



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

3. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel

**Der Einfluss des p53-Status karzinom-assoziiierter Fibroblasten
auf die Chemosensitivität des
Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinoms**

Frederik Götte

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. I. Ringshausen
2. Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 21.06.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.01.2014 angenommen.

Gewidmet meinen Eltern

Verzeichnisse

Inhaltsverzeichnis	I-III
Abbildungsverzeichnis	IV-V
Abkürzungsverzeichnis	VI-IX

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)	1
1.1.1. Allgemeines	1
1.1.2. Prognose des NSCLC	1
1.2. Protein 53 (p53)	2
1.2.1. Allgemeines	2
1.2.2. p53-Aktivierung	2
1.2.3. Zellzyklusregulation	3
1.3. Tumor-Mikromilieu	5
1.3.1. Allgemeines	5
1.3.2. Karzinomassoziierte Fibroblasten (CAF) im Mikromilieu	5
1.3.3. Tumor-Stroma Interaktion	6
1.3.4. Verändertes p53 in der Tumor-Stroma-Interaktion	7
1.3.5. Auswirkungen des Mikromilieus auf das Tumorwachstum	9
1.3.6. Auswirkungen des Mikromilieus auf die Metastasierung	10
1.3.7. Auswirkungen des Mikromilieus auf die Chemosensitivität von Tumoren	10
1.4. Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)	10
2. Fragestellung	12
3. Material	13
3.1. Allgemeine Materialien	13
3.2. DNS-Gewinnung	14
3.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	15
3.4. Gelelektrophorese	15
3.5. Zellkultur	16
3.6. Durchflusszytometrie	17
3.7. Histologie	18
3.8. Bakterientransformation/Transfektion	18

4. Methoden	19
4.1. Trp53 ^{KI/KI} -Mausmodell	19
4.2. Gewinnung embryonaler Mausfibroblasten (MEFs)	19
4.3. Genotypisierung	20
4.3.1. Präparation von Gewebe zur Genotypisierung	20
4.3.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR) für p53 knock-in	21
4.3.3. Gelelektrophorese	21
4.4. Zellkultur	22
4.4.1. Zellkultivierung	22
4.4.2. Splitten von Zellen	22
4.4.3. Zellzählung/Trypanblau-Färbung	23
4.4.4. Einfrieren von Zellen	23
4.5. Durchflusszytometrie	24
4.5.1. Allgemeine Funktionsweise	24
4.5.2. Zellfärbung mit Propidiumiodid (PI)	25
4.5.2.1. Methodische Grundlage	25
4.5.2.2. Durchführung	25
4.6. Zellzyklusmessung per Durchflusszytometrie	26
4.6.1. Theoretische Grundlage	26
4.6.2. Zellfixierung	26
4.6.3. Zellfärbung	27
4.7. Histologische Aufarbeitung der Lungenpräparate	27
4.7.1. Fixierung der Lungenpräparate	27
4.7.2. Hämalaun-/Eosin-Färbung	27
4.8. Bakterientransformation	28
5. Ergebnisse	29
5.1. In vivo Tumormodell	29
5.2. Etablierung einer Co-Kultur aus MEFs und LLC-Zellen	32
5.2.1. Problematik	32
5.2.2. Calcein-Acetoxy-methylester	33
5.2.3. Calceinfärbung MEFs	33
5.2.4. Chemotherapeutische Behandlung der Tumorzellen in vitro	34
5.2.4.1. Auswahl Chemotherapeutika	34
5.2.4.2. Titration der notwendigen Konzentration für die chemotherapeutische Behandlung der LLC-Zellen/Chemosensitivität	35
5.2.5. Chemosensitivität der MEFs	38
5.3. Cokultur-Versuche	40
5.3.1. Auswertung nach PI-Färbung	40
5.3.2. Simultane Zellzyklusmessung zweier Zellpopulationen aus der Cokultur	41
5.4. Ergebnisse der Cokultur	43
5.4.1. Geringere Apoptose der LLC-Zellen durch Cokultivierung	43
5.4.2. P53-Defizienz im Stroma erhöht Chemosensitivität der LLC-Zellen	45

6. Diskussion	48
6.1. Einfluss des Mikromilieus auf die Chemosensibilität	48
6.2. Möglicher Selektionsdruck gegen p53 im Stroma und Auswirkung auf die Chemosensitivität	50
6.3. Weitere Versuche und Ausblick	52
7. Anhang	54
7.1. Zusammenfassung	54
7.2. Literaturverzeichnis	56
7.3. Curriculum	63
7.4. Danksagung	64

VI. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1** Unabhängige Aktivierung von p53 über Onkogene oder Stresssignale
(aus Prives et al., 1998)
- Abb.2** Unterschiedliche Wege nach DNS-Schaden zur Apoptose oder einer DNS-Reparatur (aus Fei et al., 2003)
- Abb.3** Gegenseitige Beeinflussung von Epithel und Stroma
(aus Hill et al., 2005-2)
- Abb.4** Genotypisierung
- Abb.5** Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers
(aus Sack et al., 2007)
- Abb.6** Absorption und Emissionsspektrum Propidiumiodid (6a. aus Invitrogen, Datasheet)/Lebend-tot-Diskriminierung der LLC-Zellen mittels PI als PI/SCS aus der Cokultur
- Abb.7** Histogramm Zellzyklus und DNS-Gehalt im Verlauf des Zellzyklus
(a. entnommen aus Datasheet „Nucleocounter 300, IUL-Instruments“, b. aus <http://www.cobocards.com/pool/en/card/1497784/online-karteikarten-dna-gehalt-einer-zelle-im-verlauf-des-zellzyklus>; aufgerufen am: 10.10.2012)
- Abb.8** Überschneidung LLC-Zellen/MEFs im FACS. Darstellung
Im Histogramm als Überlagerung
- Abb.9** Unspezifische Abspaltung der Acetoxymethylestergruppe durch zytoplasmatische Esterasen und folgende grüne Fluoreszenz bei 516nm Wellenlänge
(9a. aus Datasheet Calcein-AM, Anaspec, 9b. aus Datasheet: Calcein-AM, life technologies)
- Abb.10** Messung der grünen Fluoreszenz mit Calcein-AM gefärbten MEFS (rechter Peak) im Vergleich zu ungefärbten MEFS (linker Peak) im FL-1-Kanal des FACS (FITC-Kanal) nach 24h, 48h und 72h
- Abb.11** Beispielhafte Auswertung Zellzyklus LLC-Zellen nach 48h ohne Zytostatika (Kontrollmessung)
- Abb.12** Behandlung LLC-Zellen mit Cisplatin und Zellzyklusdarstellung
- Abb.13** Behandlung LLC-Zellen mit Paclitaxel und Zellzyklusdarstellung
- Abb.14** Chemosensibilität MEFs nach 24 Stunden

- Abb.15** Beispielhafte Auswertung der Cokultur-Daten
- Abb.16** Simultane Zellzyklusmessung zweier Zellpopulationen aus der Cokultur
- Abb.17** Vergleichsmessung LLC-Zellen allein und in Cokultur mit Wildtyp-MEFs nach 24 Stunden
- Abb.18** Vergleichsmessung LLC-Zellen allein und in Cokultur mit Wildtyp-MEFs nach 48 Stunden
- Abb.19** Vergleichsmessung LLC-Zellen allein und in Cokultur mit Wildtyp-MEFs nach 72 Stunden
- Abb.20** Vergleichsmessung Trp53^{KI/KI}-MEFS nach 24 Stunden behandelt mit und ohne 4-OHT
- Abb.21** Vergleichsmessung Trp53^{KI/KI}-MEFS nach 48 Stunden behandelt mit und ohne 4-OHT
- Abb.22** Vergleichsmessung Trp53^{KI/KI}-MEFS nach 72 Stunden behandelt mit und ohne 4-OHT
- Abb.23** Überlebenszeit der Mäuse nach verschiedenen Tumorimplantationsmethoden
- Abb.24** Lungenpräparate 3 Wochen nach Injektion von 10⁵ LLC-Zellen
- Abb.25** Lungenpräparate 3 Wochen nach Injektion von 10⁴ LLC-Zellen

VII. Abkürzungsverzeichnis

4-OHT:	4-Hydroxytamoxifen
5-JÜR:	5-Jahres-Überlebensrate
14-3-3:	14-3-3 zeta:serotonin N-acetyltransferase complex

A

ABL:	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADR:	Acquired drug resistance
Apaf1:	Apoptotic protease activating factor 1
ARF:	Alternative reading frame
ASMA:	Alpha-smooth-muscle actin
ATM:	Ataxia telangiectasia mutated

B

Bid:	BH3 interacting-domain death agonist
------	--------------------------------------

C

CAF:	Cancer associated fibroblast
CAM-DR:	Cell-adhesion-molecule mediated drug resistance
CO ₂ :	Kohlenstoff-Dioxid
CXCR4:	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; SDF-1-Rezeptor

D

dATP:	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP:	Desoxycytidintriphosphat
dGTP:	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNS:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribunukleotid Triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DR5:	Tumor necrosis factor receptor superfamily
dTTP:	Desoxythymidintriphosphat

E

E1a:	Adenovirales Protein
E2F1:	Transkriptionsfaktor
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EM-DR:	Environmental-mediated Drug-resistance
EMT:	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EZM:	Extrazelluläre Matrix

F

FBS:	Fetal Bovine Serum, Fetales Kälberserum
FCS:	Forward scatter

G

G1-Phase:	Gap-1-Phase
G2-Phase:	Gap-2-Phase
Gadd45:	Growth Arrest and DNA Damage- Gen
GFP:	Grün-fluoreszierendes Protein
Gy:	Gray

H

HGF:	Hepatocyte growth factor
HNPCC:	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer

I

IL-6, IL-8:	Interleukin-6, -8
-------------	-------------------

K

KI67:	Protein zur Markierung sich teilender Zellen
KO:	Knock-out

L

LLC:	Lewis-lung carcinoma
------	----------------------

M

Mdm-2:	Murine double minute (Onkogen)
MEF:	Embryonale Mausfibroblasten
MgCl:	Magnesium-Chlorid
miR200c:	Mikro-RNA 200c
ml:	Milliliter
mM:	Millimolar
MM:	Mikromilieu
MMP:	Matrix-Metallo-Proteinasen
mPIN:	Intraepitheliale Neoplasien der Prostata
Myc:	Protoonkogen, kodiert für C-Myc
µl:	Mikroliter

N

N ₂ :	Stickstoff
NaCl:	Natrium-Chlorid
nM:	Nanometer
Noxa:	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NSCLC:	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom

P

p19,-21,-53:	Protein 19, -21,-53
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
PI:	Propidium-Jodid
PK:	Proteinkinase
PS:	Penicillin + Streptomycin
PUMA:	p53-up-regulated modulator of apoptosis

R

Rb:	Retinoblastom-Gen
RNA:	Ribonukleinsäure

S

SCLC: Small-cell lung cancer
SDF-1: Stromal cell-derived factor-1
S-Phase: Synthese-Phase
SSC: Side scatter
SV40: Simian-Virus 40

T

TAE-Puffer: Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TgAPT₁₂₁: 121-N-terminales Fragment des SV40 large T Antigen
TGF- β : Transforming growth factor- β

U

U/min: Umdrehungen pro Minute
UV: Ultra violett

V

VLA-1: Very large antigen-1

W

WT: Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)

1.1.1. Allgemeines

Mit etwa 34.000 Neuerkrankungen pro Jahr bei Männern und 15.500 bei Frauen stellt das Bronchialkarzinom die dritthäufigste Krebserkrankung in Deutschland dar. Mit einem Anteil von 26% handelt es sich bei Männern um die häufigste, bei Frauen mit 13% um die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (*Robert Koch Institut, 2012*). Rauchen ist in der Europäischen Union für etwa 85% der Lungenkrebstodesfälle (91% bei Männern, 65% bei Frauen) ursächlich (McNeill et al., 2004) und liegt damit in der Häufigkeit noch weit vor Risiken wie Passivrauchen, Umweltnoxen und anderen Noxen als wichtigste Risikofaktoren für die Entstehung von Bronchialkarzinomen (*Goeckenjan et al., 2010*).

Etwa 85% der Bronchialkarzinome sind nicht-kleinzellig und lassen sich noch weiter in verschiedene histologische Untertypen einteilen, wobei als häufigste das Plattenepithelkarzinom (ca. 40%), das Adenokarzinom (ca. 35%) sowie das großzellige Bronchialkarzinom (10%) zu nennen sind. Das kleinzellige Bronchialkarzinom hat einen Gesamtanteil von 15% in der histologischen Häufigkeit der Bronchialkarzinome.

1.1.2. Prognose des NSCLC

In sehr frühem Stadium (IA) liegt die 5-Jahres-Überlebensquote (5-JÜR) bei etwa 50%. Bei größerem Lokalbefund (IB) sinkt sie bereits auf etwa 40%. Mit zusätzlich positivem Lymphknotenbefund (II) beträgt sie noch etwa 25%. Im Stadium IV wird die 5-JÜR mit etwa einem Prozent angegeben (*Mountain et al., 1997*).

1.2. Protein 53 (p53)

1.2.1. Allgemeines

In etwa der Hälfte aller Tumoren inaktiviert, spielt p53 als Tumorsuppressorgen eine zentrale Rolle in der Entstehung von Tumoren (*Soussi et al., 2007*). Schon frühe Studien mit p53-defizienten Mäusen konnten zeigen, dass ein völliges Fehlen von p53 eine normale Entwicklung erlaubt, im Verlauf jedoch zu Neoplasien prädisponiert (*Donehower et al., 1992*).

Ohne Einwirkung von Zellstress herrscht in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen p53 und seinem Gegenspieler Mdm-2, welcher zu proteasomalem Abbau von p53 führt (*Michael et al., 2003*). Nach langjähriger Forschungsanstrengung zu p53 wurde ein komplexes System von Induktion und Suppression in der Zelle, gerade in Zusammenhang mit DNS-Schäden, entdeckt. Eine Besonderheit dieses Regulationssystems ist es, die Zelle insbesondere nach DNS-Schäden entweder in Richtung Apoptose oder den Zellzyklusarrest leiten zu können.

1.2.2. p53-Aktivierung

Die p53-Aktivierung wird von einer Fülle von Stresssignalen, wie zum Beispiel genotoxischem Stress, onkogener Aktivierung, dem Verlust von normalem Zell-Zell-Kontakt und Hypoxaemie ausgelöst (*Vousden et al., 2009*). Als Folge ist eine erhöhte Gentranskription sowie ein verminderter Ubiquitin-abhängiger Abbau des Proteins beschrieben.

Zur Aktivierung des Proteins kommt es durch Phosphorylierung- beispielsweise durch das ATM-Protein (Ataxia telangiectasia mutated protein).

Weiterhin sind DNS-abhängige Poteinkinasen (DNA-PK), welche durch DNS-Schädigung aktiviert werden, an der Veränderung des Proteins 53 beteiligt. Als deren Substrat wird die amino-terminale Region von p53 verändert, welche die Interaktion mit dem Transkriptionsapparat der Zelle und Mdm-2 kontrolliert.

Die Transkription des Mdm-2-Gens ist p53-abhängig. Bei hohem p53-Gehalt in der Zelle wird folglich die Menge an Mdm-2 erhöht, was ein Gleichgewicht zwischen den beiden Proteinen zur Folge hat. Dieser Mechanismus erklärt auch, weshalb mutiertes p53 in der Zelle aus dem daraus folgendem Mangel an Mdm-2 stabil ist (*Lane, 1998*).

Ein weiterer Aktivierungsweg stellt die onkogene Aktivierung von p53 dar. Für p14ARF (Alternative reading frame) konnte eine dem p53 übergeordnete Bedeutung nachgewiesen werden, wobei p14ARF p53 unabhängig von DNS-Schäden regulieren kann. ARF selbst wird beispielsweise über das Retinoblastom-Gen (Rb) induziert (*Prives, 1998*).

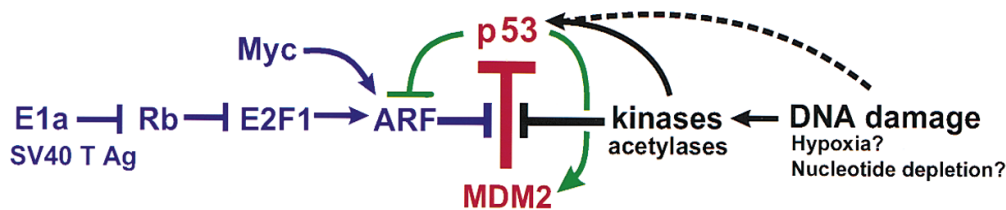


Abb.1 Unabhängige Aktivierung von p53 über Onkogene oder Stresssignale

1.2.3. Zellzyklusregulation

Einige Studien sprechen dafür, dass p53 für eine G1-DNS-Schäden-Checkpoint Funktion gebraucht wird (*u.a. Prives et al., 1999*). Stabilität des Proteins und Aktivität als Transkriptionsfaktor scheinen infolge eines DNS-Schadens erhöht zu sein. Als Grund hierfür gelten post-translationale Modifikationen, die die Interaktionen zwischen Mdm-2 und p53 stören und p53 vor einer Ubiquitin-vermittelten Proteolyse bewahren. Ein G1-Phasen-Arrest, gerade als Antwort auf Bestrahlung, resultiert aus einer Transaktivierung von p21^{Waf1} durch WTp53, was G1- cyclinabhängige Kinasen inhibiert und somit einen Eintritt in die S-Phase verhindert (*Fei et al., 2003*).

Ein weiteres wichtiges Molekül im Zusammenhang mit p53 und der Zellzyklusregulation stellt ATM dar. Durch Phosphorylierung von p53 oder c-ABL, was wiederum in einer Hochregulierung von p21 resultiert, zeigt sich hier ein weiterer Mechanismus zur Zellzyklusregulierung (*Dasika et al., 1999*). Die Induktion einer p21-Expression ist selbst für geringe Level von p53 sehr empfindlich. Dies führt dazu, dass die Zelle bei geringem Schaden über einen temporären G1-Block Zeit bekommt den Schaden zu beheben, ohne abzusterben. Ebenfalls eng mit der p53-abhängigen Aktivierung von p21 verknüpft ist der dauerhafte Zellzyklusarrest, die sog. „Senescence“ (*Vousden et al., 2009*).

Auch bei Durchlaufen des G2-Phase-Checkpoint spielen p53-vermittelte Reaktionen eine Rolle, wobei hier eher eine Verstärkung von anderen Zellzyklusregulationsmechanismen durch p53 anzunehmen ist, da dieser Effekt auch bei p53-Knockout beobachtet werden kann (*Passalaris et al., 1999*).

Nach Schädigung der DNS wird der Gehalt an p53 in der Zelle innerhalb von Minuten erhöht und erste Apoptosevorgänge innerhalb von wenigen Stunden eingeleitet (*Clarke et al., 1993*). Dabei fällt eine wichtige Entscheidung: Apoptose oder Zellzyklusarrest und DNS-Reparatur. Entscheidend für eine der beiden Alternativen sind die spezifische postranslationale Modifikation und/oder beteiligte Proteine.

In der nachfolgenden Graphik soll ein Überblick zur Antwort auf DNS-Schäden im Hinblick auf p53 und dessen Verschaltung gegeben werden.

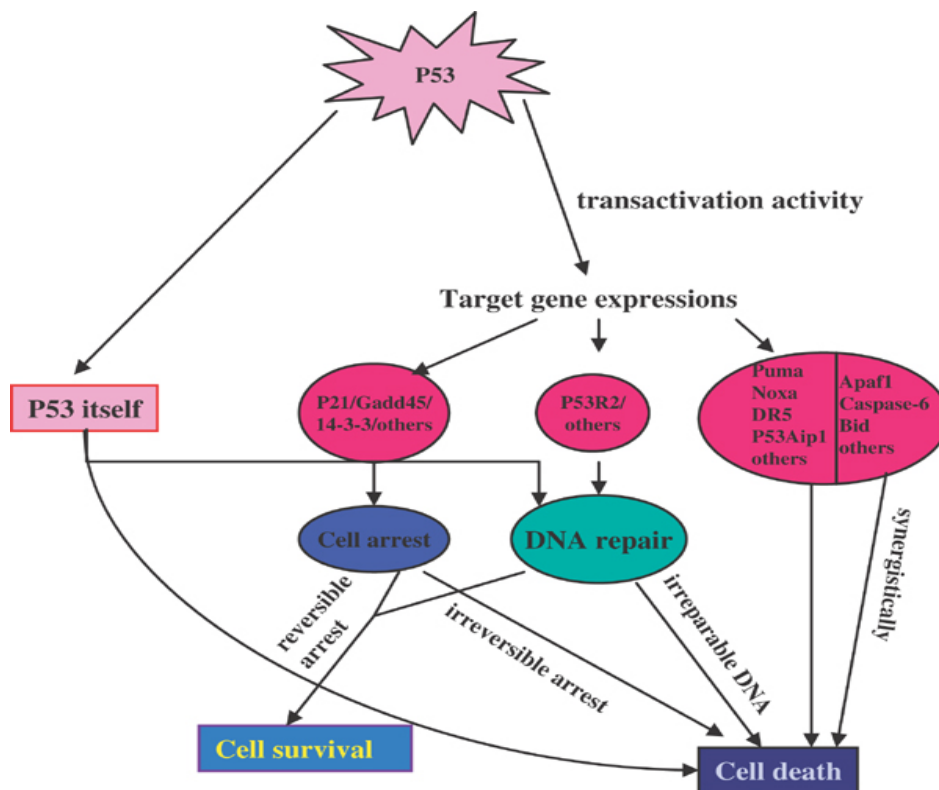


Abb.2 Unterschiedliche Wege nach DNS-Schaden zur Apoptose oder einer DNS-Reparatur

1.3. Tumor-Mikromilieu

1.3.1. Allgemeines

Das Mikromilieu (MM) ist ein komplexes Gebilde, das Tumorzellen genauso wie nicht-maligne Zellen umgibt. Es setzt sich aus der Extrazellulären Matrix (EZM) sowie diffusionsfähigen Wachstumsfaktoren und Zytokinen zusammen. Weiterhin sind nicht-epitheliale Zelltypen Bestandteile des MM; Zum einen vaskuläre Zelltypen, wie Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen und Zellen, die bei Infektionen und Verletzungen eine Rolle spielen, wie zum Beispiel Lymphozyten, Makrophagen oder Mastzellen. Zum anderen sind Fibroblasten ein wichtiger Bestandteil des MM, die im Zusammenhang mit Tumoren auch als karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAF) bezeichnet werden, um deren besondere Bedeutung im Hinblick auf die Tumor-Stroma-Interaktion zu betonen (z.B. *Tlsty et al., 2001; Addadi et al., 2010*).

Als vorherrschende Zellart im Stroma sind Fibroblasten als Ursprung für einen Großteil der Bestandteile des Bindegewebes zu betrachten. Wichtige Beispiele hierfür sind verschiedene Arten von Kollagenen, proteolytische Enzymen und Inhibitoren, Wachstumsfaktoren sowie Proteoglykane (*Sappino et al., 1990*). In verschiedenen Organen zeigen Fibroblasten unterschiedliche Variationen der eben genannten Moleküle.

1.3.2. Karzinomassoziierte Fibroblasten (CAF) im Mikromilieu

In pathologischen Untersuchungen zeigten Fibroblasten und die von ihnen sezernierten Moleküle gerade in direkter Nachbarschaft von Tumoren spezifische Veränderungen.

Erste Beobachtungen ergaben eine gesteigerte Fibroblastenproliferation, eine erhöhte Menge an Kollagen und eine alpha Glatt-Muskel Aktin (α -SMA) Vermehrung in der Umgebung von Tumorzellen, was insgesamt als Desmoplasie bezeichnet wird und vermuten ließ, dass tumorbedingte Vorgänge in den Fibroblasten ausgelöst wurden. Die desmoplastische Reaktion gilt als ein verbreiteter Aspekt für die Progression solider Tumoren wie Mamma-, Prostata-, Colon- und Bronchial-Karzinom (*Sappino et al., 1990*). Häufig wird sie auch von einer inflammatorischen Reaktion begleitet. Ein spezifisches Sezernierungsmuster, wie es auch bei

Wundheilung und Inflammation beobachtet werden kann, zeigte sich mit Vermehrung von den o.g. Komponenten α -SMA, Vimentin, Glattmuskel-Myosin, Calponin, Tenascin und Desmin. Diese gemischte Sezernierung von Glattmuskelmolekülen zusammen mit einer erhöhten Produktion von Kollagen Typ III und V im Umfeld des Tumors führte dazu, dass den Fibroblasten der Name Myofibroblasten (im Weiteren im Begriff Karzinom-assoziierte Fibroblasten einbegriffen) gegeben wurde. Besonders interessant hierbei war jedoch, dass Laminin- ein Indikator für die Unversehrtheit von Gewebe- in CAFs reduziert und verändert vorgefunden wurde (*van den Hooff, 1988*), was eine direkte Beeinflussung durch ihre Umgebung, wie es durch bei einem inflammatorischen Prozess der Fall ist, vermuten lässt.

Nach Entfernen von Tumorgewebe zeigten CAFs eine Veränderung des Phänotypes (*Bauer et al., 1979; Knudson et al., 1984*), ein unkontrolliertes Wachstum und unorganisierte Wachstumsmuster in Zellkultur (*van den Hooff, 1988*).

Weiterhin gelang es in Haut-Fibroblasten von Patienten mit hereditären non-polypösen kolorektalen Tumoren (HNPCC) ein verändertes Wachstumsmuster und eine veränderte Aktinanordnung in vitro nachzuweisen (*Antecol et al., 1986*). Diese Beobachtungen zeigen, dass der durch Tumorzellen im Mikromilieu bedingte Einfluss, dauerhafte Veränderungen in den umliegenden Zellen bewirkt und dieser auch nach Entfernung des Tumorgewebes fortbesteht.

1.3.3. Tumor-Stroma-Interaktion

Atula et al. (*Atula et al., 1997*) verglichen die Auswirkungen von tumorassoziierten Fibroblasten auf epitheliale Zellen in einem dreidimensionalen Cokultur-Modell. Epithelzellen wurden hier aus dem Plattenepithelkarzinom des Larynx gewonnen, welche p53 mutiert waren. Tumorassoziierte Fibroblasten gewann man aus dem Tumorpräparat und zum Vergleich Fibroblasten aus einer Hautbiopsie desselben Patienten.

In morphologischen Untersuchungen zeigten sich die ausgeprägtesten Dysplasien in Epithelzellen nach direktem Kontakt mit CAFs. Die Zellen zeigten sich pleomorph, die Kern-Zytoplasma-Relation war erhöht und es zeigten sich Veränderungen in der Mitose. Nach Cokultur mit Haut-Fibroblasten zeigten die Epithelzellen eine nur geringe Veränderung bezüglich der Mitose. Die Zellkultur ohne Anwesenheit von Fibroblasten zeigte den am ehesten benignen Phänotyp.

Diese Widersprüchlichkeit im Hinblick auf die Interaktion des Tumors mit dem Fibroblasten, zum einen eine supportive Funktion durch die CAFs und zum anderen eine eher gegenteilige Entwicklung des Tumors durch „normale“ Fibroblasten, wurde schon früher beschrieben. Cornil et al. (Cornil et al., 1991) zeigten, dass frühe Stadien des Melanoms durch Kontakt zu normalen Haut-Fibroblasten in vitro im Wachstum gehemmt werden, wohingegen fortgeschrittene, potentiell metastasierungsfähige Melanomzellen durch die Cokultur mit Fibroblasten im Wachstum unterstützt werden. Ähnliches konnten auch für das Urothel- und papilläre Blasenkarzinom gezeigt werden (Pritchett et al., 1989).

Einen Schritt weiter gingen Aria et al. (Aria et al., 1999) und untersuchten den Effekt von CAFs (aus einem Adenokarzinom der Prostata gewonnen) auf normales humanes Prostatagewebe. Sie konnten nach Cokultivierung der Zellarten histologisch eine intraepitheliale Neoplasie der Prostatzellen feststellen.

Der Kontakt zur Tumorzelle scheint folglich die CAFs so zu beeinflussen, dass sie selbst andere Zellen hin zur Malignität beeinflussen können.

1.3.4. Verändertes p53 in der Tumor-Stroma-Interaktion

Die Aktivierung des WT p53 in Zellen als Antwort auf DNS-Schäden gilt als typisch (MacCallum et al., 1996; Lutzker et al., 1996). Wie sich ein verändertes p53 in Tumorzellen jedoch auf selbiges in den umgebenden Stromazellen auswirkt, konnte im Verlauf beobachtet werden.

Mehrere Studien an humanem Gewebe haben das Stroma des Mammakarzinoms (Moinfar et al., 2000; Wernert et al., 2001; Kurose et al., 2001; Fukino et al., 2004), des Kolonkarzinoms (Wernert et al., 2001; Matsumoto et al., 2003), des Ovarialkarzinoms (Tuhkanen et al., 2004) und des Blasenkarzinoms (Paterson et al., 2003) untersucht und konnten zeigen, dass p53 im Stroma mutiert war.

Wie aber genau die Auswirkungen eines p53-mutierten Stromas auf den Tumor oder auf andere Systeme sind, beleuchtete eine weitere Studie (Hill et al., 2005-2), die das Stroma von Prostatakarzinomen im Mausmodell auf genau dieses Phänomen hin untersuchte.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich entnehmen, dass Tumorzellen einen direkten Einfluss auf den p53-Status in den sie umgebenden Stromazellen haben und hier eine Art Selektionsdruck im Mikromilieu des Tumors gegen p53 entsteht.

Hill et al. (Hill et al., 2005-1) etablierten ein Mausmodell, bei dem TgAPT₁₂₁-Mäuse durch Inaktivierung von pRb und weiteren Proteinen ausgeprägte intraepitheliale Neoplasien der Prostata (mPIN) entwickelten. Nach 4 Monaten entstanden in allen Mäusen aus mPIN-Läsionen microinvasive Adenokarzinome. Weiterhin unterschieden sich die Mäuse im p53-Genotyp als entweder p53-defizient (p53^{-/-}), heterozygot (p53^{+/-}) oder Wildtyp (p53^{+/+}). Alle Mäuse zeigten ein massives Tumorstromawachstum, wobei in p53^{-/-}-Mäusen ein schnelleres Wachstum und ein hyperzelluläres Mesenchym histologisch beobachtet werden konnte. Die Hypothese der Autoren, dass eine gesteigerte Proliferation in den stromalen Fibroblasten vom p53-Status im Tumor beeinflusst wird, wurde mittels Ki67-Immunfluoreszenz (ein zellulärer Marker für Zellproliferation) versucht nachzuweisen. Es zeigten sich proliferierende Zellen im Stroma von p53-defizienten Tumoren, während zu dieser Zeit (Mäuse 2 Monate alt) in wildtyp und heterozygoten Tumoren nur wenig proliferierende Zellen auszumachen waren. Hingegen schien eine Induktion von p53 im Stroma zu einer unterdrückten Proliferation der Fibroblasten zu führen. Diese Beobachtung konnte mithilfe von PCR-Untersuchungen bestätigt werden.

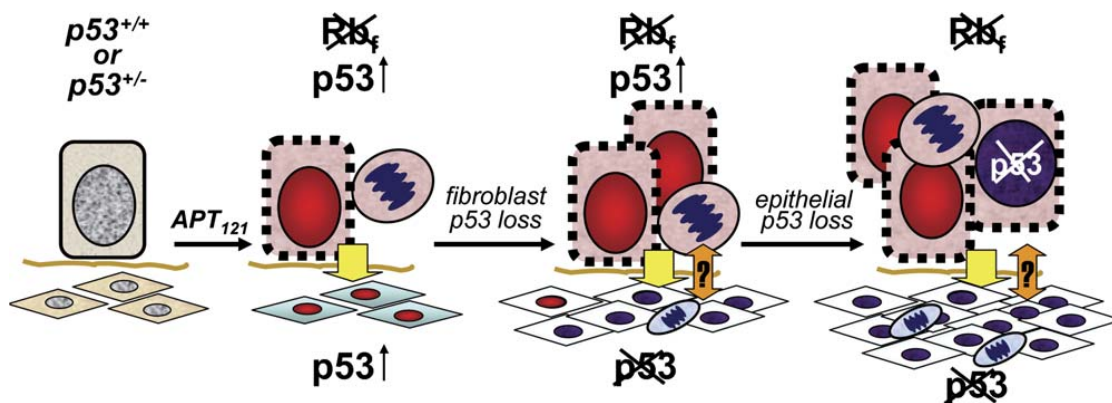


Abb.3 Gegenseitige Beeinflussung von Epithel und Stroma
Zellzyklusstörung durch pRb-Inaktivierung (Mitosefigur) lösen eine p53-Erhöhung in Epithelzellen und Fibroblasten aus. Durch Epithelzellen provoziert, wird in Fibroblasten eine p53-abhängige Wachstumshemmung ausgelöst (gelber Pfeil) was wiederum einen Selektionsdruck gegen die p53-Funktion auslöst. Bei Verlust von p53 proliferieren die Fibroblasten, wie im Text beschrieben. Im Verlauf kann ein p53-Verlust in einigen Epithelzellen beobachtet werden (orangefarbener Pfeil), wobei der genaue Patho-Mechanismus nicht völlig klar ist.

Außerdem konnten die Autoren der Studie einen p53-Verlust in einigen Epithelzellen nachweisen, der entweder stochastisch bedingt oder die Folge eines bislang unbekanntes Selektionsdruckes ausgehend von p53-mutierten Fibroblasten ist.

Es findet folglich eine Art Dialog zwischen dem Tumor und dem Stroma statt.

Die genauen Mechanismen, welche den p53-Verlust im Epithel bedingt durch die Fibroblasten erklären würden, sind jedoch noch unklar.

1.3.5. Auswirkungen des Mikromilieus auf das Tumorwachstum

Eine Deletion von p53 im Stroma eines Tumors konnte auch im Mausmodell mit Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden (*Kiaris et al., 2005*). Um den Einfluss anderer Zellen aus dem Stroma auf das Tumorwachstum einzugrenzen, wurden die Mamma-Ca-Zellen mit Fibroblasten unterschiedlichen p53-Genotypes suspendiert und subcutan in immundefiziente Mäuse injiziert. Passend zur Hypothese, ermöglichten p53^{-/-}-Fibroblasten es dem Tumor schneller und aggressiver zu wachsen. Im Vergleich zum Wildtypstroma konnte außerdem eine geringere Apoptose im TUNEL-Assay (Anfärbung des Zellkerns apoptotischer Zellen) beobachtet werden. Eine ähnliche supportive Funktion von CAFs auf das Wachstum von Prostatakarzinomen wurde von Cunha et al. (*Cunha et al., 2003*) beschrieben.

Es zeigt sich folglich, dass sich der p53-Verlust im Stroma wiederum als wachstumsfördernd für den Tumor erweisen kann.

1.3.6. Auswirkungen des Mikromilieus auf Metastasierung

Neben dem oben beschriebenen Support auf das Tumorwachstum selbst zeigt sich in verschiedenen Studien ein zusätzlicher wichtiger Modus: ein positiver Einfluss des Mikromilieus auf die Metastasierung von Tumoren. Bei Untersuchungen zum Verlust von E-Cadherin auf Epithelzellen während der Entstehung von Neoplasien konnte dem Molekül eine Funktion als Tumorsuppressor nachgewiesen werden (*Christofori et al., 1999*), wobei der Verlust ein stärker invasives Wachstum sowie eine frühere Metastasierung zur Folge hatte. Ein weiterer Mechanismus wurde von Kang et al. (*Kang et al., 2009*) aufgedeckt. Erhöhte Expression von Prosaposin in einer Tumorzelllinie reduziert gleichzeitig ihr Metastasierungspotential. Eine Injektion von Prosaposin in die Prostata von Mäusen führte nicht nur zu einer Induktion von p53

lokal im Stroma von Prostatakarzinomen, sondern gleichzeitig auch in der Lunge der Maus, also eine entfernte „Gegenmaßnahme“.

Folglich kann ein lokales Tumorgeschehen nicht nur lokal sondern auch in entfernten Organen Veränderungen auslösen und somit Metastasierung erleichtern oder erschweren. Kaplan et al. (*Kaplan et al., 2006*) bezeichnen die entfernte Veränderung im Zusammenhang mit Versuchen im Knochenmark als „prämetastatische Nische“. Hier zeigt sich eine mögliche Folge des in dieser Arbeit thematisierten lokalen Geschehens.

1.3.7. Auswirkungen des Mikromilieus auf die Chemosensitivität von Tumoren

Die bisherigen Beobachtungen, dass ein p53-defizientes Stroma das Tumorwachstum beschleunigt und die Invasivität sowie die Metastasierung unterstützt, wird von einigen Studien noch um einen weiteren Aspekt ergänzt.

Bei Koinjektion von Tumorzellen (Prostata- und Mammakarzinomzellen) mit WT-Fibroblasten unter die Haut von Mäusen zeigte sich ein langsames Wachstum des Tumors verglichen mit Tumoren, die mit p53^{-/-}-Fibroblasten injiziert wurden.

Als die Tumoren der Mäuse palpabel waren, begannen die Autoren der Studie (*Lafkas et al., 2008*) sie mit einer kombinierten Chemotherapie bestehend aus Doxorubicin und Cisplatin zu behandeln. Trotz eines schnelleren Wachstums zusammen mit p53^{-/-}-Fibroblasten, war das Ansprechen des Tumors auf Zytostatika hier höher als bei WT-p53-Stroma. Um diesen Effekt besser zu verstehen, wurden Fibroblasten chemotherapeutisch vorbehandelt und deren Medium anschließend auf Tumorzellen übertragen. Zusammen mit Medium von WT-Fibroblasten wuchsen Tumorzellen schneller als mit dem Medium von p53^{-/-}-Fibroblasten, was auf die p53-abhängige Sekretion von Wachstumsfaktoren der WT-Fibroblasten nach chemotherapeutischer Behandlung hindeutete.

1.4. Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)

Im Verlauf der embryonalen Entwicklung zeigen Epithelien verschiedene Veränderungen. In den meisten Metazoen können sie reversibel oder irreversibel in mesenchymale Zellen durch EMT umgewandelt werden (*Gilbert, 1997*). Während dieser Transition nehmen mesenchymale Zellen eine Morphologie an, die für die

Migration in ihre extrazelluläre Umgebung und die Besiedlung von Bereichen, die an der Organogenese beteiligt sind, nötig ist.

Dieser Mechanismus ist für die Entwicklung des Herzens, des muskuloskeletalen Systems, vieler craniofazialer Strukturen und des peripheren Nervensystems verantwortlich.

Gleichzeitig ließ sich dieser Mechanismus *in vitro* auch bei Karzinomzellen beobachten und viele Parallelen zwischen embryonaler Entwicklung, Gewebekulturen und Tumorentwicklung konnten bezüglich EMT gezeigt werden. Ein Zusammenhang zwischen einer veränderten EMT-Aktivierung und einem positiven Einfluss auf die Tumorentwicklung sowie Metastasierung ließ sich bereits vor einigen Jahren zeigen (*Polyak et al., 2009*). Jüngere Ergebnisse zeigen eine Korrelation zwischen p53 und der EMT (*Chang et al., 2011*). Dieser Effekt wird auch in der Arbeit von Hill et al. (*Hill et al., 2005-2*) als möglicher Modus der beschriebenen Ergebnisse diskutiert. Bei der Annahme, dass ein p53-defizientes Stroma entweder durch Mutation und Selektion oder EMT entstehen kann, zeigten die Autoren eine fehlende Oberflächenexpression von EMT-typischen Markern und ein fehlendes histologisches Korrelat, was die beschriebenen Ergebnisse zusätzlich untermauerte.

2. Fragestellung

Nachdem die onkologische Forschung lange Zeit hauptsächlich auf den Tumor selbst bezogen war, ist in den letzten Jahren die Rolle des Tumor-Mikromilieus immer häufiger in das Zentrum des Interesses gerückt und zum Thema verschiedener Untersuchungen geworden.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Funktion von p53 im Mikromilieu und sein Einfluss auf das Tumorwachstum sowie die stromaabhängige Chemosensitivität der Tumorzellen.

Die zentrale Fragestellung hier ist, in welchem Maße der p53-Status der Stromazellen die Chemosensitivität von NSCLC-Zellen beeinflusst.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, war es zunächst notwendig, ein entsprechendes Zellkultur-Modell zu etablieren. Das Modell soll dazu verwendet werden, ex vivo den Einfluss von Chemotherapeutika auf NSCLC-Zellen aus der Maus in einem Stroma zu untersuchen, in welchem p53 restauriert werden kann und darauf aufbauend- der Zellzyklus der beteiligten Zellarten betrachtet werden kann.

Die Eigenschaft der transgenen Maus und der aus ihr gewonnen embryonalen Fibroblasten, mithilfe von 4-Hydroxytamoxifen den p53-Status beeinflussen zu können, gibt der Arbeit dabei einen weiteren neuen methodischen Aspekt.

Um die gewonnenen Erkenntnisse in Zukunft auch in ein Mausmodell übertragen zu können, sollte die vorliegende Arbeit die nötigen Vorarbeiten für eine in-vivo-Untersuchung leisten und nötige Erkenntnisse zuvor in-vitro zeigen.

3. Material

3.1. Allgemeine Materialien

Aqua dest	Delta Pharma GmbH (Pfullingen, D)
EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Eppendorf-Gefäß 1,5 ml (mit Deckel)	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Ethanol(96%)	Merck (Darmstadt, D)
Methanol	Merck (Darmstadt, D)
NaCl	Roth (Karlsruhe, D)
PBS 1x	Biochrom AG (Berlin, D)
Gefrierfach -20°C	Liebherr (Ochsenhausen, D)
-86°C VIPTMSERIES	SANYO (München, D)
Handschuhe: SemperCare	Semperit Technische Produkte GmbH (Wien, A)
Kryoröhrchen 2 ml	CORNING (New York, USA)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen, D)
Micro Tube 2 ml	SARSTEDT (Nümbrecht, D)
Mikroskop- Axiovert 25	Zeiss (Jena, D)
Minishaker MS1	IKA-Werke GmbH & Co KG (Staufen, D)
Pipetboy	Integra Bioscience (Fernwald, D)
Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	BD Falcon (Heidelberg,D)

Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht Rommelsdorf, D)
Software	<ul style="list-style-type: none">• Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim, D)• Verity Software House• Tree Star, Inc.• Joe Trotter, The Scripps Research Institute (La Jolla, USA)
• Office for MAC 2011	
• ModFit LT 3.0	
• FlowJo	
• WinMDI 2.8	
Stickstofftank: K-Series	Taylor-Wharton Germany GmbH (Husum, D)
Tubes (20/50 ml)	<i>Nunc GmbH & Co. KG</i> (Wiesbaden, D)
Waagen	
• Analysewaage (Modell Kern 770)	Kern & Sohn GmbH (Balingen Frommern, D)
• Präzisionswaage (Modell Kern PLJ 2100- LM)	
Wasserbad	GFL (Burgwedel, D)
Zentrifuge Megafuge	HERAEUS (Hanau, D)

3.2. DNS-Gewinnung

Argentrix Einmal Hoellenstein Aetzstift	Ryma-Pharm GMBH (Koerle, D)
DNeasy Blood and tissue Kit	QIAGEN (Hilden, D)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)

3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Cycler	Bio Rad (Muenchen, D)
AmpliTAQ-Polimerase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
10xBuffer	Roche (Mannheim, D)
dNTP	Invitrogen (Karlsruhe, D)
DMSO	Finnzymes (Schwerte, D)
Primer	Eurofins (Ebersberg, D)
PCR-Gefäße	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)

3.4. Gelelektrophorese

Agarose	Roth (Karlsruhe, D)
TAE-Puffer <ul style="list-style-type: none"> • tris edta essigsäure • wasser 	Roth (Karlsruhe, D) Delta select (Rimbach, D)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, D)
Elektrophoresegestell	Gibco Lifetechnologies (Karlsruhe, D)
6xOrange	Invitrogen (Karlsruhe, D)
DNA-Ladder (1kb)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
UV-Kamera	Bio Rad (Muenchen, D)
Auswertprogramm Quantity-One	Bio Rad (Muenchen, D)
Spannungsquelle	Bio Rad (Muenchen, D)

3.5. Zellkultur

Brutschrank	Thermo Scientific (Schwerte, D)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen, D)
Kulturflaschen	Greiner (Frickenhausen, D)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe, D)
FBS	PAA (Cölbe, D)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe, D)
PBS	PAA (Cölbe, D)
Calcein-AM	Invitrogen (Karlsruhe, D)
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Absaugpumpe	Schütt Labortechnik (Göttingen, D)
Sterilbank HERASafe	Heraeus (Hanau, D)
Trypsin 10x	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Neubauer-Zählkammer	LO–Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf, D)
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen (Karlsruhe, D)

3.6. Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer Coulter EPICS XL	Beckman	Beckman Coulter & Co. KG (Krefeld, D)
FACS-Röhrchen		BD Falcon (Heidelberg, D)
Software SYSTEM II for EPICS Version 3.0		Beckman Coulter & Co. KG (Krefeld, D)
Ethanol (70%) bei -20°C		Merck (Darmstadt, D)
Propidium-Jodid 25 mg Stocklösung: 5mg/ml (gelöst in DMSO) Working-Solution: 50 µg/ml (Stocklösung 1:100 mit PBS verdünnt)		Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
PI-Staining Solution; - 1xPBS (ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺) - RNAs soll: 100µg/ml - PI soll: 50µg/ml		Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
RNAse Stock(10mg/ml); - Sigma 10mg - Stocklsg. 10mg/ml (gelöst in PBS)		Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
PI-Stock-Lsg.; - PI: Sigma 25mg - PI-Stock-Lsg. 25mg/ml		Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

3.7. Histologie

Axiovision ICc1 Kamera	Carl Zeiss AG (Jena, D)
AxioVision Documentation Software	Carl Zeiss AG (Jena, D)
Histoclear	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Hämalaun	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Eosin, ethanolisches	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)

3.8. Bakterientransformation/Transfektion

One Shot Top10 Competent Cells	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ampicillin	Invitrogen (Karlsruhe, D)

4. Methoden

4.1. Trp53^{KI/KI}-Mausmodell

Christophorou et al. entwickelten eine Maus mit der Eigenschaft, p53 nur in Anwesenheit von 4-Hydroxytamoxifen restaurieren zu können. Der p53-Status lässt sich folglich reversibel in Abhängigkeit von 4-OHT beeinflussen.

(Christophorou et al., 2005). Um dieses zu erreichen, wurde mithilfe eines Targetingvektors die hormonbindende Domäne eines modifizierten Östrogenrezeptors (ER^{TAM}) am 3'-Ende der kodierenden Sequenz für endogenes Trp53 vorgeschaltet. Die entwickelten Mäuse entwickeln ohne kontinuierliche Gabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) verschiedene Arten von Tumoren, meist lymphatischer Herkunft. Zur Wiederherstellung des Wildtypstatus in Bezug auf p53 müssen die Mäuse >48 Stunden zweimal täglich mit 4-OHT behandelt werden.

4.2. Gewinnung embryonaler Mausfibroblasten (MEF)

Mäuse werden an einem Tag zur Verpaarung zusammengesetzt, das Männchen dann aus dem Käfig entfernt. Am 12. Tag nach der Verpaarung werden die trächtigen Weibchen mit CO₂ eingeschläfert.

Das Abdomen wird oberflächlich mit nicht-sterilen Scheren eröffnet.

Das Peritoneum wird mit sterilen Scheren eröffnet. Es folgt das Herauspräparieren des Uterus, welcher dann in eine Petrischale mit PBS+PS (Penicillin+Streptomycin) gelegt wird.

Die umgebende Membran wird abgelöst, so dass die Embryonen einzeln in ihrem Dottersack vorliegen.

Der Dottersack und die Plazenta werden dann entfernt und die Embryonen in eine Petrischale mit PBS+PS gelegt.

Der Kopf und die Leber der Embryonen werden abpräpariert.

Der Rest des Embryos wird in einer Petrischale in einen Tropfen PBS gelegt und mit zwei Nadeln zerkleinert um eine möglichst homogene Masse zu erhalten.

Die zerkleinerte Masse wird mit 2ml PBS in eine 15ml Tube gegeben.

Zentrifugieren bei 3000 U/min für eine Minute, danach den Überstand an PBS abpipettieren.

Das Pellet wird mit 5ml Trypsin lysiert, dabei in einer Pipette für 1-2min auf-und-ab pipettiert.

Nochmaliges Zentrifugieren bei 500 U/min für eine Minute.

Der Überstand wird in ein neues Tube gegeben, die übrigen großen Partikel nochmals trypsiniert und zum Überstand hinzugegeben. Im Anschluss bei 150 U/min für 3 Minuten zentrifugiert.

Das Zell-Pellet in DMEM+10%FBS+PS+L-glutamin (Medium) lösen und in eine Petrischale gegeben und als 1.Passage benannt.

Oben genannte Schritte werden für jeden Embryo wiederholt.

4.3. Genotypisierung

4.3.1. Präparation von Gewebe zur Genotypisierung

Als Gewebe dient ein ca. 5mm langes Stück Schwanz, das mittels Schere von der zu genotypisierenden Maus gewonnen wird. Der entstandene Gewebedefekt wird mit einem Höllenstein-Ätzstift versorgt.

Zur Genotypisierung der MEFs dient der embryonale Schädel als Gewebe.

Das gewonnene Material wird mit dem „DNeasy Blood and Tissue Kit“ nach dem Protokoll: „ Purification of total DNA from animal tissue“ bei 56°C im Thermoblock lysiert.

4.3.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR) für p53 knock-in

Für jede zu testende Probe werden 1,5µl der gewonnenen DNS mit 0,5µl dNTP (5mM) (bestehend aus dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2µl 10xBuffer(15mM MgCl), 1µl DMSO, 11,75µl Wasser sowie jeweils 1µl der 3 Primer gegeben:

1.p53In10_F	5`CCT CCA GCC TAG AGC CTT CCA AGC
2.p53_R	5`GGT GAG ATT TCA TTG TAG GTG CC
3.ER_R	5`GCA CAC AAA CTC TTC ACC CTG C

Der Reaktionsansatz wird auf Eis gelagert. Kurz vor Start des Programmes erfolgt die Zugabe von 0,25µl AmpliTaq Polymerase (5U/µl).

Programm:

Zunächst wird der Reaktionsansatz auf 94°C für 2 Minuten erhitzt um eine vollständige Denaturierung des DNS-Doppelstranges zu erreichen.

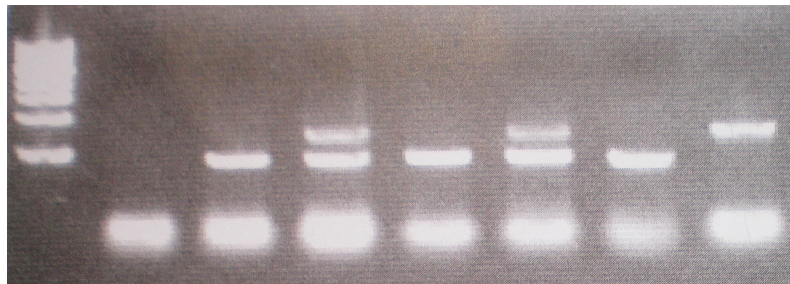
Es folgen 40 identische Zyklen in denen bei 94°C für 40 Sekunden die DNS-Doppelstränge denaturieren um anschließend bei 60°C über 40 Sekunden das Anlagern der Primer zu ermöglichen (Annealing). Im Anschluss bei 72°C über 2 Minuten bildet die DNS-Polymerase von 3` nach 5` den komplementären DNS-Strang (Extension). Schließlich erfolgt eine finale Extension bei 72°C über 10 Minuten.

4.3.3. Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Agarosegels werden 1,5g Agarose mit 150ml TAE-Puffer erhitzt und 5µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Flüssigkeit wird nun in einen Gelschlitten gegossen, in welchen ein PVC-Kamm eingetaucht wird, der nach Erkalten der Flüssigkeit die Auftragstaschen bildet. 10µl der zu untersuchenden DNS zusammen mit 5µl „6x Loading dye“ werden jeweils in eine Auftragstasche pipettiert. Als Kontrolle wird eine 1 Kilobasen Bande sowie eine Wildtyp-Kontrolle in die ersten Taschen pipettiert.

Da es sich bei Nukleinsäuren um Polyanionen handelt, wandern diese bei der angelegten Spannung von 140 Volt über 30 Minuten zur Anode und trennen sich ihrer Größe nach auf.

Das Gel wird nach der Laufzeit entnommen und zur Auswertung in eine Fotokammer gelegt, um es mit ultraviolettem (UV) Licht zu beleuchten. Das zuvor hinzugegebene Ethidiumbromid interkaliert in der DNS und fluoresziert als Ethidiumbromid-DNS-Komplex bei UV-Bestrahlung. Das bestrahlte Gel wird fotografiert und digital archiviert.



Knock-in Bande 700bp
Wildtypbande 430 bp

Abb.4 Genotypisierung

4.4. Zellkultur

4.4.1. Zellkultivierung

Alle Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Das Kulturmedium sowohl für die LLC als auch für MEFS setzt sich aus DMEM (high glucose) + 10% FBS + Penicillin/Streptomycin zusammen. Im 3-Tage-Intervall werden die Zellen 1:10 gesplittet. Jede Arbeit, die ein Öffnen der Petrischale oder der Zellkulturflaschen erfordert, geschieht unter dem Laborabzug unter besonderer Achtung keimarmen Arbeitens.

4.4.2. Splitten von Zellen

Zunächst wird das Medium abgesaugt und Medium-Reste mit PBS aufgenommen. Mit Trypsin (1x) werden die Zellen bedeckt und die Petrischale für ca. 2 Minuten bei 37°C im Brutschrank belassen. Mit ca. 5ml Medium werden die Zellen von der Petrischale abgelöst, die Zellsuspension in ein Tube überführt und 5min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpelett resuspendiert,

im Anschluss in geringerer definierter Konzentration in Petrischalen oder Kulturflaschen überführt.

4.4.3. Zellzählung/Trypanblau-Färbung

Das zentrifugierte Zellpelett (vgl. Zellen splitten) wird in 10ml Medium aufgenommen. 50µl dieser Zellsuspension werden mit der gleichen Menge Trypanblau in einer 96-Well-Platte gemischt. Das Gemisch wird in die Neubauer-Zählkammer überführt und unter dem Lichtmikroskop die Zellzahl bestimmt.

Folgende Formel wird herangezogen um die Gesamtzellmenge zu bestimmen:

$$N = n/4 \times 10 \times D \times V$$

- N: Gesamtzellzahl
- n: gezählte Zellen in allen vier Quadranten
- 4: Anzahl der Quadranten
- 10: Kammerfaktor
- D: Verdünnung (z.B. bei 1:10: D = 10)
- V: Volumen, in dem die Zellen suspendiert waren

4.4.4. Einfrieren von Zellen

Nach dem Ablösen und Zentrifugieren der Zellen (vgl.: Zellen splitten) können die Zellen alternativ für einen längeren Zeitraum im N₂-Tank aufbewahrt werden.

Hierzu wird das Zellpelett mit bekannter Zellmenge in FBS+ 10% DMSO aufgenommen und in einem Cryotube in gekühlter Einfrierbox (4°C) über 1-2 Tage bei -80°C gelagert. Im Anschluss wird das Cryotube in den N₂-Tank überführt.

Bei Bedarf können die Zellen kurz im Wasserbad (37°C) erwärmt, mit Medium aufgenommen und zentrifugiert werden. Das Zellpelett kann anschließend resuspendiert und wieder in Kultur genommen werden.

4.5. Durchflusszytometrie (FACS)

4.5.1. Allgemeine Funktionsweise

Die analytische Grundlage der Durchflusszytometrie bildet ein zum Probenfluss rechtwinklig angeordneter Laserstrahl. Bei Passieren des Lasers wird in einem engen Winkel zum Laserlicht die Lichtstreuung der Zellen als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FCS) detektiert. Das FCS ist dabei das Maß für die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) beschreibt die Lichtstreuung in einem Winkel von 90° und gibt als komplexe Mehrfachstreuung die Binnenstruktur der Zelle wieder. Es ist somit ein Maß für die Granularität der Zelle.

Eine weitere Möglichkeit Zellen zu unterscheiden ist deren Fluoreszenz. Die Emissionsspektren der verschiedenen Farben werden per Farbteilerspiegel und Bandpassfilter optisch getrennt und die Lichtsignale über Photomultiplier (PMT) detektiert sowie in elektrische Signale gewandelt. Die Detektoren werden aufsteigend nach spektralem Abstand benannt (FL1, FL2, usw.). Werden die Zellen beispielsweise mit blau-grünem Licht eines 488-nm-Argon-Lasers angeregt, detektiert der FL1-Detektor grünes, der FL2-Detektor oranges und der FL3-Detektor rotes Licht (Sack *et al.*, 2007).

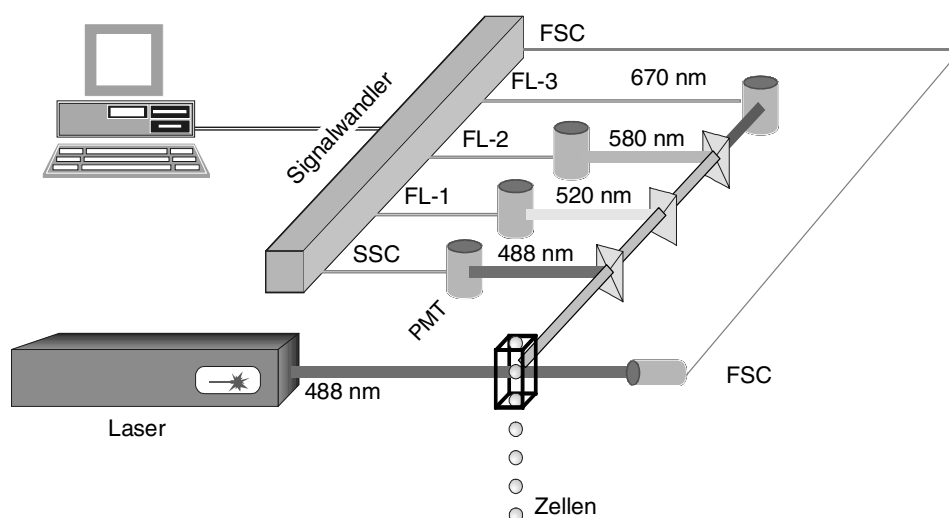


Abb.5 Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

4.5.2. Zellfärbung mit Propidiumiodid (PI)

4.5.2.1. Methodische Grundlage

Bei intakter Zellmembran ist es dem zugesetzten PI nicht möglich diese zu passieren. Wird die Membran jedoch im Rahmen der Zellnekrose permeabel, gelangt PI ins Zellinnere und interkaliert in der DNS. Mit dieser Methode ist es möglich, nekrotische von intakten Zellen zu unterscheiden. Das Absorptionsmaximum von PI verschiebt sich, wenn an DNS gebunden, von 482nm nach 540nm. Mit 608 nm bleibt das Emissionsmaximum gebunden und ungebunden gleich (pH=7,2)(Produktinformation Sigma-Aldrich).

4.5.2.2. Durchführung

Die zu untersuchenden Zellen werden abgelöst und zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in FACS-Puffer resuspendiert und pro 500µl 10µl PI zugegeben. Die Zellen werden ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

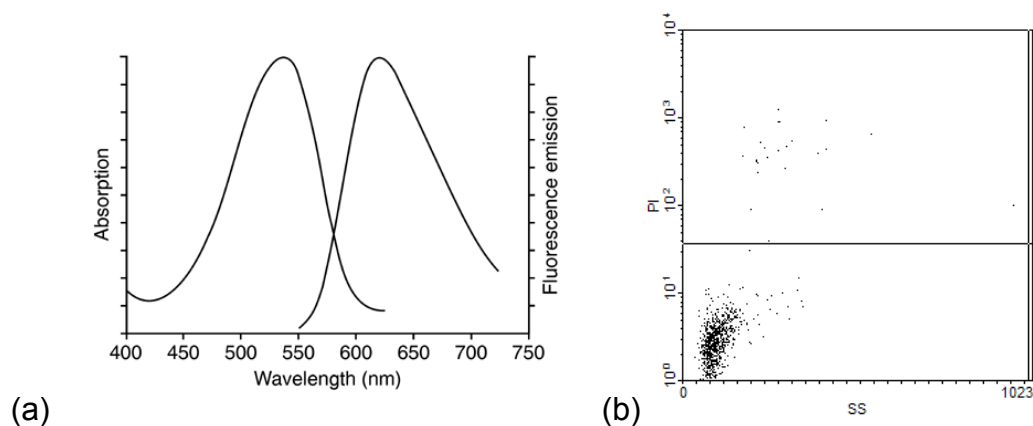


Abb.6 (a)Absorption und Emissionsspektrum Propidiumiodid. (b)Lebend-tot-Diskriminierung der LLC-Zellen mittels PI als PI/SS im FACS aus der Kokultur

4.6. Zellzyklusmessung per Durchflusszytometrie

4.6.1. Theoretische Grundlagen

Die theoretische Grundlage zur Zellzyklusmessung mithilfe der Durchflusszytometrie ist die Interkalation des Farbstoffes Propidium-Iodid (PI) in die DNS der Zelle.

In der G₁/G₀-Phase besitzt die Zelle einen diploiden Chromosomensatz, die Zellen der G₂-Phase hingegen einen tetraploiden. Da PI stöchiometrisch in die DNS interkaliert kann so in der G₂-Phase ein anderes Signal detektiert werden als das der G₁/G₀-Phase. Kommt es zu DNS-Strangbrüchen, beispielsweise bei Zellschädigung, kann das Signal vor dem Signal der G₁/G₀-Phase dargestellt werden. Die S-Phase stellt sich zwischen G₁/G₀- und G₂-Phase dar. Die Darstellung erfolgt als Histogramm.

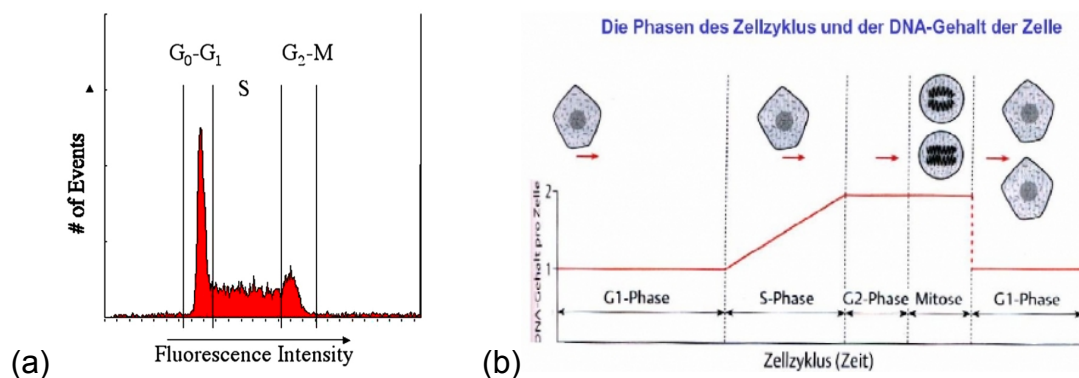


Abb.7 (a)Histogramm Zellzyklus und (b)DNS-Gehalt im Verlauf des Zellzyklus

4.6.2. Zellfixierung

Zur Zellfixierung wird die Zellsuspension zunächst in ein FACS-Röhrchen überführt und für 5min. bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Unter Vortexen erfolgt die langsame Zugabe 1ml eiskaltem Ethanol (70%). Die Zellen plus Ethanol werden dann bei -20°C für 15 min inkubiert.

4.6.3. Zellfärbung

Die fixierten Zellen werden 5min. bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen.

Zugabe von 500µl PI-Färbelösung und Inkubation im Dunkeln für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur.

4.7. Histologische Aufarbeitung der Lungenpräparate

4.7.1. Fixierung der Lungenpräparate

Zur Entnahme der Lungenpräparate werden die Mäuse mit einer CO₂-Narkose betäubt und die Medulla spinalis der Halswirbelsäule durchtrennt. Die entnommenen Lungen werden in Formaldehyd fixiert und nach 24 Stunden im Institut für Pathologie des Klinikums Rechts der Isar weiterbehandelt. Die hier durchgeführte Dehydratation mittels Ethanol in steigender Konzentration, gefolgt von einer Behandlung mit Xylol, ist die Grundlage für eine Einbettung in Paraffin. Hiernach werden die fixierten Lungen mit flüssigem Paraffin übergossen und nach Erkalten mit dem Mikrotom in etwa 3,5µm dicke Schnitte geteilt. Die so erzeugten Präparate werden mit einem Pinsel in ein Wasserbad überführt und per Objektträger aufgenommen.

4.7.2. Hämalaun-/Eosin-Färbung

Der sich auf dem Objektträger befindliche histologische Schnitt wird zunächst zweimal jeweils 5 Minuten in HistoClear (Wirkstoff: d-Limonen 95-100%) getaucht. In der folgenden Ethanol-Reihe wird der Objektträger in absteigenden Konzentrationen zweimal je 3 Minuten in zunächst 100%, dann 96% und schließlich 70%igem Ethanol belassen. Im nächsten Schritt folgt die Anfärbung über 8 Minuten mit Hämalaun, danach 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Nach 5 Minuten in ethanolischem Eosin folgen 25 Sekunden in 96%igem Ethanol und 25 Sekunden in Isopropanol.

Im letzten Schritt werden die Schnitte 1,5 Minuten mit HistoClear behandelt und schließlich eingedeckelt.

4.8. Bakterientransformation

Für die Transformation sind 100µl kompetente Bakterien (E. coli) mit DNS zu versetzen. Der Ansatz wird für 30min. auf Eis inkubiert und nach Heatshock für 30 Sekunden bei 42°C sofort wieder auf Eis zurückgeführt. Nach Zugabe von 200µl Medium folgt das Schütteln für 45-60 Minuten bei 37°C. Der Ansatz wird nun auf eine Platte mit jeweils korrektem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Zur Isolierung der Plasmid-DNS wird eine Miniprep (*nach: Absolutely-RNA-Miniprep, Stratagene*) durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1. In vivo Tumormodell

Zur Etablierung eines in vivo Modells zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des Mikromilieus auf das Wachstum und die Chemosensitivität des NSCLC, war es zunächst nötig, die erforderliche Zellmenge zur Entwicklung eines soliden Tumors in der Maus herauszufinden. Aus der Literatur bot sich hierzu die Methode der orthotopen Injektion von Tumorzellen in die Lunge der Maus an (*Yamaura et al., 1999*). Nach Thorakotomie unter Narkose wurden der Maus 10^3 LLC-Zellen in das Lungengewebe injiziert.

Nach einer Latenz und folgender Entnahme der Lungenpräparate zeigte sich, dass die methodenbedingte Stichkanalmetastasierung eine histologische Ausarbeitung und Auswertung der Ergebnisse deutlich erschwerte. Ebenfalls als nachteilig erwies sich die kurze Überlebenszeit der orthotop injizierten Mäuse (s.Abb.23). Als alternative Methode konnte die Injektion der LLC-Zellen in die Schwanzvenen der Mäuse angewandt werden.

Zur Etablierung dieses Modells wurden die LLC-Zellen zunächst in Kultur genommen und nach einmaligem Splitten kurz vor Injektion abgelöst sowie in definierter Zellmenge in NaCl 0,9% gelöst. Zunächst wurde eine Zellmenge von 10^6 gewählt. Bei dieser Menge verlief die Tumorprogression jedoch so rapide, dass die Tumorgröße keine weitere Beobachtung der Mäuse zuließ. In der Folge wurden den Mäusen (Stamm: C57BL6, *Harlan Laboratories, Rossdorf, D*) Zellmengen von 10^5 bzw. 10^4 LLC-Zellen injiziert.

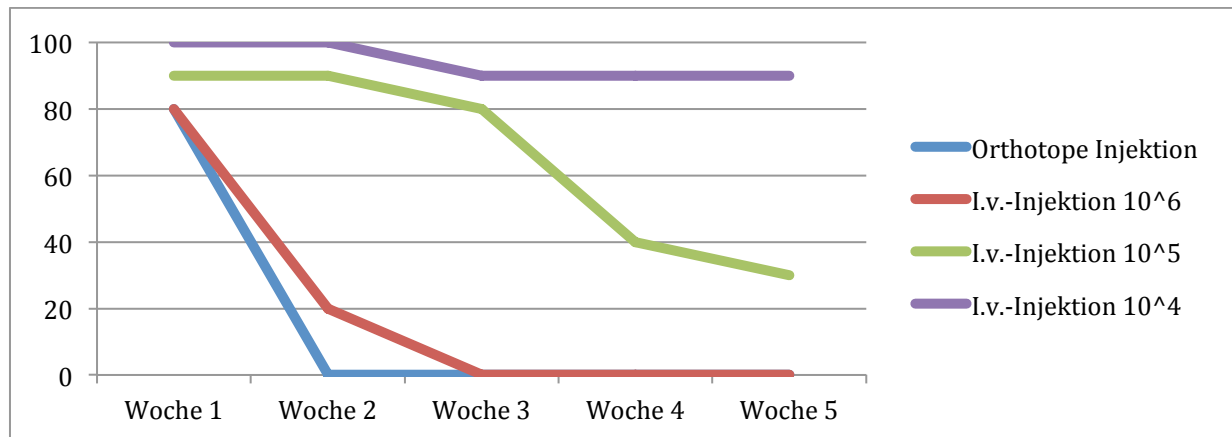


Abb.23 Überlebenszeit der Mäuse nach verschiedenen Tumorimplantationsmethoden (Jeweils n=10).

Nach 3 Wochen wurden die Lungen entnommen und histologisch aufgearbeitet. Bei Zellmengen von 10^5 injizierten Tumorzellen konnten nach 3 Wochen regelmäßig solide Tumoren beobachtet werden, die z.T. große Teile eines Lungenlappens befallen hatten (s.Abb.24).

Ebenfalls zu beobachten waren metastasentypische Rundherde im Lungenparenchym.

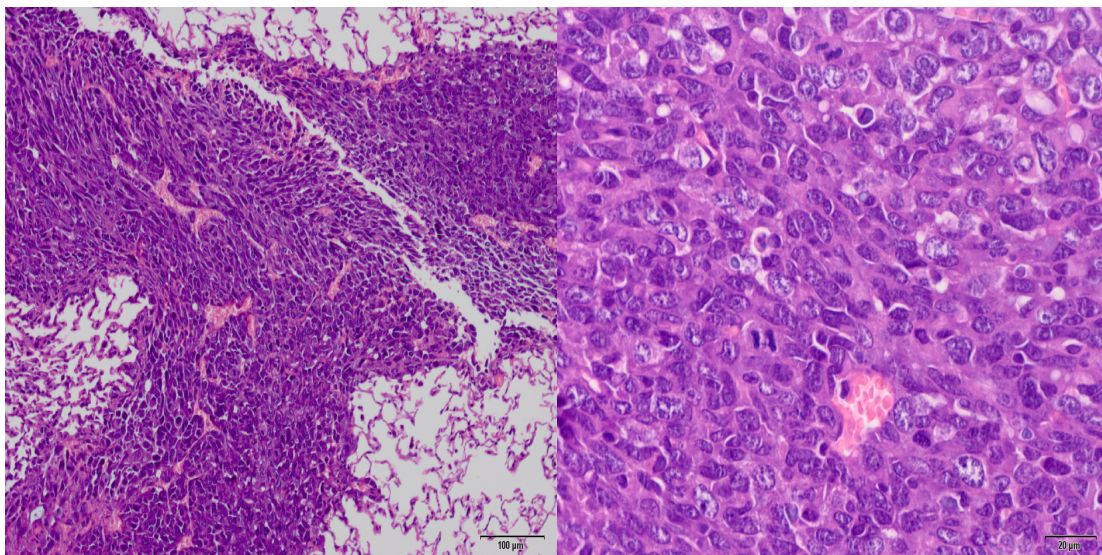


Abb.24 Lungenpräparate 3 Wochen nach Injektion von 10^5 LLC-Zellen; H/E-Färbung in 100-facher (linke Abbildung) bzw. 400-facher (rechte Abbildung) Vergrößerung.

Wie erwähnt, wurden zum Vergleich 10^4 LLC-Zellen in die zu vergleichende Gruppe BL6-Mäuse injiziert.

Hier ließen sich im gleichen Zeitraum keine Lungenherde ausmachen. In der pathologischen Auswertung zeigte sich ein regelrechtes pulmonales Gewebe (Abb.25).

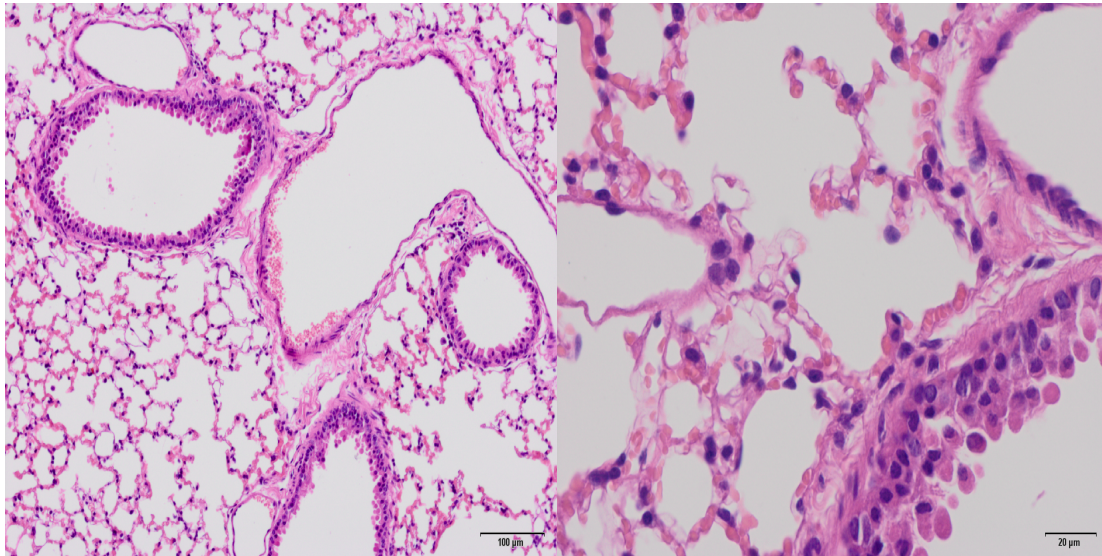


Abb.25 Lungenpräparate 3 Wochen nach Injektion von 10^4 LLC-Zellen; H/E-Färbung in 100-facher (linke Abbildung) bzw. 400-facher (rechte Abbildung) Vergrößerung.

5.2. Etablierung einer Co-Kultur aus MEFS und LLC-Zellen

5.2.1. Problematik

Wie in der Einleitung dargestellt, können sich Tumor und Stroma auf verschiedenen Wegen gegenseitig beeinflussen. Ein wichtiger Punkt ist die Auswirkung darauf, wie sich der p53-Status in Stromazellen auf die Chemosensitivität von Tumorzellen auswirkt. Um dieses quantifizieren zu können, war es Ziel der Arbeit nach einer chemotherapeutischen Behandlung der Tumorzellen in Cokultur, diese gezielt mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich Viabilität und Zellzyklusregulation bewerten zu können.

Um den Einfluss des p53-Status der Fibroblasten auf die Tumorzellen messen zu können, war es nötig ein Cokultur Modell zu etablieren, bei dem sich auch nach 72 Stunden eine Aufteilung von Tumorzellen und Stromazellen mittels FACS und die anschließende isolierte Betrachtung der Tumorzellen umsetzen lässt.

Erschwerend zeigte sich jedoch, dass NSCLC-Zellen und MEFS ungefärbt, als jeweils adhärent wachsende Zellen, ein sich überschneidendes Signal im FACS auslösten und folglich keine zufriedenstellende Auftrennung der einzelnen Zellarten im FS/SS aus der Cokultur möglich war.

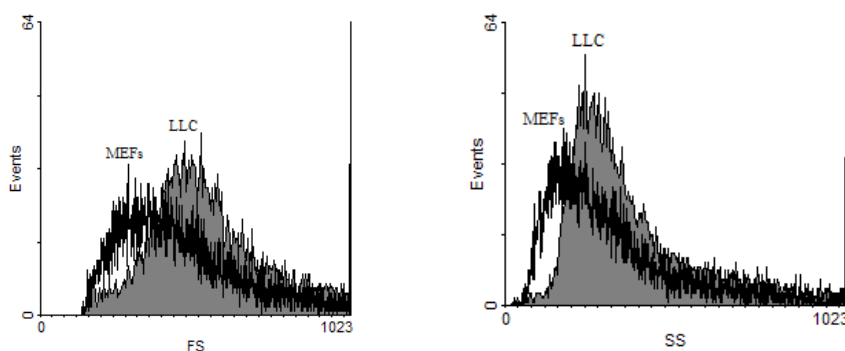


Abb.8 Überschneidung LLC-Zellen/MEFs im FACS. Darstellung im Histogramm als Überlagerung

5.2.2. Calcein-Acetoxy-methylester

Um das Problem der Überlagerung im FACS zu lösen bot sich an, eine der beiden Zellen mit einem Farbstoff intrazytoplasmatisch anzufärben. Um die LLC-Zellen später zwecks Apoptose- und Zellzyklusmessungen mit PI anfärben zu können ohne eine Überstrahlung verschiedener Farbstoffe im FACS zu riskieren, wurde die Entscheidung getroffen, die MEFS anzufärben. Nach intensiver Suche eines Farbstoffes, der trotz Ethanolfixierung zur Zellzyklusmessung eine zufriedenstellende Markierung der Zelle gewährleistet, erwies sich Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) als gut geeignet.

Nach Aufnahme von Calcein-AM in die Zelle wird die Acetoxy-methylgruppe unspezifisch von zytoplasmatischen Esterasen abgespalten. Als Folge ist Calcein in der Lage Calciumionen zu komplexieren, woraufhin eine Fluoreszenz entsteht (*Papadopoulos et al., 1994*). Das Emissionsmaximum liegt bei 516nm (bei einem pH von 8,5), was einer grünen Fluoreszenz entspricht.

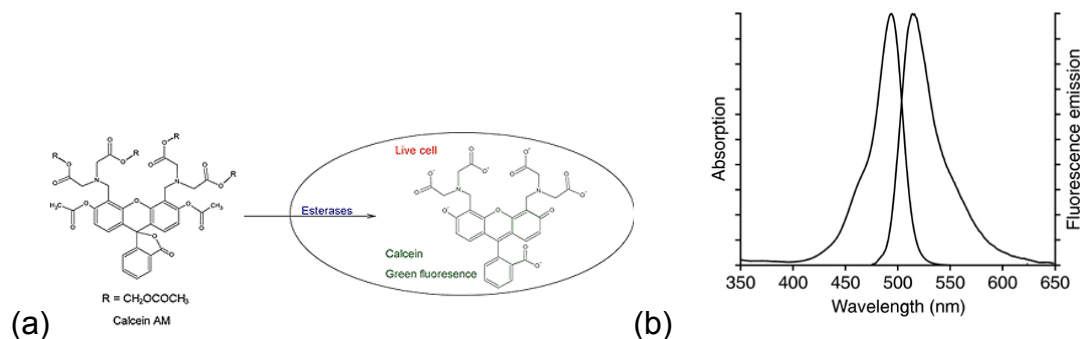


Abb.9 (a) Unspezifische Abspaltung der Acetoxy-methylestergruppe durch zytoplasmatische Esterasen und folgende (b) grüne Fluoreszenz bei 516nm Wellenlänge (in Puffer mit pH=9,0)

5.2.3. Calceinfärbung MEFS

Die MEFS werden in 6-Well-Platten mit 30.000 MEFS pro Well ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. 24 Stunden nach Ausplattieren wird das Medium abgesaugt und mögliche Medium-Reste mit PBS aufgenommen. Zuvor wird 2µl Calcein-AM pro ml Medium vermischt und 3ml Calcein-AM-Medium pro Well verteilt. MEFS werden inkubiert und danach für eine Stunde im Brutschrank belassen.

Anschließend wird das Calcein-AM abgesaugt und die MEFS anschließend zweimal mit Medium von möglichen Rückständen des Calcein gereinigt.

Abbildung 10 zeigt die Darstellung im FACS der mit Calcein-AM gefärbten MEFS im Vergleich zu nicht gefärbten MEFS nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden.

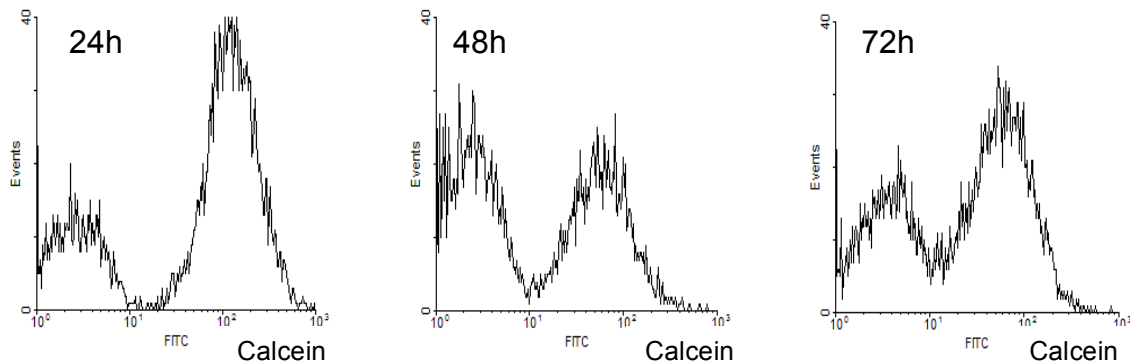


Abb.10 Messung der grünen Fluoreszenz mit Calcein-AM gefärbten MEFS (rechter Peak) im Vergleich zu ungefärbten MEFS (linker Peak) im FL-1-Kanal des FACS (FITC-Kanal) nach 24h, 48h und 72h

Wie in Abbildung 10 zu sehen, ist es nach 72 Stunden noch möglich MEFs mittels Calcein getrennt voneinander zu detektieren und so für weitere Messungen zu untersuchen.

5.2.4. Chemotherapeutische Behandlung der Tumorzellen in vitro

5.2.4.1. Auswahl Chemotherapeutika

Neben der primären Resektion von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) stellt die adjuvante Chemotherapie wie auch die Monotherapie bzw. Kombinationstherapie bei Kontraindikation zur Operation oder fortgeschrittenen Karzinomen einen zentralen Therapiebaustein dar.

Nach den S3-Leitlinien (*Goeckenjan et al., 2010*) für die Therapie von Bronchialkarzinomen ist Cisplatin die am häufigsten angewandte und wirksamste Chemotherapie als Erstlinien-Therapie (firstline-therapy). Bei mangelndem Ansprechen des Tumors auf platinhaltige Chemotherapeutika oder

Kontraindikationen (z.B. Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz) stellen Taxane wie Paclitaxel eine therapeutische Alternative zu platinbasierten Behandlungsschemata dar.

Aus den oben genannten Gründen der klinischen Relevanz für die Therapie des NSCLC wurden Cisplatin und Paclitaxel für die Cokultur-Versuche ausgewählt.

5.2.4.2. Titration der notwendigen Konzentration für die chemotherapeutische Behandlung der LLC-Zellen/Chemosensitivität

Für die Cokultur war es nötig, zuerst die LLC-Zellen hinsichtlich ihrer Reaktion auf verschiedene Konzentrationen von Cisplatin und Paclitaxel zu untersuchen. Es sollte ein Konzentration erreicht werden, die es trotz Apoptose eines Teiles der LLC-Zellen erlaubt, einen messbaren Anteil viabler Zellen auch nach 72 Stunden Behandlung zu erlangen.

Hierzu wurden LLC-Zellen in definierter und immer gleicher Menge ausplattiert und jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin oder Paclitaxel behandelt. Als Kontrollen dienten LLC-Zellen, die lediglich mit Nährmedium oder Hydroxytamoxifen behandelt wurden.

Die Auswertung erfolgte durch Lebend-Tot-Diskriminierung mit PI und anschließender Messung im FACS. Außer der PI-Messung gab die Messung der Auswirkung von Chemotherapeutika auf den Zellzyklus der Tumorzellen einen weiteren Einblick in die zelluläre Reaktion auf die Behandlung mit Zytostatika.

Cisplatin entwickelt seine zytostatische Wirkung durch Quervernetzung („Cross-links“) zwischen verschiedenen DNS-Basen, wobei die N-7-Position von Guanin und Adenin als am empfindlichsten gelten (*Graefe et al., 2011*). Die Folge hiervon ist eine phasenunspezifische Blockierung des Zellzyklus (*Karow et al., 2009*).

Wie in den Zellzyklusmessungen nach Behandlung der LLC-Zellen mit Cisplatin zu sehen ist, reagieren die Tumorzellen sowohl mit einem G1-, als auch mit einem G2/M-Phasen Block. Dieser gemischte Block verlagerte sich von geringen Konzentrationen, bei denen der G1-Block überwog, zu einem G2/M-Block bei höheren Konzentrationen.

Nach Auswertung der Messungen erwies sich eine Konzentration von 4µg Cisplatin/ml Medium als geeignet sowohl für frühe Messungen als auch für spätere Zeitpunkte (72 Stunden). Bei höherer Konzentration konnte keine ausreichende

Anzahl vitaler LLC-Zellen zur zufriedenstellenden Erfassung im FACS erreicht werde.
In zu geringerer Konzentration trat entweder kein oder ein nur marginaler Effekt ein.

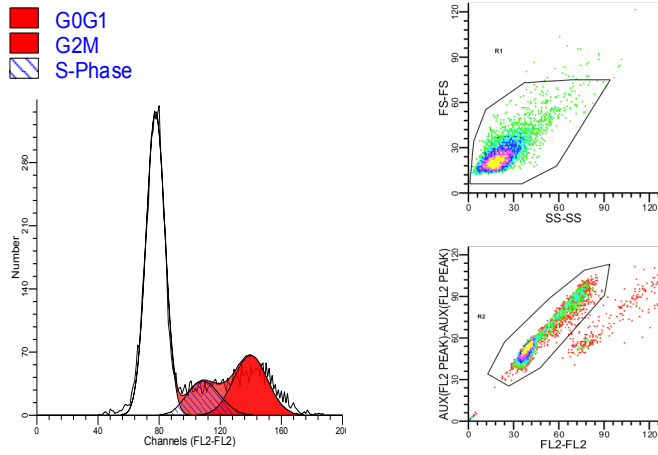


Abb.11 Beispielhafte Auswertung Zellzyklus LLC-Zellen nach 48h ohne Zytostatika (Kontrollmessung)

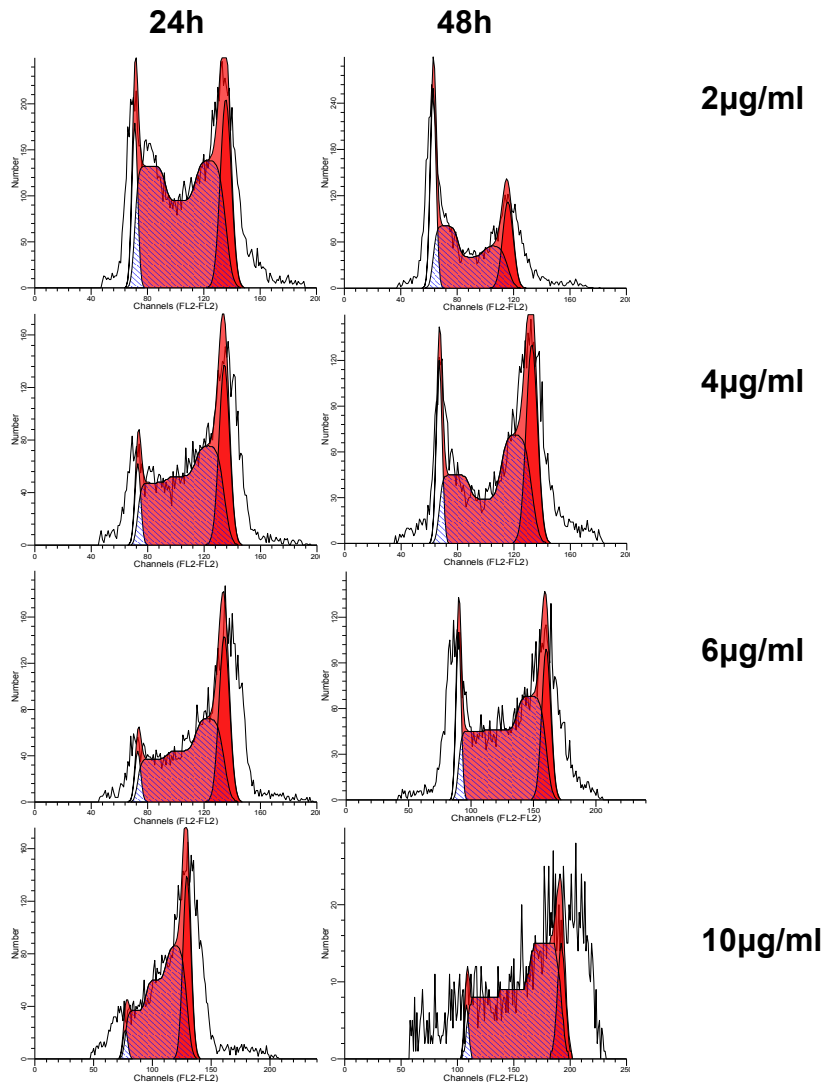


Abb.12 Behandlung LLC-Zellen mit Cisplatin und Zellzyklusdarstellung

Durch Anlagerung an die β -Tubulin-Untereinheiten der Microtubuli und deren Stabilisierung hemmt Paclitaxel die Depolymerisation und fördert die Bildung atypischer, funktionsunfähiger Microtubuli. Folge hiervon ist ein fehlender Aufbau des Spindelapparates und eine Blockierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase (Graefe et al., 2011).

In den Messungen ließ sich analog zur Literatur ein G2/M-Phasenblock nachweisen. Über die drei Messpunkte gesehen erwies sich eine Konzentration von 50ng Paclitaxel pro ml Medium (Nicht dargestellt) als besonders praktikabel bezogen auf vitale LLC-Zellen wie auch im 72 Stunden Messpunkt.

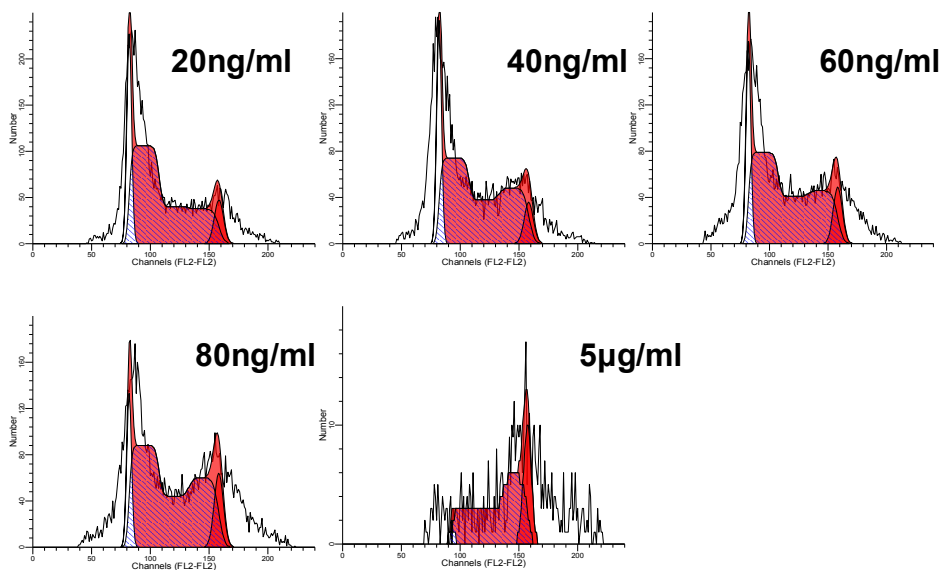


Abb.13 Behandlung LLC-Zellen mit Paclitaxel und Zellzyklusdarstellung

5.2.5. Chemosensitivität der MEFs

Um die Durchführbarkeit der geplanten Cokulturversuche zu zeigen, musste zunächst ausgeschlossen werden, dass die MEFs eine ausgeprägte Chemosensitivität zeigen und somit kein Effekt dieser auf die Tumorzellen zu erwarten ist. Zur Untersuchung dessen wurden die Zellen ausplattiert und nach 3 Tagen gesplittet. Am Folgetag erfolgte die Zugabe von entweder Cisplatin (4 μ g/ml), Paclitaxel (50ng/ml) oder keinem Zytostatika als Kontrollkultur. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und inklusive Überstand zentrifugiert.

Anschließend folgte die Messung mittels Durchflusszytometrie zur Bestimmung der PI-Aufnahme.

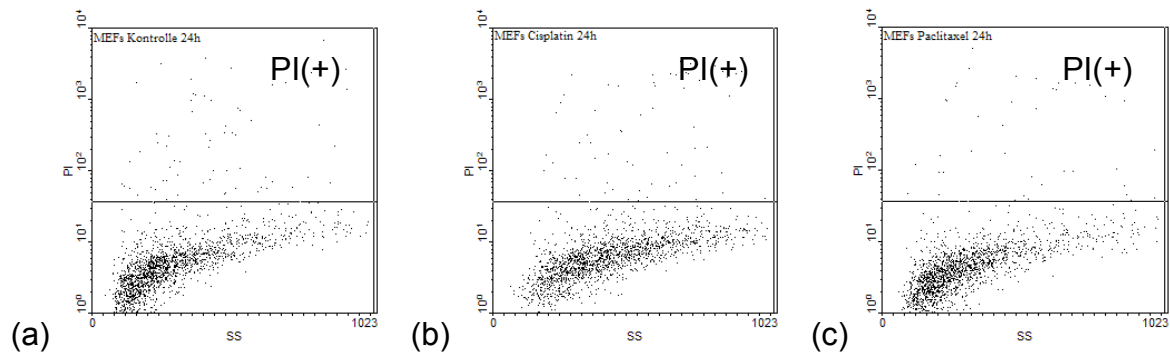


Abb.14 Chemosensibilität MEFs nach 24 Stunden behandelt mit Medium (a), Cisplatin (b) und Paclitaxel (c)

Wie in Abbildung 14 zu sehen, geschah die Auswertung der Chemosensitivität mittels PI-Färbung zur Darstellung der apoptotischen Zellen. Für die Kontrollkultur ließ sich ermitteln, dass 4.95% der erfassten MEFs ohne zytostatische Vorbehandlung PI-positiv waren. Nach hinzufügen von Cisplatin in o.g. Konzentration zeigten sich nach 24 Stunden 5.33% der erfassten MEFs PI-positiv. Die mit Paclitaxel behandelten MEFs waren nach 24 Stunden zu 3.21% PI-positiv.

Sowohl in den Kontrollmessungen als auch nach zytostatischer Behandlung zeigen die MEFs eine ähnlich geringe Apoptose. Da sie zusätzlich noch per Calcein-AM-Färbung von den Tumorzellen getrennt werden, stellen sie somit einen nur sehr geringen Störfaktor in der Auswertung der Cokultur-Ergebnisse dar.

5.3. Cokultur-Versuche

5.3.1. Auswertung nach PI-Färbung

Eine Woche vor Beginn der Cokultur ist es nötig die MEFS in Kultur zu nehmen und das Zellmedium mit Hydroxytamoxifen in einer 100 μ M-Konzentration zu versetzen (Christophorou et al., 2005). Die MEFS werden zweimal gesplittet und dabei das Medium und Hydroxytamoxifen in genannter Konzentration erneuert.

Nach Färbung der MEFS werden pro Well 5000 LLC-Zellen darauf ausplattiert. Die Tumorzellen wurden 3 Tage zuvor aus dem N₂-Tank wieder in Kultur genommen und einmal gesplittet. Nach Zählung der LLC-Zellen wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe die nötige Zellkonzentration erreicht.

Um den Effekt einer p53-Defizienz im Stroma auf die Tumorzellen zu zeigen, stellt man jeweils ein mit 4-Hydroxytamoxifen behandeltes Stroma einem nicht behandeltem gegenüber. Der Umgang mit den MEFS unterscheidet sich hierbei nur in der Zugabe von 4-OHT von der Vergleichs-Cokultur.

24 Stunden nach Ausplattieren der LLC-Zellen auf den MEFS folgt die Zugabe der Chemotherapeutika Cisplatin in einer Konzentration von 4 μ l/ml Medium und Paclitaxel in einer Konzentration von 50ng/ml Medium.

Ziel der Versuchsauswertung war es, den prozentualen Anteil der apoptotischen LLC-Zellen per FACS zu erfassen. Wie zuvor beschrieben, wurden die MEFS mit dem Farbstoff Calcein-AM gefärbt und anschließend LLC-Zellen darauf ausplattiert. Nach Zugabe von Cisplatin und Paclitaxel wurden Messpunkte im Abstand von 24, 48 und 72 Stunden gewählt.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, werden zunächst alle Zellen im FCS/SCS erfasst und die Einzelzellen mit einem entsprechenden Gate umrahmt, um zusammenhaftende Zellen aus den folgenden Messschritten auszuschließen. In Abb.10 ist gut zu erkennen, dass sich die Cokultur mithilfe der Calcein-AM-Färbung gut auftrennen lässt und wie in Abb. 15(c) zu sehen, die LLC-Zellen mit einem Gate von den MEFS separiert werden können. Im letzten Messschritt werden die LLC-Zellen nach dem Gehalt an PI einzeln betrachtet und der prozentuale Anteil an PI-positiven Zellen gemessen.

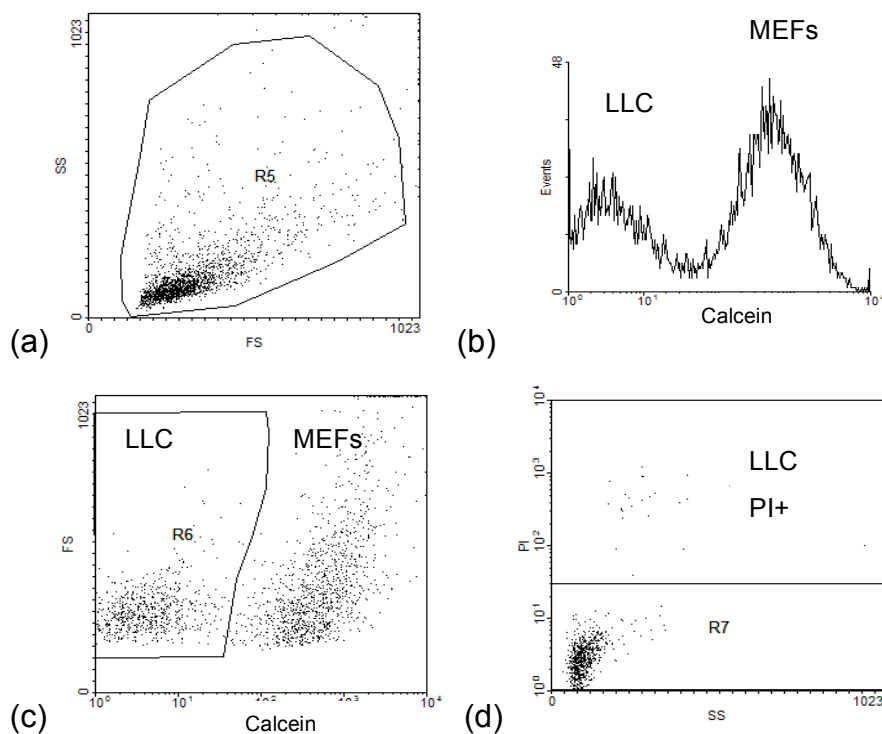
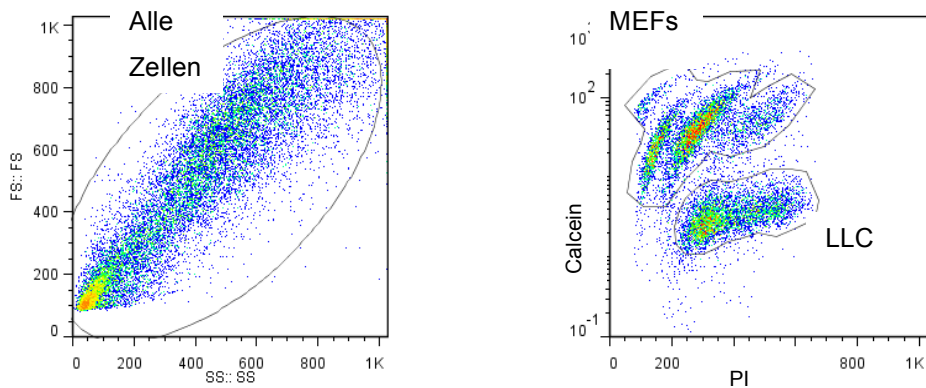


Abb.15 Beispielhafte Auswertung der Cokultur-Daten. (a) Erfassung aller Zellen in FSC/SS und folgende Aufteilung durch die Calcein-AM-Färbung (b,c). Erfassung der PI-positiven LLC-Zellen in (d)

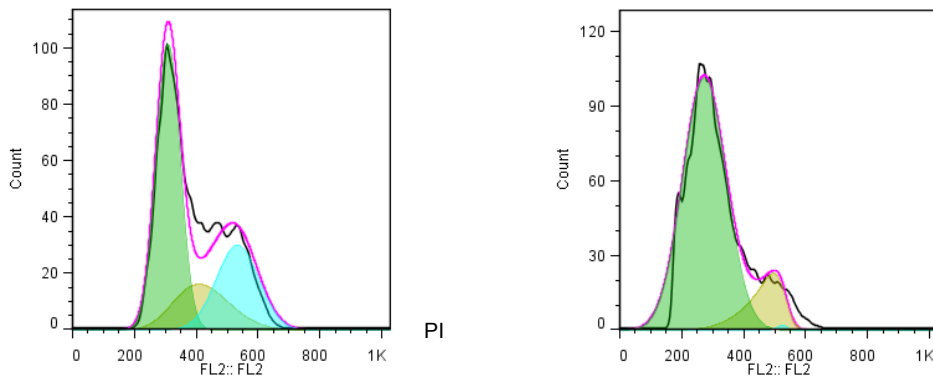
5.3.2. Simultane Zellzyklusmessung zweier Zellpopulationen aus der Cokultur

Zur Untersuchung möglicher Einflüsse im Zellzyklus von MEFs oder LLC wurde eine Methode zur simultanen Untersuchung des Zellzyklus der beiden Zellarten aus der Cokultur etabliert. Nach Aufbau der Cokultur wurden die Zellen zur Zellzyklusmessung mit Ethanol fixiert und mit PI gefärbt, wie oben beschrieben. Die vorherige Färbung mit Calcein-AM erlaubte hier trotz Ethanolfixierung die Unterscheidung der beiden Zellarten im FACS und ein getrenntes Betrachten des jeweiligen Zellzyklus.

Nach Erfassen beider Zellpopulationen (forward- gegen sidescatter), wurden im nächsten Schritt diejenigen Zellen ausgegattet, die mit anderen zusammenhängen und so ein nicht verwertbares Signal in den nächsten Schritten abgeben würden. Durch die Calcein-AM-Färbung lassen sich im nächsten Schritt LLC-Zellen und MEFs (gefärbt) unterscheiden (Abb.16.a) und nach Eingrenzen der jeweiligen Population getrennt als Zellzyklus-Histogramm betrachten.



(a)



(b)

(c)

Abb.16 Simultane Zellzyklusmessung zweier Zellpopulationen aus der Cokultur (a) und folgende Auswertung getrennt im Histogramm von LLC-Zellen (b) und MEFs (c)

Die Abbildungen 16.b und 16.c zeigen den Zellzyklus von LLC-Zellen und p53-defizienten $\text{Trp53}^{\text{KI/KI}}$ -MEFs aus der Kontroll-Cokultur, welche keine chemotherapeutische Behandlung erhalten haben.

Diese Methode bietet die Möglichkeit, nicht nur den Zellzyklus und damit die apoptotischen Zellen in der Sub-G1-Population einer Zellart nach chemotherapeutischer Behandlung zu betrachten, sondern die Auswirkungen auf beide Zellarten synchron auszuwerten. Abgesehen davon könnten weitere Faktoren, die auf möglichen Zell-Zell-Beeinflussungen beruhen mit evaluiert werden. Gerade im Hinblick auf die Untersuchung von p53 und dessen Auswirkungen von Zellen aufeinander, könnte die simultane Zellzyklusmessung weitere Einblicke ermöglichen.

5.4. Ergebnisse der Cokultur

5.4.1. Geringere Apoptose der LLC-Zellen durch Cokultivierung

Um einen Effekt des p53-Status der Fibroblasten auf die Chemosensitivität der Tumorzellen darzustellen, wurden zunächst Vergleichsmessungen von 2 zu vergleichenden Cokultur-Varianten durchgeführt. Es wurde zum einen eine Cokultur mit Wildtyp-MEFs und zum Vergleich ein Aufbau mit LLC-Zellen ohne MEFs erstellt. Alle Zellen wurden wie zuvor beschrieben behandelt und die jeweiligen Messungen nach erläuterten Vorgehen 24h, 48h und 72h nach Zugabe der Chemotherapeutika erfasst. Cisplatin wurde mit einer Konzentration von 4 μ l/ml Medium eingesetzt, Paclitaxel mit 50ng/ml. Die MEFs wurden 24h vor Versuchsbeginn ausplattiert.

Aus den Messwerten nach 24 Stunden (Abb.17) kann man entnehmen, dass sowohl in der Kontrollmessung mit Medium oder mit Cisplatin die LLC-Zellen ohne vorheriger Kultivierung mit MEFs eine deutlich höhere Apoptose zeigen als die Tumorzellen aus der Cokultur. Unter Paclitaxel fiel der Effekt mit 31,1% bei den LLC-Zellen versus 30,5% zunächst geringer aus, zeigte jedoch ab 48h einen deutlicheren Effekt. Der Einfluss einer Cokultivierung der Tumorzellen zeigte sich unter Cisplatin über alle Messwerte konstant.

Die beobachtete erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika der LLC-Zellen bei Cokultivierung lässt sich auch in den folgenden Messungen zeigen und macht deutlich, wie das Mikromilieu den Tumor beeinflussen kann.

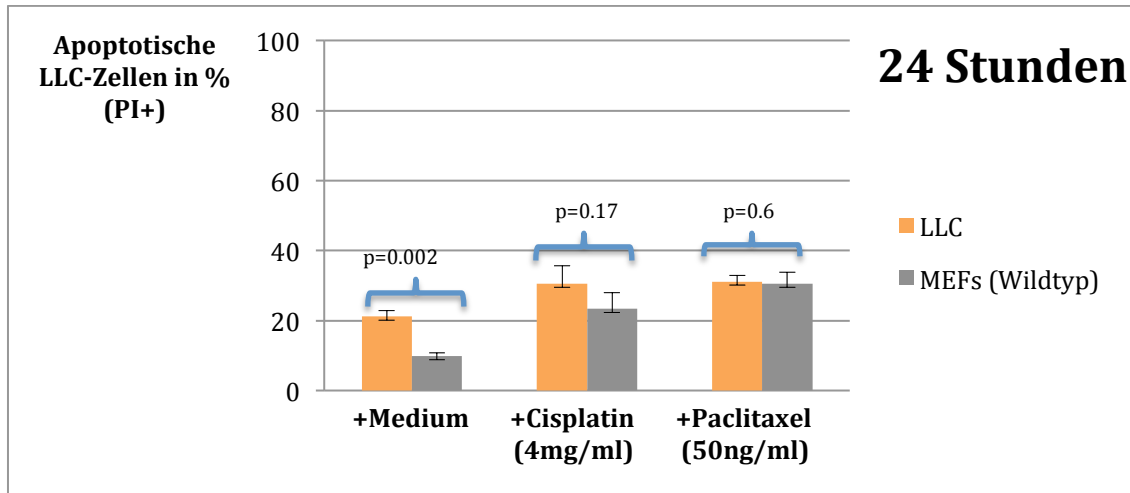


Abb.17 Vergleichsmessung LLC-Zellen allein und in Cokultur mit Wildtyp-MEFs nach 24 Stunden(n=3)

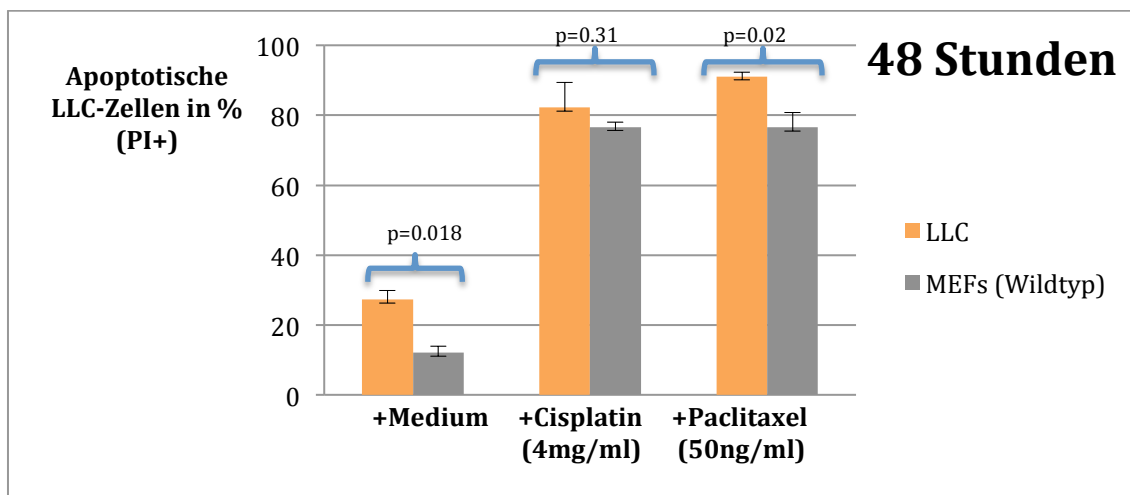


Abb.18 Vergleichsmessung LLC-Zellen allein und in Cokultur mit Wildtyp-MEFs nach 48 Stunden(n=3)

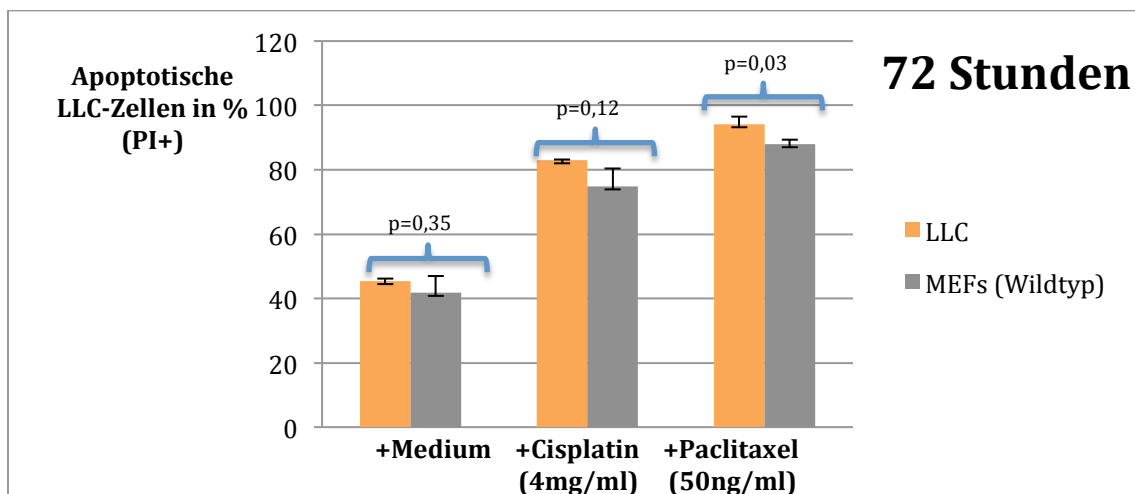


Abb.19. Vergleichsmessung LLC-Zellen allein und in Cokultur mit Wildtyp-MEFs nach 72 Stunden(n=3)

Ähnlich den 24- und 48 Stunden Messwerten war der prozentuale Anteil der PI-positiven LLC-Zellen ohne Cokultivierung nach 72 Stunden deutlich höher als mit Cokultivierung. Es scheint auch hier die Cokultivierung mit Wildtyp-MEFs ein Vorteil für die LLC-Zellen im Hinblick auf die Chemosensitivität zu sein.

5.4.2. P53-Defizienz im Stroma erhöht Chemosensitivität der LLC-Zellen

Im Vergleich zur Vergleichsmessung mit LLC-Zellen, Wildtyp-MEFs und Trp53^{KI/KI}-MEFS wurden in den folgenden Messreihen nur Trp53^{KI/KI}-MEFs zusammen mit LLC-Zellen cokultiviert. Die gegenübergestellten Cokulturen unterscheiden sich lediglich in der Vorbehandlung der einen Vergleichsgruppe mit 4-Hydroxytamoxifen. Nach dem Ausplattieren der MEFs erfolgte die Zugabe von 4-OHT zum Medium der Zellen. Die Zellen wurden in der Folge alle zwei Tage gesplittet und 4-OHT neu hinzugefügt. Die zu vergleichenden MEFs wurden parallel bis auf Zugabe von 4-OHT gleich behandelt. Wie in Methode „Trp53^{KI/KI}-Mausmodell“ beschrieben, restauriert eine Behandlung der MEFs mit 4-OHT über >48 Stunden den Wildtypstatus der MEFs bezüglich p53.

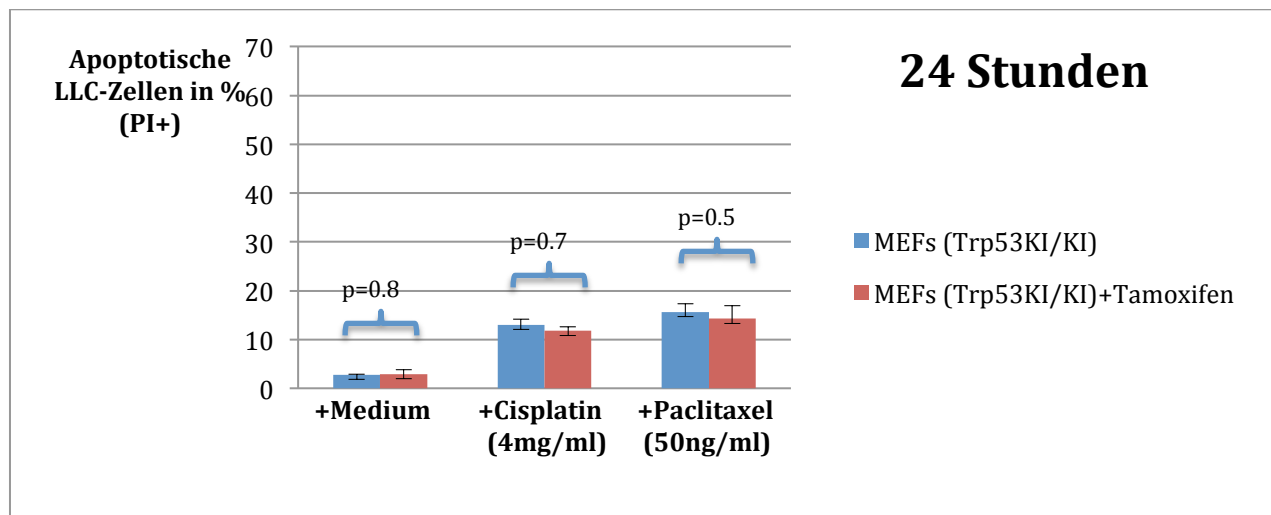


Abb.20 Vergleichsmessung Trp53^{KI/KI}-MEFS nach 24 Stunden behandelt mit und ohne 4-OHT(n=3)

Wie in Abbildung 19 zu sehen, ist die Spontanapoptose (Vergleichsmessung mit Medium) geringer als in den vorherigen Messungen. Nach Behandlung mit Zytostatika zeigen sich in den beiden Gruppen wieder merkliche Unterschiede in

deren Reaktion darauf. LLC-Zellen, die mit Trp53^{KI/KI}-MEFS ohne Zugabe von 4-OHT kokultiviert waren, reagieren empfindlicher als diejenigen, bei denen eine Vorbehandlung stattgefunden hat.

In den Messungen nach 24 Stunden lässt sich diese Beobachtung für Cisplatin als auch für Paclitaxel feststellen.

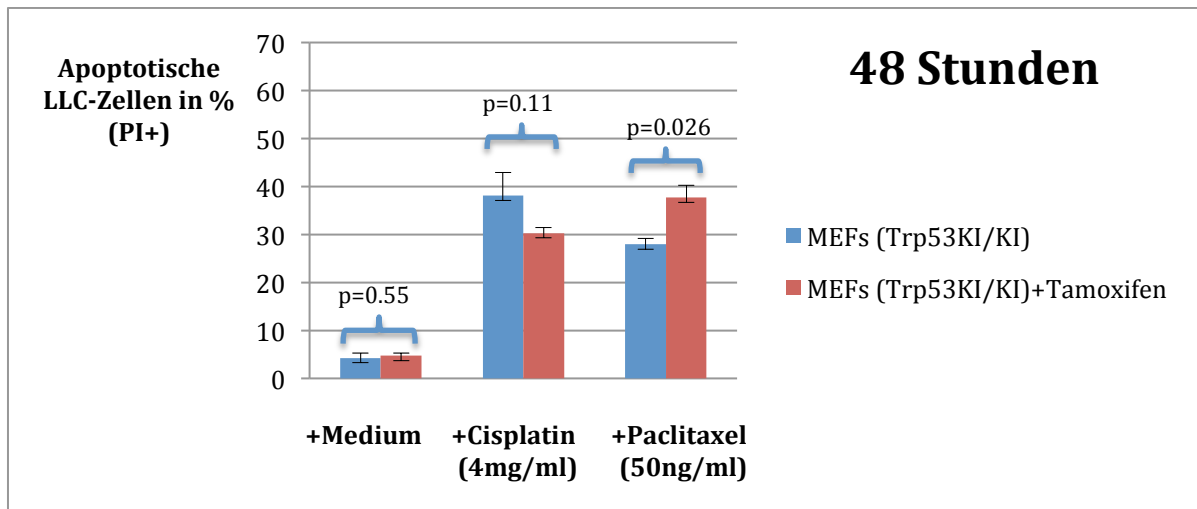


Abb.21 Vergleichsmessung Trp53^{KI/KI}-MEFS nach 48 Stunden behandelt mit und ohne 4-OHT(n=3)

Vergleicht man nun die Messungen nach 48 Stunden mit denen nach 24 Stunden, lässt sich für die Spontanapoptose und die mit Cisplatin behandelten Kokulturen eine ähnliche empfindlichere Reaktion bei p53-defizientem Stroma zeigen. Betrachtet man hingegen die mit Paclitaxel behandelten Zellen, zeigt sich im Gegensatz zu den 24-Stunden-Messungen eine andere Tendenz: Die Apoptose der LLC-Zellen ist höher, wenn kokultiviert mit Trp53^{KI/KI}-MEFS+4-OHT als ohne 4-OHT.

Dieser Effekt verstärkt sich nach 72 Stunden noch weiter.

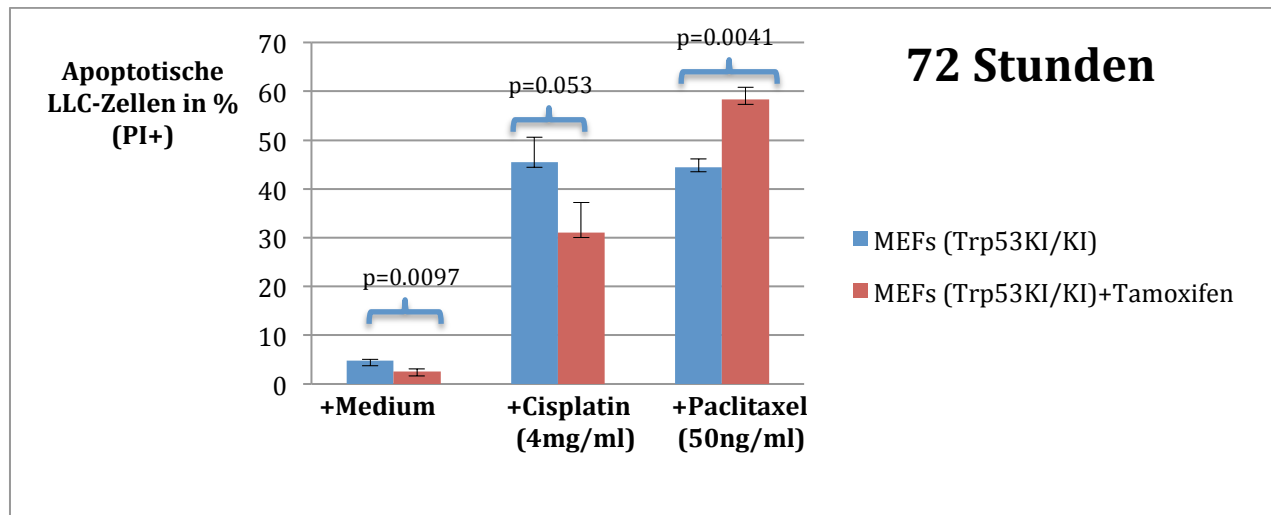


Abb.22 Vergleichsmessung Trp53^{KI/KI}-MEFS nach 72 Stunden behandelt mit und ohne 4-OHT(n=3)

Bezogen auf die Zugabe von Cisplatin zeigen LLC-Zellen, die mit p53-defizienten Fibroblasten kokultiviert waren eine deutlich höhere Apoptose.

Die Reaktion auf eine Zugabe von Paclitaxel fiel im Vergleich zum 48-Stunden-Wert ebenfalls ausgeprägter aus. LLC-Zellen scheinen in einem Stroma mit intaktem p53 empfindlicher für eine chemotherapeutische Behandlung mit Paclitaxel zu sein als in p53-defizientem.

Es besteht nach den gewonnenen Werten also ein Nachteil für den Tumor bezüglich seiner Chemosensitivität gegenüber Cisplatin, wenn das Stroma p53-defizient ist.

Bei der Behandlung mit Paclitaxel ist es jedoch ein Vorteil.

Für nachfolgend beschriebenen in vivo Versuche ergeben sich aus diesen Ergebnissen zwei Fragestellungen; zum einen, wie der p53-Status im Stroma die Tumorprogression beeinflusst und zum anderen, wie er sich auf die Chemosensibilität des Tumors auswirkt.

6. Diskussion

6.1. Einfluss des Mikromilieus auf die Chemosensitivität

Aus den Ergebnissen der Versuche geht hervor, dass Tumorzellen, wenn sie mit Stromazellen kokultiviert wurden, eine geringere Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika aufweisen, als bei selektiver Kultivierung.

Resistenz gegenüber zytostatischen Substanzen lässt sich weiter in eine intrinsische Resistenz als Folge von Mutation(-en) innerhalb einer Tumorzelle mit folgender Proliferation von chemoresistenten Klonen, wie es nach der Luria-Delbruck-Hypothese der Fall ist (*Coldman et al., 1986*) (auch als „acquired drug resistance“ oder ADR bezeichnet) und in eine extrinsische Resistenz aufteilen. Der extrinsische Weg oder „Environmental-mediated drug resistance (EM-DR)“ entsteht unter dem Einfluss von löslichen Faktoren sowie von Zell-Adhäsions-Molekülen (CAM-DR) und zeigt schon zu Beginn der Therapie einen Einfluss auf das Ansprechen der Tumorzellen hierauf. Die ADR hingegen entwickelt sich erst im Verlauf der Therapie (*u.a. Bellamy et al., 1991*). Beide Einflüsse sind vom Mikromilieu des Tumors abhängig. Bei den löslichen Faktoren sind beispielsweise für das Chemokin SDF-1 und das Zytokin IL-6 Einflüsse auf die Chemoresistenz verschiedener Tumorarten beschrieben.

SDF-1 wird von einer Vielzahl von Geweben sezerniert und entwickelt seine Effekte über den physiologischen Rezeptor CXCR-4, welcher an Chemotaxis, Hämatopoese, Vaskulogenese, Tumorwachstum und Metastasierung beteiligt ist. Durch eine Blockade des Rezeptors in vivo ließ sich die Bildung von Metastasen von u.a. Mammakarzinomen und Bronchialkarzinomen in Lunge, Knochenmark und Lymphknoten reduzieren (*Burger et al., 2006*).

In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Expression des SDF-1 Rezeptors CXCR-4 auf der Zelloberfläche die Metastasierung von verschiedenen Tumorarten, wie Mamma-, Ovarial- oder Prostatakarzinom in den Knochen erleichtert (*Ratajczak et al., 2006*). Zudem zeigte eine overall-survival-Studie für das Überleben von Patienten mit bereits metastasiertem NSCLC (Stad. IV) ein deutlich kürzeres Überleben, wenn die Tumorzellen CXCR-4 exprimierten (*European Society for Medical Oncology, 2010*).

Versuche zum Molekül zeigten weiterhin einen Zusammenhang zwischen der SDF-1-Sezernierung und p53, was die Bedeutung dieses Zytokins in Verbindung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in ein neues Licht bringen könnte.

So konnte nachgewiesen werden, dass ein Knock-Out von p53 einen Anstieg von SDF-1 zur Folge hatte und der supportive Effekt von SDF-1 auf die Tumorzellen auf diese Weise durch einen Verlust von p53 in stromalen Fibroblasten verstärkt wird (*Moskovits et al., 2006*). Addadi et al. konnten mithilfe eines Maus-Xenograft-Modells einen positiven Effekt von p53-Defizienz in Fibroblasten und dem Wachstum von co-injizierten Prostatakarzinomzellen im Zusammenhang mit SDF-1 ausmachen (*Addadi et al., 2010*).

Welche Bedeutung ein p53 Verlust in einer Zelle für deren Sekretionsprofil hat, untersuchten Khwaja et al. (*Khwaja et al., 2006*), indem sie in einer p53-mutierten Gliom-Zelllinie den WT-p53-Status restaurierten.

Von 111 untersuchten Proteinen, die die Zellen sezernierten, waren in der Folge 39 quantitativ erhöht und 21 erniedrigt. Unter den verminderten Proteinen wurden u.a. Matrix-Metallo-Proteinasen wie MMP-1 und MMP-16 identifiziert. Eine Beobachtung, die bereits von anderen Autoren berichtet wurde (*Sun et al., 2000*).

Neben den hier beschriebenen Proteinen zeigen verschiedene andere Arbeiten einen Einfluss von IL-6 auf die EM-DR.

Unter anderem sind für Knochenmark-Stromazellen als Mikromilieu von Tumoren hohe Level an IL-6 beschrieben (*Lu et al., 2004*), was beispielsweise in Myelomzellen ein erhöhtes Level an fibroblast growth factor zur Folge hat (*Bisping et al., 2003*) und eine gegenseitige positive Beeinflussung von Tumor und Stroma bezüglich des Wachstums nahegelegt.

Auch für die Chemoresistenz in Myelomzellen ist für IL-6 hierzu ein Zusammenhang nachgewiesen (*Voorhees et al., 2007*).

Neben den genannten löslichen Faktoren sind zudem für TGF- β und HGF (hepatocyte growth factor) positive Einflüsse u.a. auf das Tumorwachstum innerhalb des Mikromilieus beschrieben worden (*Lazar-Molnar et al., 2000; Cunha et al., 2003*). Hier zeigen sich verschieden Modi, wie sich zum einen der p53-Status einer Zelle auf die Sekretion von löslichen Faktoren auswirken kann und zum anderen, wie sich dieses auf das Mikromilieu auswirken kann. Dieses könnte u.a. einen Einfluss auf die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse haben

Wie oben erwähnt sind außer für die löslichen Faktoren auch für Zell-Adhäsionsmoleküle Einflüsse auf die in dieser Arbeit beschriebene erhöhte Chemoresistenz bekannt.

Im Zentrum der CAM-DR stehen vor allem die Integrine, wie das VLA-1 (very large antigen 1), welches u.a. für die Chemoresistenz im SCLC gegenüber Etoposid von Relevanz zu sein scheint (*Hartmann et al., 2005*).

Auch ein Einfluss von E-Cadherin ließ sich zeigen. Sollte es zu einem Verlust von p53 in einer Zelle kommen, kann er sich auch auf die Expression dieses zentralen Adhäsionsmoleküls auswirken. So konnte gezeigt werden, dass ein p53 Verlust in einer NSCLC-Linie eine verminderte E-Cadherin Expression zur Folge hatte (*Bukholm et al., 1997*), wobei der Verlust von E-Cadherin seinerseits einen Einfluss auf p53 in Zellen haben kann (*Nigro et al., 1997*).

In wie weit sich der Einfluss des Mikromilieus auf das Tumorwachstum und die Chemosensitivität auf bestimmte Moleküle begrenzen lässt oder ob sich die beobachteten Effekte aus einer Vielzahl von verschiedenen Einflüssen ergeben, bedarf weiterer Untersuchungen zu dieser Fragestellung. Weiterhin von Interesse ist, in welchem Ausmaß die beschriebenen Vorgänge zellspezifisch sind und welche Reaktionen als pathophysiologisch regelhaft zu werten sind.

Beide Ansätze sind möglicherweise grundlegend für zukünftige Therapieansätze.

6.2. Möglicher Selektionsdruck gegen p53 im Stroma und Auswirkung auf die Chemosensitivität

Neben der Beobachtung, dass das Tumormikromilieu die Resistenz der LLC-Zellen gegenüber einer Behandlung mit Zytostatika erhöht, zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die beschriebenen Effekte zusätzlich vom p53-Status im Stroma abhängig sind.

Nach Restauration des WT-p53-Status konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich daraus ein verändertes Ansprechen der Tumorzellen auf Zytostatika ergibt (vgl. Abbildungen 19-21).

Wie oben beschrieben konnten Veränderungen des p53-Status u.a. mit einem veränderten Sekretionsprofil und einer geänderten Expression von Adhäsionsmolekülen in Verbindung gebracht werden. Durch welchen Pathomechanismus sich jedoch ein p53-Verlust in der Tumorzelle auf p53 in

Stromazellen auswirkt, konnte bislang nicht eindeutig gezeigt werden. So beschrieben Hill et al. einen von den Tumorzellen ausgehenden Selektionsdruck auf den p53-Status der Stromazellen in dem von dieser Arbeitsgruppe untersuchten Mikromilieu (Hill et al., 2005-2). Weiterhin ließen ihre Ergebnisse auf einen nachfolgenden Einfluss der Stromazellen wiederum auf p53 im Tumor selbst schließen.

Eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) infolge des p53-Verlustes schlossen die Autoren dabei aus, da sich u.a. EMT-typische Oberflächenmarker (vgl. Saika et al., 2004) nicht nachweisen ließen und die Zellen sich auch histologisch weiter gut differenzieren ließen.

Der genaue Mechanismus dieses Effektes blieb jedoch offen.

Wie sich der vermeintliche genotoxische Stress als eine Art Selektionsdruck auf das p53 im Stroma des Tumors auswirkt, könnten weitere Untersuchungen der Stromazellen nach Cokultivierung zeigen. Von besonderem Interesse könnte hier die Untersuchung von ATM oder Phosphohiston-2AX sein, um genotoxischen Stress in den Zellen zu belegen.

ATM steht in engem Zusammenhang mit p53 und Mdm-2 (Kastan et al., 1991) und gehört zu den Proteinen, die nach genotoxischem Stress an einem möglichen Zellzyklusarrest mit DNS-Reparatur oder der Apoptose beteiligt sind (u.a. Khanna et al., 2001). Auch die Betrachtung von Phosphohiston-2AX als zellulären Marker für einen DNS-Schaden (Fernandez-Capetillo et al., 2004) stellt einen möglichen nächsten Untersuchungsschritt dar.

Einen weiteren Ansatzpunkt für einen potentiellen Nachweis böte die p14^{ARF}-, Mdm-2-, p53-Achse. Unter anderem durch Beeinflussung des nukleo-zytoplasmatischen Shuttles von Mdm-2 wird durch p14^{ARF} letztlich p53 stabilisiert (Tao et al., 1999). Dieser Einfluss könnte so auch im Selektionsdruck innerhalb des Mikromilieus beteiligt sein.

Wie sich eine DNS-Schädigung auf p53 auswirkt, kann ebenfalls die Analyse seines Phosphorylierungsprofils zeigen (u.a. Ashcroft et al., 1999).

Die genannten Proteine stellen mögliche pathophysiologische oder pharmakologische Ansatzpunkte dar, den vermuteten Selektionsdruck gegen p53 im Mikromilieu während der Cokultivierung aufzudecken.

Welche Rolle der p53-Verlust der Zelle infolge von genotoxischem Stress haben kann, zeigte die Beobachtung, dass von Tumorzellen ausgehend DNS von Fibroblasten in ihrer Umgebung aufgenommen wird. Voraussetzung dafür, dass die Fibroblasten nach Aufnahme der mutierten DNS nicht in Seneszenz übergehen oder die Apoptose einleiten, ist ein Fehlen oder Verlust von p53 in der Zielzelle. War dies der Fall, so existiert Evidenz, dass die Tumor-DNS dann im Fibroblasten vertikal weitergegeben werden kann (*Ehnfors et al., 2009*) - eine Beobachtung, die die vermeintlichen Folgen eines p53-Verlustes im Stroma für dessen Karzinogenese verdeutlicht.

6.3. Weitere Versuche und Ausblick

Auf welche Weise der Verlust von p53 im Mikromilieu durch Selektionsdruck erfolgt, ist noch nicht ausreichend aufgeklärt. Zwar gibt es in den o.g. Arbeiten zum Einfluss löslicher Faktoren und von Zell-Adhäsionsmolekülen Erklärungen für eine gesteigerte Chemosensibilität in Tumoren, jedoch ist nicht hinreichend erleutert, weshalb sich die Chemosensibilität im Tumor durch p53-Defizienz in dessen Stroma erhöht (neben den Ergebnissen dieser Arbeit u.a. in *Lafkas et al., 2008* für Cisplatin gezeigt). Aus welchem Grund das Tumorwachstum (*Kiaris et al., 2005*) sowie die Neigung zur Metastasierung (*Kang et al., 2009*) durch das Mikromilieu auf der einen Seite unterstützt wird, wenn p53 darin degradiert ist und auf der anderen Seite die Chemosensibilität steigt, ist ebenfalls bisher nicht geklärt.

Dem gegenüber steht die Erkenntnis, dass sich die Tumorzellen unter einer Behandlung mit Paclitaxel gegenteilig verhalten und sensibler sind, wenn p53 im Stroma wieder restauriert wurde. Eine höhere Sensibilität gegenüber Paclitaxel bei stärkerer p53-Expimierung in NSCLC-Zelllinien konnte dabei schon früher nachgewiesen werden (*Guntur et al., 2010*). Ob die dort beschriebenen Ergebnisse für die hier gewonnen Daten von Bedeutung sind, bedarf weiterer Untersuchungen. Hierzu könnten außer p53 weitere Proteine in der Zelle eine Rolle spielen, wie es für die Chemosensibilität beispielsweise für p27 (*Hazlehurst et al., 2000*) oder p21 (*Lwin et al., 2007*) gezeigt werden konnte.

Weitere Untersuchungen sollen zeigen, wie sich das Zytokin-Profil der LLC-Zellen und der MEFs mit verändertem p53 verhalten. Hier ließen sich mit der Übertragung von konditioniertem Medium weitere Erkenntnisse gewinnen. Auch Untersuchungen

mit Hilfe von Gene-arrays werden weitere Aufschlüsse zu diesen Fragestellungen geben.

Künftige in vivo Versuche können ebenfalls wertvolle Hinweise zur Bedeutung von p53 in der Tumor-Stroma-Interaktion geben.

7. Anhang

7.1. Zusammenfassung

Nachdem über mehrere Dekaden hinweg die Untersuchung von Vorgängen in der Tumorzelle selbst im Zentrum der onkologischen Forschung stand, zeigten zahlreiche Studien das die Tumorzelle umgebende Stroma als einen weiteren wichtigen Faktor in der Tumorgenese auf. Das sog. Mikromilieu zeigt sich dabei als heterogenes Gebilde, bestehend aus verschiedenen Zellarten, wobei den beteiligten Fibroblasten hierin eine besondere, wenn nicht entscheidende Rolle zugesprochen wird. Verschiedene lösliche Faktoren, die von Stromazellen in das Mikromilieu sezerniert werden sowie membrangebundene Moleküle können mit diesen Effekten in Verbindung gebracht werden.

Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen dem p53-Status in den Stromazellen und einem in der Folge veränderten Sezernierungsmuster beobachtet werden. Weiter ergibt sich daraus in mehreren Untersuchungen ein beschleunigtes Tumorwachstum, eine erhöhte Neigung zur Metastasierung sowie verstärkte Chemosensitivität gegenüber bestimmten Zytostatika.

Zur Bestätigung der besonderen Rolle des p53-Status im Mikromilieu wurde ausgehend vom Tumor ein „Selektionsdruck“ auf die den Tumor umgebenden Fibroblasten beobachtet.

Die beschriebenen Vorgänge zeigen das Vorliegen eines komplexen metabolischen Dialogs zwischen Tumor und Stroma.

Um die beschriebenen Effekte weiter aufzuklären, war es zunächst notwendig ein ex-vivo Modell zu etablieren, um Tumor-Stroma-Interaktionen abhängig vom p53-Status in den Fibroblasten per Durchflusszytometrie zu untersuchen. Methodisch wurden embryonale Fibroblasten (MEFs) von Mäusen gewonnen, in denen durch Injektion von 4-Hydroxytamoxifen p53 in der Zelle restauriert werden kann. Dieser Schritt ermöglichte es, den p53-Status der Fibroblasten in-vitro zu verändern. Als Tumorzellen dienten NSCLC-Zellen (LLC- Lewis lung cancer).

Im Zentrum der Untersuchungen stand die Chemosensitivität der Tumorzellen in entweder p53-defizientem- oder p53-WT-Stroma.

Cokulturen wurden dabei entweder einer Cisplatin- oder Paclitaxel-Behandlung ausgesetzt und die Ergebnisse nach 24, 48 und 72 Stunden per Durchflusszytometrie mittels Lebend-Tod-Diskriminierung (PI-Färbung) oder Zellzyklusfärbung ausgewertet. Die zuvor durchgeführte Zellfärbung der MEFs mit Calcein-AM machte es dabei möglich, den Zellzyklus beider Zellarten der Cokultur synchron aufzutrennen und zu betrachten. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit, zwei adherend-wachsende Zellpopulationen, die ein ähnliches Signal in der Durchflusszytometrie zeigen, über mehrere Tage aufzutrennen und individuell zu untersuchen.

In der Auswertung zeigte sich, dass der p53-Status eine signifikante Rolle für die Chemosensitivität der LLC-Zellen spielt. So zeigten die Tumorzellen nach Zugaben von Cisplatin und einem p53-defizienten Stroma eine erhöhte Apoptose-Rate. Dieser Effekt zeigte sich weiterhin abhängig vom eingesetzten Zytostatikum. Es ließ sich nachweisen, dass die Apoptose-Rate der Tumorzellen unter Paclitaxel-Behandlung höher war, wenn diese in einem p53-WT-Stroma kokultiviert waren.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit betrifft die mögliche Vorbereitung eines in-vivo Versuches im Mausmodell. Hierzu wurde in Vorversuchen die erforderliche Methodik zur Tumorgenese in der Maus mittels Injektion der LLC-Zellen in die Schwanzvene der Maus etabliert. Entstandene Bronchialkarzinome wurden histologisch aufgearbeitet und als HE-gefärbte Präparate ausgewertet.

Zusammen mit der Möglichkeit, p53 der Maus durch Injektion von 4-Hydroxytamoxifen zu restaurieren, bietet dieses Modell die Möglichkeit, die Tumor-Stroma-Interaktionen im Mausmodell weiter zu untersuchen und mögliche weitere Pathomechanismen aufzudecken.

7.2. Literaturverzeichnis

A

Addadi Y, Moskovits N, Granot D, Lozano G, Carmi Y, Apte RN, Neeman M, Oren M. p53 status in stromal fibroblasts modulates tumor growth in an SDF1-dependent manner. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9650-8. Epub 2010 Oct 15.

Antecol Michael H., André Darveau, Nahum Sonenberg, B.B. Mukherjee; Altered Biochemical Properties of Actin in Normal Skin Fibroblasts from Individuals Predisposed to Dominantly Inherited Cancers; *Cancer Res* 1986;46:1867-1873.

Aria F. Olumi, Gary D. Grossfeld, Simon W. Hayward, Peter R. Carroll, Thea D. Tlsty, and Gerald R. Cunha; Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium; *Cancer Res* 1999;59:5002-5011.

Ashcroft M., Kubbutat M., Vousden K.; Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation; *Mol Cell Biol.* 1999 March; 19(3): 1751–1758.

Atula S, Grenman R, Syrjänen S.; Fibroblasts can modulate the phenotype of malignant epithelial cells in vitro.; *Exp Cell Res.* 1997 Aug 25;235(1):180-7.

B

Bauer EA, Uitto J, Walters RC, Eisen AZ; Enhanced collagenase production by fibroblasts derived from human basal cell carcinomas. *Cancer Res.*; 1979 Nov;39(11):4594-9.

Bellamy WT, Dalton WS, Gleason MC, Grogan TM, Trent JM. Development and characterization of a melphalan-resistant human multiple myeloma cell line. *Cancer Res* 1991;51:995–1002

Bisping G, Leo R, Wenning D, Dankbar B, Padró T, Kropff M, Scheffold C, Kröger M, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J.; Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma; *Blood.* 2003 Apr 1;101(7):2775-83. Epub 2002 Nov 27.

Bukholm, I. K., Nesland, J. M., Karesen, R., Jacobsen, U. & Borresen-Dale, A. L. Expression of E-cadherin and its relation to the p53 protein status in human breast carcinomas. *Virchows Arch.* 431, 317–321 (1997)

Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006; 107: 1761–7.

C

Chang CJ, Chi-Hong Chao¹, Weiya Xia, Jer-Yen Yang, Yan Xiong, Chia-Wei Li, Wen-Hsuan Yu, Sumaiyah K. Rehman, Jennifer L. Hsu, Heng-Huan Lee, Mo Liu, Chun-Te Chen, Dihua Yu, and Mien-Chie Hung; p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs; *Nat Cell Biol.* 2011 Mar;13(3):317-23. Epub 2011 Feb 20.

Christofori G, Semb H; The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene; *Trends Biochem Sci.* 1999 Feb;24(2):73-6.

Christophorou MA, Martin-Zanca D, Soucek L, Lawlor ER, Brown-Swigart L, Emmy W Verschuren & Gerard I Evan; Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo. *Nat Genet.* 2005;37:718–726

Clarke A.R., C.A. Purdie, D.J. Harrison, R.G. Morris, C.C. Bird, M.L. Hooper & A.H. Wyllie; Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways; *Nature* 362, 849 - 852 (29 April 1993); doi:10.1038/362849a0

Coldman AJ, Goldie JH.; A stochastic model for the origin and treatment of tumors containing drug-resistant cells; *Bull Math Biol.* 1986;48(3-4):279-92

Cornil I, Theodorescu D, Man S, Herlyn M, Jambrosic J, Kerbel RS.; Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jul 15;88(14):6028-32.

Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., and Ricke, W.A. (2003). Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int. J. Cancer* 107, 1–10.

D

Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY; DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis; *Oncogene.* 1999 Dec 20;18(55):7883-99.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur M, Montgomery JrC, Butel JS and Bradley A, 1992, Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature*, 356,215-221.

E

Ehnfors J., M Kost-Alimova, N. Luna Persson, A Bergsmedh, J. Castro, T. Levchenko-Tegnebratt, L. Yang, T. Panaretakis and L. Holmgren; Horizontal transfer of tumor DNA to endothelial cells in vivo; *Cell Death and Differentiation* (2009) 16, 749–757

European Society for Medical Oncology (2010, May 1). CXCR4: A new drug target in lung cancer. *ScienceDaily*

F

Fei P, El-Deiry WS; P53 and radiation responses; *Oncogene*. 2003 Sep 1;22(37):5774-83.

Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A.; H2AX: the histone guardian of the genome; *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):959-67.

Fukino, K., Shen, L., Matsumoto, S., Morrison, C.D., Mutter, G.L., and Eng, C. (2004). Combined total genome loss of heterozygosity scan of breast cancer stroma and epithelium reveals multiplicity of stromal targets. *Cancer Res*. 64, 7231–7236.

G

Gilbert, S. F. *Developmental Biology* (Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 1997).

Goeckenjan G., H. Sitter, M. Thomas, D. Branscheid, M. Flentje, F. Griesinger, N. Niederle, M. Stuschke, T. Blum, K.-M. Deppermann, J. H. Ficker, L. Freitag, A. S. Lübke, T. Reinhold, E. Späth-Schwalbe, D. Ukena, M. Wickert, M. Wolf, S. Andreas, T. Auberger, R. P. Baum, B. Baysal, J. Beuth, H. Bickeböller, A. Böcking, R. M. Bohle, I. Brüske, O. Burghuber, N. Dickgreber, S. Diederich, H. Dienemann, W. Eberhardt, S. Eggeling, T. Fink, B. Fischer, M. Franke, G. Friedel, T. Gauler, S. Gütz, H. Hautmann, A. Hellman, D. Hellwig, F. Herth, C. P. Heußel, W. Hilbe, F. Hoffmeyer, M. Horneber, R. M. Huber, J. Hübner, H.-U. Kauczor, K. Kirchbacher, D. Kirsten, T. Kraus, S.M. Lang, U. Martens, A. Mohn-Staudner, K.-M. Müller, J. Müller-Nordhorn, D. Nowak, U. Ochmann, B. Passlick, I. Petersen, R. Pirker, B. Pokrajac, M. Reck, S. Riha, C. Rübe, A. Schmittl, N. Schönfeld, W. Schütte, M. Serke, G. Stamatidis, M. Steingraber, M. Steins, E. Stoelben, L. Swoboda, H. Teschler, H. W. Tessen, M. Weber, A. Werner, H.-E. Wichmann, E. Irlinger Wimmer, C. Witt, H. Worth
Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, *Pneumologie* 2010; 64, Supplement 2: e1 – e164

Graefe, Karl Heinz; Werner K. Lutz, Heinz Bönisch; *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*; Thieme; 2011 (1. Auflage)

Guntur VP, Waldrep JC, Guo JJ, Selting K, Dhand R.; Increasing p53 protein sensitizes non-small cell lung cancer to paclitaxel and cisplatin in vitro; *Anticancer Res*. 2010 Sep;30(9):3557-64.

H

Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M.; CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells; *Oncogene*. 2005 Jun 23;24(27):4462-71.

Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. Adhesion to fibronectin via h1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Onco- gene* 2000;19:4319 ^ 27.

Hill, R.(1) Song, Y., Carrdiff, R.D., and Van Dyke, T. (2005). Heterogeneous tumor evolution initiated by loss of pRb function in a preclinical prostate cancer model. *Cancer Res*. 65, 10243–10254.

Hill, R.(2); Yurong Song, Robert D. Cardiff, Terry Van Dyke; Selective Evolution of Stromal Mesenchyme with p53 Loss in Response to Epithelial Tumorigenesis; *Cell* - 16 December 2005 (Vol. 123, Issue 6, pp. 1001-1011)

K

Kang SY, Halvorsen OJ, Gravdal K, Bhattacharya N, Lee JM, Liu NW, Johnston BT, Johnston AB, Haukaas SA, Aamodt K, Yoo S, Akslen LA, Watnick RS; Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 21;106(29):12115-20. Epub 2009 Jul 6.

Kaplan RN, Psaila B, Lyden D; Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond; *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Dec;25(4):521-9

Karow, T.; Ruth Lang-Roth; Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Thomas Karow Verlag; 2009

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991;51: 6304–11.

Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 2001;8:1052–65.

Khwaja FW, Svoboda P, Reed M, Pohl J, Pyrzynska B, Van Meir EG; Proteomic identification of the wt-p53-regulated tumor cell secretome; *Oncogene*. 2006 Dec 7;25(58):7650-61. Epub 2006 Oct 9.

Kiaris, H., Chatzistamou, I., Trimis, G., Frangou-Plemmenou, M., Pafiti-Kondi, A., and Kalofoutis, A. (2005). Evidence for nonautonomous effect of p53 tumor suppressor in carcinogenesis. *Cancer Res*. 65, 1627–1630.

Knudson W, Biswas C, Toole BP; Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Nov;81(21):6767-71.

Kurose, K., Hoshaw-Woodard, S., Adeyinka, A., Lemeshow, S., Watson, P.H., and Eng, C. (2001). Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions. *Hum. Mol. Genet*. 10, 1907–1913.

L

Lafkas D, Trimis G, Papavassiliou AG, Kiaris H; P53 mutations in stromal fibroblasts sensitize tumors against chemotherapy; *Int J Cancer*. 2008 Aug 15;123(4):967-71.

Lane D.; Awakening angels; *Nature*. 1998 Aug 13;394(6694):616-7.

Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000;12:547–54

Lu Y, Zhang J, Dai J, Dehne LA, Mizokami A, Yao Z, Keller ET.; Osteoblasts induce prostate cancer proliferation and PSA expression through interleukin-6-mediated activation of the androgen receptor; *Clin Exp Metastasis*. 2004;21(5):399-408.

Lutzker SG, Levine AJ; A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation; *Nat Med*. 1996 Jul;2(7):804-10.

Lwin T, Lori A. Hazlehurst, Sophie Dessureault, Raymond Lai, Wenlong Bai, Eduardo Sotomayor, Lynn C. Moscinski, William S. Dalton and Jianguo Tao; Cell adhesion induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Blood* 2007;110:1631-8.

M

MacCallum DE, Hupp TR, Midgley CA, Stuart D, Campbell SJ, Harper A, Walsh FS, Wright EG, Balmain A, Lane DP, Hall PA; The p53 response to ionising radiation in adult and developing murine tissues; *Oncogene*. 1996 Dec 19;13(12):2575-87.

Matsumoto, N., Yoshida, T., Yamashita, K., Numata, Y., and Okayasu, I. (2003). Possible alternative carcinogenesis pathway featuring microsatellite instability in colorectal cancer stroma. *Br. J. Cancer* 89, 707– 712.

McNeill A. Tobacco use and effects on health. In: Prepared by the Aspect Consortium EC, Hrsg. Tobacco or health in the European Union– past, present und future. Prepared by the Aspect Consortium, European Commission. Luxemburg: Office für Official Publication of the European Communities, 2004: 25 – 68

Michael D, Oren M; The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system; *Semin Cancer Biol.* 2003 Feb;13(1):49-58.

Moinfar, F., Man, Y.G., Arnould, L., Bratthauer, G.L., Ratschek, M., and Tavassoli, F.A. (2000). Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res.* 60, 2562–2566.

Mountain CF; Revisions in the International System for Staging Lung Cancer; *Chest.* 1997 Jun;111(6):1710-7.

Moskovits N, Kalinkovich A, Bar J, Lapidot T, Oren M.; p53 Attenuates cancer cell migration and invasion through repression of SDF-1/CXCL12 expression in stromal fibroblasts.; *Cancer Res.* 2006 Nov 15;66(22):10671-6.

N

Nigro JM, Aldape KD, Hess SM, Tlsty TD; Cellular adhesion regulates p53 protein levels in primary human keratinocytes; *Cancer Res.* 1997 Sep 1;57(17):3635-9.

P

Papadopoulos, N.G., Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. J., An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry; *J. Immunol. Methods* 1994, 177, S. 101–111.

Passalaris TM, Benanti JA, Gewin L, Kiyono T, Galloway DA; The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways; *Mol Cell Biol.* 1999 Sep;19(9):5872-81.

Paterson, R.F., Ulbright, T.M., MacLennan, G.T., Zhang, S., Pan, C.X., Sweeney, C.J., Moore, C.R., Foster, R.S., Koch, M.O., Eble, J.N., and Cheng, L. (2003). Molecular genetic alterations in the laser-capture- microdissected stroma adjacent to bladder carcinoma. *Cancer* 98, 1830–1836.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9:265–273.

Pritchett, T. Rand, Julia K. M. Wang and Peter A. Jones; Mesenchymal-Epithelial Interactions between Normal and Transformed Human Bladder Cells; *Cancer Res* 1989;49:2750-2754.

Prives C.; Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit; *Cell.* 1998 Oct 2;95(1):5-8.

Prives C, Hall PA; The p53 pathway; *J Pathol.* 1999 Jan;187(1):112-26.

R

Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J.; The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis; *Leukemia.* 2006 Nov;20(11):1915-24. Epub 2006 Aug 10.

Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten; „Krebs in Deutschland 2007/2008“, 8.Ausgabe 2012

S

Sack U, Tärnok A, Rothe G (Hrsg): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel, Karger, 2007, pp 27–70

Saika, S., Kono-Saika, S., Ohnishi, Y., Sato, M., Muragaki, Y., Ooshima, A., Flanders, K.C., Yoo, J., Anzano, M., Liu, C.Y., Kao WW, Roberts AB. (2004). Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am. J. Pathol.* 164, 651–663.

Sappino AP, Schürch W, Gabbiani G.; Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations.; *Lab Invest.* 1990 Aug;63(2):144-61

Soussi T, Wiman KG; Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm; *Cancer Cell.* 2007 Oct;12(4):303-12.

Sun Y, Cheung JM, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Wenger L, Altman RD, Howell DS, Cheung HS. (2000). Wild type and mutant p53 wt-p53-regulated secreted proteins in glioma cells differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13). *J Biol Chem* 275: 11327–11332.

T

Tao W, Levine AJ.; P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2; Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 8;96(12):6937-41.

Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. Curr Opin Genet Dev 2001;11:54–9

Tuhkanen, H., Anttila, M., Kosma, V.M., Ylä-Herttuala, S., Heinonen, S., Kuronen, A., Juhola, M., Tammi, R., Tammi, M., and 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.

V

Van den Hooff A.; Stromal involvement in malignant growth; Adv Cancer Res.1988;50:159-96.

Voorhees PM, Chen Q, Kuhn DJ, Small GW, Hunsucker SA, Strader JS, Corringham RE, Zaki MH, Nemeth JA, Orlowski RZ.; Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical models of multiple myeloma. Clin Cancer Res 2007;13:6469 ^ 78.

Vousden KH, Prives C.; Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53; Cell. 2009 May 1;137(3):413-31.

W

Wernert, N., Locherbach, C., Wellmann, A., Behrens, P., and Hugel, A. (2001). Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers. Anticancer Res. 21, 2259–2264.

Y

Yamaura T, Doki Y, Murakami K, Saiki I.; Model for mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic intrapulmonary implantation of lung cancer cells in mice; Hum Cell. 1999 Dec;12(4):197-204.

7.3. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Frederik Götte
Geburtsdatum: 27.09.1985
Geburtsort: Wiesbaden
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Hochschulbildung

05/2012: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2008: Immatrikulation im Studiengang Humanmedizin an der TU München
04/2008: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2005: Immatrikulation im Studiengang Humanmedizin an der LMU München
06-10/2005: Praktikum in der Aukamm-Klinik, Wiesbaden

Schulbildung

06/2005: Abitur
2003-2005: Humboldt-Gymnasium, Wiesbaden
1996-2003: Oranien-Gymnasium, Wiesbaden
1992-1996: Robert-Koch-Grundschule in Wiesbaden-Bierstadt

7.4. Danksagung

Ich danke zunächst Herrn Prof. Dr. med. Ch. Peschel für die Möglichkeit an der 3. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar, München, und seinen Forschungseinrichtungen die notwendigen Versuche für die vorliegende Dissertation durchgeführt haben zu dürfen.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. med. Ingo Ringshausen und PD Dr. med. Tobias Dechow für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die stets engagierte und herzliche Betreuung, die ich immer als nicht selbstverständlich angesehen habe.

Besonderer Dank gilt Madlen Ölsner und Michaela Wagner, ohne die diese Arbeit in diesem Maß nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin danke ich Dr. rer. nat. Gloria Lutzny, Dipl.-Biol. Anja Baumgart, Toni Kuhnt und Constanze Weber für die gute, stets geduldige und freundliche Betreuung.

Ebenso Danke ich Dr. med. Moritz Wildgruber und Dr. med. Martina Rudelius für die Unterstützung im Rahmen der in-vivo Versuche.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mich seither mit allen Kräften und über alle Maße unterstützt haben.