

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Rolf-Edgar Silber)

Tumorigenese des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms: von der genetischen Regulation zur Tumor-Stroma-Interaktion

Habilitation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium, rerum medicarum habitatus
(Dr. rer. nat., rer. medic. habil.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. rer. nat. Babett Bartling
geboren am 18.09.1972 in Wernigerode

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hubertus Wirtz (Leipzig)
2. Prof. Dr. Leoni Kunz-Schughart (Dresden)
3. Prof. Dr. Heinz Günther Fehrenbach (Marburg)

Verteidigung am 20. Januar 2009 in Halle (Saale)

urn:nbn:de:gbv:3-000015229

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000015229>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Die Entstehung von Tumoren aus Epithelzellen (Karzinomen) ist ein multifaktorieller Vorgang, dem sowohl genetische Defekte in den Epithelzellen als auch ein geeignetes Gewebemilieu zu Grunde liegen. Das Gewebemilieu wird durch stromale Zellen und extrazelluläre Matrixkomponenten gebildet. Unter den Zellen des Stromas spielen die Fibroblasten eine bedeutende Rolle, da sie durch die Freisetzung von mitogenen Faktoren und Proteinasen die Tumorentwicklung unterstützen. Aus diesem Grund fokussierte die Arbeit auf molekulargenetischen Veränderungen im Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) sowie dem Einfluss von Fibroblasten auf die genetisch veränderten Bronchialkarzinomzellen.

Als primäre Ursache für die Karzinogenese gelten jedoch genetische Veränderungen. Diese können zudem als Marker für die Diagnose und Subklassifizierung von Tumoren herangezogen werden. So war das NSCLC mit der induzierten Expression zweier Proteine der S100-Familie verbunden, die als regulatorische Moleküle eine Vielzahl von biologischen Prozessen in der Zelle steuern. Konventionelle Methoden (*real-time* Polymerasekettenreaktion, Immunoblot und Immunhistochemie) zeigten, dass die Expression von S100P ein guter Indikator für ein Adenokarzinom im frühen Tumorstadium ist, wohingegen die Expression von S100A2 ein frühes Plattenepithelkarzinom anzeigt. Im Plattenepithelkarzinom der Lunge konnte mittels der neuartigeren Antikörper-Array-Technologie auch die Histondeazetylase 3 als Tumormarker identifiziert werden. Ferner erwies sich der Zelloberflächenrezeptor RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) als ein geeigneter Marker für neoplastische Veränderungen in der Lunge, da die starke Expression von RAGE im normalen Lungengewebe in den NSCLCs deutlich herabreguliert war. Die verminderte RAGE-Expression im NSCLC hing aber nicht von den beiden histopathologischen Subtypen, Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom, ab. Experimentelle Untersuchungen konnten dann zeigen, dass die sehr geringe RAGE-Expression im NSCLC 1) zum Verlust der normalen Zellorganisation des Lungenepithels zugunsten der tumorigenen Zellanordnung und 2) zu einer höheren Empfindlichkeit von Bronchialkarzinomzellen gegenüber der Wachstumsstimulation durch benachbarte Fibroblasten beiträgt. Die Gegenwart von Fibroblasten induzierte eine Vielzahl von molekularen Veränderungen in Bronchialkarzinomzellen *in vitro*. So kam es neben der Stimulation von Proteinkinasen (p42/44, Akt, p70S6) auch zu einer moderaten Heraufregulation des *High Mobility Group Box*-Proteins 1, dessen Expression eng mit der Tumorigenese verbunden ist. Dabei unterstützten die Fibroblasten durch Freisetzung von löslichen Faktoren nicht nur die Proliferation von Bronchialkarzinomzellen, sondern sie verminderten auch deren basalen Zelltod. Auch replikativ gealterte Fibroblasten hatten das Potential, Bronchialkarzinomzellen proliferativ zu stimulieren, nicht verloren. Dennoch dürften lösliche Faktoren von seneszenten Fibroblasten die intrazelluläre Homöostase in Lungenepithelzellen verändern, da sie einen leichten oxidativen Stress sowie oxidative Abwehrmechanismen (Expression der Superoxiddismutase 1) induzierten.

Diese Arbeit hat, unter anderem am Beispiel von RAGE, gezeigt, dass die Tumorigenese des NSCLC mit molekulargenetischen Veränderungen in Lungenepithelzellen assoziiert ist und zusätzlich vom veränderten Gewebemilieu durch die Nachbarschaft zu mesenchymalen Fibroblasten beeinflusst wird.

Bartling, Babett. Tumorigenese des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms: von der genetischen Regulation zur Tumor-Stroma-Interaktion. Halle, Univ., Med. Fak., Habil., 56 Seiten, 2008.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Referat und bibliographische Beschreibung	i
Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungen, Erläuterungen	iv
1. Einleitung	1
1.1. Krebserkrankungen des Epithels – Karzinome	1
1.2. Interaktion zwischen Epithel und Stroma bei der Entstehung von Karzinomen	3
1.3. Lungenkrebs – Bronchialkarzinom	6
1.4. Genetische und molekulare Veränderungen im Bronchialkarzinom	10
1.5. Der Rezeptor RAGE in Lunge und Bronchialkarzinom	13
2. Zielstellung der Arbeit	17
3. Veränderte Genexpression im Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom	17
3.1. Differentielle Genexpression als Indikator für Histopathologie und Stadium des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms	17
3.2. Vergleich von differentieller mRNA- und Proteinexpression	21
4. Beitrag des Rezeptors RAGE zur Entstehung des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms	23
4.1. Verminderte Expression von RAGE im Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom	23
4.2. Einfluss der verminderten RAGE-Expression auf Zellmigration und Tumorwachstum	26
4.3. Veränderte Epithelstruktur durch die Expression von RAGE	29
5. Einfluss von Fibroblasten auf die Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomzellen	31
5.1. Mitogene Stimulation und Tumorzellproliferation	31
5.2. Tumorzellresistenz und Einfluss der zellulären Seneszenz von Fibroblasten	36

6. Zusammenfassung	43
7. Literaturverzeichnis	45
8. Eigene veröffentlichte Originalarbeiten zur Habilitationsschrift	54
8.1. <i>Importance of S100A2 and S100P for diagnosis of non-small cell lung carcinoma is impaired by advanced tumour stages and neoadjuvant chemotherapy</i>	54
8.2. <i>Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma</i>	54
8.3. <i>Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma</i>	54
8.4. <i>Proliferative stimulus of lung fibroblasts on lung cancer cells is impaired by RAGE</i>	54
8.5. <i>Fibroblast-associated factors mediate induction of High Mobility Group Box protein 1 in lung epithelial cells</i>	54
8.6. <i>Senescent fibroblasts induce moderate stress in lung epithelial cells in vitro</i>	54
9. Thesen	55
Anhang	vi
Danksagung	vi
Eidesstattliche Erklärung	vii
Lebenslauf	viii

Abkürzungen, Erläuterungen

Abb.	Abbildung
AGE	<i>Advanced Glycation End-products</i> (Glykierungsendprodukte)
Akt	<i>AKT8 virus oncogene cellular homologue</i> (Proteinkinase, zunächst aus einem Thymom der AKR-Maus isoliert; auch als Proteinkinase B bezeichnet)
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i> (proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie)
BASC	<i>Bronchioalveolar Stem Cells</i> (Vorläuferzelle in der Lunge)
Bcl-2	<i>B cell lymphoma-2</i> (antiapoptotisches Protein)
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
bzw.	beziehungsweise
cAMP	<i>cyclic AMP</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cDNA	<i>copy DNA</i> (DNA-Kopie eines RNA-Moleküls)
CREB	<i>cAMP Response Element (CRE)-Binding protein</i> (Transkriptionsfaktor)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DNA-interagierender Fluoreszenzfarbstoff)
DAT1	Oligo(dA-dT)-Bindungsprotein (Transkriptionsfaktor)
DCF	2,7-Dichlordihydrofluorescein (Radikal-sensitiver Farbstoff, der durch Oxidation von H ₂ DCF entsteht)
DEVD	Peptid der Sequenz: Asparaginsäure - Glutaminsäure - Valin - Asparaginsäure
d.h.	das heißt
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (chemischer Initiator für das Plattenepithelkarzinom der Haut durch aktivierende Mutation im Protoonkogen H-Ras)
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EF hand	<i>Helix-turn-helix</i> -Motiv mit geladenen Aminosäuren, welche Ca ²⁺ -Ionen binden
EGF	Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
<i>et al.</i>	und andere
Erbin	<i>ErbB2-interacting protein</i> (basolaterales Protein für den Erhalt der Zellpolarität)
esRAGE	<i>endogenous secretory Receptor for Advanced Glycation End-products</i> (lösliche Form von RAGE)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor: acidic</i> (a)FGF, <i>basic</i> (b)FGF (Wachstumsfaktor)
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> (Genexpressionsanalysemethode)
GAP	<i>GTPase-Activating Protein</i> (GTPase-aktivierendes Protein)
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GLOBOCAN	Datenbank der IARC zur Erfassung der weltweiten Krebsinzidenz und -mortalität
GTP	Guanosintriphosphat
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> (Wachstumsfaktor)
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i> (Transkriptionsfaktor)
HMGB	<i>High Mobility Group Box</i>
hTERT	katalytische Untereinheit der Telomerase
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i> (Apoptose-inhibierendes Protein)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IASLC	<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> (Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i> (Proteinkinase; auch als SAPK bezeichnet)
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoprotein geringer Dichte); <i>oxidized</i> (ox)LDL
LF-L	<i>Lactoferrin-Like protein</i> (AGE-bindendes Zelloberflächenprotein)
LL	<i>Lewis Lung</i> (Karzinomzellen der Mauslunge)
Mac-1	<i>Macrophage antigen-1</i> (β2-Integrin)
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (Proteinkinase)
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i> (Chemokin CCL-2)
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i> (Matrixmetalloproteinase)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MT1-MMP	<i>Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase</i> (Membran-gebundene Matrixmetalloproteinase)
NHBEc	<i>Normal Human Bronchial Epithelial Cells</i> (Bronchialepithelzellen)
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Carcinoma</i> (Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom)
NF	<i>Nuclear Factor: NF-κB, NF-ATc2</i> (Transkriptionsfaktor)
Nude	immundefiziente Mäuse durch Defekt des <i>nude</i> -Genes

PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> (Wachstumsfaktor)
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End-products</i> (Zelloberflächenrezeptor)
Ras	<i>Rat sarcoma</i> (kleine GTPase)
Rb	Retinoblastom
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> (Genexpressionsanalysemethode)
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i> (Genexpressionsanalysemethode)
SAPK	<i>Stress-Activated Protein Kinase</i> (Proteinkinase; auch als JNK bezeichnet)
Scid	<i>Severe combined immunodeficiency</i> (immundefiziente Mäuse durch einen autosomal-rezessiven Defekt auf Chromosom 16)
SCLC	<i>Small Cell Lung Carcinoma</i> (Kleinzelliges Bronchialkarzinom)
SOD1	<i>Superoxiddismutase 1</i> (Cu ²⁺ /Zn ²⁺ -Superoxiddismutase)
SOD2	<i>Superoxiddismutase 2</i> (Mn ⁴⁺ -Superoxiddismutase)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismus)
Sp1	<i>Specificity protein 1</i> (Transkriptionsfaktor)
sRAGE	<i>secretory Receptor for Advanced Glycation End-products</i> (lösliche Form von RAGE)
STR	Stromelysin
TA	tumorassoziiert
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> (Wachstumsfaktor)
TN-C	Tenascin-C
TNM	<i>Tumor - Nodus - Metastasis</i> (Stadieneinteilung von malignen Tumoren)
TPA	12- <i>O</i> -Tetradecanoyl-phorbol-13-azetat (chemischer Promoter für das Plattenepithelkarzinom der Haut)
TF2	<i>Transcription Factor-2</i> (Transkriptionsfaktor; auch als <i>gp (glycogen phosphorylase)-2-DNA</i> -Bindungsfaktor bezeichnet)
TTF1	<i>Thyroid Transcription Factor-1</i> (Transkriptionsfaktor)
uPA	<i>urokinase Plasminogen Activator</i> (Proteinase)
UV	ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Epidermal Growth Factor</i> (Wachstumsfaktor)
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WI	<i>Wistar Institute</i>
u.a.	unter anderem
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis</i> (Apoptose-inhibierendes Protein)
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Krebserkrankungen des Epithels – Karzinome

Die Krebserkrankungen stellen eine Gruppe unterschiedlicher Erkrankungen dar, die aber alle durch die unkontrollierte Teilung von Zellen eines Organs oder Gewebes verursacht werden. Dadurch entsteht ein Tumor. Die bösartigen (malignen) Tumore zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich der normalen Wachstumskontrolle des Organismus entzogen haben. Die veränderten Zellen vermehren sich ungehindert und wachsen in das umliegende Gewebe ein und zerstören es. Letztlich können sie in Blut- und Lymphgefäße eindringen und über diese in andere Körperorgane gelangen. Dort haben die Zellen dieser so genannten soliden Tumoren die Möglichkeit, sich erneut anzusiedeln und zu vermehren. Es entstehen Metastasen. Im Gegensatz zu den bösartigen Tumoren zeichnen sich die gutartigen (benigen) Tumore dadurch aus, dass sie nicht invasiv in das umliegende Gewebe einwachsen, sondern es nur verdrängen und keine Metastasen bilden. Ferner ist das erneute Auftreten der Erkrankung (Rezidiv) nach der Behandlung bei einem gutartigen Tumor seltener als bei einem bösartigen Tumor.

Nach den aktuellen Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und dem Robert-Koch-Institut (RKI) erkranken knapp 220.000 Männer und 207.000 Frauen in der Bundesrepublik Deutschland an den bösartigen Neubildungen. Da die Neubildungen von Körpergeweben (Neoplasmen) besonders mit dem zunehmenden Alter auftreten, werden statistischen Angaben zu Neuerkrankungen (Inzidenz) und Sterblichkeit (Mortalität) häufig altersabhängig gemacht (Abb. 1). Insgesamt stellen die Tumorerkrankungen mit knapp 26 % aller Todesfälle die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauferkrankungen (45 %) in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt, 2007). Unter ihnen machen die Karzinome mit etwa 80 % aller bösartigen Tumore einen Großteil der Krebserkrankungen aus. Karzinome sind Krebserkrankungen, die von den Epithelzellen im Deckgewebe der Haut oder Schleimhaut ausgehen. Je nach der Art des entarteten Epithels ergeben sich weitere Differenzierungen. Die meisten Karzinomerkrankungen leiten sich vom Plattenepithel (Plattenepithelkarzinom bzw. squamöses Karzinom) oder Drüsenepithel (Adenokarzinom) ab. Das überwiegende Auftreten von Krebserkrankungen des Epithels wird darauf zurückgeführt, dass die epithelialen Gewebe (z.B. Haut, Atem-, Verdauungs- und Urogenitaltrakt) stärker physikalischen Prozessen oder chemischen Stoffen mit karzinogenem Potential (Karzinogene) ausgesetzt sind. In diesem Zusammenhang sind die ultraviolette (UV-) Strahlung und Röntgenstrahlung, Luftpartikel

aus Industrieanlagen, Bestandteile des Zigarettenrauchs sowie Asbest am häufigsten beschrieben. Darüber hinaus können bestimmte Karzinomerkrankungen auch durch Viren hervorgerufen werden (z.B. *Epstein-Barr-Virus* beim Nasopharynxkarzinom, Hepatitisvirus beim Leberzellkarzinom, Papillomavirus beim Harnblasenkrebs).

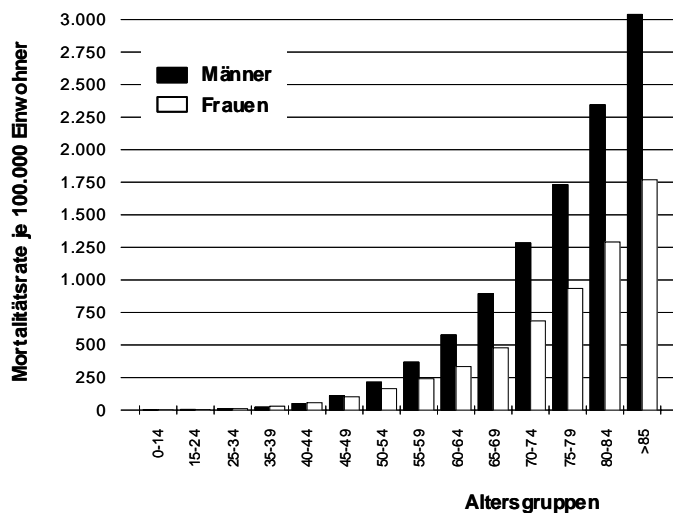


Abb. 1) Altersspezifische Krebsmortalität. Darstellung aller bösartigen Neubildungen bei Männer und Frauen in der Bundesrepublik Deutschland von 1994 bis 2003 (GEKID & RKI, 2006).

Die Entstehung von Karzinomen geht mit einer veränderten Zellorganisation des Epithels einher (Eccles, 2002). Epithelzellen sind normalerweise polarisiert, d.h. dass Epithelzellen eine apikale und basolaterale Seite mit differentiellen Funktionen ausbilden. Die basolaterale Seite verbindet die Zellen untereinander durch interzelluläre Strukturen (Desmosomen, *Tight Junctions* und *Adherens Junctions*) und zur extrazellulären Matrix durch spezifische Zellmembranproteine (Integrine). Die basale Zellschicht des Epithels sekretiert dabei Proteine, welche die Basalmembran ausbilden. Die apikale Seite steht mit dem Lumen bzw. der Umwelt in Verbindung. Die Epithelzellen sind als squamöse Schichten (Deckepithel) oder sekretorische Strukturen (Drüsenepithel) angeordnet. Form und Struktur der Epithelzellen werden durch ein komplexes System aus intermediären Zytokeratinfilamenten aufrechterhalten. Ferner wird die Integrität des Epithels durch das Bindegewebe unterstützt, in dem sich die versorgenden Blutgefäße sowie vereinzelt die Fibroblasten befinden. Eines der Adhäsionsmoleküle, das bei der Aufrechterhaltung der normalen Epithelstruktur eine bedeutende Stellung einnimmt, ist das epitheliale (E-) Cadherin (Perez-Moreno *et al.*, 2003). Dieses Ca^{2+} -abhängige Glykoprotein ist infolge genetischer und epigenetischer Veränderungen in fast allen Karzinomen einschließlich des Bronchialkarzinoms funktionell

inaktiv (Birchmeier & Behrens, 1994; Hirohashi, 1998). Da E-Cadherin aber nicht nur eine physikalische Funktion erfüllt, sondern auch Signaltransduktionswege moduliert, ist der Verlust von E-Cadherin mit weitreichenden Veränderungen verbunden, die in ihrer Gesamtheit zum malignen Verhalten von Zellen führen (Cavallaro & Christofori, 2004).

1.2. Interaktion zwischen Epithel und Stroma bei der Entstehung von Karzinomen

Es wird davon ausgegangen, dass die meisten Karzinome durch einzelne entartete Zellen (Vorläuferzellen) hervorgerufen werden. Die jeweilige Vorläuferzelle ist beispielsweise durch Karzinogene transformiert und wächst anschließend zu einem Zellklon und Tumor heran (Nowell, 1976). Genetische Defekte werden als primäre Ursache für die Entartung von Zellen und somit die Entstehung von Tumovorläuferzellen angesehen (Bishop, 1991; Hahn & Weinberg, 2002; Jackson & Loeb, 1998). Unabhängig davon sind zahlreiche Veränderungen in den Zellen bzw. in deren Umgebung notwendig, um das Wachstum von Tumoren und die Ausbreitung von Tumorzellen zu ermöglichen (Hanahan & Weinberg, 2000). Dazu zählen der Verlust der Wachstumskontrolle, die gesteigerte Resistenz gegenüber dem Zelltod, eine verlängerte Lebensspanne der Zellen sowie eine gute Versorgung des Tumors durch Gefäßneubildung (Neoangiogenese) und die Möglichkeiten zur Metastasierung.

Die Gewebsumgebung ist ein ausschlaggebender Faktor für das Wachstum von Tumoren. Diese wird sowohl durch die Art der Nachbarzellen (z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten) als auch durch die Komponenten der extrazellulären Matrix bestimmt. Welche besondere Rolle das Gewebemilieu bei der Tumorigenese spielt, kann beispielsweise am multipotenten Verhalten von Stammzellen verdeutlicht werden. So bilden embryonale Stammzellen in einigen Geweben maligne Tumore aus, wohingegen sie in Blastozysten zur Entwicklung von normalen Geweben beitragen (Illmensee, 1978). Andere Experimente konnten zeigen, dass das onkogene Potential von *Rous Sarcoma*-Virus-transformierten Zellen in Gegenwart von embryonaler extrazellulärer Matrix inhibiert wird (Boudreau *et al.*, 1996). Da demzufolge die Gewebsumgebung das Tumorwachstum unterdrücken kann, könnte eine abnormale Umgebung die Tumorigenese auch steigern. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass erst die Gegenwart von bestrahlten aber nicht normalen Fibroblasten das Tumorwachstum von Epithelzellen unterstützt (Barcellos-Hoff & Ravani, 2000). Ein ähnlicher Effekt konnte auch für gealterte Fibroblasten gezeigt werden, welche das tumorfördernde Wachstum von prämaligen Epithelzellen auslösten (Krtolica *et al.*,

2001). Darüber hinaus ist seit langem die Bildung von organspezifischen Metastasen in Abhängigkeit vom Karzinomtyp bekannt. Die klinische Beobachtung, dass sich Zellen des Mammakarzinoms bevorzugt in Knochenmark, Lunge oder Leber absiedeln, führte bereits 1889 zur *Seed and Soil*-Theorie durch Stephen Paget. Diese Theorie besagt, dass die Tumorzelle (*Seed*) über den Blutstrom verteilt wird, aber nur in einem geeigneten Gewebemilieu (*Soil*) einen sekundären Tumor ausbilden kann. Faktoren dieses geeigneten Gewebemilieus werden auch als *Microenvironmental Effectors* (Park *et al.*, 2000) oder *Landscapers* (Kinzler & Vogelstein, 1998) bezeichnet.

Wie können nun stromale Faktoren die malignen Veränderungen im Epithelgewebe begünstigen? Es wird angenommen, dass unter bestimmten Bedingungen eine reversible Aktivierung von mesenchymalen Fibroblasten eintritt, wie sie auch bei der Wundheilung vorkommt. Tritt aber eine chronische Aktivierung ein, setzen die Fibroblasten vermehrt Proteinasen frei, die beim Gewebeumbau und der Erzeugung eines tumorbegünstigenden Milieus beteiligt sind. Demnach wird das Stroma von Tumoren auch als das Ergebnis einer fehlgeleiteten Wundheilung angesehen (Dvorak, 1986). Vorhandene prä maligne Epithelzellen erhalten somit die Chance zur Proliferation (Bissell & Radisky, 2001). Diese Möglichkeit der Tumorentstehung ist am Beispiel der Matrixmetalloproteinase (MMP)-3/Stromelysin (STR)-1 für das Mammakarzinom beschrieben (Sternlicht *et al.*, 1999). Im Vergleich findet man eine ganze Reihe von reparativen Vorgängen bei der Wundheilung, die auch in der Umgebung des Tumors konstitutiv aktiv sind (Bissell & Radisky, 2001). Dazu zählen die Rekrutierung inflammatorischer Zellen, die Proliferation von Fibroblasten und Epithelzellen, die Zellmigration und Neoangiogenese.

Der Einfluss des Stromas auf das Tumorgeschehen ist vielfältig und findet sowohl auf zellulärer als auch auf extrazellulärer Ebene statt (Beacham & Cukierman, 2005; Kiaris *et al.*, 2004; Mueller & Fusenig, 2004; Wernert, 1997; vgl. Abb. 2). Es hat sich erwiesen, dass vor allem die Fibroblasten das Mikromilieu im Tumorgewebe beeinflussen. Insbesondere durch die Bildung und Freisetzung von mitogenen Faktoren (Wachstumsfaktoren, Zytokine) und Proteinasen tragen sie zum invasiven Wachstum und zur Neoangiogenese des Tumors bei (Kunz-Schughart & Knuechel, 2002b; Micke & Ostman, 2004). Die Beziehung zwischen Tumorzelle und Fibroblast konnte für viele Karzinomtypen identifiziert werden. Im Falle des Bronchialkarzinoms wurde gezeigt, dass neben den Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs, *Fibroblast Growth Factors*) auch der TGF (*Transforming Growth Factor*)- α sowie das Amphiregulin der Fibroblasten die Proliferation von Tumorzellen stimuliert (Cekanova *et al.*, 2006). Des Weiteren unterstützt die mitogene

Stimulation der Tumorzellen durch die Fibroblasten bzw. deren lösliche Faktoren (*acidic* (a)FGFs und *basic* (b)FGFs) die Resistenz von Tumoren gegenüber ausgewählten Chemotherapeutika (Bartling *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2000). Die Fibroblasten haben aber nicht nur einen Effekt auf die Tumorzellen, sondern umgekehrt auch die Tumorzellen auf die Fibroblasten. So stimuliert die Gegenwart von Bronchialkarzinomzellen die Freisetzung von bFGF sowie die Sekretion von MMP-11/STR-3 in den normalen pulmonalen Fibroblasten (Mari *et al.*, 1998). Die Expression von MMP-2 in den Fibroblasten, nicht aber in den Tumorzellen, geht zudem mit der zunehmenden Dichte der tumorversorgenden Gefäße im Bronchialkarzinom einher (Ishikawa *et al.*, 2004). Zusätzlich zu den direkten mesenchymal-epithelialen Effekten tragen die Fibroblasten durch die Freisetzung von löslichen Faktoren (Abb. 2) auch zu immunologischen Prozessen (Entzündungsreaktion, Immunsuppression) in Tumoren bei (Silzle *et al.*, 2004).

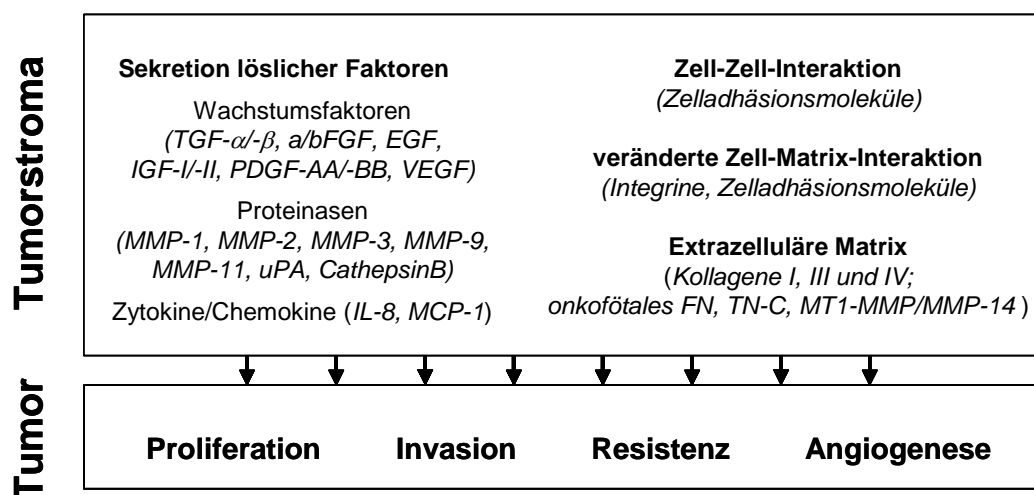


Abb. 2) Stromale Faktoren, die zur Tumorentwicklung beitragen (Erläuterungen, siehe Abkürzungsverzeichnis).

Aufgrund charakteristischer Eigenschaften werden die Fibroblasten im Tumorgewebe zumeist als tumorassoziierte (TA) bzw. karzinomassoziierte Fibroblasten bezeichnet. Die TA-Fibroblasten sind heterogen und weisen Merkmale von Myofibroblasten und/oder onkofötale Merkmale auf (Kunz-Schughart & Knuechel, 2002a; Micke & Ostman, 2004). Obwohl die genaue Herkunft der TA-Fibroblasten unklar ist, könnte es sich hierbei um normale Fibroblasten handeln, die in der unmittelbaren Umgebung des Tumors definierten Phänotypveränderungen unterliegen. Dazu zählen auch multiple Veränderungen im Genexpressionsprofil der Fibroblasten (Fromigue *et al.*, 2003). Hinsichtlich der Herkunft von

TA-Fibroblasten gibt es aber auch andere Theorien (z.B. embryonale Herkunft, epithelial-mesenchymale Transformation). Neben dem unmittelbaren Einfluss der TA-Fibroblasten auf das Tumorwachstum spielt die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und deren Modifikation durch die TA-Fibroblasten eine wichtige Rolle (z.B. Bildung von Fibronektinfragmenten, Tenascin-C, Kollagen), da diese sowohl die Tumorzellen als auch die Immunzellen im Tumor reguliert (Silzle *et al.*, 2004). Die Fibroblasten bilden demnach zusammen mit den anderen Bestandteilen des Stromas ein Mikromilieu, welches zu Entstehung, Wachstum und Invasion sowie zur Resistenz der Tumore beiträgt.

1.3. Lungenkrebs – Bronchialkarzinom

Epidemiologie und Ätiologie

Bösartige Tumore in der Lunge entstehen überwiegend aus den Zellen, welche die Atemwege (Bronchien) auskleiden. Nur diese Tumore bezeichnet man im engeren Sinn als Lungenkarzinome oder Bronchialkarzinome (Cersosimo, 2002). In der Lunge können jedoch weitere Krebserkrankungen auftreten, wie die Metastasen von Tumoren anderer Körperorgane oder Krebserkrankungen der Blutzellen (Lymphome). Nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) zur histologischen Klassifikation der Lungentumore lassen sich mehr als 50 Tumortypen unterscheiden (Beasley *et al.*, 2005; Travis *et al.*, 1999).

Zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung bösartiger Lungentumore gehört das aktive Rauchen (Sasco *et al.*, 2004). Ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs stellt auch das Passivrauchen (Kreutzer *et al.*, 2006) sowie eine regional erhöhte Radonbelastung in Wohnhäusern dar (Wichmann *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu ist das Lungenkrebsrisiko durch die beruflich bedingte Exposition zu diversen kanzerogenen Stoffen, wie Asbest, ionisierte Strahlung oder Quarzstäuben, relativ gering (Boffetta, 2006). Männer sind häufiger als Frauen gleichen Alters von Lungenkrebs betroffen. Daher ist auch ihr Anteil an der Lungenkrebs-bedingten Mortalität deutlich höher (Abb. 3). Dennoch ist die Anzahl der Erkrankungsfälle bei den Männern seit Ende der 1980er Jahre stagnierend (GEKID & RKI, 2006). Bei den Frauen dagegen steigt die Inzidenz und somit die Anzahl der Todesfälle weiterhin kontinuierlich an. Zwischen 1980 und 2003 hat sich in Deutschland die Anzahl der Frauen, die an Lungenkrebs verstarben, nahezu verdoppelt (GEKID & RKI, 2006). Der zunehmende Anteil von Frauen unter den Rauchern wird für diese unterschiedliche Trendentwicklung verantwortlich gemacht. Wie bei vielen Krebserkrankungen, nimmt auch

für das Bronchialkarzinom die Inzidenz und Mortalität mit dem Alter exponentiell zu und erreicht bei 80 Jahren ihr Maximum (Abb. 3). Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer und Frauen bei etwa 68 Jahren, was dem mittleren Alter für Krebserkrankungen insgesamt entspricht (GEKID & RKI, 2006).

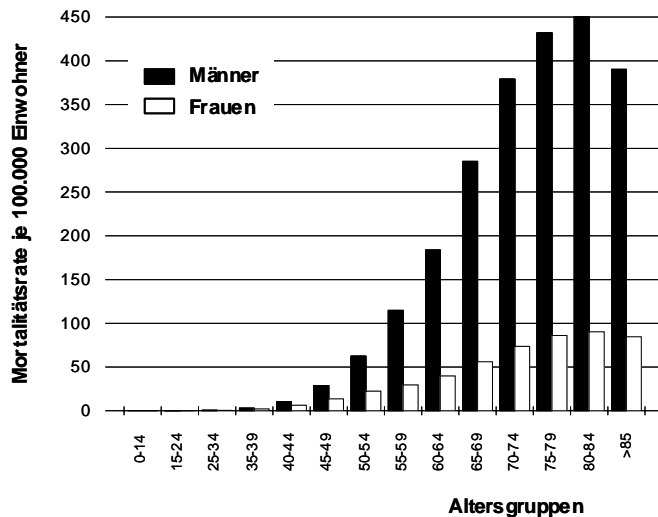


Abb. 3) Alters- und geschlechtsspezifische Krebsmortalität. Bösartigen Neubildungen der Bronchien und Lunge in der Bundesrepublik Deutschland von 1994 bis 2003 (GEKID & RKI, 2006).

Pathologie und Therapie

Die bösartigen epithelialen Tumore der Lunge teilen sich nach WHO/IASLC-Klassifikation in die kleinzelligen Karzinome (SCLC) und vier Hauptgruppen der nichtkleinzelligen Karzinome (NSCLC) ein (Tab. 1: A-E). Daneben treten weniger häufige Grundformen (Tab. 1: F-H) und Sonderformen innerhalb der jeweiligen Hauptgruppen auf. Am häufigsten sind die Plattenepithelkarzinome und die Adenokarzinome (Tab. 1). Während die Plattenepithelkarzinome oft zentral in den Bronchien lokalisiert sind, entstehen Adenokarzinome in den kleinen Bronchien und liegen peripher in der Lunge. Das Plattenepithelkarzinom ist die Form von Lungenkrebs, die noch am häufigsten mit dem Rauchen assoziiert ist (Sasco *et al.*, 2004). In den vergangenen Jahren konnte jedoch eine zunehmende Tendenz für die pulmonalen Adenokarzinome beobachtet werden, wobei der Anstieg der Adenokarzinome bei den Frauen stärker als bei den Männern ist (Janssen-Heijnen & Coebergh, 2003). Vielfach treten auch die kleinzelligen sowie die großzelligen Karzinome auf. Einige Bronchialkarzinome besitzen neuroendokrine Eigenschaften, wie die Karzinoidtumore und ein Teil der kleinzelligen und großzelligen Karzinome. Daher werden diese auch zu den

neuroendokrinen Karzinomen gezählt (Brambilla *et al.*, 2001). Aufgrund der morphologischen Heterogenität der Lungentumore wird angenommen, dass sich die verschiedenen Typen der Bronchialkarzinome aus pluripotenten Vorläuferzellen (Typ-II-Alveolarzellen, Clarazellen) (Greenberg *et al.*, 1975; Ten Have-Opbroek *et al.*, 1997) bzw. den unlängst beschriebenen BASCs (*Bronchioalveolar Stem Cells*) entwickeln (Kim *et al.*, 2005).

Tabelle 1) Histologische Klassifikation und Häufigkeit der bösartigen epithelialen Tumore der Lunge nach WHO/IASLC (Travis *et al.*, 2004; Travis *et al.*, 1995).

Tumorsubtypen	Anteil
A) Plattenepithelkarzinome	30 bis 40 %
B) Kleinzellige Karzinome	15 bis 20 %
C) Großzellige Karzinome	10 %
D) Adenokarzinome	25 bis 30 %
E) Adenosquamöse Karzinome	1 bis 2 %
F) Polymorphe sarkomatoide Karzinome	
G) Karzinoidtumore	
H) Bronchialdrüsenkarzinome	
Unklassifizierte Tumore	

Makroskopisch lässt sich das Auftreten und die Ausdehnung des Primärtumors durch Röntgenanalyse und Computertomographie bestimmen. Zusätzlich wird Gewebematerial zur histologischen Klassifizierung des Tumors (*Typing*) mittels endoskopischer Verfahren oder durch transthorakale Punktion gewonnen. Neben der Feststellung von Metastasen im Brustkorbbereich muss im Rahmen von Untersuchungen zum Tumorstadium auch geprüft werden, ob Fernmetastasen in anderen Organen vorliegen. Metastasierungen der Bronchialkarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose relativ häufig. Je nach Ausbreitung des Bronchialkarzinoms unterscheidet man verschiedene Stadien der Tumorentwicklung (Mountain, 1997). Für das so genannte *Staging* sind drei Gesichtspunkte maßgebend: die Größe und Ausdehnung des Tumors (T), die Beteiligung der Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Daher verwendet man auch den Begriff TNM-Klassifikation. Ziffern hinter den entsprechenden Buchstaben informieren über die genaue Ausdehnung des Tumors (T1 bis T4), die Anzahl und Lokalisation der befallenen Lymphknoten (N0 bis N2) und das Fehlen oder Vorhandensein von entfernten Metastasen (M0 oder M1). Die Kombination dieser drei Gesichtspunkte bestimmt die Einstufung des Tumors in ein niedriges/frühes bis hohes/fortgeschrittenes Tumorstadium (TNM I bis TNM IV). Des Weiteren werden die Malignitätsgrade (G1 bis G4) aufgrund von histologischen

Untersuchungen des Tumorgewebes definiert. Anhand dieses *Grading*s lassen sich Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumorwachstums ziehen.

Das Fortschreiten der Erkrankung und die histopathologischen Eigenschaften des Tumors entscheiden dabei grundlegend über die Therapieform und die Prognose von Patienten mit Lungenkrebs. In Deutschland erfolgt die klinisch-pathologische Diagnose und Therapie von Lungenkrebserkrankungen nach den Empfehlungen der Deutschen Krebsgesellschaft e.V., 2002. Die Chemo- und Radiotherapie sowie die operative Entfernung des Primärtumors stellen die grundlegenden Behandlungsmöglichkeiten von Patienten mit Bronchialkarzinom dar. Beim Therapieentscheid ist die Differenzierung der SCLCs von den NSCLCs aufgrund des unterschiedlichen biologischen Verhaltens von wesentlicher Bedeutung. Beim SCLC wird die Kombinationschemotherapie als Ganzkörperbehandlung bevorzugt, da der Tumor schnell wächst und früh Metastasen ausbildet. Obwohl sich mit der Chemotherapie und einer anschließenden Bestrahlung des Tumors die Lebensqualität der Patienten vorübergehend verbessern lässt, ist die mittlere Überlebenszeit von 15 bis 20 Monate sehr kurz. Im Vergleich zum SCLC wächst das NSCLC langsamer und zeigt eine spätere Metastasierungstendenz, reagiert aber weniger gut auf die Chemo- und Strahlentherapie. Deshalb ist die thoraxchirurgische Resektion des betroffenen Lungenareals durch die Lobektomie, Segmentresektion oder im Extremfall durch die Pneumonektomie der bisher einzige kurative Ansatz. Die chirurgische Behandlung des NSCLC ist allerdings nur für die frühen Tumorstadien (TNM I und TNM II) möglich, wenn sich der Tumor höchstens in die regionären Lungenwurzellymphknoten ausgebreitet hat. Aus diesem Grund können nur 25 bis 30 % aller Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose noch einer operativen Behandlung unterzogen werden. Im TNM-Stadium I, in dem sich der Tumor auf die Lunge beschränkt, liegt die 5-Jahres-Überlebenszeit bei 60 bis 75 % noch relativ hoch, vermindert sich aber im Stadium II auf 30 bis 50 %. Sind bereits die mediastinalen Lymphknoten in das Tumorgeschehen einbezogen (TNM IIIa), wird zusätzlich (adjuvant) eine Chemo- oder Radiotherapie durchgeführt. In den letzten Jahren hat sich auch die chemotherapeutische Behandlung des Patienten bereits vor der chirurgischen Intervention, d.h. die neoadjuvante Chemotherapie, zunehmend etabliert (Eberhardt *et al.*, 2007). Liegt bereits der Befall von mediastinalen Lymphknoten (TNM IIIb) oder sogar eine Fernmetastasierung des Tumors (TNM IV) vor, wird nur noch in Ausnahmefällen operiert. Neben der Radiotherapie kommt die Kombinationstherapie mit verschiedenen Zytostatika zum Einsatz. Dennoch liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei den höheren Tumorstadien nur zwischen 10 und 30 % für das TNM-Stadium IIIa und zum Teil weit unter 10 % für die Stadien IIIb und IV.

1.4. Genetische und molekulare Veränderungen im Bronchialkarzinom

Der Übergang einer normalen Zelle in eine Tumorzelle wird Transformation genannt. Im Gegensatz zu normalen Zellen, die alle Merkmale von ausdifferenzierten Zellen mit spezifischen Funktionen zeigen, sind die Tumorzellen häufig dedifferenziert und tragen Eigenschaften embryonaler Zellen. Darüber hinaus teilen sich Tumorzellen ungehemmt und ihre Zelloberfläche sowie intrazelluläre Strukturen (Zytoskelett, Zellkern) sind verändert. Neben den rein zellbiologischen Veränderungen können Tumorzellen ein Spektrum von chromosomalen Defekten (Umbauten, Verdopplungen, Aneuploidie) und kleineren Mutationen (*mis-/non-sense* Mutationen, Insertionen, Deletionen) tragen. Ferner steuern epigenetische Veränderungen (Promoter-DNA-Methylierung, Histondeazetylierung) zur Tumorigenese bei. Eine Vielzahl von molekularen Faktoren sind an den tumorigenen Veränderungen beteiligt, die auch in der Tumordiagnostik von Bedeutung sind und daher oft als Tumormarker bezeichnet werden. Diese Tumormarker können u.a. Faktoren sein, die direkt bei der Transformation (Initiation) und Stabilisierung der transformierten Zellen (Promotion) eine Rolle spielen und/oder nachfolgend die Entwicklung zu einem malignen Tumor (Progression: Wachstum, Invasion, Metastasierung) unterstützen.

Bei der Tumoringenese sind die Aktivierung von so genannten Protoonkogenen und der Verlust von Antionkogenen (Tumorsuppressorgenen) relevant. Unter normalen Umständen induzieren Protoonkogene aber noch keinen Tumor. Erst durch genetische Ereignisse, wie Mutationen, Deletionen oder Überexpressionen, erlangen Protoonkogene die Eigenschaft von Onkogenen. Onkogene wurden zunächst in tumorinduzierenden Viren gefunden (virale Onkogene). Ihre Homologe in eukaryotischen Zellen werden als zelluläre Onkogene bezeichnet. Onkogene kodieren für Proteine, die an der Kontrolle von Wachstums- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind. Diese umfassen Membranrezeptoren und ihre Liganden, Proteinkinasen, GTP-bindende Proteine, nukleäre Hormonrezeptoren und DNA-bindende Proteine. Die beim Bronchialkarzinom involvierten Protoonkogene sind vor allem *myc* (*c-myc*, *N-myc*, *L-myc*), *ras* (*K-ras*, *H-ras*, *N-ras*) und *erbB* (*c-erbB1*, *c-erbB2*) (Wiethage *et al.*, 2000). Während *erbB1* und *erbB2*, die für Wachstumsfaktorrezeptoren kodieren, beim NSCLC häufig überexprimiert sind, liegt eine Überexpression von *myc*, dessen Genprodukt als Transkriptionsfaktor die Transkription anderer Gene kontrolliert, ausschließlich beim SCLC vor. Im Gegensatz dazu sind die *ras*-Protoonkogene, die für GTPasen kodieren, beim NSCLC mutiert. Infolge der Mutation ist die Inaktivierung der GTPasen durch das GTPase-aktivierende Enzym (GAP) gehemmt, und somit die Ras-vermittelte Signaltransduktion in der Zelle ständig aktiv (Schmitz *et al.*, 2000). Ferner gilt

eine konstitutiv aktive Telomerase durch die verstärkte Expression der katalytischen Untereinheit hTERT zu den frühen Ereignissen der Bronchialkarzinomentstehung (Hiyama *et al.*, 1995). Unter den Tumorsuppressorgenen sind vor allem das Retinoblastom (*Rb*)-Gen sowie das *p53*-Gen häufig defekt (Wiethege *et al.*, 2000). Die molekulargenetischen Veränderungen im menschlichen Bronchialkarzinom sind allerdings sehr heterogen, da sie nur in einem gewissen Prozentsatz der Tumore und in nicht allen histologischen Subtypen in gleicher Weise vorliegen. Darüber hinaus kann die Expression von Onkogenen, die für Faktoren mit parakriner Funktion kodieren (z.B. HGF als Genprodukt von *c-met*) nicht allein durch die Tumorzelle selbst, sondern auch durch Fibroblasten im Tumorstroma erfolgen (Siegfried, 1998). Daher sind die diagnostische und prognostische Bedeutung einzelner Protoonkogene und Tumorsuppressorgene häufig nicht ausreichend genug. Neben molekulargenetischen Veränderungen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, treten weitere Veränderungen auf, die zur Tumorentstehung führen. Dazu zählen eine Reihe von Prozessen, die infolge der Hypoxie im Tumorzellverband aktiviert werden (z.B. die Induktion des Transkriptionsfaktors HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*)-1 α und seiner regulierten Gene) (Harris, 2002). Dazu zählt aber auch die Expression von Genen, die den apoptotischen Zelltod beeinträchtigen und somit zur gesteigerten Apoptoseresistenz von Tumorzellen beitragen (Igney & Krammer, 2002). Obwohl nicht alle genetischen Veränderungen im Tumor die Tumorentstehung primär begünstigen werden, dürften sie dennoch als Tumormarker für die Diagnose von Nutzen sein.

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms und die technologische Revolution in der DNA-Analytik haben in den letzten Jahren die Voraussetzungen geschaffen, genetische Veränderungen in Tumoren systematisch zu analysieren. Die Entwicklung der Mikroarray-Technologien hat insbesondere ermöglicht, multiple genetische Veränderungen im Tumor nicht mehr sequentiell sondern gleichzeitig zu bestimmen (Seliger, 2006). Diese umfassen sowohl die Quantifizierung der Transkription von Genen als auch die Analyse von Genpolymorphismen (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*). Als eine neue Klasse von Genotypmarkern im Tumor gelten auch die kleinen nichtkodierenden RNA-Moleküle, die als Mikro-RNAs (miRNAs) bezeichnet werden und negative Regulatoren der Genexpression sind (Zhang *et al.*, 2007). Im Rahmen der Tumoranalytik war es vor allem von großem Interesse, die genomweite Verteilung und Regulation von Transkriptionsprodukten zu bestimmen. Dazu dienten anfangs die SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*)-Technologie (Velculescu *et al.*, 1995) sowie die cDNA-Mikroarrays (DeRisi *et al.*, 1997) und später die *high density* Oligonukleotid-Mikroarrays (Lipshutz *et al.*, 1999; Ragoussis &

Elvidge, 2006). So konnten besonders die DNA-Mikroarray-Analysen Gene identifizieren, die im Bronchialkarzinom differentiell transkribiert werden (Tab. 2). Aufgrund der verschiedenen histopathologischen Subtypen (SCLC, NSCLC und seine Unterformen) sind diese aber nicht immer gleich (Tab. 2). Diesbezüglich haben Oligonukleotid-Mikroarray-Studien an unserer Klinik die Überexpression bestimmter Gene im NSCLC definieren können, die nur im Plattenepithelkarzinom auftreten (z.B. *collagen VII*, *cytokeratin 6A*), wohingegen andere spezifisch für das Adenokarzinom sind (z.B. *tf1*, *dat1*, *tf2*) (Hofmann *et al.*, 2006). Diese Untersuchungen am Gewebehomogenat liefern jedoch keine zuverlässigen Hinweise zu Expressionsveränderungen auf Einzelzellbasis, sodass die Analysen am Gewebeschnitt nach wie vor unerlässlich sind. Darüber hinaus haben auch das Tumorstadium und andere Faktoren einen Einfluss auf die Genexpression im Tumorgewebe (vgl. Kapitel 3.1.).

Tabelle 2) Differentiell exprimierte Gene, die in unabhängigen DNA-Mikroarray-Studien für das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) oder für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) identifiziert werden konnten (Meyerson *et al.*, 2004).

SCLC	NSCLC
<i>human achaete-scute homologue 1</i>	<i>ataxia-telangiectasia group D-associated protein</i>
<i>forkhead box G1B</i>	<i>bullous pemphigoid antigen 1</i>
<i>insulinoma-associated 1</i>	<i>collagen VII</i>
<i>islet-1 transcription factor</i>	<i>galectin 7</i>
<i>KIAA 0282 protein</i>	<i>keratin 5</i>
<i>thymosin β</i>	<i>keratin 17</i>
	<i>s100 calcium-binding protein A2</i>
	<i>tumour protein 63</i>

Die Bestimmung multipler Veränderungen im Tumor soll dazu beitragen, Tumormarker für eine genauere Diagnose und Subklassifizierung des Bronchialkarzinoms sowie Marker mit prognostischer Relevanz zu identifizieren. So konnten Arbeiten mit DNA-Mikroarrays verschiedene Prognosemarker für das Bronchialkarzinom definieren (Beer *et al.*, 2002; Diederichs *et al.*, 2004; Wigle *et al.*, 2002), zu denen die simultan erhöhte mRNA-Expression von MMP-12 und Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) gehörte (Hofmann *et al.*, 2005). Ferner soll der Einsatz der DNA-Mikroarray-Technologie dazu beitragen, Ansätze für eine bessere Antikrebstherapie zu entwickeln. Diese könnte so aussehen, dass nur die Chemotherapeutika Anwendung beim Patienten finden, wenn dieser das Zielprotein der Therapie auch verstärkt im Tumor bildet (Hofmann & Bartling, 2005). Neben der

genomweiten Transkriptionsanalyse durch die DNA-Mikroarrays haben auch SNP- und miRNA-Arrays definierte Veränderungen auf der Ebene der Genpolymorphismen (Weir *et al.*, 2007) bzw. der miRNA-Expression (Volinia *et al.*, 2006; Yanaihara *et al.*, 2006) im Bronchialkarzinom kartieren können. Zur Verifizierung der auf der Array-Technologie beruhenden Ergebnisse werden aber nach wie vor konventionelle Methoden angewandt, zu denen die quantitative RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) und FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)-Technik gehören. Darüber hinaus liefern die Array-basierenden molekulargenetischen Daten lediglich Hinweise zu tumorassoziierten Veränderungen des Genoms, nicht aber des Proteoms. Daher ist ihre Aussagekraft zur biologischen Bedeutung einzelner Veränderungen eingeschränkt. Aus diesem Grund wird derzeit an der Entwicklung und Etablierung von Array-Technologien gearbeitet, die tumorbiologische Veränderungen auf der Proteinebene analysieren (vgl. Kapitel 3.2.).

1.5. Der Rezeptor RAGE in Lunge und Bronchialkarzinom

Die Transformation von Zellen und Entstehung von Tumoren einschließlich der Lungentumore ist eng mit genetischen Defekten verbunden, die durch eine Vielzahl von toxischen Prozessen hervorgerufen werden können (Hanahan & Weinberg, 2000; Schwartz *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer genotoxischen Wirkung werden auch die Glykierungsendprodukte als potentielle Karzinogene diskutiert (Stopper *et al.*, 2003). Glykierungsendprodukte, die *in vivo* gebildet werden, bezeichnet man im Allgemeinen als AGEs (*Advanced Glycation End-products*). Die AGEs stellen eine heterogene Gruppe von modifizierten Proteinen oder Lipiden dar, die nichtenzymatisch durch die Glykierung mit Zuckern (Maillard-Reaktion) im Gewebe gebildet werden (Dyer *et al.*, 1991). Ihr Auftreten ist eng mit den Altersveränderungen der inneren Organe, einer unbehandelten Diabetes sowie Niereninsuffizienz assoziiert (Brownlee, 1995; Henle & Miyata, 2003). Auch das Rauchen induziert die Akkumulation von Tabak-AGEs im Blut durch Reaktion mit dem LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Nicholl & Bucala, 1998). AGEs treten sowohl intra- als auch extrazellulär auf. Bindungsstudien konnten ein Molekül in Proteinextrakten der Rinderlunge entdecken, das mit den AGEs interagiert und daher als RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) bezeichnet wurde (Neeper *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1992).

RAGE ist ein Zelloberflächenrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie (Neeper *et al.*, 1992), der neben den AGEs auch andere Liganden bindet (Herold *et al.*, 2007). Dieser Multiligandenrezeptor setzt sich aus einem 322-Aminosäure-großen extrazellulären Bereich

mit zwei C-Typ- und einer V-Typ-Immunglobulin-ähnlichen Domäne zusammen (Abb. 4). Die N-terminale V-Domäne ist für die Interaktion mit den Liganden wichtig (Hofmann *et al.*, 1999; Kislinger *et al.*, 1999; Skrikrishna *et al.*, 2002). Im C-terminalen Proteinbereich schließt sich die Transmembrandomäne und ein 43-Aminosäure-großer zytoplasmatischer Bereich an (Abb. 4). Obwohl der zytoplasmatische Bereich stark negativ geladen ist und keine Homologien mit bekannten Signaltransduktionsdomänen aufweist, wurde die Stimulation bestimmter intrazellulärer Signalmoleküle durch RAGE beschrieben. So konnte die Aktivierung von kleinen GTPasen (Ras, Cdc42, Rac) (Huttunen *et al.*, 1999), Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPKs: p38, p44/p42, SAPK/JNK) (Taguchi *et al.*, 2000), Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, CREB) (Huttunen *et al.*, 1999; Huttunen *et al.*, 2002b) und anderen Faktoren gezeigt werden.

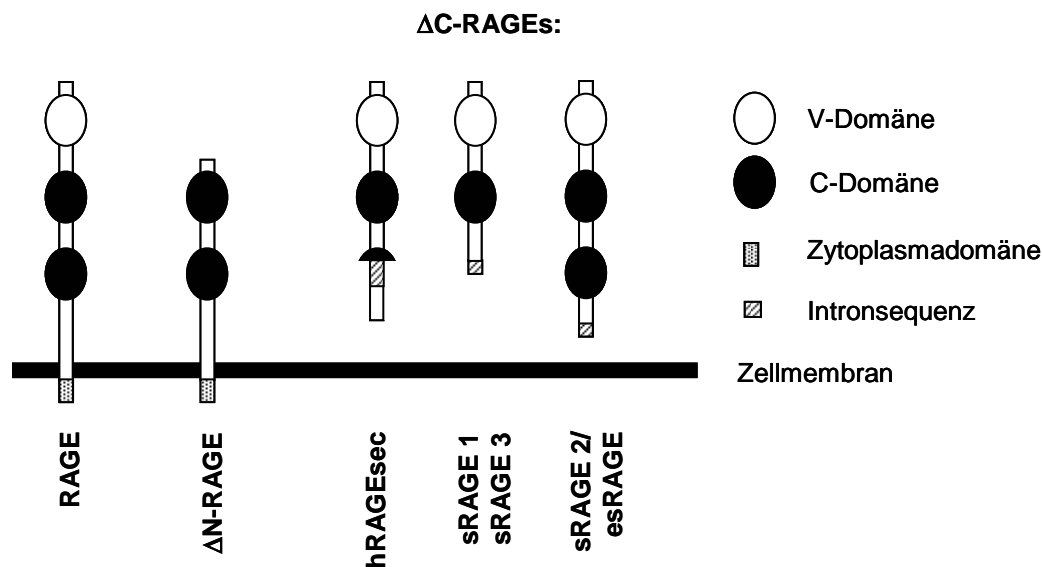


Abb. 4) Schematische Darstellung der Proteinstruktur des Zelloberflächenrezeptors RAGE und seiner Isoformen. Neben der N-terminal veränderten (Δ N-) Isoform, die membrangebunden ist, treten mehrere C-terminal veränderte (Δ C-) Isoformen auf, die löslich sind. Die löslichen RAGE-Formen resultieren aus verschiedenen Spleißvariationen, wobei die mRNAs von sRAGE 1 und 3 für das gleiche Protein kodieren.

Unter physiologischen Bedingungen wird RAGE nahezu ausschließlich in der Lunge exprimiert (Brett *et al.*, 1993), und hier insbesondere in den Typ-I-Alveolarzellen (Fehrenbach *et al.*, 1998; Shirasawa *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur Lunge ist RAGE in anderen Geweben nur geringfügig exprimiert, kann aber unter pathologischen Bedingungen induziert werden. So ist beispielsweise die induzierte Expression von RAGE in den Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Phagozyten diabetisch veränderter Gefäßbereiche

(diabetische Vaskulopathie) (Wautier *et al.*, 1996) oder nach einer mechanischen Gefäßverletzung (Ballondilatation) (Zhou *et al.*, 2003) gezeigt worden. An der Transkription des *rage*-Genes sind die Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Huttunen *et al.*, 1999) und Sp1 (Li *et al.*, 1998) beteiligt. Da die Interaktion von RAGE mit seinen Liganden zur Aktivierung von NF- κ B führt (Huttunen *et al.*, 1999), scheinen die Liganden selbst die Expression von RAGE zu induzieren (positive Rückkopplung).

Das alternative Spleißen der Vorläufer-mRNA resultiert zusätzlich in der Bildung einiger Isoformen von RAGE (Abb. 4), die zell- und gewebespezifisch exprimiert werden (Cheng *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 2007; Malherbe *et al.*, 1999; Schlueter *et al.*, 2003; Yonekura *et al.*, 2003). Die löslichen Isoformen werden häufig nur als *s/sec* (*secretory*) RAGE bezeichnet, ohne die exakte sRAGE-Variante zu kennen. Ferner wurden auch sRAGE-Varianten beschrieben, die durch proteolytische Spaltung entstehen (Ding & Keller, 2005; Galichet *et al.*, 2008). Aufgrund ihrer Primärstruktur sowie einiger experimenteller Daten wird vom antagonistischen Effekt dieser sRAGE-Formen ausgegangen (Kislinger *et al.*, 1999; Rouhiainen *et al.*, 2004). Dennoch sind aber auch sRAGE-vermittelte Effekte gezeigt worden (z.B. Induktion von proinflammatorischen Zytokinen), die nicht auf die RAGE-Kompensation zurückzuführen sind (Pullerits *et al.*, 2006). In der Lunge sind überwiegend die löslichen Formen sRAGE 1 und 2 exprimiert (Schlueter *et al.*, 2003). Die Isoform sRAGE 2, die auch es (*endogenous secretory*) RAGE genannt wird (Yonekura *et al.*, 2003), kann zudem stabil im Zytoplasma detektiert werden (Cheng *et al.*, 2005). Neben dem potentiell kompetitiven Effekt zwischen dem membranständigen RAGE und seinen löslichen Isoformen wird die effiziente Wirkung des Rezeptors durch posttranslationale Proteinmodifikationen beeinflusst. So beeinträchtigt die N-Glykosylierung im N-terminalen Bereich von RAGE die Rezeptor-Liganden-Interaktion und somit die RAGE-vermittelte Funktion (Skrikrishna *et al.*, 2002).

Unter der Vielzahl von AGEs wurde das N- ϵ -Carboxymethyllysin, ein sehr häufiges AGE-Derivat *in vivo* (Dyer *et al.*, 1993), als Hauptbindungspartner für RAGE identifiziert (Kislinger *et al.*, 1999). Zusätzlich zu diesem AGE-Derivat sind weitere RAGE-Liganden beschrieben worden, die im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen stehen (Abb. 5). Dazu zählen das β -Amyloid-Peptid (Yan *et al.*, 1996), extrazelluläre Mitglieder der S100-Proteinfamilie (Donato, 2001) sowie β 2-Integrine (Mac-1, p150,95) (Chavakis *et al.*, 2003). Abhängig vom Liganden führt die Aktivierung von RAGE zur Induktion intrazellulärer Signalsysteme, die eine verstärkt proinflammatorische Antwort der Zelle

hervorrufen, die Zellhomöostase beeinflussen und das Immunsystem stimulieren (Herold *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang wurde die induzierte Expression von Wachstumsfaktoren, Interleukinen und anderen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Matrixmetalloproteinasen und proapoptotischen Genen sowie die Bildung von Sauerstoffradikalen beschrieben. Daher wird der Aktivierung von RAGE eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von degenerativen Erkrankungen (Diabetes, Niereninsuffizienz, Arteriosklerose, Alzheimer) zugesprochen (Bucciarelli *et al.*, 2002).

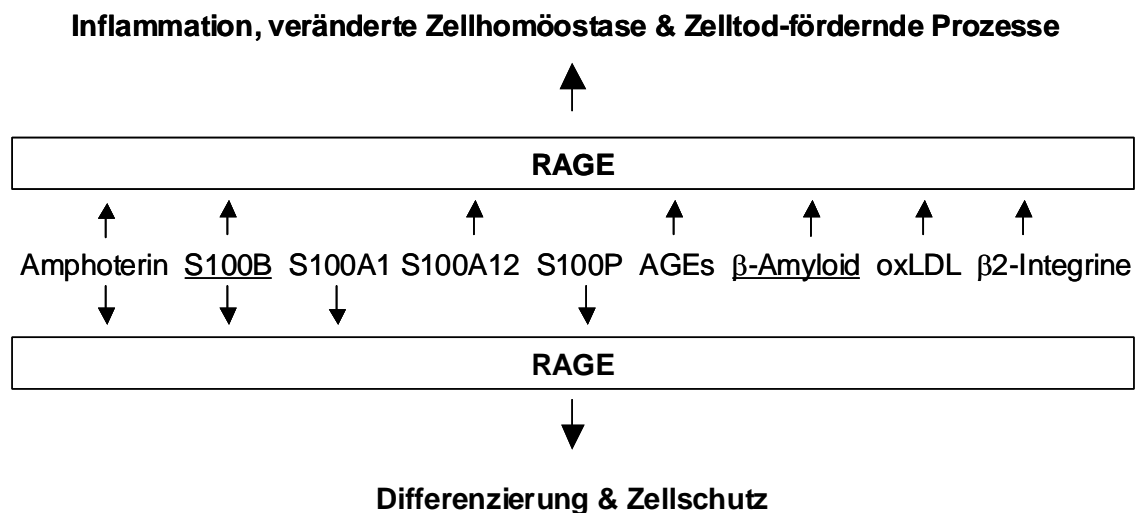


Abb. 5) Bindungspartner des Multiligandenrezeptors RAGE und ihre zelluläre Wirkung. Viele Liganden werden in der Lunge bzw. in den Lungenepithelzellen exprimiert oder erreichen über die Blutbahn das Lungengewebe (Bartling *et al.*, 2005 (8.1.)). Andere Liganden (unterstrichen) treten bevorzugt im Gehirn auf.

Im Gegensatz zum normalen Lungengewebe ist die Expression des Rezeptors RAGE im Lungentumor von Patienten mit einem NSCLC deutlich reduziert (Schraml *et al.*, 1997). Zudem konnten Oligonukleotid-Mikroarray-Analysen an unserer Klinik zeigen, dass der geringe RAGE-Gehalt im NSCLC eine sehr genaue Differenzierung des Tumorgewebes vom Nichttumorgewebe erlaubt (Hofmann *et al.*, 2004). Inwiefern die stark verminderte Expression dieses Rezeptors ein generelles Tumoreignis ist und ob der Verlust von RAGE auch zur Tumorentwicklung selbst beiträgt, haben diese Analysen nicht gezeigt.

2. Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob die verminderte Expression des Zelloberflächenrezeptors RAGE im Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) zur Tumorentwicklung beiträgt und welchen synchronen Einfluss die Gegenwart von mesenchymalen Fibroblasten dabei hat. Darüber hinaus sollten die differentiellen Expressionen anderer Genprodukte herausgearbeitet werden, welche zusätzlich zur tumorbiologischen auch eine diagnostische Bedeutung für das NSCLC haben könnten. Dieses Vorhaben konzentrierte sich insbesondere auf Proteine der S100-Familie sowie Amphoterin/HMGB1, die gleichzeitig Interaktionspartner von RAGE sind.

3. Differentielle Genexpression im Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom

3.1. Differentielle Genexpression als Indikator für Histopathologie und Stadium des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms

Die ausreichend frühe Diagnose des Tumors ist nach wie vor ein entscheidendes Kriterium für die erfolgreiche Behandlung von Patienten mit Bronchialkarzinom. Trotz multipler molekularer Veränderungen im Tumor beruht die Tumordiagnostik weiterhin primär auf mit konventionellen Methoden erhobenen histopathologischen Befunden. Auch wenn diese bereits eine hohe Aussagekraft haben, können sie den Status und die Subklassifizierung der Krebserkrankung nicht ausreichend genau definieren. Daher liegen große Hoffnungen auf der molekularen Tumordiagnostik mithilfe der DNA-Mikroarrays, die aber noch keinen Einsatz in der Klinik gefunden hat. Die Ursachen hierfür liegen an den hohen Kosten der Array-Technologie mit dem zusätzlichen Problem der unzureichenden Standardisierung und der großen Anzahl an vernachlässigbaren Daten auf den genomweiten Arrays. Aus diesem Grund wäre in der Tumordiagnostik die Array-basierende Expressionsanalyse einer kleinen Anzahl von Genen wünschenswert, die signifikant Aussagen zum Vorliegen eines malignen Gewebes und zur Identifizierung des histopathologischen Subtyps und Tumorstadiums treffen kann.

Auf der Suche nach potentiellen Genen für solche Diagnose-relevanten DNA-Arrays konzentrierten sich unsere Analysen auf die Familie der S100-Proteine (Bartling *et al.*, 2005 (**8.1.**)). Ein Grund hierfür war, dass die Mehrheit der *s100*-Gene in der Chromo-

somenregion 1q21 lokalisiert ist, die in vielen Tumorzellen multiple Defekte und daher Dysregulationen aufweist (Whang-Peng *et al.*, 1991). Die Familie der S100-Proteine besteht aus mehr als 20 Mitgliedern, die zur Regulation von Enzymaktivität, Proteinphosphorylierung, Transkriptionsfaktoren, Ca^{2+} -Homöostase oder Zytoskelettdynamik beitragen. Daher ist diese Proteinfamilie an einer Reihe von biologischen Prozessen beteiligt, zu denen die Differenzierung und Proliferation von Zellen aber auch die Immunreaktion zählen (Donato, 2003; Heizmann *et al.*, 2002; Marenholz *et al.*, 2004). S100-Proteine bilden nach Ca^{2+} -Aktivierung über zwei *EF-hand*-Motive Homo- und/oder Heterodimere aus, die an distinkte Effektorproteine (z.B. Annexin I, F-Aktin, Glykogenphosphorylase) binden und somit deren Funktion beeinflussen (Donato, 2001). Obwohl ihr genauer Wirkmechanismus noch unzureichend verstanden ist, wird dennoch davon ausgegangen, dass die meisten S100-Proteine eine überwiegend regulatorische Funktion in der Zelle ausüben. Darüber hinaus werden einige Mitglieder der S100-Familie über nichtklassische Transportwege aus der Zelle geschleust und vermitteln nach Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren zusätzlich extrazelluläre Effekte (Donato, 2003). Einer der S100-bindenden Zelloberflächenrezeptoren ist RAGE (Abb. 5).

Die meisten S100-Proteine werden nicht ubiquitär, sondern abhängig vom Typ der primären oder transformierten Zelle exprimiert (Donato, 2001). Daher wird vermutet, dass die S100-Proteine in den einzelnen Zelltypen ganz unterschiedliche Funktionen ausüben. Obwohl ihre Bedeutung bei der Tumorigenese noch weitestgehend unklar ist (Emberley *et al.*, 2004), könnte ihre zelltypspezifische Expression eine signifikante Bedeutung bei der histopathologischen Klassifizierung von Tumoren haben. Im normalen Lungengewebe identifizierten wir mittels RT-PCR-Technik insbesondere die Expression von S100A1, S100A2, S100A4, S100A6, S100A9 und S100P (Bartling *et al.*, 2005 (8.1.)). Die mRNA-Expression dieser S100-Proteine wurde zudem in primären menschlichen Bronchialepithelzellen (NHBE, *Normal Human Bronchial Epithelial Cells*) und in Bronchialkarzinomzelllinien (A549, H358) nachgewiesen. Obwohl auch die Expression anderer S100-Proteine im Lungengewebe detektierbar war, so konnte diese auf die Infiltration von Monozyten im Lungengewebe zurückgeführt werden. Im Vergleich zur normalen *s100*-Genexpression in der Lunge zeigten vor allem die S100-Proteine S100A2 und S100P eine erhöhte Expression im NSCLC, die abhängig vom histopathologischen Subtyp war. Während die mRNA- und Proteinexpression von S100A2 insbesondere in den Plattenepithelkarzinomen erhöht war, konnte eine höhere Expression von S100P hauptsächlich in den Adenokarzinomen festgestellt werden. Die Heraufregulation von S100A2 bzw. S100P

trat dabei überwiegend im frühen Tumorstadium (TNM I) auf, wohingegen die höheren Tumorstadien (TNMs II-IV) keine signifikanten Unterschiede zum Normallungengewebe mehr zeigten. Die Reduktion der S100A2- bzw. S100P-Expression auf Normalniveau in den fortgeschrittenen Stadien könnte sowohl durch indirekte als auch direkte genregulatorische Mechanismen verursacht worden sein. Da die Transkription von S100A2 und S100P über die DNA-Methylierung reguliert wird (Sato *et al.*, 2004; Wicki *et al.*, 1997), wären Veränderungen der DNA-Methylierung eine mögliche Ursache für den Verlust der induzierten Expression beider *s100*-Gene im fortgeschrittenen Tumorstadium. Zudem konnten wir zeigen, dass eine stabil hohe S100P-Expression die nachfolgende Transkription von S100P vermindert (negative Rückkopplung) (Rehbein *et al.*, 2008). Der Nutzen des S100A2-S100P-Expressionsprofils für die histopathologische Klassifizierung des NSCLC ist also stark vom vorliegenden Tumorstadium abhängig. Interessanterweise zeigten auch die Tumorgewebe von Patienten, die zuvor eine Behandlung mit Chemotherapie erhalten hatten, keine Veränderungen des S100A2-S100P-Expressionsprofils im Vergleich zum Normallungengewebe (Bartling *et al.*, 2005 (**8.1.**)).

Trotz einiger Einschränkungen könnte der Nachweis der erhöhten Expression von S100A2 bzw. S100P im frühen Tumorstadium dennoch von diagnostischem Nutzen sein, weil die Diagnose eines Tumors gerade in diesem Stadium ein entscheidendes Kriterium für die erfolgreiche Behandlung von NSCLC-Patienten ist. Die induzierte Expression von S100A2 bzw. S100P in unserem Patientenkollektiv wird durch Arbeiten anderer Gruppen am NSCLC bestätigt (Diederichs *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; vgl. auch Tabelle 2). Diese und unsere Ergebnisse widersprechen somit Veröffentlichungen, die eine verminderte S100A2-Expression im NSCLC und anderen Karzinomen beschrieben hatten (Feng *et al.*, 2001; Wicki *et al.*, 1997). Einige Widersprüchlichkeiten könnten darauf beruhen, dass die Untersuchungen häufig nicht in Abhängigkeit vom histopathologischen Subtyp und Tumorstadium vorgenommen worden sind. Einige Arbeiten hatten S100A2 sogar als einen potentiellen Tumorsuppressor beschrieben (Feng *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2001), der im Zellkern mit dem p53-Protein interagiert und dessen transkriptionelle Aktivität verstärkt (Mueller *et al.*, 2005). Allerdings konnten wir sowohl im Gewebeschnitt als auch in den Zelllinien mit und ohne p53-Expression (A549^{p53+}, H358^{p53-}) keine primäre Lokalisation von S100A2 im Zellkern feststellen (Bartling *et al.*, 2005 (**8.1.**)). Während die Rolle von S100A2 bei der Tumorentstehung daher noch unklar ist, werden dem S100P zumeist protumorigene Eigenschaften hinsichtlich Zelltransformation (Guerreiro Da Silva *et al.*, 2000), Zellproliferation und -migration (Arumugam *et al.*, 2005; Diederichs *et al.*, 2004;

Fuentes *et al.*, 2007) zugesprochen. Darüber hinaus konnten Korrelationen zwischen dem erhöhten S100P-Gehalt und der Metastasierungstendenz des Tumors sowie dem Überleben des Patienten gezeigt werden (Diederichs *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006).

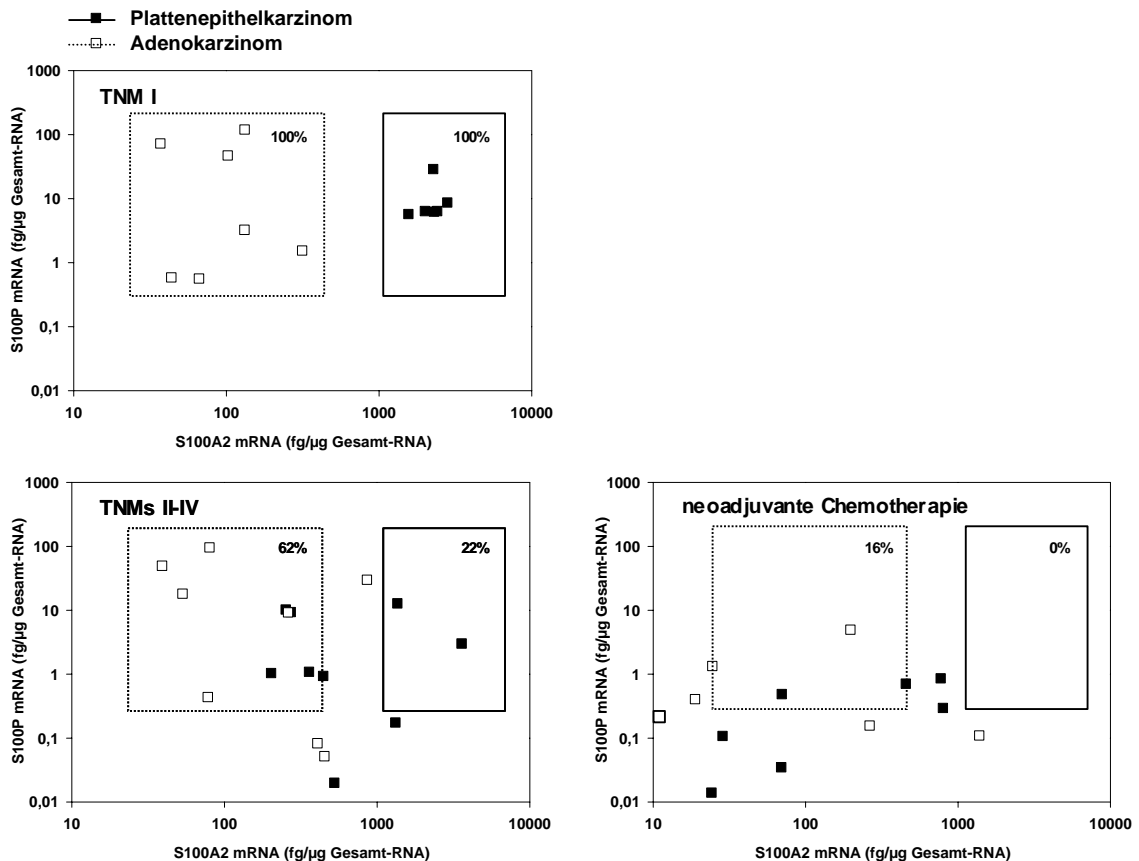


Abb. 6) Graphische Darstellung des individuellen mRNA-Expressionsgehaltes von S100A2 per S100P im NSCLC abhängig vom TNM-Stadium sowie von einer neoadjuvanten Chemotherapie. Der mRNA-Gehalt wurde durch quantitative *real-time* RT-PCR ermittelt. Die Prozentangaben beziehen sich auf all die NSCLCs, die dem entsprechenden Expressionscluster (Box) für das Plattenepithelkarzinom bzw. Adenokarzinom korrekt zugeordnet werden konnten. Aus Bartling *et al.*, 2007 (8.1.).

Zusammengefasst haben die Untersuchungen zur diagnostischen Bedeutung der S100-Proteine gezeigt, dass die erhöhte Expression von S100A2 in einem NSCLC ein Plattenepithelkarzinom im frühen Tumorstadium diagnostiziert, wohingegen die erhöhte Expression von S100P auf ein Adenokarzinom im frühen Tumorstadium hinweist. Daher eignet sich die mathematische Darstellung eines S100A2-S100P-Expressionsclusters gut für die histopathologische Zuordnung des jeweiligen NSCLC-Subtyps (Abb. 6). Bei höheren Tumorstadien und/oder nach einer neoadjuvanten Chemotherapie des Patienten kann dieses S100A2-S100P-Expressionscluster jedoch nicht mehr für die eindeutige Diagnose herangezogen werden (Abb. 6). Dennoch würde sich die gleichzeitige Expres-

sionsanalyse beider S100-Proteine im Zuge der Etablierung von Diagnose-relevanten Arrays empfehlen, da sie die klinisch-pathologische Bestimmung eines vorliegenden Bronchialkarzinoms zusätzlich unterstützen kann.

3.2. Vergleich von differentieller mRNA- und Proteinexpression

In den letzten Jahren haben genomweite Analysen des Transkriptoms die Veränderungen des mRNA-Expressionsprofils im Bronchialkarzinom und seiner histopathologischen Subtypen im Vergleich zum Normalgewebe erfasst (vgl. Kapitel 1.4.). Die Veränderungen des mRNA-Gehaltes deuten aber nicht unmittelbar auf einen veränderten Gehalt des entsprechenden Proteins oder gar dessen Funktionalität hin. Aufgrund der eingeschränkten biologischen Signifikanz von Transkriptomanalysen werden daher zusätzliche Nachweistechniken genutzt, um die Ergebnisse der mRNA-Analysen auf Proteinebene zu bestätigen. Dazu gehört auch die Gewebe-Mikroarray-Technik, welche die simultane immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen Gewebeproben ermöglicht (Battifora, 1986; Kononen *et al.*, 1998; Torhorst *et al.*, 2001). So konnte beispielsweise die differentielle Expression einiger Proteine der S100-Familie in diversen Tumorarten durch die Gewebe-Mikroarrays nachgewiesen werden (Cross *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2003).

Obwohl die Gewebe-Mikroarrays mehrere Gewebe gleichzeitig analysieren können, hat diese Technik den Nachteil, dass sie nur ein Zielprotein an ausgesuchten Gewebeproben detektiert. Daher wurde die Antikörper-Array-Technik entwickelt, welche die gleichzeitige Quantifizierung einer Vielzahl von Proteinen durch monoklonale Antikörper auf Glasträgern erlaubt (Lv & Liu, 2007; Wingren & Borrebaeck, 2006). Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Proteinen einer Signalkaskade oder Proteinen einer bestimmten Funktionsklasse hergestellt werden kann. Auch wenn diese Technologie für onkologisch-orientierte Proteomanalysen vielversprechend zu sein scheint, gab es kaum praktische Erfahrungen mit der Anwendung dieser Technik für menschliches Tumorgewebe. Aus diesem Grund hatten wir die Antikörper-Array-Technik genutzt, um die differentielle Expression von Proteinen im Plattenepithelkarzinom der Lunge zu analysieren und anschließend zu verifizieren (Bartling *et al.*, 2005 (8.2.)). Dazu wurden *BD ClontechTM* Ab-Mikroarrays genutzt, die die Analyse von 378 definierten Proteinen pro Array ermöglichten. Im internen Vergleich zum Normallungengewebe konnten 20 Proteine identifiziert werden, die im Plattenepithelkarzinom höher exprimiert waren, bzw. 9 Proteine, die geringer exprimiert waren. Der direkte Vergleich mit Daten der DNA-Mikroarray-Analysen an den gleichen Tumorproben ergab in 31 % der detektierten Proteine

eine Übereinstimmung mit der differentiellen Expression der mRNA im Plattenepithelkarzinom. Dazu gehörte die erhöhte Expression von PEX (*Peroxisome biogenesis factor*) 1, MKK (*Mitogen-activated protein Kinase Kinase*) 7 und HDAC (*Histone Deacetylase*) 3 sowie die verminderte Expression des Transkriptionsfaktors NF (*Nuclear Factor*)-ATc2. In 28 % der detektierten Proteine fanden wir allerdings keine Korrelation mit dem mRNA-Gehalt, wohingegen in 7 % eine umgekehrte Korrelation und in 34 % ein falsch-positives Signal (d.h. Proteindetektion bei fehlender mRNA-Expression) auftrat. Die Ursachen für eine abweichende Expression von mRNA und Protein könnten einerseits aktive Regulationsmechanismen sein, andererseits könnten sie aber auch technisch bedingt sein. Dazu zählt die inkorrekte Antigen-Antikörper-Bindung auf dem Array, die vermutlich auch zum relativ hohen Anteil von falschen Signalen geführt hatte. Aus diesem Grund wurden ausgewählte Proteine, die im Plattenepithelkarzinom potentiell verändert exprimiert waren, durch Immunoblot-Analysen überprüft. Während manche Daten in der Tat nicht bestätigt werden konnten, gab es aber auch einige Übereinstimmungen (Bartling *et al.*, 2005 (8.2.)). Diese fanden wir für die Proteinkinase C (PKC)-Isoform ϵ , die im Tumor verstärkt exprimiert war, und den Na^+/H^+ -Austauscher (NHE)-1, der vermindert exprimiert war. Die differentielle Expression von PKC ϵ und NHE-1 konnte aber in einer zweiten, unabhängigen (Validierungs-) Gruppe von Patienten mit Plattenepithelkarzinom nicht mehr beobachtet werden, was auf die Insignifikanz der Expressionsveränderungen im Tumor hindeutete. Im Gegensatz dazu wurde die Heraufregulation der HDAC3 durch Immunoblot-Analysen beider Patientengruppen verifiziert. Die HDAC3-Proteinexpression war in nahezu allen untersuchten Plattenepithelkarzinomen (92 %) stärker als im vergleichenden Normal-lungengewebe exprimiert (ca. 1,5-fach). Obwohl keine Proteinexpressionsanalysen von HDAC3 am Adenokarzinom der Lunge vorgenommen worden sind, zeigten die DNA-Mikroarray-Studien einen deutlichen Anstieg (ca. 2-fach) der mRNA-Expression von HDAC3 in den Adenokarzinomgeweben (unveröffentlicht).

HDAC3 ist ein Mitglied der HDAC-Klasse-I-Familie, der auch die HDACs 1, 2, 8 und 11 angehören (Gray & Ekstrom, 2001). HDACs spielen zusammen mit der Histonazetyltransferase eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation in der Zelle, da sie den Azetylierungsstatus der Histone reversibel regulieren (Kuo & Allis, 1998). Eine hohe Histonazetylierung führt demnach zur Aktivierung und eine geringe Histonazetylierung zur Repression von Transkriptionsprozessen. Ferner trägt auch die dynamische Azetylierung und Deazetylierung von Nichthistonproteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren, α -Tubulin) zu einer Vielzahl von zellulären Prozessen bei (Kouzarides, 2000). Treten Störungen im

Azetylierungsstatus auf, kann es zum Fehlverhalten der Zelle und zur neoplastischen Transformation kommen (Kim *et al.*, 2003). Obwohl es einen direkten Zusammenhang zwischen HDAC-Aktivität und Tumorigenese gibt (Belinsky *et al.*, 2003), liegen nur wenige Daten zur Expression von HDAC-Enzymen in Tumoren vor. Bisher wurde lediglich die erhöhte Expression von HDAC1 in einigen malignen Geweben beschrieben (Choi *et al.*, 2001; Patra *et al.*, 2001; Toh *et al.*, 2003). Unsere DNA-Mikroarray-Analysen konnten ebenfalls eine verstärkte mRNA-Expression von HDAC1 im Plattenepithelkarzinom feststellen (Bartling *et al.*, 2005 (8.2.)), allerdings ließen die verwendeten Antikörper-Arrays aufgrund fehlender Antikörper auf dem Array keine Untersuchungen von HDAC1 oder anderen HDACs zu. In diesem Zusammenhang war auch die Bestimmung bereits bekannter Tumormarker für das Plattenepithelkarzinom, wie beispielsweise einige Zytokeratine (Buccheri & Fierrigno, 2001) oder S100A2 (vgl. Kapitel 3.1.), nicht möglich.

Anhand unserer Erfahrungen mit dem Einsatz von Antikörper-Mikroarrays konnten wir schlussfolgern, dass diese Technologie eine nützliche *Screening*-Methode ist, mit der man multiple Veränderungen im Proteom bestimmen kann. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern ist sie für den unmittelbaren Einsatz in der Tumoranalytik allerdings weniger geeignet. Darüber hinaus bleibt auch zu beachten, dass die Proteinquantifizierung mittels der Antikörper-Arrays auf der Bindung von Proteinen in ihrer dreidimensionalen Struktur basiert. Da posttranslationale Prozesse zu Veränderungen in der Proteinstruktur führen können und somit die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes auf dem Array beeinflussen, wäre zudem der gleichzeitige Einsatz von verschiedenen monoklonalen Antikörpern sinnvoll, die unterschiedliche Epitope des gleichen Antigens erkennen. Aufgrund dieser Nachteile sowie der Untersuchung von Gewebehomogenaten in der Antikörper-Array-Technologie wird daher die zusätzliche Nutzung anderer Nachweistechiken unerlässlich bleiben.

4. Beitrag des Rezeptors RAGE zur Entstehung des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms

4.1. Verminderte Expression von RAGE im Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom

Die Aktivierung des Zelloberflächenrezeptors RAGE trägt abhängig von Zelltyp, Zellstatus und Ligand sowohl zu physiologischen als auch zu pathophysiologischen Prozessen bei (vgl. Kapitel 1.5.). Obwohl insbesondere die Rolle von RAGE bei der Vermittlung von

inflammatorischen Reaktionen der Zelle und Differenzierungsprozessen beschrieben worden ist, blieb die Bedeutung des Rezeptors bei der Tumorentstehung zunächst unklar. Experimentelle Arbeiten von Taguchi *et al.*, 2000, konnten zeigen, dass die Aktivierung von RAGE durch extrazelluläres Amphoterin/HMGB1 das Tumorwachstum und die Metastasierung von Tumorzellen fördert. Dies wurde für das Tumorwachstum durch die subkutane Implantation von C6-Gliomazellen in immundefiziente Scid-Mäuse und für die Metastasierung durch Injektion von 3LL (*Lewis Lung*)-Karzinomzellen in C57BL/6-Mäuse *in vivo* nachgewiesen (Taguchi *et al.*, 2000). Die RAGE-Aktivierung könnte insbesondere zu einer verbesserten Migrationsfähigkeit von Tumorzellen führen, da das Expressionsniveau von RAGE mit der gesteigerten Migration, nicht aber der Proliferation, auch anderer Arten von Karzinomzellen einherging (Kuniyasu *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2001). Trotz dieser Beobachtungen ist die tumorbiologische Rolle von RAGE umstritten. So konnten experimentelle Studien an Neuroblastomzellen sowie Melanomzellen eindeutig zeigen, dass die Bindung des C-terminalen Bereiches von Amphoterin an RAGE die invasive Migration der Tumorzellen in transendothelialen Migrationsversuchen inhibiert und ferner die Ausbildung von Tumormetastasen *in vivo* unterdrückt (Huttunen *et al.*, 2002a).

Die Ursachen für diese widersprüchlichen Ergebnisse zur Rolle von RAGE in Tumoren sind vielfältig. Zum einen interagiert RAGE mit einer Vielzahl von extrazellulären Liganden, die von den Tumorzellen oder Zellen des Tumorstromas gebildet werden können und sich in ihrer RAGE-vermittelnden Wirkung somit gegenseitig beeinflussen. Zum anderen üben die potentiellen Bindungspartner von RAGE extrazelluläre Funktionen aus, die unabhängig von RAGE sind. Darüber hinaus gehen all diese Untersuchungen davon aus, dass die RAGE-Expression in den Tumoren hoch ist. Der Zelloberflächen RAGE ist aber auch in einigen normalen Geweben und insbesondere im Lungengewebe stark exprimiert (Brett *et al.*, 1993). Zudem konnten deskriptive Analysen von Schraml *et al.* bereits 1994 zeigen, dass die Expression von RAGE im NSCLC im Vergleich zum Normallungengewebe herabreguliert ist.

Unsere Arbeiten haben die deutliche Herabregulation von RAGE in den Tumorproben von Patienten mit einem NSCLC bestätigt (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Ferner erlaubte die geringe RAGE-Expression im NSCLC eine diagnostisch sehr genaue Differenzierung des Tumorgewebes vom Nichttumorgewebe (Hofmann *et al.*, 2004). Dies konnte sowohl für das Plattenepithelkarzinom als auch für das Adenokarzinom durch Untersuchungen von mRNA- und Proteinexpression am Gewebehomogenat gezeigt werden. Immunhistochemische Analysen bestätigten den deutlichen Expressionsverlust von RAGE in den

Bronchialkarzinomzellen im Vergleich zum histologisch normalen Lungenepithel (Abb. 7). Der Expressionsverlust von RAGE in den Tumoren von Patienten mit höheren TNM-Stadien (III-IV) war dabei deutlicher als in den TNM-I-Tumoren ausgeprägt. Korrelationen mit anderen Tumorparametern (z.B. Differenzierungsgrad, neoadjuvante Chemotherapie) oder dem krankheitsfreien Überleben der Patienten konnten nicht gefunden werden. Darüber hinaus trat auch kein differentielles Spleißen der Vorläufer-mRNA für RAGE zugunsten seiner löslichen (Δ C-) Isoformen sRAGE 1, 2 und 3 auf (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Die andere Δ C-Isoform hRAGEsec sowie das Δ N-RAGE waren in der Lunge bzw. im Tumor nicht exprimiert. Die Isoform sRAGE 2/esRAGE, die sowohl extra- als auch intrazellulär auftritt (Cheng *et al.*, 2005; Yonekura *et al.*, 2003), wurde detaillierter durch Kobayashi *et al.*, 2007, am NSCLC untersucht. Diese überwiegend histopathologische Arbeit zeigte die deutliche Herabregulation des zytoplasmatischen Anteils von sRAGE 2/esRAGE im NSCLC im Vergleich zum normalen Lungengewebe. Die verbleibende sRAGE 2/esRAGE-Expression im Tumor war aber ein Indikator für den Nichtbefall der Lymphknoten sowie das Überleben der Patienten nach thoraxchirurgischer Intervention. Im Gegensatz zu RAGE ist die sRAGE 2/esRAGE-Expression jedoch nicht auf die Bronchialkarzinomzellen beschränkt, sondern kann auch in Stromazellen nachgewiesen werden (Kobayashi *et al.*, 2007).

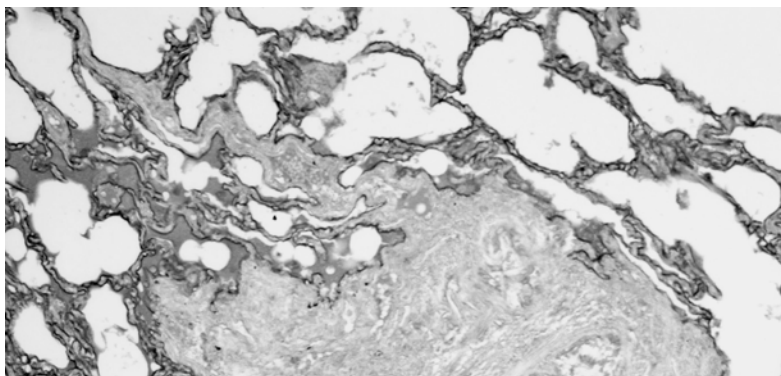


Abb. 7) Immunhistochemie eines Adenokarzinoms der Lunge zeigt die Färbung von RAGE im umliegenden Normallungengewebe, wohingegen die Tumorzellen ungefärbt bleiben. Bildausschnitt aus Bartling *et al.*, 2005 (8.3.).

Die verminderte Expression des Rezeptors RAGE in den Lungentumoren trat allerdings nicht nur in den malignen Neoplasmen, sondern auch benignen Neoplasmen der Lunge (Hamartom) auf (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Da die RAGE-Expression zudem in Lungenmetastasen anderer Tumore (z.B. Nierenzellkarzinom, Magenkarzinom) sowie in

Karzinomen anderer Gewebe (z.B. Kolon, Rektum, Schilddrüse) im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe reduziert war, scheint die Herabregulation von RAGE auch ein häufigeres Tumorereignis zu sein. Dennoch wird in einigen Karzinomen bzw. Epithelzelllinien immer wieder eine gute RAGE-Expression beschrieben (Hsieh *et al.*, 2003; Ishiguro *et al.*, 2005; Kuniyasu *et al.*, 2003; Miki *et al.*, 1993; Sasahira *et al.*, 2005), die aber nur bedingt interpretiert werden kann, da zumeist kein vergleichendes Normalgewebe analysiert worden ist.

Der Repression von Transkriptionsprozessen durch verstärkte DNA-Methylierungen im Promoterbereich und/oder durch eine geringere Histonazetylierung trägt durch multiple Veränderungen der Genexpression zur Tumorentstehung und -progression bei (vgl. Kapitel 3.2.). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die gleichzeitige Inhibierung von DNA-Methylierung und Histondeazetylierung die Entwicklung von Lungentumoren *in vivo* verhindern kann (Belinsky *et al.*, 2003). Die Blockade der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2`Deoxycytidin allein oder in Kombination mit der Inhibierung der Histondeazetylierung durch Scriptaid hatte allerdings keinen Einfluss auf die RAGE-Expression in den H358-Bronchialkarzinomzellen (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Daher scheinen diese epigenetischen Prozesse keine Rolle bei der verminderten Transkription des *rage*-Genes im Bronchialkarzinom zu spielen. Des Weiteren können Genpolymorphismen ausgeschlossen werden, da Polymorphismen in der Promoterregion von *rage* in nur 21 % der NSCLCs auftreten (Schenk *et al.*, 2001). Ferner ist auch der Verlust des *rage*-aktivierenden Transkriptionsfaktors NF- κ B unwahrscheinlich, da dieser in den meisten Tumoren induziert ist (Darnell Jr, 2002). Daher basiert die aktive Repression der mRNA-Expression von RAGE vermutlich auf anderen molekulargenetischen Prozessen.

4.2. Einfluss der veränderten RAGE-Expression auf Zellmigration und Tumorentstehung

Die verminderte Expression des Zelloberflächenrezeptors RAGE im NSCLC und anderen soliden Tumoren führte nun zu der Fragestellung, ob und in welchem Ausmaß der Verlust von RAGE zur Tumorentwicklung selbst beiträgt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden menschliche H358-Bronchialkarzinomzellen, die sich von einem bronchioloalveolären Karzinom ableiten und kein detektierbares RAGE-Protein aufweisen, mit dem Rezeptor RAGE stabil überexprimiert (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Darüber hinaus sind H358-

Zellen etabliert worden, die RAGE ohne die intrazelluläre Domäne (Δ cytoRAGE) stabil exprimieren (dominant negative Zellen).

Der Hauptligand von RAGE in der Lunge könnte die extrazelluläre Form von HMGB1, das Amphoterin, sein (Huttunen *et al.*, 2002a). HMGB1 ist als DNA-bindendes Protein überwiegend im Zellkern lokalisiert, wird aber in bestimmten Entwicklungsstadien (Muller *et al.*, 2001) oder durch proinflammatorische Stimuli von Zellen freigesetzt (Czura *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1999). Darüber hinaus gelangt HMGB1 durch den Zerfall nekrotischer Zellen indirekt in den extrazellulären Bereich, wo es zur Auslösung von Entzündungsprozessen beiträgt (Scaffidi *et al.*, 2002). Die Interaktion von Amphoterin/HMGB1 mit RAGE wurde als eine der Ursachen für die invasive Migration und Metastasierung von Tumorzellen betrachtet (Kuniyasu *et al.*, 2003; Taguchi *et al.*, 2000). Vergleichbare Effekte sind für die extrazelluläre Bindung von S100P an RAGE beschrieben worden (Fuentes *et al.*, 2007). Zudem konnte auch eine direkte Korrelation zwischen dem RAGE-Expressionsgehalt und dem invasiven Verhalten von Pankreas- und Magenkarzinomzelllinien gezeigt werden (Kuniyasu *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2001). Es ist aber unklar, in welchem Ausmaß das Amphoterin/HMGB1 oder andere RAGE-Liganden im Extrazellularbereich von Tumorzellen *in vivo* vorliegen (vgl. Kapitel 5.2.). Ferner könnte RAGE bereits über Autoaktivität verfügen. Daher haben wir den biologischen Effekt von RAGE allein und nicht in Kombination mit spezifischen RAGE-Liganden untersucht.

In den H358-Bronchialkarzinomzellen führte nur die Expression der zytoplasmatischen Deletionsmutante von RAGE (Δ cytoRAGE), nicht aber des gesamten Rezeptors, zu einer gesteigerten Migrationsfähigkeit der Zellen (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Daher scheint zwar die extrazelluläre Domäne von RAGE die Zellmigration zu fördern, die intrazelluläre Domäne blockiert bzw. kontrolliert jedoch diesen promigrativen Effekt. Vergleichbare Beobachtungen wurden an L6-Myoblasten *in vitro* (Riuzzi *et al.*, 2006) gemacht. Die geringe Expression von RAGE in den Lungenmetastasen (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)) deutet ebenfalls auf die geringe Rolle von RAGE bei der Tumorzellmigration und Metastasierung hin.

Da der Verlust von RAGE im NSCLC keinen signifikanten Einfluss auf die Migration der Tumorzellen zu haben scheint, könnte aber die Zellproliferation und somit das Tumorstadium durch die verminderte RAGE-Expression moduliert werden. In diesem Zusammenhang führte die Überexpression (Reexpression) von RAGE in H358-Zellen in der Tat zu einer reduzierten Zellproliferation sowohl im zweidimensionalen Zellmodell

(*Monolayer*-Kultur) als auch im dreidimensionalen Zellmodell (Sphäroidkultur) im Vergleich zu den Δ cytoRAGE-exprimierenden Zellen. Dieses Ergebnis wurde am Xenograft-Modell durch die subkutane Injektion von H358-Zellen in immundefiziente Nude-Mäuse *in vivo* bestätigt (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Aus diesem Grund scheint das hohe Expressionsniveau von RAGE in der Lunge eine eher tumorsuppressive Wirkung zu vermitteln. Diese Annahme wird durch experimentelle Studien an Neuroblastomzellen und Myoblasten unterstützt, die nach RAGE-Aktivierung durch Amphoterin/HMGB1 eine reduzierte Zellproliferation im Vergleich zu den Δ cytoRAGE-exprimierenden Zellen *in vitro* und *in vivo* beobachteten (Huttunen *et al.*, 2002b; Riuzzi *et al.*, 2006). Die negative Wirkung von RAGE auf das Tumorwachstum dürfte durch die verbleibende Expression von sRAGE 2/esRAGE in einigen individuellen NSCLCs noch verstärkt werden, da die Überexpression dieser RAGE-Isoform die Proliferation von Bronchialkarzinomzellen *in vitro* ebenfalls reduzierte (Kobayashi *et al.*, 2007).

Da wir und andere Arbeitsgruppen kein verstärktes Tumorwachstum in Gegenwart von RAGE identifizieren konnten, widersprechen diese Daten auch dem protumorigenen Effekt von RAGE in C6-Gliomazellen *in vivo* (Taguchi *et al.*, 2000) oder in Kolonkarzinomzellen *in vitro* (Fuentes *et al.*, 2007). Dennoch muss beachtet werden, dass das RAGE-Liganden-System und seine Wirkung auf die Zelle sehr komplex ist und zudem organspezifisch sein kann. So führte beispielsweise die kompetitive Blockade von RAGE durch die Überexpression von Δ cytoRAGE in H358-Zellen nicht nur zu einem stärkeren Wachstum der dreidimensionalen Tumorzellverbände *in vitro* und *in vivo* im Vergleich zu den RAGE-exprimierenden Zellen, sondern auch im Vergleich zu den H358-Kontrollzellen (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Insbesondere synergistische Effekte zwischen der zellschädigenden und zellprotektiven Wirkung einiger RAGE-Liganden könnten eine Erklärung dafür sein (Arumugam *et al.*, 2004; Donato, 2003; Huttunen & Rauvala, 2004; Kuniyasu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Der extrazelluläre Gehalt und die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Bindungspartner von RAGE dürften dabei entscheidend von der Art und Lokalisation der Tumorzellen, aber auch vom umgebenden Mikromilieu abhängen. Hinzu kommen die unterschiedliche Anordnung von Oberflächenproteinen und deren induzierte Signaltransduktion zwischen den polarisierten Zellen im zweidimensionalen Zellverband und den dreidimensional angeordneten Zellen. Darüber hinaus fanden wir unter normalen Zellkulturbedingungen keine offensichtliche Freisetzung von Amphoterin/HMGB1 und Interaktion mit RAGE. Die schnelle proteolytische Degradation von Amphoterin/HMGB1 im Extrazellularraum (Zellkulturmedium) könnte ein Grund dafür sein (Bartling *et al.*,

2007 (8.5.)). Obwohl all dies kein Hinweis auf die Situation in einem dreidimensionalen Zellverband *in vitro* oder gar auf die Situation *in vivo* ist, hebt es einige Unklarheiten bei der Rezeptorstimulation von RAGE und der intrazellulären Signaltransduktion hervor. Auf die Problematik wird in Kapitel 5.1. nochmals eingegangen.

4.3. Veränderte Epithelstruktur durch die Expression von RAGE

Unsere Beobachtungen deuten zwar darauf hin, dass der Expressionsverlust von RAGE im NSCLC das Tumorwachstum unterstützt, diese Effekte waren aber nicht sehr dominant ausgeprägt. Daher könnte auch der Verlust von anderen RAGE-abhängigen Prozessen in den Epithelzellen der Lunge zur Tumorigenese des NSCLC beitragen. So zeigten immunzytochemische Untersuchungen, dass RAGE insbesondere an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Diese RAGE-Lokalisation war zudem ausschließlich von der extrazellulären Domäne des Rezeptors abhängig, da auch die zytoplasmatische Deletionsmutante Δ cytoRAGE an den interzellulären Kontaktstellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 8). Aus diesem Grund könnte die Herabregulation von RAGE im NSCLC und anderen Karzinomen bei der Reorganisation des Gewebes während der Tumorformation eine bedeutende Rolle spielen, so wie es für das E-Cadherin beschrieben worden ist (vgl. Kapitel 1.1.).

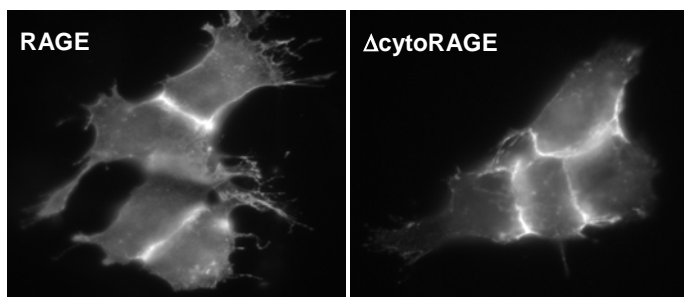


Abb. 8) Immunfluoreszenzfärbung von RAGE in H358-Bronchialkarzinomzellen, die RAGE bzw. die zytoplasmatische Deletionsmutante Δ cytoRAGE überexprimieren. Aus Bartling *et al.*, 2005 (8.3.).

Das Alveolarepithel der Lunge setzt sich aus den Typ-I- und den Typ-II-Alveolarzellen zusammen (Crapo *et al.*, 1982). Typ-II-Alveolarzellen sind kubisch geformte Zellen, die die Gesamtoberfläche des Alveolarepithels nur zu 5 % bedecken und hauptsächlich der Produktion und Sekretion des Surfactants dienen. Die Typ-II-Alveolarzellen sind selbstregenerierende Zellen, und darüber hinaus können sie sich in die Typ-I-Alveolarzellen

umwandeln (Danto *et al.*, 1995; Forbes, 2002). Den überwiegenden Teil der Gesamtoberfläche des Alveolarepithels (95 %) aber bedecken die Typ-I-Zellen (Alveolardeckzellen), die dem Gasaustausch über die Alveolarwand (Blut-Luft-Schranke) dienen. Die Typ-I-Zellen sind an der basolateralen Seite miteinander oder mit den Typ-II-Zellen sowie der extrazellulären Matrix, dessen Hauptkomponente Kollagen ist, verbunden.

An der basolateralen Seite von Typ-I-Alveolarzellen ist auch RAGE bevorzugt lokalisiert (Fehrenbach *et al.*, 1998). Dort kolokalisiert der Rezeptor mit Erbin (*ErbB2-interacting protein*) (Shirasawa *et al.*, 2004), das bedeutend für die Organisation des Epithels ist (Bryant & Huwe, 2000). Da die RAGE-Expression während der Lungenentwicklung *in vivo* und der Transdifferenzierung von Typ-II- zu Typ-I-ähnlichen Alveolarzellen *in vitro* zunimmt (Demling *et al.*, 2005; Shirasawa *et al.*, 2004), könnte RAGE mit der Differenzierung und Organisation des Lungenepithels assoziiert sein. Daher würde der Expressionsverlust von RAGE im Tumorgewebe auch zum Verlust der normalen Struktur des Alveolarepithels beitragen. Diese Vermutung kann durch unsere Beobachtungen unterstützt werden, die zeigten, dass die Reexpression von RAGE in den H358-Bronchialkarzinomzellen das epitheliale Wachstum der Zellen auf Kollagen deutlich fördert (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)). Im Gegensatz dazu blieben die Bronchialkarzinomzellen ohne RAGE-Expression bevorzugt in ihren tumorigenen Zellverbänden (Abb. 9). Analog der vergleichbaren Lokalisation von RAGE und Δ cytoRAGE in der Zelle (Abb. 8), war auch die epitheliale Zellanordnung auf dem Kollagen unabhängig von der intrazellulären RAGE-Domäne (Abb. 9). Aus diesem Grund dürfte entweder die extrazelluläre Domäne von RAGE allein oder in Kombination mit anderen extrazellulären Faktoren und/oder Membranproteinen auf der Zelloberfläche zur Epithelzellanordnung beitragen.

Die potentielle Bedeutung des Zelloberflächenrezeptors RAGE bei der Organisation des Alveolarepithels wird durch eine andere Arbeitsgruppe unterstützt, die eine verbesserte Zelladhärenz und Abflachung (*Spreading*) von Epithelzellen auf Kollagen durch die RAGE-Expression beobachtete (Demling *et al.*, 2005). Obwohl auch diese Beobachtung auf eine signifikante Rolle von RAGE bei der Aufrechterhaltung der abgeflachten Zellmorphologie von Typ-I-Zellen im Alveolarepithel hinweist, zeigen RAGE *knock out*-Mäuse aber keine offensichtlichen Phänotypveränderungen der Lunge (He *et al.*, 2007). Unter physiologischen Umständen scheinen daher andere basolaterale Zelloberflächenproteine der Typ-I-Zellen die Funktion von RAGE im Alveolarepithel zu kompensieren. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass sich das RAGE-Defizit im Alveolarepithel erst in Gegenwart definierter (pathologischer) Stimuli ausprägt. Derzeit gibt es darauf aber nur

indirekte Hinweise. So haben aktuelle Arbeiten von Lizotte *et al.*, 2007, an der Ratte zeigen können, dass die Expression von RAGE in Lunge mit der Entwicklung vom Fötus über das Neugeborene zum jungen Tier graduell zunimmt. Die entwicklungsbedingte Zunahme von RAGE ist aber gestört, wenn das neugeborene Tier einer chronischen Hyperoxie ausgesetzt wird. Da Hyperoxie beim Neugeborenen häufig zu einer bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) mit gestörter Alveolarentwicklung führt (Jobe & Ikegami, 1998), könnte die BPD-Pathogenese mit der verminderten RAGE-Expression im Alveolarepithel assoziiert sein.

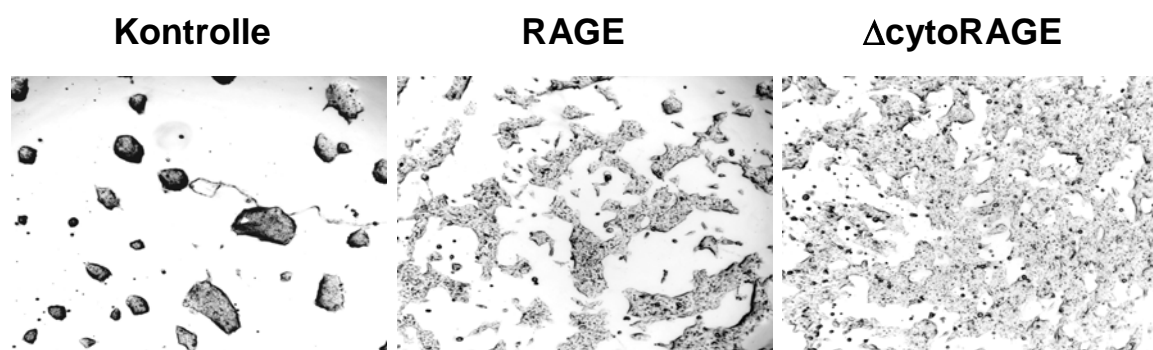


Abb. 9) Kultur von H358-Zellen auf einer Kollagenschicht, die überwiegend aus Kollagen-1/-3 besteht. Nach 5 Tagen zeigen sich morphologische Unterschiede zwischen den H358-Zellverbänden mit Überexpression von RAGE bzw. Δ cytoRAGE im Vergleich zu den H358-Kontrollen. Aus Bartling *et al.*, 2005 (8.3.).

5. Einfluss von Fibroblasten auf die Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomzellen

5.1. Mitogene Stimulation und Tumorzellproliferation

Das vorherige Kapitel stellte die differentielle Expression einiger Gene bzw. deren Genprodukte dar, die im Zusammenhang mit der Pathogenese des NSCLC stehen. Am Beispiel des Typ-I-Alveolarzell-spezifischen Oberflächenrezeptors RAGE wurde dabei eines der differentieLL exprimierten Gene genauer analysiert, um seine Bedeutung bei der Tumorigenese zu charakterisieren. Diese Analysen haben gezeigt, dass die verminderte Expression von RAGE im Tumorgewebe potentiell zum Verlust der epithelialen Zellanordnung im Bronchialkarzinom beiträgt, ohne dabei einen negativen Effekt auf das Tumorstwachstum zu haben (Bartling *et al.*, 2005 (8.3.)).

Epitheliale Krebserkrankungen werden aber nicht allein durch genetische Veränderungen wie die Herabregulation von RAGE in den entarteten Epithelzellen bestimmt, sondern

zusätzlich durch die protumorigene Umgebung der Zellen im Tumorgewebe (Kinzler & Vogelstein, 1998; Park *et al.*, 2000). Das Gewebemilieu im Tumor prägen insbesondere die Fibroblasten des Tumorstromas (Kunz-Schughart & Knuechel, 2002a; Kunz-Schughart & Knuechel, 2002b; Micke & Ostman, 2004). Aus diesem Grund haben sich unsere Studien ferner mit dem Einfluss von Fibroblasten auf Bronchialkarzinomzellen in Abhängigkeit von der Reexpression von RAGE in den Tumorzellen beschäftigt (Bartling *et al.*, 2006 (8.4.)). Als menschliche Bronchialkarzinomzellen wurden wiederum die H358-Zellen verwendet, die entweder RAGE oder die zytoplasmatische Deletionsmutante Δ cytoRAGE überexprimierten. Die menschlichen WI-38-Zellen dienten als primäre Lungenfibroblasten. Da es sich hierbei um fötale Zellen der Lunge handelt, dürften auch einige Gemeinsamkeiten mit den tumorassoziierten Fibroblasten vorliegen, da auch diese fötale Eigenschaften aufweisen (Kunz-Schughart & Knuechel, 2002a).

Unsere experimentellen Arbeiten konnten nachfolgend zeigen, dass die direkte Kokultur von H358-Bronchialkarzinomzellen mit den WI-38-Lungenfibroblasten die Proliferation der Tumorzellen sowohl im zweidimensionalen Zellmodell (*Monolayer*-Kultur) als auch im dreidimensionalen Zellmodell (Sphäroidkultur) fördert. Dies wurde anhand der Zunahme der Zellzahl bzw. der Sphäroidgröße demonstriert (Tab. 3). Ähnliche Ergebnisse wurden für die indirekte Kultivierung von H358-Tumorzellen mit den WI-38-Fibroblasten (Verwendung von permeablen Zellkultureinsätzen, Softagarassay) oder für die H358-Kultivierung in den konditionierten Medien von Fibroblasten erzielt (Tab. 3). Aus diesem Grund scheinen lösliche Faktoren, die von den Fibroblasten gebildet und freigesetzt werden, die Zellproliferation der Tumorzellen entscheidend zu stimulieren.

Der Einsatz von blockierenden Antikörpern hatte ergeben, dass die H358-Tumorzellen durch den bFGF der Fibroblasten stimuliert werden (Bartling *et al.*, 2006 (8.4.)). Obwohl auch IGF (*Insulin-like Growth Factor*)-1 im Zusammenhang mit der Tumorentwicklung steht (Renehan *et al.*, 2004), war die verbesserte H358-Zellproliferation in den konditionierten Medien von Fibroblasten durch die gleichzeitige Blockade von IGF-1 nicht signifikant beeinträchtigt. Darüber hinaus war auch der Effekt der Fibroblasten auf die Zellproliferation geringer ausgeprägt, wenn die H358-Zellen den Zelloberflächenrezeptor RAGE überexprimierten. Dies konnte sowohl für die *Monolayer*-Kultur als auch für das Sphäroidkulturmodell gezeigt werden (Tab. 3). Dementsprechend hatte auch die bFGF-Blockade durch neutralisierende Antikörper keinen Einfluss auf die Fibroblasten-induzierte Proliferation von H358-Zellen, die RAGE überexprimierten. Die Stimulation der Zellproliferation mit rekombinantem bFGF zeigte ebenfalls einen geringeren Effekt auf die

RAGE-exprimierenden H358-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Bartling *et al.*, 2006 (8.4.)).

Tabelle 3) Einfluss von WI-38-Lungenfibroblasten auf die Bronchialkarzinomzelllinie H358 ohne und mit Überexpression von RAGE bzw. Δ cytoRAGE. Zusammenfassung der Daten aus Bartling *et al.*, 2006 (8.4.).

H358-Parameter	Kontrolle	RAGE	Δ cytoRAGE
zweidimensionale Zellkultivierung:			
Zellzahl ^{a, b, c}	↑↑	↑	↑
Zellen in der S- bzw. G2-Zellzyklusphase ^a	↑↑	↑	↑
Aktivität der p42/p44-MAPKs ^{b, c}	↑↑	↑	↑
Aktivität der Akt-Kinase ^{b, c}	↑	↑	↑
basaler Zelltod ^a	↓	↓	↓
basale Mitochondriendysfunktion ^a	↓	↓	↓
dreidimensionale Zellkultivierung:			
Sphäroidwachstum ^a	↑↑	↑	↑↑
Anzahl der Zellkolonien im Softagarassay ^b	↑↑	↑	↑↑

Veränderungen einzelner Parameter im Vergleich zur internen Kontrollkultivierung ohne WI-38-Fibroblasten: erhöht (↑), stark erhöht (↑↑), verringert (↓). Differenzen zwischen den H358-Kontrollzellen und den RAGE- bzw. Δ cytoRAGE-exprimierenden Zellen sind zusätzlich rot markiert. ^adirekte Kokultur mit WI-38, ^bindirekte Kokultur mit WI-38, ^ckonditioniertes Medium von WI-38 (Erläuterungen, siehe Abkürzungsverzeichnis).

Die Zellproliferation wird durch ein komplexes System aus intrazellulären Proteinkinasen und anderen Signalproteinen bestimmt. Eine Vielzahl von Rezeptortyrosinkinasen aktiviert nach der Rezeptorstimulation durch mitogene Faktoren eine intrazelluläre Kaskade aus Serin-/Threoninkinasen, die so genannten Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) (Schaeffer & Weber, 1999). Die indirekte Kokultur oder Verwendung von konditionierten Medien der WI-38-Fibroblasten resultierte in einer erhöhten p42/p44-Aktivität in den H358-Tumorzellen. Analog dem geringeren proliferativen Einfluss von Fibroblasten auf H358-Zellen, die RAGE reexprimierten, war in diesen Zellen auch die Stimulation der p42/p44-MAPKs durch die Fibroblasten geringer ausgeprägt (Tab. 3). Die bFGF-induzierte p42/p44-Stimulation war ebenfalls in den RAGE-exprimierenden Zellen geringer als in den normalen H358-Tumorzellen (Bartling *et al.*, 2006 (8.4.)). Neben der Induktion des MAPK-Signalweges durch Wachstumsfaktoren spielt auch die Aktivierung der Serin-/Threoninkinase Akt eine bedeutende Rolle bei der Transduktion mitogener Stimuli über die Rezeptortyrosinkinasen (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000). Obwohl die Kultivierung von H358-Zellen in Gegenwart von löslichen Faktoren der WI-38-Fibroblasten zu einer

verbesserten Akt-Stimulation geführt hatte, war dieser Effekt im Vergleich zur Stimulation der p42/p44-MAPKs deutlich geringer und zudem unabhängig von RAGE (Tab. 3).

Der Zelloberflächenrezeptor RAGE besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und einem sehr kurzen zytoplasmatischen Teil (Neeper *et al.*, 1992). Da die zytoplasmatische Domäne keine Homologien zu bisher bekannten Signaltransduktionsdomänen aufweist und derzeit auch noch keine intrazellulären Bindungspartner für RAGE identifiziert worden sind, bleiben die RAGE-vermittelten Signalwege unklar. Aus diesem Grund kann auch nicht darüber diskutiert werden, über welchen Mechanismus RAGE den MAPK-Signalweg beeinflusst. Darüber hinaus setzen die Lungenfibroblasten ein ganzes Spektrum an mitogenen und anderen Faktoren frei, die mehrere Signalwege gleichzeitig induzieren und miteinander sowie mit dem RAGE-Signalweg interagieren könnten. Die Rezeptoraktivierung von RAGE und nachfolgende Signaltransduktion scheint umso komplexer, wenn man die Ergebnisse der H358-Bronchialkarzinomzellen betrachtet, die RAGE ohne die zytoplasmatische Domäne (Δ cytoRAGE) exprimieren. Analog der H358-Zellen mit Überexpression von RAGE zeigten auch die Δ cytoRAGE-exprimierenden Zellen eine verminderte Fibroblasten-induzierte Aktivierung der p42/p44-MAPKs sowie der Zellproliferation im Vergleich zu den normalen H358-Zellen (Tab. 3). Diese Beobachtung konnte jedoch nur für polarisierte Zellen in den zweidimensionalen Kokulturmodellen gemacht werden, aber nicht für die Kokultur der H358-Zellen mit den Fibroblasten im multizellulären Sphäroidmodell (Tab. 3). Über den Einfluss der Zellanordnung als entweder zwei- oder dreidimensionaler Zellverband auf die RAGE- bzw. Δ cytoRAGE-abhängige Zellproliferation wurde schon zuvor berichtet (vgl. Kapitel 4.2.).

Diese Beobachtungen dürften stark mit den subzellulären Veränderungen des Rezeptorkomplexes und/oder des umgebenden Mikromilieus im dreidimensionalen Zellverband assoziiert sein. Trotz einiger Diskrepanzen hinsichtlich der Δ cytoRAGE-exprimierenden Zellen, liegen experimentelle Arbeiten vor, die die Notwendigkeit der extra- aber nicht intrazellulären Domäne von RAGE beschreiben. So konnte gezeigt werden, dass die S100B-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in Mikrogliazellen unabhängig von der intrazellulären aber abhängig von der extrazellulären RAGE-Domäne ist, wohingegen die zytoplasmatische Domäne für die Aktivierung von NF- κ B unerlässlich ist (Adami *et al.*, 2004). Darüber hinaus hatten wir zuvor bereits die vorrangige Lokalisation von RAGE an den interzellulären Kontaktstellen sowie das epitheliale Zellwachstum auf Kollagenmatrix beschrieben, was ebenfalls unabhängig von der Expression der intra-

zellulären RAGE-Domäne war (Abb. 8 und 9). Obwohl all diese Beobachtungen nur bedingt Klarheiten in die RAGE-vermittelte Signaltransduktion bringen, deuten sie auf eine gesonderte Rolle des extrazellulären Bereiches von RAGE hin. Die bisherigen Beobachtungen schlagen vor allem vor, dass RAGE nicht allein als ein individueller Oberflächenrezeptor agiert, sondern im Komplex mit anderen Membranproteinen auf der Zelloberfläche steht. Daher ist auch die RAGE-vermittelte Signaltransduktion über andere Zelloberflächenrezeptoren (Korezeptoren) nicht ausgeschlossen. Bisher konnte nur die Interaktion der extrazellulären Domäne von RAGE mit dem LF-L (*Lactoferrin-Like*)-Protein identifiziert werden (Schmidt *et al.*, 1994). Die biologische Funktion dieser Interaktion ist aber noch unklar.

Die Interaktion der extrazellulären Domäne von RAGE mit Korezeptoren wäre eine plausible Erklärung für die Diskrepanzen zwischen polarisierten und nichtpolarisierten H358-Zellen mit Δ cytoRAGE-Expression. Dennoch bleibt dies sehr spekulativ. Um nun aber die potentielle Bedeutung der RAGE-Signaltransduktion bei der Beeinträchtigung der Fibroblasten-induzierten Tumorzellproliferation zu festigen, wurden H358-Zellen im konditionierten Medium von Fibroblasten kultiviert und das überexprimierte RAGE bzw. Δ cytoRAGE mit Antikörpern, die gegen die extrazelluläre Domäne von RAGE gerichtet waren, blockiert. Nachfolgende Proliferationsversuche in der *Monolayer*-Kultur zeigten, dass der RAGE-abhängige Einfluss auf die Zellproliferation durch die neutralisierenden Antikörper komplett aufgehoben werden kann (Bartling *et al.*, 2006 (8.4.)). Da dies aber nicht für die Δ cytoRAGE-exprimierenden H358-Zellen beobachtet wurde, deuten die Ergebnisse wiederum auf die Notwendigkeit der intrazellulären RAGE-Domäne hin.

Im Bronchialkarzinom ist der Zelloberflächenrezeptor RAGE im Vergleich zum normalen Lungengewebe sehr gering exprimiert. Zudem stimulieren Fibroblasten in der unmittelbaren Umgebung von Bronchialkarzinomzellen die Proliferation der Tumorzellen. Da der proliferative Stimulus der Fibroblasten auf die Tumorzellen aber durch die RAGE-Reexpression vermindert war, dürfte somit der Expressionsverlust von RAGE in den Bronchialkarzinomzellen den protumorigenen Effekt von Fibroblasten im Tumorstroma zusätzlich unterstützen. Obwohl unsere Beobachtungen den antitumorigenen Nutzen der hohen RAGE-Expression im Lungenepithel unterstreichen, bleibt dennoch zu bedenken, dass Immunzellen oder andere Komponenten des Stromas zur Tumorigenese via RAGE beitragen könnten. So ist der Rezeptor RAGE an der Entstehung von chemisch induzierten Hauttumoren mit DMBA/TPA beteiligt, weil RAGE die TPA-vermittelte Entzündung und chronische Infiltration von Immunzellen entscheidend unterstützt (Gebhardt *et al.*, 2008).

Da RAGE weder in den Immunzellen noch in der Epidermis stark exprimiert wird, unterstreichen diese Ergebnisse auch die Unterschiede zwischen Zelltypen mit einer basal hohen RAGE-Expression und Zelltypen mit einer basal geringen RAGE-Expression, die RAGE aber unter pathophysiologischen Umständen induzieren können.

5.2. Tumorzellresistenz und Einfluss der zellulären Seneszenz von Fibroblasten

Replikativ normale Fibroblasten

Die Fibroblasten des Tumorstromas setzen eine Vielzahl von Faktoren frei, die zu distinkten Prozessen der Tumorentwicklung beitragen (Abb. 2). Neben der Unterstützung der Zellproliferation konnten wir in unseren Studien ferner einen Beitrag der Fibroblasten zur Reduktion des basalen Zelluntergangs von Tumorzellen beobachten (Bartling *et al.*, 2006 (8.4.)). Die chronische Stimulation zellprotektiver/antiapoptotischer Mechanismen dürfte dabei eine wichtige Rolle spielen (Igney & Krammer, 2002). Diesbezüglich haben wir nicht nur die Aktivierung der Proteinkinasen Akt und p42/p44 zeigen können, die jeweils antiapoptotische Effekte vermitteln, sondern auch die verstärkte Deaktivierung des proapoptotischen Faktors Bad (Bartling *et al.*, 2006 (8.6.)). Daneben dürfte es weitere Faktoren geben, welche die Tumorzellresistenz unterstützen. Einer dieser Faktoren mit potentiell zellprotektiver Wirkung ist HMGB1 (Brezniceanu *et al.*, 2003), der bisher nur als extrazellulärer Bindungspartner für RAGE diskutiert worden ist. HMGB1 fungiert aber hauptsächlich als Kofaktor für den Transkriptionsprozess (Transkoaktivator) im Zellkern, wo es als Nichthistonprotein an die DNA bindet (Goodwin *et al.*, 1973). Die überwiegende Kernlokalisation von HMGB1 konnte auch für die H358-Zellen (Abb. 10) sowie für andere Tumorepithelzellen der Lunge (A549, H322) immunzytochemisch gezeigt werden (Bartling *et al.*, 2007 (8.5.)). Obwohl HMGB1 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist, tritt HMGB1 abhängig von Zelltyp und Zellstatus auch im Zytoplasma auf (Bonaldi *et al.*, 2003; Bustin & Neihart, 1979; Kuehl *et al.*, 1984; Mosevitsky *et al.*, 1989; Youn & Shin, 2006).

Im Zellkern moduliert HMGB1 die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, zu denen p53, NFκB und Steroidhormonrezeptoren gehören (Bustin, 1999). HMGB1 würde aufgrund seines starken Promoters auf einem hohen Niveau transkribiert werden, aber *Silencer-Elemente upstream* der Promoterregion halten die HMGB1-Transkription auf physiologischem Expressionsniveau (Lum & Lee, 2001). Die Expression von HMGB1 ist während der Embryonalentwicklung induziert (Rauvala & Pihlaskari, 1987; Zhao *et al.*, 2000) und zudem essentiell für das postembryonale Überleben (Calogero *et al.*, 1999).

Abhängig vom Zelltyp findet man eine detektierbare HMGB1-Expression in verschiedenen ausdifferenzierten Zellen (Degryse *et al.*, 2001; Fiuza *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004) und eine generell hohe Expression in transformierten Zellen (Brezniceanu *et al.*, 2003; Nagatani *et al.*, 2001). Im Tumor unterstützt HMGB1 die Transformation, Proliferation und Resistenz der Zellen (Brezniceanu *et al.*, 2003; Volp *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2000a).

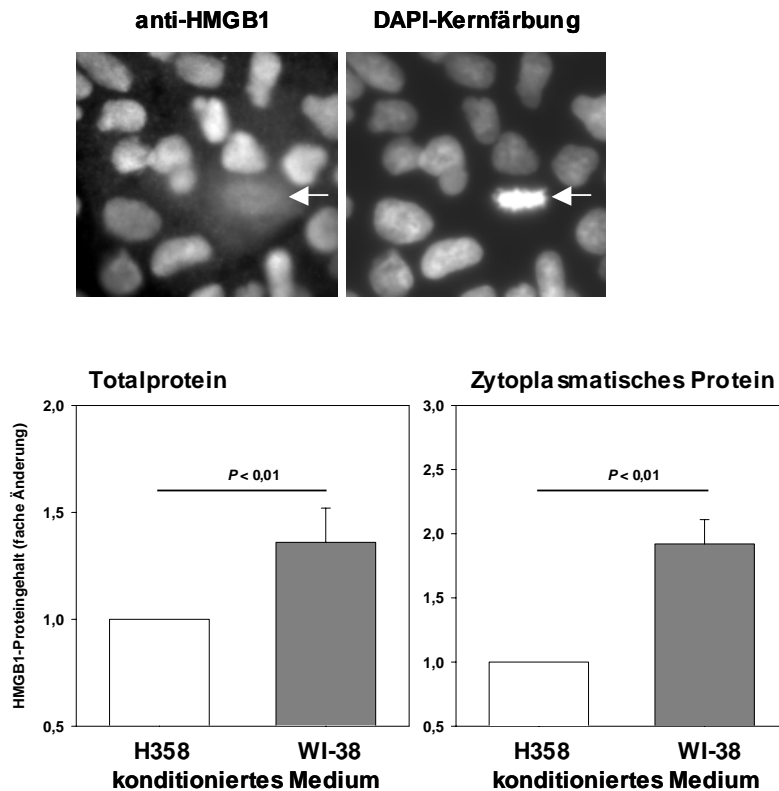


Abb. 10 Immunfluoreszenzfärbungen (oben) zeigen die überwiegende Kernlokalisation von HMGB1 in der Bronchialkarzinomzelllinie H358. Die kondensierte genomische DNA der mitotischen Zelle (Pfeil) ist nach DAPI-Färbung sichtbar. Immunoblot-Analysen (unten) bestimmten nach 24 h Kultivierung im konditionierten Medium von H358-Zellen oder WI-38-Fibroblasten den Totalproteingehalt und zytoplasmatischen Proteingehalt von HMGB1 in den H358-Zellen. Aus Bartling *et al.*, 2007 (8.5.).

Da demnach HMGB1 ein wichtiger Faktor für die Tumorentwicklung zu sein scheint, haben wir den Effekt der Fibroblasten auf die Expression und Lokalisation von HMGB1 in Bronchialkarzinomzellen untersucht (Bartling *et al.*, 2007 (8.5.)). Analog der vorherigen experimentellen Ansätze wurde die Lungenepithelzelllinie H358 analysiert, die im konditionierten Medium von WI-38-Fibroblasten im Vergleich zum konditionierten Kontrollmedium von H358-Zellen kultiviert worden ist. Nachfolgende Expressionsanalysen haben gezeigt, dass die Gegenwart löslicher Faktoren von Fibroblasten zu einem Anstieg der mRNA- und Proteinexpression von HMGB1 führt (Abb. 10). Da ein erhöhter HMGB1-Gehalt in somatische Zellen gegenüber verschiedenen zytotoxischen Stimuli protektiv wirkt

(Brezniceanu *et al.*, 2003; Nagatani *et al.*, 2001; Volp *et al.*, 2006), könnten die Fibroblasten über HMGB1-Induktion in den Tumorzellen einen Beitrag zur Therapieresistenz von Tumoren leisten. Ein kritischer Signalweg bei der HMGB1-vermittelten Zellresistenz ist die NFκB-Aktivierung und Stimulation des NFκB-regulierten Genproduktes c-IAP (*Inhibitor of Apoptosis*) 2, ein wirkungsvoller Inhibitor der proapoptotischen Caspasen -9 und -3 (Volp *et al.*, 2006). Zudem ist HMGB1 als ein direktes Targetgen von c-Myc an der Myc-vermittelten neoplastischen Transformation und Proliferation von Zellen beteiligt (Wood *et al.*, 2000a; Wood *et al.*, 2000b; Yoon *et al.*, 2004). Auch wenn die Fibroblasten die HMGB1-Expression in den H358-Tumorzellen nicht außerordentlich stark induziert hatten (Abb. 10), dürften sie zumindest zur Stabilisierung des HMGB1-Gehaltes in den Tumorzellen beitragen. In diesem Zusammenhang muss auch beachtet werden, dass der basale Expressionsgehalt von HMGB1 in transformierten Zellen bereits relativ hoch ist, aber in Tumovorläuferzellen geringer und somit leichter induzierbar sein könnte.

Die primäre HMGB1-Detektion im Zellkern von Lungenepithelzelllinien unterstreicht die Hauptfunktion von HMGB1 als Chromatinkomponente. Dennoch war HMGB1 auch zu einem gewissen Anteil im Zytoplasma dieser Zellen lokalisiert, und insbesondere während der mitotischen Zellteilung (Abb. 10). Da DNA-gebundenes HMGB1 während der Mitose von den Chromosomen dissoziiert und dann als freie Form vorliegt (Falciola *et al.*, 1997; Pallier *et al.*, 2003), findet man zytoplasmatisches HMGB1 auch während der DNA-Replikation in Geweben (Mosevitsky *et al.*, 1989). Die nukleo-zytoplasmatische Verteilung von HMGB1 wird durch zwei *Nuclear Import*- und zwei potentielle *Nuclear Export*-Signalsequenzen (Bonaldi *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 1989) sowie durch posttranslationale Phosphorylierung (Youn & Shin, 2006) reguliert. HMGB1 kann dabei durch verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert werden, zu denen die Ca²⁺-Phospholipid-abhängige Proteinkinase (Ramachandran *et al.*, 1984), die PKC-Varianten α, β und γ sowie die Kreatinkinase I (Sakamoto *et al.*, 2001) gehören. Ebenso verursachten lösliche Faktoren der Fibroblasten in den H358-Bronchialkarzinomzellen einen stärkeren Anstieg des zytoplasmatischen Anteils von HMGB1 im Vergleich zur Erhöhung des Totalproteingehaltes (Abb. 10).

Obwohl die Gegenwart von Fibroblasten bzw. deren löslichen Faktoren Phosphorylierungen von Proteinen, wie beispielsweise der Proteinkinasen Akt und p42/p44, in den H358-Zellen induzierte (Bartling *et al.*, 2006 (8.4.)), gibt es derzeit keine konkreten Daten zur Rolle von HMGB1-spezifischen Proteinkinasen in ähnlichen experimentellen Ansätzen. Darüber hinaus ist auch unklar, ob HMGB1 im Zytoplasma eine aktive biologische Funktion ausübt. In diesem Zusammenhang wäre die Interaktion von HMGB1 mit dem

zytoplasmatischen sRAGE 2/esRAGE in den Zellen möglich (Kobayashi *et al.*, 2007). Bisher geht man davon aus, dass HMGB1 aus dem Zellkern freigesetzt wird, weil es dort vorübergehend nicht gebraucht wird oder für die Sekretion aus der Zelle vorbestimmt ist (Bustin & Neihart, 1979; Isackson *et al.*, 1980; Mosevitsky *et al.*, 1989; Youn & Shin, 2006). HMGB1 wird auch durch Azetylierung im Zytoplasma gehalten, wo es in sekretorischen Lysosomen akkumuliert und über Exozytose freigesetzt wird (Bonaldi *et al.*, 2003). Diese Art der Freisetzung ist für Immunzellen charakteristisch, wohingegen andere Zelltypen HMGB1 über bisher noch unbekannte Wege freisetzen (Charoonpatrapong *et al.*, 2006; Fages *et al.*, 2000; Rauvala & Pihlaskari, 1987; Rouhiainen *et al.*, 2000; Sparatore *et al.*, 2001). Das extrazelluläre HMGB1 vermittelt seine biologische Funktion durch Bindung an verschiedene Interaktionspartner auf der Zelloberfläche, zu denen Plasminogen (Parkkinen & Rauvala, 1991), Syndecan-1 (Salmivirta *et al.*, 1992) und Rezeptoren wie RAGE (Abb. 5) gehören. Da wir aber unter Standardkulturbedingungen weder eine aktive Freisetzung von HMGB1 durch die H358-Bronchialkarzinomzellen noch durch die WI-38-Fibroblasten feststellen konnten (Bartling *et al.*, 2007 (8.5.)), dürfte die intrazelluläre Funktion von HMGB1 in unserem experimentellen Tumormodell überwiegen.

Replikativ gealterte (seneszente) Fibroblasten

Unsere bisherigen Studien zur epithelial-mesenchymalen Interaktion bei der Tumorigenese haben sich vor allem auf Fibroblasten konzentriert, die gute Proliferationseigenschaften *in vitro* aufwiesen und, abgesehen von der Kokultur mit den Tumorzellen, keinen distinkten pathologischen Stimuli ausgesetzt waren. Obwohl Fibroblasten abhängig von Lokalisation und Status sehr unterschiedlich sein können, vermitteln normale Fibroblasten aber keine protumorigenen Effekte im Gewebe. So unterliegen die Fibroblasten erst in der Umgebung von Tumoren multiplen Phänotypveränderungen, die mit dem Krankheitsbild assoziiert sind, und auch bei der Initiation und Promotion von malignen Veränderungen geht man von phänotypisch veränderten Fibroblasten aus (vgl. Kapitel 1.2.).

Die Entstehung von Tumorerkrankungen, und insbesondere von Karzinomen, ist eng mit dem zunehmenden Alter verbunden (Abb. 1). Dies dürfte mit der Immunseneszenz, den altersbedingten Veränderungen in den Epithelzellen selbst (z.B. Telomerdysfunktionen, Anhäufung von Mutationen, epigenetische Regulationen) sowie dem umgebenden Stroma verbunden sein (Campisi, 2003; DePinho, 2000; Schwartsburd, 2004). So treten im Stroma von alten Organismen häufiger seneszente Fibroblasten auf, die man aber auch in pathologisch veränderten Geweben finden kann (Erusalimsky & Kurz, 2005). Auch der

Zigarettenrauch induziert die frühzeitige Alterung von Alveolarzellen *in vivo* (Tsuji *et al.*, 2004). Obwohl es zwischen der *in vivo* Zellalterung und der *in vitro* Alterung von Zellen, die in der Regel durch Zellverdopplung (Replikation) induziert wird, einige Unterschiede gibt (Campisi, 2001), konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von prämaligen Epithelzellen mit den replikativ seneszenten aber nicht präseneszenten Fibroblasten das Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen auslöst (Krtolica *et al.*, 2001).

Replikative Seneszenz vermindert die Proliferationsfähigkeit von normalen somatischen Zellen, die letztlich mit dem irreversiblen Wachstumsstopp und, im Gegensatz zu den post-mitotischen Zellen, mit multiplen Veränderungen der Zellfunktion einhergeht. Dazu zählen die verstärkte Ausbildung von sekretorischen Vesikeln und veränderte Freisetzung einer Vielzahl von löslichen Faktoren, zu denen einige MMPs, proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren gehören (Krtolica & Campisi, 2002). Aus diesem Grund können wenige alte Zellen die lokale Gewebemöostase verändern. In der Zellkultur werden seneszente Fibroblasten in der Regel durch den Verlust der Zellproliferation sowie die induzierte Aktivität der sauren β -Galaktosidase bestimmt (Dimri *et al.*, 1995). Es wird davon ausgegangen, dass insbesondere die Produktion und Freisetzung von Matrix-modulierenden Proteinasen durch die seneszenten Fibroblasten ein protumorigenes Milieu schafft, welches den prämaligen Zellen zum Tumorwachstum verhilft (Campisi, 2003; Krtolica & Campisi, 2002). Darüber hinaus dürfte es aber auch andere Faktoren geben, welche die Tumorigenese unterstützen. In diesem Zusammenhang haben wir zeigen können, dass lösliche Faktoren von seneszenten Fibroblasten die Lungenepithelzellen in eine moderate Stresssituation versetzen (Bartling *et al.*, 2006 (8.6.)). So führte die Kultivierung von Tumorepithelzellen der Lunge (H358) in konditionierten Medien von replikativ seneszenten Lungenfibroblasten (WI-38) zu einem erhöhten oxidativen Stress in den H358-Zellen im Vergleich zu den konditionierten Medien von präseneszenten Fibroblasten (Tab. 4). Als Indikator für den oxidativen Stress in der Zelle wurde 2,7-Dichlordihydrofluorescein-diazetat (H_2DCF -DA) eingesetzt, das nach Hydrolyse der Azetatgruppe (-DA) durch intrazelluläre Esterasen und Bildung von Dichlordihydrofluorescein (H_2DCF) zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert werden kann (Hempel *et al.*, 1999). Die H_2DCF -Oxidation wird direkt durch Sauerstoffradikale, aber indirekt auch durch andere Faktoren ausgelöst (z.B. Verlust an Antioxidanzien) (Jakubowski & Bartosz, 2000). Daher könnten neben einer gesteigerten Radikalproduktion weitere Veränderungen zum oxidativen Stress in den H358-Zellen geführt haben. Obwohl seneszente Fibroblasten bzw. deren lösliche Faktoren einen moderaten oxidativen Stress in

den H358-Zellen induzierten, hatte dies keinen Einfluss auf die Fibroblasten-induzierte Proliferation der Zellen. Dies konnte neben den Kultivierungsversuchen mit den konditionierten Medien auch für die indirekten und direkten Kokulturmodelle herausgearbeitet werden (Tab. 4). Analog dieser Beobachtung war auch die Aktivierung von Proteinkinasen nicht beeinträchtigt, die im Zusammenhang mit der mitogenen Zellantwort stehen (Schaeffer & Weber, 1999; Thomas, 2002; Vanhaesebroeck & Alessi, 2000). Dazu zählten die p42/p44-MAPKs, die Proteinkinase Akt aber auch die p70S6 (*70-kDa ribosomal protein S6*)-Kinase (Tab. 4).

Tabelle 4) Einfluss von replikativ präseneszenten und seneszenten WI-38-Lungenfibroblasten auf die Bronchialkarzinomzelllinie H358. Zusammenfassung der Ergebnisse aus Bartling *et al.*, 2006 (8.4.), Bartling *et al.*, 2007 (8.5.) und Bartling *et al.*, 2006 (8.6.).

H358-Parameter		präseneszente WI-38-Fibroblasten	seneszente WI-38-Fibroblasten
Zellproliferation/-wachstum	Zellzahl ^{a, b, c}	↑	↑
	Zellen in der S- bzw. G2-Zellzyklusphase ^{a, b, c}	↑	↑
	Sphäroidwachstum ^a	↑	↑
	Anzahl der Zellkolonien im Softagarassay ^b	↑	↑
	Aktivität der p42/p44-MAPKs ^{b, c}	↑	↑
	Aktivität der Akt-Kinase ^{b, c}	↑	↑
	Aktivität der p70S6-Kinase ^c	↑	↑↑
	Proteinexpression von HMGB1 ^c	↑	n.b.
Zelltod/-stress	basaler Zelltod ^{a, c}	↓	↓
	basale Mitochondriendysfunktion ^{a, c}	↓	↔
	Aktivität von Bad ^c	↓	↓
	Aktivität der Caspasen-3/7 ^c	↔	↑
	Aktivität der Caspase-9 ^c	↔	↔
	Proteinexpression von XIAP ^c	↔	↓
	oxidativer Stress ^c	↔	↑
	Aktivität der SAPK/JNK ^c	—	—
	Proteinexpression der SOD1 ^c	↓	↑
Proteinexpression der SOD2 ^c	↔	↔	

Veränderungen einzelner Parameter im Vergleich zur internen Kontrollkultivierung ohne WI-38-Fibroblasten: erhöht (↑), stark erhöht (↑↑), verringert (↓), keine Änderung (↔), kein detektierbares Signal (—), nicht bestimmt (n.b.). Differenzen zwischen den Kultivierungen mit präseneszenten und seneszenten WI-38-Fibroblasten sind zusätzlich rot markiert. ^adirekte Kokultur mit WI-38, ^bindirekte Kokultur mit WI-38, ^ckonditioniertes Medium von WI-38 (Erläuterungen, siehe Abkürzungsverzeichnis).

Unter den altersrelevanten Faktoren (Krtolica & Campisi, 2002) wäre das proinflammatorische Interleukin (IL)-1 α ein potentieller Kandidat, der die Sauerstoffradikalbildung induziert (Bohler *et al.*, 2000). Obwohl Sauerstoffradikale oft in Verbindung mit dem oxidativen Stress gebracht werden, sind transient erhöhte Sauerstoffradikalgehalte aber auch bedeutende Faktoren bei der Zellproliferation sowie bei der Aktivierung einer Vielzahl von Signalmolekülen und intrazellulären Signalwegen (Esposito *et al.*, 2004). So aktivieren Sauerstoffradikale die Proteinkinasen Akt und p42/p44 durch indirekte Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen, zu denen auch der EGF (*Epidermal Growth Factor*)-Rezeptor (Gamou & Shimizu, 1995) zählt. Die Radikal-vermittelte Inhibierung der Proteintyrosinphosphatase, die die Wachstumsfaktorrezeptoren autokatalytisch deaktivieren würde, gilt als Ursache für die stabile Rezeptoraktivität (Barret *et al.*, 1999).

Auch in den H358-Zellen konnte die verstärkte Aktivierung von EGF-Rezeptor und p42/p44-MAPKs nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid oder mit den konditionierten Medien von seneszenten im Vergleich zu präseneszenten Fibroblasten beobachtet werden (Bartling *et al.*, 2006 (8.6.)). Aus diesem Grund könnte also die milde Stressinduktion durch seneszente Fibroblasten ein mitogener Stimulus sein, der zusätzlich auf die benachbarten Zellen einwirkt. Dennoch bleibt ein moderat erhöhter Sauerstoffradikalgehalt in der Zelle auch ein potentieller Indikator für zellulären Stress. Obwohl wir zwar keinen Einfluss der seneszenten Fibroblasten auf den spontanen Zelltod oder die Stimulation der Stress-aktivierten Proteinkinase (SAPK/JNK) in H358-Zellen beobachtet hatten, war die Aktivität der proapoptotischen Effektorcaspasen-3/7 dennoch verstärkt (Tab. 4).

In Gegenwart von normalen präseneszenten WI-38-Fibroblasten trat in der Regel eine Herabregulation der Cu²⁺/Zn²⁺-Superoxiddismutase (SOD1) in den H358-Tumorzellen auf (Bartling *et al.*, 2006 (8.6.)). Während die Mn⁴⁺-Superoxiddismutase (SOD2) unbeeinflusst blieb, konnte die SOD1-Herabregulation nicht beobachtet werden, wenn H358-Zellen in den konditionierten Medien von seneszenten Fibroblasten kultiviert worden sind (Tab. 4). Dies weist auf eine teilweise Aktivierung von antioxidativen Abwehrmechanismen in der Zelle hin (Zelko *et al.*, 2002). Diese Beobachtung wäre eine potentielle Erklärung für die Etablierung eines protumorigenen Mikromilieus durch die seneszenten Fibroblasten, da kontinuierlich hohe SOD1-Gehalte zur Langzeitstabilisierung benachbarter Epithelzellen und zum Zellschutz gegenüber zusätzlichen Stresssituationen (d.h. Präkonditionierung) beitragen dürften. In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass eine moderat erhöhte Aktivität der Caspase-3 nicht nur mit der Zelltodinduktion, sondern auch mit Zelltod-unabhängigen Mechanismen und der Zellproliferation verbunden ist (Kennedy *et*

al., 1999). Darüber hinaus könnten weitere Zellschutzmechanismen induziert sein, wie beispielsweise einige Hitzeschockproteine, die in unserer Studie jedoch nicht analysiert worden sind.

Unsere experimentelle Studie unterstreicht, dass lösliche Faktoren von seneszenten Fibroblasten die Zellhomöostase in benachbarten Epithelzellen verändern, da sie einen moderaten oxidativen Stress und oxidative Abwehrmechanismen induzieren. Da aber die mitogene Stimulation der Epithelzellen nicht beeinträchtigt war, könnte im alternden Organismus die Gegenwart von seneszenten Fibroblasten in der unmittelbaren Umgebung von potentiellen Tumorzellen dazu beitragen, den fragilen Zustand dieser Zellen zu stabilisieren und zusammen mit anderen Seneszenzfaktoren (z.B. Immunseneszenz) die Tumorpromotion zu begünstigen.

6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die differentielle Expression ausgewählter Gene im Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) herauszuarbeiten, die eine tumorbiologische und insbesondere diagnostische Bedeutung haben. Unter den bereits bekannten differentiell exprimierten Genen im NSCLC sollte der Zelloberflächenrezeptor RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) genauer analysiert werden, um seine Bedeutung bei der Entwicklung des NSCLC zu charakterisieren. Da die epithelialen Krebserkrankungen aber nicht nur von genetischen Veränderungen in den Epithelzellen abhängen, sondern auch durch das umgebende Gewebemilieu geprägt werden, fokussierte die Arbeit ferner auf dem Einfluss von Fibroblasten auf die Bronchialkarzinomzellen.

Klinisch-deskriptive Studien

Die gleichzeitige Expressionsanalyse distinkter Gene mit der Oligonukleotid-Mikroarray-Technologie könnte die Tumordiagnostik zukünftig unterstützen, insofern die Gesamtheit dieser Gene signifikant Aussagen zum Vorliegen eines malignen Gewebes sowie zur Identifizierung des histopathologischen Subtyps und Tumorstadiums trifft. Die Arbeit konnte zeigen, dass die Expressionsbestimmung zweier Mitglieder der S100-Familie, S100A2 und S100P, diagnostische Relevanz hat. Die erhöhte Expression von S100A2 im NSCLC war ein Indikator für das Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms im frühen Tumorstadium, wohingegen die erhöhte Expression von S100P auf ein frühes Adenokarzinom hinwies. Aus diesem Grund wäre die simultane Analyse von S100A2 und S100P auf

potentiell diagnostischen Oligonukleotid-Mikroarrays sinnvoll. Da aber beide *s100*-Gene in den späteren Tumorstadien und im NSCLC von Patienten mit einer neoadjuvanten Chemotherapie nicht mehr höher exprimiert waren, konnten sie keine Aussage über ein generelles Auftreten eines NSCLC treffen. In der Tumordiagnostik könnten neben den Oligonukleotid-Mikroarrays auch andere Arraytechnologien ihren Einsatz finden, wie beispielsweise die Antikörper-Mikroarrays. Obwohl die Antikörper-Array-Technik die gesteigert Proteinexpression der Histondeazetylase (HDAC) 3 im Plattenepithelkarzinom als Tumormarker identifizieren konnte, wies diese Technologie hinsichtlich der Quantität und Spezifität der zu analysierenden Antigene noch zu viele Defizite auf, die ihren diagnostischen Einsatz gegenwärtig in Frage stellen.

Experimentelle Studien

Auch der Zelloberflächenrezeptor RAGE erwies sich als ein geeigneter Marker für die Erkennung neoplastischer Veränderungen in der Lunge, da die Expression von RAGE im NSCLC stark herabreguliert ist. Die Herabregulation von RAGE hing nicht von den beiden histopathologischen Subtypen des NSCLC, Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom, ab. Nachfolgende experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass der geringe RAGE-Gehalt in den Lungenepithelzellen zur Tumorigenese beitragen könnte durch 1) eine verminderte epitheliale Zellorganisation zugunsten der tumorigenen Zellanordnung und 2) ein verbessertes Tumorstadium insbesondere durch die höhere Sensitivität der Tumorzellen gegenüber dem wachstumsfördernden Einfluss benachbarter Fibroblasten. Dieser wachstumsfördernde Effekt von Fibroblasten war mit einer Vielzahl von molekularen Veränderungen in den Bronchialkarzinomzellen verbunden. So konnten neben der Stimulation von Proteinkinasen (p42/44, Akt, p70S6) auch die moderate Heraufregulation von HMGB (*High Mobility Group Box*)-Protein 1 in der Zelle beobachtet werden, dessen Expression eng mit der Tumorigenese verbunden ist. Fibroblasten unterstützten aber nicht nur die Proliferation von Tumorzellen, sondern sie verminderten auch deren basalen Zelluntergang *in vitro*. Auch replikativ gealterte Fibroblasten hatten das Potential, Tumorzellen proliferativ zu stimulieren, nicht verloren. Dennoch veränderten lösliche Faktoren von seneszenten Fibroblasten die Zellhomöostase, da sie einen geringfügigen oxidativen Stress sowie antioxidative Mechanismen (Expression der Superoxiddismutase (SOD) 1) in den Lungenepithelzellen induzierten. Somit könnte in Gegenwart von seneszenten Fibroblasten die chronische Induktion zellprotektiver Mechanismen wie der SOD1 nützlich sein, den

fragilen Zustand initialer Tumorepithelzellen zu stabilisieren und somit die Tumorpromotion zu begünstigen.

Wie in Abbildung 11 zusammenfassend dargestellt hat diese Arbeit unterstrichen, dass die Tumorigenese des NSCLC mit einer Vielzahl von molekulargenetischen Veränderungen in den Lungenepithelzellen verbunden ist und darüber hinaus durch die Interaktion mit mesenchymalen Fibroblasten beeinflusst wird.



Abb. 11) Schematische Darstellung der Ergebnisse der Habilitationsarbeit. Differentielle Genexpressionen im NSCLC im Vergleich zum normalen Lungengewebe und zusätzliche Beeinflussung der Bronchialkarzinomzellen durch angrenzende Fibroblasten.

7. Literaturverzeichnis

Referenzen

- Adami, C., Bianchi, R., Pula, G. & Donato, R. S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim Biophys Acta* 1742 (2004) 169-177.
- Arumugam, T., Simeone, D., Schmidt, A. & Logsdon, C. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* 279 (2004) 5059-5065.
- Arumugam, T., Simeone, D.M., Van Golen, K. & Logsdon, C.D. S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 5356-5364.
- Barcellos-Hoff, M.H. & Ravani, S.A. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res* 60 (2000) 1254-1260.
- Barret, W., DeGnore, J., Keng, Y., Zhang, Z., Yim, M. & Cock, P. Role of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 274 (1999) 34543-34546.
- Bartling, B., Hofmann, H., Silber, R. & Simm, A. Differential impact of fibroblasts on the efficient cell death of lung cancer cells induced by paclitaxel and cisplatin. *Cancer Biol Ther* (2008) in press.
- Battifora, H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 55 (1986) 244-248.
- Beacham, D.A. & Cukierman, E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol* 15 (2005) 329-341.
- Beasley, M.B., Brambilla, E. & Travis, W.D. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 40 (2005) 90-97.
- Beer, D.G., Kardia, S.L., Huang, C.C., Giordano, T.J., Levin, A.M., et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 8 (2002) 816-824.
- Belinsky, S., Klinge, D., Stidley, C., Issa, J., Herman, J., et al. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res* 63 (2003) 7089-7093.

- Birchmeier, W. & Behrens, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem Biophys Acta* 1198 (1994) 11-26.
- Bishop, J. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64 (1991) 235-248.
- Bissell, M.J. & Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1 (2001) 46-54.
- Boffetta, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res* 608 (2006) 157-162.
- Bohler, T., Waiser, J., Hepburn, H., Gaedeke, J., Lehmann, C., *et al.* TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine* 12 (2000) 986-991.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., *et al.* Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *Embo J* 22 (2003) 5551-5560.
- Boudreau, N., Reddy, S.T., Stoker, A.W., Fairman, C. & Bissell, M.J. The embryonic environment and extracellular matrix suppress oncogenic transformation by Rous sarcoma virus in chick embryos. *Mol Cell Diff* 3 (1996) 261-274.
- Brambilla, E., Travis, W.D., Colby, T.V., Corrin, B. & Shimosato, Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18 (2001) 1059-1068.
- Brett, J., Schmidt, A.M., Yan, S., Zou, Y., Weidman, E., *et al.* Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 143 (1993) 1699-1712.
- Brezniceanu, M.L., Volp, K., Bosser, S., Solbach, C., Lichter, P., *et al.* HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *Faseb J* 17 (2003) 1295-1297.
- Brownlee, M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Ann Rev Med* 46 (1995) 223-234.
- Bryant, P. & Huwe, A. LAP proteins: what's up with epithelia? *Nat Cell Biol* 2 (2000) E141-E143.
- Buccheri, G. & Fierrigno, D. Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview. *Lung Cancer* 34 (2001) S65-S69.
- Bucciarelli, L.G., Wendt, T., Rong, L., Lalla, E., Hofmann, M.A., *et al.* RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol Life Sci* 59 (2002) 1117-1128.
- Bustin, M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 5237-5246.
- Bustin, M. & Neihart, N.K. Antibodies against chromosomal HMG proteins stain the cytoplasm of mammalian cells. *Cell* 16 (1979) 181-189.
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., *et al.* The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* 22 (1999) 276-280.
- Campisi, J. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp Gerontol* 36 (2001) 607-618.
- Campisi, J. Cancer and ageing: Rival demons? *Nature Reviews Cancer* 3 (2003) 339-349.
- Cavallaro, U. & Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and IG-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer* 4 (2004) 118-132.
- Cekanova, M., Masi, T., Plummer, H.K., Majidi, M., Fedorocko, P. & Schuller, H.M. Pulmonary fibroblasts stimulate the proliferation of cell lines from human lung adenocarcinomas. *Anticancer Drugs* 17 (2006) 771-781.
- Cersosimo, R.J. Lung cancer: a review. *Am J Health Syst Pharm* 59 (2002) 611-642.
- Charoonpatrapong, K., Shah, R., Robling, A.G., Alvarez, M., Clapp, D.W., *et al.* HMGB1 expression and release by bone cells. *J Cell Physiol* 207 (2006) 480-490.
- Chavakis, T., Bierhaus, A., Al-Fakhri, N., Schneider, D., Witte, S., *et al.* The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 198 (2003) 1507-1515.
- Cheng, C., Tsuneyama, K., Kominami, R., Shinohara, H., Sakurai, S., *et al.* Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mol Pathol* 18 (2005) 1385-1396.
- Choi, J.H., Kwon, H.J., Yoon, B.I., Kim, J.H., Han, S.U., *et al.* Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res* 92 (2001) 1300-1304.
- Crapo, J., Barry, B., Gehr, P., Bachofen, M. & Weibel, E. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Resp Dis* 126 (1982) 332-337.
- Cross, S.S., Hamdy, F.C., Deloulme, J.C. & Rehman, I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* 46 (2005) 256-269.
- Czura, C., Wang, H. & Tracey, K. Dual roles of HMGB1: DNA binding and cytokines. *J Endotoxin Res* 7 (2001) 16625-16635.

- Danto, S., Shannon, J., Borok, Z., Zabski, S. & Crandall, E. Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12 (1995) 497-502.
- Darnell Jr, J. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002) 740-749.
- Degryse, B., Bonaldi, T., Scaffidi, P., Muller, S., Resnati, M., *et al.* The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 152 (2001) 1197-1206.
- Demling, N., Ehrhardt, C., Kasper, M., Laue, M., Knels, L. & Rieber, E.P. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell and Tissue Research* accepted (2005).
- DePinho, R.A. The age of cancer. *Nature* 408 (2000) 248-254.
- DeRisi, J., Iyer, V. & Brown, P. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278 (1997).
- Deutsche Krebsgesellschaft. (2002) Qualitätssicherung in der Onkologie. Diagnose und Therapie maligner Erkrankungen. Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien. In Hermanek, P.H. (ed.), Informationszentrum für klinische Studien (ISTO). Zuckerschwerdt Verlag, München - Bern - Wien - New York, pp. 107-141.
- Diederichs, S., Bulk, E., Steffen, B., Ji, P., Tickenbrock, L., *et al.* S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 64 (2004) 5564-5569.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 9363-9367.
- Ding, Q. & Keller, J.N. Splice variants of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) in human brain. *Neurosci Lett* 373 (2005) 67-72.
- Donato, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33 (2001) 637-668.
- Donato, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 60 (2003) 540-551.
- Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315 (1986) 1650-1659.
- Dyer, D.G., Blackledge, J.A., Katz, B.M., Hull, C.J., Adkisson, H.D., *et al.* The Maillard reaction in vivo. *Z Ernährungswiss* 30 (1991) 29-45.
- Dyer, D.G., Dunn, J.A., Thorpe, S.R., Bailie, K.E., Lyons, T.J., *et al.* Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 91 (1993) 2463-2469.
- Eberhardt, W., Gauler, T., Pottgen, C., Krbek, T., Korfee, S., *et al.* Multimodality treatment of stage IIIA and IIIB non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2 (2007) S35-36.
- Eccles, S. (2002) Models for epithelial carcinomas. In Malcolm, R. (ed.), *Cancer Handbook*. Nature Publishing Group, London, New York, Tokyo, pp. 1081-1100.
- Emberley, E.D., Murphy, L.C. & Watson, P.H. S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer. *Biochem Cell Biol* 82 (2004) 508-515.
- Erusalimsky, J.D. & Kurz, D.J. Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol* 40 (2005) 634-642.
- Esposito, F., Ammendola, R., Faraonio, R., Russo, T. & Cimino, F. Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. *Neurochem Res* 29 (2004) 617-628.
- Fages, C., Nolo, R., Huttunen, H.J., Eskelinen, E. & Rauvala, H. Regulation of cell migration by amphoterin. *J Cell Sci* 113 (2000) 611-620.
- Falciola, L., Spada, F., Calogero, S., Langst, G., Voit, R., *et al.* High mobility group 1 protein is not stably associated with the chromosomes of somatic cells. *J Cell Biol* 137 (1997) 19-26.
- Fehrenbach, H., Kasper, M., Tsherinig, T., Shearman, M., Schuh, D. & Mueller, M. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cell Mol Biol* 44 (1998) 1147-1157.
- Feng, G., Xu, X., Youssef, E. & Lotan, R. Diminished expression of S100A2, a putative tumor suppressor, at early stage of human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 61 (2001) 7999-8004.
- Fiuza, C., Bustin, M., Talwar, S., Tropea, M., Gerstenberger, E., *et al.* Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 101 (2003) 2652-2660.
- Forbes, B. Pulmonary epithelial cell culture. *Methods Mol Biol* 188 (2002) 65-75.
- Fromig, O., Louis, K., Dayem, M., Milanini, J., Pages, G., *et al.* Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. *Oncogene* 22 (2003) 8487-8497.
- Fuentes, M.K., Nigavekar, S.S., Arumugam, T., Logsdon, C.D., Schmidt, A.M., *et al.* RAGE activation by S100P in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways. *Dis Colon Rectum* 50 (2007) 1230-1240.

- Galichet, A., Weibel, M. & Heizmann, C.W. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 370 (2008) 1-5.
- Gamou, S. & Shimizu, N. Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett* 357 (1995) 161-164.
- Gebhardt, C., Riehl, A., Durchdewald, M., Nemeth, J., Furstenberger, G., *et al.* RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J Exp Med* (2008).
- GEKID & RKI. (2006) *Krebs in Deutschland*. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert-Koch-Institut, Saarbrücken.
- Goodwin, G.H., Sanders, C. & Johns, E.W. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 38 (1973) 14-19.
- Gray, S.G. & Ekstrom, T.J. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 262 (2001) 75-83.
- Greenberg, S.D., Smith, M.N. & Spjut, H.J. Bronchiolo-alveolar carcinoma-cell of origin. *Am J Clin Pathol* 63 (1975) 153-167.
- Guerreiro Da Silva, I., Hu, Y., Russo, I., Ao, X., Salicioni, A., *et al.* S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells in vitro and early stages of breast cancer development in vivo. *Int J Oncol* 16 (2000) 231-241.
- Hahn, W. & Weinberg, R. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002) 331-341.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (2000) 57-70.
- Harris, A. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002) 38-47.
- He, M., Kubo, H., Ishizawa, K., Hegab, A., Yamamoto, Y., *et al.* The role of the receptor for advanced glycation end-products in lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293 (2007) L1427-L1436.
- Heizmann, C., Fritz, G. & Schäfer, B. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Frontiers Biosci* 7 (2002) 1356-1368.
- Hempel, S.L., Buettner, G.R., O'Malley, Y.Q., Wessels, D.A. & Flaherty, D.M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 27 (1999) 146-159.
- Henle, T. & Miyata, T. Advanced glycation end products in uremia. *Adv Ren Replace Ther* 10 (2003) 321-331.
- Herold, K., Moser, B., Chen, Y., Zeng, S., Yan, S.F., *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. *J Leukoc Biol* 82 (2007) 204-212.
- Hirohashi, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153 (1998) 333-339.
- Hiyama, K., Hiyama, E., Ishioka, S., Yamakido, M., Inai, K., *et al.* Telomerase activity in small-cell and non-small cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 87 (1995) 895-902.
- Hofmann, H.-S. & Bartling, B. How will lung cancer be treated in the future? *Future Oncol* 1 (2005) 551-559.
- Hofmann, H.-S., Hansen, G., Burdach, S., Bartling, B., Silber, R. & Simm, A. Classification of human lung neoplasm by two target genes. *Am J Respir Crit Care Med* 170 (2004) 516-519.
- Hofmann, H.S., Bartling, B., Simm, A., Murray, R., Aziz, N., *et al.* Identification and classification of differentially expressed genes in non-small cell lung cancer by expression profiling on a global human 59.620-element oligonucleotide array. *Oncol Rep* 16 (2006) 587-595.
- Hofmann, H.S., Hansen, G., Richter, G., Taege, C., Simm, A., *et al.* Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 1086-1092.
- Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., *et al.* RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97 (1999) 889-901.
- Hsieh, H., Schafer, B., Sasaki, N. & Heizmann, C. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. *Biochem Biophys Res Commun* 307 (2003) 375-381.
- Hudson, B.I., Carter, A.M., Harja, E., Kalea, A.Z., Arriero, M., *et al.* Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *Faseb J* (2007).
- Huttunen, H.J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A.J. & Rauvala, H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res* 62 (2002a) 4805-4811.
- Huttunen, H.J., Fages, C. & Rauvala, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 274 (1999) 19919-19924.
- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J. & Rauvala, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling induces CREB-dependent chromogranin expression during neuronal differentiation. *J Biol Chem* 277 (2002b) 38635-38646.

- Huttunen, H.J. & Rauvala, H. Amphoterin as an extracellular regulator of cell motility: from discovery to disease. *J Intern Med* 255 (2004) 351-366.
- Igney, F. & Krammer, P. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002) 277-288.
- Illmensee, K. Reversion of malignancy and normalized differentiation of teratocarcinoma cells in chimeric mice. *Basic Life Sci* 12 (1978) 3-25.
- Isackson, P.J., Bidney, D.L., Reeck, G.R., Neihart, N.K. & Bustin, M. High mobility group chromosomal proteins isolated from nuclei and cytosol of cultured hepatoma cells are similar. *Biochemistry* 19 (1980) 4466-4471.
- Ishiguro, H., Nakaigawa, N., Miyoshi, Y., Fujinami, K., Kubota, Y. & Uemura, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin, are overexpressed and associated with prostate cancer development. *Prostate* 64 (2005) 92-100.
- Ishikawa, S., Takenaka, K., Yanagihara, K., Miyahara, R., Kawano, Y., *et al.* Matrix metalloproteinase-2 status in stromal fibroblasts, not in tumor cells, is a significant prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 6579-6585.
- Jackson, A. & Loeb, L. The mutation rate of cancer. *Genetics* 148 (1998) 1483-1490.
- Jakubowski, W. & Bartosz, G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 24 (2000) 757-760.
- Janssen-Heijnen, M.L. & Coebergh, J.W. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer* 41 (2003) 245-258.
- Jobe, A. & Ikegami, M. Mechanisms indicating lung injury in the preterm. *Early Hum Dev* 53 (1998) 81-94.
- Kennedy, N.J., Kataoka, K., Tschopp, J. & Budd, R.C. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 190 (1999) 1891-1896.
- Kiaris, H., Chatzistamou, I., Kalofoutis, C., Koutselini, H., Piperi, C. & Kalofoutis, A. Tumour-stroma interactions in carcinogenesis: basic aspects and perspectives. *Mol Cell Biochem* 261 (2004) 117-122.
- Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121 (2005) 823-835.
- Kim, D.H., Kim, M. & Kwon, H.J. Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents. *J Biochem Mol Biol* 36 (2003) 110-119.
- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 280 (1998) 1036-1037.
- Kislinger, T., Fu, C., Huber, B., Qu, W., Taguchi, A., *et al.* N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 274 (1999) 31740-31749.
- Kobayashi, S., Kubo, H., Suzuki, T., Ishizawa, K., Yamada, M., *et al.* Endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 175 (2007) 184-189.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4 (1998) 844-847.
- Kouzarides, T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* 19 (2000) 1176-1179.
- Kreutzer, M., Jöckel, K., Wichmann, H. & Straif, K. Rauchen, Passivrauchen und Krebserkrankungen. Aktuelle Studien aus Deutschland und ihr Beitrag zur IARC-Monographie. *Onkologe* 11 (2006) 1094-1105.
- Krtolica, A. & Campisi, J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 34 (2002) 1401-1414.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockert, S., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 12072-12077.
- Kuehl, L., Salmond, B. & Tran, L. Concentrations of high-mobility-group proteins in the nucleus and cytoplasm of several rat tissues. *J Cell Biol* 99 (1984) 648-654.
- Kuniyasu, H., Chihara, Y. & Kondo, H. Differential effects between amphoterin and advanced glycation end products on colon cancer cells. *Int J Cancer* 104 (2003) 722-727.
- Kuniyasu, H., Oue, N., Wakikawa, A., Shigeishi, H., Matsutani, N., *et al.* Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J Pathol* 196 (2002) 163-170.
- Kunz-Schughart, L.A. & Knuechel, R. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 17 (2002a) 599-621.
- Kunz-Schughart, L.A. & Knuechel, R. Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue. *Histol Histopathol* 17 (2002b) 623-637.
- Kuo, M.H. & Allis, C.D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20 (1998) 615-626.

- Li, J., Qu, X. & Schmidt, A.M. Sp1-binding elements in the promoter of RAGE are essential for amphoterin-mediated gene expression in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 273 (1998) 30870-30878.
- Lipshutz, R., Fodor, S., Gingeras, T. & Lockhart, D. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21 (1999) 20-24.
- Lum, H.K. & Lee, K.L. The human HMGB1 promoter is modulated by a silencer and an enhancer-containing intron. *Biochim Biophys Acta* 1520 (2001) 79-84.
- Lv, L.L. & Liu, B.C. High-throughput antibody microarrays for quantitative proteomic analysis. *Exp Rev Proteomics* 4 (2007) 505-513.
- Malherbe, P., Richards, J.G., Gaillard, H., Thompson, A., Diener, C., *et al.* cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res* 71 (1999).
- Marenholz, I., Heizmann, C.W. & Fritz, G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology. *Biochem Biophys Res Commun* 322 (2004) 1111-1122.
- Mari, B.P., Anderson, I.C., Mari, S.E., Ning, Y., Lutz, Y., *et al.* Stromelysin-3 is induced in tumor/stroma cocultures and inactivated via a tumor-specific and basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 273 (1998) 618-626.
- Meyerson, M., Franklin, W.A. & Kelley, M.J. Molecular classification and molecular genetics of human lung cancers. *Semin Oncol* 31 (2004) 4-19.
- Micke, P. & Ostman, A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 45 Suppl 2 (2004) S163-175.
- Miki, S., Kasayama, S., Miki, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, M., *et al.* Expression of the receptor for advanced glycosylation end products on renal cell carcinoma cell *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 196 (1993) 984-989.
- Mosevitsky, M.I., Novitskaya, V.A., Iogannsen, M.G. & Zabezhinsky, M.A. Tissue specificity of nucleocytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions. *Eur J Biochem* 185 (1989) 303-310.
- Mountain, C.F. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 111 (1997) 1710-1717.
- Mueller, A., Schafer, B.W., Ferrari, S., Weibel, M., Makek, M., *et al.* The calcium binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *J Biol Chem* 280 (2005) 29186-29193.
- Mueller, M.M. & Fusenig, N.E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 839-849.
- Muller, S., Scaffidi, P., Degryse, B., Bonaldi, T., Ronfani, L., *et al.* New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *Embo J* 20 (2001) 4337-4340.
- Nagatani, G., Nomoto, M., Takano, H., Ise, T., Kato, K., *et al.* Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer Res* 61 (2001) 1592-1597.
- Nagy, N., Brenner, C., Markadieu, N., Chaboteaux, C., Camby, I., *et al.* S100A2, a putative tumor suppressor gene, regulates *in vitro* squamous cell carcinoma migration. *Lab Invest* 81 (2001) 599-612.
- Neeper, M., Schmidt, A., Brett, J., Yan, S., Wang, F., *et al.* Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267 (1992) 14998-15004.
- Nicholl, I. & Bucala, R. Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 7 (1998) 1025-1033.
- Nowell, P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 (1976) 23-28.
- Paget, S. The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet* 1 (1889) 571-573.
- Pallier, C., Scaffidi, P., Chopineau-Proust, S., Agresti, A., Nordmann, P., *et al.* Association of chromatin proteins high mobility group box (HMGB) 1 and HMGB2 with mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell* 14 (2003) 3414-3426.
- Park, C.C., Bissell, M.J. & Barcellos-Hoff, M.H. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 6 (2000) 324-329.
- Parkkinen, J. & Rauvala, H. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphoterin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphoterin. *J Biol Chem* 266 (1991) 16730-16735.
- Patra, S.K., Patra, A. & Dahiya, R. Histone deacetylase and DNA methyltransferase in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 287 (2001) 705-713.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C. & Fuchs, E. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization and neurologic diversity. *Cell* 112 (2003) 535-548.
- Pullerits, R., Brisslert, M., Jonsson, I.M. & Tarkowski, A. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via β 2 integrin Mac-1. *Arthritis Rheum* 54 (2006) 3898-3907.

- Ragoussis, J. & Elvidge, G. Affymetrix GeneChipR system: moving from research to the clinic. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 6 (2006) 145.
- Ramachandran, C., Yau, P., Bradbury, E.M., Shyamala, G., Yasuda, H. & Walsh, D.A. Phosphorylation of high-mobility-group proteins by the calcium-phospholipid-dependent protein kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 259 (1984) 13495-13503.
- Rauvala, H. & Pihlaskari, R. Isolation and some characteristics of an adhesive factor of brain that enhances neurite outgrowth in central neurons. *J Biol Chem* 262 (1987) 16625-16635.
- Rehbein, G., Simm, A., Hofmann, H., Silber, R. & Bartling, B. Molecular regulation of S100P in human lung adenocarcinomas. *Int J Mol Med* (2008) in press.
- Renehan, A.G., Zwahlen, M., Minder, C., O'Dwyer, S.T., Shalet, S.M. & Egger, M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 363 (2004) 1346-1353.
- Riuzzi, F., Sorci, G. & Donato, R. The amphoterin (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) pair modulates myoblast proliferation, apoptosis, adhesiveness, migration, and invasiveness. Functional inactivation of RAGE in L6 myoblasts results in tumor formation in vivo. *J Biol Chem* 281 (2006) 8242-8253.
- Rouhiainen, A., Imai, S., Rauvala, H. & Parkkinen, J. Occurrence of amphoterin (HMGB1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation. *Thromb Haemost* 84 (2000) 1087-1094.
- Rouhiainen, A., Kuja-Panula, J., Wilkman, E., Pakkanen, J., Stenfors, J., *et al.* Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). *Blood* 104 (2004) 1174-1182.
- Sakamoto, R., Okano, M., Takena, H. & Ohtsuki, K. Inhibitory effect of glycyrrhizin on the phosphorylation and DNA-binding abilities of high mobility group proteins 1 and 2 in vitro. *Biol Pharm Bull* 24 (2001) 906-911.
- Salmivirta, M., Rauvala, H., Elenius, K. & Jalkanen, M. Neurite growth-promoting protein (amphoterin, p30) binds syndecan. *Exp Cell Res* 200 (1992) 444-451.
- Sasahira, T., Akama, Y., Fujii, K. & Kuniyasu, H. Expression of the receptor for advanced glycation end products and amphoterin in colorectal adenomas. *Virchows Arch* 446 (2005) 411-415.
- Sasco, A.J., Secretan, M.B. & Straif, K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* 45 Suppl 2 (2004) S3-9.
- Sato, N., Fukushima, N., Matsubayashi, H. & Goggins, M. Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene* 23 (2004) 1531-1538.
- Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418 (2002) 191-195.
- Schaeffer, H.J. & Weber, M.J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 2435-2444.
- Schenk, S., Schraml, P., Bendik, I. & Ludwig, C.U. A novel polymorphism in the promoter of the RAGE gene is associated with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 32 (2001) 7-12.
- Schlueter, C., Hauke, S., Flohr, A., Rogalla, P. & Bullerdiek, J. Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta* 1630 (2003) 1-6.
- Schmidt, A.M., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., *et al.* Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 267 (1992) 14987-14997.
- Schmidt, A., Mora, R., Cao, R., *et al.* The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem* 269 (1994) 9882-9888.
- Schmidt, A.M., Yan, S.D., Yan, S.F. & Stern, D.M. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 108 (2001) 949-955.
- Schmitz, A., Govek, E.-E., Boettner, B. & Van Aelst, L. The GTPases: Signaling, Migration, and Invasion. *Exp Cell Res* 261 (2000) 1-12.
- Schraml, P., Bendik, I. & Ludwig, C.U. Differential messenger RNA expression and protein expression of the receptor for advanced glycosylated end products in normal lung and non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 57 (1997) 3669-3671.
- Schwartsburd, P.M. Age-promoted creation of a pro-cancer microenvironment by inflammation: pathogenesis of dyscoordinated feedback control. *Mech Ageing Dev* 125 (2004) 581-590.
- Schwartz, A.G., Prysak, G.M., Bock, C.H. & Cote, M.L. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* 28 (2007) 507-518.
- Seliger, H. Introduction: array technology - an overview. *Methods Mol Biol* 381 (2006) 1-36.
- Shirasawa, M., Fujiwara, N., Hirabayashi, S., Ohno, H., Iida, J., *et al.* Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes Cells* 9 (2004) 165-174.

- Siegfried, J. (1998) Growth factors and receptors in non-small cell lung cancer. In Kane, M. & Bunn, P. (eds.), *Biology of lung cancer*. Marcel Dekker, New York, pp. 317-336.
- Silzle, T., Randolph, G.J., Kreutz, M. & Kunz-Schughart, L.A. The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int J Cancer* 108 (2004) 173-180.
- Skrikrishna, G., Huttunen, H., Johansson, L., Weigle, B., Yamaguchi, Y., *et al.* N-glycans on the receptor for advanced glycation end products influences amphotericin binding and neurite outgrowth. *J Neurochem* 80 (2002) 998-1008.
- Song, S., Wientjes, M.G., Gan, Y. & Au, J.L. Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 8658-8663.
- Sparatore, B., Patrone, M., Passalacqua, M., Pedrazzi, M., Gaggero, D., *et al.* Extracellular processing of amphotericin generates a peptide active on erythroleukaemia cell differentiation. *Biochem J* 357 (2001) 569-574.
- Statistisches Bundesamt. (2007) Das Statistische Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland 2006. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Sternlicht, M.D., Lochter, A., Sympon, C.J., Huey, B., Rougier, J.P., *et al.* The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98 (1999) 137-146.
- Stopper, H., Schinzel, R., Sebekova, K. & Heidland, A. Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells. *Cancer Lett* 190 (2003) 151-156.
- Taguchi, A., Blood, D.C., del Toro, G., Canet, A., Lee, D.C., *et al.* Blockade of RAGE-amphotericin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405 (2000) 354-360.
- Takada, M., Koizumi, T., Toyama, H., Suzuki, Y. & Kuroda, Y. Differential expression of RAGE in human pancreatic carcinoma cells. *Hepatogastroenterology* 48 (2001) 1577-1578.
- Ten Have-Opbroek, A.A., Benfield, J.R., van Krieken, J.H. & Dijkman, J.H. The alveolar type II cell is a pluripotential stem cell in the genesis of human adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol* 12 (1997) 319-336.
- Thomas, G. The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth. *Biol Res* 35 (2002) 305-313.
- Toh, Y., Yamamoto, M., Endo, K., Ikeda, Y., Baba, H., *et al.* Histone H4 acetylation and histone deacetylase 1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 10 (2003) 333-338.
- Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., *et al.* Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159 (2001) 2249-2256.
- Travis, L.B., Brambilla, E., Müller-Hermelink, H. & Harris, C. (2004) *WHO classification of tumors. Pathology and genetics: Tumors of the lung, pleura, thymus and heart*. IARC Press, Lyon.
- Travis, W., Colby, T., Corrin, B., Y, S. & Brambilla, E. (1999) *Histological typing of lung and pleural tumours*. Springer, Berlin.
- Travis, W.D., Travis, L.B. & Devesa, S.S. Lung cancer. *Cancer* 75 (1995) 191-202.
- Tsuji, T., Aoshiba, K. & Nagai, A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31 (2004) 643-649.
- Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D.R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3 (2000) 561-576.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Serial analysis of gene expression. *Science* 270 (1995) 484-487.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006) 2257-2261.
- Volp, K., Brezniceanu, M.L., Bosser, S., Brabletz, T., Kirchner, T., *et al.* Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas. *Gut* 55 (2006) 234-242.
- Wang, G., Platt-Higgins, A., Carroll, J., de Silva Rudland, S., Winstanley, J., *et al.* Induction of metastasis by S100P in a rat mammary model and its association with poor survival of breast cancer patients. *Cancer Res* 66 (2006) 1199-1207.
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J., Ombrellino, M., *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285 (1999) 248-251.
- Wang, H., Yang, H. & Tracey, K.J. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 255 (2004) 320-331.
- Wang, H., Zhang, Z., Li, R., Ang, K.K., Zhang, H., *et al.* Overexpression of S100A2 protein as a prognostic marker for patients with stage I non small cell lung cancer. *Int J Cancer* 116 (2005) 285-290.
- Wautier, J.L., Zoukourian, C., Chappey, O., Wautier, M.P., Guillausseau, P.J., *et al.* Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 97 (1996) 238-243.
- Weir, B.A., Woo, M.S., Getz, G., Perner, S., Ding, L., *et al.* Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450 (2007) 893-898.

- Wen, L., Huang, J.K., Johnson, B.H. & Reeck, G.R. A human placental cDNA clone that encodes nonhistone chromosomal protein HMG-1. *Nucleic Acids Res* 17 (1989) 1197-1214.
- Wernert, N. The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* 430 (1997) 433-443.
- Whang-Peng, J., Knutsen, T., Gazdar, A., Steinberg, S.M., Oie, H., *et al.* Nonrandom structural and numerical chromosome changes in non-small-cell lung cancer. *Genes Chrom Cancer* 3 (1991) 168-188.
- Wichmann, H.E., Rosario, A.S., Heid, I.M., Kreuzer, M., Heinrich, J. & Kreienbrock, L. Increased lung cancer risk due to residential radon in a pooled and extended analysis of studies in Germany. *Health Phys* 88 (2005) 71-79.
- Wicki, R., Franz, C., Scholl, F.A., Heizmann, C.W. & Schafer, B.W. Repression of the candidate tumor suppressor gene S100A2 in breast cancer is mediated by site-specific hypermethylation. *Cell Calcium* 22 (1997) 243-254.
- Wiethage, T., Junker, K., Johnen, G., Krismann, M. & Muller, K.M. Pathology and molecular biology of lung cancer. *Pathologe* 21 (2000) 404-423.
- Wigle, D.A., Jurisica, I., Radulovich, N., Pintilie, M., Rossant, J., *et al.* Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival. *Cancer Res* 62 (2002) 3005-3008.
- Wingren, C. & Borrebaeck, C. Antibody microarrays: current status and key technological advances. *OMICS* 10 (2006) 411-427.
- Wood, L.J., Maher, J.F., Bunton, T.E. & Resar, L.M. The oncogenic properties of the HMG-I gene family. *Cancer Res* 60 (2000a) 4256-4261.
- Wood, L.J., Mukherjee, M., Dolde, C.E., Xu, Y., Maher, J.F., *et al.* HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene. *Mol Cell Biol* 20 (2000b) 5490-5502.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., *et al.* RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382 (1996) 685-691.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9 (2006) 189-198.
- Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Petrova, R., Abedin, M., *et al.* Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 370 (2003) 1097-1109.
- Yoon, S., Lee, J.Y., Yoon, B.K., Bae, D.S. & Choi, D.S. Effects of HMGB-1 overexpression on cell-cycle progression in MCF-7 cells. *J Korean Med Sci* 19 (2004) 321-326.
- Youn, J.H. & Shin, J.S. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 177 (2006) 7889-7897.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J. & Folz, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33 (2002) 337-349.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. & Anderson, T. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302 (2007) 1-12.
- Zhao, Z., Chou, D.K., Nair, S.M., Tobet, S. & Jungalwala, F.B. Expression of sulfoglucuronyl (HNK-1) carbohydrate and its binding protein (SBP-1) in developing rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 120 (2000) 165-180.
- Zhou, Z., Wang, K., Penn, M.S., Marso, S.P., Lauer, M.A., *et al.* Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation* 107 (2003) 2238-2243.

Verwendete Literatur zu allgemeinen Angaben

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular biology of the cell*. Taylor & Francis Ltd. New York.
- Driscoll, B. (2003) *Lung Cancer - Diagnostic and therapeutic methods and reviews*. Humana Press. Totowa, New Jersey.
- Driscoll, B. (2003) *Lung Cancer - Molecular pathology, methods and reviews*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Malcolm, R.A. (2007) *The cancer handbook*. Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey.
- Schalhorn, A. (2000) *Tumorzentrum München - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumoren der Lunge und des Mediastinums*. Zuckerschwerdt Verlag. München - Bern - Wien - New York.
- The cancer genome anatomic project. National Cancer Institute. Bethesda, Maryland. SAGE Anatomic Viewer. <http://www.cgap.nci.nih.gov/SAGE/AnatomicViewer>.

8. Eigene veröffentlichte Originalarbeiten zur Habilitationsschrift^a

- 8.1. *Importance of S100A2 and S100P for diagnosis of non-small cell lung carcinoma is impaired by advanced tumour stages and neoadjuvant chemotherapy.*** Babett Bartling, Grit Rehbein, Wolfgang Daniel Schmitt, Hans-Stefan Hofmann, Rolf-Edgar Silber, Andreas Simm. *European Journal of Cancer* 43 (2007) 1935-1943.
- 8.2. *Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma.*** Babett Bartling, Hans-Stefan Hofmann, Thomas Boettger, Gesine Hansen, Stefan Burdach, Rolf-Edgar Silber, Andreas Simm. *Lung Cancer* 48 (2005) 145-154.
- 8.3. *Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma.*** Babett Bartling, Hans-Stefan Hofmann, Bernd Weigle, Rolf-Edgar Silber, Andreas Simm. *Carcinogenesis* 26 (2005) 293-301.
- 8.4. *Proliferative stimulus of lung fibroblasts on lung cancer cells is impaired by RAGE.*** Babett Bartling, Nina Demling, Rolf-Edgar Silber, Andreas Simm. *American Journal of Respiratory and Molecular Cell Biology* 34 (2006) 83-91.
- 8.5. *Fibroblast-associated factors mediate induction of high mobility group box protein 1 in lung epithelial cells.*** Babett Bartling, Christine Fuchs, Rolf-Edgar Silber, Andreas Simm. *International Journal of Molecular Medicine* 20 (2007) 217-224.
- 8.6. *Senescent fibroblasts induce moderate stress in lung epithelial cells in vitro.*** Babett Bartling, Grit Rehbein, Rolf-Edgar Silber, Andreas Simm. *Experimental Gerontology* 41 (2006) 532-539.

^a Aus urheberrechtlichen Gründen sind die Arbeiten in der veröffentlichten Version der Habilitationsschrift nicht enthalten.

9. Thesen

1. Das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) ist eng mit genetischen Veränderungen in den Lungenepithelzellen verbunden. Daneben ist die Gewebsumgebung (Stroma) für die Tumorentwicklung ausschlaggebend. Das Stroma setzt sich aus der Extrazellulärmatrix und verschiedenen Arten von Zellen zusammen, unter denen die mesenchymalen Fibroblasten einen signifikanten Einfluss auf die Tumorigenese haben.
2. Zu den genetischen Veränderungen im frühen Tumorstadium des NSCLC gehört die differentielle Expression zweier Mitglieder der S100-Proteinfamilie, die zudem auf den histopathologischen Subtyp hinweist. Das S100-Protein S100A2 ist besonders im Plattenepithelkarzinom und S100P hauptsächlich im Adenokarzinom verstärkt exprimiert.
3. Die Antikörper-Array-Technik zeigt die Histondeazetylase (HDAC) 3 als einen weiteren NSCLC-Marker, der im Plattenepithelkarzinom höher exprimiert wird. Obwohl diese neuartige Technologie den Vorteil hat, dass sie eine Vielzahl von Proteinen im Gewebehomogenat gleichzeitig quantifizieren kann, weist sie hinsichtlich der Quantität und Spezifität der zu analysierenden Proteine einige Defizite auf, die gegen ihren derzeitigen Einsatz in der Tumordiagnostik sprechen.
4. Die neoplastischen Veränderungen in der Lunge sind mit der verminderten Expression des Zelloberflächenrezeptors RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) verbunden. Der Expressionsverlust von RAGE im NSCLC ist in den fortgeschrittenen Tumorstadien deutlicher als im frühen Tumorstadium, aber unabhängig von den histopathologischen Subtypen des NSCLC, Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom.
5. Die Inhibierung der beiden epigenetischen Prozesse, DNA-Methylierung und/oder Histondeazetylierung, hat keinen Einfluss auf die *rage*-Transkription in menschlichen Bronchialkarzinomzellen.

6. Das geringe RAGE-Expressionsniveau in den Bronchialkarzinomzellen trägt zum Verlust der epithelialen Organisation der Zellen zugunsten der tumorigenen Zellanordnung bei. Darüber hinaus begünstigt die geringe Expression von RAGE in den Tumorzellen deren Sensitivität gegenüber dem proliferativen Stimulus benachbarter Fibroblasten.

7. Der proliferative Einfluss von Fibroblasten auf die Bronchialkarzinomzellen basiert auf der Freisetzung von löslichen Faktoren durch die Fibroblasten und ist mit multiplen molekularen Veränderungen in den Tumorzellen verbunden, zu denen die moderat erhöhte Expression des HMGB (*High Mobility Group Box*)-Proteins 1 zählt.

8. Die Gegenwart von Fibroblasten bzw. deren löslichen Faktoren induziert zellprotektive Mechanismen (verstärkte Aktivierung der Proteinkinasen p42/p44-MAPKs und Akt, verstärkte Inaktivierung des proapoptotischen Faktors Bad) und vermindert den basalen Zelluntergang von Bronchialkarzinomzellen.

9. Die replikative Seneszenz von Fibroblasten beeinträchtigt die proliferative Stimulation der Bronchialkarzinomzellen durch die Fibroblasten nicht. Dennoch induzieren lösliche Faktoren von seneszenten Fibroblasten einen moderaten Stress (Oxidation von Dichlordihydrofluorescein, Aktivität der Caspasen-3/7) sowie oxidative Abwehrmechanismen (Proteinexpression der Superoxiddismutase 1) in den Lungenepithelzellen.

10. Diese Arbeit hat am Beispiel von RAGE und anderen Faktoren gezeigt, dass die Tumorigenese des NSCLC mit multiplen molekulargenetischen Veränderungen in den Lungenepithelzellen assoziiert ist und zusätzlich vom Gewebemilieu durch die Nachbarschaft zu mesenchymalen Fibroblasten beeinflusst wird.

Anhang

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie in Halle sowie bei den Kooperationspartnern bedanken, die mir geholfen haben, die Arbeiten zu dieser Habilitationsschrift anzufertigen. Insbesondere danke ich dem Forschungsleiter der Klinik Andreas Simm und Hans-Stefan Hofmann für die unmittelbare Zusammenarbeit bei der inhaltlichen Gestaltung und Organisation der Forschungsprojekte sowie unserem Klinikdirektor Prof. Silber für die persönliche Unterstützung. Für die Arbeiten zur direkten Umsetzung der einzelnen Schwerpunkte möchte ich mich bei den Mitarbeitern der „Lungengruppe“ mit Anke Müller, Sabine Koitzsch und Stephanie Tuche sowie Grit Rehbein, Christine Fuchs, Yvonne Hennemann, Maximilian Desole, Antonia Sohst und Alexander Koch bedanken. Ein herzlicher Dank auch an Robert Scheubel, Bernd Niemann und Britt Hofmann, unser „großräumiges“ Büro mit Norbert Nass und Alexander Navarette Santos sowie Stephanie Ruhs und Beatrice Leuner für die Ratschläge und Diskussionen. Thomas Böttger, Vesselin Christof, Gesine Hansen und Prof. Burdach danke ich für die Zusammenarbeit bei den Mikroarray-Projekten sowie Renate Donath, Simone Kahrstedt und Thekla Wangemann für die weitere technische Unterstützung.

Zur erfolgreichen Durchführung vieler Projekte war die Kooperation mit einigen internen und externen Partnern notwendig. In diesem Zusammenhang gilt den Mitarbeitern von Operationssaal und Schnellschnittlabor für den reibungslosen Ablauf mit den Tumorproben mein Dank - Wolfgang Schmitt für die immunhistochemischen Arbeiten - Claudius Diez, Reinhard Schinzel, Veronika Somoza, Bernd Weigle und Nina Demling für die Zusammenarbeit am RAGE-Projekt - Ariane Söling und den Mitarbeitern im Tierstall für die Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche. Dem benachbarten Labor der Anästhesie mit Anja Struppert, Phillip Röntgen, Armin Sablotzki und Elke Czeslick danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und positive Stimmung - ebenfalls auch Susanne Rohrbach, Roland Busath, Dorothea Darmer und Prof. Holtz vom Institut für Pathophysiologie. Des Weiteren möchte ich mich bei Boris Zhivotovsky und den Arbeitsgruppen in Stockholm (mit Therese, Maria, Agnieszka, Andre, Pavel, Leta, Wladimir, John, Bertram, Bengt, Sun, Wanlaya, Marie, Suzanne sowie Prof. Orrenius) danken für die schöne Zeit und erfolgreiche Arbeit, für die ich später den Wilhelm-Roux-Preis erhielt (*Tak so mycke*).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Habilitationsschrift selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ein Habilitationsverfahren wurde an keiner anderen Universität eröffnet oder beantragt. Frühere Habilitationsversuche sind nicht unternommen worden.

Halle (Saale), den 22.05.2008

gez. Dr. rer. nat. Babett Bartling

Lebenslauf

Name: Bartling
Vorname: Babett
Akad. Grad: Dr. rer. nat. Dipl. Biochem.

Geburtsdatum: 18. 09. 1972
Geburtsort: Wernigerode
Familienstand: ledig
Wohnort: Halle (Saale)

Ausbildung:

- 1979 - 1989 Polytechnische Oberschule (POS), Wernigerode
- 1989 - 1991 Erweiterte Oberschule (EOS), Wernigerode
- 1991 Abitur
- 1991 - 1996 Studium der Biochemie, Fachbereich Biochemie/
Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
- 1993 Vordiplom
- 1995-1996 Diplomarbeit, Institut für Pathophysiologie, Fachbereich
Medizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 1996 Diplom
- 1996-1999 Dissertation, Institut für Pathophysiologie, Fachbereich
Medizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Beruflicher Werdegang:

- 1997-1999 wiss. Mitarbeiterin, Institut für Pathophysiologie, Fachbereich
Medizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- seit 1999 wiss. Mitarbeiterin, Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie,
Fachbereich Medizin, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
- 2002-2003 *Postdoc*-Stipendiatin, Karolinska Institut, Institut für Umwelt-
medizin, Abt. Toxikologie; Stockholm, Schweden