter wie Zellzahl, metabolische Aktivität, Proliferation und Zelltod einbezieht.

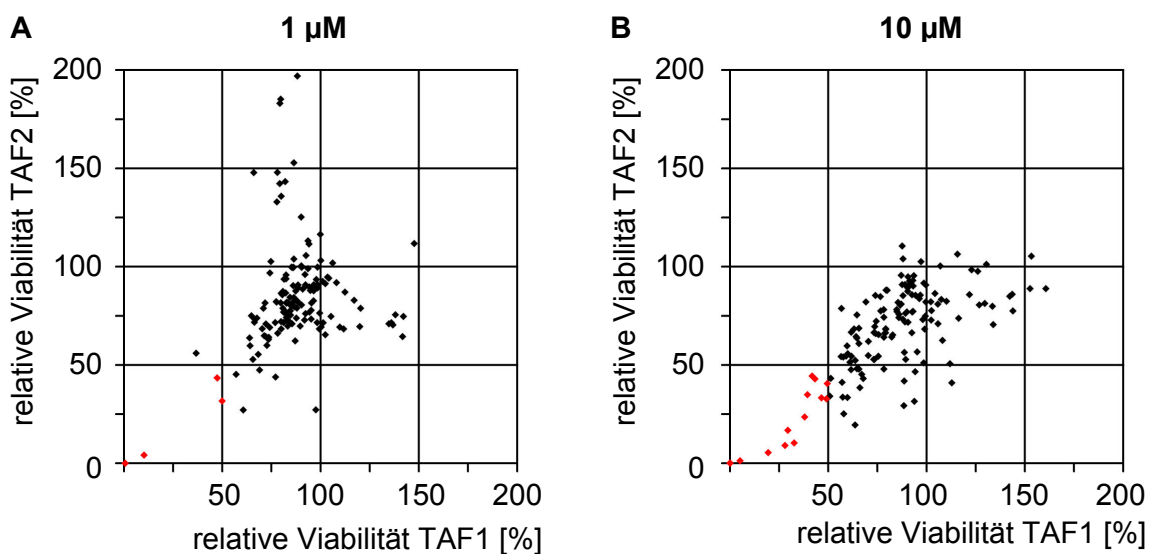


Abbildung 5.1.: Relative Viabilität von TAF aus zwei verschiedenen Patienten nach Behandlung mit den Substanzen aus der *Inhibitor Select* Bibliothek.

Die TAF aus zwei Patienten mit Adenokarzinomen wurden mit 151 Kinase-Inhibitoren der *Inhibitor Select* Bibliothek (Calbiochem) für 48 h inkubiert und anschließend die Viabilität im MTT-Experiment bestimmt. Jeder Punkt steht für die relative Viabilität von TAF1 und TAF2 nach Behandlung mit einem bestimmten Inhibitor im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. rot: Inhibitoren, die die Viabilität beider TAF zu über 50 % hemmen. **A:** 1 µM Inhibitor-Konzentration (siehe Tabelle A.2 auf Seite 127). **B:** 10 µM Inhibitor-Konzentration.

Viele dieser Inhibitoren wurden bisher noch nicht im Patienten eingesetzt, daher wurden zwei Konzentrationen untersucht. Die fünf Substanzen, die die Viabilität von TAF1 und TAF2 bei 1 µM Inhibitor-Konzentration mindestens um die Hälfte senken, sind *PDK1/Akt/Flt Dual Pathway Inhibitor*, Staurosporin, *PDGF Receptor Tyrosine Kinase*

Inhibitor IV, K-252a und PI-103 (siehe Tabelle A.2 auf Seite 127 im Anhang).

Damit sind unter diesen fünf Kinase-Inhibitoren drei Substanzen, die den PDGFR bei nanomolaren Konzentrationen hemmen. Auch N-benzoyl-Staurosporin hemmt TAF1 auf 36,7 % und TAF2 auf 56,0 % Viabilität. Zusätzlich hemmen von den nach Herstellerangaben spezifischen PDGFR-Inhibitoren weitere fünf Substanzen die Viabilität beider TAF auf Werte von 63-74 % der Kontrolle. Damit konnten in dieser Inhibitor-Bibliothek neun PDGFR-Inhibitoren identifiziert werden, die die zwei TAF deutlich hemmen. Bezogen auf die gesamte Substanzbibliothek finden sich sieben beziehungsweise acht dieser Substanzen unter den 25 wirksamsten Substanzen für die einzelnen TAF (Tabelle A.3 auf Seite 128 im Anhang).

Einige Inhibitoren wirken erst bei höheren Konzentrationen. Daher wurde das Experiment auch bei 10 μM Inhibitorkonzentration durchgeführt, um auch diese zu identifizieren. Abbildung 5.1, B zeigt, dass beide TAF durch 17 Substanzen zu mehr als 50% gehemmt werden, darunter auch *PDGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor III* und *IV*.

5.1.2. Effekte zugelassener PDGFR-Inhibitoren

Aus der Inhibitor-Substanzbibliothek wurden PDGFR-Inhibitoren als besonders effektiv identifiziert. Die klinisch zugelassenen PDGFR-Inhibitoren Dasatinib, Imatinib, Nilotinib und Sorafenib sind jedoch nicht enthalten. Einerseits zur Validierung, andererseits im Hinblick auf die potenzielle klinische Anwendung wurde die Sensitivität der TAF aus primären Lungentumoren und Metastasen auch gegen diese Substanzen getestet. In Abbildung 5.2 auf der nächsten Seite sind die Daten für diese Inhibitoren und zusätzlich für den EGFR-Inhibitor Erlotinib als Negativ-Kontrolle dargestellt.

Alle getesteten TAF reagieren deutlich auf Dasatinib, Imatinib und Nilotinib (Abbildung 5.2, A). Die Sensitivität von TAF verschiedener Patienten ist aber unterschiedlich. Dasatinib ist hier der wirksamste Inhibitor der Viabilität der TAF (Abbildung 5.2, B). Das 95%-Konfidenz-Intervall für die mittlere Hemmung durch Dasatinib überlappt bei physiologischen Konzentrationen nicht mit denen von Imatinib und Nilotinib.

Die verwendeten Inhibitoren erreichen im Patienten verschiedene maximale Plasmakonzentrationen (C_{max} , siehe auch Tabelle 4.9 auf Seite 38). Daher wurde die Wirksamkeit der Inhibitoren bei diesen C_{max} verglichen (Abbildung 5.2, C). Dasatinib ist auch bei diesem Vergleich das wirksamste Medikament, um die Viabilität von TAF zu hemmen. Bei Dasatinib beträgt diese Hemmung $36,4 \pm 1,2\%$, bei Imatinib $31,6 \pm 1,8\%$ (ungepaarter t-Test Dasatinib *versus* Imatinib mit Welch-Korrektur: $p = 0,03$), bei Nilotinib $20,6 \pm 2,4\%$, bei Sorafenib $16,3 \pm 1,2\%$ und bei Erlotinib $0,4 \pm 3,7\%$ (MW \pm SEM).

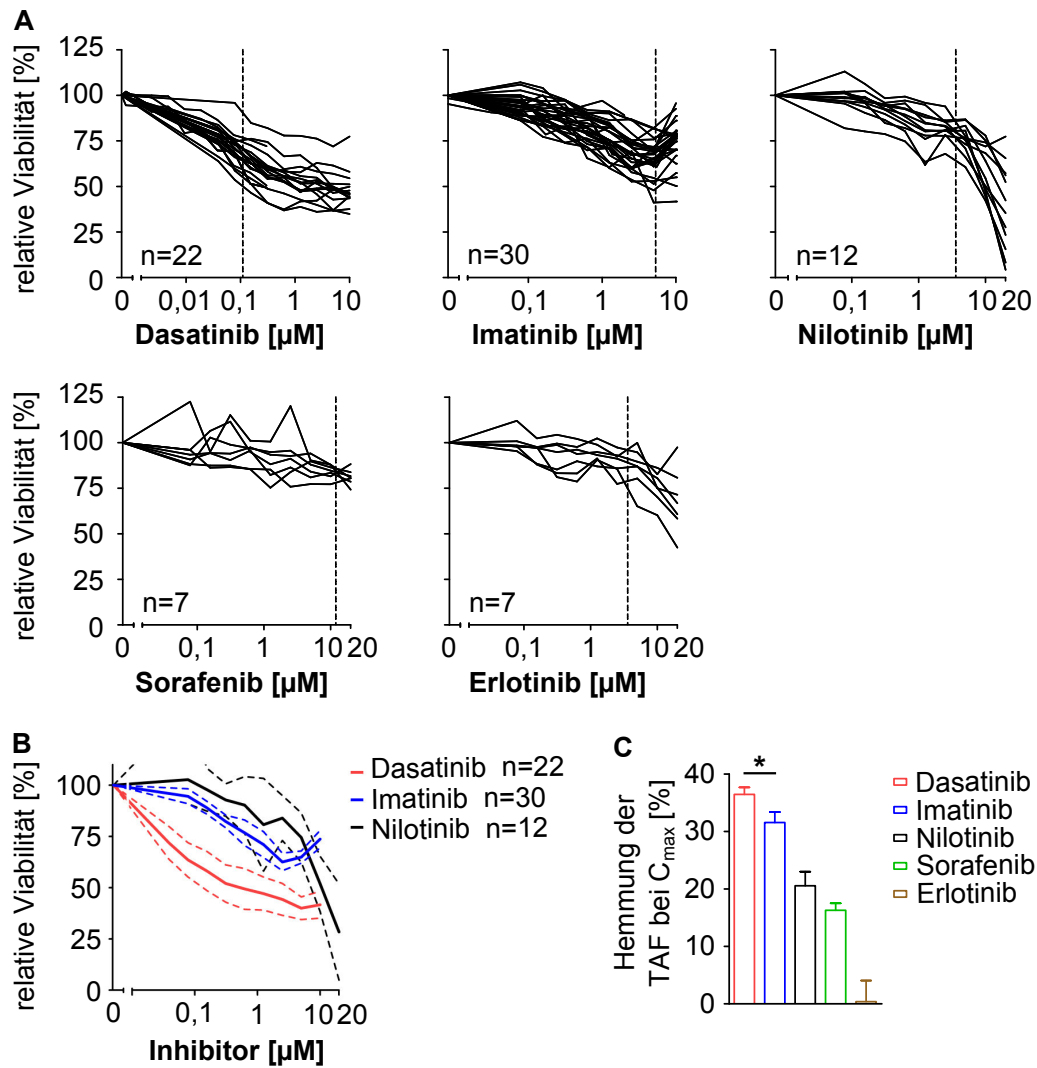


Abbildung 5.2.: Vergleich der Wirksamkeit von Dasatinib, Imatinib, Nilotinib, Sorafenib und Erlotinib.

A: MTT-Experiment mit steigenden Inhibitorkonzentrationen. Die Linien zeigen die Hemmkurve der TAF aus unterschiedlichen Patienten, ermittelt aus Triplikaten. Die gestrichelte Linie zeigt die durchschnittliche Plasmakonzentration C_{max} (siehe auch Tabelle 4.9 auf Seite 38). **B:** Vergleich der mittleren Viabilität von TAF bei Behandlung mit den drei wirksamsten Inhibitoren, Dasatinib, Imatinib und Nilotinib ($\text{MW} \pm 95\% \text{ CI}$ aus A). **C:** TAF-Hemmung bei der Inhibitor- C_{max} -Konzentration für die fünf Inhibitoren ($\text{MW} \pm \text{SEM}$), *: $p=0,03$ (ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur).

Die zwei wirksamsten PDGFR-Inhibitoren, Dasatinib und Imatinib, wurden mittels AnnexinV- und BrdU-PI-Färbung untersucht, ob sie Zelltod induzieren oder die Proliferation der Zellen hemmen. Die Inhibitoren zeigen keine Induktion des Zelltods, sondern Dasatinib und Imatinib hemmen die Proliferation von TAF (Abbildung 5.3 auf der nächsten Seite, A und B). Dasatinib und Imatinib verursachen einen $G_{0/1}$ -Zellzyklus-Arrest (Abbildung 5.3, C, mehr Zellen in $G_{0/1}$ und weniger Zellen in G_2 : OneWayANOVA je $p < 0,001$).

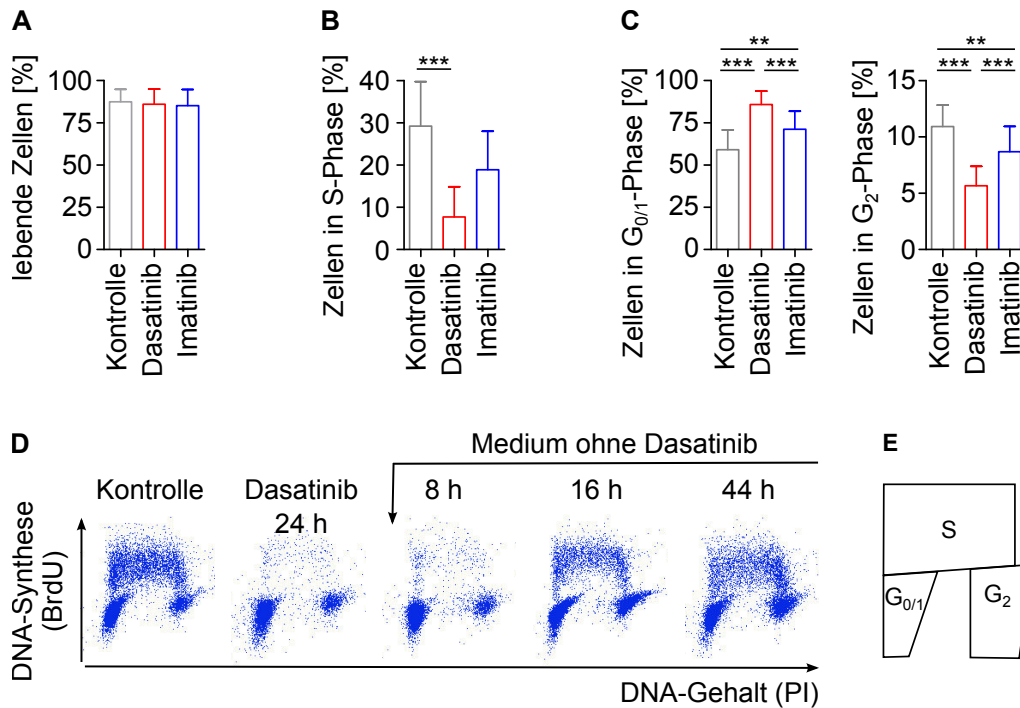


Abbildung 5.3.: Dasatinib und Imatinib hemmen die Proliferation von TAF.

AnnexinV- und BrdU-PI-Färbungen von acht TAF nach 24 Stunden Behandlung mit der entsprechenden Plasmakonzentration der Inhibitoren (Tabelle 4.9 auf Seite 38). **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$ (OneWayANOVA mit Tukey-post-Test). **A**: Die Inhibitoren haben keinen Einfluss auf den Zelltod (AnnexinV-Färbung). **B**: Dasatinib und Imatinib hemmen die Proliferation (BrdU-PI-Färbung). **C**: Dasatinib und Imatinib erhöhen den Anteil der Zellen in G_{0/1} und verringern den Anteil der TAF in G₂. **D, E**: Die Dasatinib-induzierte Hemmung der Proliferation ist reversibel. Nach 24stündiger Dasatinib-Behandlung wurde der Inhibitor ausgewaschen und nach 4, 8, 16 und 44 Stunden die Proliferation mit BrdU-PI-Färbung analysiert, repräsentatives Beispiel (D) und Schema der S-, G_{0/1}- und G₂-Phasen in der durchflusszytometrischen Auswertung (E).

Diese durch Dasatinib induzierte Hemmung der Proliferation der TAF ist reversibel. Abbildung 5.3 C zeigt, dass die Fibroblasten bereits acht Stunden nach Auswaschen von Dasatinib erneut zu proliferieren beginnen. Bei TAF verschiedener Patienten entspricht der Anteil der Zellen in S-Phase nach circa 16 h wieder dem Anteil bei unbehandelten TAF. Dies zeigt, dass Dasatinib in TAF keine irreversible Seneszenz verursacht. Zusätzlich zeigt die negative β -Galaktosidase-Färbung, dass keine Seneszenz vorliegt (Haubeiss *et al.* 2010).

5.1.3. Molekulare Effekte von Dasatinib auf Tumor-assoziierte Fibroblasten

5.1.3.1. Genexpressionsanalyse der Reaktion von Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Dasatinib

Dasatinib hat auf TAF eine stärkere Wirkung als die anderen untersuchten PDGFR-Inhibitoren. Um die molekularen Veränderungen von TAF als Antwort auf eine Dasatinib-Behandlung zu klären, wurden die neun sensitivsten TAF mittels Genexpressions-

Array humangene1.0st-v1 (Affymetrix) untersucht. Von den 28 132 Transkripten, die die Ensembl-Datenbank¹ als Gene annotiert, reguliert Dasatinib in diesen TAF die Expression von 511 Transkripten (492 Genen) mindestens zweifach (gepaarter t-Test mit Benjamini-Hochberg-FDR-Korrektur $p < 0,05$). Diese werden im weiteren als „Dasatinib Response Signatur“ bezeichnet (Abbildung 5.4). Die vollständige Liste dieser Gene ist publiziert und frei zugänglich (Haubeiss *et al.* 2010).

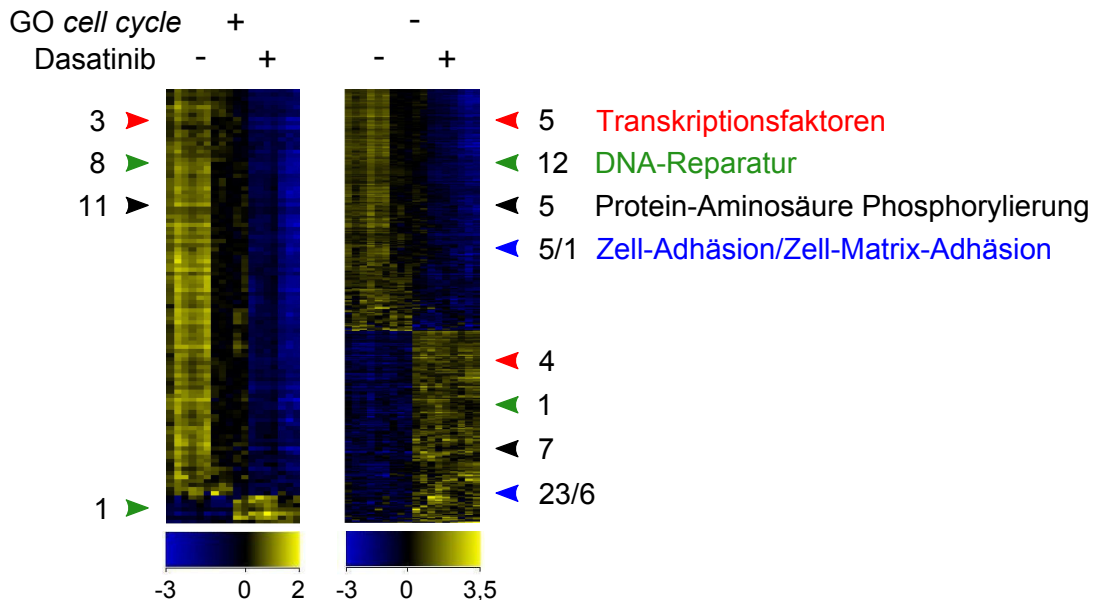


Abbildung 5.4.: „Dasatinib Response Signatur“.

Heatmap der „Dasatinib Response Signatur“, jede Zeile steht für ein Transkript, jede Spalte für TAF aus einem Patienten. Farbskala: blau zeigt niedrige Expression, schwarz mittlere und gelb hohe Expression eines Transkripts.

links: 107 Transkripte mit *Gene Ontology*-Zuordnung (GO) *cell cycle*, rechts: 404 Transkripte ohne GO *cell cycle*. Die farbigen Pfeil-Köpfe und Zahlen stehen für die Anzahl weiterer Transkripte in folgenden *Gene Ontology*-Kategorien: *molecular funktion*: Transkriptionsfaktoren (GO:0003700, *transcription factor activity*) und *biological process*: DNA Reparatur (GO:0006281), Protein-Aminosäure Phosphorylierung (GO:0006468), Zell-Adhäsion / Zell-Matrix-Adhäsion (GO:0007155 / GO:0007160).

Eine Datensammlung, die den Transkripten Informationen über „molekulare Funktion“, „biologischen Prozess“ und „zelluläre Komponente“ zuordnet, ist die *Gene Ontology* (GO²). Eine GO-Analyse mit der Genespring-Software zeigte, dass 107 der 511 Transkripte (104 Gene) eine Verbindung zum Zellzyklus aufweisen. Von diesen sind 97 nach Dasatinib-Behandlung niedriger exprimiert, zum Beispiel der Proliferations-Marker *antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67)*.

Die veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren ist ein Hinweis auf veränderte Expressionsmuster ganzer Gruppen von Genen. Unter den 104 Zellzyklus-Genen befinden sich laut der *GO molecular function* drei Transkriptionsfaktoren: *E2F transcription fac-*

¹<http://www.ensembl.org>

²<http://www.geneontology.org/>

tor 7 (E2F7), ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1 (UHRF1) und *pituitary tumor-transforming 1 (PTTG1)*. Dasatinib ändert also die Expression von Regulatoren des Zellzyklus und der Chromatinstruktur. Außerdem wird die Expression von Genen herunter reguliert, deren Überexpression bei Lungentumoren und Lungenzelllinien bekannt ist, beispielsweise *stathmin 1/oncprotein 18 (STMN1)* (Chen *et al.* 2003; Rosell *et al.* 2003).

Zusätzlich ändert sich die Expression vieler Gene, die bekannterweise eine Funktion im Zellzyklus haben und/oder die mit Tumorerkrankungen in Zusammenhang gebracht wurden. Zum Beispiel sind die RNAs von *aurora kinase A und B (AURKA, B)*, *breast cancer 1, early onset und 2 (BRCA1, 2)*, zahlreichen *cell division cycle*-Genen (CDCs), *Fanconi anemia, complementation group D2 und C1 (FAND2, C1)*, *mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (MSH2)*, *retinoblastoma-like 1 (p107, RBL1)*, *timeless homolog (Drosophila) (TIMELESS)* und *TIMELESS interacting protein (TIPIN)* nach Dasatinib-Behandlung niedriger exprimiert, die RNAs von *transforming growth factor, beta 2 (TGFB2)* und *tumor protein D52-like 1 (TPD52L1)* höher exprimiert.

Von den 404 Transkripten (388 Genen), die nicht den GO-Begriff *cell cycle* tragen, waren 299 Transkripte (216 Gene) nach Dasatinib-Behandlung geringer exprimiert und 175 Transkripte (172 Gene) stärker exprimiert.

Unter diesen Transkripten finden sich neun Transkriptionsfaktor-RNAs. Fünf Transkriptionsfaktoren werden nach Dasatinib-Behandlung geringer exprimiert: *V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2 (MYBL2)*, *forkhead box M1 (FOXM1)*, *High-mobility group box 2 (HMGB2)*, *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (ARNTL2)* und *transcription factor 19 (SC1) (TCF19)*. Die vier hochregulierten Transkriptionsfaktoren sind *cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1)*, *SRY (sex determining region Y)-box 4 (SOX4)*, *endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1)* und *pre-B-cell leukemia homeobox 1 (PBX1)*. Diese Genexpressionsänderungen können sich auf das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung auswirken, der Effekt lässt sich aber nicht abschätzen.

Hilfreichere Informationen liegen über Wachstumsfaktoren vor, die im Kommunikationsnetzwerk eines Tumors eine bedeutende Rolle spielen. Für die GO-Annotationen *growth factor*, *growth regulator* und *growth inhibitor* wurden sieben Transkripte gefunden, die nach Dasatinib-Behandlung signifikant mindestens zweifach geändert exprimiert wurden. Der *fibroblast growth factor 5 (FGF5)* und der *heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF)* werden 2,3- und 2fach schwächer exprimiert. Die Transkripte von *fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor) (FGF9)*, *transforming growth factor, beta 2 (TGFB2)*, *insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) (IGF2)* sowie *insulin-like growth factor binding protein 5 und 7 (IGFBP5/7)* sind nach Dasatinib-Behandlung höher exprimiert. Die Wirkung dieser unterschiedlich regulierten Wachstumsfaktoren wird später in funktionellen Experimenten aufgegriffen (Kapitel 5.1.4.1 auf Seite 53).

Zusätzlich finden sich viele Gene, die für Proteine der extrazellulären Matrix oder des Zytoskeletts codieren. Die meisten dieser Transkripte werden durch Dasatinib hochreguliert: Aktine (*ACTA2*, *C1*, *G2*), Kollagene (*COL3A1*, *4A1*, *4A2*, *5A1*, *11A1*), Integrine (*ITGAV*, *11* höher exprimiert, *ITGA6* niedriger exprimiert), Laminine (*LAMA4*, *B1*) und Myosine (*MYH10*, *H11* und *MYLK*). Kinesine hingegen werden schwächer exprimiert (*KIF2C*, *4A*, *11*, *14*, *15*, *18A*, *20A*, *22*, *23*, *C1*). Gleichzeitig ist in der Zellkultur zu beobachten, dass die TAF nach Dasatinib-Behandlung stärker an den Kulturflaschen adhärieren und längere Trypsin-Einwirkung benötigen, bevor sie sich lösen. Die Ursache dafür könnte in der veränderten Expression der ECM-Moleküle und entsprechender Bindeproteine liegen.

5.1.3.2. Vergleich mit funktionellen Signaturen

Dasatinib beeinflusst also mehr als nur den Zellzyklus der Tumor-assoziierten Fibroblasten. Um die Frage zu beantworten, welche zusätzlichen Auswirkungen Dasatinib auf das Genexpressionsmuster der TAF hat, wurde die „Dasatinib Response Signatur“ mit weiteren bereits veröffentlichten Signaturen verglichen. Dabei wurden solche Signaturen ausgewählt, die die Genexpressionsmuster von Fibroblasten in verschiedenen funktionellen Zuständen beschreiben.

Coller *et al.* (2006) beschreiben ein Fibroblasten-*Quiescence*-Programm. Die Autoren identifizierten Genexpressionsänderungen, die als Antwort auf drei unterschiedliche *Quiescence*-induzierende Stimuli geschehen. Dabei handelt es sich um Gene, die für die Aufrechterhaltung des ruhenden Zustands nötig sind, aber ebenso für dessen Reversibilität. Erwartungsgemäß gibt es in der „Dasatinib Response Signatur“ Transkripte, die durch diese Signatur funktionell der *Quiescence* zugeordnet werden.

Insgesamt sind 34 Gene (35 Transkripte) in der beschriebenen Signatur enthalten, davon werden 15 Gene sowohl bei Dasatinib-Behandlung als auch bei der *Quiescence* geringer exprimiert als in unbehandeltem Zustand, 19 Gene werden stärker exprimiert (Abbildung 5.5 auf der nächsten Seite, A, links). Diese Anzahl der Gene in der Schnittmenge ist signifikant größer als bei einer zufälligen Überschneidung zu erwarten wäre (X^2 -Test $p < 0,0001$, erwartet: 14 Gene). In Abbildung 5.5, B, links, ist die *heatmap* der 35 in die gleiche Richtung regulierten Transkripte abgebildet. Geringer exprimiert werden beispielsweise die schon beschriebenen *CDC20*, *FOXM1*, und *stathmin 1* (*STMN1*), induzierte Expression zeigen unter anderem *ACTA2*, *COL3A1*, *MYLK* und *interleukin 6* (*interferon, beta 2*) (*IL6*). (Weitere Gennamen, -Funktionen und Stärke der Regulation siehe Haubeiss *et al.* (2010) *Additional file 4, Table S3*.)

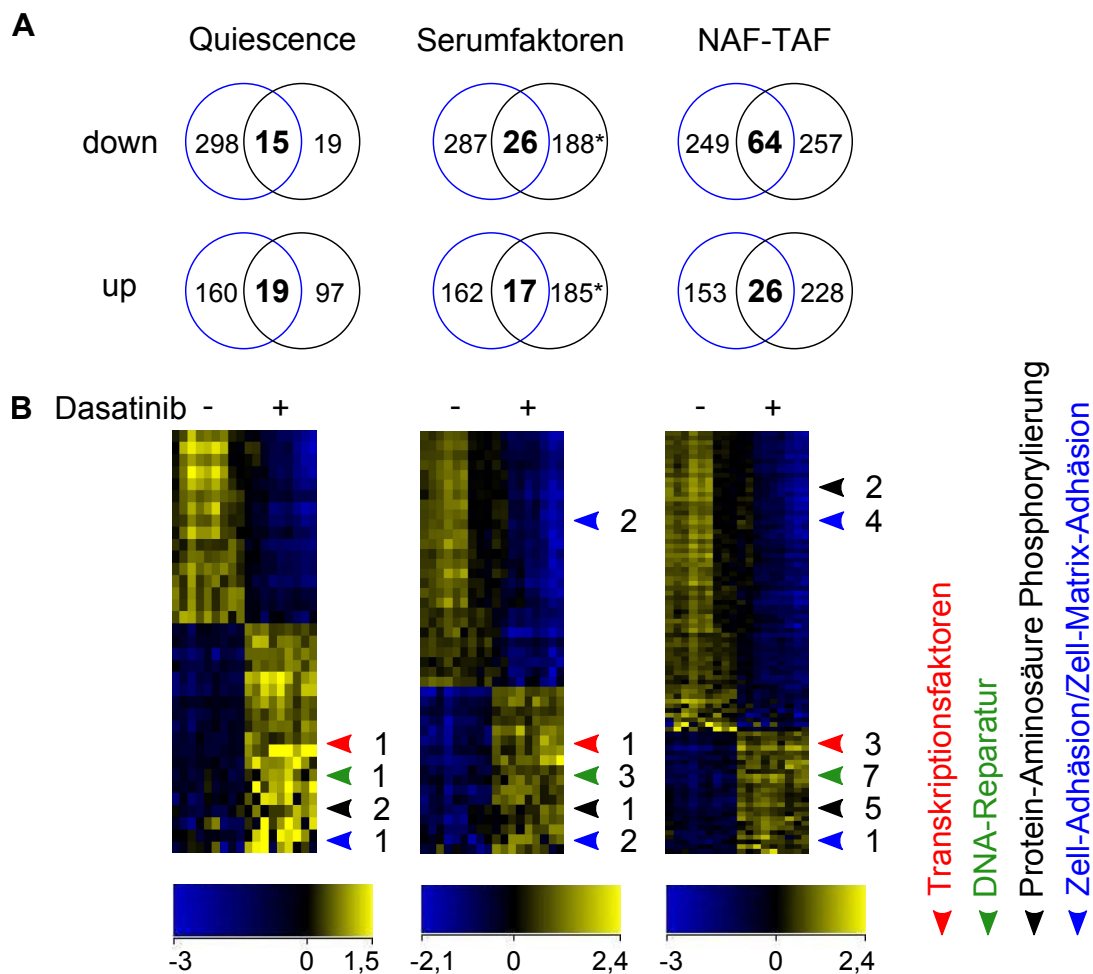


Abbildung 5.5.: Transkripte aus verschiedenen funktionellen Signaturen sind in der „Dasatinib Response Signatur“ enthalten.

A: Darstellung der Anzahl der in den Einzelsignaturen und in jeweils beiden Signaturen enthaltenen Gene. blauer Kreis: „Dasatinib Response Signatur“, schwarzer Kreis von links nach rechts: *Quiescence* (Coller *et al.* 2006), Serumfaktoren (Chang *et al.* 2004), NAF-TAF (Sadlonova *et al.* 2009). *up*: höher exprimiert nach Dasatinib-Behandlung als die unbehandelten Kontrollen, *down*: niedriger exprimiert nach Dasatinib-Behandlung als die unbehandelten Kontrollen, *: höher/niedriger exprimiert bei Kultur ohne Serum. **B:** Heatmap der höher oder niedriger exprimierten Transkripte aus den Schnittmengen aus A. Jede Zeile steht für ein Transkript, jede Spalte für TAF aus einem Patienten, die farbigen Pfeil-Köpfe stehen für *Gene Ontology*-Kategorien wie in Abbildung 5.4 auf Seite 47. blau: niedrige Expression, gelb: hohe Expression. Listen der Gene siehe Haubeiss *et al.* (2010).

Chang *et al.* (2004) identifizierten die *Core Serum Response* (CSR), indem sie Fibroblasten aus Gewebe von zehn verschiedenen Körperstellen mit und ohne Serum kultivierten und die Genexpressionsänderungen untersuchten. Diese Änderungen ähneln denen der Wundheilung. In den meisten Fibroblastentypen wurden 611 Gene induziert oder reprimiert. Die Autoren schlossen solche Gene aus, die periodische Änderungen im Zellzyklus von HeLa-Zellen zeigten. Die verbleibenden, durch Serum regulierten 512 Gene nannten sie CSR.

Bei Lungenkarzinomen konnten die Autoren zwei Gruppen von Tumoren unterscheiden, solche die Genexpressionsmuster ähnlich der Serum-aktivierten CSR haben und solche, die die entgegengesetzte Serum-reprimierte Signatur zeigen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Lungentumore mit dem Serum-aktivierten Phänotyp mit einem höheren Todesrisiko korreliert sind. Diese CSR-Signatur identifiziert also prognostische Faktoren.

423 der 511 Transkripte der „Dasatinib Response Signatur“ sind auf dem von Chang *et al.* verwendeten Array vorhanden. Davon sind 43 Gene nach Dasatinib-Behandlung und Serum-Behandlung entgegengesetzt reguliert. Das heißt 26 Gene, die durch Dasatinib schwächer exprimiert sind, sind auch bei niedriger Serum-Konzentration niedrig exprimiert. Und 17 Gene, die durch Dasatinib hochreguliert werden, sind hoch exprimiert bei dieser niedrigen Serumkonzentration (Abbildung 5.5, A, links und Haubeiss *et al.* (2010) *Additional file 5, Table S4*). Damit ist eine signifikante Anzahl von Genen durch Dasatinib in die gleiche Richtung reguliert wie durch Serumentzug ($p < 10^{-12}$, Fisher's exact test).

Zusätzlich zu den Zellzyklus-, Serum- und *Quiescence*-spezifischen Genen gibt es in der „Dasatinib Response Signatur“ noch einen großen Anteil von Genen, die mit keiner dieser Signaturen überlappen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch untersucht, ob darunter solche sind, die in TAF und Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten (NAF) differenziell exprimiert sind.

Sadlonova *et al.* (2009) führten eine Genexpressionsanalyse mit NAF aus zwei verschiedenen Patienten mit Brustreduktions-Operationen und drei TAF von zwei verschiedenen Brustkrebs-Patienten und der Hs574T-Zelllinie durch. Hier stammten die normalen Fibroblasten nicht aus der Nähe eines Tumors. Dabei wurden 420 Gene identifiziert, deren Expression in TAF und NAF mindestens 2,5fach verschieden war. Aus den Originaldaten wurden alle Transkripte mit mindestens 2fachen, signifikanten Expressionsunterschieden gefiltert (575 Gene) und mit der „Dasatinib Response Signatur“ verglichen. 8345 Gene sind gemeinsam auf den von Sadlonova *et al.* und den hier verwendeten *Microarrays* vorhanden. Abbildung 5.5, rechts, zeigt die 64 nach Dasatinib-Behandlung und in NAF niedrig exprimierten und die 26 entsprechend hoch exprimierten Gene, die beiden Signaturen gemeinsam sind. Bei einer zufälligen Überlappung der Datensets würde man nur 8 beziehungsweise 4 gemeinsame Gene erwarten ($p < 10^{-30}$ und $p < 10^{-11}$, Fisher's exact test), (Haubeiss *et al.* (2010) *Additional file 6, Table S5*). Für sechs dieser 90 Gene wurde die Expressionsänderung mittels qRT-PCR untersucht und bestätigt (Abbildung 5.6 auf der nächsten Seite, A und B).

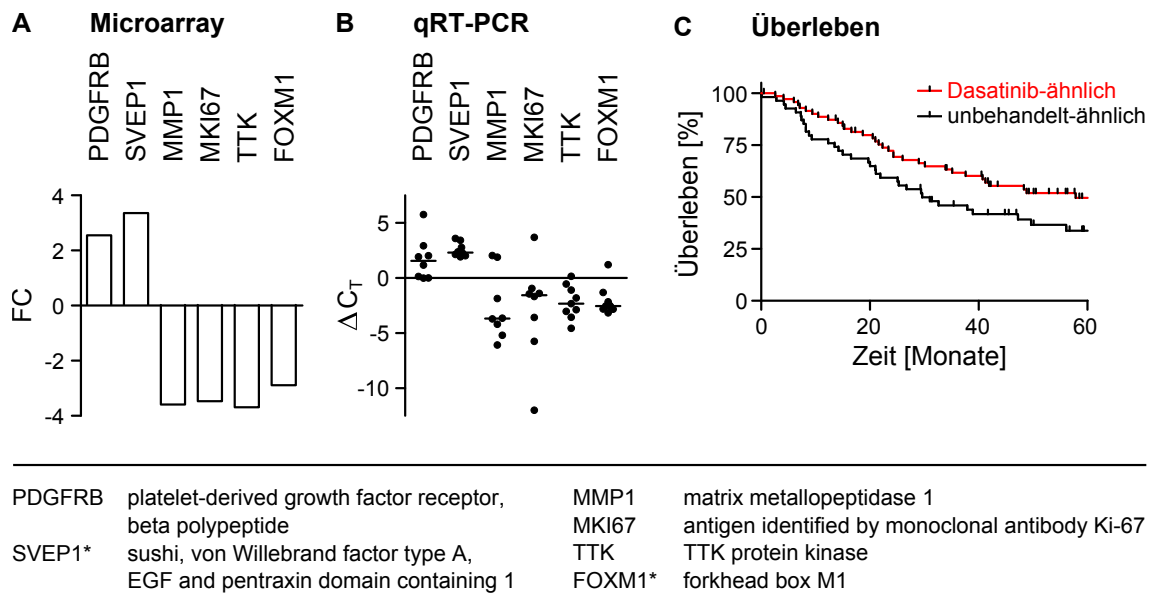


Abbildung 5.6.: Validierung der *Microarray*-Genexpressionsdaten von 6 Genen und Analyse der Überlebensdaten von Patienten aus dem Datenset von Bhattacharjee *et al.* (2001).

Die Genexpressions-Daten von 6 Genen der „Dasatinib Response Signatur“ wurden mittels qRT-PCR überprüft. Alle 6 Gene sind auch zwischen TAF und NAF differenziell exprimiert (Sadlonova *et al.* 2009), *: Gene auch in der *Quiescence*-Signatur enthalten (Coller *et al.* 2006). **A:** Genexpressionsänderung laut *Microarray*-Daten, FC: *fold change*. **B:** Ergebnis der qRT-PCRs als ΔC_t -Einzelwerte und Median. **C:** Die Genexpressionsdaten von Lungentumor-Patienten (Bhattacharjee *et al.* 2001) wurden anhand der Schnittmenge aus der „Dasatinib Response Signatur“ (Haubeiss *et al.* 2010) und der TAF-NAF-Signatur (Sadlonova *et al.* 2009) mit einem hierarchischen *clustering* analysiert, eine Gruppe mit einem Muster, das der Dasatinib-Behandlung ähnelt und eine Gruppe ähnlich zu unbehandelten TAF identifiziert und die Überlebensdaten dieser Gruppen dargestellt (log-Rang-Test $p = 0,052$).

Die Dasatinib-Signatur identifiziert in der TAF-NAF-Signatur eine Teilmenge an Genen. Um festzustellen, ob die Expressionsänderung dieser Gene durch Dasatinib in Tumoren von Bedeutung wäre, wurde mittels der etablierten Methode der *outcome*-Assoziation (Venet *et al.* 2011) die Expression dieser Gene in einem Datenset aus 125 Lungentumoren untersucht, für die Daten über den klinischen Verlauf der Erkrankung veröffentlicht wurden (Bhattacharjee *et al.* 2001). Eine hierarchische Gruppierung der Expression der 90 Gene, die in der „Dasatinib Response Signatur“ und in der TAF-NAF-Signatur enthalten sind, führte zur Identifikation von zwei Gruppen von Patienten. In einer Gruppe war die Expression der 90 Gene ähnlich der Expression in unbehandelten TAF, in der anderen Gruppe war sie ähnlich der Expression Dasatinib-behandelter TAF und von NAF (Abbildung 5.6, C). Patienten der Gruppe mit dem Dasatinib-ähnlichen Genexpressionsmuster zeigen ein tendenziell längeres Überleben als die der zweiten Gruppe (Median unbehandelt-ähnlich: 29,6 Monate, Dasatinib-ähnlich: 57,8 Monate, Hazard Ratio 1,62).

Navab *et al.* 2011 haben eine umfangreiche Untersuchung mit NAF-TAF-Paaren aus 15 Lungentumor-Patienten erstellt. Sie fanden mittels der *Significance Analysis of Microarrays* (SAM)-Methode 46 zwischen NAF und TAF differenziell exprimierte Gene. Auch diese NAF und TAF aus verschiedenen Patienten waren auf der Genexpressionsebene sehr

heterogen, was die vergleichsweise geringe Anzahl der Transkripte in dieser Signatur erklärt. Zwei Gene aus der „Dasatinib Response Signatur“ sind in den 15 Lungen-TAF niedriger als in NAF und in unbehandeltem Zustand niedriger als in Dasatinib-behandeltem Zustand exprimiert (*alpha-2-macroglobulin (A2M)* und *clusterin (CLU)*) und ein Transkript jeweils höher (*leupaxin (LPXN)*). Damit sind in der Schnittmenge der zwei Gen-signaturen nicht signifikant mehr Transkripte enthalten als statistisch zu erwarten wäre (X^2 -Test $p = 0,24$).

5.1.4. Funktionelle Konsequenzen der Dasatinib-Behandlung in Tumor-Modellen

5.1.4.1. Die von Dasatinib-behandelten TAF sekretierten Wachstumsfaktoren fördern das Tumorzellwachstum weniger als die Faktoren unbehandelter TAF

Die *Microarray*-Ergebnisse zeigen unter anderem, dass die Expression zahlreicher sezernerter Proteine der TAF durch die Behandlung mit Dasatinib verändert wird. Die Richtung der Veränderung und der potenzielle, in der Literatur beschriebene Effekt auf Tumorzellen sind aber sehr verschieden. Daher sollen funktionelle Untersuchungen helfen, den Einfluss der Dasatinib-Behandlung von TAF unabhängig von der Interpretation von mRNA-Profilen zu beurteilen.

Mit Hilfe von TAF-konditioniertem Medium, in das die TAF Wachstumsfaktoren sezernierten, wurde der Einfluss dieser Faktoren auf Tumorzellen untersucht. Hierfür wurde das Medium von TAF nach 48 Stunden Kultivierung gesammelt. Außerdem wurde Kontroll-konditioniertes-Medium durch Inkubation bei 37°C für 48 Stunden hergestellt. Mit diesem Medium von drei verschiedenen TAF wurden H1299-Lungentumorzellen für 48 Stunden behandelt und mittels BrdU-PI-Färbung durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 5.7 auf der nächsten Seite, A und B). Die Fibroblasten oder die H1299-Tumorzelllinie wurden jeweils mit Dasatinib behandelt.

Das konditionierte Medium von unbehandelten TAF ändert den Anteil der H1299-Zellen in der S-Phase nicht (Abbildung 5.7 A und B, Nr. 1 und 3). Dasatinib verringert die Proliferation der H1299-Zellen (Nr. 2 und 4). Das konditionierte Medium von Dasatinib-behandelten Fibroblasten hat den gleichen Einfluss wie Dasatinib kombiniert mit konditioniertem Medium (Nr. 4 und 5). Rechts in Abbildung 5.7, B sind die Differenzen zur jeweils relevanten Kontrolle dargestellt.

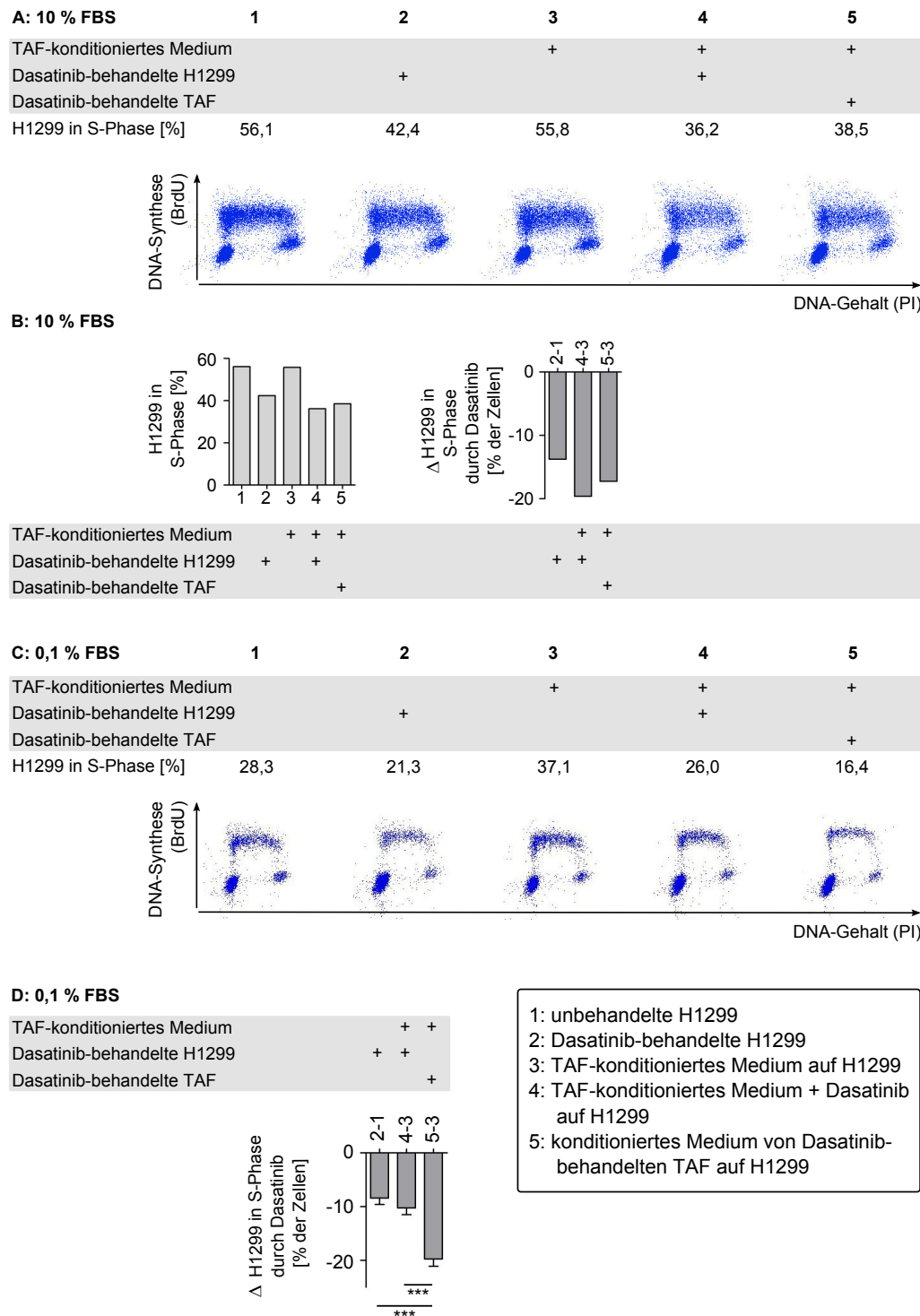


Abbildung 5.7.: Die Wachstumsförderung der H1299 durch TAF-sezernierte Faktoren wird durch Dasatinib-Behandlung der TAF zu einer Wachstumshemmung umgekehrt.

BrdU-PI-Färbungen von H1299-Tumorzellen, die mit unterschiedlichen konditionierten Medien behandelt wurden. **A, B:** Etablierung mit 10 % FBS im Medium. **A:** Durchflusszytometrische Analyse einer BrdU-PI-Färbung der H1299 (Beispiel). **B:** links: Säulendiagramm der Daten der Zellen in S-Phase aus A, rechts: Änderung des Anteils der Zellen in S-Phase im Vergleich zur relevanten Kontrolle. **C, D:** Experimente mit 0,1 % FBS im Medium (Jens Schmid, IKP Stuttgart), **C:** Durchflusszytometrische Analyse einer BrdU-PI-Färbung der H1299 (Beispiel). **D:** Änderung des Anteils der Zellen in S-Phase im Vergleich zur relevanten Kontrolle (MW \pm SD, konditioniertes Medium von TAF aus 3 Patienten, ***: $p < 0,0001$ (OneWayANOVA)).

Da das konditionierte Medium unter den gewählten Bedingungen nicht den erwarteten wachstumsfördernden Effekt auf die Tumorzelllinie zeigte, wurde dieses Experiment von Jens Schmid (IKP Stuttgart) mit Medium mit nur 0,1 % FBS-Anteil wiederholt, um den Einfluss der Wachstumsfaktoren des FBS zu verringern (Haubeiss *et al.* 2010). Abbildung 5.7, C (Nr. 1) zeigt beispielhaft, dass sich ohne Behandlung noch 28,3 % der H1299 mit 0,1 % FBS in der S-Phase befinden. Hierbei handelt es sich um eine 50%ige Reduktion im Vergleich zu Abbildung 5.7, A (Nr. 1) mit 10% FBS. Der Effekt von Dasatinib auf die Proliferation ist in beiden Medien gleich (A und C, Nr. 2 zu Nr. 1: Verringerung auf circa 75 % der unbehandelten Zellen) und bei Verwendung von konditioniertem Medium geringfügig stärker als bei Kontroll-Medium (A und C, Nr. 4 zu Nr. 3). Die Dasatinib-Effekte auf die H1299-Zelllinie sind demnach bei beiden FBS-Konzentrationen vergleichbar. Im Gegensatz zu Vollmedium mit 10 % FBS zeigt sich bei geringer FBS-Konzentration jedoch ein Proliferations-fördernder Effekt des konditionierten Mediums der TAF auf die H1299 (Abbildung 5.7, C Nr. 1 zu Nr. 3: 131 % der unbehandelten Zellen). Bei der Behandlung mit TAF-konditioniertem Medium hat eine Dasatinib-Behandlung der H1299 einen deutlich geringeren Einfluss auf die Proliferation (Nr. 4 und Nr. 3) als die Dasatinib-Behandlung der TAF, die die deutlichste Auswirkung auf die H1299-Proliferation zeigt (Nr. 5 zu Nr. 3: 44 %). Die H1299-Lungentumorzelllinie wird durch konditioniertes Medium von Dasatinib-behandelten Fibroblasten signifikant stärker gehemmt als durch die Kombination von konditioniertem Medium un behandelter Fibroblasten mit Dasatinib (Abbildung 5.7, D, 4-3 -10 % und 5-3 -20 % (MW)).

Im Gegensatz zur bekannten Wachstumsförderung durch die TAF hat hier somit die durch Dasatinib hervorgerufene Änderung der Mediumzusammensetzung der sezernierten Proteine die Wirkung, dass die Lungentumorzellen sich weniger schnell teilen. Die Dasatinib-behandelten TAF hemmen nicht nur die Tumorzell-Proliferation anstatt sie zu fördern (Abbildung 5.7, C, Nr. 5), sondern diese Hemmung ist auch deutlich stärker als der kombinierte Effekt aus konditioniertem Medium und Dasatinib (Nr. 4).

Die Expressionsänderung einiger Wachstumsfaktoren wurde mittels qRT-PCR genauer untersucht. Dazu wurde der Zellzyklus von TAF aus drei Patienten durch Serumentzug für 24 Stunden synchronisiert. Nach Wiedereintritt in den Zellzyklus für 24 Stunden und einer anschließenden Dasatinib-Behandlung wurde die Expression von 21 Transkripten von Wachstumsfaktoren und zugehörigen Rezeptoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Die Auswahl dieser Transkripte erfolgte anhand deren Expressionsänderung bei den *Microarray*-Experimenten: Nach Dasatinib-Behandlung änderte sich die Expression signifikant mindestens 1,6fach. Bei allen Transkripten konnte die aus den *Microarrays* bekannte Richtung der Expressionsänderung nach 48 h Behandlung durch die qRT-PCR bestätigt werden. Da die drei TAF aus verschiedenen Patienten aber in sehr variablem Ausmaß und mit unterschiedlichen Kinetiken auf Dasatinib reagierten, ist mit drei Patienten nur bei wenigen Transkripten statistische Signifikanz erreicht worden.

Daher sind in Abbildung 5.8 die Expressionsänderungen in einzelnen TAF dargestellt, um sowohl die gemeinsame Tendenz als auch die Heterogenität anhand einiger Beispiele zu verdeutlichen. Bei der Expression von *PDGFRB*, *SVEP1* und anderen Transkripten zeigt sich, dass sowohl die Stärke der Expressionsänderung als auch der Zeitpunkt der maximalen Expression zwischen den TAF aus verschiedenen Patienten variieren. Bei *IGF2* und *HBEGF* sind sehr unterschiedliche basale Expressionsniveaus in unbehandelten Fibroblasten zu beobachten.

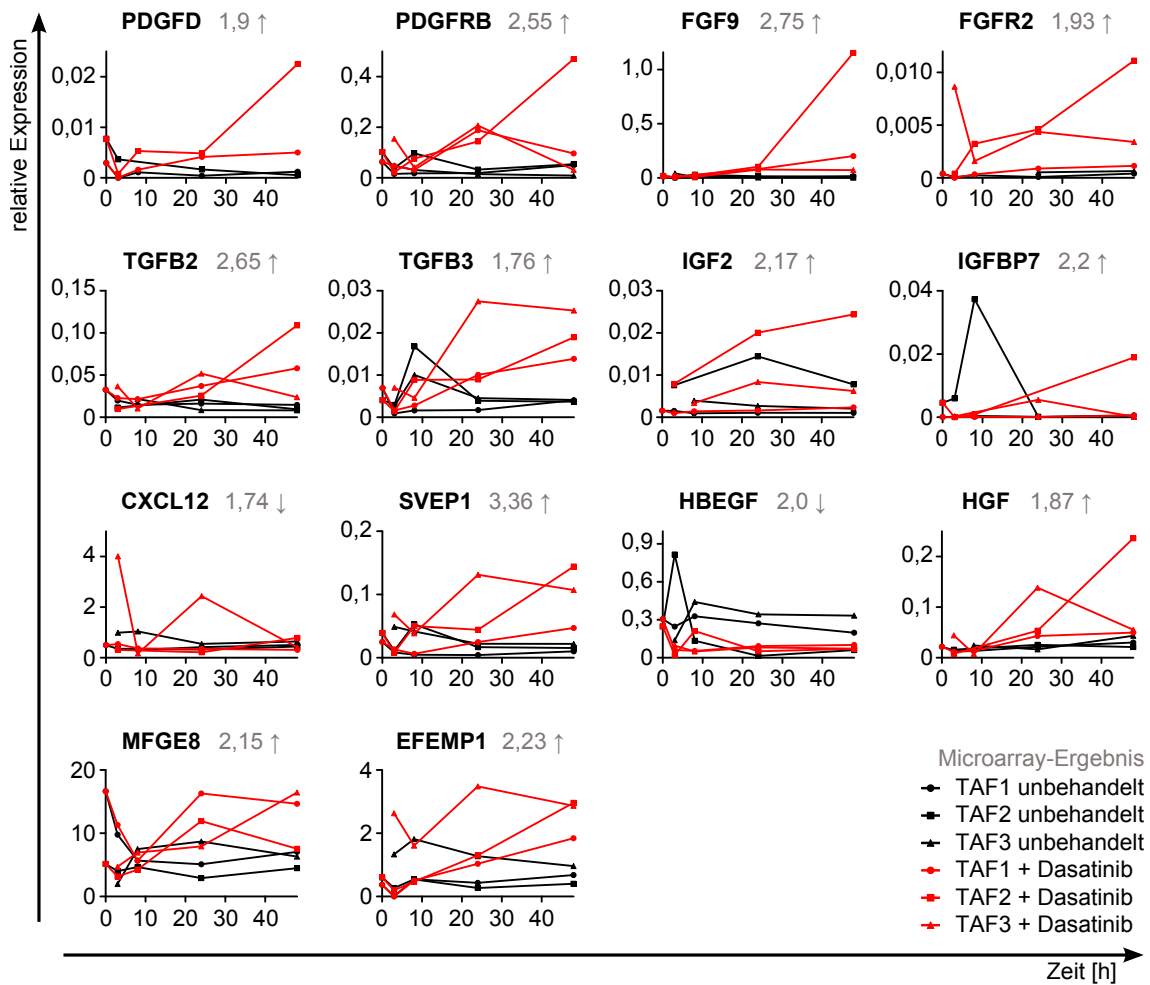


Abbildung 5.8.: Genexpressionsanalyse verschiedener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren nach Dasatinib-Behandlung mittels qRT-PCR.

Drei TAF-Linien wurden mit Serumentzug synchronisiert und für 24 h mit Serum kultiviert. Anschließend wurden sie für 3, 8, 24 und 48 h mit 0,1 μ M Dasatinib behandelt und die Genexpression mittels qRT-PCR untersucht. schwarz: unbehandelte TAF, rot: Dasatinib-behandelte TAF, grau: Expressionsänderungen der 9 TAF nach den *Microarray*-Ergebnissen ($p < 0,05$).

Gennamen siehe Abkürzungsverzeichnis, Primer siehe Tabelle A.7 auf Seite 132 im Anhang.

5.1.4.2. Einfluss von Dasatinib in einem *in vivo*-nahen Tumormodell

Die Frischgewebekultur von Lungentumor-Schnitten (*Slices*) ist ein Modell, das die Beobachtung der unterschiedlichen Zelltypen in der intakten Mikroumgebung realer Tumore erlaubt, beispielsweise bei der Reaktion auf eine Manipulation durch chemotherapeuti-

sche Behandlung (van der Kuip *et al.* 2006). Tumorgewebe-Schnitte von 13 Patienten wurden für 72 Stunden mit $0,1 \mu\text{M}$ Dasatinib behandelt, mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE-Gewebe). $3 \mu\text{M}$ -Dünnschnitte dieser *Slices* wurden für KI67- und TUNEL-Färbungen verwendet, um die Zellteilungsaktivität und den Zelltod der Fibroblasten und Tumorzellen zu quantifizieren und den Einfluss von Dasatinib auf diese Prozesse in der intakten Mikroumgebung humaner Lungentumore zu untersuchen.

KI67 ist in der Immunhistologie ein etablierter Marker für die Zellproliferation. Die Tumorschnitte von 11 Patienten wurden damit gefärbt, von 9 Patienten konnten jeweils zwei Tumorareale (Stanzen) ausgewertet werden. In den untersuchten *Slices* proliferierten auch in den unbehandelten Gewebeschnitten weniger als 10 % der Fibroblasten. Weder eine Steigerung noch eine Verringerung der Fibroblasten-Proliferation wurde beobachtet (ohne Abbildung). Daher kann keine Aussage über die mögliche, Proliferations-hemmende Wirkung von Dasatinib auf die Fibroblasten im Gewebe getroffen werden.

Allerdings sind als Therapieziel die proliferierenden Tumorbereiche ebenso interessant. In den Paraffin-Schnitten der *Slices* wurden alle Stanzen ausgewertet, die mindestens 10 % Proliferation der Tumorellen zeigten (Abbildung 5.9, 6 Patienten). Bei geringerer Proliferationsrate war häufig nekrotisches Gewebe erkennbar, das nicht mehr auf die Dasatinib-Behandlung reagieren kann. In vier dieser sechs Patienten reduziert Dasatinib die Proliferation der Tumorzellen deutlich. Im Mittelwert aller Patienten beträgt die Proliferationsrate unbehandelter Tumorzellen $37,3 \pm 17,2 \%$, die der Dasatinib-behandelten Tumorzellen $20,3 \pm 4,8 \%$ (MW \pm SD; gepaarter t-Test $p=0,09$) und Dasatinib-behandelte Tumorzellen zeigen eine geringere Variabilität der Proliferationsrate als unbehandelte Tumorzellen.

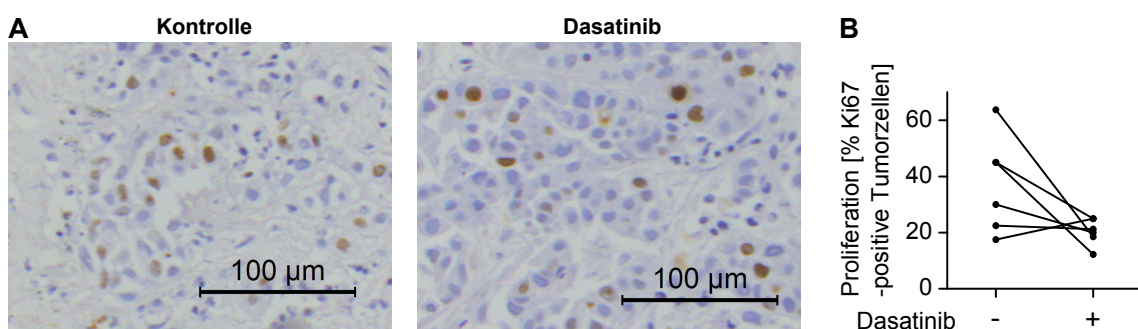


Abbildung 5.9.: Dasatinib reduziert die Proliferation der Tumorzellen in Gewebeschnitten von 4 von 6 Patienten.

A: Beispiel einer KI67-Färbung, links: Kontrolle, rechts: 72 h $0,1 \mu\text{M}$ Dasatinib. **B:** Proliferation der Tumorzellen als Anteil KI67-positiver Zellen in unbehandelten und mit Dasatinib behandelten Gewebeschnitten ($n=6$).

Dasatinib zeigte in der Zellkultur weder bei Fibroblasten noch bei H1299-Tumorzellen einen Einfluss auf den Zelltod. Nun sollte überprüft werden, ob das auch im Gewebe der Fall ist. Hier kann Dasatinib sowohl direkt auf die TAF oder die Tumorzellen wirken als auch indirekt über die TAF die Tumorzellen beeinflussen und umgekehrt. TUNEL-Färbungen Dasatinib behandelter *Slices* von 12 Patienten wurden mit denen der

unbehandelten Kontrollen verglichen (Abbildung 5.10). Der TUNEL-Assay zeigt DNA-Fragmentierung anhand der Markierung freier 3'OH-Enden und dient somit als Marker für den Zelltod.

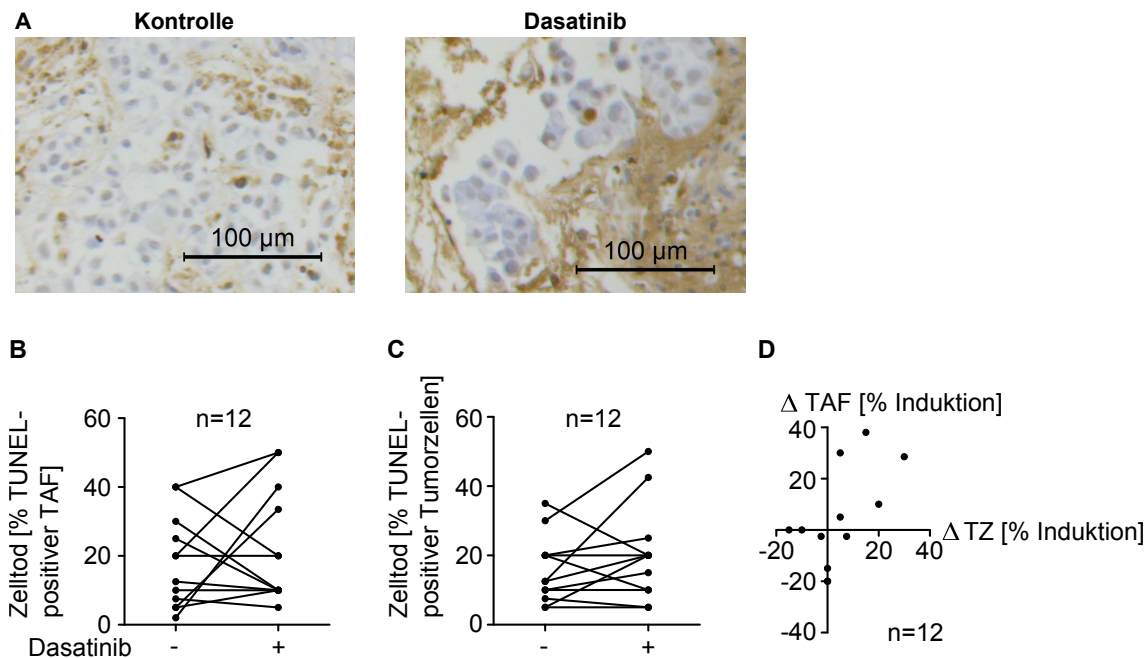


Abbildung 5.10.: Die Reaktion von TAF und Tumorzellen auf Dasatinib ist sehr heterogen.

A: Beispiel einer TUNEL-Färbung, links: Kontrolle, rechts: 72 h 0,1 μ M Dasatinib. **B:** Zelltod der TAF und **C:** Zelltod der Tumorzellen in unbehandelten und mit Dasatinib behandelten Gewebeschnitten (12 Patienten). **D:** Differenz TUNEL-positiver Zellen von behandelten und unbehandelten Gewebeschnitten in TAF und Tumorzellen.

Bei den unbehandelten Gewebeschnitten zeigt sich erneut eine große Variabilität. Die TAF sind zu 2-40 % TUNEL-positiv (Abbildung 5.10, B), die Tumorzellen zu 5-35 % (C). Auch die Reaktion auf die Dasatinib-Behandlung ist in den einzelnen Tumoren sehr verschieden. Im Mittel ist bei Dasatinib-Behandlung von TAF eine geringfügige Zelltod-Induktion von $18,1 \pm 13,4$ % auf $22,4 \pm 16,6$ % zu beobachten, bei Tumorzellen von $15,6 \pm 9,6$ % auf $20,2 \pm 13,8$ %. Bei den TAF ist die Richtung der Antwort auf Dasatinib ausgeglichen, TAF von fünf Patienten reagieren mit einer Induktion des Zelltods, fünf mit einer Hemmung des Zelltods und zwei zeigen keine Reaktion auf die Dasatinib-Behandlung. Bei den Tumorzellen zeigen sechs Patienten eine Induktion von Zelltod, drei eine Hemmung und drei keine Reaktion auf Dasatinib. Dabei findet sich eine positive Korrelation zwischen der Antwort der TAF und der Tumorzellen (Abbildung 5.10, D, Pearson $r = 0,59$, $p = 0,045$), das heißt beide Zellkompartimente reagieren parallel. Sowohl TAF als auch Tumorzellen zeigen nach Dasatinib-Behandlung häufig eine Induktion des Zelltods. In einigen Fällen reagiert jeweils einer der Zelltypen mit einer Hemmung des Zelltods, während der andere Zelltyp keine Antwort auf die Behandlung zeigt.

5.2. Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin

5.2.1. Cisplatin hemmt den Zellzyklus von Tumor-assoziierten Fibroblasten

In Vorarbeiten wurde die Heterogenität von Tumor-assoziierten Fibroblasten gegenüber Cisplatin untersucht und in MTT-Experimenten festgestellt, dass die Cisplatin-Sensitivität der TAF ähnlich variabel ist wie die eines *Panels* von Tumorzelllinien (Dissertation Sonnenberg 2009). Diese Untersuchungen wurden in dieser Arbeit fortgeführt und das Kollektiv der TAF erweitert.

Die funktionelle Ursache für die Hemmung der TAF durch Cisplatin wurde bisher nicht betrachtet. BrdU-PI-Färbungen zeigen eine deutliche Hemmung der Proliferation der TAF (Abbildung 5.11, A und B), im Mittel von 18,2 % Zellen in der S-Phase auf 5,8 %.

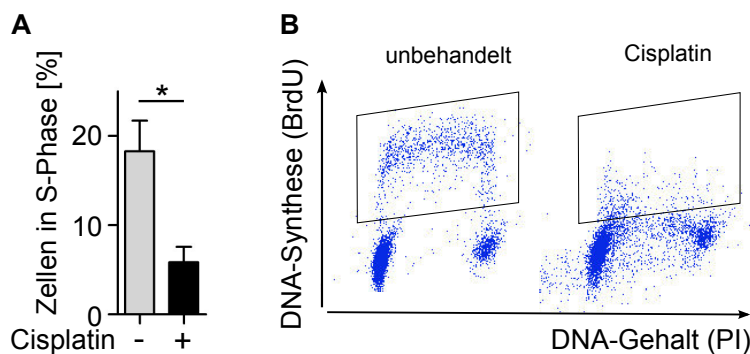


Abbildung 5.11.: Cisplatin hemmt die Proliferation von TAF.

Proliferations-Färbungen mit unbehandelten und für 24 h mit 13 μ M Cisplatin behandelten TAF von drei Patienten. **A:** BrdU-PI-Färbung (MW \pm SD), *: $p = 0,017$ (gepaarter t-Test). **B:** repräsentatives Beispiel: Cisplatin-behandelte TAF stellen die DNA-Synthese ein und stoppen im Zellzyklus, ohne einen spezifischen G₁- oder G₂-Arrest.

5.2.2. Ursachen der Variabilität der Cisplatin-Sensitivität

5.2.2.1. Genetische Ursachen

Der Einfluss verschiedener *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), die bei der Sensitivität gegen Cisplatin im Patienten eine Rolle spielen, wurde in gemeinsamen Vorarbeiten mit Maïke Sonnenberg untersucht. Dabei fand sich ein Trend, dass der SNP rs1042522 im *tp53*-Gen einen Einfluß auf die Cisplatin-Sensitivität haben könnte (Sonnenberg *et al.* 2008). Dieser SNP korreliert mit dem Ansprechen fortgeschrittener Lungentumore auf Chemotherapie (Han *et al.* 2008). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit dieser Zusammenhang in weiteren TAF untersucht.

Zum direkten Vergleich der Auswirkung des p53-Arg72Pro-Polymorphismus rs1042522 auf die Viabilität der TAF bei der Cisplatin-Plasmakonzentration C_{\max} und auf die üblicherweise veröffentlichte GI₅₀-Konzentration von Cisplatin sind jeweils beide Werte dargestellt (Abbildung 5.12 auf der nächsten Seite). Der vermutete Zusammenhang zwischen

der Cisplatin-Sensitivität der TAF und diesem SNP konnte nicht bestätigt werden. Wie in den Vorarbeiten fanden sich in den untersuchten TAF auch weiterhin keine somatischen Mutationen im *tp53*-Gen (Sonnenberg *et al.* 2008).

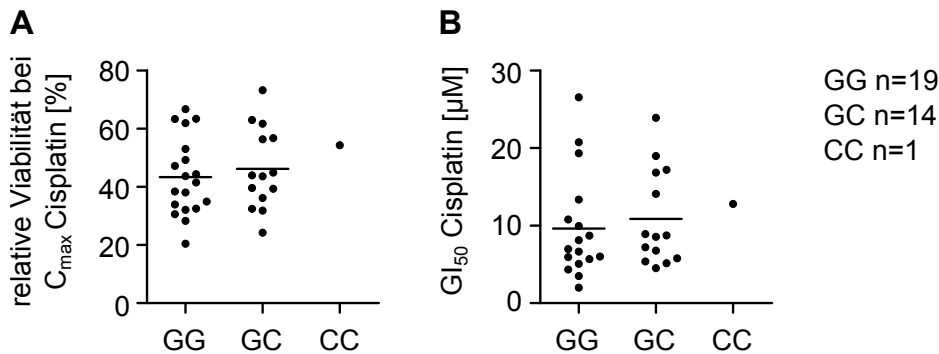


Abbildung 5.12.: Der *tp53*-Polymorphismus rs1042522 (Pro72Arg) hat keinen Einfluss auf die Cisplatin-Sensitivität.

Cisplatin-Sensitivität von TAF anhand der **A:** Viabilität der TAF bei C_{\max} Cisplatin (11 μM) und **B:** GI_{50} -Werte der unterschiedlichen Genotypen des *tp53*-SNP rs1042522 (Linie: Mittelwert).

5.2.2.2. Tumor- und Patienteneigenschaften

Geschlecht, Alter und Tumor-Histologie könnten bei der Cisplatin-Sensitivität der TAF eine Rolle als sogenannte *confounding factors* (mitbestimmende Faktoren) oder als echte Ursache von Variabilität spielen. Daher sollte untersucht werden, ob diese Eigenschaften der Patienten auch für die Sensitivität der TAF gegenüber Cisplatin eine Rolle spielen. Abbildung 5.13 auf der nächsten Seite zeigt, dass keiner der drei Faktoren einen signifikanten Einfluss hat. Die ersten Hypothesen zur Ursache der variablen Sensitivität von TAF aus unterschiedlichen Patienten in Zellkultur konnten somit nicht bestätigt und die Ursache der Variabilität nicht identifiziert werden.

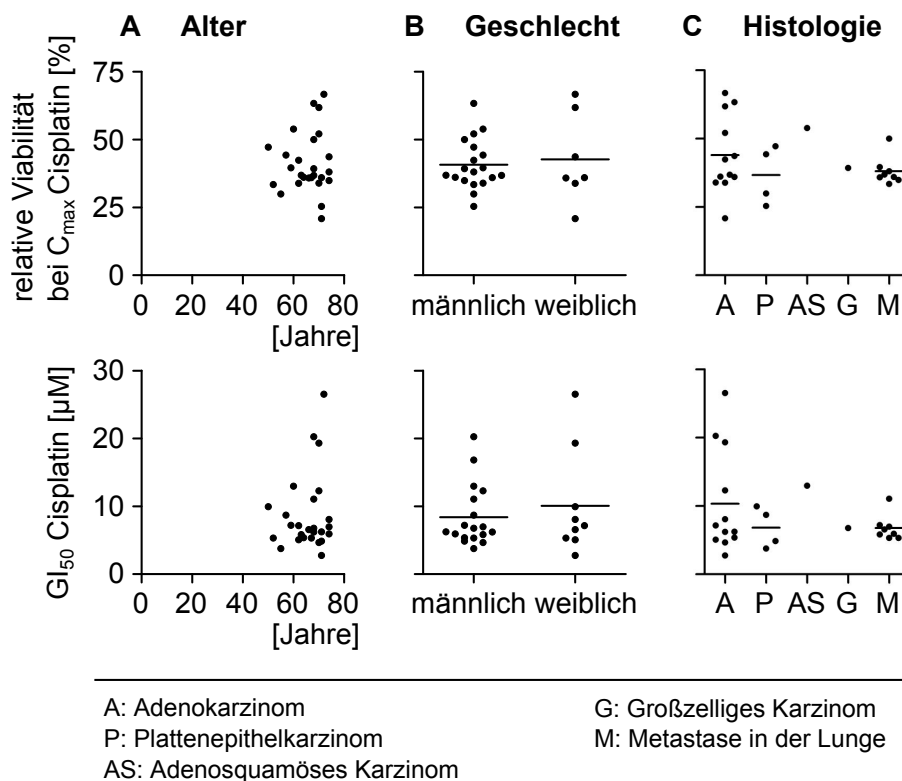


Abbildung 5.13.: Die Faktoren Alter, Geschlecht und Tumor-Histologie der Patienten haben keinen signifikanten Einfluss auf die Cisplatin-Sensitivität der TAF.

TAF-Viabilität in % der unbehandelten Kontrolle bei der C_{\max} -Cisplatin-Konzentration (11 μM , oben) und GI_{50} -Konzentration in μM (unten) für die Faktoren **A**: Alter in Jahren, **B**: Geschlecht und **C**: Histologie der Lungentumore oder Metastase in der Lunge (Linie: Mittelwert). Je höher die Viabilität bei C_{\max} oder je höher die GI_{50} -Konzentration, desto resistenter sind die TAF.

5.2.3. Einfluss der Wechselwirkungen zwischen Tumor-assoziierten Fibroblasten und Tumorzellen - Etablierung eines Modellsystems

5.2.3.1. Auswahl der auszuwertenden Parameter

In einem Tumor beeinflusst ein Signalnetzwerk zwischen den verschiedenen Zelltypen die Reaktion der einzelnen Zellen. Dieses Netzwerk ist sehr komplex, da es viele Zelltypen in unterschiedlichen Anteilen enthält, die Tumorzellen in verschiedenem Ausmaß verändert sind und damit unterschiedliche Effekte auf die anderen Zelltypen haben können. Daher wurde ein Kokultur-System von TAF und GFP-positiven H1299-Lungentumorzellen etabliert, um diese Wechselwirkungen mit nur einer stets gleichen Tumorzelllinie zu untersuchen.

Im Tumor sind in verschiedenen Stadien Prozesse wie Proliferation, Zelltod und Migration von Bedeutung. Auf die Proliferationsanalyse mittels BrdU-Markierung wurde verzichtet, weil nach der für die Färbung notwendigen Fixierung der Zellen der Vorteil der autokatalytischen GFP-Fluoreszenz verloren geht. Auf die Durchführung einer Migrations-Analyse anhand von *scratch*-Assays wurde ebenso verzichtet, weil unbehandelte Fibroblasten sehr viel stärker migrieren als die Tumorzellen und eine Optimierung der Bedingungen nicht gelang.

Als idealer Parameter erwies sich der Zelltod, der mittels AnnexinV-Alexa568 (rote Fluoreszenz) detektiert wurde. Das Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse zeigt Abbildung 5.14. Dabei können H1299-Tumorzellen durch die grüne Fluoreszenz von den GFP-negativen TAF unterschieden werden sowie tote Zellen durch die rote Fluoreszenz-Markierung mit AnnexinV-Alexa568 von lebenden nicht-fluoreszierenden Zellen.

Abbildung 5.14, A zeigt die Zellpopulation, die in die Auswertung des Zelltods einbezogen wurde. Abbildung 5.14, B zeigt links die GFP-negativen Fibroblasten, rechts die GFP-positiven H1299-Lungentumorzellen. Oben wurden AnnexinV-positive, sterbende Zellen und unten AnnexinV-negative, lebende Zellen detektiert. Beide Zellpopulationen zeigen Cisplatin-induzierten Zelltod. Damit ergeben sich vier voneinander abgegrenzte Zellpopulationen und der Anteil sterbender und lebender Zellen kann für TAF und H1299 jeweils unabhängig analysiert werden.

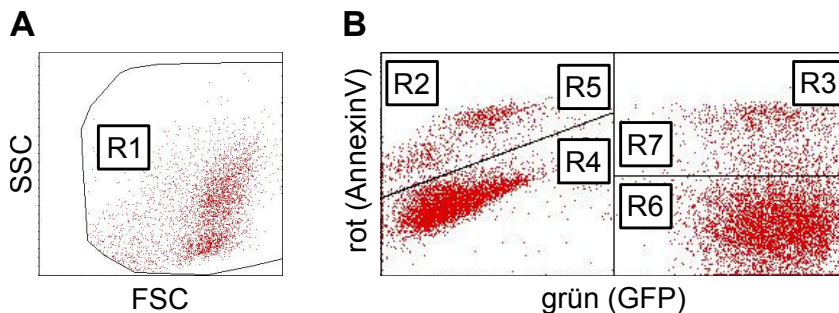


Abbildung 5.14.: Beispiel der durchflusszytometrischen Auswertung eines Kokultursystems von Cisplatin-behandelten TAF und H1299.

A: R1: Zellen in der FSC-SSC-Ansicht (*forward scatter*, *side scatter*, Streulicht). **B:** Zellen (aus R1 in A) in der FL1-FL2-Ansicht (grün-rot), R4: lebende TAF, R5: apoptotische TAF, R2 = R4 + R5 (alle TAF), R6: lebende H1299, R7: apoptotische H1299, R3 = R6 + R7 (alle H1299). Sowohl die Trennung von TAF und H1299 als auch die von lebenden und toten Zellen gelingt.

5.2.3.2. Optimierung des Zellzahl-Verhältnisses von Tumorzellen zu Fibroblasten

In Tumoren gibt es eine große Bandbreite der Anteile von Tumorzellen und anderen Zelltypen. In Lungentumoren sind außerdem die Tumorzellen je nach Histologie unterschiedlich in der Stroma verteilt. Der Einfluss des Anteils von TAF auf den Cisplatin-induzierten Zelltod der H1299 sollte daher untersucht werden. Zunächst wurden je 20 000 TAF in die Vertiefungen von 6-Loch-Platten eingesät und am darauffolgenden Tag keine, 40 000 oder 80 000 H1299 zugesetzt. Da sich beide Zelltypen circa einmal pro Tag teilen, wachsen die Zellen im Loch also im Verhältnis 1 + 0, 1 + 1 oder 1 + 2. Dies ist in Abbildung 5.15 auf der nächsten Seite, A schematisch dargestellt.

Am dritten oder am vierten Tag wurden die Zellen mit 13 μ M Cisplatin behandelt. Damit wurde zusätzlich der Effekt einer unterschiedlichen Zelldichte bei längerem Wachstum

untersucht. Nach 24 h Behandlung wurden die Zellen abgelöst, gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Der Zelltod der behandelten und unbehandelten Zellen ist in Abbildung 5.15 B für TAF und H1299 einzeln dargestellt.

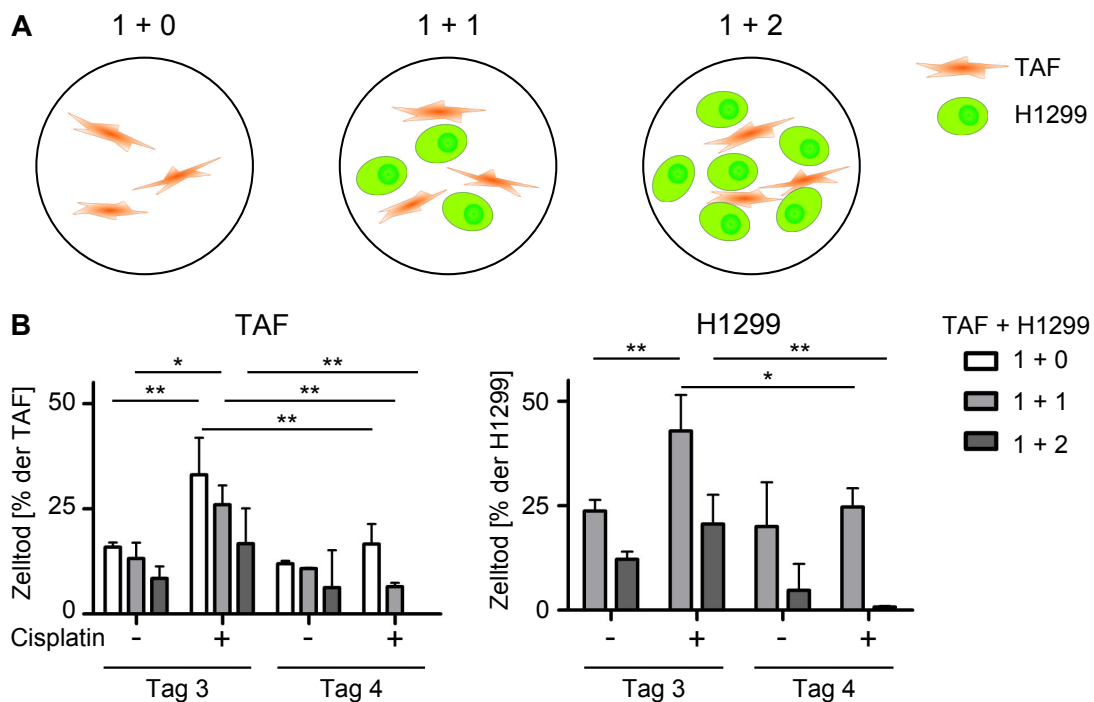


Abbildung 5.15.: Die Zelldichte, das Verhältnis von TAF zu H1299 und die Cisplatin-Behandlung haben einen Einfluss auf den Zelltod.

A: Schematische Darstellung der Verhältnisse der Zellzahlen von TAF (orange) zu H1299 (grün). **B:** Zelltod in % der Zellen je Zelltyp. Die Zellen wurden jeweils für 24 h mit 13 μ M Cisplatin behandelt, jedoch nach unterschiedlicher Dauer der Vorkultivierung (3 oder 4 Tage) und damit bei unterschiedlichen Zelldichten im Loch (MW \pm SD aus Experimenten mit 3 TAF), *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ (Bonferroni post-Tests der TwoWayANOVA).

Die Cisplatin-Behandlung und die Dauer der Kultur vor der Behandlung beeinflussen den Zelltod (TwoWayANOVA TAF: $p < 0,0001$, H1299: $p = 0,0007$). Auch das Verhältnis von TAF zu H1299 beeinflusst den Anteil toter Zellen (TAF: $p = 0,0005$, H1299: $p < 0,0001$). Bonferroni-post-Tests zeigen, dass die Zahl der toten TAF bei Cisplatin-Zugabe an Tag 3 bei Monokultur und 1 + 1-Kultur höher ist als bei den entsprechenden unbehandelten TAF. An Tag 4 ist dies nicht mehr der Fall. Bei den H1299 gilt dasselbe für die in 1 + 1-Kultur wachsenden Zellen. Die wahrscheinlichste Ursache für diese Effekte ist eine Abnahme der Cisplatin-Sensitivität mit der Zunahme der Zellzahl (siehe auch Abbildung 5.18 auf Seite 66), sowohl mit der Zunahme durch zusätzliches Einsäen von H1299 als auch durch längeres Wachstum bis Tag 4. Daher wurde im folgenden der Einfluss der Zellzahl ausgeschlossen und diese konstant gehalten. Die Behandlung erfolgte an Tag 3, 48 Stunden nach dem Einsäen der TAF.

Hierzu wurden die Zellen so eingesät, dass die Zellzahl zum Zeitpunkt der Cisplatin-Behandlung 160 000 Zellen/Loch betrug. Damit wurde die Zellzahl so gewählt, dass sie der bisher in der TAF-Monokultur erreichten entspricht. Diese waren zum Zeitpunkt der

AnnexinV-Färbung in den unbehandelten Vertiefungen der Kulturplatte subkonfluent. Um zu überprüfen, ob das Verhältnis von H1299 zu TAF einen Einfluss auf die Cisplatin-Sensitivität hat, wurden unter diesen Bedingungen die Verhältnisse TAF-Monokultur (1+0), 3+1, 1+1, 1+3 und H1299-Monokultur (0+1) untersucht (Schema siehe Abbildung 5.16 A, Ergebnisse siehe B).

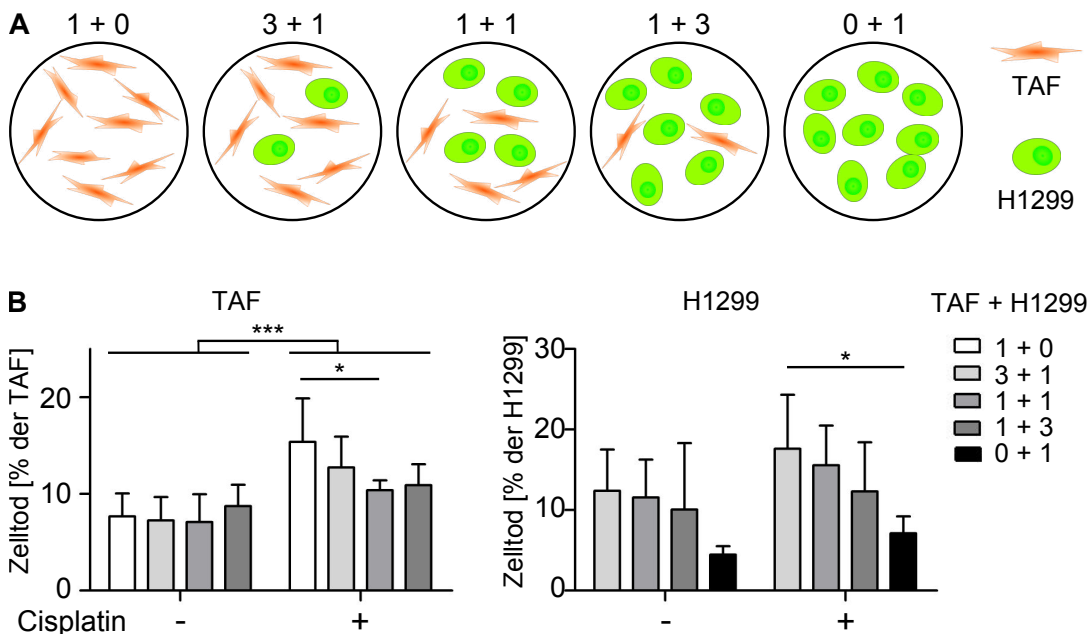


Abbildung 5.16.: Die TAF zeigen erhöhten Zelltod nach Cisplatin-Behandlung, die H1299 nicht.

A: Schema der Verhältnisse der Zellzahlen von TAF zu H1299 bei einer konstanten Zellzahl von 160 000 Zellen pro Loch. **B:** Zelltod in % der Zellen je Zelltyp, (MW \pm SD aus Experimenten mit 4 TAF), ***: $p < 0,0001$ (TwoWayANOVA), *: $p < 0,05$ (Bonferroni post-Tests der TwoWayANOVA).

Bei den TAF zeigt die Cisplatin-Behandlung einen signifikanten Effekt (TwoWayANOVA $p < 0,0001$). Nur in einem Vergleich innerhalb der Cisplatin-behandelten TAF gibt es einen signifikanten Unterschied, und zwar zwischen der Monokultur und der Kokultur mit H1299 im Verhältnis 1:1 (Bonferroni post-Test $p < 0,05$), der in TAF durch Cisplatin-Behandlung induzierte Zelltod verringert sich in Anwesenheit der Tumorzellen im Mittel von 15,4 % auf 10,4 %.

In diesem Experiment zeigt die Cisplatin-Behandlung bei den H1299 keinen signifikanten Einfluss auf den Zelltod. Es gibt jedoch innerhalb einer Behandlung den Effekt, dass die Tumorzellen weniger Apoptose zeigen, je weniger Fibroblasten kokultiiviert wurden (TwoWayANOVA $p = 0,01$). Der Bonferroni-post-Test zeigt einen signifikanten Unterschied insbesondere bei Cisplatin-behandelten H1299 zwischen den extremen Zellmischungs-Verhältnissen 3:1 und H1299-Monokultur ($p < 0,05$).

5.2.3.3. Einfluss des Alters der TAF

Um mögliche Effekte der „Alterung“ der TAF zu überprüfen, wurde der Versuch mit TAF aus einem Tumor in Passage 5 und 7 durchgeführt. Wieder wurden fünf unterschiedliche Zellzahl-Verhältnisse untersucht. In Abbildung 5.17 ist dargestellt, dass in Passage 7 tendenziell mehr TAF sterben als in Passage 5. Bei Kokultur mit den älteren TAF wurde für die H1299 hingegen eine geringere Zahl toter Zellen detektiert (TwoWayANOVA $p < 0,05$). Circa 31 % der Variabilität der H1299 kann mit dem Alter der TAF erklärt werden (TwoWayANOVA $p = 0,03$). Für alle weiteren Experimente wurden daher nur TAF in den Passagen drei bis fünf verwendet.

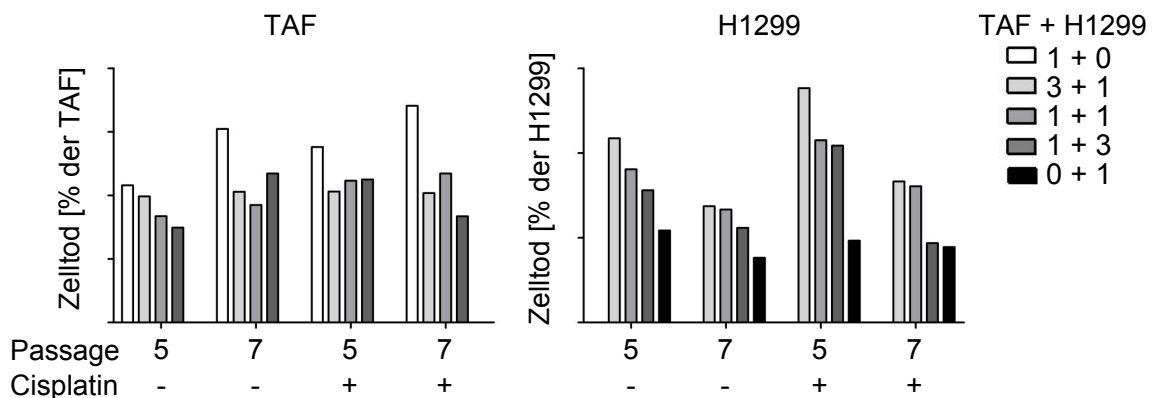


Abbildung 5.17.: Das Alter der TAF hat einen Einfluss auf die Cisplatin-Sensitivität der H1299.

Zelltod in % der Zellen je Zelltyp bei einer TAF in Passage 5 und 7 und kokultivieren H1299 mit und ohne Cisplatin-Behandlung.

5.2.3.4. Optimierung der Zellzahlen

Wiederholte Beobachtungen haben gezeigt, dass bei 160 000 Zellen pro Loch die unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt der AnnexinV-PI-Färbung subkonfluent blieben. Die Zellen wurden jetzt in Monokultur so eingesät, dass zum Zeitpunkt der Behandlung 40 000, 80 000, 100 000, 120 000, 160 000 oder 200 000 Zellen pro Loch behandelt wurden. Damit wurden sowohl „dünnere“ Kulturen mit weniger Zell-Zell-Kontakten als auch konfluente Bedingungen eingeschlossen.

Abbildung 5.18 zeigt, dass bei den TAF die Zellzahl keine Rolle spielt, die Behandlung aber einen Effekt zeigt (TwoWayANOVA $p=0,0019$). Bei den H1299 zeigt die Behandlung keine signifikant unterschiedliche Wirkung, die Zellzahl beeinflusst aber die Cisplatin-Sensitivität ($p=0,0012$). Dabei ergeben die Bonferroni post-Tests, dass signifikante Unterschiede nur im Vergleich zur niedrigsten Zellzahl vorhanden sind.

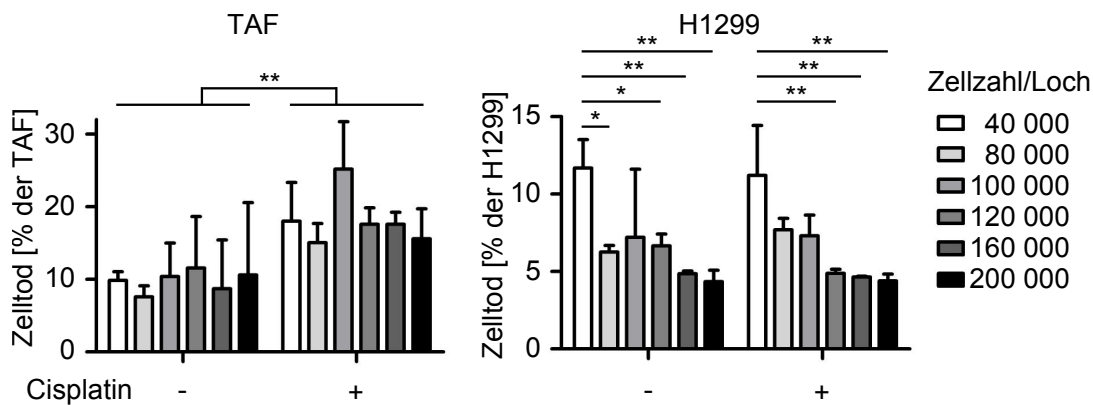


Abbildung 5.18.: Die Zellzahl beeinflusst den Zelltod von H1299.

Zelltod in % der Zellen je Zelltyp bei unterschiedlichen Zellzahlen pro Loch in Monokultur und Cisplatin-Behandlung (MW \pm SD aus 2 Experimenten mit 1 TAF), *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ (Bonferroni post-Tests der TwoWayANOVA).

5.2.3.5. Kokultur-Experimente

Als Ergebnis der Vorversuche lässt sich zusammenfassen, dass bei den Kokulturversuchen die Zelldichte und das Alter der TAF eine wichtige Rolle spielen. Da die Zellen in der Platte bei 160 000 Zellen pro Loch subkonfluent und genügend Zellen für reproduzierbare Messungen vorhanden sind, wurden die Experimente mit dieser Zellzahl durchgeführt. Die Versuche wurden außerdem auf die Passagen 3 bis 5 der TAF beschränkt. Zusätzlich wurde in der Passage vor dem Experiment die Zellteilungsrate der TAF bestimmt und damit die Zahl der einzusäenden Fibroblasten jeweils angepasst. Als Verhältnis von Fibroblasten zu Tumorzellen wurde 1:1 gewählt. Als Kontrollen dienten jeweils die Monokulturen von TAF und H1299. In Abbildung 5.19 ist der Ablauf der Experimente dargestellt.

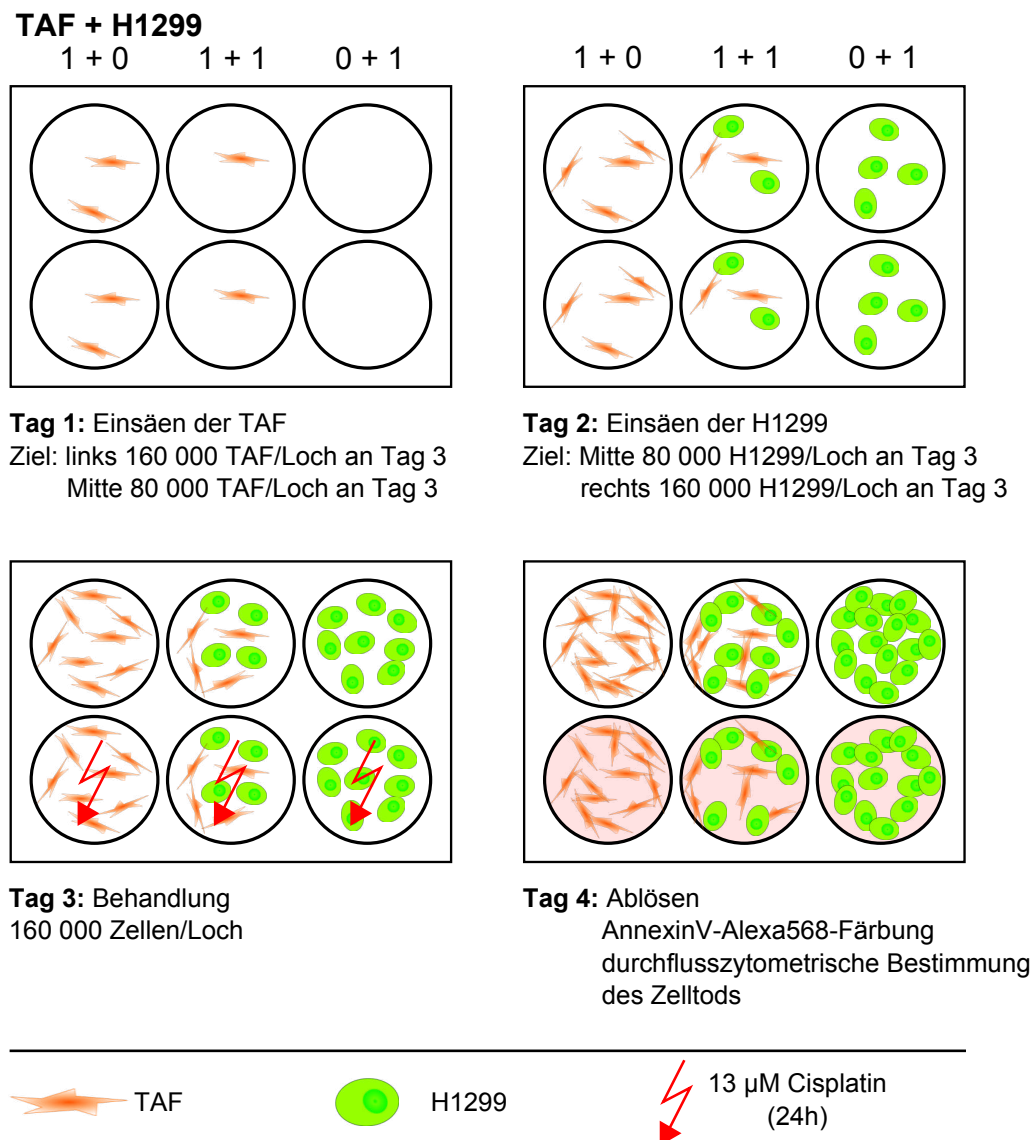


Abbildung 5.19.: Ablaufschema eines Kokultur-Experiments über 4 Tage.

Rechteck: 6-Loch-Platte, Kreis: einzelne Vertiefung der Zellkulturplatte.

5.2.4. Wechselseitiger Einfluss von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Tumorzellen auf die Cisplatin-Sensitivität

5.2.4.1. Einfluss der Kokultivierung auf die Cisplatin-Sensitivität von TAF und H1299

Die Kokultur-Experimente wurden mit TAF von 12 Patienten durchgeführt, um den Einfluss der TAF auf die H1299-Tumorzelllinie zu untersuchen und umgekehrt. In der unbehandelten Kontrolle gibt es weder bei TAF noch bei H1299 einen signifikanten Unterschied zwischen dem Anteil toter Zellen in Mono- und Kokultur (Abbildung 5.20). Bei Behandlung mit Cisplatin zeigen TAF und H1299 entgegengesetzte Reaktionen: TAF sind in Monokultur sensitiver auf Cisplatin als in Kokultur (Zelltod $MW \pm SD$: $16,7 \pm 10,3 \%$ versus $9,2 \pm 2,6 \%$), H1299 hingegen sind in Monokultur resistenter als in Kokultur ($8,9 \pm 3,5 \%$ versus $15,6 \pm 10,1 \%$). In der Monokultur induziert Cisplatin den Zelltod der TAF signifikant, nicht jedoch den der erwartungsgemäß Cisplatin-resistenten, da p53-negativen H1299. Umgekehrt zeigt die H1299-Lungentumorzelllinie Cisplatin-induzierten Zelltod in Kokultur, die TAF hingegen kaum. In der Kokultur weisen die Daten auf eine wechselseitige Beeinflussung hin, sowohl die TAF verändern die Cisplatin-Sensitivität der H1299 als auch umgekehrt.

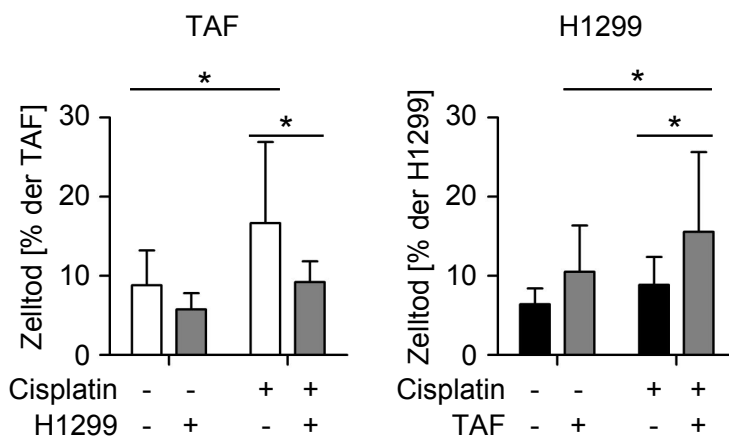


Abbildung 5.20.: Wechselseitige Beeinflussung der Cisplatin-Sensitivität von TAF und H1299 in Kokultur.

H1299-Lungentumorzellen schützen die TAF unter Kokultur-Bedingungen vor Cisplatin-induziertem Zelltod, während die TAF die H1299 gegenüber Cisplatin sensitivieren. Zelltod in % der Zellen je Zelltyp ($MW \pm SD$ aus Experimenten mit 12 TAF), *: $p < 0,05$ (Holm-korrigierte Bonferroni-post-Tests von TwoWayANOVAs).

5.2.4.2. Einfluss der Zelltypen in Gewebeschnitt-Kultur

Der gegenseitige Einfluss von TAF und Tumorzellen wurde auch in Gewebeschnitten humaner Lungentumore untersucht. In diesem Modell bleibt die Zusammensetzung und Struktur des Gewebes weitgehend erhalten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nur wenige Lungentumore auf eine Behandlung mit $13 \mu\text{M}$ Cisplatin reagieren (Dissertation Sonnenberg 2009). Diese Experimente wurden fortgeführt. Einerseits sollten damit

Fallzahlen erreicht werden, die statistische Analysen zulassen, andererseits soll hier der Einfluss von *tp53*-Mutationen der Tumorzellen auf die Cisplatin-Sensitivität von Tumorzellen und Fibroblasten untersucht werden (siehe Kapitel 5.2.5 auf der nächsten Seite).

Der Zelltod von TAF und Tumorzellen aus 40 Patienten wurde nach Behandlung mit Cisplatin untersucht (12 Patienten: Daten aus Dissertation Sonnenberg 2009). Abbildung 5.21 zeigt die Daten der immunhistochemischen TUNEL-Färbung der TAF und Tumorzellen sowie die Korrelation der Induktion oder Hemmung von Zelltod in beiden Zelltypen.

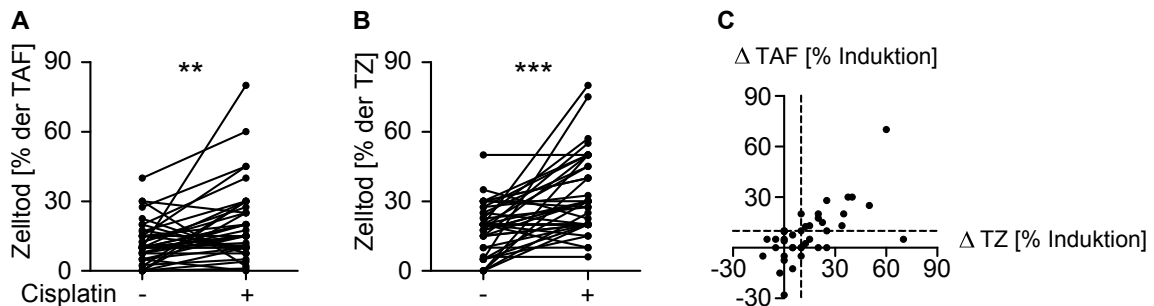


Abbildung 5.21.: Cisplatin induziert den Zelltod von TAF und Tumorzellen im Gewebe.

A: Anteil TUNEL-positiver TAF und **B:** Tumorzellen (TZ) in % der Zellen je Zelltyp in unbehandelten und für 3 Tage mit 13 μ M Cisplatin behandelten Tumor-Schnitten, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$ (Wilcoxon-Test). **C:** Induktion des Zelltods durch Cisplatin als Differenz zwischen Zelltod behandelter und unbehandelter Zellen in % der Zellen je Zelltyp, die schwarz gestrichelten Linien zeigen ein Ansprechen von über 10 % Induktion des Zelltods in TAF und Tumorzellen an.

Bei unbehandelten TAF variiert der Anteil toter Zellen von 0-40 % (Abbildung 5.21, A, MW \pm SD: $11,8 \pm 9,0$ %), bei den Tumorzellen von 0-50 % (Abbildung 5.21, B, $18,1 \pm 11,0$ %). Nach Cisplatin-Behandlung steigt der Anteil TUNEL-positiver TAF auf 0-80 % ($19,9 \pm 13,3$ %, Wilcoxon Rangsummentest: $p = 0,0011$), der toter Tumorzellen auf 6-80 % ($32,5 \pm 17,0$ %, $p < 0,0001$). Dabei ist der Cisplatin-Effekt auf die Induktion von Zelltod der Tumorzellen stärker als auf die TAF (Wilcoxon-Test $p = 0,013$).

Fünfzehn von 40 Patienten zeigen ein Ansprechen in TAF und Tumorzellen durch Induktion des Zelltods von mindestens 10 % (Abbildung 5.21, C). Damit wurden in diesem erweiterten Patientenkollektiv mehr als doppelt so viele Fälle gefunden, in denen beide Kompartimente auf Cisplatin reagieren (37,5 % statt 16,7 % in Dissertation Sonnenberg 2009). Es besteht eine positive Korrelation zwischen dem Tod von TAF und Tumorzellen (Spearman $r = 0,63$, $p < 0,0001$), aber Abbildung 5.21 zeigt, dass es auch Fälle gibt, in denen TAF und Tumorzellen in geringem Umfang nicht parallel reagieren. Dabei wurde in den TAF nur dann über 10 % Induktion des Zelltods detektiert, wenn auch die Tumorzellen auf diese Weise auf Cisplatin reagierten.

Die Proliferation von TAF und Tumorzellen aus 27 Patienten wurde anhand der immunhistochemischen Färbung mit Ki67-Antikörper bewertet. Wie bereits beschrieben, proliferieren die TAF nicht oder kaum (Sonnenberg 2009, ohne Abbildung). Bei den Tumorzellen

len wurden nur die Tumoreareale (Stanzen) ausgewertet, bei denen die Tumorzellen in unbehandeltem Gewebe mindestens 10 % Proliferation zeigten. Damit zeigt Abbildung 5.22 die Daten von 19 Patienten.

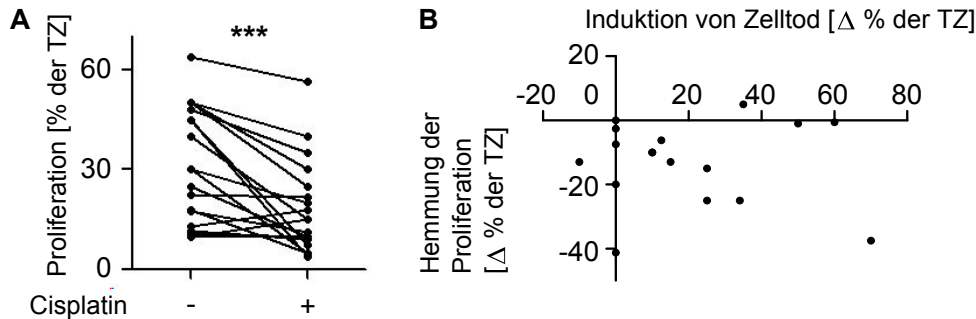


Abbildung 5.22.: Cisplatin hemmt die Proliferation der Tumorzellen im Gewebe.

A: Anteil KI67-positiver Tumorzellen (TZ) in Gewebeschnitten von 19 Patienten, ***: $p < 0,001$ (gepaarter t-Test). **B:** Induktion von Zelltod und Hemmung der Proliferation von Tumorzellen durch Cisplatin sind im Gewebe nicht korreliert (17 Patienten).

Die Proliferation von unbehandelten und Cisplatin-behandelten Tumorzellen ist bei verschiedenen Patienten sehr unterschiedlich. In unbehandelten Gewebeschnitten variiert der Anteil KI67-positiver Zellen von 10-63,8 % ($31,1 \pm 17,3$ %), in Cisplatin-behandelten Gewebeschnitten von 3,8-56,3 % ($18,3 \pm 13,8$ %, gepaarter t-Test: $p = 0,0006$).

Die Induktion von Zelltod und die Hemmung der Proliferation von Tumorzellen sind im Gewebe nicht korreliert, das heißt Cisplatin löst nicht Zelltod und Proliferationshemmung in einem bestimmten Verhältnis zueinander aus. Stattdessen können drei Gruppen von Tumoren unterschieden werden. Eine Gruppe von Tumorzellen reagiert ausschließlich mit Induktion von Zelltod (Abbildung 5.22, Punkte auf der x-Achse), eine Gruppe nur mit Hemmung der Proliferation (Punkte auf der y-Achse) und die Tumorzellen anderer Patienten zeigen eine Kombination aus beidem.

5.2.5. *tp53*-Mutationen im Lungentumor-Kollektiv

p53 ist ein zentraler Schalter bei der Reaktion von Zellen auf Cisplatin, der die Verminderung der Proliferation verbunden mit DNA-Reparatur einerseits und den Zelltod andererseits auslösen kann. Zur Untersuchung der p53-Regulation wurde eine immunhistochemische Färbung mit p53-Antikörper von unbehandelten und Cisplatin-behandelten Gewebeschnitten von 47 Patienten durchgeführt. Damit wird der funktionelle Aspekt der Mutation wie Überexpression oder Nullmutation betrachtet. Zusätzlich wurden die Exons 4-10 von *tp53*, die 99 % aller Mutationen enthalten, in Tumormaterial der zugehörigen FFPE-Gewebe aus der RBK-Pathologie sequenziert. Aus diesen zwei Techniken können sich also unterschiedliche, sich ergänzende Aussagen ergeben.

5.2.5.1. Immunhistochemische Analyse von p53

Die immunhistochemische Detektion von p53-Protein in FFPE-Gewebe der Tumor-Slices wurde mit einem Antikörper durchgeführt, der sowohl mutiertes als auch Wildtyp-p53 erkennt. Das Epitop liegt N-terminal und erkennt mit den Aminosäuren 20-25 eine Region, in der bisher keine Mutationen in Lungentumoren bekannt sind. Die Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Jens Schmid (IKP Stuttgart) durchgeführt. Es ist bekannt, dass viele Tumorzellen p53 hoch exprimieren (Casey *et al.* 1996), während andere Tumore keine oder nur geringe p53-Färbung aufweisen. Durch die zusätzliche Analyse Cisplatin-behandelter Gewebeschnitte wurde hier die Gruppe der p53 niedrig exprimierenden Tumore weiter unterteilt in solche, die nach der Behandlung eine p53-positive Färbung zeigen, also p53 stabilisieren, und solche, deren p53-Färbung auch nach der Behandlung negativ ist. Abbildung 5.23 zeigt Beispiele für Tumore, in denen die Tumorzellen nach Cisplatin-Behandlung p53 stabilisieren (Gruppe 1), bereits konstitutiv hoch exprimieren (Gruppe 2) oder nicht exprimieren (Gruppe 3).

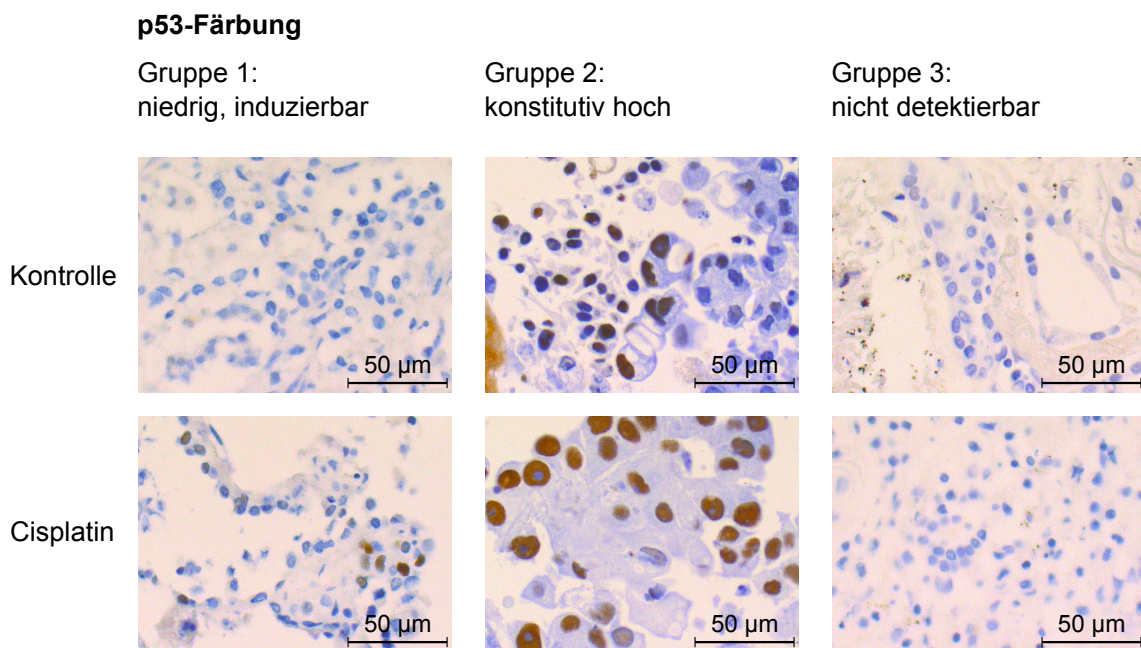


Abbildung 5.23.: Immunhistochemische p53-Färbung von unbehandelten und Cisplatin-behandelten Gewebeschnitten.

Darstellung der drei Gruppen anhand von repräsentativen Beispielen. **Gruppe 1:** unbehandelt geringe p53-Färbung, Cisplatin-behandelt starke p53-Färbung, **Gruppe 2:** konstitutiv starke p53-Färbung, unabhängig von der Behandlung, **Gruppe 3:** keine p53-Färbung, unabhängig von der Behandlung.

Diese drei durch die immunhistochemische p53-Färbung der Tumorzellen definierten Gruppen wurden für die Einteilung der Tumore verwendet. Gruppe 1 enthält Tumore, in denen die Tumorzellen in den unbehandelten Slices wenig oder nicht nachweisbare Mengen des p53-Proteins enthalten, in denen dieses jedoch nach Cisplatin-Behandlung verstärkt gefärbt wird. In Gruppe 2 ist p53 schon konstitutiv akkumuliert und bei Cisplatin-Behandlung findet sich keine stärkere Färbung. In Gruppe 3 ist p53 weder konstitutiv

noch nach Behandlung nachweisbar. In Abbildung 5.24, A sind die prozentualen Anteile p53-positiver Tumorzellen und TAF der drei Tumorgruppen gezeigt.

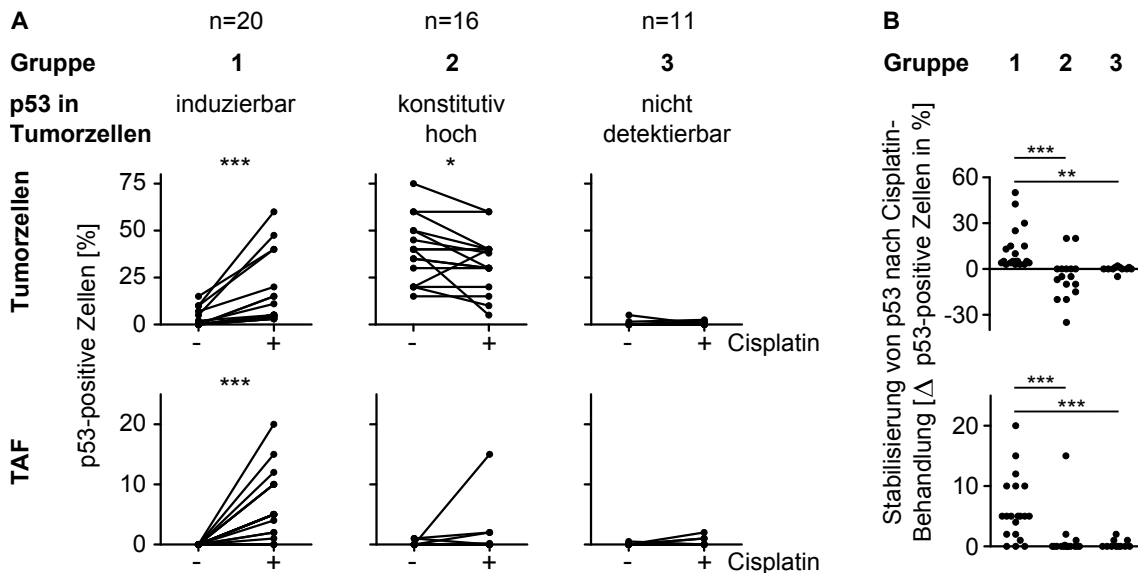


Abbildung 5.24.: Anteil p53-positiver Zellen in Tumor-Schnitten nach immunhistochemischer Einteilung in die Gruppen 1-3 (siehe Abbildung 5.23).

Tumorschnitte wurden für 3 Tage mit 13 μ M Cisplatin behandelt. Ergebnisse der p53-IHC-Färbung von 47 Patienten. **A:** Anteil der positiven Zellen der Tumorzellen (oben) und TAF (unten), *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ (t-Test oder Wilcoxon-Test). **B:** Änderung des Anteils p53-positiver Zellen durch die Cisplatin-Behandlung der Tumorzellen (oben) und TAF (unten). **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$ (Kruskal-Wallis-Test).

In den Tumoren, in denen die Tumorzellen p53 als Antwort auf die Cisplatin-Behandlung stabilisieren, ist auch in den TAF die p53-Färbung nach der Behandlung stärker (Abbildung 5.24, A, Gruppe 1). Tumorzellen, die p53 konstitutiv hoch exprimieren, zeigen nach der Behandlung im Mittel weniger p53-positive Zellen, die zugehörigen TAF stabilisieren p53 nur in einem von 16 Fällen (A, Gruppe 2). Ist p53 in den Tumorzellen nicht detektierbar, so zeigen die TAF eine ähnlich geringe p53-Färbung (A, Gruppe 3). Die Stabilisierung der p53-Expression in den Tumorzellen und zugehörigen TAF für die drei Gruppen ist in Abbildung 5.24, B aufgetragen. Die TAF der Tumore, deren Tumorzellen p53 stabilisieren können (Gruppe 1), zeigen dabei eine höhere p53-Stabilisierung als die TAF der anderen 2 Gruppen (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple Comparison Test $p < 0,0001$). Dabei gibt es in keiner der drei Gruppen eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der p53-Stabilisierung in Tumorzellen und TAF (Daten aus Abbildung 5.24, B). Stabilisiertes p53 in den Tumorzellen steht somit in keinem linearen Zusammenhang mit stabilisiertem p53 in den TAF (ohne Abbildung).

5.2.5.2. Sequenzierung von *tp53*

Die Exons 4-10 enthalten 99 % aller bekannten Mutationen des *tp53*-Gens. Diese wurden nach einem Protokoll der *International Agency for Research on Cancer* (IARC¹) sequenziert. In 24 von 47 Tumoren wurden Mutationen gefunden. Bei zwei Patienten ließ sich Exon 9 nicht amplifizieren und bei jeweils einem Patienten das amplifizierte Exon 6 oder 7 nicht vollständig sequenzieren. Diese Fälle wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Somit wurden 24 Mutationen in 43 Tumoren gefunden (55,8 %, Tabelle A.4 auf Seite 128 im Anhang).

Den *tp53*-Pro72Arg-SNP rs1042522, der mit dem Ansprechen fortgeschrittener Lungentumore auf Chemotherapie korreliert ist (Han *et al.* 2008), weisen zwölf der 24 Fälle mit einer Mutation auf (viermal homozygot), aber nur fünf der 19 Fälle mit Wildtyp-*tp53* (26,3%, zweimal homozygot).

In diesem Kollektiv waren 8 von 8 Plattenepithelkarzinomen, 1 von 1 Großzelligem Karzinom, 3 von 5 Adenosquamösen Karzinomen (60 %) und 4 von 17 Adenokarzinomen (23,5 %) mutiert. Außerdem wiesen 5 von 12 Metastasen (58,3 %) eine *tp53*-Mutation auf. Damit findet sich die bekannte Verteilung, dass Plattenepithelkarzinome und Adenosquamöse Karzinome häufiger Mutationen aufweisen als Adenokarzinome (Tammemagi *et al.* 1999).

Es wurden 19 Aminosäure-Austausch- (nicht-synonyme) Mutationen, vier *frameshift*-Mutationen durch 1 bp-Deletion und sieben größere Deletionen gefunden. Fünf Patienten wiesen zwei Mutationen gleichzeitig auf, dreimal eine Kombination aus einem Aminosäure-Austausch, *downstream* gefolgt von einer Deletion, eine Deletion gefolgt von einem Aminosäure-Austausch und einmal zwei Punktmutationen in aufeinanderfolgenden *Codons*. Ein Patient wies eine 9 bp-Deletion auf, die eine Aminosäure verändert (Trp146Cys) und drei deletiert. Unter den 19 Aminosäure-Substitutionen finden sich drei Stop-Mutationen (18,8 %, IARC-TP53-Datenbank²). Diese drei Fälle weisen auch einen deutlichen Wildtyp-Allel-Peak auf, erscheinen also heterozygot mutiert und zeigen nur eine schwache Stabilisierung von p53 in den Tumorzellen.

Abbildung 5.25 auf der nächsten Seite zeigt einen Vergleich der veränderten *tp53*-*Codons*, die in Lungentumoren bereits aus der IARC-TP53-Datenbank² bekannt sind, mit denen des hier untersuchten Patienten-Kollektivs. Die Mutationen befinden sich nur in den DNA-Motiven von *tp53*, die für die Prolin-reiche Domäne (PRD) und die DNA-Bindedomäne (DBD) codieren.

¹www-p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf

²www-p53.iarc.fr

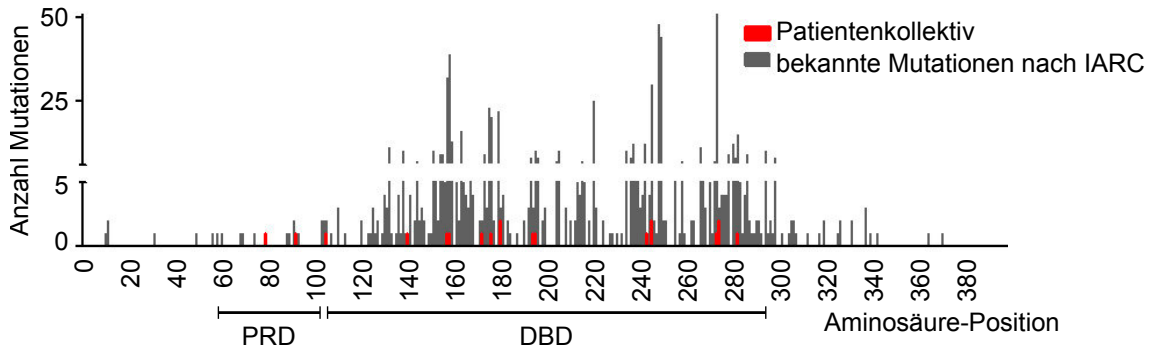


Abbildung 5.25.: Vergleich der Häufigkeit von *tp53*-Mutationen in Lungentumoren (IARC-Datenbank) und im hier untersuchten Patientenkollektiv.

Häufigkeit der Mutationen in der IARC-Datenbank¹ von Lungentumor-Histologien, die im hier verwendeten Patientenkollektiv vertreten sind, nur *nonsense*- und *missense*-Mutationen. Die in diesem Kollektiv gefundenen Mutationen befinden sich in der Prolinreichen Domäne (PRD) und der DNA-Bindedomäne (DBD), zwei davon auch am Mutations-Hot Spot Aminosäure 273.

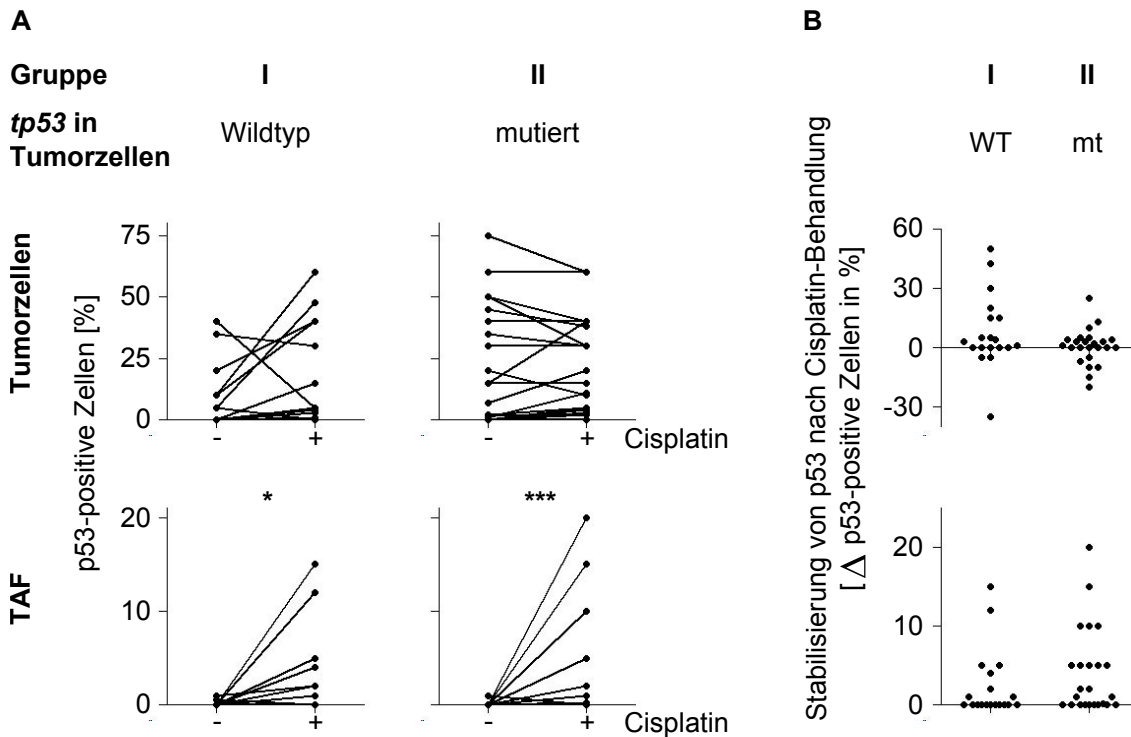


Abbildung 5.26.: Anteil p53-positiver Zellen in Tumor-Schnitten nach Einteilung in Gruppe I und II, in denen die Tumorzellen anhand der *tp53*-Sequenzierung in Wildtyp und mutiert eingeteilt wurden.

Ergebnisse der p53-Sequenzierung von 43 Patienten (19 Wildtyp, 24 mutiert). **A:** Anteil der p53-positiven Zellen der Tumorzellen (oben) und TAF (unten) ohne und mit Cisplatin-Behandlung in den Gruppen I und II, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ (gepaarter t-Test). **B:** Änderung des Anteils p53-positiver Zellen durch die Cisplatin-Behandlung in den Gruppen I und II in Tumorzellen (oben) und TAF (unten).

¹www-p53.iarc.fr

Der *tp53*-Mutationsstatus der Tumorzellen sollte auch mit der immunhistochemischen p53-Färbung von TAF und Tumorzellen verglichen werden. Die p53-Stabilisierung in Tumorzellen und TAF aus Tumoren mit Wildtyp (Gruppe I) oder mutiertem *tp53* (Gruppe II) ist in Abbildung 5.26 auf der vorherigen Seite, A gezeigt. In beiden Gruppen reagieren die Zellen gleich, die Tumorzellen zeigen keine signifikante Stabilisierung von p53, nur bei Wildtyp-*tp53* ist ein Trend erkennbar (t-Test: $p = 0,07$). TAF hingegen können p53 stabilisieren, unabhängig vom Mutations-Status der benachbarten Tumorzellen. Es gibt aber in beiden Gruppen auch TAF, die auf Cisplatin-Behandlung nicht mit p53-Stabilisierung reagieren.

Zwischen den Gruppen I und II zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei Tumorzellen oder TAF (Abbildung 5.26 auf der vorherigen Seite, B). Es gibt in beiden Gruppen sowohl Tumore, in denen mehr Tumorzellen mit p53-Färbung detektiert wurden als auch solche mit weniger p53-positiven Zellen nach Cisplatin-Behandlung. Die TAF aus einem Teil der Tumore können sowohl in der Nachbarschaft von Tumorzellen mit Wildtyp- als auch mit mutiertem *tp53* in geringem Umfang p53 stabilisieren.

Ein Vergleich der Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse (Gruppen 1-3, siehe Kapitel 5.2.5.1 auf Seite 71) mit denen der Sequenzierung (Gruppen I und II) zeigt unterschiedliche Anteile mutierter Tumore in den immunhistochemisch definierten Gruppen. Von den Tumorzellen, die p53 nach Cisplatin-Behandlung stabilisieren (IHC Gruppe 1), sind 52,6 % *tp53*-mutiert und 78,6 % der Tumorzellen, die p53 konstitutiv hoch exprimieren (Gruppe 2), haben eine *tp53*-Mutation. Bei den Fällen mit immunhistochemisch nicht detektierbarem p53 (Gruppe 3) ist mit 30 % der geringste Anteil der Tumorzellen mutiert. Abbildung 5.27 auf der nächsten Seite zeigt die Stabilisierung von p53 in Tumorzellen und TAF im Zusammenhang mit der Gruppierung nach Immunhistochemie (Gruppe 1-3) und Mutations-Status (Gruppe I und II) der Tumorzellen.

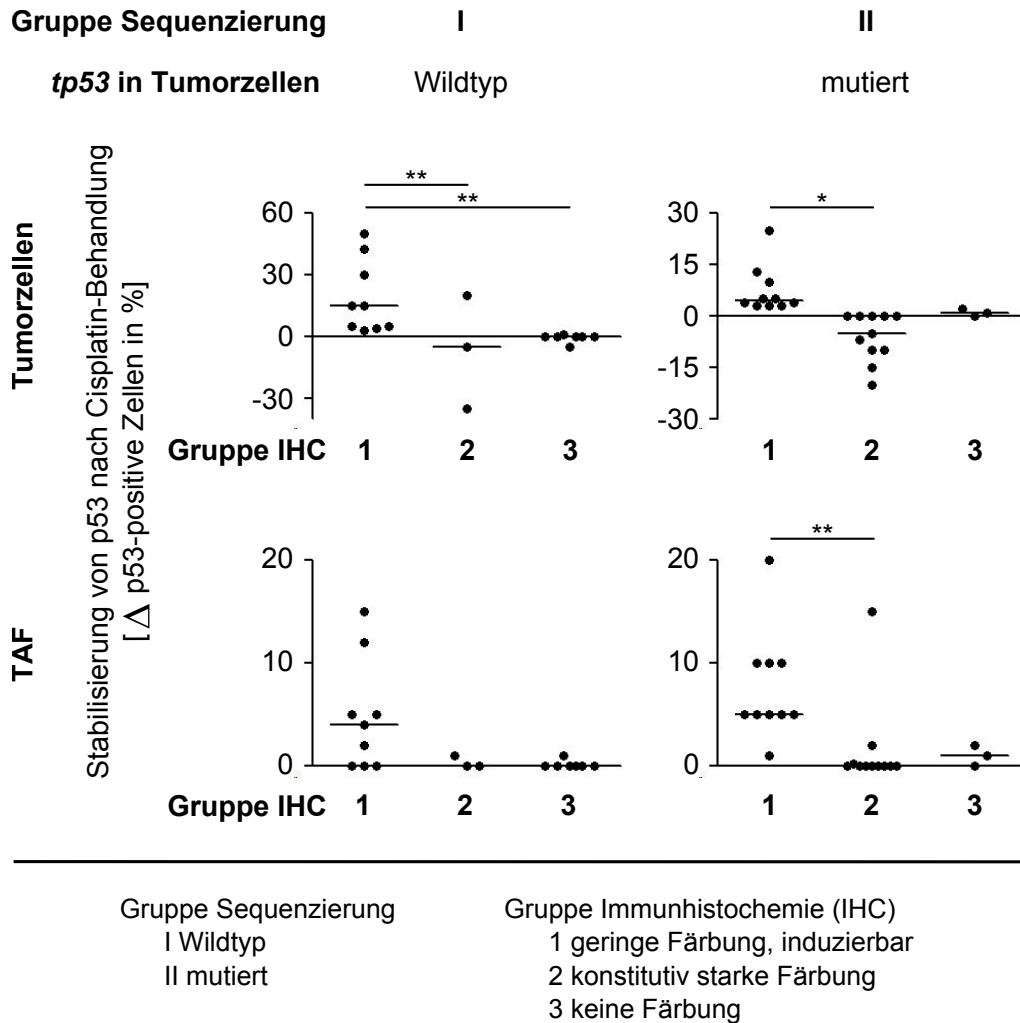


Abbildung 5.27.: Zusammenhang der p53-Stabilisierung (Gruppen 1-3) und *tp53*-Mutationsstatus (Gruppen I, II) in Tumorzellen (oben) und den zugehörigen, nicht-mutierten TAF (unten).

Die Daten aus Abbildung 5.24 auf Seite 72, B wurden für die Gruppen I und II einzeln dargestellt. Linie: Median, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ (Bonferroni post-tests der TwoWayANOVA).

Abbildung 5.27 zeigt, dass bei WT-*tp53* die meisten Tumorzellen in Gruppe 1 sind (47 %), nur 16 % in Gruppe 2, aber auch viele Tumorzellen bei Cisplatin-Behandlung nicht mit p53-Stabilisierung reagieren (37 %, Gruppe 3). Bei Tumoren mit mutiertem *tp53* hingegen sind die meisten Tumorzellen in Gruppe 2 (46 %) zu finden, 42 % in Gruppe 1 und nur 13 % in Gruppe 3. Eine TwoWayANOVA identifiziert als bestimmenden Faktor für das Ausmaß der p53-Stabilisierung nur die immunhistochemische Gruppierung ($p = 0,01$), der Mutationsstatus hat darauf keinen Einfluss ($p = 0,46$). Die post-Tests zeigen, dass bei den *tp53*-Wildtyp und -mutierten Tumorzellen jeweils die Gruppe 1 signifikant verschiedene p53-Stabilisierung zeigt als Gruppe 2. Dieselbe Analyse für TAF zeigt diesen Unterschied nur für die Gruppe mit mutierten Tumorzellen.

5.2.5.3. Kein Einfluss von p53-Stabilisierung, *tp53*-Mutationen und -SNP rs1042522 auf den Zelltod und die Zellproliferation von TAF und Tumorzellen in Gewebeschnitt-Kultur

Für einen Teil der Tumore, deren p53-Status untersucht wurde, liegen auch immunhistochemische Färbungen für Marker der Proliferation und des Zelltods in unbehandelten und Cisplatin-behandelten Gewebeschnitten vor. Abbildung 5.28 zeigt die Ergebnisse der KI67-Färbung der Tumorzellen und der TUNEL-Färbung von Tumorzellen und TAF nach den verschiedenen Kriterien der p53-Gruppierungen.

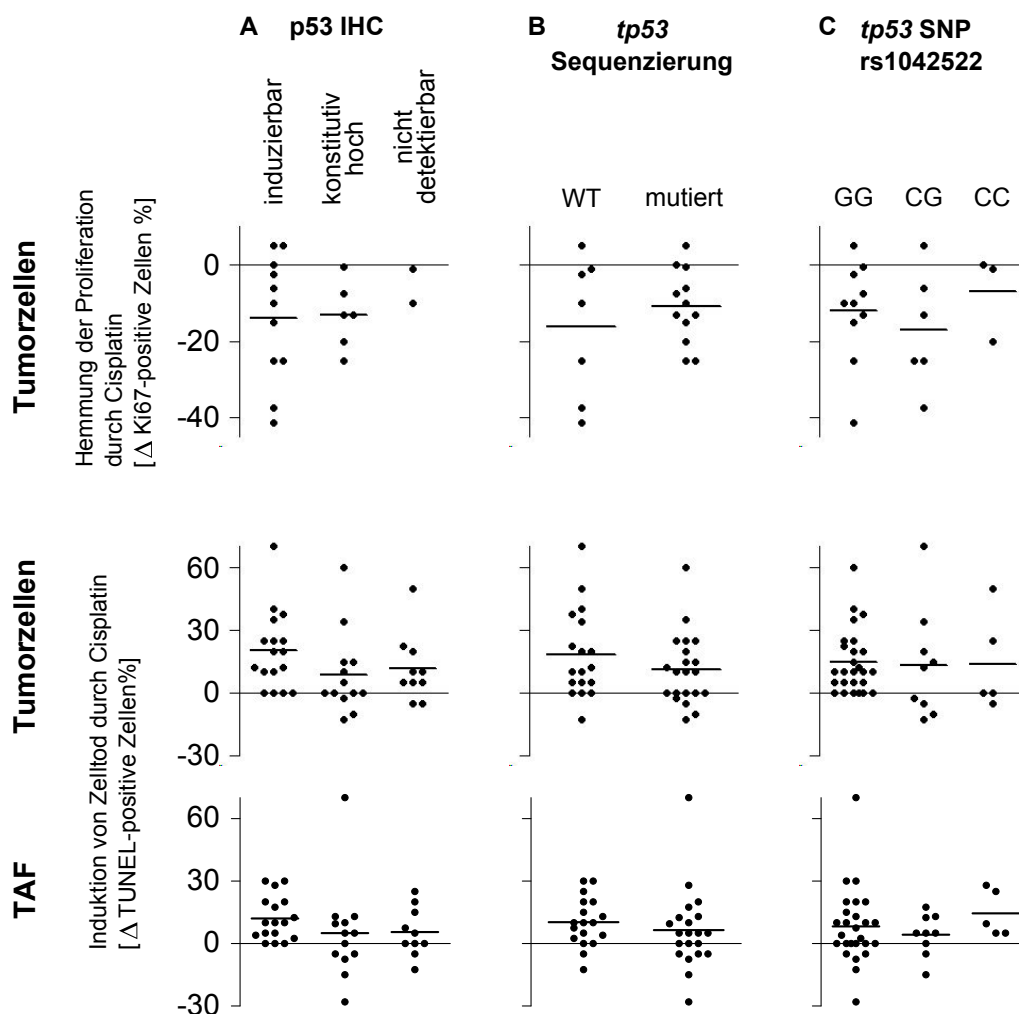


Abbildung 5.28.: Verschiedene p53-Eigenschaften zeigen keinen Einfluss auf Proliferation von Tumorzellen sowie Zelltod von Tumorzellen und TAF.

Proliferation: KI67 19 Fälle. Zelltod: TUNEL *tp53* WT-mutiert 39 Fälle, TUNEL immunhistochemische p53-Färbung (IHC) und *tp53*-SNP rs1042522 40 Fälle.

tp53-Mutationen haben auf die Cisplatin-induzierte Hemmung der Proliferation der Tumorzellen keinen Einfluss (Abbildung 5.28, oben, B). Diese ist für WT-*tp53* und mutierte Zellen gleich variabel. Das Gleiche gilt für die immunhistochemische Einteilung (A) und den Arg72Pro-SNP (C). Diese drei Faktoren haben auch keinen Einfluss auf die Induktion des Zelltods in Tumorzellen (Abbildung 5.28, Mitte) und TAF (unten).

Die bekannte Korrelation zwischen Zelltod der Tumorzellen und Zelltod der TAF (Abbildung 5.21 auf Seite 69, C) bleibt bei Wildtyp- und mutiertem *tp53* erhalten (WT: $r=0,55$, $p=0,02$ und mutiert: $r=0,59$, $p=0,006$). Eine noch stärkere Korrelation gilt für Arg72-homozygote Patienten ($r=0,70$, $p<0,0001$). Bei der immunhistochemischen Gruppe der Patienten mit p53-stabilisierenden Tumorzellen ist die Korrelation schwächer als beim gesamten Kollektiv und nicht signifikant (Gruppe 1: $r=0,46$, $p=0,054$), bei den der konstitutiv hoch exprimierenden und der nicht detektierbaren ist sie verstärkt (Gruppe 2: $r=0,80$, $p=0,0019$ und Gruppe 3: $r=0,65$, $p=0,029$, ohne Abbildung). Das heißt die stärkste Korrelation zwischen Zelltod der Tumorzellen und der TAF zeigen in diesem Patienten-Kollektiv diejenigen Tumore mit immunhistochemisch p53-konstitutiv hoch exprimierenden Tumorzellen, gefolgt von denjenigen mit Arg72-homozygoten Tumorzellen.

5.3. Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin bei Kombination mit PDGFR-Inhibitoren

5.3.1. Einfluss von PDGFR-Inhibitoren auf die Cisplatin-Sensitivität der Tumor-assoziierten Fibroblasten

Durch genetische Mutationen entstehen in Tumorzellen Therapie-Resistenzen wahrscheinlich schneller als in TAF (Mueller und Fusenig 2004; Joyce 2005), weshalb die Hemmung der TAF-Viabilität ein attraktives Behandlungsziel ist. Das Eingreifen in unterschiedliche zelluläre Prozesse gleichzeitig kann der Resistenz-Entstehung entgegenwirken. Daher werden bereits vermehrt Kombinationstherapien in der Klinik eingesetzt und erforscht. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss einer kombinierten Behandlung mit PDGFR-Inhibitoren und Cisplatin untersucht.

Im MTT-Experiment wurde der Einfluss der bereits in Kapitel 5.1.2 auf Seite 44 untersuchten PDGFR-Inhibitoren Dasatinib, Imatinib und Nilotinib auf die Cisplatin-Sensitivität der TAF ermittelt. Dafür wurden die TAF mit konstanten, geringfügig unter dem Plasmaspiegel liegenden Inhibitor-Konzentrationen, aber steigenden Cisplatin-Konzentrationen behandelt.

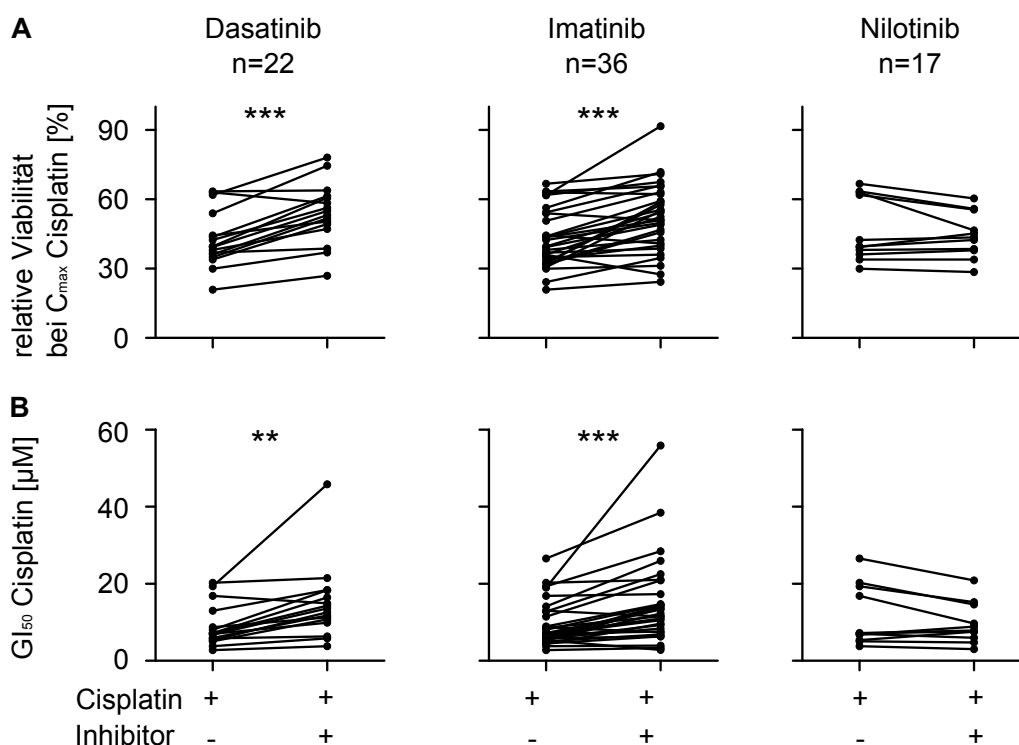


Abbildung 5.29.: Veränderung der Cisplatin-Sensitivität von TAF bei Kombinationsbehandlung mit den PDGFR-Inhibitoren Dasatinib, Imatinib und Nilotinib.

Jeder Punkt entspricht **A**: der relativen Viabilität bei C_{max} oder **B**: der GI_{50} -Konzentration von Cisplatin einer TAF bei einer Kombinationsbehandlung mit $0,1 \mu\text{M}$ Dasatinib, $1 \mu\text{M}$ Imatinib oder $1,7 \mu\text{M}$ Nilotinib. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$ (t-Tests).

Dasatinib und Imatinib vermindern die Sensitivität der TAF gegenüber Cisplatin. Anhand der C_{max} -Daten ist eine Steigerung der relativen TAF-Viabilität um circa $\frac{1}{5}$ zu sehen (Da-

satinib: $42,6 \pm 12,2 \%$ auf $53,9 \pm 13,1 \%$, Imatinib $42,6 \pm 12,5 \%$ auf $52,0 \pm 14,7 \%$, gepaarter t-Test bei beiden Behandlungen $p < 0,0001$). Bei einer Kombination mit Nilotinib konnte dagegen kein Einfluss auf die Cisplatin-Sensitivität der TAF detektiert werden.

5.3.2. Einfluss von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Dasatinib auf die Cisplatin-Sensitivität von H1299-Tumorzellen im Kokultur-Modell

Bei Cisplatin-Mono-Behandlung wurde beobachtet, dass Tumorzellen in Kokultur mit TAF mehr Zelltod induzieren als in Monokultur, während die TAF unter Kokultur-Bedingungen ein geringeres Zelltod-Niveau zeigen als unter Monokultur-Bedingungen. Die bereits beschriebenen Kokultur-Experimente (siehe Abbildung 5.19 auf Seite 67) wurden mit drei TAF auch für Cisplatin in Kombination mit Dasatinib durchgeführt, um zu untersuchen, ob Dasatinib einen Einfluss auf die Cisplatin-Sensitivität der H1299 oder der TAF ausübt.

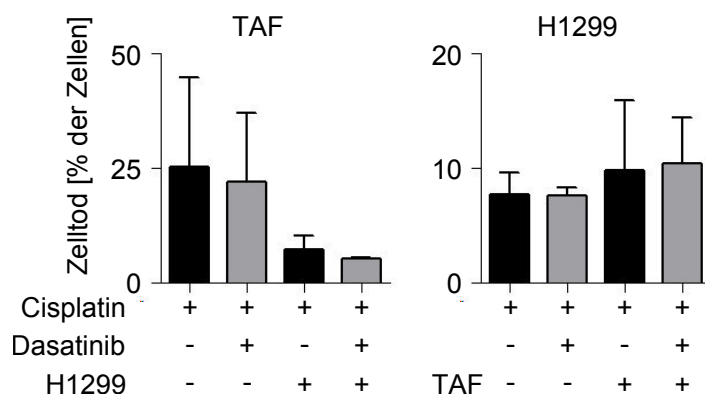


Abbildung 5.30.: Die Reaktionen von TAF und H1299 auf Cisplatin werden in Mono- und Kokultur durch Dasatinib nicht verändert.

Die Kokultur-Experimente wurden wie in Abbildung 5.19 auf Seite 67 durchgeführt. Dargestellt ist der mittlere Zelltod aus drei Experimenten mit unterschiedlichen TAF in Kokultur mit H1299 oder in Monokultur (MW \pm SD).

Bei einer kombinierten Behandlung mit Cisplatin und Dasatinib konnte im Kokultur-Experiment kein zusätzlicher Einfluss von Dasatinib auf den Zelltod detektiert werden. Auch in den Monokultur-Kontrollen von TAF und H1299 konnte kein veränderter Anteil toter Zellen beobachtet werden. Tendenziell sind die TAF auch bei der Kombinationsbehandlung in Kokultur resistenter gegen Cisplatin-induzierten Zelltod als bei Monokultur (links, graue Balken).

5.3.3. Einfluss von Dasatinib auf die Cisplatin-Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Tumorzellen in Gewebeschnitten

Der Zelltod von TAF und Tumorzellen sowie die Proliferation der Tumorzellen wurden auch in Gewebeschnitten von Lungentumoren untersucht, die mit Cisplatin oder einer

Cisplatin-Dasatinib-Kombination behandelt wurden.

Im TUNEL-Assay zeigt sich erneut die große Variabilität von TAF und Tumorzellen beim Zelltod Cisplatin-behandelter Zellen und der Reaktion auf die zusätzliche Behandlung mit Dasatinib (Abbildung 5.31, A und B).

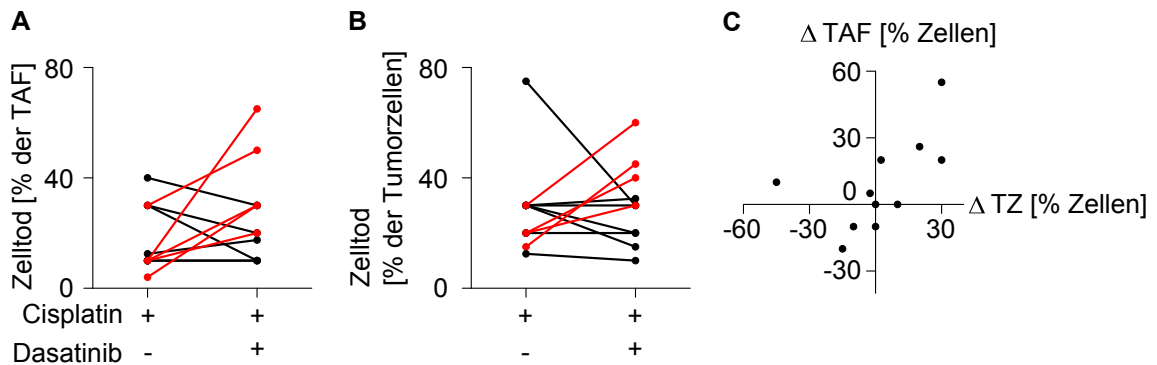


Abbildung 5.31.: Die Dasatinib-Behandlung von Tumorschnitten zusätzlich zur Cisplatin-Behandlung beeinflusst die TAF in acht Fällen und die Tumorzellen in sieben Fällen.

Auswertung der TUNEL-Färbung von Gewebeschnitten aus 11 Patienten, die mit 13 μM Cisplatin allein oder in Kombination mit 0,1 μM Dasatinib behandelt wurden. **A:** Zelltod der TAF, rot: Induktion von Zelltod durch Dasatinib von mindestens 10%. **B:** Zelltod der Tumorzellen. **C:** Zusammenhang zwischen Dasatinib-Effekten auf Tumorzellen (TZ) und Fibroblasten, dargestellt als Differenz der TUNEL-Daten mit und ohne Dasatinib-Behandlung.

TAF in den Cisplatin-behandelten Gewebeschnitten zeigen 4-40% Zelltod (Abbildung 5.31, A, MW \pm SD: $17,9 \pm 12,1\%$), die Tumorzellen 12,5-75% (Abbildung 5.31, B, $28,4 \pm 16,8\%$). Bei gleichzeitiger Behandlung mit Cisplatin und Dasatinib wurden 10-65% ($26,6 \pm 17,5\%$) tote TAF und 10-60% ($30,2 \pm 14,3\%$) tote Tumorzellen detektiert. Dasatinib induziert oder hemmt damit nicht einheitlich zusätzlichen Zelltod. Die Induktion von Zelltod durch die Zugabe von Dasatinib ist aber häufiger als die Hemmung des Zelltods (TAF: 5 *versus* 3 Tumore, Tumorzellen: 4 *versus* 3 Tumore).

Der durch Dasatinib in mehreren Fällen zusätzlich induzierte oder verminderte Zelltod von Tumorzellen und TAF ist tendenziell eine parallele Reaktion (Abbildung 5.31 C; Pearson $r=0,57$, $p=0,065$). Das heißt wenn die Tumorzellen bei der Doppelbehandlung mehr Zelltod induzieren als bei der Cisplatin-Behandlung allein, dann kann auch bei den TAF eine Induktion beobachtet werden und ebenso bei einer Reduktion. Drei Tumore zeigen eine zusätzliche Wirkung von Dasatinib im Form einer Induktion von Zelltod um mindestens 10% in beiden Kompartimenten, zwei Tumore zeigen aber auch eine Reduktion dieser Größenordnung.

Der Einfluss von Dasatinib auf die Cisplatin-Sensitivität der Tumorzellen wurde mittels KI67-Färbung auch für die Proliferation untersucht. Von elf Tumoren zeigten fünf ohne Behandlung kaum Proliferation und wurden aus der Bewertung ausgeschlossen. In einem weiteren Fall enthielt das Gewebe, das mit der Kombination aus Cisplatin und Dasatinib behandelt wurde, zu wenig Tumorzellen für eine Bewertung. Damit gingen fünf Tumo-

re in Abbildung 5.32 ein, für zwei Tumore wurden die Mittelwerte von Schnitten aus verschiedenen Tumorarealen verwendet.

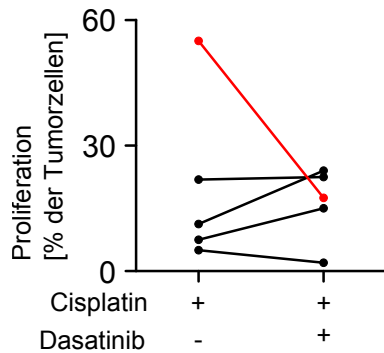


Abbildung 5.32.: Nur in zwei Fällen zeigt Dasatinib eine Wirkung auf die Proliferation von Tumorzellen nach Cisplatin-Behandlung von mindestens 10 %.

Auswertung der KI67-Färbung von Gewebeschnitten aus 5 Patienten, die mit 13 μ M Cisplatin allein oder in Kombination mit 0,1 μ M Dasatinib behandelt wurden. rot: Induktion von Zelltod durch Dasatinib von mindestens 10 %.

Die Tumorzellen reagieren nur in geringem Umfang auf die zusätzliche Behandlung mit Dasatinib. Ein Tumor zeigt eine Förderung der Proliferation von über 10 %. Die Tumorzellen mit der höchsten Proliferationsrate bei Cisplatin-Einzel-Behandlung zeigen hingegen eine deutliche Reduktion der Proliferation bei der Kombinationsbehandlung. Die Tumorzellen dieses Patienten zeigen auch nur geringen und unveränderten Zelltod, jeweils 10 % TUNEL-positive Zellen bei beiden Behandlungen. Weitere Fälle müssen zeigen, ob die Proliferation von Cisplatin-resistenten Tumorzellen durch Dasatinib gehemmt wird.

5.4. Vergleich von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten

5.4.1. Genexpressionsanalyse von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten

5.4.1.1. Genexpressionsmuster mittels *Microarray*-Analyse

Tumor-assoziierte und Normalgewebe-assoziierte Fibroblasten (TAF und NAF) aus dem gleichen Patienten zu isolieren eröffnet die Möglichkeit eines direkten Vergleichs zwischen beiden Fibroblastentypen, ohne dass individuelle genetische und physiologische Unterschiede zwischen verschiedenen Patienten die möglicherweise vorhandenen Unterschiede der Fibroblasten verschleiern. Selbst der Vergleich von NAF aus Brustreduktions-Gewebe und TAF aus Brustkarzinomen verschiedener Individuen hatte signifikante Unterschiede zwischen normalen Fibroblasten und TAF gezeigt (Sadlonova *et al.* 2009). Eine Analyse von TAF und NAF aus den gleichen Patienten sollte in der vorliegenden Arbeit genau diejenigen Unterschiede identifizieren, die nicht durch die Herkunft aus verschiedenen Patienten, sondern durch den Einfluss der Tumorzellen verursacht werden. Daher wurden zwei NAF-TAF-Paare für eine Genexpressionsanalyse zum Vergleich der Transkriptionsmuster von NAF und TAF gewählt und mit dem *Microarray humangene1.0st-v1* (Affymetrix) analysiert.

Dabei ließen sich nur geringe Expressionsunterschiede zwischen NAF und TAF finden. Das maximale Genexpressions-Verhältnis der untersuchten Transkripte von NAF und TAF aus individuellen Patienten war 3,4fach, also für *Microarray*-Analysen sehr ähnlich. Im Vergleich der Gene, die in mindestens einem NAF-TAF-Paar zweifach unterschiedlich exprimiert sind und im zweiten NAF-TAF-Paar in die gleiche Richtung unterschiedlich sind, wurden neun Transkripte identifiziert (Tabelle A.5 auf Seite 129 im Anhang). Drei dieser Transkripte sind in TAF höher exprimiert als in NAF, sechs sind in TAF niedriger exprimiert als in NAF (Abbildung 5.33 auf der nächsten Seite).

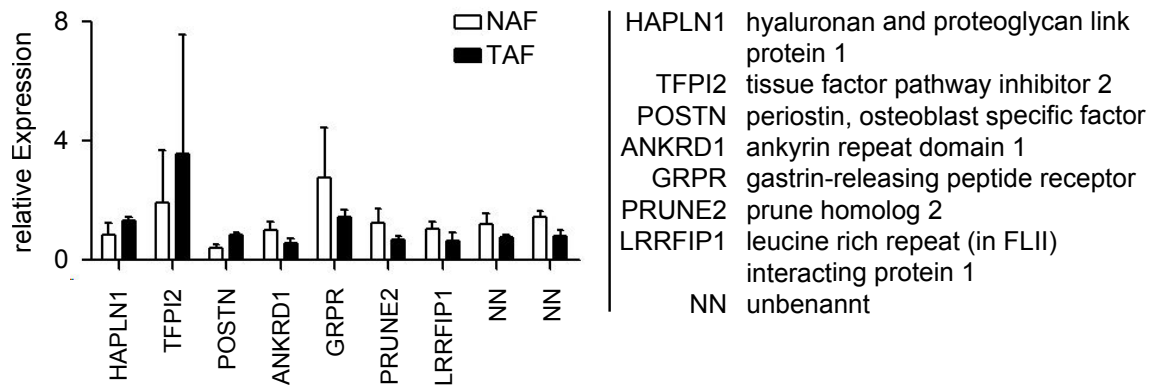


Abbildung 5.33.: Expression der neun differenziell zwischen NAF und TAF exprimierten Gene.

NAF und TAF aus zwei Patienten wurden mit *humangene1.Ost-v1-Microarrays* auf unterschiedliche Genexpression untersucht. Zweifache Unterschiede in einem NAF-TAF-Paar zusammen mit parallelen Unterschieden im zweiten Paar, identifizierten neun Gene (siehe auch Tabelle A.5 auf Seite 129), MW \pm SD.

Wurde nur eine mindestens 1,3fach Expressionsänderung zwischen TAF und NAF zugrunde gelegt, war die Expression von 63 Transkripten in beiden Paaren in der gleichen Richtung verändert. Dabei waren 38 Transkripte in beiden TAF mindestens 1,3fach höher exprimiert als in den NAF, zum Beispiel die aus der „Dasatinib Response Signatur“ bekannten *MMP1*- und fünf *Histone cluster 1*-Transkripte. Auch *G0/G1 switch 2 (G0S2)* ist in TAF höher exprimiert als in NAF.

Fünfundzwanzig Transkripte sind in TAF niedriger exprimiert als in NAF, darunter *hedhog interacting protein (HHIP)*, *ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5 (ADAMTS5)* und das Laminin-bindende *integrin, alpha 7 (ITGA7)*, die im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen bereits bekannt sind.

Sechzehn der 63 in diesem NAF-TAF-Vergleich identifizierten Transkripte sind auch Bestandteil der „Dasatinib Response Signatur“, wobei fünf Transkripte, die in NAF höher exprimiert sind als in TAF nach Dasatinib-Behandlung der TAF stärker exprimiert werden. Für neun Transkripte gilt der entgegengesetzte Zusammenhang.

Ein Vergleich mit den 575 Genen, die in Brust-NAF und -TAF identifiziert wurden (Sadlonova *et al.* 2009), ist durch die Verwendung unterschiedlicher Arrays eingeschränkt. Von den 63 Transkripten, die zwischen den Lungen-NAF und -TAF verschieden exprimiert sind, sind nur 20 auf dem von Sadlonova *et al.* (2009) verwendeten Array vorhanden. Von diesen wird *MMP1* in Brust-TAF 10,3fach höher exprimiert als in Brust-NAF. In Lungen-TAF ist dieses Transkript in den untersuchten zwei Fibroblasten-Paaren 1,34fach beziehungsweise 1,43fach höher exprimiert als in den zugehörigen NAF. Der Vergleich mit der Lungen-TAF-NAF-Signatur von Navab *et al.* (2011) identifiziert *clusterin (CLU)*, das in beiden Datensets in TAF niedriger exprimiert ist als in NAF.

5.4.1.2. Expression von *HIPK2* und *CDKN1A*

Daten unserer Kooperationspartner der Arbeitsgruppe Moshe Oren (Neta Moskovits, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) legen nahe, dass *homeodomain interacting protein kinase 2* (*HIPK2*) in TAF und NAF unterschiedlich exprimiert ist. *HIPK2* phosphoryliert p53, was zur transkriptionellen Aktivierung von dessen Zielgenen führen kann. Daher wurde als p53-Zielgen auch die *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (*CDKN1A*)-Expression in NAF und TAF analysiert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen *HIPK2*-Expression und p53-Aktivität zu untersuchen. In den zwei *Microarray*-Genexpressionsanalysen der NAF und TAF aus 2 Patienten sind *HIPK2* und *CDKN1A* nicht verschieden exprimiert. Daher wurde die mRNA-Expression von *HIPK2* und *CDKN1A* in weiteren NAF-TAF-Paaren mittels qRT-PCR untersucht. Dies wurde in einer Bachelor-Arbeit von Julia Leitmann (Universität Hohenheim) fortgeführt. Abbildung 5.34 zeigt die Ergebnisse von 11 beziehungsweise 9 NAF-TAF-Paaren.

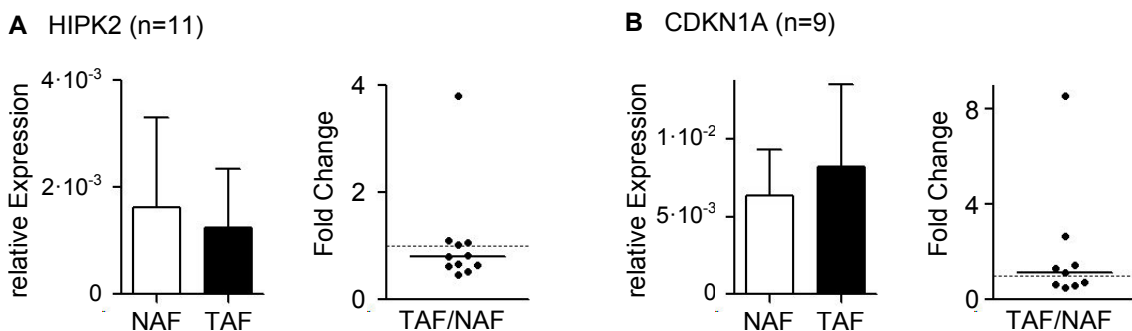


Abbildung 5.34.: Vergleich der Expression von *HIPK2* und *CDKN1A* in NAF und TAF.

Links: relative Expression bezogen auf *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*), MW ± SD, rechts: Expressionsänderung (*Fold Change*, FC). Linie: Median, gestrichelte Linie: FC = 1. **A:** *homeodomain interacting protein kinase 2* (*HIPK2*), **B:** *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (*CDKN1A*).

Die Expression von *HIPK2* ist sowohl in NAF als auch in TAF sehr variabel. Es zeigt sich ein Trend, dass in mehr als der Hälfte der untersuchten Paare die TAF geringere *HIPK2*-mRNA-Mengen exprimieren als die NAF (Abbildung 5.34, A, rechts). *CDKN1A* ist in TAF variabler exprimiert als in NAF (Abbildung 5.34, B, links).

Im untersuchten Kollektiv besteht keine lineare Korrelation zwischen den *HIPK2*- und den *CDKN1A*-Expressionsniveaus in NAF oder TAF oder zwischen den Expressionsunterschieden von NAF und TAF. Für das NAF-TAF-Paar mit dem *Fold Change*-Extremwert bei der *HIPK2*-Expression wurde aber auch ein Extremwert der *CDKN1A*-Expression gemessen.

5.4.2. Wachstum der Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten

Die Genexpressions-Analysen zeigten mehr Gemeinsamkeiten als Unterschiede zwischen NAF und TAF. In der Zellkultur werden Wachstumsfaktoren in Form von FBS dem Me-

dium zugesetzt. Dies könnte die Genexpression der NAF verändern. Daher sollte geklärt werden, ob NAF und TAF unter diesen Umständen trotzdem funktionelle Unterschiede zeigen. Dafür wurde die Dauer des Zellzyklus, der Zelltod und die Verteilung der Zellen auf unterschiedliche Zellzyklus-Phasen untersucht.

Die Dauer des Zellzyklus von drei NAF und 16 TAF wurde in Passage 3 ermittelt und ist in Abbildung 5.35, A dargestellt.

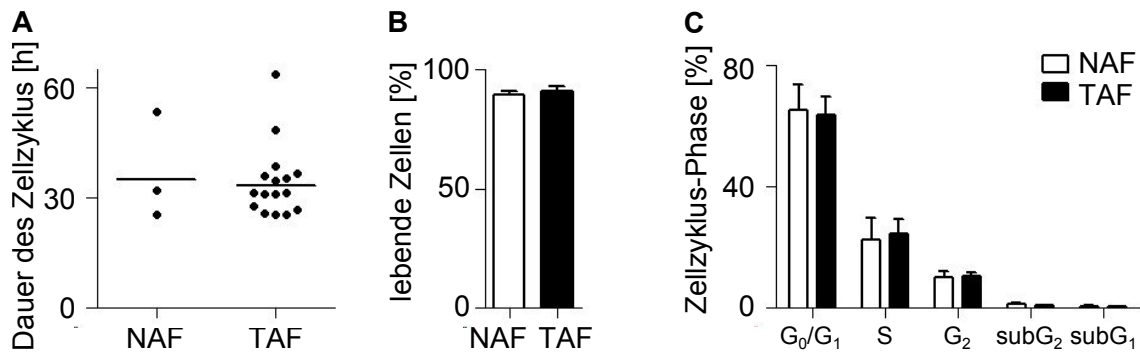


Abbildung 5.35.: Funktionell unterscheiden sich NAF und TAF in Zellkultur nicht.

A: Vergleich zwischen 3 Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten (NAF) und 16 Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAF). Die Punkte zeigen die Zellzyklusdauer von Fibroblasten einzelner Patienten, die Linie den geometrischen Mittelwert. **B:** Fünf TAF-NAF-Paare wurden mittels AnnexinV-PI-Messung auf Zelltod untersucht (MW ± SD). **C:** Vergleich der Zellzyklus-Phasen zwischen NAF und TAF von 5 Patienten anhand einer BrdU-PI-Färbung (MW ± SD).

Die Zellzyklus-Dauer von Fibroblasten aus verschiedenen Patienten zeigt eine breite Streuung (NAF: 25,2 - 53,4 h, TAF: 25,2 - 63,7 h). Dabei wurden keine Unterschiede zwischen NAF und TAF gefunden.

Die Viabilität der Fibroblasten wird durch Proliferation und Zelltod mit bestimmt. Daher wurde mittels AnnexinV-PI-Färbung der Zelltod von NAF und TAF gemessen. Abbildung 5.35, B zeigt ein mittleres Überleben der NAF von $89,7 \pm 3,2 \%$ und der TAF von $90,9 \pm 3,2 \%$ (MW ± SD). Hier kann demnach kein Unterschied zwischen TAF und NAF detektiert werden.

Die NAF und TAF von fünf verschiedenen Patienten wurden mittels einer BrdU-PI-Färbung auch auf Unterschiede im Zellzyklus untersucht. Dabei wurden von drei Patienten Triplikat- und von einem Patienten Duplikat-Experimente gemittelt. Abbildung 5.35, C zeigt, dass es keine Unterschiede zwischen den Fibroblasten aus Tumor- oder Normalgewebe gibt. Der größte Anteil der Zellen befindet sich in der G₁-Phase des Zellzyklus (Mittelwert: 65,4% der NAF und 63,7% der TAF), gefolgt von der S-Phase (22,6% der NAF und 24,5% der TAF) und der G₂-Phase (10,0% der NAF und 10,3% der TAF). Weder NAF noch TAF zeigen deutlichen Zelltod (Summe subG₁- und subG₂-Phase: 1,6% der NAF und 1,2% der TAF).

5.4.3. Sensitivität von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Medikamente der Prestwick-Substanzbibliothek

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Substanzen zu finden, die die Viabilität der TAF deutlich stärker inhibieren als die der NAF. Um möglichst viele Substanzen testen zu können, wurde die *Prestwick Chemical Library*[®] verwendet. Diese enthält 1120 von der FDA zugelassene Wirkstoffe, für die bereits ein medizinischer Nutzen gezeigt wurde. Daher wurde ein TAF-NAF-Paar mit Hilfe eines MTT-Assays gescreent, um zu untersuchen, ob sich unter diesen chemisch und pharmakologisch unterschiedlichen Substanzen solche finden, die die Viabilität der TAF stärker hemmen als die der NAF. In Abbildung 5.36 ist die relative Viabilität im MTT-Experiment nach 48stündiger Behandlung mit 1 μ M Wirkstoff gezeigt.

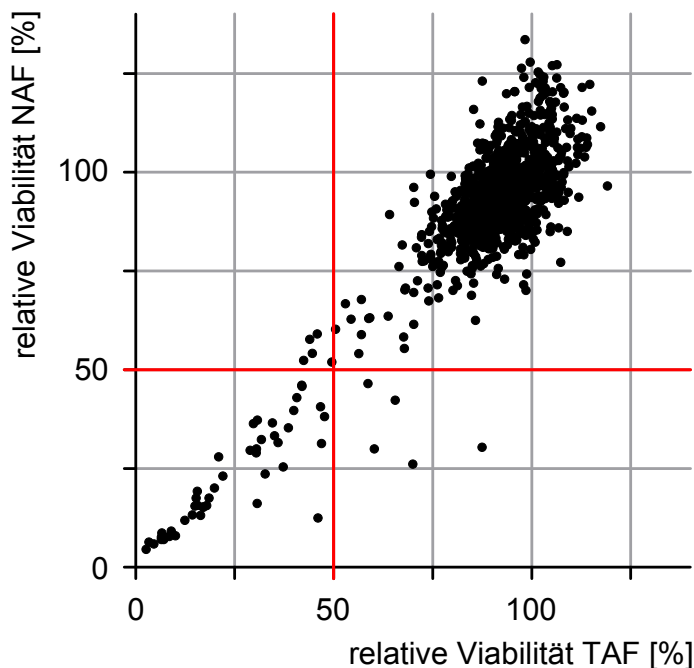


Abbildung 5.36.: Sensitivität eines NAF-TAF-Paares auf 1120 verschiedene Substanzen der Prestwick-Library.

Die aus Tumorbereichen und normalen Bereichen eines Patienten gewonnenen Fibroblasten (TAF und NAF) wurden mit den Substanzen der Library bei 1 μ M Wirkstoffkonzentration für 48 h inkubiert und anschließend die Viabilität im MTT-Experiment ermittelt. Jeder Punkt zeigt die relative Viabilität der TAF und NAF nach Behandlung mit einer bestimmten Substanz im Vergleich zur Kontrolle.

Jeweils 51 Substanzen hemmen die Viabilität von TAF oder NAF zu mehr als 50 %, davon zeigen 46 Substanzen diese Hemmung in beiden Fibroblastentypen. Keine Substanz kann die Viabilität von TAF oder NAF verdoppeln. 137 beziehungsweise 126 Substanzen hemmen TAF und NAF zu mehr als 20 %. Von diesen hemmen 92 Substanzen sowohl TAF als auch NAF. Sechs Substanzen fördern die Viabilität der NAF und erhöhen diese auf mehr als 125 %, aber kein Wirkstoff fördert die TAF so stark.

Der Spearman-Korrelationskoeffizient beträgt 0,639 (Spearman, $p < 0,0001$). Das heißt

nur 41 % der Wirkung einer Substanz auf die TAF lassen sich vorhersagen, wenn die Wirkung auf die NAF bekannt ist (oder umgekehrt). Obwohl die Zellen aus dem gleichen Patienten stammen, zeigen sie also deutliche Unterschiede in der Reaktion auf die getesteten Substanzen, je nachdem ob die Fibroblasten aus Tumor- oder Normalgewebe gewonnen wurden.

In der *Prestwick Chemical Library*[®] sind keine Substanzen enthalten, die die Viabilität der TAF deutlich stärker hemmen als die der NAF. In Tabelle A.6 auf Seite 130 im Anhang sind die vier Substanzen aufgeführt, die auf NAF eine 2fach stärkere hemmende Wirkung zeigen als auf TAF. Darunter finden sich ein Antibiotikum und drei Substanzen, die die Funktion von Kanalproteinen modulieren.

5.4.4. Sensitivität von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten auf PDGFR-Inhibitoren

Es ist bekannt, dass PDGFR-Inhibitoren die Viabilität der TAF hemmen. Da diese Inhibitoren in der *Prestwick Chemical Library*[®] nicht enthalten sind, wurde die Sensitivität von NAF und TAF auf klinisch zugelassene PDGFR-Inhibitoren untersucht. Abbildung 5.37 zeigt die relative Viabilität von TAF und NAF bei der C_{max} -Konzentration von Dasatinib, Imatinib und Nilotinib im MTT-Experiment.

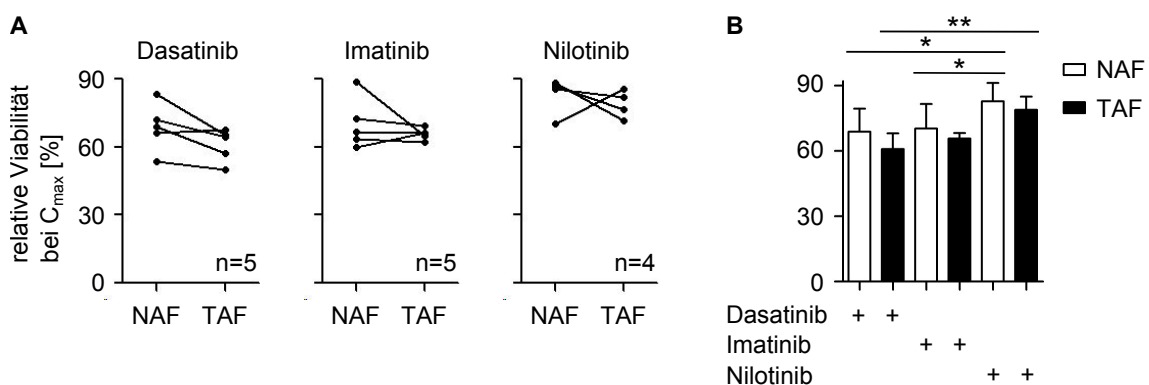


Abbildung 5.37.: Vergleich der Viabilität von NAF und TAF nach Behandlung mit PDGFR-Inhibitoren.

NAF-TAF-Paare wurden mit der C_{max} -Konzentration von Dasatinib, Imatinib oder Nilotinib behandelt und die relative Viabilität mittels MTT-Farbreaktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. **A:** jeder Punkt zeigt die relative Viabilität einer NAF oder TAF (C_{max} -Konzentration siehe Tabelle 4.9 auf Seite 38). **B:** MW \pm SD der Daten aus A. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ (repeated measurements ANOVA (4 Paare) mit Tukeys Multiple Comparison post-Test).

NAF aus verschiedenen Patienten reagieren ebenso wie TAF heterogen auf eine Behandlung mit PDGFR-Inhibitoren (Abbildung 5.37). Auch bei NAF wirkt Dasatinib etwas stärker hemmend als Imatinib und Nilotinib, wobei die NAF geringfügig resistenter sind als die TAF. Signifikante Unterschiede zwischen NAF und TAF konnten bei der Sensitivität auf Dasatinib, Imatinib und Nilotinib nicht detektiert werden. NAF und TAF zeigen bei einer Behandlung mit den PDGFR-Inhibitoren ebenso keine Unterschiede bei

der durch BrdU-PI-Färbung untersuchten Proliferation oder dem mittels AnnexinV-PI-Färbung nachgewiesenen Zelltod (ohne Abbildung).

Zusätzlich wurden die zwei auf Dasatinib am sensitivsten reagierenden TAF-NAF-Paare für eine Genexpressionsanalyse nach 48 h Dasatinib-Behandlung gewählt, um zu untersuchen, ob diese NAF und TAF in gleicher oder unterschiedlicher Weise auf Dasatinib reagieren. Alle Transkripte, die in NAF und TAF mindestens 1,3fach verändert sind, werden durch Dasatinib in beiden Fibroblastentypen in die gleiche Richtung reguliert. Eine *Gene Ontology slim*-Analyse¹ der nur in TAF, nur in NAF oder in beiden Fibroblastentypen regulierten Transkripte vergleicht den Anteil bestimmter Transkript-Kategorien mit der Häufigkeit dieser Kategorien auf dem gesamten *Array*. Dabei fällt bei *biological process* die Häufung der Kategorie *cellular component organization* in TAF und NAF und ein geringerer Anteil von *response to stimulus*, *developmental process* und *cell communication* in den TAF auf (ohne Abbildung).

Eine *gene set enrichment*-Analyse (GSEA²) nach *Gene Ontology*-Begriffen zeigt Transkript-Gruppen, die häufiger vorkommen, als statistisch zu erwarten wäre (Abbildung A.1 auf Seite 131 im Anhang zeigt zur Veranschaulichung einen Ausschnitt aus dem Ergebnis dieser GSEA-Analyse). In TAF und NAF werden durch Dasatinib vor allem Transkripte reguliert, die für die Mitose nötig sind. Zum Beispiel werden 23 von 34 Transkripten mit der GO-Kategorie *mitotic sister chromatid segregation* in TAF und NAF reguliert. Statistisch würde man nur 2,92 Transkripte in dieser Kategorie erwarten. Damit sind Transkripte mit dieser GO-Annotation 7,87fach häufiger in TAF und NAF reguliert als erwartet, was einer *ratio of enrichment* von $R = 7,87$ entspricht. Insgesamt kommen 266 Transkripte der GO-Kategorie *cell cycle* ($R = 2,99$) und 97 der Kategorie *mitosis* vor ($R = 4,59$). Aus diesen Kategorien wurden in Abbildung 5.38 auf der nächsten Seite jeweils die untersten Begriffe (Enden der Pfade) der signifikant gehäuften Kategorien dargestellt, die eine *ratio of enrichment* von mindestens $R = 2$ erreichen.

Auch bei dieser Analyse wird nochmals deutlich, dass die Gemeinsamkeiten der Dasatinib-Antwort von TAF und NAF in der verminderten Proliferation liegen. Bei der *molecular function*-Annotation fallen außerdem Transkripte auf, die eine Veränderung der extrazellulären Matrix im Zusammenhang mit der veränderten Zellteilung nahelegen. TAF zeigen nach Dasatinib-Behandlung eine stärkere Regulation bei verschiedenen RNA-Prozessen wie mRNA-Transport und -Prozessierung. Bei den NAF finden sich nur bei *cellular component* signifikant zweifach regulierte Transkript-Kategorien, nicht aber bei *molecular function* oder *biological process*. Diese deuten darauf hin, dass es in den NAF eine Dasatinib-induzierte Regulation der Ribonucleoprotein-Komplexe, wie zum Beispiel der *ribonuclease P* (*RNaseP*) gibt, die in den TAF nicht beobachtet wurde (ohne Abbildung).

¹<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>

²<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>

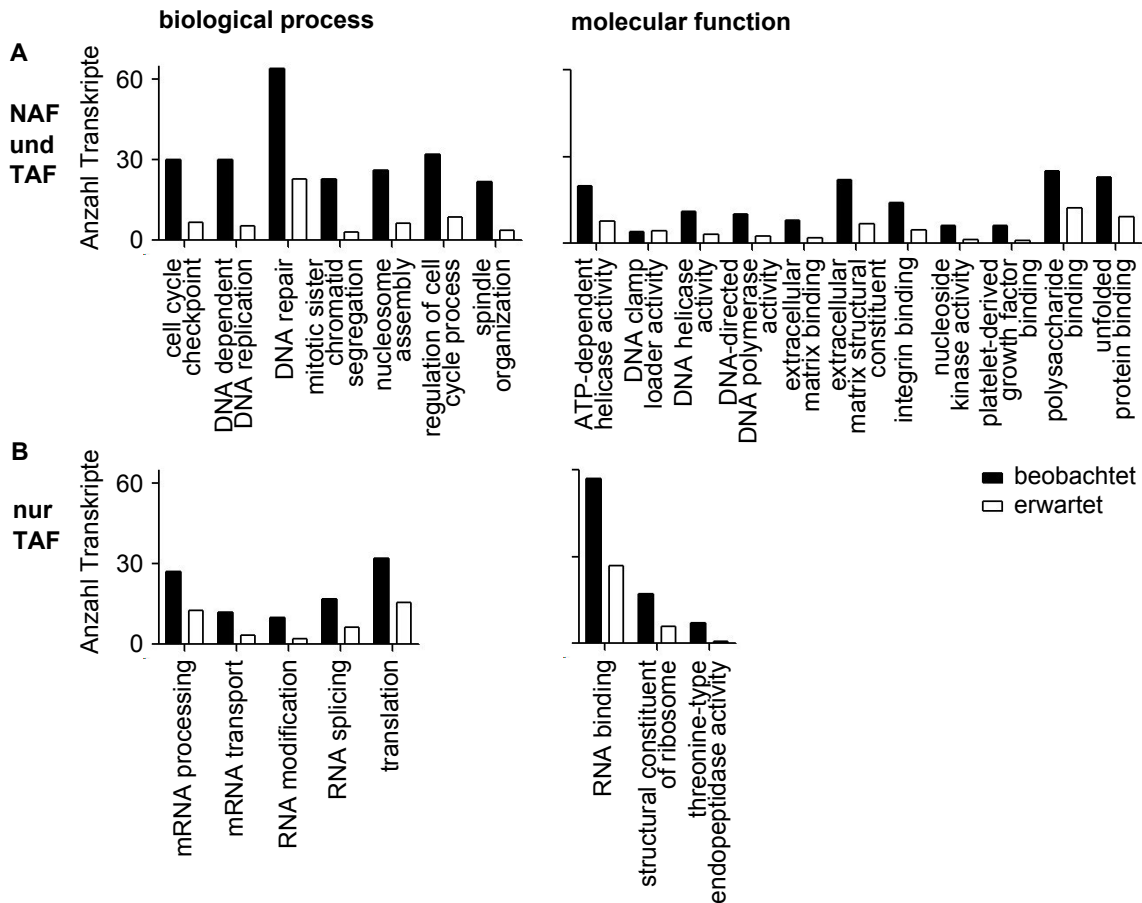


Abbildung 5.38.: GSEA zeigt mehr Gemeinsamkeiten von NAF und TAF als Unterschiede.

Gene set enrichment-Analyse (GSEA) der Transkripte, die durch Dasatinib reguliert werden. Die gezeigten GSEA-Kategorien kommen im Vergleich zur Erwartung mindestens zweifach häufiger vor ($R \geq 2$). **A:** In NAF und TAF in gleicher Weise regulierte Transkripte. **B:** Ausschließlich in den zwei TAF regulierte Transkripte. Die Analyse der in den zwei NAF regulierten Transkripte ergab keine signifikant gehäuften Gen-Kategorien für *biological process* (links) oder *molecular function* (rechts).

In den Analysen der Genexpressionsmuster von TAF und NAF zeigen sich also Unterschiede in der Antwort auf Dasatinib-Behandlung. Die Gemeinsamkeiten beider Fibroblasten-Typen überwiegen jedoch.

5.4.5. Sensitivität von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin

5.4.5.1. Unterschiedliche Hemmung der Proliferation

Cisplatin hemmt die Proliferation der TAF (siehe Kapitel 5.2.1 auf Seite 59). Ob es die Proliferation von NAF ebenso beeinflusst, wurde zuerst im MTT-Assay mit acht NAF-TAF-Paaren untersucht. Es zeigt sich erneut, dass die Fibroblasten verschiedener Patienten sehr unterschiedlich auf Cisplatin reagieren können. Dabei wurde ein Trend beobachtet, dass die NAF möglicherweise resistenter gegenüber Cisplatin sind als die TAF (Viabilität im MTT-Experiment bei 11 μ M Cisplatin, MW \pm SD: TAF $37,0 \pm 13,7$ %, NAF

45,7 ± 15,9 %, p = 0,096, ohne Abbildung).

Auch der Zelltod von drei beziehungsweise vier NAF-TAF-Paaren wurde nach einer Behandlung mit 13 µM Cisplatin für 8, 16 und 24 h mittels AnnexinV-PI-Färbung untersucht. NAF reagieren auf eine Cisplatin-Behandlung nicht mit Zelltod, ebenso wie TAF (ohne Abbildung).

Sowohl TAF als auch NAF reagieren auf Cisplatin mit Zellzyklus-Arrest (Abbildung 5.39). Die Zellen synthetisieren keine DNA mehr und arretieren im Zellzyklus. Die Kinetik der Cisplatin-Antwort bei einer BrdU-PI-Färbung ist jedoch verschieden: NAF zeigen schon nach acht Stunden einen signifikanten Proliferationsstopp, TAF zeigen erst nach 24 Stunden signifikant weniger Zellen in S-Phase und mehr Zellen in der subG₂-Phase.

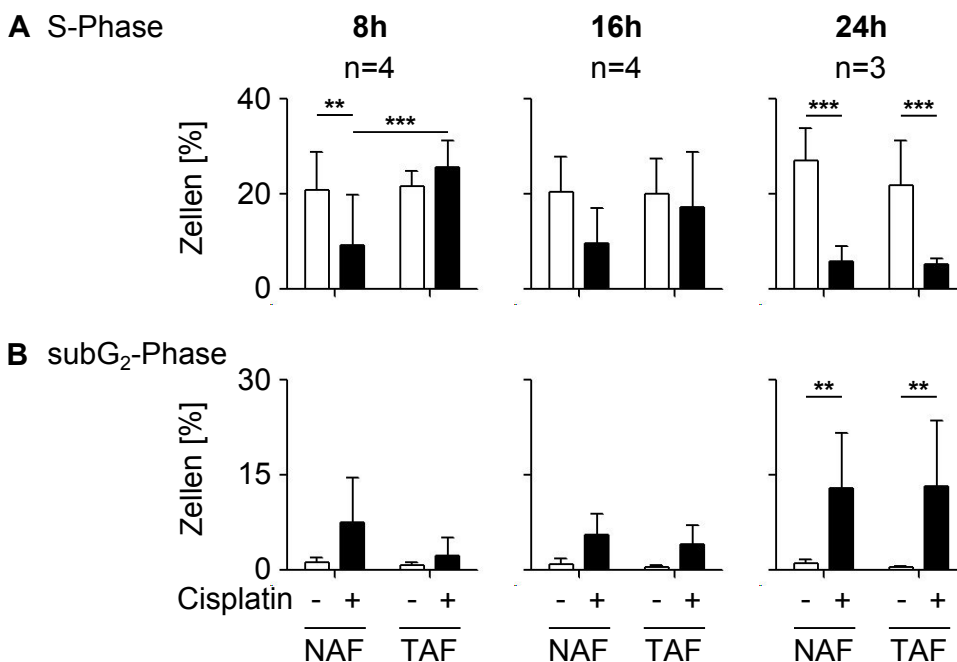


Abbildung 5.39.: Cisplatin-Behandlung bewirkt bei NAF eine frühere Induktion von Zellzyklus-Arrest als bei TAF.

NAF-TAF-Paare aus vier beziehungsweise drei Patienten wurden mit Cisplatin behandelt, nach 8, 16 und 24 Stunden mit BrdU-PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist der Anteil der Zellen in % in S- und subG₂-Phase (MW ± SD). Auf die anderen Zellzyklus-Phasen hat die Behandlung keine Auswirkung. **: p < 0,01, ***: p < 0,0001 (TwoWayANOVA mit Bonferroni post-Tests).

5.4.5.2. Genexpressionsanalyse von p53-Zielgenen

In ihrer Bachelor-Arbeit untersuchte Julia Leitmann unter meiner Betreuung die Reaktion von NAF und TAF auf Cisplatin-Behandlung auf molekularer Ebene. Dabei spielt die p53-Aktivität eine zentrale Rolle, ohne dass die *tp53*-mRNA-Niveaus sich ändern. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass p53 trotz niedriger *HIPK2*-mRNA-Expression in NAF und TAF gleichermaßen nach Cisplatin-Behandlung an Serin-15 und -46 phosphoryliert und damit aktiviert wird (Bachelor-Arbeit Leitmann 2010). Dies führte

zur weiteren Untersuchung verschiedener p53-Zielgene. Die Expression von Zellzyklus-spezifischen Genen wie *CDKN1A* (*p21*) und Zelltod-spezifischen Genen wie *BBC3* (*PUMA*) und *PMAIP1* (*NOXA*) wurden mittels qRT-PCR von unbehandelten und Cisplatin-behandelten NAF und TAF verglichen. Hierfür wurden vier NAF-TAF-Paare ausgewählt, bei denen die NAF eine deutlich höhere basale *HIPK2*-Expression zeigten als die zugehörigen TAF. Die mRNA-Mengen wurden acht und 16 Stunden nach Cisplatin-Behandlung gemessen. In Abbildung 5.40 sind die Genexpressions-Daten nach 16stündiger Behandlung relativ zu GAPDH dargestellt, da nach dieser Zeit die Effekte deutlicher waren.

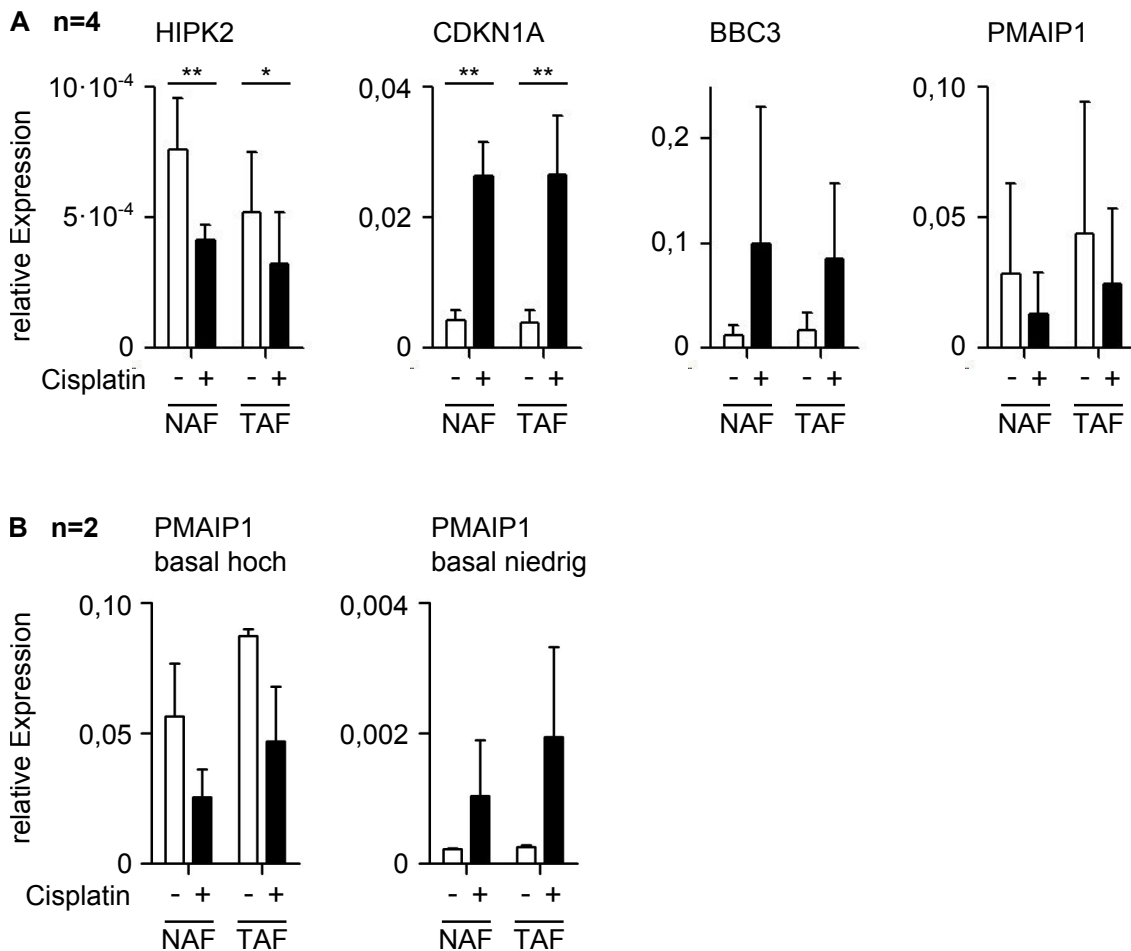


Abbildung 5.40.: Effekt der Cisplatin-Behandlung auf die mRNA-Expressionsniveaus verschiedener p53-Zielgene.

A: TAF-NAF-Paare aus vier Patienten, bei denen die NAF höhere basale *HIPK2*-Expression aufweisen als die TAF (links) wurden für 16 h mit Cisplatin behandelt und anschließend die Expression von *CDKN1A* als Zellzyklus-spezifisches sowie *BBC3* und *PMAIP1* als Zelltod-spezifische p53-Zielgene mittels qRT-PCR analysiert, relative Genexpression bezogen auf GAPDH. **B:** *PMAIP1*-Expressionsdaten von jeweils zwei TAF-NAF-Paaren mit ausgeprägten basalen Expressionsunterschieden und Expressionsänderung nach Cisplatin-Behandlung, MW ± SD, *: p < 0,05, **: p < 0,01 (TwoWayANOVA mit Bonferroni-post-Tests).

Obwohl erneut die Variabilität zwischen NAF und TAF aus verschiedenen Patienten zu sehen ist, unterscheidet sich entsprechend der Vorauswahl der vier NAF-TAF-Paare die *HIPK2*-Expression zwischen unbehandelten NAF und TAF signifikant (ge-

paarter t-Test $p=0,017$). Wie in Abbildung 5.40 dargestellt, zeigen die NAF eine $1,56 \pm 0,3$ fach stärkere *HIPK2*-Expression als die TAF. NAF und TAF reagieren auf 16stündige Cisplatin-Behandlung mit einer Verringerung der *HIPK2*-Expression (NAF: $0,57 \pm 0,1$ fach, $p=0,018$, TAF: $0,63 \pm 0,24$ fach, $p=0,04$).

CDKN1A, das Zellzyklus-spezifische Zielgen des p53-Proteins, ist konstitutiv deutlich stärker exprimiert als *HIPK2*. Alle NAF und TAF induzieren *CDKN1A*-Expression nach 16stündiger Cisplatin-Behandlung. Dies konnte auf Protein-Ebene auch im Western Blot beobachtet werden (ohne Abbildung). Es zeigen sich aber weder im unbehandelten noch im behandelten Zustand Unterschiede zwischen NAF und den zugehörigen TAF.

Ebenso zeigen beide Zelltod-spezifischen p53-Zielgene weder signifikante Unterschiede zwischen NAF und TAF noch zwischen unbehandeltem und Cisplatin-behandeltem Zustand. Die Expression von *BBC3* ist nach Cisplatin-Behandlung tendenziell erhöht. Bei *PMAIP1* wurden ausgeprägte Unterschiede der konstitutiven Expression beobachtet: Die NAF und TAF aus zwei Patienten haben eine mehr als 200fach höhere basale *PMAIP1*-Expression als die der anderen zwei Patienten (Abbildung 5.40, B). Die Zellen mit einer hohen basalen Expression zeigen nach einer Cisplatin-Behandlung nur noch halb so starke *PMAIP1*-Expression wie in unbehandeltem Zustand (B, links). Die Zellen mit einer niedrigen basalen Expression hingegen reagieren mit einer 2-10,6fach höheren *PMAIP1*-Expression (B, rechts), wobei der Effekt in den TAF deutlicher ist als in den NAF dieser zwei Patienten.

5.4.5.3. Einfluss von Wachstumsfaktoren der H1299-Zelllinie auf Normalgewebe-assoziierte und Tumor-assoziierte Fibroblasten

Es ist bekannt, dass NAF und TAF unterschiedlich auf konditioniertes Medium von Tumorzellen reagieren, beispielsweise bei der p53-Stabilisierung nach einer Cisplatin-Behandlung (Bar *et al.* 2009). Um mögliche Unterschiede zwischen NAF und TAF bei der Reaktion auf von Tumorzellen sekretierten Faktoren zu untersuchen, wurden die Fibroblasten auch mit einer Kombination aus konditioniertem Medium und Cisplatin behandelt. Dafür wurden zwei NAF-TAF-Paare für acht oder 16 Stunden mit konditioniertem Medium der H1299-Lungentumorzelllinie und Cisplatin inkubiert. Um Unterschiede nicht durch Serumfaktoren zu überlagern wurde FBS-freies Medium verwendet und die RNA-Expression der p53-Kinase *HIPK2* und des p53-Zielgens *CDKN1A* untersucht (Abbildung 5.41 auf der nächsten Seite).

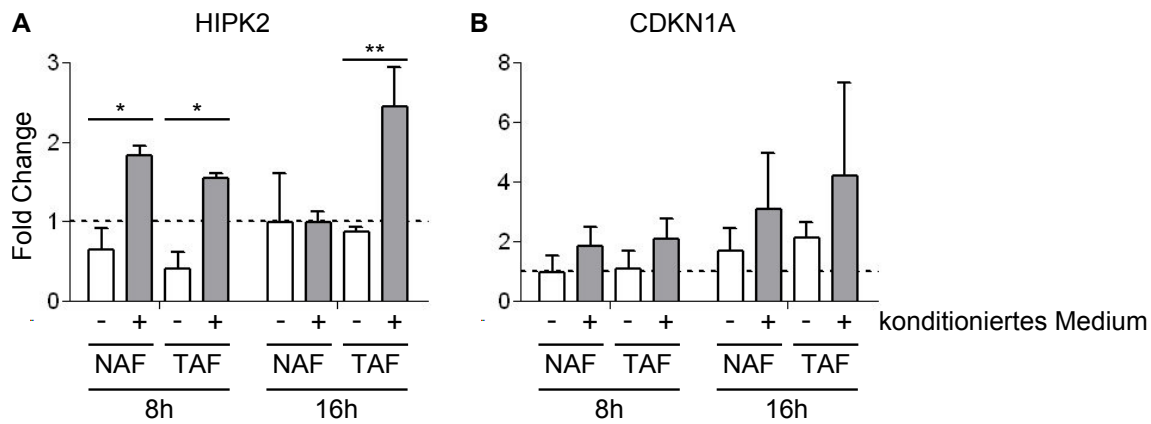


Abbildung 5.41.: Einfluss von H1299-Wachstumsfaktoren auf die Genexpression von NAF und TAF nach Cisplatin-Behandlung.

Änderung der Expressionsstärke (Fold Change) nach Cisplatin-Behandlung bei 2 NAF-TAF-Paaren, gestrichelte Linie FC = 1, FC < 1: niedriger exprimiert, FC > 1: höher exprimiert nach Behandlung mit 13 μ M Cisplatin. MW \pm SD, *: p < 0,05, **: p < 0,01 (TwoWayANOVA mit Bonferroni post-Tests).

Abbildung 5.41 zeigt, dass die *HIPK2*-Expression nach acht Stunden Cisplatin-Behandlung in NAF und TAF reduziert ist (A links, weiße Balken), nach 16 Stunden ist dies aber wieder reversiert (A rechts, weiße Balken). Bei Behandlung mit konditioniertem Medium hingegen ist bereits nach 8 Stunden die Expression von *HIPK2* sowohl in NAF als auch in TAF erhöht (Abbildung 5.41, A links, graue Balken). Nach 16 Stunden ist dieser Effekt in NAF reversiert, in TAF jedoch verstärkt (Abbildung 5.41, A rechts, graue Balken).

Die *CDKN1A*-Expression wird auch ohne Wachstumsfaktoren aus FBS nach 16 Stunden durch Cisplatin-Behandlung induziert (Abbildung 5.41, B rechts, weiße Balken), in NAF und TAF in ähnlichem Umfang. Konditioniertes Medium führt dazu, dass *CDKN1A* in beiden Fibroblastentypen früher und stärker induziert wird (Abbildung 5.41, B links und rechts, graue Balken).

5.4.6. Sensitivität von Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Cisplatin in Kombination mit PDGFR-Inhibitoren

Da das Fibroblasten-Wachstum vom PDGFR-Signalweg abhängig ist und sich durch PDGFR-Inhibitoren wie Dasatinib, Imatinib und Nilotinib hemmen lässt, wurde der Einfluss der Inhibitoren auf die Cisplatin-Sensitivität der NAF und TAF im MTT-Experiment mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen untersucht. Im Vergleich zwischen NAF und TAF ist keine der Kombinations-Behandlungen in einem der Zelltypen wirksamer als im anderen Fibroblastentyp (ohne Abbildung).

Der direkte Vergleich zwischen der Cisplatin-Einzelbehandlung und jeder der Kombinationsbehandlungen ist in Abbildung 5.42 auf der nächsten Seite dargestellt.

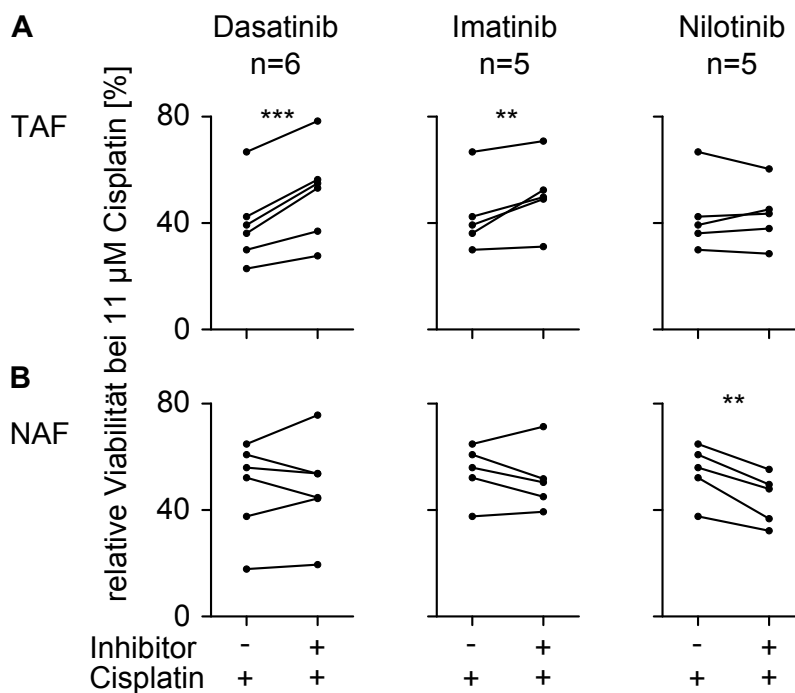


Abbildung 5.42.: Einfluss der verschiedenen PDGFR-Inhibitoren auf die Cisplatin-Sensitivität von TAF und NAF.

Relative Viabilität im MTT-Experiment von **A**: TAF und **B**: NAF bei kombinierter Behandlung für 48 h mit 11 µM Cisplatin und 0,1 µM Dasatinib, 1 µM Imatinib oder 1,7 µM Nilotinib. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$ (OneWayANOVA mit Dunnetts Multiple Comparison Test).

Bei diesem Vergleich zeigt sich, dass TAF auf die Kombination von Cisplatin mit Dasatinib oder Imatinib resistenter reagieren als auf Cisplatin alleine, nicht jedoch auf die Kombination mit Nilotinib (Abbildung 5.42, A). Bei NAF ist kein Unterschied zwischen der Einzelbehandlung und der Kombination mit Dasatinib oder Imatinib festzustellen, dafür aber eine Cisplatin-Sensitivierung von NAF bei Zugabe von Nilotinib (Abbildung 5.42, B). Dasatinib und Imatinib erhöhen somit die Cisplatin-Resistenz von TAF, Nilotinib hingegen verringert die Cisplatin-Resistenz der NAF.

Bei diesem Effekt der PDGFR-Inhibitoren auf die Cisplatin-Sensitivität treten die vergleichsweise kleinen Effekte erst im direkten Vergleich hervor. So zeigen die TAF mit Dasatinib bei 11 µM Cisplatin eine $1,30 \pm 0,12$ fach höhere Viabilität als ohne Dasatinib, mit Imatinib $1,19 \pm 0,17$ fach höhere Viabilität als ohne Imatinib und die NAF ohne Nilotinib $1,23 \pm 0,11$ fach höhere Viabilität als mit Nilotinib.

6. Diskussion

Tumore der Lunge, der Bronchien und der Tracheen sind in den Industriestaaten mit hohem Einkommen die dritthäufigste Todesursache und sind unter den malignen Neoplasien mit circa 22 % die häufigste Todesursache (WHO¹). In unseren Ländern finden sich Lungen-, Darm- und Brusttumore unter den 10 häufigsten Todesursachen. Die Bedeutung dieser Erkrankungen wird mit zunehmendem Anteil älterer Menschen an der Bevölkerung und absolutem Alter der Einzelnen weiterhin wachsen und auch in den Ländern mit geringerem Einkommen zunehmen (WHO). Zwar wurden durch massive Investitionen in den letzten Jahrzehnten Verbesserungen der Prävention und Therapie erreicht, aber die wissenschaftlichen Fortschritte in der onkologischen Forschung lassen sich nur schwer in Verbesserungen der klinischen Therapie umsetzen. Ein Grund dafür sind die in der Forschung angewandten, stark vereinfachten Modelle, die bisher meist nur die Tumorzellen betrachteten. Im Patienten ist die Situation viel komplexer. Ein Tumor ist keine homogene Masse eines entarteten Zelltyps, sondern besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, deren Interaktionen die Therapie beeinflussen (Saintigny und Burger 2012). Daher kommt der Erforschung der Mikroumgebung der Tumorzellen eine wachsende Bedeutung zu.

Das Stroma bildet in vielen Tumoren den Hauptteil der Tumormasse (Rønnov-Jessen *et al.* 1996) und Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) als großer Teil davon produzieren den Hauptanteil der extrazellulären Matrix. Damit haben die TAF bedeutenden Einfluss auf Prozesse wie Invasion und Migration von Tumorzellen (Egeblad *et al.* 2010; Pathak und Kumar 2012) und werden so neben den epithelialen Tumorzellen zu einem attraktiven Therapieziel.

Die Forschung hat sich dabei stark auf Tumore der Brust konzentriert. Die Bedeutung der TAF für die Entstehung, das Wachstum, die Invasion und die Metastasierung von Brusttumoren sowie die Mechanismen der gegenseitigen Beeinflussung sind so gut etabliert, dass bereits von einer Ko-Evolution der Tumorzellen und TAF gesprochen wird (Anderson *et al.* 2006; Polyak *et al.* 2009). Über den Einfluss der TAF auf die Sensitivität oder Resistenz der Tumorzellen aus Brust- (Shekhar *et al.* 2007; Crawford *et al.* 2009), Ovar- (Ahmed *et al.* 2007), Pankreas- (Müerköster *et al.* 2004; Hwang *et al.* 2008) und Lungentumoren (Bartling *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009) ist hingegen nur sehr wenig bekannt. Außerdem zeigten Chang *et al.* (2002) Unterschiede in der Genexpression von Fibroblasten aus verschiedenen Geweben und schlossen daraus, dass Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft als verschiedene differenzierte Zelltypen behandelt werden sollten. Die Erkenntnisse über TAF aus anderen Organen sind also wahrscheinlich nicht vollständig auf die Lungen-TAF übertragbar. Die Studien mit Lungen-TAF zeigten einen Einfluss der Fibroblasten auf die Tumorzellen bei einer Behandlung mit Gefitinib, Erlotinib und Paclitaxel (Bartling *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009). Umfassende Untersuchungen

¹www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/index.html

der Reaktion von Lungen-TAF auf unterschiedlichste Substanzen fehlten bisher. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Sensitivität der TAF auf Kinase-Inhibitoren und das Chemotherapeutikum Cisplatin zu untersuchen und einen Vergleich zwischen TAF und NAF aus Lungengewebe zu erstellen. Diese Charakterisierung sollte dazu beitragen, die Reaktionen der TAF genauer zu verstehen und ihren Phänotyp modulieren zu können, so dass der negative Einfluss auf die Tumorzellen minimiert wird. Über die Bedeutung für Lungentumore hinaus könnten mit den so erhaltenen Daten durch Vergleiche mit bereits publizierten Studien auch Ähnlichkeiten und Unterschiede der TAF aus verschiedenen Tumorentitäten bestimmt werden.

Für diese Untersuchungen wurden nach dem von Sonnenberg *et al.* (2008) beschriebenen Verfahren die Fibroblasten aus Tumoren und benachbartem normalen Lungengewebe isoliert und die Primärzell-Kultur etabliert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten die TAF über mehrere Passagen ohne Proliferationsverlust kultiviert werden. Es wurde wiederholt gezeigt, dass der TAF-Phänotyp in Kultur auch beim Fehlen der Tumorzell-Signale stabil ist, und vorgeschlagen, dass dies durch epigenetische Veränderungen als Reaktion auf Stress verursacht wird (Zeisberg *et al.* 2000; Orimo *et al.* 2005). Um mögliche Veränderungen der TAF während der Kultur auszuschließen, wurden die Experimente in Passage drei bis fünf durchgeführt, also so früh wie möglich nach der Etablierung der Kultur, aber mit ausreichend expandierter Zellzahl für eine Vielzahl paralleler Experimente. Dieses Monokultur-Modellsystem von TAF unterschiedlicher Patienten wurde ergänzt durch Modelle mit konditioniertem Medium, die Etablierung und Nutzung eines Kokultur-Systems von TAF und der Lungentumor-Zelllinie H1299, sowie die Untersuchung von TAF und Tumorzellen in intakten, *ex vivo* kultivierten Gewebeschnitten von humanen Lungentumoren.

6.1. Pharmakologische Modulation des Phänotyps der Tumor-assoziierten Fibroblasten zur Reduktion ihrer Tumor-unterstützenden Eigenschaften

TAF unterscheiden sich von ihren Pendanten in normalem Gewebe (Kalluri und Zeisberg 2006). Diese Veränderungen wurden meist auf molekularer Ebene charakterisiert, sie beeinflussen aber viele Prozesse im Tumor auf unterschiedlichen Ebenen und damit auch das Überleben der Patienten. Die TAF mit pharmakologischen Mitteln so zu modulieren, dass die sensible Balance des Kommunikationsnetzwerks der Tumore beeinträchtigt wird, könnte daher eine interessante therapeutische Möglichkeit sein.

Von den Tumorzellen werden die Fibroblasten durch sekretierte Faktoren wie TGF β , PDGF und FGF2 beeinflusst (Elenbaas und Weinberg 2001). Solche Wachstumsfaktoren binden an die extrazellulären Domänen von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden. Bei der Verarbeitung, Weiterleitung und Verstärkung

dieser Signale spielen Kinasen in allen Zelltypen eine bedeutende Rolle (Manning *et al.* 2002). Die Veränderungen der TAF betreffen damit auch die Expression oder Regulation solcher Kinasen. Diese in TAF veränderten Prozesse zu hemmen, sollte demnach ihren Phänotyp beeinflussen. Dies könnte die Förderung des Tumorwachstums reduzieren, die Proliferation hemmen und die Sekretion der extrazellulären Matrix, von Proteasen und von Wachstumsfaktoren normalisieren.

Für Lungen-TAF lagen bisher keine umfangreichen Untersuchungen der Wirkung von Kinase-Inhibitoren vor. Mit einer Kinase-Inhibitor-Bibliothek, die gut charakterisierte, Zell-permeable, klinische und präklinische Inhibitoren aus unterschiedlichen Substanzklassen enthält, wurde daher in der vorliegenden Arbeit zunächst nach den wirksamsten der 151 getesteten Inhibitoren gesucht.

Fünf Substanzen hemmten die Viabilität zweier TAF bei einer Konzentration von 1 μM um mindestens 50 %. Dabei handelte es sich einerseits um den Breitspektrum-Inhibitor Staurosporin, andererseits gab es auch Inhibitoren mit etwas engerer Spezifität wie PDK1/Akt/Flt-Inhibitor, K-252a, und PI-103 sowie den spezifischen PDGFR-Inhibitor IV. Staurosporin, K-252a und PDGFR-Inhibitor IV, also drei der fünf Inhibitoren, hemmen die Aktivierung des PDGFR bei nanomolaren Konzentrationen. Bei anderen intrazellulären oder Rezeptor-Kinasen tritt keine solche Häufung auf. Diese *in vitro*-Experimente stimmen mit Beobachtungen von Forsberg *et al.* (1993) überein, nach denen PDGF ein wichtiges Mitogen für Fibroblasten ist und darüber hinaus die Bildung von Tumor-Stroma fördert. PDGFR-Hemmung könnte daher eine leistungsfähige Möglichkeit darstellen, den veränderten, aktivierten Phänotyp der TAF zu reduzieren.

Für die weitere Verfolgung dieses Ziels wurden die klinisch zugelassenen PDGFR-Inhibitoren Dasatinib, Imatinib, Nilotinib und Sorafenib untersucht. Wenn die behandelten TAF ein geringeres Maß an Proliferation beziehungsweise Viabilität zeigten, könnte auch eine Wirkung auf den Phänotyp des Tumor-Stromas erzielt werden, bei der die TAF verschiedene Prozesse im Tumor weniger fördern würden. Für eine klinische Anwendung sind dabei bereits zugelassene Inhibitoren die attraktivere Möglichkeit im Vergleich zu präklinisch eingesetzten Inhibitoren, weil bereits die Dosierung ermittelt wurde, die Nebenwirkungen tolerierbar sind und die Zulassung für eine neue Indikation damit schneller möglich wäre. In MTT-Experimenten hemmten diese vier PDGFR-Inhibitoren die Viabilität der TAF, der als Kontrolle verwendete EGFR-Inhibitor Erlotinib zeigte erwartungsgemäß keine Wirkung. Die vier PDGFR-Inhibitoren bewirkten eine unterschiedlich effiziente Hemmung der TAF, wobei Dasatinib mit 36 % Viabilitätshemmung das wirksamste Medikament war. Als Ursache für die unterschiedliche Stärke der Hemmung kommen verschiedene Faktoren in Frage. So hemmt Dasatinib von den verwendeten Inhibitoren das breiteste Spektrum an Tyrosinkinasen, z. B. Abl, viele Src-Familien-Kinasen und c-Kit neben dem PDGFR (Montero *et al.* 2011). Imatinib und Nilotinib hemmen ebenso Abl, c-Kit und PDGFR (Homsí und Daud 2007; Blay und von Mehren 2011), während Sorafenib mit c-Raf, B-Raf, PDGFR, VEGFR und c-Kit ein anderes Spektrum an Kina-

sen hemmt (Mangana *et al.* 2012). Die geringe Hemmung der TAF durch einen spezifischen Src-Inhibitor im *Inhibitor Select-Library-Screen* schließt die Möglichkeit nicht vollständig aus, dass die bessere Dasatinib-Wirkung auf ein breiteres Spektrum gehemmter Kinasen zurückzuführen ist. Dagegen spricht aber, dass auch Sorafenib, der Inhibitor mit dem geringsten Effekt im MTT-Experiment, ein sehr breites Wirkungsspektrum besitzt. Darüber hinaus ist bekannt, dass Dasatinib die aktive Konformation der Kinasen hemmt, während Imatinib nur an die inaktive Form bindet (Vajpai *et al.* 2008), was zu der beobachteten stärkeren Wirkung auf die TAF beitragen könnte. Zusätzlich ist nicht für jeden Inhibitor im Detail bekannt, ob PDGFR-A oder -B inhibiert wird. Wahrscheinlich ist eine Kombination der genannten Effekte für die unterschiedlichen Effizienzen der Inhibitoren verantwortlich.

Für den Inhibitor mit der zweitschwächsten Wirkung auf TAF, Nilotinib, kommt hinzu, dass das Alter der Patienten mit der Hemmung der TAF im MTT-Assay signifikant korreliert ist (ohne Abbildung, Pearson $r = 0,7$, $p = 0,016$). Die Hälfte der Variabilität der Nilotinib-Wirkung könnte im hier untersuchten TAF-Kollektiv auf das Alter der elf Patienten zwischen 55 und 74 Jahren zurückzuführen sein, wobei die TAF älterer Patienten sensitiver auf Nilotinib reagieren als die TAF jüngerer Patienten. Dass es altersbedingte Veränderungen von Fibroblasten gibt und diese beispielsweise die funktionelle Antwort auf $TGF\beta$ beeinflussen wurde zwar gezeigt (Moulin *et al.* 2001), aber wie mögliche Unterschiede nur bei einem der PDGFR-Inhibitoren eine Rolle spielen könnten, ist unklar. Hierfür erscheinen Veränderungen in Signalwegen, die parallel zum gehemmten PDGFR-Weg existieren, möglich. So zeigten Mostertz *et al.* (2010) einen Einfluss des Alters der Patienten darauf, welche Signalwege in den Tumoren von hoch-Risiko-Patienten aktiviert sind. Ohne einen konkreten Mechanismus zu kennen, bleibt die biologische Bedeutung dieser in einem relativ kleinen Kollektiv identifizierten Unterschiede aber unklar.

Für fibrotische Erkrankungen ist bereits geklärt, dass Fibroblasten sensitiv auf PDGFR-Inhibitoren wie Dasatinib, Imatinib und Nilotinib reagieren (Akhmetshina *et al.* 2008; Distler und Distler 2010). Die vorliegende Arbeit konkretisiert die lang bekannte Bedeutung von PDGF dahingehend, dass die Hemmung der Viabilität von Lungen-TAF in Zellkultur durch PDGFR-Inhibitoren am effektivsten ist. Die Hemmung keiner anderen Kinase hatte im *Screen* eine ebenso deutliche Wirkung und die MTT-Experimente mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen und deutlich erweitertem TAF-Kollektiv bestätigen die Wirkung anhand von vier Inhibitoren mit klinischer Zulassung. Daher kann die PDGFR-Hemmung ein Weg sein, die TAF zu inhibieren und ihre Unterstützung des Tumorwachstums zu vermindern. Untersuchungen mit murinen Tumormodellen deuten darüber hinaus auf Tumor-schädigende Mechanismen einer PDGFR-Hemmung hin. So zeigten zwei Studien mit Dickdarm- und Schilddrüsentumor-Modellen, dass PDGFR-Hemmung zu einer Reduktion des Flüssigkeitsdrucks in den Tumoren führt, so dass die Diffusion von Substanzen in den Tumor erleichtert (Pietras *et al.* 2001) und damit die Wirkung von Chemotherapeutika *in vivo* erhöht wird (Pietras *et al.* 2002). Im Zervixkarzinom-Modell

verringerte die PDGFR-Hemmung mit Imatinib die Progression von prämaligen Neoplasien und beeinträchtigte das Wachstum invasiver Tumore (Pietras *et al.* 2008).

Die zwei wirksamsten der vier PDGFR-Inhibitoren, Dasatinib und Imatinib, wurden daher detaillierter untersucht. Dasatinib und Imatinib hemmen die Proliferation der TAF, ohne Zelltod zu induzieren. Diese Wirkung der Inhibitoren könnte also einen Aspekt der Normalisierung des Phänotyps erfüllen, die TAF in einen ruhenden Zustand zurück zu versetzen. Dasatinib hemmt den Zellzyklus reversibel. Bereits nach acht Stunden ohne Behandlung beginnen die Fibroblasten erneut zu proliferieren und der Anteil der Zellen in S-Phase normalisiert sich. Dies und die negative β -Galaktosidase-Färbung zeigen (Haubeiss *et al.* 2010), dass die Fibroblasten ruhen, also quieszent sind und nicht seneszent. Damit wären mögliche, von Krtolica *et al.* (2001) gezeigte negative Auswirkungen von seneszenten Fibroblasten auf die Tumorzellen bei einer Behandlung mit Dasatinib nicht zu erwarten.

Aufgrund der stärkeren Wirkung im Vergleich zu den anderen zugelassenen Inhibitoren wurde Dasatinib ausgewählt, um zu untersuchen, ob die beobachtete Proliferationshemmung mit einer Normalisierung weiterer Facetten des TAF-Phänotyps einhergeht. Um diese Frage zu klären, gibt es bisher keinen zuverlässigen, etablierten Marker. Mittels *Microarray*-Analysen wurden jedoch verschiedene Gene identifiziert, die zwischen TAF und NAF unterschiedlich exprimiert sind (Sadlonova *et al.* 2009). Für einen Vergleich der Dasatinib-Wirkung mit diesen Genexpressions-Mustern wurde daher die Genexpression von Dasatinib-behandelten und unbehandelten TAF untersucht. Die 492 Gene der in der vorliegenden Arbeit identifizierten „Dasatinib Response Signatur“ sind zwischen unbehandelten und behandelten TAF mindestens zweifach unterschiedlich exprimiert. Darin enthalten sind erwartungsgemäß auch Gene, die dem *Gene Ontology* (GO)-Begriff Zellzyklus zugeordnet oder in einer *Quiescence*-Signatur enthalten sind (Coller *et al.* 2006). Diese machen etwa $\frac{1}{5}$ beziehungsweise $\frac{1}{15}$ der „Dasatinib Response Signatur“ aus. Sowohl diese Teilmengen des Expressionsmusters als auch die Betrachtung einzelner Gene, beispielsweise von Transkriptionsfaktoren, zeigen mögliche Mechanismen des beobachteten, funktionellen Phänotyps Dasatinib-behandelter TAF auf. So wird die Expression mehrerer *E2F*-Transkriptionsfaktoren reduziert, was zur Verminderung der Proliferation bei einer Dasatinib-Behandlung führen könnte. Außerdem könnte die erhöhte Expression vieler Transkripte mit einer GO-Zuordnung zur Zell-Zell und Zell-Matrix-Adhäsion zur beobachteten stärkeren Adhäsion an den Zellkulturgefäßen beitragen.

Ebenfalls $\frac{1}{5}$ der Gene sind in einem TAF-NAF-Vergleich identifiziert worden (Sadlonova *et al.* 2009). Dabei wird die Expression dieser Gene durch Dasatinib so verändert, dass die Lungen-TAF auf molekularer Ebene den normalen Fibroblasten ähneln. Beim Vergleich dieser zwei Genexpressions-Signaturen wurden etwa achtmal so viele Gene in der Schnittmenge gefunden, wie statistisch durch Zufall zu erwarten wäre. Ob sich die Expression dieser „Dasatinib Response“-Teilsignatur auch in humanen Lungentumoren identifizieren lässt, wurde mit der häufig verwendeten Methode der *outcome*-Assoziation untersucht

(Venet *et al.* 2011). Dafür wurde die Expression der Gene aus der „Dasatinib Response“-Teilsignatur in den Genexpressionsmustern von humanen Lungentumoren identifiziert. Anhand dieser Teilmenge der *Microarray*-Daten konnten zwei Gruppen von Tumoren unterschieden werden, die entweder ein Genexpressionsmuster ähnlich der unbehandelten TAF oder ähnlich zu den Dasatinib-behandelten TAF aufwiesen. Dass die Patienten mit dem Dasatinib-ähnlichen Expressionsmuster der Lungentumore die Erkrankung tendenziell länger überlebten, ist ein Hinweis auf die funktionelle Bedeutung dieser Gene. Die Behandlung mit Dasatinib macht die TAF also nicht nur ähnlicher zu NAF, sondern diese Veränderung könnte auch Bedeutung für das Überleben der Patienten haben. Daher wurde nach weiteren Patienten-Datensets gesucht, für die sowohl Genexpressions-Signaturen als auch klinische Daten veröffentlicht waren. Da aber bei aktuelleren Veröffentlichungen verstärkt die Bedeutung der Kontamination mit Stromazellen berücksichtigt wurde, konnten keine brauchbaren Datensets gefunden werden, weil nur Material analysiert wurde, das 90-100 % Tumoreal enthielt.

In der Literatur wird aktuell der Nutzen von Genexpressions-Signaturen insbesondere für die Verwendung als prognostisches oder prädiktives Mittel kontrovers diskutiert. Ursache hierfür ist eine Veröffentlichung von Venet *et al.* (2011), die zeigte, dass zufällige Signaturen unter Umständen deutlichere Überlebens-Unterschiede zeigen als real funktionell identifizierte Signaturen. Das Bewusstsein für eine mögliche Problematik dieser Methode bereits vor der genannten Veröffentlichung führte dazu, dass dieser Hinweis auf eine verminderte Unterstützung der Tumorzellen durch die TAF in funktionellen Experimenten mit konditioniertem Medium von Fibroblasten weiterverfolgt wurde. Um dem Hinweis nachzugehen, dass eine Dasatinib-Behandlung die TAF so verändert, dass die Normalisierung des Phänotyps zu einer geringeren Wachstumsförderung der Tumorzellen führt, wurde die Proliferation von H1299-Tumorzellen in Kultur mit konditioniertem Medium von Dasatinib-behandelten und unbehandelten Fibroblasten untersucht. Außerdem sollten diese Experimente klären, wie die mittels *Microarrays* identifizierte, erhöhte Expression vieler Wachstumsfaktoren der TAF sich auf die Tumorzellen auswirkt. Die H1299-Lungentumorzelllinie wurde von Jens Schmid einzeln mit konditioniertem Medium, das die Wachstumsfaktoren von TAF aus drei unterschiedlichen Patienten enthielt, behandelt. Der wachstumsfördernde Effekt des konditionierten Mediums konnte durch eine Dasatinib-Behandlung der TAF aufgehoben werden. Die Hemmung der H1299-Proliferation durch konditioniertes Medium von behandelten TAF war sowohl signifikant stärker als die allein durch Dasatinib verursachte Reduktion als auch im Vergleich zur durch Dasatinib-Zugabe zu TAF-konditioniertem Medium verursachten Reduktion. Die Behandlung von TAF mit Dasatinib reduziert demnach den durch die TAF vermittelten Wachstumsstimulus auf die Tumorzellen (Haubeiss *et al.* 2010). Eine simultane Behandlung von TAF und H1299 wie sie im Patienten der Realität entspräche, ist im Rahmen dieses vereinfachten Zellkultur-Experimentes nicht möglich. Daher bleibt unklar, wie stark der beobachtete Effekt von Dasatinib-behandelten H1299 möglicherweise zusätzlich auf

die TAF und die Zusammensetzung der sekretierten Wachstumsfaktoren wirken würde und ob sich *in vivo* synergistische Wirkungen der Hemmung von TAF und Tumorzellen ergeben könnten.

Diese Frage sollte unter Verwendung eines Tumorgewebeschnitt-Modellsystems untersucht werden. Wenn die Dasatinib-Behandlung von humanem Lungentumorgewebe eine verringerte Proliferation oder verstärkten Zelltod von TAF und/oder Tumorzellen zur Folge hätte, wäre das ein Argument für den Nutzen einer Dasatinib-Therapie, das weit über Gensignaturen und sekretierte Faktoren hinaus ginge. Der Vorteil dieses *ex vivo*-Modells ist, dass die Mikroumgebung des Tumors weitgehend erhalten bleibt und damit auch die Einflüsse der anderen Zelltypen zu einem vollständigeren Bild der Auswirkungen der Behandlung führen. Dafür wurden Frischgewebe-Schnitte humaner Lungentumore mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Dicke von 200 µm für vier Tage kultiviert und konnten 72 Stunden medikamentös behandelt werden. Mit diesem Modell wurde der Einfluss von Dasatinib auf die Proliferation und den Zelltod von TAF und Tumorzellen untersucht. Dasatinib hemmt die Proliferation von Tumorzellen insbesondere in den Tumoren, die *per se* hochproliferativ sind. Das bestätigt nicht gezeigte *in vitro*-Voruntersuchungen, nach denen einige, aber nicht alle Lungentumor-Zelllinien sensitiv auf Dasatinib reagieren. Die Ursache hierfür kann demnach eine direkte Hemmung von (Rezeptor)-Tyrosinkinasen in den Tumorzellen sein. In diesem Modell lässt sich jedoch nicht feststellen, wie groß dieser Effekt im Vergleich zum Einfluss der TAF und deren veränderter Sekretion von Wachstumsfaktoren ist. Dong *et al.* (2011) haben aus vielen der hier verwendeten Tumorgewebeproben die Tumorzellen isoliert. Diese wachsen jedoch in Monokultur nur selten und dann in der Regel nur über sehr wenige Passagen. Daher konnte die Sensitivität der Tumorzellen in Zellkultur nicht bestimmt werden. Im Gegensatz zu den Tumorzellen zeigten die TAF der untersuchten Gewebeschnitte in immunhistochemischen Analysen nur selten und vereinzelt eine positive KI67-Färbung. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beschreibung von Haviv *et al.* (2009) überein, nach der TAF stets negativ für die Proliferationsmarker KI67 und PCNA sind.

Die Auswirkungen von Dasatinib auf den Zelltod von Tumorzellen und TAF im Gewebe sind sehr heterogen. In einigen Fällen zeigen nur die Tumorzellen oder nur die TAF Zelltod, in anderen Fällen reagieren beide auf Dasatinib. Während in der Zellkultur weder Fibroblasten noch Tumorzellen mit Zelltod auf die Dasatinib-Behandlung reagieren, ist in der Gewebekultur nur bei einem Teil der Patienten keine Reaktion zu beobachten. Im Unterschied zur Monokultur treten bei der Gewebeschnitt-Kultur sowohl die Zelltod-Induktion als auch Zelltod-Hemmung in beiden Zelltypen auf. Von 12 untersuchten Tumoren wurde bei vier Tumoren in TAF und drei Tumoren in den Tumorzellen eine Zelltod-Induktion von mindestens 10 % detektiert. Hier handelt es sich demnach um einen Effekt, der auf Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zellen im Gewebe beruhen könnte da er in der Zellkultur nicht beobachtet wurde. Um aufzuklären, ob ein Zelltyp zuerst auf Dasatinib reagiert und daraufhin den anderen Zelltyp beein-

flusst, müsste die Dasatinib-Behandlung als Kinetik in der Gewebeschnitt-Kultur durchgeführt werden. Doch aufgrund des meist limitierten Tumormaterials musste darauf verzichtet werden. Die geringe positive Korrelation zwischen Zelltod von TAF und Tumorzellen könnte aber ein Hinweis auf die Veränderung der gesamten Tumor-Kommunikation sein. Als mögliche Ursache für die Dasatinib-Sensitivität der Tumorzellen wurden auch *SRC*-Amplifikationen beschrieben (Sos *et al.* 2009). Diese Veröffentlichung beschreibt auch den EGFR als relevantes Dasatinib-Zielprotein. Darüber hinaus wurde Dasatinib-induzierter Zelltod von Tumorzellen im Zusammenhang mit einer erhöhten Anzahl der Genkopien von Dasatinib-Zielgenen beschrieben, welche in 12,9 % der untersuchten primären Lungenkarzinome auftrat (Pelham *et al.* 2006). Hier wurden im Maus-Modell in zwei Fällen auch für TAF erhöhte Kopienzahlen einzelner Gene beschrieben. Allerdings wurden keine funktionellen Untersuchungen der TAF durchgeführt und auch Mäuse ohne Tumore, aber beispielsweise mit entzündlichen Erkrankungen, als Kontrollen fehlten. So blieb die Bedeutung dieser Veränderungen in TAF unklar und es könnte sich um ein normales Phänomen in proliferierenden Fibroblasten handeln.

Die in der Gewebeschnitt-Kultur beobachtete Wirkung von Dasatinib auf Proliferation und Zelltod der TAF und Tumorzellen hat in der Klinik momentan noch keinen direkten Effekt. Johnson *et al.* (2010) zeigten zwar einen Patienten mit circa 40%iger Reduktion der Tumorgröße nach 12wöchiger Dasatinib-Behandlung und vier Patienten mit progressionsfreier Erkrankung, doch der Vergleich dieser Studie mit einarmigem Design zu anderen Studien der konventionellen Chemotherapie zeigte keinen Vorteil der Dasatinib-Behandlung.

Zusammenfassend zeigt die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Normalisierung des TAF-Phänotyps in Kombination mit der Dasatinib-Wirkung auf die Tumorzellen in Experimenten mit konditioniertem Medium und in Gewebeschnitt-Kultur einen möglichen neuen Weg zur pharmakologischen Behandlung und Destabilisierung von Lungentumoren.

6.2. Gegenseitige Beeinflussung der Cisplatin-Sensitivität von Tumor-assoziierten Fibroblasten und Tumorzellen

Cisplatin ist nach wie vor die empfohlene Chemotherapie vieler Stadien des Lungenkarzinoms (Goeckenjan *et al.* 2011). Experimentell konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur die Tumorzellen, sondern auch die TAF auf eine Behandlung mit Cisplatin ansprechen (Sonnenberg *et al.* 2008), wobei aus Lungentumoren isolierte TAF ebenso heterogen auf Cisplatin reagierten wie eine Auswahl verschiedener Tumorzelllinien. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Ursache für diese Heterogenität der TAF nicht auf einen einfaktoriellen Unterschied zurückgeführt werden. Die Untersuchungen wurden daher mit zwei Schwerpunkten fortgeführt.

Der erste Schwerpunkt gründet auf der Beobachtung, dass im Gewebeschnitt-Modell von humanen Tumoren die TAF und Tumorzellen parallel auf eine Behandlung reagierten (Sonnenberg 2009). Hier sollte ein Kokultur-Modell etabliert und verwendet werden, das die Untersuchung des Zusammenspiels der Zelltypen in vereinfachter, manipulierbarer Form ermöglicht.

In der Dissertation Sonnenberg (2009) wurde gezeigt, dass isolierte TAF in der Zellkultur ebenso variabel auf Cisplatin reagierten wie eine Auswahl von Tumorzelllinien, während die TAF im Gewebe ein paralleles Ansprechen zu den Tumorzellen zeigten. Dabei verhielten sich 40 % der isolierten TAF Cisplatin-sensitiv, aber nur 13 % der Fibroblasten im Gewebe mit intakter Tumor-Mikroumgebung. Diese Beobachtungen wurden als ein Schutz der sensitiven TAF durch die Tumorzellen im Gewebe interpretiert, also ein Einfluss der Umgebung auf die Sensitivität der TAF. Auch eine Schutzfunktion resistenter TAF gegen Cisplatin-induzierten Zelltod der Tumorzellen wurde als Möglichkeit in Betracht gezogen.

Doch die Variabilität der Zelltypen und der ECM in menschlichen Tumoren ist sehr hoch (Morin 2003). Intra- und interindividuell können die Tumorzellen unterschiedliche Mutationen haben und die Zusammensetzung der Anteile an Tumorzellen und verschiedenen Stromazelltypen kann variieren. Zwischen verschiedenen Patienten mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund können die Tumore zusätzlich unterschiedliche Histologien und Stadien aufweisen. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, ein Kokultur-System aus TAF und Tumorzellen zu entwickeln. Dieses vereinfacht die Komplexität auf zwei Zelltypen, deren Eigenschaften wie beispielsweise bestimmte Mutationen je nach Fragestellung ausgewählt werden können. Im Gegensatz zu Modellen mit konditioniertem Medium sind die Effekte nicht auf im Medium stabile sekretierte Faktoren der Zellen begrenzt, sondern es wurde ein System eingeführt, das auch die Effekte weniger stabiler Proteine und der direkten Zell-Zell-Kontakte umfasst. Das Modell ist dennoch standardisiert und die Manipulationen leicht wiederholbar. Außerdem ist zur Detektion der Zelltypen keine Fixierung und Markierung nötig, um Artefakte und unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden sowie die Anzahl benötigter Kontrollen und damit die Menge benötigter primärer Fibroblasten zu reduzieren. Dafür bot sich eine Zelllinie mit eGFP-markiertem Histon unseres Kooperationspartners Moshe Oren vom *Weizmann Institute of Science* (Rehovot, Israel) an. Diese H1299 sind durch grüne Fluoreszenz von den GFP-negativen primären TAF in durchflusszytometrischen Auswertungen gut zu unterscheiden. Selbst bei einer Behandlung mit 13 μM Cisplatin bleibt diese Fluoreszenz erhalten.

Da Sonnenberg (2009) im Gewebe die parallele Zelltod-Reaktion von TAF und Tumorzellen beobachtet hatte, wurde auch für die Kokultur auf die Zelltod-Färbung mittels rot fluoreszierendem AnnexinV-Alexa568 konzentriert. Die Trennung sowohl der GFP-positiven und -negativen Zellen als auch der AnnexinV-positiven und -negativen Zellen in vier identifizierbare Gruppen gelang mit diesen Farbstoffen zuverlässig. Mit diesem System wurden verschiedene Voruntersuchungen durchgeführt, die Faktoren wie die Dauer

der Kultivierung und Behandlung, die Anteile der eingesetzten Zellen, die Kontrollen und das Alter der TAF einschlossen, um reproduzierbare Daten zu erhalten und Effekte der Zelltypen untereinander beobachten zu können. Es wurde ein Kokultur-System etabliert, bei dem die Dauer eines Versuches vier Tage beträgt. In einer 6-Loch-Platte werden dafür TAF- sowie Tumorzell-Monokultur-Kontrollen und kokultivierte Zellen untersucht, wobei beispielsweise pro Platte Behandlung und Kontrolle verglichen werden können. Der Arbeitsaufwand ist gering und die Kokultur-Experimente erlauben jederzeit eine visuelle Kontrolle der Zelldichte und Zellmorphologie. Die AnnexinV-PI-Färbung dauert circa 30 Minuten und die durchflusszytometrische Auswertung bis zu drei Minuten pro Probe. Darüber hinaus ist dieses Kulturmodell einfach an verschiedene Fragestellungen anzupassen, indem beispielsweise Paare von Tumorzelllinien mit verschiedenen Mutationen verwendet werden oder sogar für die Fragestellung interessante TAF immortalisiert werden können. Das etablierte Modellsystem erfüllt damit alle geforderten Bedingungen.

Im Kokultur-Modell wurde dann die Reaktion der Zellen aufeinander und auf Cisplatin untersucht. Unter Monokultur-Bedingungen zeigten die TAF Cisplatin-induzierten Zelltod, im Mittel der 12 untersuchten TAF eine Verdopplung des Zelltods. Die maximale Zelltod-Induktion unter Monokultur-Bedingungen lag für TAF bei 30,4 % und für die H1299-Tumorzelllinie bei 6,5 %, unter Kokultur-Bedingungen für die TAF bei 6,9 % und für H1299 bei 17,2 %. Unter allen Bedingungen betrug die Cisplatin-induzierte Änderung des Anteils der toten Zellen für die meisten der 12 Experimente unter 10 %. Darüber lagen nur zwei TAF in Monokultur und dreimal die H1299-Zelllinie in Kokultur mit verschiedenen TAF. Sowohl das basale Zelltod-Niveau als auch der Zelltod nach Cisplatin-Behandlung waren damit geringer als in Tumorgewebe-Schnitten von Sonnenberg (2009) beobachtet wurde. Die Zelltod-Induktion durch Cisplatin in diesem Kulturmodell liegt demnach auf einem niedrigen Niveau, zwischen 1,4fach und 1,9fach.

Dennoch konnten signifikante Unterschiede bei der Cisplatin-Antwort zwischen Monokultur- und Kokultur-Bedingungen identifiziert werden. Die H1299-Tumorzelllinie wird im Mittel durch die Kokultur mit TAF aus verschiedenen Patienten Cisplatin-sensitiver, die TAF werden resistenter. Dieses Ergebnis entspricht nicht der Erwartung, dass beide Zelltypen in gleicher Weise reagieren. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Experimente ergibt sich eine ausgeprägte Variabilität. Eine detaillierte Analyse zeigt, dass 6 von 12 TAF durch H1299 vor Cisplatin-induziertem Zelltod geschützt werden, 2 kaum reagieren, und 4 in Kokultur sensitiver gegenüber Cisplatin sind. Hingegen werden die H1299 in Kokultur mit TAF aus verschiedenen Tumoren 7mal sensitiver und 5mal resistenter gegen Cisplatin als in Monokultur. Die Anwesenheit von Tumorzellen schränkt dabei die Variabilität der Cisplatin-Antwort der TAF ein, während umgekehrt die H1299 bei der Kokultur mit TAF erwartungsgemäß variabler reagieren als in Monokultur. In fünf Fällen reagieren TAF und Tumorzellen wie erwartet parallel auf die veränderten Kulturbedingungen. Dreimal sind TAF und Tumorzellen in Kokultur resistenter gegen Cisplatin und zweimal sind beide Zelltypen sensitiver. In ebenso vielen Fällen reagieren die zwei

Zelltypen aber entgegengesetzt. So reagieren in drei Experimenten die H1299 in Kokultur sensitiver auf Cisplatin als in Monokultur während gleichzeitig die TAF resistenter werden. In zwei Fällen war die Situation genau umgekehrt. Die in diesem Modellsystem gezeigten Effekte sind also deutlich heterogener als nach den Gewebeschnitt-Kulturergebnissen von Sonnenberg (2009) erwartet wurde, obwohl für die Kokultur-Versuche stets die H1299-Tumorzelllinie verwendet wurde, während in den Tumorgewebeschnitten auch eine Heterogenität der Tumorzellen vorliegt.

In den Kokultur-Experimenten sind die TAF aus verschiedenen Patienten eine zentrale Ursache der beobachteten Variabilität. In den im folgenden beschriebenen Gewebeschnitt-Untersuchungen ist diese Heterogenität nur einer unter mehreren Faktoren. Auch wenn die mittlere Induktion des Zelltods in der Kokultur geringer ist als von Sonnenberg (2009) im Gewebe beobachtet wurde, werden die folgenden Vergleiche anhand eines erweiterten Kollektivs von Gewebeschnitten zeigen, dass gerade die im Kokultur-Modell beobachtete Variabilität ein Aspekt ist, bei dem das Kokultur-Modell die Variabilität im Gewebe rekapituliert und der für weitere Untersuchungen nützlich sein kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zelltod im Gewebe mittels TUNEL-Färbung als Maß für DNA-Fragmentierung weiter untersucht und die Beobachtungen auf Gewebeschnitte von 40 Patienten ausgeweitet. Dabei wurde einerseits durch eine lineare Korrelation der Tumorzell- und TAF-Zelltod-Antwort das Ergebnis prinzipiell bestätigt, dass TAF und Tumorzellen parallel reagieren. In diesem erweiterten Patientenkollektiv reagieren 15 von 40 Tumoren mit einer parallelen Zelltod-Induktion in beiden Kompartimenten von mindestens 10 %, insgesamt zeigen in $\frac{3}{4}$ der Fälle TAF und Tumorzellen eine mindestens geringe parallele Induktion von Zelltod. Der Spearman-Korrelationskoeffizient betrug aber nur $r=0,62$, das heißt nicht alle Gewebe reagieren auf diese beschriebene Weise. Eine ähnlich starke Korrelation wurde bereits bei den Kokultur-Experimenten mit TAF verschiedener Patienten und der H1299-Tumorzelllinie beobachtet (Pearson $r=0,62$, $p=0,03$), bei denen die TAF den Zelltod der Tumorzellen beeinflussen. Es wurden zwar bei den immunhistochemischen Analysen der Gewebeschnitte unter Beachtung der gängigen 10 %-Grenze (Koda *et al.* 2007) keine Tumore gefunden, bei denen TAF und Tumorzellen entgegengesetzte Reaktionen auf Zelltod zeigten, aber es gab mehrere Fälle, in denen Tumorzellen eine teilweise erhebliche Induktion von Zelltod zeigten, während die TAF nicht mit vermehrtem oder vermindertem Cisplatin-induziertem Zelltod reagierten. Der umgekehrte Fall, eine mehr als 10%ige Zelltod-Induktion der TAF ohne eine mindestens 10%ige Zelltod-Induktion der Tumorzellen, wurde nicht beobachtet. Zusätzlich ist die Induktion des Zelltods der Tumorzellen signifikant stärker als die der benachbarten TAF. Zusammengenommen sind diese Daten Hinweise auf eine Beeinflussung der TAF durch die Tumorzellen, wobei ein schwächerer, umgekehrter Einfluss der TAF auf die Tumorzellen, wie er bei den Kokultur-Experimenten auftrat, nicht auszuschließen ist.

Aus drei Tumoren wurden TAF in Gewebeschnitten und unter Kokultur-Bedingungen untersucht. Das basale anhand der TUNEL-Färbung ermittelte Zelltod-Niveau der TAF

liegt im Tumorschnitt bereits höher als das in unbehandelten, kokultivierten TAF mittels AnnexinV-Alexa568 ermittelte. Auch nach Cisplatin-Behandlung ist im Gewebe der Anteil toter Zellen höher als unter vergleichbaren Kulturbedingungen. Die Induktion von Zelltod im Gewebe und in Zellkultur sind im Mittel gleichstark (1,6fach in TAF), die Variabilität ist im Gewebe aber deutlich höher. Eine mögliche Ursache dafür sind die unterschiedlichen Tumorzellen im Gewebe, die die TAF über unterschiedliche Signalwege manipulieren könnten als die stets gleichen H1299 bei der Kokultur.

Darüber hinaus bestätigen die vorliegenden Ergebnisse auch die Proliferations-Daten von Sonnenberg *et al.* (2008), das heißt die Abnahme der KI67-Färbung der Tumorzellen nach Cisplatin-Behandlung, und zeigen im erweiterten Kollektiv die statistische Signifikanz dieser Veränderung. Die Tumorzellen können auf Cisplatin also sowohl mit Zelltod als auch mit verringerter Proliferation reagieren. Wieder zeigen die TAF im Gewebeschnitt keine Proliferation, was mit *in vivo*-Beobachtungen übereinstimmt (Haviv *et al.* 2009).

Von 17 Patienten lagen Daten über Proliferation und Zelltod der Tumorzellen im Gewebe vor. Diese können Aufschluss darüber geben, ob Tumorzellen einzelner Patienten mit Zelltod und Proliferations-Reduktion reagieren, oder ob die Tumorzellen nur jeweils eine dieser Reaktionen zeigen. Drei Gruppen konnten hier unterschieden werden: Die Tumorzellen stoppten nur die Proliferation, sie induzierten nur Zelltod oder sie reagierten mit beiden Prozessen. Für eine einfaktorische oder multifaktorische Analyse der Ursache solcher Heterogenität ist das vorliegende Kollektiv zu klein, beispielsweise sind einige histologische Gruppen der Tumore kaum repräsentiert. In der Literatur findet sich aber ein Hinweis, dass einzelne *tumor protein p53 (tp53)*-Mutationen in Tumorzellen eine Wildtyp-Zellzyklus-Regulation bei veränderter Apoptose-Induktion vermitteln können (Rowan *et al.* 1996). Es könnte also eine genetische Determination geben, die die Reaktion der Tumorzellen bestimmt und die beispielsweise dazu führt, dass diese bei einer Cisplatin-Behandlung ausschließlich eine Hemmung der Proliferation ohne Induktion von Zelltod zeigen. Mit der im Folgenden beschriebenen Suche nach *tp53*-Mutationen wurde daher der erste Schritt in die Richtung gemacht, die Ursache für die heterogenen Reaktionen von Tumoren aus verschiedenen Patienten zu finden.

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war somit die Untersuchung der p53-Antwort von TAF und Tumorzellen. Das p53-Protein ist ein zentraler Schalter bei der Reaktion auf DNA-schädigende Medikamente wie Cisplatin. Die Antwort einer Zelle auf Cisplatin ist von vielen Faktoren abhängig, zum Beispiel vom zellulären Kontext und dem Ausmaß des DNA-Schadens (Soussi und Bérout 2001). Außerdem ist das codierende *tp53*-Gen in Lungentumor-Zellen sehr häufig mutiert (Ding *et al.* 2008) und auch für TAF lagen Veröffentlichungen vor, laut denen *tp53*-Mutationen identifiziert wurden (Patocs *et al.* 2007). *In vitro* konnte außerdem gezeigt werden, dass die p53-Stabilisierung von TAF durch p53-null-Tumorzellen beeinträchtigt wird (Bar *et al.* 2009), was im Gewebe für die beobachtete Korrelation der Zelltod-Induktion von TAF und Tumorzellen ursäch-

lich sein könnte. Umgekehrt, beim Einfluss von TAF auf Tumorzellen, ist bisher nur bekannt, dass konditioniertes Medium von Lungen-TAF den Cisplatin-induzierten Zelltod von p53-null Tumorzellen nicht beeinflusste (Bartling *et al.* 2008). Da das Zusammenspiel der p53-Antwort verschiedener Zelltypen auf Cisplatin im intakten Tumorgewebe noch nicht untersucht wurde, lag hier der Fokus auf der Analyse des Einflusses von TAF und Tumorzellen aufeinander in einem Kollektiv von 47 humanen Lungentumoren, die *ex vivo* mit Cisplatin behandelt wurden.

Um die Frage zu klären, ob Tumorzellen die p53-Antwort der TAF auch in humanen Tumoren beeinflussen, wurde das p53-Protein mittels immunhistochemischer Färbung in unbehandelten und *ex vivo* 72 Stunden mit Cisplatin behandelten Gewebeschnitten nachgewiesen. Cisplatin verursacht DNA-Schäden, die über mehrere Signalschritte zur Stabilisierung von p53 führen können. Es ist lange bekannt, dass es Tumorzellen gibt, die p53 bereits konstitutiv, das heißt ohne DNA-schädigende Behandlung hoch exprimieren (Minna *et al.* 1986). Die Färbung der TAF wurde bisher aber nicht systematisch untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht nur die bekannten zwei Gruppen von Tumorzellen identifiziert - solche, die p53 konstitutiv hoch exprimieren (Gruppe 2) und solche, die es konstitutiv nicht exprimieren - sondern drei Gruppen. Diejenigen Tumorzellen, die unbehandelt keine p53-Färbung aufwiesen, konnten anhand des Farbe-Ergebnisses Cisplatin-behandelter Schnitte in zwei Gruppen unterteilt werden: Solche, die nach einer Behandlung mit DNA-schädigendem Medikament erwartungsgemäß p53 stabilisierten (Gruppe 1) und solche, die auch nach der 72stündigen Behandlung keine p53-Stabilisierung aufwiesen (Gruppe 3). Die Behandlung der Tumor-Gewebeschnitte ergab also einerseits eine detailliertere Gruppierung anhand der immunhistochemischen p53-Färbung der Tumorzellen.

Andererseits wurde in diesem Gewebe auch erstmalig die p53-Reaktion der TAF genauer untersucht, die bei Veröffentlichungen anderer Gruppen nicht betrachtet wurde. Dabei wiesen die TAF aus Tumoren der Gruppe 1 eine p53-Stabilisierung bei Cisplatin-Behandlung auf. In 15 von 16 Tumoren der Gruppe 2 und elf von elf Tumoren der Gruppe 3 reagierten die TAF in diesem Assay nicht auf die Cisplatin-Behandlung. Die Fähigkeit der TAF, auf Cisplatin mit einer p53-Antwort zu reagieren, ist also korreliert mit der Antwort von benachbarten Tumorzellen. Damit wurde erstmalig in einem Kollektiv von 47 humanen Tumoren nachgewiesen, dass der p53-Status der Tumorzellen einen Einfluss auf die p53-Antwort der benachbarten TAF ausübt. Die genaue Art der p53-Modulation der TAF könnte von vielen Faktoren abhängig sein, wie dem Tumortyp, dem ursprünglichen transformierenden Onkogen und weiteren Mutationen, den daraus folgenden Änderungen des Sekretoms der Tumorzellen und auch dem genetischen Hintergrund wie SNPs in p53-Signalweg-Genen. Durch solche teilweise nicht dokumentierten Unterschiede könnte auch die variable p53-Antwort der TAF in Gruppe 1 erklärt werden.

Für die Färbung wurde ein p53-Antikörper verwendet, der an die Aminosäuren 20-25 bindet. Für Lungentumore sind in dieser Region keine Mutationen beschrieben, daher kann

Wildtyp- und mutiertes p53 detektiert werden. Außerdem können unter Umständen auch durch eine Mutation verkürzte Proteine detektiert werden, falls diese nicht durch proteasomalen Abbau beseitigt werden. Auch nonsense-Mutationen könnten verschieden stabile verkürzte Proteine zur Folge haben. Das wird durch Beobachtungen nahegelegt, die zeigen dass die Länge des verbleibenden p53-Proteins einen Einfluss auf die Prognose haben kann (Ozcelik *et al.* 2007). Zusätzlich können indirekt auch weitere Deregulationen von p53 detektiert werden, die durch andere Veränderungen im Signalweg verursacht werden, wie sie zahlreich von Soussi und Bérout (2001) gelistet wurden. Mittels dieser immunhistochemischen Färbung können also sehr verschiedene Deregulationen detektiert werden. Trotz Limitationen bei der Identifikation der genauen p53-Veränderung stellt die immunhistochemische Detektion von p53 daher ein verbreitetes Kriterium bei der Einschätzung der Tumor-Aggressivität durch Pathologen dar, das schon lange verwendet wird (Dowell *et al.* 1994). Studien zeigen darüber hinaus einen Zusammenhang hoher p53-Expression mit einer verkürzten Zeitspanne bis zur Progression (Molina *et al.* 1998; Montero *et al.* 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwar keine Untersuchungen der mechanistischen Hintergründe des Einflusses der Tumorzellen auf die p53-Antwort der TAF durchgeführt. Eine begrenzte Zahl von Veröffentlichungen gibt jedoch Hinweise auf mögliche funktionelle Ursachen. So zeigten Bar *et al.* (2009) anhand von Experimenten mit H1299-konditioniertem Medium, dass die Hemmung der p53-Induktion der Fibroblasten durch sekretierte Faktoren vermittelt wird. H1299 ist eine Lungentumor-Zelllinie mit p53-null-Phänotyp und würde im Gewebe zur Gruppe 3 gezählt, also ein Tumor, der keine p53-Stabilisierung zeigt. Im hier analysierten Kollektiv zeigen in dieser Gruppe weder Tumorzellen noch TAF eine positive Färbung für p53, was mit dem Ergebnis von Bar *et al.* (2009) übereinstimmt. Normale Lungenzellen zeigten bei diesen Kokultur-Experimenten diesen Effekt nicht und TAF reagierten besser als NAF (Bar *et al.* 2009). Das heißt einerseits sekretieren die Tumorzellen ein verändertes Signal, beispielsweise in Form von Wachstumsfaktoren, und andererseits wurden die TAF sensitiver für diese Signale, was auf eine Art Koevolution hindeutet. Ähnliche Untersuchungen mit Zelllinien, die p53 normal stabilisieren oder konstitutiv hoch exprimieren und damit den Tumoren der Gruppen 1 und 2 entsprächen wurden bisher nicht veröffentlicht.

Neben parakrinen Signalen der Tumorzellen für die TAF ist ein möglicher die TAF auch *in vivo* beeinflussender Mechanismus die Aufnahme von Tumor-DNA-Bruchstücken (Holmgren *et al.* 1999; Ehnfors *et al.* 2009), die auch ohne chemotherapeutische Behandlung nachgewiesen wurde. Die Aufnahme von DNA-Bruchstücken aktiviert p53 in den Fibroblasten, so dass diese nicht mehr proliferieren und kein neuer Klon entsteht. Dies führt das zu einer Hemmung des Tumorwachstums. Die aufgenommene DNA kann aber auch propagiert werden, wenn sie einen Selektionsvorteil vermittelt und die Zielzellen p53-negativ sind. Es wurden sowohl vollständige Chromosomen als auch fusionierte Chromosomen identifiziert, somit kann eine große Anzahl von Genen übertragen werden

(Bergsmedh *et al.* 2001). Dabei wurde auch die Aufnahme und Expression von Onkogenen bestätigt, beispielsweise von *EBNA1* des Epstein-Barr-Virus (Holmgren *et al.* 1999), *Harvey rat sarcoma virus oncogene (HRAS)*, *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-MYC)* (Bergsmedh *et al.* 2001), *SV40 large T antigen* (Ehnfors *et al.* 2009) oder *transforming protein (E6)* des humanen Papillomavirus (Gaiffe *et al.* 2012). Da Onkogene häufig in die p53-Regulation eingreifen, könnte dieser auch *in vivo* beschriebene Prozess die Beobachtung der verminderten p53-Stabilisierung in TAF erklären. Dasselbe Ergebnis könnte auch durch eine Selektion von Fibroblasten entstehen, die p53 aufgrund anderer, unbekannter Mechanismen bereits vorher niedrig exprimierten. Dass die verminderte p53-Antwort der TAF zumindest zum Teil genetisch oder epigenetisch reguliert ist, zeigen Experimente, nach denen aus Maustumoren isolierte TAF auch in Kultur weiter reduzierte p53-Expression und -Aktivierung zeigen (Dudley *et al.* 2008).

Unabhängig von diesen möglichen Mechanismen gibt es mehrere Hinweise aus unterschiedlichen Entitäten, dass es für das Tumorstadium vorteilhaft ist, wenn die TAF kein p53 aktivieren. Kiaris *et al.* (2005) zeigten, dass Koimplantate mit p53-mutierten Fibroblasten im Vergleich zu p53-Wildtyp-Fibroblasten in Mäusen aggressivere Tumore bilden. Trimis *et al.* (2008) zeigten, dass Gleiches für p21 gilt und dass p21 darüber hinaus im Stroma später Brusttumore gering exprimiert ist. Ein möglicher Mechanismus für diese Tumorstadium durch Wildtyp-p53-Stroma ist die *prosaposin* (PSAP)-Expression. Diese führt mittels einer *thrombospondin-1* (THBS1)-Expression durch Fibroblasten zu einer reduzierten Metastasierung (Kang *et al.* 2009).

Es gibt also mehrere Hinweise auf den Mechanismus und den Nutzen einer p53-Deregulation von TAF. Andererseits wurde auch gezeigt, dass die hier mittels Cisplatin-Behandlung identifizierte p53-Inaktivierung der TAF sich bei einer chemotherapeutischen Behandlung als Nachteil für den Tumor herausstellen kann. So lange der Tumor unbehandelt bleibt, wächst er besser wenn die TAF kein p53 stabilisieren. Doch bei einer Behandlung kann sich das als Schwachpunkt erweisen und die Tumorzellen gegenüber der Behandlung sensitivieren. Während normal p53-induzierende Fibroblasten seneszent werden und auf diese Weise die Tumorzellen schützen könnten (Lafkas *et al.* 2008), würden TAF mit p53-Deregulation die Tumorzell-Schädigung nicht vermindern. In den hier untersuchten Gewebeschnitten ist das Ergebnis eher umgekehrt. Die Tumore aus Gruppe 2 und 3 zeigen tendenziell eine geringere TUNEL-Färbung der Tumorzellen als die der Gruppe 1, das heißt ein geringeres Tumorzell-tod-Niveau in Tumoren mit einer p53-Deregulation der TAF. Dies lässt sich aber möglicherweise auf den Mechanismus der Tumorschädigung zurückführen. Besonders wenn auch das Endothel p53-negativ war, konnten die Tumorzellen bei einer Behandlung durch Nekrose stark geschädigt werden (Browder *et al.* 2000). Im *Slice* spielt ein funktionsfähiges Gefäßsystem wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle für das Überleben der Zellen, da Nährstoffe und auch große Moleküle durch Diffusion alle Zellen erreichen können (van der Kuip *et al.* 2006). Zwischen den verschiedenen Tumorgruppen (1-3) mit unterschiedlicher Cisplatin-

induzierter p53-Stabilisierung konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der funktionellen Parameter wie Proliferation und Zelltod von TAF und Tumorzellen identifiziert werden. Interessanterweise ist die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Korrelation des Zelltods von TAF und Tumorzellen in Tumoren der Gruppe 2 besonders stark und hochsignifikant (Gruppe 1 $r=0,46$, $p=0,054$; Gruppe 2 $r=0,8$, $p=0,002$; Gruppe 3 $r=0,65$, $p=0,029$). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die p53-Deregulation von TAF und Tumorzellen in Tumoren der Gruppe 2 indirekt auch auf die Zelltod-Regulation der beiden Kompartimente wirkt. Eine Korrelation des funktionellen Status von p53 mit der Progression der Erkrankung oder dem Überleben der Patienten, die auch vom Zelltod beider Zelltypen abhängig sind, war im vorliegenden kleinen Kollektiv nicht möglich, da die Patienten mit unterschiedlichen Chemotherapie-Schemata behandelt wurden.

Neben den neuen Ergebnissen der p53-Färbungen zeigte sich das bekannte Muster, dass nie alle Tumorzellen und TAF im Gewebeschnitt p53-positiv sind, weder in unbehandelten Schnitten noch nach Cisplatin-Behandlung. Eine mögliche Erklärung sind Subpopulationen von Tumorzellen mit unterschiedlichen Mutationsmustern. Eine weitere Möglichkeit ist eine unterschiedliche Stabilität von p53 in Abhängigkeit von weiteren Faktoren in einzelnen Zellen. So wird auch im p53R175H *knock in*-Mausmodell, in dem alle Zellen heterozygot mutiertes *tp53* codieren, das p53-Protein nicht in allen Tumorzellen detektiert (entspricht beim Mensch R172H, Lang *et al.* 2004). Darüber hinaus ist p53 in den entsprechenden Mausfibroblasten nicht stabil, die Detektion der p53R175H-Mutante hängt also auch vom Zelltyp ab.

Positive immunhistochemische Färbungen für p53 werden häufig mit aktivierenden Mutationen von *tp53* gleichgesetzt. Casey *et al.* (1996) zeigte auch ein hohes Maß an Übereinstimmung von Aminosäure-Substitutions-Mutationen und p53-positiver Färbung, unter anderem in Lungentumoren. Für andere Typen von *tp53*-Mutationen gilt dies jedoch nicht. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit auch die *tp53*-Sequenzen der Tumore analysiert, die für die oben beschriebene immunhistochemische p53-Detektion verwendet wurden. Soussi und Bérout (2001) betonen die Vorteile der Sequenzierung gegenüber der Immunhistochemie aufgrund fehlender Antikörper für die große Anzahl möglicher unterschiedlicher Mutationen. Außerdem könnten nur mit der Sequenzierung *frameshift*- und *nonsense*-Mutationen identifiziert werden, die 11,3 % und 7,5 % aller Mutationen ausmachten. Mit der hier vorgenommenen Einschränkung auf die Exons 4-10 wurden nur circa 0,3 % der *tp53*-Mutationen, die in Exon 3 von anderen Gruppen identifiziert wurden, nicht untersucht, so dass die vorliegende Mutationsanalyse möglichst umfassend ist.

Da alle 57 untersuchten TAF aus Lungentumoren *tp53*-Wildtyp waren und keine Mutationen detektiert wurden, wurde mit der Annahme gearbeitet, dass alle TAF Wildtyp-*tp53* codieren, auch wenn TAF aus den Slices einzelner Patienten nicht kultiviert und einzeln sequenziert werden konnten. Auch die Zusammenfassung von Polyak *et al.* (2009) und Ergebnisse von Navab *et al.* (2011) legen nahe, dass TAF in Lungentumoren in der Regel

keine *tp53*-Mutationen aufweisen. Bei der Sequenzierung wurde zusätzlich auf die Verwendung von Gewebe aus der Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses geachtet, das einen hohen Anteil an Tumorzellen enthält.

Insgesamt wurden 47 Tumore sequenziert. Dabei wurden zahlreiche, auch im Vergleich mit Metaanalysen und Mutationsdatenbanken bekannte Mutationen gefunden, die den Tumorzellen zuzuordnen sind (Tammemagi *et al.* 1999; Lim *et al.* 2007¹, Petitjean *et al.* 2007²). Die Häufigkeit und das Spektrum der Mutationen stimmt dabei weitestgehend mit publizierten Mustern überein. Beispielsweise ähnelt die Häufung der Mutationen in den Exons fünf bis neun, die die DNA-Bindedomäne von p53 betreffen, der aus bisher veröffentlichten Studien (Soussi und Bérout 2001, *online table 1*). Zusätzlich findet sich eine deutliche Häufung von Deletionen im Exon 9, die das nukleäre Lokalisierungssignal oder die Oligomerisierungsdomäne betreffen könnten. Die Häufigkeit von Stop-Mutationen entspricht mit 6,3 % der Mutationen in etwa der Erwartung von 7,5 % (Petitjean *et al.* 2007²), obwohl sie im Vergleich zu anderen Aminosäure-Substitutionen im untersuchten Kollektiv häufiger vorkommen als erwartet. Außerdem sind *missense*-Mutationen im hier untersuchten Patienten-Kollektiv vielfach häufiger als größere Deletionen, was der Datenbank-Datenlage entspricht (Petitjean *et al.* 2007). Dieser Vergleich wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass in 40 % der Studien in den p53-Datenbanken nur die Exons fünf bis acht analysiert wurden (Soussi und Bérout 2001). Im hier vorliegenden Kollektiv liegen jedoch 34 % der Mutationen in den Exons vier und neun, so dass die Verhältnisse von Missense- zu Deletions-Mutationen zwischen diesem Kollektiv (19:7 = 2,7) und der Datenbank² (1403:68 = 20,6) erklärbar abweichen.

Für verschiedene *tp53*-Mutationen sind unterschiedliche funktionelle Auswirkungen publiziert und zusammengefasst worden. Da jedes Experiment eine bestimmte Frage verfolgt, kann die folgende Aufzählung nicht vollständig sein. Für viele Mutationen wurden bestimmte Fragen schlicht nicht untersucht. Trotzdem ist nach eigener Auswertung der IARC-TP53-Datenbank² für 14 Aminosäure-Substitutions-Mutanten des vorliegenden Kollektivs bekannt, dass 15mal Funktionsverlust, 8mal Funktionsgewinn und 9mal dominant negative Effekte in unterschiedlichen Experimenten mit Hefen und Zelllinien beobachtet wurden.

Eine Art von Funktionsgewinn ist die dauerhafte Stabilität des p53-Proteins, wie sie durch die immunhistochemische Färbung nachgewiesen wurde, ein Funktionsverlust kann beispielsweise bei einer fehlenden Stabilisierung nach Cisplatin-Behandlung vorliegen. Daher stellte sich die Frage, wie sich die gefundenen Mutationen zu den unterschiedlichen Immunhistochemie-Gruppen zuordnen lassen. Dabei ergab sich, dass Tumore der Gruppe 1 häufiger Wildtyp-*tp53*-Status haben als die Tumore der Gruppe 2. Manche Mutationen verändern die Expression und Stabilisierung von p53 also nicht (Gruppe 1) und umgekehrt kann eine veränderte Regulation der Stabilisierung bei Cisplatin-Behandlung

¹p53.bii.a-star.edu.sg

²www-p53.iarc.fr/

auch unabhängig von einer *tp53*-Mutation auftreten (Gruppe 2 und 3). Das Vorkommen von zahlreichen mutiertem *tp53* in Tumoren der Gruppe 1 und von vereinzelt Wildtyp-*tp53* in Tumoren der Gruppe 2 entspricht tendenziell der in Lungentumoren gefundenen niedrigen Übereinstimmung von Mutation und Überexpression von p53 (Hashimoto *et al.* 1999). Eine mögliche Ursache dafür kann sein, dass nicht detektierbares p53 sowohl durch eine Mutation (*missense*, *nonsense*, teilweise oder komplette Deletion) als auch durch eine andere Deregulation in der p53-Aktivierung oder der DNA-Schadens-Erkennung bei Wildtyp-*tp53* verursacht werden kann. p53 ist eins von vielen Proteinen in einem Netzwerk aus Signalketten, das die Regulation der Wachstumskontrolle nach einem Stress-Signal wie DNA-Schaden abstimmt. In Tumoren wurden mehrere weitere Netzwerk-Proteine mit Veränderungen identifiziert, beispielsweise *CHEK2 checkpoint kinase 2* (CHEK2), *Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog* (MDM2), *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A, p14^{ARF}) und *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) (Soussi und Bérout 2001), deren Funktionalität in jedem der hier untersuchten Tumore unbekannt ist und einen Einfluss auf das p53-Niveau von Tumorzellen und TAF haben könnte. Für Tumore der Gruppen 1 und 2 gibt es bereits veröffentlichte Hinweise, welche Deregulationen zu p53-Stabilisierung trotz *tp53*-Mutation oder konstitutiv hoher Expression ohne *tp53*-Mutation führen könnten:

Alle drei Tumore mit Stop-Mutationen wurden immunhistochemisch der Gruppe 1 zugeordnet, mit Tumorzellen, die unbehandelt keine p53-Färbung zeigen und bei Cisplatin-Behandlung p53 stabilisieren. Auch Hashimoto *et al.* (1999) sahen in der Regel keine konstitutive p53-Expression bei den Null-Mutanten, das Stroma oder der Effekt einer Behandlung wurden bei dieser Publikation aber nicht betrachtet. Alle drei Tumore reagierten außerdem auf Cisplatin mit einer Induktion von Zelltod auf das 1,5-2fache der Kontrolle, was ein Hinweis auf funktionelles p53 sein könnte. Die Sequenz-Chromatogramme dieser drei Fälle zeigen neben der Mutation auch ein Wildtyp-Signal. Ob dieses jedoch von den Tumorzellen oder möglichen Stromazellen stammt konnte hier nicht geklärt werden. Damit kann auch keine Aussage über die Stabilität der verkürzten p53-Proteine und eine mögliche oder fehlende dominant-negative Wirkung auf das vollständige Protein getroffen werden.

Eine mögliche Ursache für eine erhöhte p53-Expression unbehandelter *tp53*-Wildtyp-Tumore wie in Gruppe 2 wurde von DiTullio *et al.* (2002) beschrieben. In der Mehrzahl der untersuchten Lungentumore wurde konstitutiv aktive *checkpoint kinase 2* (CHEK2) beschrieben, also ein konstitutiv aktiver DNA-Schaden-Signalweg. CHEK2 kann p53 phosphorylieren und so zur Proteinstabilität beitragen. Die konstitutiv hohe Expression könnte auch durch einen anderen Stressfaktor ausgelöst sein, im Patienten zum Beispiel aufgrund einer Entzündung. Dagegen spricht, dass eine hohe Wildtyp-*tp53*-Expression dann in fast allen Lungentumoren zu erwarten wäre, denn die Erkrankung wird sehr häufig von entzündlichen Prozessen begleitet. Nach der Operation sollten die Transportbedingungen zusätzliche Ursachen für Stress einschränken.

Wird das untersuchte Tumorkollektiv nach Mutations- und Expressionsstatus gruppiert, so bleibt der in der vorliegenden Arbeit identifizierte Einfluss der Tumorzellen auf die Stabilisierung von p53 in TAF, also der Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2, auch bei mutiertem *tp53* erhalten. Das stimmt mit früheren Publikationen überein, nach denen nur der p53-Expressions-Status für (progressionsfreies) Überleben wichtig war und nicht der Mutationsstatus, sowohl bei unbehandelten Patienten mit Stadium II Brusttumoren als auch bei einer Cisplatin-Behandlung von NSCLC-Patienten (Bhatavdekar *et al.* 2000; Huang *et al.* 2004). Bei Wildtyp-*tp53* ist die Anzahl der Fälle in Gruppe 2 für eine Bewertung nicht ausreichend.

Die gefundenen Mutationen haben keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen in den Gewebeschnitten oder auf den Zelltod der Tumorzellen und benachbarten TAF bei einer Cisplatin-Behandlung. Da unterschiedliche Mutationen aber sehr verschiedene Auswirkungen auf die Zellen haben können und der vorliegenden Arbeit viele andere Studien mit ähnlicher Fragestellung vorausgingen (Übersichtsartikel Soussi und Bérout 2001 und Meta-Analysen Huncharek *et al.* 2000; Mitsudomi *et al.* 2000), wäre ein so einfacher Zusammenhang auch überraschend. Auch in klinischen Studien gelangen mit wenigen Ausnahmen keine konsistenten Aussagen über eine Korrelation zwischen Mutationen und dem Überleben der Patienten (Soussi und Bérout 2001). Besonders bei einzelner Betrachtung der Publikationen fallen Unterschiede auf, beispielsweise widersprechen sich die Studien, in welchem Exon oder welcher Proteindomäne relevante Mutationen liegen, oder ob Null-Mutationen oder Aminosäure-Substitutionen eine schlechtere Prognose bedeuten (Vega *et al.* 1997; Huang *et al.* 1998; Hashimoto *et al.* 1999; Tomizawa *et al.* 1999; Skaug *et al.* 2000). Eine Ursache dafür kann die Inklusion unterschiedlicher Studienteilnehmer sein, beispielsweise in Abhängigkeit vom Stadium der Tumore. Meta-Analysen deuten bei Nicht-kleinzelligen Lungentumoren (NSCLC) trotzdem auf eine prognostische Signifikanz von *tp53*-Mutationen hin.

Insgesamt wird deutlich, dass Sequenzierung von *tp53* und immunhistochemische Analyse des p53-Proteins in den Lungentumoren verschiedene Aspekte beleuchten, die sich ergänzen und in einigen Fällen überlappen. Dabei wurde mit der immunhistochemischen Färbung von unbehandelten und Cisplatin-behandelten humanen Lungentumorgewebeschnitten der Einfluss des p53-Status der Tumorzellen auf die TAF in weitgehend intakter Mikroumgebung gezeigt. Der Zusammenhang zu *tp53*-Mutationen sowie der Reaktion in Bezug auf Proliferation und Zelltod ist aber nicht einfach zu verstehen, wahrscheinlich weil sich sehr viele Parameter auf diese Prozesse auswirken (Oliner *et al.* 1992; Crook *et al.* 1992; Moll *et al.* 1995; Soengas *et al.* 2001).

6.3. Wirkung einer pharmakologischen Modulation der Tumor-assoziierten Fibroblasten mit Dasatinib in Kombination mit Cisplatin

Eine Heilung von Tumorerkrankungen durch eine Chemotherapie oder Inhibitoren mit nur einem Medikament hat sich als fast unmöglich herausgestellt. Bei Lungentumoren ist selbst die Lebensverlängerung nur gering. Daher werden immer neue kombinierte Therapien erforscht. Dabei mit einem der Medikamente genetisch stabile Stromazellen so zu verändern, dass sie die Tumorzellen nicht mehr fördern oder schützen, ist eine Option mit großer Anziehungskraft: Die Zellen im Tumor zu schwächen, die in der Regel nicht durch Mutationen Resistenz erhalten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dasatinib die TAF auf molekularer und funktioneller Ebene so verändert, dass sie wieder normalen Fibroblasten ähneln und Johnson *et al.* (2010) zeigten bei einer Dasatinib-Monotherapie eine Verzögerung der Progression in vier Patienten. Daher wurde auch der Einfluss einer kombinierten Behandlung mit verschiedenen klinisch zugelassenen PDGFR-Inhibitoren und Cisplatin vergleichend untersucht. Cisplatin ist bei Lungentumoren eine zentrale Komponente der Chemotherapie (Ceppi *et al.* 2009), und verbessert allein oder in Kombination mit gezielten Therapien das Überleben in fast allen Erkrankungsstadien. Dabei existiert eine sensible Balance zwischen Wirkung und Toxizität, weshalb eine Verringerung der Nebenwirkungen wünschenswert wäre, beispielsweise durch eine mögliche Dosisreduzierung in der Kombinationstherapie. Es wurden MTT-Experimente mit konstanter Inhibitor-Konzentration und steigenden Cisplatin-Konzentrationen an kultivierten TAF durchgeführt. Ergänzend wurde der Effekt von Dasatinib auf die Cisplatin-Sensitivität in Kokultur-Experimenten und Gewebeschnitten untersucht.

Bei den MTT-Experimenten wurden die TAF gleichzeitig mit PDGFR-Inhibitoren und Cisplatin behandelt. Anhand der sigmoidalen Kurvenform zeigt sich dabei ein starker Effekt von Cisplatin. Damit waren die Voraussetzungen gegeben, die zusätzliche Wirkung der Inhibitoren anhand der TAF-Viabilität bei C_{\max} und der GI_{50} -Konzentration zu vergleichen. Die maximale Viabilität für Cisplatin-unbehandelte TAF betrug für die Dasatinib-Kontrolle circa 75-80 % der unbehandelten Kontrolle. Regelmäßig überschritten sich die Hemmkurven im Bereich der größten Steigung. Für beide Vergleiche wurde daher die maximale Viabilität auf 100 % normiert. Es zeigte sich, dass Dasatinib und Imatinib die Cisplatin-Sensitivität der TAF um circa 20 % vermindern. Die Steigerung der Resistenz der TAF gegen Cisplatin war ursprünglich nicht das Ziel dieser Versuche. Doch es kann vermutet werden, dass die Hemmung der Proliferation durch Kinase-Inhibitoren hier die Zellen vor Cisplatin-Addukten schützt, die besonders proliferierende Zellen schädigen, so dass die relative Viabilität erhöht wird.

Ob der beobachtete schützende Effekt einen positiven oder negativen Einfluss auf Tumorzellen hat, ist für eine mögliche kombinierte Therapie in Patienten von großer Bedeutung.

Bisher gibt es jedoch keine klinischen Studien, die darüber Aufschluss geben könnten. Aber eigene MTT-Experimente wiesen darauf hin, dass keine der untersuchten Tumorzelllinien vollständig resistent gegen Dasatinib war. Und auch MTT-Versuche von Ceppi *et al.* (2009) legen nahe, dass H1299 auf eine Kombination aus Cisplatin und Dasatinib sensitiver reagieren als auf Cisplatin allein. Dasatinib verhinderte in dieser Studie außerdem die Cisplatin-induzierte mRNA-Expression von DNA-Reparaturgenen, die bei der Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden von Bedeutung sind. Daher wurde die Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und dem vielversprechenden, den TAF-Phänotyp modulierenden Dasatinib auch in Kokultur- und Gewebekultur-Experimenten untersucht. Bei den Kokultur-Experimenten zeigt sich nur ein äußerst schwacher Effekt von Dasatinib zusätzlich zu Cisplatin, der aufgrund der hohen Standardabweichung in den Monokultur-Kontrollen nicht bewertet werden kann. Immerhin werden die TAF und H1299-Tumorzellen nicht offensichtlich durch Dasatinib vor Cisplatin-induziertem Zelltod geschützt. Bei Ceppi *et al.* (2009) zeigten im MTT-Experiment die meisten Zelllinien eine erhöhte Cisplatin-Sensitivität bei einer Kombination mit Dasatinib. Auch beim Zelltod schien dort eine Halbierung der Cisplatin-Dosis bei gleicher Wirksamkeit möglich, wobei die halbierte Dosis im therapeutischen Bereich lag. Die Unterschiede zu der unveränderten H1299-Sensitivität in Kokultur in der vorliegenden Arbeit könnten auf Wirkungen der TAF auf die Tumorzellen verursacht sein. Sie könnten aber auch in einer doppelt so langen Behandlungsdauer bei Ceppi *et al.* (2009) begründet sein.

Die Auswirkungen einer kombinierten Dasatinib-Cisplatin-Behandlung wurden auch im Frischgewebeschnitt-Modell an humanen Lungentumoren im Vergleich zur Cisplatin-Mono-Behandlung untersucht. In den Gewebeschnitten von 11 Patienten ergibt sich weder für Tumorzellen noch für die TAF ein einheitliches Bild. Im Mittel wurden keine signifikanten Veränderungen von Zelltod oder Proliferation von TAF und Tumorzellen detektiert. Außerdem reagieren die zwei Zelltypen auf die Zugabe von Dasatinib im gleichen Tumor teilweise in entgegengesetzte Richtungen mit Induktion oder Hemmung von Zelltod.

Nur die TAF aus wenigen Tumoren zeigten den zuvor bei den MTT-Experimenten beobachteten Schutz der Zellen vor Cisplatin bei einer zusätzlichen Dasatinib-Behandlung. Verringerter Zelltod wurde bei drei TAF beobachtet, aufgrund des geringen Anteils KI67-positiver TAF kann über die Proliferation keine Aussage getroffen werden. Im Gegensatz dazu wurde bei vier TAF der Zelltod durch die Zugabe von Dasatinib mindestens verdoppelt.

Auch Tumorzellen können durch Dasatinib-Zugabe wie die TAF vor Cisplatin-induziertem Zelltod geschützt werden oder zusätzlich eine erhöhte Proliferation zeigen. Die Tumorzellen aus drei Tumoren reagierten mit verringertem Zelltod und bei zwei Tumoren wurde erhöhte Proliferation beobachtet. Hervorzuheben sind jedoch drei Tumore, bei denen die Kombination von Dasatinib mit Cisplatin den entgegengesetzten und aus den MTT-Experimenten nicht zu erwartenden Effekt bewirkte. In diesen drei Tu-

moren wurde der Zelltod der Tumorzellen durch Dasatinib im Vergleich zur Cisplatin-Behandlung verdoppelt, wobei die TAF parallel mit einer Induktion von Zelltod reagierten. Darüber hinaus zeigte auch einer von fünf Tumoren eine deutliche Reduktion der Proliferation der Tumorzellen bei einer Zugabe von Dasatinib zur Cisplatin-Behandlung. Insgesamt ergab sich schon mit nur 11 Patienten der Trend für eine Korrelation von Zelltod von TAF und Tumorzellen. Dabei wurde häufiger eine erhöhte Cisplatin-Sensitivität von TAF und Tumorzellen beobachtet als die vorher im MTT-Experiment beobachtete niedrigere Cisplatin-Sensitivität. Im Gewebe ist die Reaktion der Kompartimente demnach heterogener als im MTT-Experiment, was zusammen mit einer möglichen Korrelation des Zelltods der zwei Kompartimente wieder auf eine gemeinsame Regulation der Cisplatin-Antwort von TAF und Tumorzellen hindeutet.

Ein Effekt, der eine Bedeutung für die Wirkungsweise der Kombination von Cisplatin und Dasatinib haben könnte, wurde von Zalmas *et al.* (2008) beschrieben. Die Autoren beobachteten ein erhöhtes Expressionsniveau der Transkriptionsfaktoren *E2F7* und *8* bei einer DNA-schädigenden Behandlung. Die erhöhte Expression der E2Fs führte zur Aktivierung der DNA-Reparatur, welche die Apoptose bei einer Zytostatika-Therapie verhindern könnte. Bei einer zusätzlichen Behandlung mit Dasatinib könnte dieser Effekt vermieden werden, wenn der Inhibitor die Induktion der E2Fs verringern oder verhindern würde, wie es die *Microarray*-Ergebnisse von Dasatinib-behandelten TAF nahe legen.

In vivo könnten PDGFR-Inhibitoren auch über einen weiteren Weg wirken. Im Maus- und Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit PDGFR-Antagonisten den erhöhten Flüssigkeitsdruck im Gewebe senkt und so zwei Chemotherapeutika besser aufgenommen werden und wirksamer sind (Pietras *et al.* 2001, 2002). In den zwei Modellen exprimierten die Tumorzellen jedoch keinen PDGFR, was auf Lungentumore nicht prinzipiell übertragbar ist. So zeigte beispielsweise Donnem *et al.* (2008), dass PDGFR-Expression durch Lungentumorzellen mit einer negativen Prognose korreliert ist. Hier könnte die PDGFR-Hemmung mit Dasatinib also erfolgversprechend sein, wenn das Wachstum oder Überleben der Tumorzellen zumindest teilweise von diesem Signalweg abhängig wäre. Tsao *et al.* (2011) fand in einer Phase II-Studie hingegen heraus, dass Tumorzell-PDGFRB-Expression sich bei der Kombination von Imatinib mit Docetaxel negativ auswirkt, wobei die Wirkmechanismen von Docetaxel und Cisplatin nicht vergleichbar sind und für Cisplatin keine ähnlichen Untersuchungen veröffentlicht wurden. Die Realität ist also komplizierter, als die Maus-Modelle vermuten ließen. Damit spiegelt das Gewebeschnitt-Modell die Realität unter Umständen besser wieder als vorhandene Tiermodelle und kann damit auch die Richtung für die Entwicklung neuer Maus-Modelle weisen.

6.4. Unterschiede zwischen Normalgewebe-assoziierten und Tumor-assoziierten Fibroblasten

Eine grundlegende Frage bei der Arbeit mit Tumor-assoziierten Fibroblasten ist diejenige nach der Unterscheidung zu Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten. Das ist sowohl für das Verständnis und die Unterscheidung von TAF und NAF wichtig als auch für die Beurteilung der pharmakologischen Modulation des TAF-Phänotyps hin zu einem NAF-ähnlicheren Phänotyp. Für Brustfibroblasten gibt es zahlreiche Veröffentlichungen über funktionelle und molekulare Veränderungen der TAF im Vergleich zu normalem Gewebe (Allinen *et al.* 2004; Hawsawi *et al.* 2008; Sadlonova *et al.* 2009). Für Lungenkarzinome lagen solche Daten zu Beginn der hier vorgestellten Untersuchungen nicht vor. Dass es Unterschiede zwischen Fibroblasten aus verschiedenen Geweben gibt, ist etabliert (Chang *et al.* 2002). Die Daten aus den Brust-Fibroblasten können deshalb nicht *per se* auf Lungen-Fibroblasten übertragen werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit molekulare und funktionelle Unterschiede zwischen TAF und NAF aus Lungengewebe untersucht.

Die Genexpressionsanalysen besonders aus Brustgeweben (Sadlonova *et al.* 2009) motivierten hier die *Microarray*-Analysen von TAF-NAF-Paaren aus zwei Patienten. Dabei konnten für diese Paare aber nur wenige und geringe Unterschiede der basalen Genexpression identifiziert werden. Diese geringen Unterschiede entsprechen aber zum Teil den Veränderungen, die durch Dasatinib ausgelöst werden und in der „Dasatinib Response Signatur“ enthalten sind. Dies ist ein weiterer Hinweis für die These, dass Dasatinib den TAF-Phänotyp normalisiert. Auch die qRT-PCR-basierte Analyse der Expression von *HIPK2* und *CDKN1A*, für die es Hinweise auf Unterschiede zwischen TAF und NAF gab (Neta Moskovits, *Weizmann Institute of Science*, persönliche Mitteilung), zeigte im vorliegenden Kollektiv von 11 beziehungsweise 9 Paaren sowie bei den *Microarrays* keine signifikanten Unterschiede. In Übereinstimmung damit konnten auch keine basalen Unterschiede bei der Zellteilungsdauer, dem Zelltod und der Proliferationsanalyse gefunden werden. Der einzige beobachtete, aber nicht systematisch dokumentierte Unterschied war das frühe Einsetzen seneszenten Prozesse der NAF und die damit verbundene kürzere Passagierbarkeit im Vergleich zu den TAF.

Eine Ursache für die geringen Unterschiede kann in der Gewinnung der Gewebe liegen, falls die NAF aus Gewebe stammen, das relativ nah bei einem Tumor lag. Der Abstand zum Tumor wurde bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geweben nicht dokumentiert und ist damit nicht nachvollziehbar. Eine wahrscheinlichere Ursache ist ein Einfluss der Kulturbedingungen. So wurden NAF wie TAF in Medium mit 20 % FBS kultiviert, was diese Fibroblasten aktivieren könnte wie der Serumkontakt bei der Wundheilung (Chang *et al.* 2004). Als dritte Möglichkeit ist in Betracht zu ziehen, dass die Unterschiede zwischen TAF und NAF aus Lungengewebe real sehr gering sind. Kopelovich (1982) und Schor *et al.* (1986) zeigten schon früh, dass schon die Hautfibroblasten

von Patienten mit einer Tumor-Prädisposition und auch die von erkrankten Personen *in vitro* eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen (Kalluri und Zeisberg 2006). So könnten die fehlenden Proliferationsunterschiede zwischen TAF und NAF damit erklärt werden, dass auch NAF keine normalen Fibroblasten mehr sind. Dass NAF durch die Nähe zum Tumor beeinflusst werden wurde bereits gezeigt (Hawsawi *et al.* 2008), wobei der Unterschied zwischen Lungen-NAF und normalen primären Lungen-Fibroblasten bisher nicht im Detail untersucht wurde. Die Ergebnisse von Navab *et al.* (2011) deuten darauf hin, dass aufgrund der hohen Variabilität zwischen verschiedenen Patienten eine große Stichprobe nötig ist, um Unterschiede zu identifizieren. Zwischen diesen Lungen-TAF und -NAF wurden dabei nur 46 differenziell exprimierte Transkripte gefunden. Andererseits zeigen Ergebnisse von Genexpressionsanalysen aus Brusttumoren, dass dort alle Zelltypen eine veränderte Genexpression aufweisen (Allinen *et al.* 2004), was in anderen Tumorentitäten prinzipiell auch zu erwarten wäre. Eine höhere Anzahl von TAF-NAF-Paaren wäre aber aufgrund der Anwendbarkeit statistischer Analysen in jedem Fall wünschenswert.

Bei einer medikamentösen Therapie sind die basalen Unterschiede zwischen TAF und NAF zweitrangig, es zählt ob die Tumore stärker geschädigt werden als das Normalgewebe, so dass der Patient eine möglichst wirksame und nebenwirkungsarme Behandlung erhält. Daher wurde mit einem TAF-NAF-Paar ein MTT-basierter *Screen* mit der *Prestwick Chemical Library*[®] durchgeführt. Diese umfasst mehr als 1000 unterschiedliche Medikamente aus verschiedensten Wirkstoffklassen. Damit könnten vielfältige Unterschiede der Reaktion von TAF und NAF auf die Beeinflussung unterschiedlichster zellulärer Ziele und Signalwege identifiziert werden. Obwohl die Zellen aus dem gleichen Patienten stammten, wiesen sie unterschiedliche Substanz-Sensitivitäten auf. Es konnten aber keine Medikamente gefunden werden, die die Viabilität der TAF stärker hemmen als die der NAF. Daher wurde im Folgenden auf die vielversprechenden PDGFR-Inhibitoren und das Standard-Chemotherapeutikum Cisplatin fokussiert. Dabei fanden sich wiederum mehr Gemeinsamkeiten von TAF und NAF und nur wenige Unterschiede bei Genexpressionsänderungen nach Dasatinib- oder Cisplatin-Behandlung.

Wenige funktionelle, aber potenziell bedeutende Unterschiede zwischen TAF und NAF wurden bei der Reaktion auf eine Cisplatin-Behandlung identifiziert. So findet der Proliferationsstopp der TAF im Vergleich zu den NAF verspätet statt, was den beobachteten Trend einer erhöhten Cisplatin-Resistenz der NAF im MTT-Experiment erklären könnte. Damit wären die NAF möglicherweise vor Cisplatin geschützt, indem die Proliferation zeitnah gestoppt würde und die DNA repariert werden könnte. In Studien mit aus Mautumoren isolierten TAF ist vergleichbar mit den hier vorliegenden Ergebnissen die Induktion von Zellzyklus-Arrest von TAF vermindert im Vergleich zu normalen Fibroblasten, was zu einer Verminderung der Apoptose bei Behandlung mit Zytostatika führte (Dudley *et al.* 2008). Eine mittel- oder längerdauernde Behandlung zur Aufklärung, ob die in dieser Arbeit beobachtete verzögerte Cisplatin-Antwort der TAF zu veränderter Apoptose oder Seneszenz führt, wurde allerdings nicht durchgeführt.

Um den Einfluss von Tumorzell-Wachstumsfaktoren auf die Cisplatin-Sensitivität der TAF und NAF zu untersuchen, wurden diese mit konditioniertem Medium der H1299-Zelllinie und Cisplatin behandelt. Hinweisen unserer Kooperationspartner vom *Weizmann Institute of Science* folgend, wurde die Expression der p53-Kinase HIPK2 untersucht. Dabei wurde ein entweder längerer und intensiverer oder nicht nur vorübergehender *HIPK2*-Expressionspeak identifiziert. Eine zeitliche Ausweitung dieser Versuche mit einer erhöhten Anzahl TAF-NAF-Paare könnte die Hypothese untermauern, dass die TAF auf die Wachstumsfaktoren aus den Tumorzellen sensitiv reagieren, die NAF hingegen nicht oder nur vorübergehend. Ein ähnliches Phänomen wurde von Bar *et al.* (2009) beobachtet. Dort waren TAF sensitiver auf konditioniertes Medium als NAF und zeigten eine stärkere Hemmung der Cisplatin-induzierten p53-Stabilisierung. Diese an sich ähnlichen Phänomene hätten funktionell verschiedene Auswirkungen: Eine erhöhte *HIPK2*-Expression der TAF wie hier beobachtet könnte zu einer stärkeren Phosphorylierung und Aktivierung von p53 führen, ein niedrigeres p53-Niveau hingegen könnte geringere Proteinaktivität bedeuten. Weder in der vorliegenden Arbeit noch bei Bar *et al.* (2009) wurde aber phosphoryliertes p53 oder funktionelle Aspekte vergleichend zwischen TAF und NAF untersucht.

TAF und NAF aus der Lunge des selben Patienten unterscheiden sich demnach bezüglich funktioneller und molekularer Parameter bei einer Cisplatin-Antwort nur geringfügig. Zwischen Fibroblasten verschiedener Patienten können deutlichere Unterschiede detektiert werden als zwischen TAF und NAF aus einem Patienten. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Ursache für die heterogene Cisplatin-Antwort der TAF patientenspezifisch ist.

Auch bei der Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und Kinase-Inhibitoren zeigen sich leichte Unterschiede zwischen TAF und NAF. Sie sind auf unterschiedliche Inhibitoren sensitiv, was bisher nicht beschrieben wurde. TAF werden bei einer zusätzlichen Behandlung mit Dasatinib oder Imatinib Cisplatin-resistenter, während NAF auf die Zugabe von Nilotinib mit einer erhöhten Cisplatin-Sensitivität reagieren. Diese Unterschiede sind insofern interessant, dass die genauere Analyse funktionell bedeutende Unterschiede zwischen TAF und NAF identifizieren könnte. Diese könnten die weitere Richtung weisen, auf welchem Weg die TAF so moduliert werden könnten, dass sie die Tumorzellen nicht mehr schützen, oder ihnen sogar schaden. Solche komplementären Strategien der Medikation - Behandlung mit Medikamenten, die Tumorzellen einerseits und TAF andererseits beeinflussen - sind eine vielversprechende Methode auf dem Weg zu individueller Tumorthherapie: Jedem Patienten die richtigen Medikamente für die beste Wirkung und die geringsten Nebenwirkungen.

7. Ausblick

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) und Tumorzellen sich gegenseitig beeinflussen und dass diese Wechselwirkungen auch die Reaktion auf eine Behandlung mit PDGFR-Inhibitoren und Cisplatin verändern. Der aktivierte Phänotyp der TAF kann mittels Dasatinib so moduliert werden, dass das Wachstum der Tumorzellen vermindert wird und diese sensitiver auf eine Behandlung reagieren können.

Der molekulare Einfluss einer pharmakologischen Modulation der TAF wurde weitestgehend auf RNA-Ebene untersucht. Ausgewählte Analysen auf Protein-Ebene sollten sich hier anschließen, beispielsweise die Expression und Aktivität von Wachstumsfaktoren und extrazellulären Proteasen betrachtet werden. Gleichzeitig sollte das Kollektiv der TAF erweitert werden, um die Analyse der interindividuellen Heterogenität auszubauen. Außerdem sollten funktionelle Experimente den Einfluss einzelner Faktoren untersuchen und die bekannten Einflüsse in Modellsystemen, die die Komplexität von Tumorgewebe und umgebenden Normalgewebe möglichst gut abbilden, bestätigt werden. Ein Schwerpunkt sollte hier die Identifizierung von Markern für die Wirksamkeit einer Dasatinib-Behandlung sein.

Der Einfluss der Tumorzellen auf die Cisplatin-induzierte p53-Stabilisierung der TAF in humanen Lungentumoren ist vom p53-Status der Tumorzellen abhängig. Hier sollten einerseits die Signalwege *downstream* von p53 in Tumorgewebe-Schnitten vertiefend untersucht werden, wobei ein größeres Kollektiv Subgruppen-Analysen erleichtern würde. Andererseits sollten die Erkenntnisse in vereinfachten Modellen detaillierter erforscht werden, um den Mechanismus, die Auswirkungen und die Relevanz bei einer Cisplatin-Therapie zu verstehen. Hierfür ist eine Kombination aus Experimenten mit konditioniertem Medium und dem hier etablierten Kokultur-System geeignet. Beide Modelle könnten verwendet werden, um mittels unterschiedlicher Tumorzelllinien den Einfluss des p53-Status dieser Zellen gezielt zu untersuchen und die drei immunhistologisch definierten Tumorgruppen zu simulieren. Darüber hinaus kann die Auswertung zusätzlicher Parameter dank neuer Detektionsmethoden die Zusammenführung der Ergebnisse unterschiedlicher Modelle erleichtern. Das so entwickelte Verständnis für die Wechselwirkungen von TAF und Tumorzellen könnte auch zu neuen Therapieansätzen und patientenspezifischen Markern für deren Wirksamkeit führen.

Die Kombinationsbehandlung mit Dasatinib und Cisplatin zeigte individuelle und teils entgegengesetzte Wirkungen auf die Zellen im Gewebe humaner Lungentumore. Die erhebliche Zelltod-Induktion in mehreren Tumoren könnte für eine möglichen Therapieansatz vielversprechend sein. Daher wäre auch hier die Markersuche zur Selektion von Patienten, die von dieser Behandlung profitieren könnten, von Bedeutung. Darüber hinaus sollte auch die Kombination von Dasatinib mit anderen etablierten Therapeutika untersucht werden.

Das Verständnis der Unterschiede zwischen TAF und Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten (NAF) ist von zentraler Bedeutung für die Identifizierung molekularer Zielstrukturen für eine Antitumor-Therapie. Daher sollte ein Fokus auf der Aufklärung solcher Unterschiede auf epigenetischer, RNA- und Proteinebene liegen. Hierfür sollte eine klinisch gut dokumentierte Auswahl und ausreichende Anzahl von TAF und NAF gewählt werden, damit auch unterschiedliche Patientencharakteristika ausreichend repräsentiert sind und multifaktorielle Abhängigkeiten untersucht werden können. Hierbei ist auch die Untersuchung unterschiedlicher funktioneller Parameter wie bei der Reaktion auf Tumorzell-konditioniertes Medium ein guter Ansatzpunkt, um die zugrunde liegenden molekularen Veränderungen zu untersuchen.

A. Anhang

Tabelle A.1.: Patientendaten und Verwendung der Gewebeschnitte, TAF und NAF für einzelne Experimente

Geschlecht: m: männlich, w: weiblich,

Histologie: A: Adenokarzinom, AS: Adenosquamöses Karzinom, G: Großzelliges Karzinom, M: Metastase aus einem anderen Organ, NSCLC: Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom ohne weitere Spezifizierung, S: Squamöses Karzinom (Plattenepithelkarzinom)

Verwendung: A: AnnexinV-PI-Färbung, B: BrdU-PI-Färbung, K: KI67-Färbung, KK: Kokultur, kM: konditioniertes Medium, L1: *Inhibitor Select Library-Screen*, L2: *Prestwick Library-Screen*, M: MTT, MA: Microarray, p: p53-IHC, q: qRT-PCR, S: *tp53*-Sequenzierung, T: TUNEL-Färbung, Z: Dauer der Zellteilungen.

Nummer	Geschlecht	Alter [Jahre]	Histologie	Verwendung/Experiment
1	w	79	A	q, S
2	m	50	S	KK, M, S
3	w	69	M	S
4	m	74	S	S
5	m	71	S	S
6	m	53	NSCLC	S
7	w	36	AS	S
8	w	62	S	S
9	m	67	S	S
10	m	61	S	p, S, T
11	m	63	A	K, p, T
12	w	67	A	K, p, q, T
12 NAF	”	”	”	q
13	w	63	M	K, p, S, T
14	w	77	M	M, S
15	m	40	M	K, p, T
16	m	63	A	K, p, S, T
17	m	56	S	S
18	m	72	S	K, M, S
19	m	66	S	M
20	m	79	S	K, p, S, T
21	m	57	S	KK, M, S
22	m	64	A	K, p, S, T
23	m	49	M	S
24	m	75	S	K, p, S, T
25	m	71	A	M
26	m	55	S	K, p, S, T
27	m	56	A	K, M, p, T
28	w	63	A	K, M, p, T
29	m	59	M	K, p, S, T
30	m	70	G	K, p, S, T
31	m	69	AS	K, p, S, T
32	m	73	A	K, p, S, T
33	m	68	A	K, p, S, T

Nummer	Geschlecht	Alter [Jahre]	Histologie	Verwendung/Experiment
34	w	59	A	S
35	m	83	AS	K, p, S, T
36	m	56	G	S
37	w	79	M	S
38	w	79	A	S
39	m	58	A	S
40	m	65	M	q
40 NAF	"	"	"	q
41	w	86	A	p, q, S, T
41 NAF	"	"	"	q
42	m	54	S	K, KK, p, q, S, T
42 NAF	"	"	"	q
43	w	64	M	K, p, S, T
44	m	68	M	KK, S
45	m	68	M	K, p, S, T
46	m	61	M	K, p, S, T
47	w	71	S	p, S
48	m	69	M	K, p, T
49	m	88	A	K, p, S, T
50	w	72	A	S
51	m	62	M	K, p, S, T
52	m	73	A	S
53	m	70	A	K, p, S, T
54	w	67	M	KK, M
55	w	70	A	B, KK, kM, M, q, S, Z
56	m	74	M	KK, M, S, Z
57	m	60	AS	K, KK, M, p, S, T, Z
58	m	63	M	A, B, KK, L1, M, S, Z
59	w	71	A	A, B, KK, M, Z
60	w	74	A	A, B, K, KK, M, p, S, T, Z
61	w	72	A	A, B, K, KK, kM, M, MA, p, q, S, T, Z
61 NAF	"	"	"	A, B, M, MA, q, Z
62	m	62	A	A, B, KK, kM, L2, M, MA, q, Z
62 NAF	"	"	"	A, B, L2, M, MA, q
63	m	68	G	K, KK, M, p, q, S, T, Z
63 NAF	"	"	"	M, q, Z
64	m	64	A	A, B, K, M, p, q, S, T, Z
64 NAF	"	"	"	A, B, M, q, Z
65	m	74	M	M, S, Z
66	m	68	A	K, M, p, S, T, Z
67	m	55	S	A, B, M, q, S, Z
67 NAF	"	"	"	A, B, M, q
68	m	59	M	M, q, S, Z
69	w	62	A	K, M, p, S, T, Z
70	m	68	M	M

Nummer	Geschlecht	Alter [Jahre]	Histologie	Verwendung/Experiment
71	m	68	A	M
72	m	71	S	K, M, p, q, S, T
72 NAF	”	”	”	M, q
73	m	70	A	M, q
74	m	52	M	K, M, p, q, S, T
74 NAF	”	”	”	M, q
75	m	70	A	K, M, p, T
76	w	66	M	M
77	m	72	A	K, L1, p, S, T
78	m	70	M	K, kM, M, p, q, T
78 NAF	”	”	”	M
79	m	71	A	K, M, q
80	m	60	AS	K, p, T
81	m	70	A	K, p, T
82	m	72	S	K, kM, p, S, T
83	w	62	S	K, p, S, T
84	w	62	AS	K, kM, p, S, T
85	m	71	M	K, p, S, T
86	m	64	M	p, S
87	m	49	G	A, B, q
87 NAF	”	”	”	A, B, q

Tabelle A.2.: Inhibitoren der *Inhibitor Select*-Substanzbibliothek, die das Wachstum primärer TAF aus zwei Patienten bei 1 μ M Inhibitor-Konzentration um mindestens 50 % hemmen. (Siehe auch Abbildung 5.1 auf Seite 43, A.)

Substanz	Residuelle Viabilität		Beschreibung
	TAF1 [%]	TAF2 [%]	
PDK1/Akt/Flt Pathway Inhibitor	0,6	0	PDK1/Akt- und Flt/PIM-Signalwege, PDGFR
Staurosporine, Strep- tomyces sp.	10,2	4,2	Breitspektrum, z. B. CaMK, MYLK, PRKACA, PRRT2, PRKG1, PDGFR
PDGF Receptor Ty- rosine Kinase Inhibi- tor IV	47,4	43,5	PDGFR, c-Abl
K-252a, Nocardio- sis sp.	47,5	43,4	Breitspektrum, z. B. CaMKII, MYLK, PRKACA, PRRT2
PI-103	49,9	31,7	PRKDC, PIK3, mTOR

Tabelle A.3.: Top25-PDGFR-Inhibitoren der *Inhibitor Select*-Substanzbibliothek, die das Wachstum beider TAF bei 1 μ M Inhibitor-Konzentration hemmen.

Substanz	Top 25 bei	
	TAF1	TAF2
GTP-14564	+	+
N-benzoyl-Staurosporin	+	+
PDGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor III	+	-
PDGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor IV	+	+
PDGF RTK Inhibitor	+	-
PDK1/Akt/Flt Dual Pathway Inhibitor	+	+
Staurosporin	+	+
VEGF Receptor 2 Kinase Inhibitor II	+	+
VEGF Receptor 2 Kinase Inhibitor III	-	+

Tabelle A.4.: Mutationen im *tp53*-Gen. Nummer entspricht der Numerierung aus Tabelle A.1 auf Seite 125. bp: Position im *tp53*-Gen laut *p53 knowledgebase*, AS: Aminosäure-Position, DBD: DNA-Bindedomäne, PRD: Prolinreiche Domäne, A: Adeno-Bereich des Tumors, P: Plattenepithel-Bereich des Tumors.

Nummer	bp	AS	Bemerkung
10	del(13117-13125)	Trp146Cys und del(147-149)	DBD, vermutlich homozygot im Tumor, WT-Allel nur circa 20%, kein <i>frameshift</i>
13	-	-	Exon 9 lässt sich nicht amplifizieren
20	C12234T	Gln104Stop	3. AS der DBD
24	A14057G	Gly244Ser	DBD
26	C12157T und delC(14069)	Ala78Val und Arg248???	PRD, homozygot, und bekannter <i>frameshift</i> (<i>p53 knowledgebase</i>), heterozygot, DBD
29	G14510C	Asp281His	DBD, vermutlich homozygot
30	delG(14470)	Arg267???	DBD
31	Deletion		Exon 9 zwei PCR-Produkte, ca. 260 bp Deletion
35 A	T13341G und Deletion	Leu194Arg	DBD, und Exon 9 zwei PCR-Produkte, ca. 60 bp Deletion
35 P	A14058G	Gly244Asp	DBD
41	C13214G und Deletion	His179Asp	DBD, und Exon 9 zwei oder drei PCR-Produkte, circa 150 und 260 bp Deletion
42	G14483T	Val272Leu und Arg273Pro	DBD
45	A14052G	Cys242Tyr	DBD
46	Deletion		Exon 4 zwei PCR-Produkte
47	A13215G	His179Arg	DBD
49	Deletion		Exon 9 zwei PCR-Produkte, ca. 50 bp Deletion
51	G12196A	Trp91Stop	PRD

Nummer	bp	AS	Bemerkung
56	delC(13331)	Pro191???	bekannter <i>frameshift</i> (<i>p53 knowledgebase</i>)
57	delG(14731) und C14749T	Asp324??? und Leu330Phe	vermutlich homozygot, <i>frameshift</i> , und vermutlich homozygot
60	Deletion		Exon 4 zwei PCR-Produkte
63	C13145G	Arg156Gly	DBD
69	-	-	Exon 9 lässt sich nicht amplifizieren
72	T13190G und A13399G	Glu171Stop und synonym	DBD, und synonymer SNP mit nur 1 % Al- lelfrequenz
74	G13203A	Arg175His	DBD
77	-	-	unklar
82	-	-	unklar
83	C14487G	Arg273Pro	DBD
84	G13096T	Lys139Asn	DBD, vermutlich nur kleiner Anteil der Zellen
85	G13148T	Val157Phe	DBD
86	A13338G	His193Arg	DBD

Tabelle A.5.: Differenziell exprimierte Gene zwischen TAF und NAF.

Transkripte, die in mindestens einem TAF-NAF-Paar zweifach unterschiedlich exprimiert sind ($FC \geq 2$) und im zweiten Paar in die gleiche Richtung unterschiedlich exprimiert sind. Siehe auch Abbildung 5.33 auf Seite 84

FC TAF1/ NAF1	FC TAF2/ NAF2	Gen- symbol	Genname	Entrez- gene	GO <i>biological process</i>
2.165	1.274	HAPLN1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	1404	cell adhesion
2.009	1.120	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	7980	blood coagulation
1.864	2.676	POSTN	periostin, osteoblast specific factor	10631	skeletal development, cell adhesion
0.822	0.378	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	27063	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, defense response, signal transduction
0.799	0.405	GRPR	gastrin-releasing peptide receptor	2925	signal transduction, G-protein coupled receptor protein signaling pathway, regulation of cell proliferation

FC TAF1/ NAF1	FC TAF2/ NAF2	Gen- symbol	Gename	Entrez- gene	GO biological process
0.705	0.497	PRUNE2 LOC1001 29762	prune homolog 2 (Drosophila) similar to KIAA0367	158471 1001 29762	induction of apoptosis, G1 phase
0.496	0.699	LRRFIP1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	9208	regulation of transcrip- tion from RNA polymera- se II promoter, negative regulation of transcrip- tion
0.494	0.826	-	-	-	-
0.438	0.732	-	-	-	-

Tabelle A.6.: Substanzen aus der *Prestwick Chemical Library*[®], die TAF und NAF mindestens 2fach unterschiedlich hemmen.

Substanz	relative Via- bilität TAF [%]	relative Via- bilität NAF [%]	Verhältnis TAF/NAF
Bicuculline (+)	60,3	30,0	2,01
Mefloquine hydrochloride	70,0	26,1	2,68
Sulfachloropyridazine	87,5	30,4	2,88
Xylazine	46,0	12,5	3,69

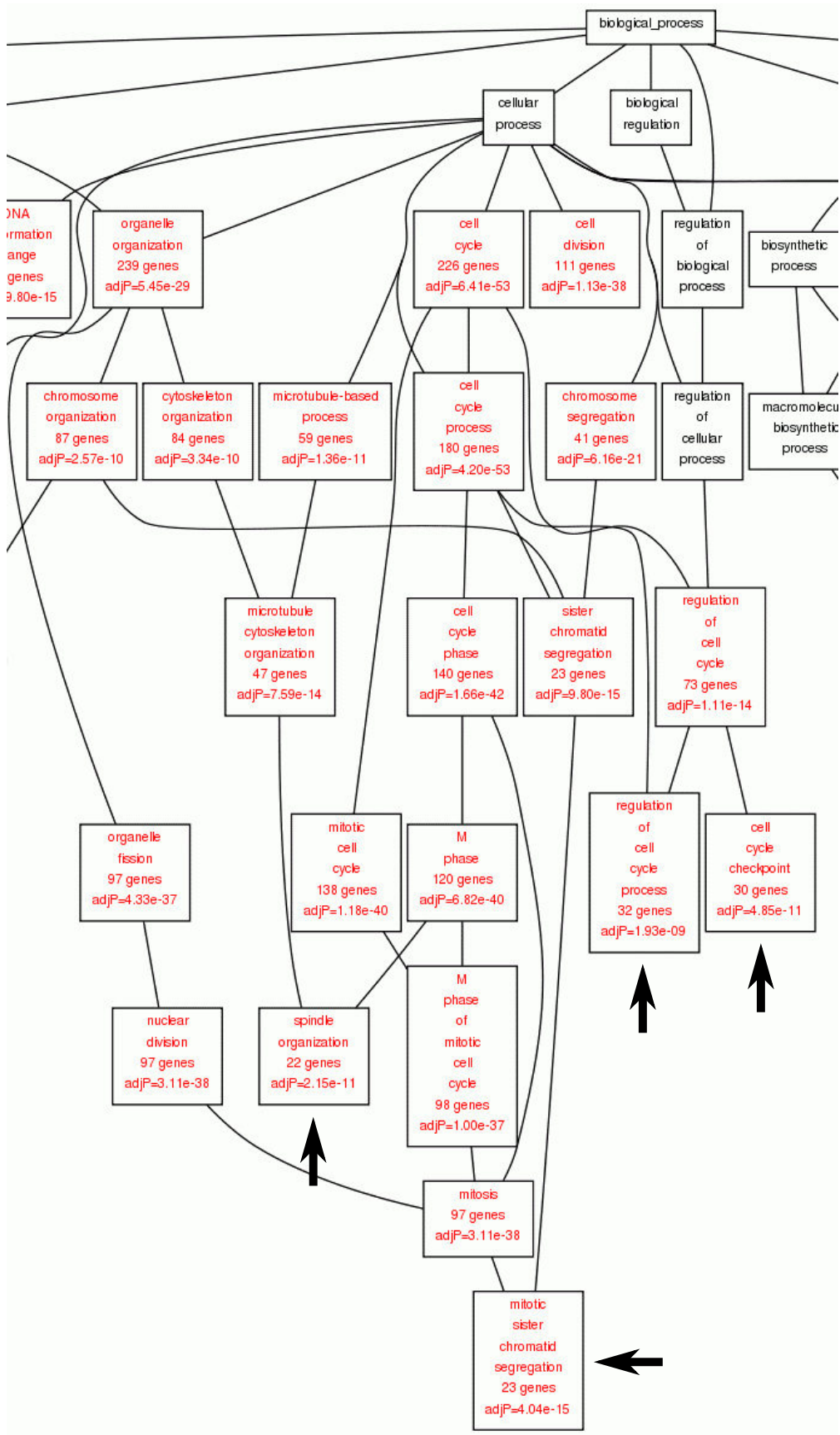


Abbildung A.1.: Beispiel eines GSEA-Ergebnisses.

Ausschnitt des GSEA-Ergebnisses von WebGestalt nach der Analyse der 1587 Transkripte, die nach Dasatinib-Behandlung in TAF und in NAF geändert exprimiert sind. Rote Kategorien sind statistisch signifikant häufiger als zu erwarten ($p < 0,01$). In Abbildung 5.38 auf Seite 90 sind nur die jeweils untersten signifikanten Ebenen dieser Darstellung gezeigt (schwarze Pfeile).

Tabelle A.7.: Primer

Name	Sequenz	Verwendung
oSH025	AACTGTGCCACACCAGAAG	PDGFRB fw
oSH026	CAGGAGAGACAGCAACAGCA	PDGFRB rev
oSH027	CAGAGCGCATCCATCAAAG	PDGFD fw
oSH028	GGATGGTCTCATCTCTTCGG	PDGFD rev
oSH029	TCCAGCAACAAGGAACAGAA	PDGFC fw
oSH030	TATGAGGAAACCTTGGGCTG	PDGFC rev
oSH031	CGAGGAGTTTTTCAGCAACAA	FGF5 fw
oSH032	TTGAAAACGCTCCCTGAACT	FGF5 rev
oSH033	GTGGACTCTACCTCGGGATG	FGF9 fw
oSH034	CCAGTTTTCTTCGAACTGTTCTC	FGF9 rev
oSH035	CGGCCCTCCTTCAGTTTAGT	FGFR2 fw
oSH036	CGCAGCCACGTACTTCT	FGFR2 rev
oSH037	GGGACCCAAGAGATGAAGAA	FGF7 fw
oSH038	TTCACTTTCCACCCCTTTGA	FGF7 rev
oSH039	GTTCGGTTTGCGACACG	IGF2 fw
oSH040	AGAAGCACCAGCATCGACTT	IGF2 rev
oSH041	GGTTTGCCTCAACGAAAAGA	IGFBP5 fw
oSH042	GAGTAGGTCTCCTCGGCCAT	IGFBP5 rev
oSH043	CATCACCCAGGTCAGCAAG	IGFBP7 fw
oSH044	GGTTTGCCTCAACGAAAAGA	IGFBP7 rev
oSH045	ATCGCGACGACTAAATACCC	CCBE1 fw
oSH046	GGGATGCATTGTCCAAGAAC	CCBE1 rev
oSH047	CGAGCAAAGTGAACACAACG	EFEMP1 fw
oSH048	ATCCCCGTAAATTGATGCAC	EFEMP1 rev
oSH049	AGATTGTACCCACGAGCTG	MFGE8 fw
oSH050	GCTGTTATTCTTCAGGCCCA	MFGE8 rev
oSH051	GATCATGAAGCGCTCGGTA	EDIL3 fw
oSH052	TTTCACATGGATTGGGATCA	EDIL3 rev
oSH053	GGCTGGCTGCTTGCCACAGT	SVEP1 fw
oSH054	GAACCCCGGTGTGTGGAGCG	SVEP1 rev
oSH055	ATATGTGAAGGAGCTCCGGG	HBEGF fw
oSH056	ATAAGCGATTTTCCACTGGG	HBEGF rev
oSH057	TTCACCACTTCGTGATGATTCTG	VEGFA fw
oSH058	AACCATGAACTTTCTGCTGTCTTG	VEGFA rev
oSH059	ATAGACATGCCGCCCTTCTT	TGFB2 fw
oSH060	CTCCATTGCTGAGACGTCAA	TGFB2 rev
oSH061	AAATTCGACATGATCCAGGG	TGFB3 fw
oSH062	CACATTGAAGCGGAAAACCT	TGFB3 rev
oSH067	CTTCTCCGGAAGGCTTGTC	ABCA1 fw
oSH068	CAGAGCTCACAGCAGGGAC	ABCA1 rev
oSH069	AGCTCGGCTCCAAGTTCTG	ABCC3 fw
oSH070	AGGCCAGCAGGGAGTTCT	ABCC3 rev
oSH071	TTCGGGGAGAAGTGATGTTC	MMP1 fw
oSH072	TTGTGGCCAGAAAACAGAAA	MMP1 rev
oSH073	CTGAAATCCTCCTGGGCTG	CDK2 fw
oSH074	GAATCTCCAGGGAATAGGGC	CDK2 rev

Name	Sequenz	Verwendung
oSH075	TGGGTCTGTTATTGATGAGCC	MKI67 fw
oSH076	TGACTTCCTTCCATTCTGAAGAC	MKI67 rev
oSH077	ACCATAACTCCCTGGTGCCGC	ACTC1 fw
oSH078	CGACAACGGCTCTGGGCTGG	ACTC1 rev
oSH079	CATCTGCTCTGGGAAGCAC	TPD52L1 fw
oSH080	GTTCTTGCAACGGTTCAGT	TPD52L1 rev
oSH081	CAGCTGAGACTGGGGGAG	PODN fw
oSH082	GTGCCGAGTCAGATGCG	PODN rev
oSH083	GTCCTCCTGCTCCTGCTGT	ELN fw
oSH084	GCCCCTGGATAAAAGACTCC	ELN rev
oSH085	AGACCGTAGTGATAGCGACGGGG	TTK fw
oSH086	TCCATTTCTACAGAAAGCTGCGCTGG	TTK rev
oSH087	CCTCTTCGGCTTCTCGCT	ITGA6 fw
oSH088	GTTGGCTCTCTGCAGTGGA	ITGA6 rev
oSH089	GCACAGAGCCTCGCCTT	ACTB fw
oSH090	GTTGTGACGACGAGCG	ACTB rev
oSH091	ATAGCAAGCGAGTCCGCATT	FOXMI fw
oSH092	TCTCCTCTTCCCTGGTCCT	FOXMI rev
oSH093	AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC	CDKN1A fw
oSH094	CATGGGTTCTGACGGACAT	CDKN1A rev
oSH095	GCTTTCACGACGGTGAC	TP53 fw
oSH096	GCTCGACGCTAGGATCTGAC	TP53 rev
oSH097	GACGACCTCAACGCACAGTA	BBC3 fw
oSH098	GTAAGGGCAGGAGTCCCAT	BBC3 rev
oSH099	ATTCCACCTCCCAACCAACT	MTBP fw
oSH100	TCCTTTCACCTCAACATCTGG	MTBP rev
oSH103	GTTTGTGCTGTGGTGTGTCC	CXCL12 fw
oSH104	ATCTAAGGTTGGGGGAGGTG	CXCL12 rev
oSH105	CAGAGGGACAAAGGAAAAGAA	HGF fw
oSH106	GCAAGTGAATGGAAGTCCTTA	HGF rev

Literaturverzeichnis

- ADAM, L., CREPIN, M., LELONG, J. C., SPANAKIS, E., UND ISRAEL, L. 1994. Selective interactions between mammary epithelial cells and fibroblasts in co-culture. *Int J Cancer* 59:262–268.
- AHMED, A. A., MILLS, A. D., IBRAHIM, A. E. K., TEMPLE, J., BLENKIRON, C., VIAS, M., MASSIE, C. E., IYER, N. G., MCGEOCH, A., CRAWFORD, R., NICKE, B., DOWNWARD, J., SWANTON, C., BELL, S. D., EARL, H. M., LASKEY, R. A., CALDAS, C., UND BRENTON, J. D. 2007. The extracellular matrix protein TGFBI induces microtubule stabilization and sensitizes ovarian cancers to paclitaxel. *Cancer Cell* 12:514–527.
- AKHMETSHINA, A., DEES, C., PILECKYTE, M., MAURER, B., AXMANN, R., JÜNGEL, A., ZWERINA, J., GAY, S., SCHETT, G., DISTLER, O., UND DISTLER, J. H. W. 2008. Dual inhibition of c-abl and PDGF receptor signaling by dasatinib and nilotinib for the treatment of dermal fibrosis. *FASEB J* 22:2214–2222.
- ALLINEN, M., BEROUKHIM, R., CAI, L., BRENNAN, C., LAHTI-DOMENICI, J., HUANG, H., PORTER, D., HU, M., CHIN, L., RICHARDSON, A., SCHNITT, S., SELLERS, W. R., UND POLYAK, K. 2004. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6:17–32.
- ANDERSON, A. R. A., WEAVER, A. M., CUMMINGS, P. T., UND QUARANTA, V. 2006. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell* 127:905–915.
- ANDRAE, J., GALLINI, R., UND BETSHOLTZ, C. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22:1276–1312.
- AO, M., FRANCO, O. E., PARK, D., RAMAN, D., WILLIAMS, K., UND HAYWARD, S. W. 2007. Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res* 67:4244–4253.
- BALL, S. G., SHUTTLEWORTH, C. A., UND KIELTY, C. M. 2007. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Biol* 177:489–500.
- BAR, J., FENIGER-BARISH, R., LUKASHCHUK, N., SHAHAM, H., MOSKOVITS, N., GOLDFINGER, N., SIMANSKY, D., PERLMAN, M., PAPA, M., YOSEPOVICH, A., RECHAVI, G., ROTTER, V., UND OREN, M. 2009. Cancer cells suppress p53 in adjacent fibroblasts. *Oncogene* 28:933–936.
- BARSKY, S. H. UND GOPALAKRISHNA, R. 1987. Increased invasion and spontaneous metastasis of BL6 melanoma with inhibition of the desmoplastic response in C57 BL/6 mice. *Cancer Res* 47:1663–1667.
- BARTLING, B., HOFMANN, H.-S., SILBER, R.-E., UND SIMM, A. 2008. Differential impact of fibroblasts on the efficient cell death of lung cancer cells induced by paclitaxel and cisplatin. *Cancer Biol Ther* 7:1250–1261.
- BAUMAN, J. E., EATON, K. D., UND MARTINS, R. G. 2007. Antagonism of platelet-derived growth factor receptor in non small cell lung cancer: rationale and investigations. *Clin Cancer Res* 13:s4632–s4636.
- BERGSMEDH, A., SZELES, A., HENRIKSSON, M., BRATT, A., FOLKMAN, M. J., SPETZ, A. L., UND HOLMGREN, L. 2001. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6407–6411.
- BHATAVDEKAR, J. M., PATEL, D. D., SHAH, N. G., VORA, H. H., SUTHAR, T. P., CHIKHLIKAR, P. R., GHOSH, N., UND TRIVEDI, T. I. 2000. Prognostic significance of immunohistochemically localized biomarkers in stage II and stage III breast cancer: a multivariate analysis. *Ann Surg Oncol* 7:305–311.

- BHATTACHARJEE, A., RICHARDS, W. G., STAUNTON, J., LI, C., MONTI, S., VASA, P., LADD, C., BEHESHTI, J., BUENO, R., GILLETTE, M., LODA, M., WEBER, G., MARK, E. J., LANDER, E. S., WONG, W., JOHNSON, B. E., GOLUB, T. R., SUGARBAKER, D. J., UND MEYERSON, M. 2001. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13790–13795.
- BHOWMICK, N. A., CHYTIL, A., PLIETH, D., GORSKA, A. E., DUMONT, N., SHAPPELL, S., WASHINGTON, M. K., NEILSON, E. G., UND MOSES, H. L. 2004a. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 303:848–851.
- BHOWMICK, N. A., NEILSON, E. G., UND MOSES, H. L. 2004b. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432:332–337.
- BLAY, J.-Y. UND VON MEHREN, M. 2011. Nilotinib: a novel, selective tyrosine kinase inhibitor. *Semin Oncol* 38 Suppl 1:S3–S9.
- BRAMBILLA, E., TRAVIS, W. D., COLBY, T. V., CORRIN, B., UND SHIMOSATO, Y. 2001. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18:1059–1068.
- BROWDER, T., BUTTERFIELD, C. E., KRÄLING, B. M., SHI, B., MARSHALL, B., O'REILLY, M. S., UND FOLKMAN, J. 2000. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 60:1878–1886.
- BROWN, L. F., GUIDI, A. J., SCHNITT, S. J., WATER, L. V. D., IRUELA-ARISPE, M. L., YEO, T. K., TOGNAZZI, K., UND DVORAK, H. F. 1999. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 5:1041–1056.
- BUCHDUNGER, E., CIOFFI, C. L., LAW, N., STOVER, D., OHNO-JONES, S., DRUKER, B. J., UND LYDON, N. B. 2000. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295:139–145.
- CARPINI, J. D., KARAM, A. K., UND MONTGOMERY, L. 2010. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis* 13:43–58.
- CASEY, G., LOPEZ, M. E., RAMOS, J. C., PLUMMER, S. J., ARBOLEDA, M. J., SHAUGHNESSY, M., KARLAN, B., UND SLAMON, D. J. 1996. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 13:1971–1981.
- CEPPI, P., PAPOTTI, M., MONICA, V., LO IACONO, M., SAVIOZZI, S., PAUTASSO, M., NOVELLO, S., MUSSINO, S., BRACCO, E., VOLANTE, M., UND SCAGLIOTTI, G. V. 2009. Effects of Src kinase inhibition induced by dasatinib in non-small cell lung cancer cell lines treated with cisplatin. *Mol Cancer Ther* 8:3066–3074.
- CHANG, H. Y., CHI, J.-T., DUDOIT, S., BONDRE, C., VAN DE RIJN, M., BOTSTEIN, D., UND BROWN, P. O. 2002. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12877–12882.
- CHANG, H. Y., SNEDDON, J. B., ALIZADEH, A. A., SOOD, R., WEST, R. B., MONTGOMERY, K., CHI, J.-T., VAN DE RIJN, M., BOTSTEIN, D., UND BROWN, P. O. 2004. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol* 2:E7.
- CHANG, Y.-L., WU, C.-T., SHIH, J.-Y., UND LEE, Y.-C. 2011. Comparison of p53 and epidermal growth factor receptor gene status between primary tumors and lymph node metastases in non-small cell lung cancers. *Ann Surg Oncol* 18:543–550.

- CHEN, G., WANG, H., GHARIB, T. G., HUANG, C.-C., THOMAS, D. G., SHEDDEN, K. A., KUICK, R., TAYLOR, J. M. G., KARDIA, S. L. R., MISEK, D. E., GIORDANO, T. J., IANNETTONI, M. D., ORRINGER, M. B., HANASH, S. M., UND BEER, D. G. 2003. Overexpression of oncoprotein 18 correlates with poor differentiation in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2:107–116.
- CHIOREAN, E. G., PORTER, J. M., FOSTER, A. E., OMARI, A. S. H. A., YODER, C. A., FIFE, K. L., STROTHER, R. M., MURRY, D. J., YU, M., JONES, D. R., UND SWEENEY, C. J. 2008. A phase I and pharmacokinetic trial of erlotinib in combination with weekly docetaxel in patients with taxane-naive malignancies. *Clin Cancer Res* 14:1131–1137.
- COHEN, M. H., JOHNSON, J. R., CHATTOPADHYAY, S., TANG, S., JUSTICE, R., SRIDHARA, R., UND PAZDUR, R. 2010. Approval summary: erlotinib maintenance therapy of advanced/metastatic non-small cell lung cancer (nscl). *Oncologist* 15:1344–1351.
- COLLER, H. A., SANG, L., UND ROBERTS, J. M. 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* 4:e83.
- CRAWFORD, Y., KASMAN, I., YU, L., ZHONG, C., WU, X., MODRUSAN, Z., KAMINKER, J., UND FERRARA, N. 2009. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* 15:21–34.
- CROOK, T., WREDE, D., TIDY, J. A., MASON, W. P., EVANS, D. J., UND VOUSDEN, K. H. 1992. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human papillomavirus-negative tumours. *Lancet* 339:1070–1073.
- CUI, W., TAUB, D. D., UND GARDNER, K. 2007. qPrimerDepot: a primer database for quantitative real time PCR. *Nucleic Acids Res* 35:D805–D809.
- DING, L., GETZ, G., WHEELER, D. A., MARDIS, E. R., MCLELLAN, M. D., CIBULSKIS, K., SOUGNEZ, C., GREULICH, H., MUZNY, D. M., MORGAN, M. B., FULTON, L., FULTON, R. S., ZHANG, Q., WENDL, M. C., LAWRENCE, M. S., LARSON, D. E., CHEN, K., DOOLING, D. J., SABO, A., HAWES, A. C., SHEN, H., JHANGIANI, S. N., LEWIS, L. R., HALL, O., ZHU, Y., MATHEW, T., REN, Y., YAO, J., SCHERER, S. E., CLERC, K., METCALF, G. A., NG, B., MILOSAVLJEVIC, A., GONZALEZ-GARAY, M. L., OSBORNE, J. R., MEYER, R., SHI, X., TANG, Y., KOBOLDT, D. C., LIN, L., ABBOTT, R., MINER, T. L., POHL, C., FEWELL, G., HAIPEK, C., SCHMIDT, H., DUNFORD-SHORE, B. H., KRAJA, A., CROSBY, S. D., SAWYER, C. S., VICKERY, T., SANDER, S., ROBINSON, J., WINCKLER, W., BALDWIN, J., CHIRIEAC, L. R., DUTT, A., FENNEL, T., HANNA, M., JOHNSON, B. E., ONOFRIO, R. C., THOMAS, R. K., TONON, G., WEIR, B. A., ZHAO, X., ZIAUGRA, L., ZODY, M. C., GIORDANO, T., ORRINGER, M. B., ROTH, J. A., SPITZ, M. R., WISTUBA, I. I., OZENBERGER, B., GOOD, P. J., CHANG, A. C., BEER, D. G., WATSON, M. A., LADANYI, M., BRODERICK, S., YOSHIZAWA, A., TRAVIS, W. D., PAO, W., PROVINCE, M. A., WEINSTOCK, G. M., VARMUS, H. E., GABRIEL, S. B., LANDER, E. S., GIBBS, R. A., MEYERSON, M., UND WILSON, R. K. 2008. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455:1069–1075.
- DIREKZE, N. C., JEFFERY, R., HODIVALA-DILKE, K., HUNT, T., PLAYFORD, R. J., ELIA, G., POULSOM, R., WRIGHT, N. A., UND ALISON, M. R. 2006. Bone marrow-derived stromal cells express lineage-related messenger RNA species. *Cancer Res* 66:1265–1269.
- DISTLER, J. H. W. UND DISTLER, O. 2010. Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of fibrotic diseases such as systemic sclerosis: towards molecular targeted therapies. *Ann Rheum Dis* 69 Suppl 1:i48–i51.
- DI TULLIO, JR, R. A., MOCHAN, T. A., VENERE, M., BARTKOVA, J., SEHESTED, M., BARTEK, J., UND HALAZONETIS, T. D. 2002. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol* 4:998–1002.

- DONG, M., PHILIPPI, C., LORETZ, B., NAFEE, N., SCHAEFER, U. F., FRIEDEL, G., AMMON-TREIBER, S., GRIESE, E.-Ü., LEHR, C.-M., KLOTZ, U., UND MÜRDTER, T. E. 2011. Tissue slice model of human lung cancer to investigate telomerase inhibition by nanoparticle delivery of antisense 2'-O-methyl-RNA. *Int J Pharm* 419:33–42.
- DONNEM, T., AL-SAAD, S., AL-SHIBLI, K., ANDERSEN, S., BUSUND, L.-T., UND BREMNES, R. M. 2008. Prognostic impact of platelet-derived growth factors in non-small cell lung cancer tumor and stromal cells. *J Thorac Oncol* 3:963–970.
- DOWELL, S. P., WILSON, P. O., DERIAS, N. W., LANE, D. P., UND HALL, P. A. 1994. Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res* 54:2914–2918.
- DUDLEY, A. C., SHIH, S.-C., CLIFFE, A. R., HIDA, K., UND KLAGSBRUN, M. 2008. Attenuated p53 activation in tumour-associated stromal cells accompanies decreased sensitivity to etoposide and vincristine. *Br J Cancer* 99:118–125.
- DVORAK, H. F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315:1650–1659.
- EGEBLAD, M., RASCH, M. G., UND WEAVER, V. M. 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol* 22:697–706.
- EHNFORSS, J., KOST-ALIMOVA, M., PERSSON, N. L., BERGSMEDH, A., CASTRO, J., LEVCHENKO-TEGNEBRATT, T., YANG, L., PANARETAKIS, T., UND HOLMGREN, L. 2009. Horizontal transfer of tumor DNA to endothelial cells in vivo. *Cell Death Differ* 16:749–757.
- ELENBAAS, B. UND WEINBERG, R. A. 2001. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 264:169–184.
- FERLAY, J., SHIN, H., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C., UND DM., P. P. 2011. Globocan 2008 v2.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase no. 10 [internet]. research on cancer; Dezember 2011.
- FINAK, G., BERTOS, N., PEPIN, F., SADEKOVA, S., SOULEIMANOVA, M., ZHAO, H., CHEN, H., OMEROGU, G., METERISSIAN, S., OMEROGU, A., HALLETT, M., UND PARK, M. 2008. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14:518–527.
- FORSBERG, K., VALYI-NAGY, I., HELDIN, C. H., HERLYN, M., UND WESTERMARK, B. 1993. Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:393–397.
- GAIFFE, E., PRÉTET, J.-L., LAUNAY, S., JACQUIN, E., SAUNIER, M., HETZEL, G., OUDET, P., UND MOUGIN, C. 2012. Apoptotic HPV positive cancer cells exhibit transforming properties. *PLoS One* 7:e36766.
- GOECKENJAN, G., SITTE, H., THOMAS, M., BRANSCHIED, D., FLENTJE, M., GRIESINGER, F., NIEDERLE, N., STUSCHKE, M., BLUM, T., DEPPERMAN, K.-M., FICKER, J. H., FREITAG, L., LÜBBE, A. S., REINHOLD, T., SPÄTH-SCHWALBE, E., UKENA, D., WICKERT, M., WOLF, M., ANDREAS, S., AUBERGER, T., BAUM, R. P., BAYSAL, B., BEUTH, J., BICKEBÖLLER, H., BÖCKING, A., BOHLE, R. M., BRÜSKE, I., BURGHUBER, O., DICKGREBER, N., DIEDERICH, S., DIENEMANN, H., EBERHARDT, W., EGGELING, S., FINK, T., FISCHER, B., FRANKE, M., FRIEDEL, G., GAULER, T., GÜTZ, S., HAUTMANN, H., HELLMANN, A., HELLWIG, D., HERTH, F., HEUSSEL, C. P., HILBE, W., HOFFMEYER, F., HORNEBER, M., HUBER, R. M., HÜBNER, J., KAUCZOR, H.-U., KIRCHBACHER, K., KIRSTEN, D., KRAUS, T., LANG, S. M., MARTENS, U., MOHN-STAUDNER, A., MÜLLER, K.-M., MÜLLER-NORDHORN, J., NOWAK, D., OCHMANN, U., PASSLICK, B., PETERSEN, I., PIRKER, R., POKRAJAC, B., RECK, M., RIHA, S., RÜBE, C., SCHMITTEL, A., SCHÖNFELD, N., SCHÜTTE, W., SERKE, M., STAMATIS, G., STEINGRÄBER, M.,

- STEINS, M., STOELBEN, E., SWOBODA, L., TESCHLER, H., TESSEN, H. W., WEBER, M., WERNER, A., WICHMANN, H.-E., IRLINGER WIMMER, E., WITT, C., WORTH, H., GERMAN RESPIRATORY SOCIETY, UND GERMAN CANCER SOCIETY 2011. Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer: interdisciplinary guideline of the german respiratory society and the german cancer society. *Pneumologie* 65:39–59.
- HAN, J.-Y., LEE, G. K., JANG, D. H., LEE, S. Y., UND LEE, J. S. 2008. Association of p53 codon 72 polymorphism and MDM2 SNP309 with clinical outcome of advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 113:799–807.
- HANAHAN, D. UND WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674.
- HASHIMOTO, T., TOKUCHI, Y., HAYASHI, M., KOBAYASHI, Y., NISHIDA, K., HAYASHI, S., ISHIKAWA, Y., TSUCHIYA, S., NAKAGAWA, K., HAYASHI, J., UND TSUCHIYA, E. 1999. p53 null mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early-stage non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 59:5572–5577.
- HAUBEISS, S., SCHMID, J. O., MÜRDTER, T. E., SONNENBERG, M., FRIEDEL, G., VAN DER KUIP, H., UND AULITZKY, W. E. 2010. Dasatinib reverses cancer-associated fibroblasts (CAFs) from primary lung carcinomas to a phenotype comparable to that of normal fibroblasts. *Mol Cancer* 9:168.
- HAVIV, I., POLYAK, K., QIU, W., HU, M., UND CAMPBELL, I. 2009. Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle* 8:589–595.
- HAWSAWI, N. M., GHEBEH, H., HENDRAYANI, S.-F., TULBAH, A., AL-EID, M., AL-TWEIGERI, T., AJARIM, D., ALAIYA, A., DERMIME, S., UND ABOUSSEKHRA, A. 2008. Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes. *Cancer Res* 68:2717–2725.
- HELDIN, C. H. UND WESTERMARK, B. 1999. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:1283–1316.
- HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., UND HARRIS, C. C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49–53.
- HOLMGREN, L., SZELES, A., RAJNAVÖLGYI, E., FOLKMAN, J., KLEIN, G., ERNBERG, I., UND FALK, K. I. 1999. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 93:3956–3963.
- HOMSI, J. UND DAUD, A. I. 2007. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control* 14:285–294.
- HUANG, C., TAKI, T., ADACHI, M., KONISHI, T., HIGASHIYAMA, M., UND MIYAKE, M. 1998. Mutations in exon 7 and 8 of p53 as poor prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer. *Oncogene* 16:2469–2477.
- HUANG, P.-Y., LIANG, X.-M., LIN, S.-X., LUO, R.-Z., HOU, J.-H., UND ZHANG, L. 2004. Correlation analysis among expression of ERCC-1, metallothionein, p53 and platinum resistance and prognosis in advanced non-small cell lung cancer. *Ai Zheng* 23:845–850.
- HUNCHAREK, M., KUPELNICK, B., GESCHWIND, J. F., UND CAUBET, J. F. 2000. Prognostic significance of p53 mutations in non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 829 cases from eight published studies. *Cancer Lett* 153:219–226.
- HWANG, R. F., MOORE, T., ARUMUGAM, T., RAMACHANDRAN, V., AMOS, K. D., RIVERA, A., JI, B., EVANS, D. B., UND LOGSDON, C. D. 2008. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 68:918–926.

- IKEDA, K., TERASHIMA, M., KAWAMURA, H., TAKIYAMA, I., KOEDA, K., TAKAGANE, A., SATO, N., ISHIDA, K., IWAYA, T., MAESAWA, C., YOSHINARI, H., UND SAITO, K. 1998. Pharmacokinetics of cisplatin in combined cisplatin and 5-fluorouracil therapy: a comparative study of three different schedules of cisplatin administration. *Jpn J Clin Oncol* 28:168–175.
- ISHII, G., SANGAI, T., ODA, T., AOYAGI, Y., HASEBE, T., KANOMATA, N., ENDOH, Y., OKUMURA, C., OKUHARA, Y., MAGAE, J., EMURA, M., OCHIYA, T., UND OCHIAI, A. 2003. Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 309:232–240.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E., UND FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69–90.
- JOHNSON, F. M., BEKELE, B. N., FENG, L., WISTUBA, I., TANG, X. M., TRAN, H. T., ERASMUS, J. J., HWANG, L.-L., TAKEBE, N., BLUMENSCHNEIN, G. R., LIPPMAN, S. M., UND STEWART, D. J. 2010. Phase II study of dasatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28:4609–4615.
- JOYCE, J. A. 2005. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 7:513–520.
- KAISER, F., ENGELHARDT, M., RAWLUK, J., MERTELSMANN, R., PASSLICK, B., UND WÄSCH, R. 2011. Current treatment concepts of lung cancer. *Dtsch Med Wochenschr* 136:1901–1906.
- KALLURI, R. UND ZEISBERG, M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:392–401.
- KANDA, T., SULLIVAN, K. F., UND WAHL, G. M. 1998. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* 8:377–385.
- KANG, S.-Y., HALVORSEN, O. J., GRAVDAL, K., BHATTACHARYA, N., LEE, J. M., LIU, N. W., JOHNSTON, B. T., JOHNSTON, A. B., HAUKAAS, S. A., AAMODT, K., YOO, S., AKSLEN, L. A., UND WATNICK, R. S. 2009. Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12115–12120.
- KEATING, M. T., ESCOBEDO, J. A., FANTL, W. J., UND WILLIAMS, L. T. 1988. Ligand activation causes a phosphorylation-dependent change in platelet-derived growth factor receptor conformation. *Trans Assoc Am Physicians* 101:24–32.
- KIARIS, H., CHATZISTAMOU, I., TRIMIS, G., FRANGOU-PLEMMENOU, M., PAFITIKONDI, A., UND KALOFOUTIS, A. 2005. Evidence for nonautonomous effect of p53 tumor suppressor in carcinogenesis. *Cancer Res* 65:1627–1630.
- KITADAI, Y., SASAKI, T., KUWAI, T., NAKAMURA, T., BUCANA, C. D., UND FIDLER, I. J. 2006. Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. *Am J Pathol* 169:2054–2065.
- KLEIHUES, P., SCHÄUBLE, B., ZUR HAUSEN, A., ESTÈVE, J., UND OHGAKI, H. 1997. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol* 150:1–13.
- KODA, M., SULKOWSKA, M., KANCZUGA-KODA, L., TOMASZEWSKI, J., KUCHARCZUK, W., LESNIEWICZ, T., CYMEK, S., UND SULKOWSKI, S. 2007. The effect of chemotherapy on Ki-67, Bcl-2 and Bak expression in primary tumors and lymph node metastases of breast cancer. *Oncol Rep* 18:113–119.
- KOPELOVICH, L. 1982. Genetic predisposition to cancer in man: in vitro studies. *Int Rev Cytol* 77:63–88.

- KOUKOURAKIS, M. I., GIATROMANOLAKI, A., HARRIS, A. L., UND SIVRIDIS, E. 2006. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res* 66:632–637.
- KRTOLICA, A., PARRINELLO, S., LOCKETT, S., DESPREZ, P. Y., UND CAMPISI, J. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12072–12077.
- KUPERWASSER, C., CHAVARRIA, T., WU, M., MAGRANE, G., GRAY, J. W., CAREY, L., RICHARDSON, A., UND WEINBERG, R. A. 2004. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4966–4971.
- LAFKAS, D., TRIMIS, G., PAPAVALASSIOU, A. G., UND KIARIS, H. 2008. p53 mutations in stromal fibroblasts sensitize tumors against chemotherapy. *Int J Cancer* 123:967–971.
- LANG, G. A., IWAKUMA, T., SUH, Y.-A., LIU, G., RAO, V. A., PARANT, J. M., VALENTIN-VEGA, Y. A., TERZIAN, T., CALDWELL, L. C., STRONG, L. C., ELNAGGAR, A. K., UND LOZANO, G. 2004. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of li-fraumeni syndrome. *Cell* 119:861–872.
- LASKIN, J. J. UND SANDLER, A. B. 2005. First-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 19:1671–6; discussion 1678–80.
- LEE, C. B., STINCHCOMBE, T. E., ROSENMAN, J. G., UND SOCINSKI, M. A. 2006. Therapeutic advances in local-regional therapy for stage III non-small-cell lung cancer: evolving role of dose-escalated conformal (3-dimensional) radiation therapy. *Clin Lung Cancer* 8:195–202.
- LEITMANN, J. 2010. Cisplatin-induzierte Aktivierung des p53-Wegs in primären Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAFs) und Normalgewebe-assoziierten Fibroblasten (NAFs) aus humanen Lungenresektaten. Bachelor-Arbeit, Universität Hohenheim.
- LEVIN, I. 1912. Changes in the tissue surrounding a growing tumor and the significance of the "precancerous state". *J Exp Med* 16:149–154.
- LIM, Y. P., LIM, T. T., CHAN, Y. L., SONG, A. C. M., YEO, B. H., VOJTESEK, B., COOMBER, D., RAJAGOPAL, G., UND LANE, D. 2007. The p53 knowledgebase: an integrated information resource for p53 research. *Oncogene* 26:1517–1521.
- MAFFINI, M. V., SOTO, A. M., CALABRO, J. M., UCCI, A. A., UND SONNENSCHNEIN, C. 2004. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci* 117:1495–1502.
- MANGANA, J., LEVESQUE, M. P., KARPOVA, M. B., UND DUMMER, R. 2012. Sorafenib in melanoma. *Expert Opin Investig Drugs* 21:557–568.
- MANNING, G., WHYTE, D. B., MARTINEZ, R., HUNTER, T., UND SUDARSANAM, S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912–1934.
- MAULIK, G., SHRIKHANDE, A., KIJIMA, T., MA, P. C., MORRISON, P. T., UND SALGIA, R. 2002. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:41–59.
- MAY, P. UND MAY, E. 1999. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18:7621–7636.
- MCALLISTER, S. S. UND WEINBERG, R. A. 2010. Tumor-host interactions: a far-reaching relationship. *J Clin Oncol* 28:4022–4028.

- MÜERKÖSTER, S., WEGEHENKEL, K., ARLT, A., WITT, M., SIPOS, B., KRUSE, M.-L., SEBENS, T., KLÖPPEL, G., KALTHOFF, H., FÖLSCH, U. R., UND SCHÄFER, H. 2004. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* 64:1331–1337.
- MICKE, P., KAPPERT, K., OHSHIMA, M., SUNDQUIST, C., SCHEIDL, S., LINDAHL, P., HELDIN, C.-H., BOTLING, J., PONTEN, F., UND OSTMAN, A. 2007. In situ identification of genes regulated specifically in fibroblasts of human basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 127:1516–1523.
- MINAMI, H., KAWADA, K., EBI, H., KITAGAWA, K., IL KIM, Y., ARAKI, K., MUKAI, H., TAHARA, M., NAKAJIMA, H., UND NAKAJIMA, K. 2008. Phase I and pharmacokinetic study of sorafenib, an oral multikinase inhibitor, in Japanese patients with advanced refractory solid tumors. *Cancer Sci* 99:1492–1498.
- MINNA, J. D., BATTEY, J. F., BIRRER, M., BROOKS, B. J., CUTTITTA, F., DEGREVE, J., GAZDAR, A. F., JOHNSON, B. E., NAU, M. M., UND SAUSVILLE, E. A. 1986. Chromosomal deletion, gene amplification, alternative processing, and autocrine growth factor production in the pathogenesis of human lung cancer. *Princess Takamatsu Symp* 17:109–122.
- MITSUDOMI, T., HAMAJIMA, N., OGAWA, M., UND TAKAHASHI, T. 2000. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 6:4055–4063.
- MOK, T. S., WU, Y.-L., THONGPRASERT, S., YANG, C.-H., CHU, D.-T., SAIJO, N., SUNPAWERAVONG, P., HAN, B., MARGONO, B., ICHINOSE, Y., NISHIWAKI, Y., OHE, Y., YANG, J.-J., CHEWASKULYONG, B., JIANG, H., DUFFIELD, E. L., WATKINS, C. L., ARMOUR, A. A., UND FUKUOKA, M. 2009. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361:947–957.
- MOLINA, R., SEGUI, M. A., CLIMENT, M. A., BELLMUNT, J., ALBANELL, J., FERNANDEZ, M., FILELLA, X., JO, J., GIMENEZ, N., IGLESIAS, E., MIRALLES, M., ALONSO, C., PEIRO, G., PEREZ-PICAÑOL, E., UND BALLESTA, A. M. 1998. p53 oncoprotein as a prognostic indicator in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 18:507–511.
- MOLL, U. M., LAQUAGLIA, M., BÉNARD, J., UND RIOU, G. 1995. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4407–4411.
- MONTERO, J. C., SEOANE, S., OCAÑA, A., UND PANDIELLA, A. 2011. Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clin Cancer Res* 17:5546–5552.
- MONTERO, S., GUZMÁN, C., VARGAS, C., BALLESTÍN, C., CORTÉS-FUNES, H., UND COLOMER, R. 2001. Prognostic value of cytosolic p53 protein in breast cancer. *Tumour Biol* 22:337–344.
- MORIN, P. J. 2003. Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture. *Drug Resist Updat* 6:169–172.
- MOSCHOS, S. J. UND MANTZOROS, C. S. 2002. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 63:317–332.
- MOSTERTZ, W., STEVENSON, M., ACHARYA, C., CHAN, I., WALTERS, K., LAMBERTHON, W., BARRY, W., CRAWFORD, J., NEVINS, J., UND POTTI, A. 2010. Age- and sex-specific genomic profiles in non-small cell lung cancer. *JAMA* 303:535–543.
- MOULIN, V., TAM, B. Y., CASTILLOUX, G., AUGER, F. A., O'CONNOR-MCCOURT, M. D., PHILIP, A., UND GERMAIN, L. 2001. Fetal and adult human skin fibroblasts display intrinsic differences in contractile capacity. *J Cell Physiol* 188:211–222.

- MUELLER, M. M. UND FUSENIG, N. E. 2004. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:839–849.
- NAKAMURA, H., SAJI, H., OGATA, A., HOSAKA, M., HAGIWARA, M., SAIJO, T., KAWASAKI, N., UND KATO, H. 2003. cDNA microarray analysis of gene expression in pathologic stage IA nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer* 97:2798–2805.
- NAVAB, R., STRUMPF, D., BANDARCHI, B., ZHU, C.-Q., PINTILIE, M., RAMNARINE, V. R., IBRAHIMOV, E., RADULOVICH, N., LEUNG, L., BARCZYK, M., PANCHAL, D., TO, C., YUN, J. J., DER, S., SHEPHERD, F. A., JURISICA, I., UND TSAO, M.-S. 2011. Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7160–7165.
- OLINER, J. D., KINZLER, K. W., MELTZER, P. S., GEORGE, D. L., UND VOGELSTEIN, B. 1992. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358:80–83.
- OLUMI, A. F., GROSSFELD, G. D., HAYWARD, S. W., CARROLL, P. R., TLSTY, T. D., UND CUNHA, G. R. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 59:5002–5011.
- ORIMO, A., GUPTA, P. B., SGROI, D. C., ARENZANA-SEISDEDOS, F., DELAUNAY, T., NAEEM, R., CAREY, V. J., RICHARDSON, A. L., UND WEINBERG, R. A. 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121:335–348.
- OZCELIK, H., PINNADUWAGE, D., BULL, S. B., UND ANDRULIS, I. L. 2007. Type of tp53 mutation and ERBB2 amplification affects survival in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 105:255–265.
- PATHAK, A. UND KUMAR, S. 2012. Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:10334–10339.
- PATOCs, A., ZHANG, L., XU, Y., WEBER, F., CALDES, T., MUTTER, G. L., PLATZER, P., UND ENG, C. 2007. Breast-cancer stromal cells with tp53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med* 357:2543–2551.
- PAULSSON, J., SJÖBLOM, T., MICKE, P., PONTÉN, F., LANDBERG, G., HELDIN, C.-H., BERGH, J., BRENNAN, D. J., JIRSTRÖM, K., UND OSTMAN, A. 2009. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. *Am J Pathol* 175:334–341.
- PELHAM, R. J., RODGERS, L., HALL, I., LUCITO, R., NGUYEN, K. C. Q., NAVIN, N., HICKS, J., MU, D., POWERS, S., WIGLER, M., UND BOTSTEIN, D. 2006. Identification of alterations in DNA copy number in host stromal cells during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19848–19853.
- PENG, B., LLOYD, P., UND SCHRAN, H. 2005. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacokinet* 44:879–894.
- PETERSEN, O. W., NIELSEN, H. L., GUDJONSSON, T., VILLADSEN, R., RANK, F., NIEBUHR, E., BISSELL, M. J., UND RØNNOV-JESSEN, L. 2003. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol* 162:391–402.
- PETITJEAN, A., MATHE, E., KATO, S., ISHIOKA, C., TAVTIGIAN, S. V., HAINAUT, P., UND OLIVIER, M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on tp53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28:622–629. Database release R15, November 2010.
- PFISTER, D. G., JOHNSON, D. H., AZZOLI, C. G., SAUSE, W., SMITH, T. J., BAKER, S., OLAK, J., STOVER, D., STRAWN, J. R., TURRISI, A. T., SOMERFIELD, M. R., UND AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 2004. American society of clinical oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol* 22:330–353.

- PIETRAS, K., OSTMAN, A., SJÖQUIST, M., BUCHDUNGER, E., REED, R. K., HELDIN, C. H., UND RUBIN, K. 2001. Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* 61:2929–2934.
- PIETRAS, K., PAHLER, J., BERGERS, G., UND HANAHAN, D. 2008. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med* 5:e19.
- PIETRAS, K., RUBIN, K., SJÖBLOM, T., BUCHDUNGER, E., SJÖQUIST, M., HELDIN, C.-H., UND OSTMAN, A. 2002. Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* 62:5476–5484.
- POLYAK, K., HAVIV, I., UND CAMPBELL, I. G. 2009. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet* 25:30–38.
- POWELL, D. W., MIFFLIN, R. C., VALENTICH, J. D., CROWE, S. E., SAADA, J. I., UND WEST, A. B. 1999. Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277:C1–C9.
- QIU, W., HU, M., SRIDHAR, A., OPESKIN, K., FOX, S., SHIPITSIN, M., TRIVETT, M., THOMPSON, E. R., RAMAKRISHNA, M., GORRINGE, K. L., POLYAK, K., HAVIV, I., UND CAMPBELL, I. G. 2008. No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat Genet* 40:650–655.
- QUANTE, M., TU, S. P., TOMITA, H., GONDA, T., WANG, S. S. W., TAKASHI, S., BAIK, G. H., SHIBATA, W., DIPRETE, B., BETZ, K. S., FRIEDMAN, R., VARRO, A., TYCKO, B., UND WANG, T. C. 2011. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 19:257–272.
- RADISKY, D. C., KENNY, P. A., UND BISSELL, M. J. 2007. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem* 101:830–839.
- RØNNOV-JESSEN, L. UND PETERSEN, O. W. 1993. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* 68:696–707.
- RØNNOV-JESSEN, L., PETERSEN, O. W., UND BISSELL, M. J. 1996. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 76:69–125.
- RODEMANN, H. P. UND MÜLLER, G. A. 1991. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. in vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17:684–686.
- ROSELL, R., SCAGLIOTTI, G., DANENBERG, K. D., LORD, R. V. N., BEPLER, G., NOVELLO, S., COOC, J., CRINÒ, L., SÁNCHEZ, J. J., TARON, M., BONI, C., MARINIS, F. D., TONATO, M., MARANGOLO, M., GOZZELINO, F., COSTANZO, F. D., RINALDI, M., SALONGA, D., UND STEPHENS, C. 2003. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 22:3548–3553.
- ROWAN, S., LUDWIG, R. L., HAUPT, Y., BATES, S., LU, X., OREN, M., UND VOUSDEN, K. H. 1996. Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J* 15:827–838.
- SADLONOVA, A., BOWE, D., NOVAK, Z., MUKHERJEE, S., DUNCAN, V., PAGE, G., UND FROST, A. 2009. Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron* 1:9–21.

- SAINTIGNY, P. UND BURGER, J. A. 2012. Recent advances in non-small cell lung cancer biology and clinical management. *Discov Med* 13:287–297.
- SCHOR, S. L., HAGGIE, J. A., DURNING, P., HOWELL, A., SMITH, L., SELLWOOD, R. A., UND CROWTHER, D. 1986. Occurrence of a fetal fibroblast phenotype in familial breast cancer. *Int J Cancer* 37:831–836.
- SHAO, Z. M., NGUYEN, M., UND BARSKY, S. H. 2000. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene* 19:4337–4345.
- SHCHEMELININ, I., SEFC, L., UND NECAS, E. 2006a. Protein kinase inhibitors. *Folia Biol (Praha)* 52:137–148.
- SHCHEMELININ, I., SEFC, L., UND NECAS, E. 2006b. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol (Praha)* 52:81–100.
- SHEKHAR, M. P. V., SANTNER, S., CAROLIN, K. A., UND TAIT, L. 2007. Direct involvement of breast tumor fibroblasts in the modulation of tamoxifen sensitivity. *Am J Pathol* 170:1546–1560.
- SHIMODA, M., MELLODY, K. T., UND ORIMO, A. 2010. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol* 21:19–25.
- SHURIN, M. R., LU, L., KALINSKI, P., STEWART-AKERS, A. M., UND LOTZE, M. T. 1999. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 21:339–359.
- SIEGEL, R., WARD, E., BRAWLEY, O., UND JEMAL, A. 2011. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 61:212–236.
- SILZLE, T., RANDOLPH, G. J., KREUTZ, M., UND KUNZ-SCHUGHART, L. A. 2004. The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int J Cancer* 108:173–180.
- SKAUG, V., RYBERG, D., KURE, E. H., ARAB, M. O., STANGELAND, L., MYKING, A. O., UND HAUGEN, A. 2000. p53 mutations in defined structural and functional domains are related to poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 6:1031–1037.
- SOENGAS, M. S., CAPODIECI, P., POLSKY, D., MORA, J., ESTELLER, M., OPITZ-ARAYA, X., MCCOMBIE, R., HERMAN, J. G., GERALD, W. L., LAZEBNIK, Y. A., CORDÓN-CARDÓ, C., UND LOWE, S. W. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409:207–211.
- SONNENBERG, M. 2009. Untersuchungen des Einflusses von Chemotherapie auf Tumor-assoziierte Fibroblasten bei Karzinomen der Lunge und Brust *in vivo* und in verschiedenen *ex vivo* Modellen. Dissertation, Institut für Zoologie, Universität Hohenheim.
- SONNENBERG, M., VAN DER KUIP, H., HAUBEISS, S., FRITZ, P., SCHROTH, W., FRIEDEL, G., SIMON, W., MÜRDTER, T. E., UND AULITZKY, W. E. 2008. Highly variable response to cytotoxic chemotherapy in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) from lung and breast. *BMC Cancer* 8:364.
- SOS, M. L., MICHEL, K., ZANDER, T., WEISS, J., FROMMOLT, P., PEIFER, M., LI, D., ULLRICH, R., KOKER, M., FISCHER, F., SHIMAMURA, T., RAUH, D., MERMEL, C., FISCHER, S., STÜCKRATH, I., HEYNCK, S., BEROUKHIM, R., LIN, W., WINKLER, W., SHAH, K., LAFRAMBOISE, T., MORIARTY, W. F., HANNA, M., TOLOSI, L., RAHNENFÜHRER, J., VERHAAK, R., CHIANG, D., GETZ, G., HELLMICH, M., WOLF, J., GIRARD, L., PEYTON, M., WEIR, B. A., CHEN, T.-H., GREULICH, H., BARRETINA, J., SHAPIRO, G. I., GARRAWAY, L. A., GAZDAR, A. F., MINNA, J. D., MEYERSON, M., WONG, K.-K., UND THOMAS, R. K. 2009. Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* 119:1727–1740.

- SOUSSI, T. UND BÉROUD, C. 2001. Assessing tp53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1:233–240.
- SUGIMOTO, H., MUNDEL, T. M., KIERAN, M. W., UND KALLURI, R. 2006. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 5:1640–1646.
- SUZUKI, K. UND MATSUBARA, H. 2011. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* 2011:978312.
- TAMMEMAGI, M. C., MCCLAUGHLIN, J. R., UND BULL, S. B. 1999. Meta-analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:625–634.
- TLSTY, T. D. UND HEIN, P. W. 2001. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 11:54–59.
- TOMIZAWA, Y., KOHNO, T., FUJITA, T., KIYAMA, M., SAITO, R., NOGUCHI, M., MATSUNO, Y., HIROHASHI, S., YAMAGUCHI, N., NAKAJIMA, T., UND YOKOTA, J. 1999. Correlation between the status of the p53 gene and survival in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 18:1007–1014.
- TRIMBOLI, A. J., CANTEMIR-STONE, C. Z., LI, F., WALLACE, J. A., MERCHANT, A., CREASAP, N., THOMPSON, J. C., CASERTA, E., WANG, H., CHONG, J.-L., NAIDU, S., WEI, G., SHARMA, S. M., STEPHENS, J. A., FERNANDEZ, S. A., GURCAN, M. N., WEINSTEIN, M. B., BARSKY, S. H., YEE, L., ROSOL, T. J., STROMBERG, P. C., ROBINSON, M. L., PEPIN, F., HALLETT, M., PARK, M., OSTROWSKI, M. C., UND LEONE, G. 2009. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* 461:1084–1091.
- TRIMIS, G., CHATZISTAMOU, I., POLITI, K., KIARIS, H., UND PAPAVALASSILOU, A. G. 2008. Expression of p21waf1/Cip1 in stromal fibroblasts of primary breast tumors. *Hum Mol Genet* 17:3596–3600.
- TSAO, A. S., LIU, S., FUJIMOTO, J., WISTUBA, I. I., LEE, J. J., MAROM, E. M., CHARNSANGAVEJ, C., FOSSELLA, F. V., TRAN, H. T., BLUMENSCHNEIN, G. R., PAPANIMITRAKOPOULOU, V., KIES, M. S., HONG, W. K., UND STEWART, D. J. 2011. Phase II trials of imatinib mesylate and docetaxel in patients with metastatic non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *J Thorac Oncol* 6:2104–2111.
- TSAO, M.-S., AVIEL-RONEN, S., DING, K., LAU, D., LIU, N., SAKURADA, A., WHITEHEAD, M., ZHU, C.-Q., LIVINGSTON, R., JOHNSON, D. H., RIGAS, J., SEYMOUR, L., WINTON, T., UND SHEPHERD, F. A. 2007. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25:5240–5247.
- TUHKANEN, H., ANTILA, M., KOSMA, V.-M., YLÄ-HERTTUALA, S., HEINONEN, S., KURONEN, A., JUHOLA, M., TAMMI, R., TAMMI, M., UND MANNERMAA, A. 2004. Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *Int J Cancer* 109:247–252.
- VAJPAI, N., STRAUSS, A., FENDRICH, G., COWAN-JACOB, S. W., MANLEY, P. W., GRZESIEK, S., UND JAHNKE, W. 2008. Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J Biol Chem* 283:18292–18302.
- VAN DER KUIP, H., MÜRDTER, T. E., SONNENBERG, M., MCCLELLAN, M., GUTZEIT, S., GERTEIS, A., SIMON, W., FRITZ, P., UND AULITZKY, W. E. 2006. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer* 6:86.

- VEGA, F. J., INIESTA, P., CALDÉS, T., SANCHEZ, A., LÓPEZ, J. A., DE JUAN, C., DIAZ-RUBIO, E., TORRES, A., BALIBREA, J. L., UND BENITO, M. 1997. p53 exon 5 mutations as a prognostic indicator of shortened survival in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 76:44–51.
- VENET, D., DUMONT, J. E., UND DETOURS, V. 2011. Most random gene expression signatures are significantly associated with breast cancer outcome. *PLoS Comput Biol* 7:e1002240.
- VOGELSTEIN, B. 1990. Cancer. a deadly inheritance. *Nature* 348:681–682.
- VOUSDEN, K. H. UND PRIVES, C. 2009. Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell* 137:413–431.
- WAKELEE, H., DUBEY, S., UND GANDARA, D. 2007. Optimal adjuvant therapy for non-small cell lung cancer – how to handle stage I disease. *Oncologist* 12:331–337.
- WANG, W., LI, Q., YAMADA, T., MATSUMOTO, K., MATSUMOTO, I., ODA, M., WATANABE, G., KAYANO, Y., NISHIOKA, Y., SONE, S., UND YANO, S. 2009. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 15:6630–6638.
- WANG, X., HOCHHAUS, A., KANTARJIAN, H. M., AGRAWAL, S., ROY, A., PFISTER, M., CHEN, T., BLEICKARDT, E., NICAISE, C., UND SHAH, N. 2008. Dasatinib pharmacokinetics and exposure-response (E-R): Relationship to safety and efficacy in patients (pts) with chronic myeloid leukemia (CML). *In Journal of Clinical Oncology (ASCO Annual Meeting Proceedings) May 2008, volume 26, No 15S: 3590.*
- WEISBERG, E., MANLEY, P. W., BREITENSTEIN, W., BRÜGGEN, J., COWAN-JACOB, S. W., RAY, A., HUNTLY, B., FABBRO, D., FENDRICH, G., HALL-MEYERS, E., KUNG, A. L., MESTAN, J., DALEY, G. Q., CALLAHAN, L., CATLEY, L., CAVAZZA, C., AZAM, M., MOHAMMED, A., NEUBERG, D., WRIGHT, R. D., GILLILAND, D. G., UND GRIFFIN, J. D. 2005. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 7:129–141.
- WEISBERG, E., MANLEY, P. W., COWAN-JACOB, S. W., HOCHHAUS, A., UND GRIFFIN, J. D. 2007. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 7:345–356.
- WORTHLEY, D. L., RUSZKIEWICZ, A., DAVIES, R., MOORE, S., NIVISON-SMITH, I., TO, L. B., BROWETT, P., WESTERN, R., DURRANT, S., SO, J., YOUNG, G. P., MULLIGHAN, C. G., BARDY, P. G., UND MICHAEL, M. Z. 2009. Human gastrointestinal neoplasia-associated myofibroblasts can develop from bone marrow-derived cells following allogeneic stem cell transplantation. *Stem Cells* 27:1463–1468.
- XUE, W., ZENDER, L., MIETHING, C., DICKINS, R. A., HERNANDO, E., KRIZHANOVSKY, V., CORDON-CARDO, C., UND LOWE, S. W. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445:656–660.
- YU, Q. UND STAMENKOVIC, I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14:163–176.
- ZALMAS, L. P., ZHAO, X., GRAHAM, A. L., FISHER, R., REILLY, C., COUTTS, A. S., UND THANGUE, N. B. L. 2008. DNA-damage response control of E2F7 and E2F8. *EMBO Rep* 9:252–259.
- ZEISBERG, E. M., POTENTA, S., XIE, L., ZEISBERG, M., UND KALLURI, R. 2007. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67:10123–10128.
- ZEISBERG, M., STRUTZ, F., UND MÜLLER, G. A. 2000. Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol* 13 Suppl 3:S111–S120.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Professor Dr. Walter E. Aulitzky für sein unermüdliches Engagement bei der Leitung und Unterstützung unserer Arbeitsgruppe und für Vorträge, die meinen Blickwinkel erweiterten.

Vielen Dank auch an Professor Dr. Peter Scheurich für die Betreuung von Seiten der Universität Stuttgart und sein Interesse an diesem Projekt sowie dem gesamten IZI für die unnachahmliche Atmosphäre bei den Retreats.

Prof. Dr. Matthias Schwab danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation an seinem Institut anfertigen zu können.

Danke, Heiko, für deinen außergewöhnlichen Einsatz, auf Anfrage Rund-um-die-Uhr an 365 Tagen im Jahr, für deine fundierten Anregungen, die dem Projekt Richtung gaben und für die wertvolle Möglichkeit, Privates und Berufliches nach meinen Vorstellungen zu regeln.

Ich danke Maïke Sonnenberg und Kerstin Willecke für die stetige Hilfe, Aufmunterung, Ablenkung und Freundschaft. Und danke für die tolle Vorarbeit und stetige Pflege, die dieses Projekt ermöglicht haben.

Ich danke Jens Schmid für die Kontinuität in der Zusammenarbeit in diesem Projekt, für Diskussionen und für Korrekturen der Projekt-Präsentation.

Ich danke allen „Aulis“ und denen, die die Mittagspausen mit mir geteilt haben für Gespräche über Wissenschaft und den Rest der Welt, ebenso allen, die neben ihren administrativen Aufgaben noch Zeit für ein kurzes Gespräch hatten. Insbesondere danke ich Dr. Peter Fritz, der diese Arbeit auch nach seinem Ruhestand bei pathologischen Fragen begleitete.

Mein Dank gilt auch der Robert Bosch Gesellschaft für medizinische Forschung mbH für die finanzielle Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinem privaten Arbeits-Ermöglichungs-Netz. Hervorheben möchte ich unsere Tagesmütter Erika Kloos und Olha Hene sowie meine zwei regelmäßig-Außerplanmäßigen Kathleen Renz und Patricia Graham.

Mein Leben und damit auch diese Arbeit sind durch meine Familie geerdet. Ich danke meinen Eltern, die meinen Ehrgeiz immer unterstützt haben. Täglich ermöglicht wurde meine Promotion durch meinen Mann, der alles Nicht-Fachliche gemeinsam mit mir organisierte, und durch meine Kinder, die meine Arbeit im Institut und zu Hause vor dem Laptop selbst durch Unterbrechungen noch bereicherten und die täglich erstaunlichen Forschergeist zeigen.