

**Charakterisierung von chemisch induzierten Lungentumoren in  
Mäusen und Untersuchung eines möglichen protektiven Effekts  
des CXCR4-Rezeptor-Antagonisten AMD3100 auf die Entstehung  
und Progression von Lungentumoren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Viktoria Maria Emken**

**geboren am 11.09.1995 in Lohne (Oldenburg)**

**Gutachter:**

- 1. Frau apl. Prof. Dr. Amelie Lupp, Jena**
- 2. Herr Prof. Dr. Gustav Jirikowski, Jena**
- 3. Herr Prof. Dr. Andreas Koeberle, Innsbruck**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.12.2021**

**Inhaltsverzeichnis**

**INHALTSVERZEICHNIS ..... I**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... III**

**1. ZUSAMMENFASSUNG ..... 1**

**2. EINLEITUNG ..... 3**

**2.1 LUNGENKREBS ..... 3**

2.1.1 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE ..... 4

2.1.2 KLASSIFIKATION ..... 6

2.1.3 KLEINZELLIGES BRONCHIALKARZINOM ..... 8

2.1.4 NICHTKLEINZELLIGES BRONCHIALKARZINOM ..... 9

2.1.5 KLINIK, DIAGNOSTIK UND THERAPIE ..... 11

**2.2 CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN ..... 15**

2.2.1 DIE CXCR4/CXCL12-ACHSE ..... 16

2.2.2 SIGNALTRANSDUKTION DER CXCR4/CXCL12-ACHSE ..... 18

2.2.3 DIE CXCR7/CXCL12-ACHSE ..... 19

2.2.4 EXPRESSION VON CXCR4 UND CXCR7 AUF TUMORZELLEN ..... 21

2.2.5 ANTAGONISIERUNG VON CHEMOKINREZEPTOREN ..... 23

**2.3 MURINES LUNGENTUMOR-MODELL ..... 25**

**3. ZIELE DER ARBEIT ..... 27**

**4. MATERIAL UND METHODEN ..... 29**

**4.1 MATERIAL ..... 29**

4.1.1 MAUSSTÄMME UND BEHANDLUNG ..... 29

4.1.2 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN ..... 31

4.1.3 ANTIKÖRPER ..... 33

4.1.4 KITS UND GEBRAUCHSFERTIGE REAKTIONSSYSTEME ..... 35

4.1.5 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL ..... 36

**4.2 METHODEN ..... 37**

4.2.1 FÄRBUNG AN PARAFFINSCHNITTEN ..... 37

4.2.2 DOPPEL-IMMUNHISTOCHEMIE AN FREE-FLOATING-SCHNITTEN ..... 42

4.2.3 DIGITALE AUSWERTUNG ..... 45

4.2.4 VISUELL-HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG ..... 45

4.2.5 AUSWERTUNG DER FREE-FLOATING-SCHNITTE ..... 45

**5. ERGEBNISSE ..... 46**

**5.1 HISTOLOGISCHER TUMORNACHWEIS IN DEN LUNGEN ..... 46**

**5.2 QUANTITATIVE ANALYSE DER LUNGENTUMORE UND VERGLEICH DER VERSUCHSREIHEN. 48**

5.2.1	VERSUCHSREIHE 1: PILOTVERSUCH AN <i>CXCR4-EGFP</i> -MÄUSEN.....	48
5.2.2	VERSUCHSREIHE 2: <i>CXCL12-CXCL12RFP/CXCR4-EGFP</i> -MÄUSE .....	48
5.2.3	VERSUCHSREIHE 3: <i>CXCR4-EGFP</i> -MÄUSE .....	49
5.2.4	VERSUCHSREIHE 4: <i>CXCR7-EGFP</i> -MÄUSE .....	50
5.2.5	VERGLEICHE ZWISCHEN DEN VERSUCHSSERIEN .....	50
<b>5.3</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN PARAFFINSCHNITTEN .....</b>	<b>52</b>
5.3.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER <i>CXCR4/CXCR7/CXCL12</i> -ACHSE.....	52
5.3.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER TUMORMARKER.....	57
5.3.3	EXPRESSION VON CD34 .....	65
5.3.4	EXPRESSION DER IMMUNZELLMARKER .....	66
<b>5.4</b>	<b>DOPPEL-IMMUNHISTOCHEMIE AN FREE-FLOATING-SCHNITTEN .....</b>	<b>69</b>
5.4.1	EGFP UND NCAM.....	69
5.4.2	EGFP UND SCCA1/2 .....	70
5.4.3	EGFP UND MUC1/EMA.....	72
5.4.4	SCCA1/2 UND SYNAPTOPHYSIN .....	73
5.4.5	MUC1/EMA UND SCCA1/2 .....	74
5.4.6	MUC1/EMA UND SYNAPTOPHYSIN.....	76
<b>5.5</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER LEBERN AUF HISTOPATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN .....</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>81</u></b>
6.1	TUMORINDUKTION MIT NNK UND LPS .....	81
6.2	CHARAKTERISIERUNG DER LUNGENTUMORE .....	83
6.2.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER <i>CXCR4/CXCR7/CXCL12</i> -ACHSE.....	83
6.2.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER TUMORMARKER.....	88
6.2.3	EXPRESSION VON CD34 .....	96
6.2.4	EXPRESSION DER IMMUNZELLMARKER .....	96
6.3	BEHANDLUNG MIT AMD3100 .....	97
6.4	HISTOPATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN IN DER LEBER .....	99
<b>7.</b>	<b><u>SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</u></b>	<b><u>101</u></b>
<b>8.</b>	<b><u>LITERATUR-UND QUELLENVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>103</u></b>
<b>9.</b>	<b><u>ANHANG.....</u></b>	<b><u>108</u></b>
9.1	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	108
9.2	DANKSAGUNG.....	109

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<b>ACKR</b>	Atypical Chemokine Receptor
<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropes Hormon, Adrenocorticotropin
<b>ADM</b>	Adrenomedullin
<b>AEC</b>	3-Amino-9-ethylcarbazol
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>Akt</b>	Synonym für Proteinkinase B
<b>Ala</b>	Alanin (Aminosäure)
<b>ALK-Gen</b>	Anaplastische Lymphomkinase-Gen
<b>AMD3100</b>	{1-[4-(1,4,8,11-Tetrazacyclotetradec-1-ylmethyl)phenyl]methyl}-1,4,8,11-tetrazacyclo-tetradecan; AnorMeD3100; Plerixafor®
<b>Arg</b>	Arginin (Aminosäure)
<b>Asp</b>	Aspartat (Aminosäure)
<b>BAC</b>	Bacterial Artificial Chromosome
<b>BAM22</b>	Bovine Adrenal Medulla 22
<b>BP-NEN</b>	Bronchopulmonale Neuroendokrine Neoplasie
<b>BRAF</b>	Proteinkinase im Ras-Raf-Signalweg
<b>cAMP</b>	Cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CEA</b>	Carcinoembryonales Antigen
<b>CgA</b>	Chromogranin A
<b>CGRP</b>	Calcitonin Gene-Related Peptide
<b>COPD</b>	Chronic Obstructive Lung Disease
<b>CREB</b>	cAMP Response Element-Binding Protein
<b>CSC</b>	Cancer Stem Cell; Krebsstammzellen
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>CXCL12</b>	CXC-Motiv-Chemokinligand 12; Synonym: SDF-1
<b>CXCR4</b>	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, CD184
<b>CXCR7</b>	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7, RDC1
<b>DAG</b>	Diacylglycerin
<b>DAPI</b>	Diamidinphenylindol
<b>DRYLAIV</b>	Motiv: Asp-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ile-Val
<b>DRYLSIT</b>	Motiv: Asp-Arg-Tyr-Leu-Ser-Ile-Thr
<b>ED</b>	Extended Disease (SCLC)
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>eGFP</b>	Enhanced Green Fluorescent Protein
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>EMA</b>	Epithelial Membrane Antigen
<b>EPC</b>	Endothelial Progenitor Cell; endotheliale Vorläuferzelle
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ERK1/2</b>	Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2

<b>FDG</b>	Fluor-18-Fluorodesoxyglucose
<b>FFM</b>	Free-Floating-Methode
<b>G-CSF</b>	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
<b>HCC</b>	Hepatocellular Carcinoma; Leberzellkarzinom
<b>HIC1</b>	Hypermethylated in Cancer 1
<b>HIER</b>	Heat-Induced Epitope Retrieval
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>IASLC</b>	International Association for the Study of Lung Cancer
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>Ile</b>	Isoleucin (Aminosäure)
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-triphosphat
<b>I-TAC</b>	IFN-induzierbarer T-Zell- $\alpha$ -Chemoattraktant
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>KD</b>	Knock-Down
<b>KRAS</b>	Proteinkinase im Ras-Raf-Signalweg
<b>LCNEC</b>	Large Cell Neuroendocrine Carcinoma; Großzelliges neuroendokrines Karzinom
<b>LD</b>	Limited Disease (SCLC)
<b>Leu</b>	Leucin (Aminosäure)
<b>LPP</b>	Lambda-Protein-Phosphatase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MAP</b>	Mitogen-Activated Protein
<b>MET</b>	Tyrosinkinase
<b>MIF</b>	Macrophage Inhibitory Factor
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloprotease
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MUC1</b>	Mucin 1
<b>NCAM</b>	Neural Cell Adhesion Molecule; neurales Zelladhäsionsmolekül; Synonym: CD56
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
<b>NNK</b>	Nicotine-derived Nitrosamine Ketone
<b>NRF1</b>	Nuclear Respiratory Factor-1
<b>NSCLC</b>	Non-Small Cell Lung Cancer
<b>PAS</b>	PAS-Reaktion (Periodic Acid Schiff Reaction = Periodsäure-Schiff-Reaktion)
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered Saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PET</b>	Positronenemissionstomographie
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b>PKA</b>	Proteinkinase A

<b>PLC-β</b>	Phospholipase C-β
<b>PNEC</b>	Pulmonale neuroendokrine Zellen
<b>RFP</b>	Red Fluorescent Protein
<b>RSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>SCC</b>	Squamous Cell Carcinoma, Plattenepithelkarzinom
<b>SCLC</b>	Small Cell Lung Cancer
<b>SDF-1</b>	Stromal Cell-Derived Factor 1, Synonym: CXCL12
<b>Ser</b>	Serin (Aminosäure)
<b>SSTR2</b>	Somatostatin-Rezeptor 2
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>Thr</b>	Threonin (Aminosäure)
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ, Tumor in situ
<b>TPBS</b>	Thiomersal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung
<b>TPBS-T</b>	Thiomersal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung und Triton X-100
<b>Tyr</b>	Tyrosin (Aminosäure)
<b>UICC</b>	Union Internationale Contre le Cancer
<b>Val</b>	Valin (Aminosäure)
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VLD</b>	Very Limited Disease (SCLC)
<b>WHO</b>	World Health Organization

## 1. Zusammenfassung

Krebserkrankungen stellen nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar und es ist zu erwarten, dass es zu einer weiteren Zunahme der Krebsinzidenzen kommt. Da maligne Lungentumore häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden, weisen Patienten mit einem Bronchialkarzinom noch immer eine sehr schlechte Prognose auf. Daher ist die Suche nach neuen Zielstrukturen für die Diagnostik und die Therapie von großer Bedeutung. Eine solche Zielstruktur könnte der Chemokinrezeptor CXCR4 darstellen, für welchen eine Überexpression in über 20 verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem auch in Bronchialkarzinomen, nachgewiesen werden konnte. Dem CXCR4 und seinem natürlichen Liganden, dem Chemokin CXCL12, wird dabei unter anderem eine wichtige Funktion bei der Neoangiogenese, der Proliferation, der Invasivität, der Metastasierung und der Chemotherapieresistenz der Tumore zugeschrieben. Die Antagonisierung dieser CXCR4-vermittelten Effekte, beispielsweise mit dem nicht-peptidischen CXCR4-Antagonisten AMD3100 (Plerixafor®), gilt daher als vielversprechender Therapieansatz bei der Behandlung CXCR4-positiver Tumore. Neben dem CXCR4 bindet dessen Ligand CXCL12 ebenfalls an den atypischen Chemokinrezeptor CXCR7. Wie die CXCR4- wird auch eine CXCR7-Überexpression mit einem ein verstärkten Wachstum, einer höheren Aggressivität und einer vermehrten Metastasierung der Tumore in Verbindung gebracht.

Um die Rolle des CXCR4 in den Lungentumoren untersuchen und einen möglichen protektiven Effekt von AMD3100 *in vivo* überprüfen zu können, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst ein von Keohavong et al. (2011) erstmals beschriebenes, realitätsnahes Lungentumor-Modell reproduziert und charakterisiert sowie die dabei entstandenen Tumore auf die Expression von CXCR4 und CXCR7 untersucht werden. Die Tumorinduktion erfolgte hierbei durch eine kombinierte Verabreichung des Nitrosamin-Ketons NNK, einem Nikotin-Metaboliten, und von Lipopolysacchariden (LPS) gramnegativer Bakterien. Die Experimente sollten an drei transgenen Mauslinien, an *Cxcr4-eGFP*-, *Cxcr7-eGFP*- und an 12 *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-Mäusen, erfolgen. Nach der chemischen Induktion der Tumore erhielt ein Teil der Mäuse über 2 Wochen 25 µg/h AMD3100 mittels einer osmotischen Minipumpe. Es folgte eine histologische Aufarbeitung der Lungen und der Lebern, als wichtigster Metastasierungsort, sowie eine immunhistochemische Charakterisierung der Lungentumore mit Hilfe von Markern für eine neuroendokrine Differenzierung (Chromogranin A, Synaptophysin, CD56 (NCAM)), für Plattenepithelkarzinome (34βE12, SCCA1/2) und darüber hinaus für Adenokarzinome (Panzytokeratin, MUC1/EMA). Die CXCR4-Expression



konnte direkt mit Hilfe des phosphosensitiven Antikörpers UMB-2 und ebenso wie die des CXCR7 indirekt über die eGFP-Expression dargestellt werden. Weitergehend wurde die Expression verschiedener Immunzellmarker, des Proliferationsmarkers Ki-67, von CXCL12/SDF-1, des Somatostatin-Rezeptors SSTR2, von CD34 und des Stammzellmarkers CD133 untersucht. Die Lungentumore wurden zusätzlich ausgemessen und der Durchmesser sowie die Fläche der Tumore berechnet.

Alle mit NNK und LPS behandelten Mäuse entwickelten diverse nicht-kleinzellige und kleinzellige Bronchialkarzinome, während bei den nur mit LPS und bei den lediglich mit den entsprechenden Lösungsmitteln behandelten Tieren keine Lungentumore verzeichnet werden konnten. Zusätzlich zeigten sich nach der Applikation von NNK und LPS, wie auch nach der alleinigen LPS-Gabe, zahlreiche Immunzell-Ansammlungen im Lungengewebe. Während sich ein Großteil der nichtkleinzelligen Tumorzellen als Tumorzellmarker- und Ki-67-negativ und folglich als benigne erwies, zeigten sich im Randgebiet einiger Tumore Gruppen von Zellen, die positiv für sowohl Adeno- als auch Plattenepithelkarzinom-Marker, CXCR4 und Ki-67 waren. Diese bereits entarteten Zellen wiesen somit Eigenschaften eines malignen adenosquamösen Karzinoms auf. Einige CXCR4-exprimierende Zellgruppen in den nichtkleinzelligen Neoplasien ließen sich aufgrund der Expression entsprechender Marker als Makrophagen sowie B- oder T-Lymphozyten identifizieren. Daneben fanden sich aber ebenfalls Läsionen (teilweise im lymphatischen Gewebe gelegen oder an dieses angrenzend, teilweise aber auch solitär), die neben dem CXCR4 auch für Marker für neuroendokrine Tumore positiv waren. Trotz der teilweise recht großen Ausdehnung insbesondere der adenoiden Tumore bei den mit NNK und LPS behandelten Mäusen konnten bei keinem der Tiere Lebermetastasen festgestellt werden.

Eine Behandlung mit AMD3100 führte zu einer Verlagerung des CXCR4-Immunsignals zur Zellmembran. Trotz der hiermit nachgewiesenen erfolgreichen Blockade des CXCR4-Rezeptors hatte die Substanz keinen Einfluss auf die Anzahl oder die Größe der Tumore.

Insgesamt ließ sich das auf der Arbeit von Keohavong et al. (2011) basierende, realitätsnahe chemische Lungentumor-Modell in der Arbeitsgruppe erfolgreich und verlässlich etablieren. Inwiefern das fehlende Ansprechen auf die Behandlung mit AMD3100 trotz der nachgewiesenen Expression des CXCR4 besonders in den kleinzelligen Neoplasien auf das noch sehr frühe Tumorstadium oder die kurze Behandlungsdauer zurückzuführen ist, sollte in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

## 2. Einleitung

### 2.1 Lungenkrebs

Bei Lungenkrebs (Synonym: Lungenkarzinom oder Bronchialkarzinom) handelt es sich um eine maligne Neubildung in der Lunge bzw. im Bronchialsystem. Diese Krebsart gehört bei beiden Geschlechtern weltweit zu den häufigsten Krebsneuerkrankungen und -todesursachen. Das Lungenkarzinom wurde bis vor kurzem in die zwei wesentlichen histopathologischen Entitäten kleinzelliges (SCLC, englisch: *Small Cell Lung Cancer*) und nicht-kleinzelliges (NSCLC, englisch: *Non-Small Cell Lung Cancer*) Bronchialkarzinom, entsprechend der Tumorzellgröße, eingeteilt. Seit der Entwicklung der modernen Onkologie finden sich mindestens zwei Dutzend biologisch unterschiedliche Entitäten mit individualisierten Behandlungskonzepten (Deutsche Krebsgesellschaft 2018).

Den Daten des Robert-Koch-Instituts zufolge erkrankten im Jahr 2014 etwa 34.500 Männer und 19.300 Frauen an Lungenkrebs, wovon 29.560 Männer und 15.524 Frauen verstarben. Damit ist Lungenkrebs mit 25% bei den Männern die häufigste und bei den Frauen mit 15% die zweithäufigste Krebstodesursache (Kaatsch et al. 2017, Herold 2018).

Ab dem 55.-60. Lebensjahr steigt die Inzidenz deutlich an. Das mediane Erkrankungsalter beträgt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei Männern 71 Jahre und bei Frauen 69 Jahre. Die alters- und geschlechtsspezifische Mortalitätsrate erreicht das Maximum zwischen 80 und 84 Jahren (Kaatsch et al. 2017, Herold 2018). Die geschlechtsabhängig gegenläufige Entwicklung altersstandardisierter Erkrankungs- und Sterberaten zeigt seit Ende der 1990-er Jahre einen kontinuierlichen Anstieg bei Frauen und einen stetigen Rückgang bei Männern. Dies wird auf das veränderte Rauchverhalten zurückgeführt. Das Robert Koch-Institut rechnet trotz der rückläufigen Inzidenzen bei Männern durch die erhöhten Inzidenzen bei Frauen sowie aufgrund der demographischen Entwicklung, welche mit einer Zunahme an Personen im höheren und damit im erkrankungsrelevanten Alter einhergeht, mit einem Anstieg der absoluten Erkrankungsfälle auf insgesamt 59.900 bis zum Jahr 2020. Dies beinhaltet einen durchschnittlichen Zuwachs an Neuerkrankungen um 0,5% pro Jahr. Die Zahl der Sterbefälle hingegen sinkt um 0,3% pro Jahr (Kaatsch et al. 2017, Deutsche Krebsgesellschaft 2018).

Da maligne Lungentumore häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium symptomatisch werden, wird die Erkrankung in vielen Fällen spät entdeckt. Somit weist die Diagnose immer noch eine schlechte Prognose auf: Das relative 5-Jahres-Überleben liegt in Deutschland für Frauen bei 20% und für Männer bei 15%. Die Überlebenaussichten variieren in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose, vom Differenzierungsgrad sowie vom histologischen Typ des Tumors (Deutsche Krebsgesellschaft 2018).

Obwohl Lungenkrebs weltweit die häufigste Krebsform ist, finden sich regionale Unterschiede: Am meisten sind entwickelte Länder in Europa und Nordamerika betroffen, wobei die Erkrankungshäufigkeit in diesen Ländern abnimmt und in Entwicklungsländern stetig zunimmt. Aus sozioökonomischer Sicht finden sich höhere Prävalenzen in Bevölkerungsgruppen mit niedrigem Einkommen und schlechter Ausbildung. Dies wird auf verschiedene Determinanten wie erhöhte berufliche Exposition gegenüber Kanzerogenen, höhere Prävalenz des Rauchens sowie eine ungesunde Ernährung zurückgeführt (Deutsche Krebsgesellschaft 2018).

### 2.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Lungenkarzinome entstehen in einem mehrstufigen Prozess. Durch chronisch entzündliche Reize sowie die Exposition gegenüber kanzerogenen Noxen entstehen dysregulierte Signalübertragungswege, genetische Aberrationen und veränderte Moleküle. Dem Bronchialkarzinom liegt eine hohe Mutationslast zugrunde. Daher führte die moderne Onkologie zu einer genombasierten Klassifikation, durch welche es bereits möglich ist, in bestimmte pathogenetische Wege medikamentös einzugreifen (Deutsche Krebsgesellschaft 2018).

Während des Prozesses der Kanzerogenese kommt es zu einer Hyperplasie von pluripotenten Basalzellen, die sich zu Plattenepithelzellen, Becherzellen und endokrinen Zellen differenzieren. Die Zellen zeigen im Verlauf atypische Wachstumsmuster, befinden sich jedoch noch in einem reversiblen dysplastischen Zustand, der durch den Verlust der Differenzierung gekennzeichnet ist (Herold 2018). Dabei entsteht unter anderem eine Plattenepithelmetaplasie, die mit dem Verlust des Zilien tragenden Epithels einhergeht. Eine fortschreitende Entdifferenzierung ermöglicht die Entwicklung der verschiedenen Karzinomtypen. Zwischen der Exposition gegenüber den auslösenden Risikofaktoren, welche in endogene und exogene Faktoren unterschieden werden, und der Entstehung von Atypien und Dysplasien können viele Jahre oder Jahrzehnte liegen (Ridge et al. 2013, Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Herold 2018).

Wie bereits in den frühen 1950-er Jahren entdeckt und in den 1960-er Jahren zweifelsfrei bewiesen, ist der prädominierende Risikofaktor für die Pathogenese von Lungenkarzinomen das Rauchen. Man schreibt der Inhalation von Zigarettenrauch die Entstehung von 85% (91% bei den Männern und 65% bei den Frauen) aller Lungenkarzinome zu. Auch wenn der Teer-, Nikotin- und Kohlenmonoxidgehalt im Zigarettenrauch in den letzten Jahrzehnten signifikant

reduziert wurde, hat sich das Krebsrisiko nicht verändert. Die Karzinogenese durch Zigarettenrauch wird auf der einen Seite maßgeblich durch eine durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe ausgelöste p53-Mutation und auf der anderen Seite durch den erhöhten Gehalt an kanzerogenen Nitrosaminen in den modernen Zigaretten gefördert (Ridge et al. 2013). Entscheidend für das Krebsrisiko sind die Dauer des Rauchens, das Alter bei Rauchbeginn sowie die Zahl gerauchter Zigaretten. Nach 40 Packungsjahren, was sich aus dem Produkt gerauchter Zigaretten und der Anzahl an Raucherjahren errechnen lässt, ist das Krebsrisiko 10-fach erhöht (Herold 2018). In einer europäischen Studie konnte gezeigt werden, dass männliche Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern ein 24-fach höheres und ehemalige Raucher ein 7,5-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko haben. Bei Frauen findet sich ein Verhältnis von 8,7:1 zwischen aktuell Rauchenden und Nichtraucherinnen und ein doppelt so hohes Risiko bei ehemaligen Raucherinnen, an Lungenkrebs zu erkranken. Des Weiteren ist auch das Passivrauchen mit einem ca. 1,3-2-fach erhöhten Lungenkrebsrisiko verbunden. Hiermit stehen jährlich ca. 260 Lungenkrebstodesfälle und ca. 280 Lungenkrebsneuerkrankungen im Zusammenhang (Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Herold 2018).

Die Kombination aus Zigarettenrauchen und der Exposition gegenüber beruflichen oder umweltbedingten Karzinogenen potenziert das Lungenkrebsrisiko (Herold 2018). Berufliche Karzinogene wie Asbest, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sowie Quarz und Nickelstäube sind nur für etwa 5% der Lungenkarzinome verantwortlich. Radon, ein natürlich vorkommendes radioaktives Edelgas, was durch den Zerfall von Radium in Gesteinen und Böden entsteht, ist die zweithäufigste Ursache für die Entstehung von Lungenkrebs (Ridge et al. 2013, Kaatsch et al. 2017, Deutsche Krebsgesellschaft 2018). Es kann einerseits berufsbedingt im Bergbau oder in Wasserwerken zu einer erhöhten Radonexposition kommen, andererseits kann es aber auch durch Gesteinsschichten in bodennahe Räume wie Keller oder Erdgeschosswohnungen diffundieren und dort in erhöhten Konzentrationen auftreten. Die karzinogene Wirkung auf das direkt durch die Radoninhalation exponierte Bronchialepithel entsteht durch die Wechselwirkung der Zerfallsprodukte sowie der dabei emittierten Alphastrahlung mit dem Epithel. Die Strahlendosis in anderen Organen ist dagegen gering (Deutsche Krebsgesellschaft 2018).

Neben exogenen Einflüssen spielen auch endogene Faktoren eine Rolle in der Karzinogenese von Bronchialkarzinomen. So findet sich ein 2-3-fach erhöhtes Risiko für Personen, bei denen ein Elternteil an einem solchen Tumor erkrankt ist. Es sind genetische Mutationen bekannt,

zum Beispiel auf Chromosom 14, die das Lungenkrebsrisiko erhöhen (Herold 2018). Bestimmte Vorerkrankungen sind mit einer erhöhten Prävalenz von Lungenkarzinomen assoziiert. Ca. 60-80% der HIV-Infizierten rauchen, allerdings kann unter Berücksichtigung dieser Tatsache die deutlich erhöhte Inzidenz sowie die durchschnittlich 18 Jahre frühere Diagnosestellung nicht erklärt werden. Es besteht somit ein Zusammenhang zwischen der HIV-bedingten Immunsuppression und der Entstehung von Lungenkrebs (Ridge et al. 2013). Ferner weisen Narben in der Lunge ein erhöhtes Risiko auf, dass sich auf deren Grundlage ein Karzinom bildet (Herold 2018).

### 2.1.2 Klassifikation

Die Stadieneinteilung erfolgt mithilfe des international anerkannten TNM-Klassifikationssystems und dient einer Einschätzung der anatomischen Ausbreitung der Tumorerkrankung, der Therapieplanung sowie der Prognose. Die aktuelle Klassifikation trat am 01.01.2017 in Kraft und wurde von der IASLC/AJCC (englisch: *International Association for the Study of Lung Cancer/American Joint Committee on Cancer*) und der internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC, französisch: *Union Internationale Contre le Cancer*) entworfen (Deutsche Krebsgesellschaft 2018). Das T-Staging beinhaltet die Charakterisierung des Primärtumors, welche sich an dem Durchmesser in der Längsachse und der Ausdehnung in benachbarte Strukturen orientiert (Mirsadraee et al. 2012). Das Frühstadium „Carcinoma in situ“ (Tis = Tumor in situ) beschreibt einen lokal auf das Ursprungsgewebe begrenzten epithelialen Tumor, der nicht invasiv wächst und somit die Basallamina nicht durchbricht. Das Stadium Tx wird verwendet, wenn keine Aussage über den Primärtumor gemacht werden kann. Die Einzelheiten des T-Stagings des Bronchialkarzinoms können der Tabelle 1 entnommen werden.

**Tabelle 1:** T0- bis T4-Staging des Bronchialkarzinoms (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)

<b>T-Staging</b>	
<b>T0</b>	Keine Evidenz eines Primärtumors
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	größter Durchmesser <3 cm, umgeben von Lungengewebe oder Pleura visceralis, Hauptbronchus nicht beteiligt <ul style="list-style-type: none"> <li>• T1a: Tumorgröße ≤1 cm</li> <li>• T1b: Tumorgröße &gt;1 und ≤2 cm</li> <li>• T1c: Tumorgröße &gt;2 und ≤3 cm</li> <li>• T1a(mi): Minimal invasives Adenokarzinom (solitäres Adenokarzinom mit überwiegend lepidischem Wachstumsmuster, &lt;3 cm in der größten Gesamtausdehnung mit einem invasiven (in der CT soliden) Anteil &lt;5 mm)</li> </ul>
<b>T2</b>	Tumor mit Durchmesser >3 und ≤5 cm oder Infiltration des Hauptbronchus unabhängig vom Abstand von der Karina, aber ohne direkte Invasion der Karina Infiltration der viszeralen Pleura oder tumorbedingte partielle Atelektase oder obstruktive Pneumonie, die bis in den Hilus reichen, Teile der Lunge oder die gesamte Lunge umfassen <ul style="list-style-type: none"> <li>• T2a: Tumorgröße &gt;3 und ≤4 cm</li> <li>• T2b: Tumorgröße &gt;4 und ≤5 cm</li> </ul>
<b>T3</b>	größter Durchmesser >5 aber ≤7 cm oder Infiltration von Thoraxwand (inklusive parietale Pleura und Sulcus superior), N. phrenicus, parietales Perikard oder zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen wie der Primärtumor
<b>T4</b>	größter Durchmesser >7 cm oder mit direkter Infiltration von Diaphragma, Mediastinum, Herz, großen Gefäßen (V. cava, Aorta, Pulmonalarterie, Pulmonalvene intraperikardial), Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Karina oder zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen

Um den örtlichen Lymphknotenbefall durch Tumorzellen zu beschreiben, wird das N-Staging mit seinen Unterstufen verwendet. Wenn es kein Anzeichen für einen Lymphknotenbefall gibt, wird dies als N0 bezeichnet. Mit den Stadien N1, N2 und N3 wird ein zunehmender Lymphknotenbefall beschrieben. Im Stadium N1 handelt es sich dabei noch um ipsilaterale intrapulmonale Lymphknoten. Erreichen die Metastasen mediastinale oder subkarinale ipsilaterale Lymphknoten, liegt das Stadium N2 vor. Im Stadium N3 finden sich Metastasen in kontralateralen mediastinalen und/oder hiliären Lymphknoten oder ipsi- oder kontralateralen zervikalen und supraklavikulären Lymphknoten. Das M-Staging umschreibt das Vorhandensein (M1) oder Fehlen (M0) von hämatogenen Fernmetastasen. Im Stadium M1 wird unterschieden zwischen dem Auftreten von separaten Tumoren im kontralateralen Lungenflügel beziehungsweise einem malignen Pleuraerguss oder Perikarderguss (M1a), einer Fernmetastase in einem extrathorakalen Organ (M1b) und mehreren Fernmetastasen in einem oder mehreren Organen (M1c). Kann weder eine Aussage zum regionären Lymphknotenbefall noch zum Vorhandensein von Fernmetastasen gemacht werden, wird dies mittels Nx oder Mx beschrieben (Deutsche Krebsgesellschaft 2018). In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die verschiedenen Krankheitsstadien mit der jeweiligen TNM-Einteilung aufgelistet.

*Tabelle 2: Klassifikation nach Tumorstadien nach UICC (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)*

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastase
<b>Stadium 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadium IA1</b>	T1a(mi)	N0	M0
	T1a	N0	M0
<b>Stadium IA2</b>	T1b	N0	M0
<b>Stadium IA3</b>	T1c	N0	M0
<b>Stadium IB</b>	T2a	N0	M0
<b>Stadium IIA</b>	T2b	N0	M0
<b>Stadium IIB</b>	T1a-c, T2a-b	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>Stadium IIIA</b>	T1a-c, T2a-b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
<b>Stadium IIIB</b>	T1 a-b, T2 a-b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
<b>Stadium IIIC</b>	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
<b>Stadium IVA</b>	jedes T	jedes N	M1a, M1b
<b>Stadium IVB</b>	jedes T	jedes N	M1c

Bei der Klassifikation vom kleinzelligen Lungenkarzinom findet neben der TNM-Klassifikation eine weitere Einteilung gemäß der *Veterans Administration Lung Study* Anwendung. Die Einteilung in *very limited disease*, *limited disease* sowie *extended disease* orientiert sich an der Durchführbarkeit einer Strahlentherapie (Colby et al. 2004, Kaatsch et al. 2017). Das Stadium *limited disease* definiert eine Tumorausdehnung, die mittels eines Strahlenfeldes vollständig erfasst werden kann (T3-4 und/oder N2-3). Die Tumorerkrankung ist dabei auf eine Thoraxhälfte mit regionalem Lymphknotenbefall beschränkt. Ohne Nachweis von mediastinalen Lymphknoten spricht man von dem Stadium *very limited disease*, welches einer TNM-Klassifikation von T1-2 und N0-1 entspricht. Jede Ausbreitung über *limited disease* hinaus wird als *extended disease* bezeichnet (Colby et al. 2004).

### 2.1.3 Kleinzelliges Bronchialkarzinom

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC, englisch: *Small Cell Lung Cancer*) ist hochaggressiv und macht etwa 15% aller Lungenkarzinome aus. Es zeichnet sich durch ein schnelles Tumorwachstum mit einer durchschnittlichen Tumorverdopplungszeit von 10-50 Tagen, eine starke Vaskularisierung, genomische Instabilität sowie eine frühe Metastasierung aus. Das SCLC ist vorwiegend zentral lokalisiert und breitet sich typischerweise submukosal entlang der Bronchien aus. Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist häufiger als jede andere

Krebsart mit paraneoplastischen Syndromen assoziiert (Colby et al. 2004, Gazdar et al. 2017, Herold 2018).

Histologisch präsentieren sich SCLC-Zellen rund, oval und spindelförmig, mit geringem Zytoplasma und schlecht definierten Zellrändern. Typischerweise finden sich Nekrosen in den Tumorzellverbänden sowie feinkörniges Kernchromatin und unauffällige oder fehlende Nukleoli. Die Tumorzellen ähneln in ihrem Aussehen Haferkörnern, so dass das kleinzellige Bronchialkarzinom häufig als Haferzellkarzinom (englisch: *oat cell carcinoma*) bezeichnet wird. In immunhistochemischen Färbungen sind die kleinzelligen Bronchialkarzinome meist positiv für die neuroendokrinen Marker CD56, Chromogranin oder Synaptophysin (Colby et al. 2004).

Anhand der Histologie ist es nicht möglich, eine Aussage über die Prognose zu machen. Zu den Faktoren, die die Prognose negativ beeinflussen, gehören unter anderem ein ausgedehntes Stadium mit Fernmetastasen, ein erniedrigter Leistungsstatus sowie ein erhöhter LDH- oder Alkalische-Phosphatase-Spiegel. Aufgrund der Tatsache, dass bei Diagnosestellung bereits zu 80% Metastasen vorliegen, wird dem SCLC allgemein eine sehr schlechte Prognose zugeschrieben. Die typischen Metastasierungsorte sind das Gehirn, die Leber, das Knochenmark und die Nebennieren (Colby et al. 2004, Gazdar et al. 2017, Herold 2018).

Nicht selten besteht ein Lungentumor aus unterschiedlichen Tumoranteilen. Bei einem sogenannten kombinierten kleinzelligen Karzinom findet man zusätzlich zu der kleinzelligen Komponente üblicherweise ein Adenokarzinom, ein Plattenepithelkarzinom oder ein großzelliges Karzinom (Colby et al. 2004).

#### 2.1.4 Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom

Alle Lungenkarzinome, die kein kleinzelliges Bronchialkarzinom sind, werden zu den nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC, englisch: *Non-Small Cell Lung Cancer*) gezählt. Die Tumorentität umfasst mit ca. 85% aller Lungentumore unter anderem das Plattenepithelkarzinom (40%), das Adenokarzinom (35%) und das großzellige Lungenkarzinom (10%) (Colby et al. 2004, Herold 2018).

Das Plattenepithelkarzinom (SCC, englisch: *Squamous Cell Carcinoma*) ist ein bösartiger epithelialer Tumor, der in mehr als 90% der Fälle auf Tabakkonsum als einer der Hauptfaktoren in der Pathogenese zurückgeführt werden kann. Das histologische Bild ist geprägt von Verhornungszeichen und den als Interzellularbrücken bezeichneten Zellfortsätzen zwischen den Tumorzellen. Zusätzlich findet man häufig nekrotische Areale, die den Tumor umgeben.



Die neoplastischen Zellen zeigen meist zentral liegende hyperchromatische Zellkerne mit markanten Nukleoli, umgeben von reichlich Zytoplasma. In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad können diese Merkmale jedoch abweichen. In der Immunhistochemie wird deutlich, dass die SCCs häufig hochmolekulares Keratin (34βE12), die Cytokeratine 5/6 oder das carcinoembryonale Antigen (CEA) exprimieren. Das Plattenepithelkarzinom neigt eher zu einer lokal aggressiven Infiltration als zu einer Metastasierung. Die normalerweise eher zentral lokalisierten Plattenepithelkarzinome können beim peripheren Wachstumstyp oder in einem fortgeschrittenen Stadium die Pleura oder das Zwerchfell infiltrieren. Die Tumorverdopplungszeit beträgt ca. 300 Tage (Colby et al. 2004, Herold 2018).

Das Adenokarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor mit einer Differenzierung in Richtung Drüsengewebe und daher zur Schleimbildung fähig. Es ist die häufigste Lungenkrebsform, die sich unabhängig vom Tabakkonsum entwickelt. Die Tumorverdopplungszeit beträgt durchschnittlich 180 Tage. Die Wachstumsmuster der Adenokarzinome können in acinär, papillär, bronchoalveolar und solide unterschieden werden. Adenokarzinome treten meist peripher in der Lunge auf. Das Zytoplasma der Zellen erscheint homogen und körnig, kann aber auch durch unscharf begrenzte Vakuolen ein schaumiges Aussehen annehmen. Die neoplastischen Zellen sind meist mononukleär und die Kerne stellen sich rund oder oval, mit glatten Konturen dar. Das Chromatin kann je nach Differenzierungszustand variieren und entweder feinkörnig und regelmäßig sein oder sich in schlecht differenzierten Tumoren grob und unregelmäßig präsentieren. Die Nukleoli sind meist unauffällig.

Die Ausbreitung erfolgt hauptsächlich auf lymphatischem und hämatogenem Weg. Periphere Tumore können auch in die Pleura infiltrieren und sich über die Pleuraoberfläche weiter ausbreiten. Schätzungsweise sind 20% der Adenokarzinome zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert. Zu den Prädilektionsstellen gehören hier wie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom das Gehirn, Knochen und Knochenmark, Nebennieren und Leber (Colby et al. 2004, Herold 2018).

Ist ein Lungentumor weder einem kleinzelligen Bronchialkarzinom, einem Plattenepithelkarzinom noch einem Adenokarzinom zuzuordnen, handelt es sich um ein entdifferenziertes großzelliges Bronchialkarzinom. Hier präsentieren sich häufig große polygonale Tumorzellen. Daneben kann man noch die eher seltenen Lungentumorarten wie das Adenosquamöse Karzinom, das Sarkomatoide Karzinom, die Karzinoideumore oder Bronchialdrüsentumore differenzieren (Colby et al. 2004, Herold 2018).

### 2.1.5 Klinik, Diagnostik und Therapie

Obwohl die Diagnosestellung des Lungenkarzinoms innerhalb eines Zeitraumes von 2 Monaten nach Auftreten von klinischen Symptomen gefordert wird und eine Behandlung im Anschluss innerhalb von 6 Wochen erfolgen sollte, kommt es aufgrund einer im Allgemeinen späten und unspezifischen Präsentation von klinischen Symptomen häufig zu einer Verzögerung von Wochen oder Monaten (Deutsche Krebsgesellschaft 2018). Während die Prognose von asymptomatischen Patienten minimal besser zu sein scheint, weisen ca. 90% der an Lungenkrebs Erkrankten initial Symptome auf. Neben Husten oder einem sich ändernden Hustencharakter als häufigstes Symptom, zählen auch rezidivierende Erkältungserkrankungen, Dyspnoe, Brustschmerzen oder Hämoptysen, welche den Auswurf von blutigem Sekret beschreiben, zur unspezifischen Klinik im Initialstadium der Erkrankung (Griesinger et al. 2018, Herold 2018). Es können zusätzlich zur Klinik des Primärtumors intrathorakale und extrathorakale Symptome je nach Ausbreitung des Tumors auftreten. Durch direktes Tumorstadium oder eine lymphogene Metastasierung in die Lymphknoten der Lunge und im Thorax werden Nerven- und Gefäßstrukturen, die Brustwand oder viszerale Organe wie der Ösophagus beeinträchtigt. Dies führt zu weiteren Symptomen wie Heiserkeit durch eine linksseitige Stimmbandparese bei Infiltration des Nervus recurrens, Läsion des Plexus brachialis, was mit einer Schwäche des betroffenen Armes einhergeht, Horner-Syndrom bei Befall des Ganglion stellatum oder das Vena-cava-superior-Syndrom. In ca. 50% der Fälle treten im Verlauf der Erkrankung Brustwand- oder Thoraxschmerzen auf, welche durch eine Invasion von Tumorzellen in die Pleura bzw. in die Brustwand bedingt sind (Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Griesinger et al. 2018, Herold 2018).

Zu den extrathorakalen Metastasierungsstellen gehören Knochen, Leber, Nebennieren, das Gehirn sowie intraabdominelle, axilläre, supraklavikuläre und zervikale Lymphknoten. Damit verbunden sind Knochen- oder Kopfschmerzen, Schwindel, je nach Lokalisation bestimmte neurologische Ausfälle, Verwirrtheit sowie auch Krampfanfälle. Die extrathorakalen Symptome kommen bei etwa einem Drittel der Patienten vor. Bei einem weiteren Drittel der Patienten ist zudem eine allgemeine Begleitsymptomatik wie Gewichtsverlust, Schwäche, Fieber und Nachtschweiß zu finden. Wie aus einer Metaanalyse hervorgeht, liegt bei Patienten mit diesen Symptomen bereits häufig eine systemische Metastasierung vor (Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Griesinger et al. 2018).

Die Klinik variiert nicht nur in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung, sondern auch von der Tumorentität. Zentrale Lungenkarzinome wie zum Beispiel die kleinzelligen Bronchialkarzinome (SCLC) führen häufiger als periphere Tumore wie Adenokarzinome zu

Symptomen (Colby et al. 2004). Ein besonderes Charakteristikum der kleinzelligen Lungenkarzinome ist das Auftreten von paraneoplastischen Syndromen. Darunter versteht man Krankheitszeichen, die nicht direkt durch die Raumforderung des Tumors entstehen, sondern mit unterschiedlichen Pathomechanismen durch die Tumorerkrankung bedingt sind. Ursache kann eine Sezernierung von Hormonen oder eine Kreuzreaktion von Antikörpern sein, deren Auswirkungen sich entfernt vom Primärtumor manifestieren (Gazdar et al. 2017). Das häufigste paraneoplastische Syndrom mit einer Prävalenz von 10% bei den an einem SCLC Erkrankten ist das Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (SIADH). Hierbei ist das Leitsymptom eine Hyponatriämie. Weitere häufige Erkrankungen sind das durch eine ACTH-Überproduktion bedingte Cushing-Syndrom sowie das Lambert-Eaton-Syndrom, bei welchem Antikörper gegen Calcium-Kanäle an der motorischen Endplatte vorliegen (Colby et al. 2004, Gazdar et al. 2017, Griesinger et al. 2018).

Bei entsprechender Klinik, aus der sich der Verdacht eines möglichen Lungenkarzinoms ableitet, sowie einem auffälligen Befund in der Röntgenaufnahme wird eine Basisdiagnostik eingeleitet. Zunächst sind in der Anamnese die Krankheitsgeschichte und Begleiterkrankungen zu erfragen. Dabei ist vor allem auch auf die Familienanamnese sowie die Hauptrisikofaktoren wie das Rauchen oder eine berufliche Exposition gegenüber Karzinogenen wie Radon, Asbest oder Arsenverbindungen zu achten. Der Karnofsky-Index beschreibt den Allgemeinzustand von Patienten mit bösartigen Tumoren. Dieser beinhaltet die symptombezogene Einschränkung im Alltag und in der Lebensqualität und hilft damit bei der Einschätzung der Prognose und der Planung einer Therapie, da für das weitere Vorgehen das Ausmaß der Diagnostik je nach Ausgangszustand des Patienten variieren kann (Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Griesinger et al. 2018).

Auf die allgemeine internistische Untersuchung, die vor allem der Beurteilung der thorakalen Organe und Lymphknotenstationen dient, folgt die Bildgebung. In dem initial immer empfohlenen Röntgenbild des Thorax zeigt sich ein Lungenkarzinom entweder direkt oder indirekt als Rundherd, Raumforderung, Atelektase, Verbreiterung des Mediastinums oder durch einen Pleuraerguss. Bei weiterhin bestehendem Verdacht wird eine CT-Untersuchung von Thorax und Oberbauch mit Kontrastmittel empfohlen. Auch wenn die morphologischen Zeichen in einer CT-Untersuchung für maligne Tumore keine Diagnose erlauben, können sie in Form von nekrotischen Arealen, einer umschriebenen Pleuraverdickung, einer pleuralen Retraktion oder Inhomogenität den Verdacht auf Malignität erhärten. Mithilfe der CT-Untersuchung wird das T-Staging vorgenommen. Dabei wird die Lokalisation des

Primärtumors, die Größe sowie die Ausdehnung in das umliegende Gewebe beschrieben. Des Weiteren erfolgt eine Einschätzung des N-Stagings. Die Lymphknotengröße wird hierbei als Hinweis für eine Lymphknotenmetastasierung verwendet. Ab einem Schwellenwert von 10 mm wird von einem auffälligen Lymphknoten ausgegangen. Dieser Wert wird aufgrund der Tatsache, dass sich einerseits Lymphknoten benigne vergrößern können und sich andererseits kleine Metastasen in Lymphknoten normaler Größe verstecken können, als relativ unsicher eingestuft. Die Magnetresonanztomographie ist für das M-Staging das Verfahren der Wahl für die Detektion von Fernmetastasen in Gehirn, Leber und Nebennieren (Deutsche Krebsgesellschaft 2018).

Für die Diagnosesicherung ist eine histologische Untersuchung essenziell. Proben können mittels Bronchoskopie, Sputumzytologie, die sich vor allem bei zentralen Tumoren und Hämoptysen eignet, oder Feinnadelpunktion aus einem Pleuraerguss akquiriert werden. In den aktuellen Leitlinien wird zur Vervollständigung der Diagnostik eine Positronenemissionstomographie (PET) mit 18-Fluorodesoxyglucose (FDG) in einem Vollringscanner, der eine integrierte CT-Funktion aufweist, empfohlen. Die Untersuchung kombiniert den Vorteil der guten räumlichen Auflösung der CT mit der hohen Sensitivität zur Detektion von Tumorgewebe der PET-Untersuchung. Das PET-CT ist vor allem bei SCLC indiziert, da nach einer Studie in ca. 20% der Fälle hierdurch eine Hochstufung aus dem *limited-disease-* in das *extensive-disease-* Stadium erfolgte (Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Griesinger et al. 2018).

Nach der Diagnosestellung erfolgt entsprechend der Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation sowie der Tumorentität die Auswahl einer Therapie, welche entweder eine operative Tumorentfernung, Radio- oder Chemotherapie oder eine Kombination der verschiedenen Verfahren umfasst. In die Entscheidungsfindung bezüglich einer optimalen Therapie müssen der Allgemeinzustand, die lungenfunktionelle Reserve, das perioperative kardiovaskuläre Risiko sowie die Komorbiditäten des Patienten miteinbezogen werden (Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Griesinger et al. 2018).

Die operative Entfernung des Primärtumors eines nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms in den Stadien I, II oder IIIa ist die Therapie der Wahl und erfolgt anhand einer Lobektomie, was einer Entfernung des betroffenen Lungenlappens entspricht, einer Bilobektomie oder einer Pneumektomie, der Entfernung des gesamten Lungenflügels. Je kleiner das resezierte Areal, desto besser ist die postoperative Lungenfunktion. Gleichzeitig steigt hiermit jedoch das Risiko der Entwicklung eines Rezidivs. Patienten mit initial nicht operablen nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen in den Stadien I und II sowie im Stadium III profitieren von einer primären

Radiotherapie. Zu dieser Gruppe gehören auch Patienten mit hohem kardiovaskulären Risiko, welches unter anderem durch eine instabile koronare Herzkrankheit, eine dekompensierte Herzinsuffizienz, eine schwere Klappenerkrankung oder durch signifikante Arrhythmien definiert ist. Postoperativ ist eine Strahlentherapie nur bei inkompletter Resektion oder bei einem N2- oder N3-Status indiziert. Ab dem Stadium III ist eine kombinierte Strahlenchemotherapie mit einem besseren Outcome assoziiert als eine Strahlentherapie allein. Es besteht zudem die Möglichkeit, die Chemotherapie als Monotherapie einzusetzen, wobei diese entweder neoadjuvant zur Induktion eines Downgradings oder adjuvant nach einer Operation erfolgen kann. Die adjuvante Chemotherapie wird bereits ab dem Stadium II zur Senkung des Rezidivrisikos sowie zur Mitbehandlung von Mikrometastasen empfohlen. Bei Patienten in den fortgeschrittenen Erkrankungsstadien IIIB oder IV erfolgt eine interdisziplinäre und multimodale Behandlung mit operativen Möglichkeiten, Chemotherapie, kombinierter Strahlenchemotherapie und radiotherapeutischen Verfahren (Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Griesinger et al. 2018).

Das zunehmende Verständnis für die Krebsentstehung auf molekularer Ebene eröffnet die Möglichkeit einer zielgerichteten rezeptor- und ligandenspezifischen Therapie, die bisher vor allem in der Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms eingesetzt wird. Entdeckt wurden Mutationen im EGFR-Gen (englisch: *Epidermal Growth Factor Receptor*), die unter anderem Deletionen im Exon 19 oder Mutationen im Exon 21 beinhalten. Hierfür stehen spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Behandlung zur Verfügung. Bedeutsam sind auch Mutationen im KRAS-Gen, im MET-Gen, im BRAF-Gen sowie chromosomale Translokationen, die das ALK-Gen betreffen. Die entsprechenden zielgerichtet wirkenden Arzneimittel werden zurzeit jedoch häufig erst noch im Rahmen von Studien getestet (Griesinger et al. 2018, Medizin 2019).

Die Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) richtet sich wie beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom nach der Stadieneinteilung, welche hier nach *very limited disease* (VLD), *limited disease* (LD) und *extended disease* (ED) erfolgt. Nur etwa 5% der Patienten mit SCLC befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose im VLD-Stadium. Hier wird von den Leitlinien entweder eine kombinierte simultane Strahlenchemotherapie oder eine primär operative Entfernung mit adjuvanter Chemotherapie empfohlen. Es soll bei beiden Therapieoptionen eine prophylaktische Schädelbestrahlung im Anschluss an die jeweilige Behandlung erfolgen. Ungefähr 1/3 der SCLC-Patienten werden im *limited-disease*-Stadium diagnostiziert. Es besteht ein kurativer Therapieanspruch, wobei eine simultane

Strahlenchemotherapie hier die Standardtherapie darstellt. Eine prophylaktische Bestrahlung des Schädels ist zur Reduktion des Risikos einer Entstehung von Hirnmetastasen indiziert. Als alternative Therapie für ältere Patienten oder Patienten mit deutlich eingeschränktem Allgemeinzustand wird eine primäre Chemotherapie und im Anschluss eine Strahlentherapie empfohlen. Im *extensive-disease*-Erkrankungsstadium, in dem sich ca. 60-70% der Patienten bei Diagnosestellung befinden, sollte die Therapie in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand sowie von der Begleitsymptomatik multimodal mittels Chemotherapie, Radiotherapie sowie einer prophylaktischen Bestrahlung des Schädels erfolgen (Wolf et al. 2017).

## 2.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Als Chemokine bezeichnet man eine Gruppe der Zytokine mit einem Molekulargewicht von 8-15 kDa, die durch die Fähigkeit, eine gerichtete Migration von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration zu induzieren, definiert ist (Teicher und Fricker 2010, Chatterjee et al. 2014). Die Bezeichnung Chemokin wurde 1992 geprägt und steht für „chemotaktisches Zytokin“ (Balkwill 2004).

Die molekulare Signatur der Chemokine umfasst vier konservierte Cysteinreste, die zwei Disulfidbrücken bilden, das erste Cystein mit dem dritten und das zweite mit dem vierten. Entsprechend der Lage der ersten zwei im N-terminalen Bereich liegenden Cysteine werden Chemokine in C-, CC-, CXC- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine eingeteilt. Die Nomenklatur beschreibt die Anzahl an Nicht-Cystein-Aminosäuren X zwischen den Cysteinen C. Die C-Familie stellt insofern eine Ausnahme dar, als sie nur eine Gruppe von Cysteinresten enthält und folglich nur eine Disulfidbrücke ausgebildet werden kann (Zlotnik und Yoshie 2012, Wang et al. 2018). Die Disulfidbrücken sind verantwortlich für die Stabilisierung der streng konservierten Tertiärstruktur, die durch ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt sowie eine  $\alpha$ -Helix am C-Terminus geprägt ist (Hattermann und Mentlein 2013).

Die heute etwa 50 bekannten Chemokine entfalten ihre Funktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben membrandurchspannenden Helices. Dabei liegen drei Schleifen sowie der N-Terminus außerhalb der Zelle und der C-Terminus mit drei weiteren Schleifen intrazellulär. Typische Chemokinrezeptoren enthalten in der zweiten intrazellulären Schleife das sogenannte DRYLAIV-Motiv, bestehend aus einer charakteristischen Abfolge von Aminosäuren (Asp-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ile-Val). Diese ist entscheidend für eine effiziente Kopplung an die heterotrimeren G-Proteine (Maksym et al. 2009). Neben diesen typischen Rezeptoren sind bisher mindestens fünf atypische Rezeptoren bekannt. Diese zeichnen sich

dadurch aus, dass das DRYLAIV Motiv fehlt und sie zusätzliche Funktionen als Chemokin-Scavenger-Rezeptor oder als Transporter einnehmen können (Zlotnik und Yoshie 2012).

Die Nomenklatur der 20 bekannten Rezeptoren lehnt sich an der der Chemokine an, sodass die Einteilung in C-, CC-, CXC- und CX<sub>3</sub>C-Rezeptoren erfolgt (Sun et al. 2010). Generell sind Chemokine in der Lage, an verschiedene Rezeptoren zu binden. Jedoch werden einige Rezeptoren, darunter auch der Chemokinrezeptor CXCR4, ausschließlich durch ein bestimmtes Chemokin aktiviert. Dem Prinzip der Redundanz wird neben der Funktion einer Feinabstimmung von Immunreaktionen auch der Grund zugeschrieben, warum Mutationen einzelner Rezeptoren kompensiert werden können (Balkwill 2004, Busillo und Benovic 2007, Hattermann und Mentlein 2013).

Der Signalübertragungsweg bei Rezeptoraktivierung führt zur Transkription von Zielgenen, die an der Zellinvasion, Migration, dem Überleben sowie an Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Balkwill 2004). Die Hauptaufgabe der Chemokine liegt in der Chemotaxis, der gerichteten Migration von Immunzellen. Es lassen sich inflammatorische oder induzierbare Chemokine von homöostatischen beziehungsweise konstitutiven Chemokinen unterscheiden. Homöostatische Chemokine werden kontinuierlich exprimiert und regulieren physiologische Migrationsprozesse von Leukozyten und ihren Vorläufern. Sie tragen zusätzlich zur Entwicklung und Erhaltung von Geweben und Organen bei. Inflammatorische Chemokine werden aufgrund von entzündlichen Stimuli bei Infektionen oder Gewebeschäden exprimiert und sind so in der Lage, Leukozyten in Entzündungsregionen zu rekrutieren sowie das Überschreiten der endothelialen Barriere zu erleichtern (Hattermann und Mentlein 2013). Die Art und Anzahl der Chemokinrezeptoren auf einer einzelnen Zelle wird unter anderem durch die Abstammung und das Differenzierungsstadium der Zelle, Umweltfaktoren, das Vorhandensein von entzündlichen Zytokinen sowie durch Hypoxie beeinflusst. Man schreibt den Chemokinen zudem eine Rolle bei der Embryogenese, Organogenese, Angiogenese und bei der Angiostase zu (Balkwill 2004, Hattermann und Mentlein 2013).

### 2.2.1 Die CXCR4/CXCL12-Achse

Der CXC-Chemokinrezeptor 4 stellt einen sehr gut erforschten und relevanten Chemokinrezeptor dar. Der Rezeptor ist im Organismus weit verbreitet und wird unter anderem von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, B- und T-Lymphozyten, hämatopoetischen Vorläuferzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert. Zusätzlich besitzen Zellen des Blutgefäß-Endothels, des Zentralnervensystems wie Astrozyten und Mikroglia und Zellen

des Magen-Darm-Trakts diesen Chemokinrezeptor. CXCR4-exprimierende Zellen migrieren entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Konzentration an CXCL12, dem natürlichen Liganden dieses Rezeptors (Teicher und Fricker 2010, Chatterjee et al. 2014). Knochenmark, Blut und Lymphknoten sind hierbei die Gewebe mit den höchsten CXCL12-Konzentrationen. Zu den physiologischen Funktionen gehören die gerichtete Migration von Stammzellen und Immunzellen, die Organogenese des kardialen und neuronalen Systems sowie die Angiogenese und die Vaskularisation (Furusato et al. 2010, Chatterjee et al. 2014).

Der CXCR4 wird während der Embryonalperiode auf Vorläuferzellen exprimiert, wodurch eine Migration vom jeweiligen Ursprungsort zum endgültigen Bestimmungsort ermöglicht wird. Dort können sich die Zellen dann in Organe und Gewebe differenzieren (Domanska et al. 2013). Eine genetische Deaktivierung der CXCR4/CXCL12-Achse führt zu einem embryonal letalen Phänotyp, wobei Defekte in der Hämatopoese, Neurogenese, Angiogenese und Vaskularisierung des Verdauungstraktes, der Haut und Niere sowie in der Herzentwicklung, mit einer fehlerhaften Ausbildung des membranösen Anteils des Ventrikelseptums, gefunden wurden (Naumann et al. 2010, Sun et al. 2010, Janssens et al. 2018).

Seine Funktion übt der CXCR4-Rezeptor über die Aktivierung durch seinen natürlichen Liganden CXCL12 (CXCL12, wobei L für Ligand steht) aus. CXCL12 ist ein homöostatisches Chemokin, ebenfalls unter dem Namen SDF-1 (englisch: *Stromal Cell-Derived Factor-1*) bekannt, und kann zusätzlich zu CXCR4 an den atypischen Chemokinrezeptor CXCR7 binden. Das Chemokin wird konstitutiv in verschiedenen Organen exprimiert und sezerniert wie Leber, Lunge, Niere, Skelettmuskel, Herz, Haut, Knochenmark oder Gehirn. Eine gesteigerte CXCL12-Sekretion findet sich bei Gewebeschäden nach Herzinfarkt, nach Chemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung, Extremitätenischämie, toxischem Leberschaden oder übermäßigen Blutungen (Maksym et al. 2009, Sun et al. 2010, Chatterjee et al. 2014).

Bisher wurden sechs Isoformen von CXCL12/SDF-1, welche durch alternatives Spleißen aus einem einzigen Gen entstehen, nachgewiesen. SDF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\beta$ , SDF-1 $\gamma$ , SDF-1 $\delta$ , SDF-1 $\epsilon$  und SDF-1 $\phi$  haben eine als Signalpeptid fungierende Sequenz von 21 Aminosäuren gemeinsam und unterscheiden sich in der Anzahl an zusätzlichen Aminosäuren am Carboxylterminus. Während für die Isoformen eine unterschiedliche Gewebeverteilung belegt wurde, ist ihre funktionelle Bedeutung bisher nicht bekannt (Busillo und Benovic 2007, Nagasawa 2014). Die zwei Hauptisoformen von CXCL12 sind SDF-1 $\alpha$  und SDF-1 $\beta$  (Sun et al. 2010).



### 2.2.2 Signaltransduktion der CXCR4/CXCL12-Achse

Die Bindung von CXCL12 an den G-Protein gekoppelten CXCR4-Rezeptor als heptahelikales Transmembranprotein führt über die Aktivierung verschiedener Signalwege zu Chemotaxis, Zellproliferation und -überleben, erhöhten intrazellulären Calciumspiegeln sowie zur Transkription verschiedener Gene. Die Signalwege können sich in verschiedenen Geweben und Zelltypen voneinander unterscheiden (Teicher und Fricker 2010, Chatterjee et al. 2014). Der CXCR4 bindet primär heterotrimere G-Proteine. Es wurde zunächst angenommen, dass es sich um eine spezifische Bindung an  $G\alpha_i$  handelt. Heute ist bekannt, dass der CXCR4 auch mit anderen G-Proteinen wie  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_o$ , und  $G\alpha_s$  interagieren kann (Teicher und Fricker 2010).

Die Signaltransduktion läuft in zwei Schritten ab. Die erste Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand führt zu einer Konformationsänderung, welche wiederum zu einer verstärkten Wechselwirkung führt. Proteasen, die unter anderem durch neutrophile Granulozyten freigesetzt werden, sind in der Lage, die Wechselwirkung zu hemmen, indem sie die für die Wechselwirkung erforderlichen N-terminalen Reste von CXCL12 abspalten. So entsteht ein Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Deaktivierung des Rezeptors in einem entzündeten Areal (Busillo und Benovic 2007, Wang et al. 2018).

Nachdem der Rezeptor durch CXCL12 aktiviert wurde und an ein  $G\alpha_i$  gekoppelt hat, spaltet sich das heterotrimere G-Protein in seine  $\alpha_i$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten auf. Die  $\alpha_i$ -Untereinheit hemmt die Aktivität der Proteinkinase A (PKA), woraufhin die cAMP-Konzentration sinkt. Dies hat Auswirkungen auf die Regulation des Energiestoffwechsels und die Aktivierung von PKA-spezifischen Transkriptionsfaktoren wie das *cAMP Response Element-Binding Protein* (CREB). Weiterhin führt die  $G\alpha_i$ -Untereinheit unter anderem über die Aktivierung des PI3K/Akt-Weges zur direkten oder indirekten Aktivierung von NF- $\kappa$ B (englisch: *Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*), welcher einen großen Einfluss auf das Zellüberleben aufweist (Busillo und Benovic 2007, Teicher und Fricker 2010, Wang et al. 2018).

Freigesetztes  $G\beta\gamma$  aktiviert die Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Die PLC- $\beta$  hydrolysiert anschließend Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), was die Produktion von Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) zur Folge hat. Die sekundären Botenstoffe führen zu einer erhöhten  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie zu einer Aktivierung der Proteinkinase C. Zusätzlich werden durch die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade (englisch: *Mitogen-Activated Protein*) sowie des PI3K-Signalweges Prozesse über die Transkription von

Genen sowie Prozesse der Zellmigration und Zelladhäsion reguliert (Busillo und Benovic 2007, Teicher und Fricker 2010, Wang et al. 2018).

Durch Homodimerisierung von CXCR4 wird die Aktivierung eines JAK/STAT-Signalweges (Januskinase; STAT, englisch: *Signal Transducer and Activator of Transcription*) hervorgerufen. Diese G-Protein-unabhängige Signaltransduktion führt zur Phosphorylierung von JAK2 und JAK3, was zu einer Aktivierung und nukleären Translokation von verschiedenen STAT-Proteinen führt (Busillo und Benovic 2007, Chatterjee et al. 2014).

Die Regulierung der Signaltransduktion erfolgt durch Desensibilisierung mittels Phosphorylierung, Internalisierung und Abbau des Rezeptors. Die Phosphorylierung führt zu einer Bindung von Arrestin-2 und/oder Arrestin-3 und im Anschluss zu einer Internalisierung des Rezeptors. Nach der Internalisierung kann der Rezeptor entweder zum Abbau in das Lysosom transportiert oder wieder an die Plasmamembran zurückbefördert werden (Busillo und Benovic 2007).

### 2.2.3 Die CXCR7/CXCL12-Achse

Neben CXCR4 bindet dessen Ligand CXCL12 auch an den Chemokinrezeptor CXCR7. Der Rezeptor spielt eine Rolle bei der Regulierung der Immunantwort, der Angiogenese, bei der Stammzellmigration sowie bei der Metastasierung von bestimmten Krebsarten (Sun et al. 2010). Obwohl der CXCR7 den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zuzurechnen ist, löst er dennoch nicht die typischen Chemokin-induzierten Zellantworten wie z.B. eine Zellmigration aus (Naumann et al. 2010). Der Rezeptor wurde kürzlich in ACKR3 (englisch: *Atypical Chemokine Receptor 3*) umbenannt, da er zu der Familie der atypischen Chemokinrezeptoren gehört. Den meisten ACKRs fehlen funktionelle Domänen, wozu auch das konservierte DRYLAIV-Motiv am N-Terminus der zweiten intrazellulären Schleife gehört, für die Kopplung an G<sub>i</sub>-Proteine und die entsprechende nachfolgende Signalübertragung sowie für die Calcium-Signalübertragung. Der CXCR7-Rezeptor besitzt stattdessen die funktionelle Sequenz DRYLSIT (Asp-Arg-Tyr-Leu-Ser-Ile-Thr), welche für die fehlende Interaktion mit G<sub>i</sub>-Proteinen verantwortlich gemacht wird (Sanchez-Martin et al. 2013, Wang et al. 2018).

Der Rezeptor ist auf der Oberfläche von fetalen Leberzellen, reifen Placenten, aktiviertem Endothel sowie auf Tumorzellen zu finden. Weiterhin wird er auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten und B-Zellen exprimiert (Maksym et al. 2009). Man vermutet zusätzlich einen Zusammenhang zwischen der Expression von CXCR7 und der Fähigkeit von B-Zellen, sich zu Plasmazellen zu differenzieren, sodass man den CXCR7 als Marker für B-Gedächtniszellen ansehen kann (Maksym et al. 2009, Sun et al. 2010).

Dem Rezeptor wird vor allem im Rahmen der Embryogenese die Rolle eines „Scavengers“ in dem Sinne zugeschrieben, dass er CXCL12 bindet, dem Abbau zuführt und auf diese Weise eine Bindung des Liganden an den CXCR4 verhindert. Dadurch wird eine gerichtete Migration der CXCR4-exprimierenden Zellen entlang eines (durch den CXCR7 modifizierten) CXCL12-Gradienten hervorgerufen. Dies wird durch die 10-fach höhere Bindungsaffinität von CXCL12 zu CXCR7 unterstützt (Naumann et al. 2010, Memi et al. 2013). Studien weisen darauf hin, dass das Ausmaß der CXCR7-Expression die des CXCR4 reguliert und folglich das CXCR4/CXCL12-Signaling (indirekt) kontrolliert. Das heißt, eine verminderte CXCR7-Expression führt zu einem Anstieg des extrazellulären CXCL12-Spiegels, was wiederum zu einer vermehrten CXCL12-Bindung an den CXCR4 und letztendlich zu dessen Internalisierung und Abbau führt. Es gibt darüber hinaus Studien, die dem CXCR7 eine regulatorische Funktion hinsichtlich des G-Protein-Signalings zuschreiben, da er mit dem CXCR4 funktionelle Heterodimere bilden kann. Diese Heterodimere sind auf der einen Seite in der Lage, die CXCL12-induzierte Calcium-Signalübertragung zu verstärken und auf der anderen Seite die ERK1/2-Aktivierung zu verzögern sowie die Hemmung der cAMP-Produktion durch CXCR4 zu blockieren. Dieser Signalweg wird durch  $\beta$ -Arrestin vermittelt. Durch eine Aktivierung von CXCR7 allein oder als Heterodimer werden zusätzlich intrazelluläre Signalwege, einschließlich der Phosphorylierung von Akt und MAP-Kinasen und der Aktivierung von JAK2/STAT3, ausgelöst (Levoye et al. 2009, Sanchez-Martin et al. 2013, Hattermann und Mentlein 2013). In neueren Studien wird dem CXCR7 außerdem eine funktionelle Komponente zugeschrieben, die unabhängig von G-Proteinen ist (Sanchez-Martin et al. 2013).

In Versuchen mit CXCR7-Knock-out-Mäusen wurde eine Rolle des CXCR7 bei der Entwicklung von Endothelzellen, der Herzentwicklung und der B-Zell-Lokalisierung bewiesen. Knock-out-Mäuse sterben perinatal aufgrund von Herzklappenfehlbildungen (Levoye et al. 2009, Naumann et al. 2010). In den Knock-out-Studien zeigten die CXCR7-KD-Mäuse (KD, englisch: *Knock-Down*) jedoch eine normale Hämatopoese (Sierro et al. 2007, Gerrits et al. 2008).

Die Funktion des CXCR7 bei Tumoren wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die meisten Studien weisen jedoch darauf hin, dass eine CXCR7-Überexpression ebenso wie beim CXCR4 zu einem verstärkten Wachstum, einer höheren Aggressivität und einer vermehrten Metastasierung der Tumore führt (Maksym et al. 2009, Sun et al. 2010).

#### 2.2.4 Expression von CXCR4 und CXCR7 auf Tumorzellen

Die meisten Tumore epithelialen, mesothelialen oder hämatopoetischen Ursprungs enthalten neben Tumorzellen auch nicht-maligne Stromazellen. Stromazellen, die teilweise die dominierende Masse in einem Tumor sein können, umfassen beispielsweise Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Die lokale Produktion von Chemokinen durch Tumorzellen sowie durch Stromazellen bedingt vornehmlich das lokale Leukozyteninfiltrat. Zudem sind Tumorzellen in der Lage, Chemokinrezeptoren zu exprimieren. Dies gibt ihnen die Fähigkeit, auf Chemokingradienten zu reagieren, sodass eine organspezifische Metastasierung durch Wechselwirkungen zwischen Chemokinrezeptoren und Chemokingradienten angenommen wird. Krebszellen weisen unterschiedliche Profile von CC- und CXC-Chemokinrezeptoren auf (Balkwill 2004, Sun et al. 2010).

Der CXCR4 ist der am häufigsten in menschlichen und murinen Tumorzellen vorkommende Chemokinrezeptor. Er wurde in über 23 verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen, darunter in Nieren-, Lungen-, Gehirn-, Prostata-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs. Dabei sind häufig nicht alle Krebszellen im Primärtumor CXCR4-positiv, sondern nur eine Teilpopulation. Zu den physiologischen Funktionen der CXCR4/CXCL12-Achse gehören Überleben und Proliferation, Vaskularisierung sowie die gerichtete Migration von CXCR4-positiven Zellen entlang eines CXCL12-Gradienten. Dementsprechend trägt eine CXCR4-Expression auf Tumorzellen zum Tumorwachstum, zur Invasion, zur Vaskularisierung sowie zur Metastasierung bei (Balkwill 2004, Chatterjee et al. 2014).

In Bezug auf die Metastasierung wird angenommen, dass die CXCR4-positiven Zellen entlang des CXCL12-Gradienten migrieren, da die häufigsten Fernmetastasen in den Organen entstehen, die eine hohe physiologische CXCL12-Expression aufweisen. Das Knochenmark, die Leber, die Lunge und die Lymphknoten zeigen eine hohe physiologische CXCL12-Expression und stellen somit die häufigsten Lokalisationen von CXCR4-positiven Tumormetastasen dar (Balkwill 2004, Domanska et al. 2013, Zhao et al. 2015). CXCR4-positiv Monozyten in der Mikroumgebung von Tumoren lagern sich im perivaskulären Bereich ab und setzen angiogene Faktoren wie Angiopoetin und VEGF-A (englisch: *Vascular Endothelial Growth Factor A*) frei und rekrutieren aus dem Knochenmark stammende Endothelzellvorläufer für die Bildung des Gefäßsystems. Eine erhöhte Vaskularisierung des Tumors bewirkt eine bessere Versorgung mit den für das Wachstum notwendigen Nährstoffen und mit Sauerstoff (Vandercappellen et al. 2008, Teicher und Fricker 2010). Indem die CXCR4/CXCL12-Achse eine Hochregulation der Matrix-Metalloprotease 13 induziert, wird der Invasionsprozess und damit einhergehend auch die Metastasierung von Tumorzellen durch

den Abbau der extrazellulären Matrix sowie der Basalmembran gefördert (Vandercappellen et al. 2008). Die Beteiligung der Achse am Tumorwachstum stützt sich unter anderem auf die Beobachtung einer gesteigerten Expression von Wachstumsfaktoren (Chatterjee et al. 2014). Die CXCR4/CXCL12-Achse fördert das Überleben, die Invasion und die Differenzierung von Krebsstammzellen und ist gleichermaßen in der Lage, myeloische Stammzellen aus dem Knochenmark zu rekrutieren. Diese sogenannten Krebsstammzellen (CSCs) erhöhen das Risiko für ein Rezidiv und fördern die Chemotherapieresistenz (Furusato et al. 2010, Jung et al. 2013, Chatterjee et al. 2014).

Verschiedene Faktoren wie der Hypoxie-induzierte Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) und die Wachstumsfaktoren EGF (englisch: *Epidermal Growth Factor*) und VEGF (englisch: *Vascular Endothelial Growth Factor*) sowie der Transkriptionsfaktor *Nuclear Respiratory Factor-1* (NRF-1) fördern eine erhöhte CXCR4-Expression (Teicher und Fricker 2010, Chatterjee et al. 2014).

Kaemmerer et al. (2015) konnten zeigen, dass das Ausmaß der CXCR4-Expression bei bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien (BP-NEN) mit einer zunehmenden Malignität einhergeht (Kaemmerer et al. 2015b). Dies wurde auch für weitere Tumorentitäten festgestellt, sodass ein Nachweis einer erhöhten CXCR4-Expression als prognostisch ungünstig angesehen wird (Chatterjee et al. 2014, Kaemmerer et al. 2015b, Zhao et al. 2015).

CXCL12 kann neben dem CXCR4 auch den Chemokinrezeptor CXCR7 binden. Der CXCR7 ist ähnlich wie der CXCR4 stark auf malignen Zellen und auf tumorassoziierten Blutgefäßen zu finden. Die Expression auf Tumorzellen ist mit einem Wachstums- und Überlebensvorteil, einer verstärkten Angiogenese, einer erhöhten Metastasierungsrate sowie einer verstärkten Adhäsionseigenschaft assoziiert (Vandercappellen et al. 2008, Maksym et al. 2009, Wang et al. 2018). Abhängig vom Tumortyp kann der CXCR7 entweder alleine oder mit dem CXCR4 koexprimiert vorliegen. Je nach Krebszelllinie variiert die Beeinflussung des CXCR4 durch den CXCR7, sodass es entweder zu einer verstärkten oder verminderten Signaltransduktion über den CXCR4 kommen kann (Janssens et al. 2018, Wang et al. 2018).

Der CXCR7 scheint stark auf endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) vertreten zu sein. Die über das CXCL12 gesteuerte transendotheliale Migration der EPCs führt zu einer Förderung der Angiogenese und der Migration maligner Zellen. Durch die Erhöhung der VEGF-Produktion sowie der Gefäßdichte trägt der CXCR7 zum Wachstum des Primärtumors bei. Der Chemokinrezeptor ist in der Lage, das CXCR4/CXCL12-vermittelte Metastasierungsverhalten

zu beeinflussen. Studien zeigen hierbei, dass der CXCR7 entweder eine erhöhte Metastasierung fördern oder aber auch verhindern kann (Janssens et al. 2018, Wang et al. 2018).

Wie bei der Regulierung des CXCR4-Expressionsmusters spielt auch bei der CXCR7-Expression die Mikroumgebung eine entscheidende Rolle. Begünstigt wird die CXCR7-Expression vor allem unter hypoxischen Bedingungen und der damit einhergehenden Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ . Die Expression steht auch im Zusammenhang mit einer Methylierung von Tumorsuppressorgenen wie zum Beispiel HIC1 (englisch: *Hypermethylated In Cancer 1*), mit einer vermehrten Expression von Transkriptionsfaktoren sowie mit einem Mangel an microRNAs (miRNAs), beispielsweise miRNA-430 (Janssens et al. 2018, Wang et al. 2018).

### 2.2.5 Antagonisierung von Chemokinrezeptoren

Aufgrund der Beteiligung von CXCR4 und CXCR7 an pathologischen Vorgängen wie der Neoangiogenese, dem Wachstum, der Invasivität, der Metastasierung und der Chemotherapieresistenz von Tumoren sowie auch an entzündlichen Prozessen oder AIDS, stellt eine Antagonisierung dieser Rezeptoren einen interessanten pharmakologischen Ansatz dar (Wang et al. 2018).

AMD3100 (AnorMed3100, Plerixafor®) wurde Anfang der 1990er Jahre für die Behandlung des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) entwickelt. Die antivirale Wirkung konnte für die T-tropen HI-Viren, die den CXCR4 als Co-Rezeptor nutzen, in vitro nachgewiesen werden (Fricker et al. 2006, Wang et al. 2018). Während der Untersuchung von AMD3100 an gesunden Freiwilligen in Phase-I-Studien wurde als unerwartete Nebenwirkung ein dosisabhängiger, starker Anstieg von Leukozyten im peripheren Blut, der innerhalb von 6 Stunden auftrat, festgestellt. Bei den mobilisierten Zellen handelt es sich um CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen. Seit 2009 ist Plerixafor® daher in Kombination mit G-CSF (englisch: *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) für die Stammzellmobilisation im Rahmen der Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom oder Non-Hodgkin-Lymphom durch die Europäische Arzneimittelagentur zugelassen (Domanska et al. 2013, De Clercq 2015).

AMD3100 ist eine kleinmolekulare Verbindung mit zwei Cyclamringen, die durch einen Phenylenlinker verbunden sind. Das Bicyclam ist bei physiologischem pH-Wert durch zwei protonierte Stickstoffatome im Cyclamring gekennzeichnet, die spezifische Ladungswchselwirkungen mit den Carboxylatgruppen von CXCR4 ausbilden (Teicher und Fricker 2010, Fricker 2013).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass AMD3100 ein spezifischer CXCR4-Antagonist ist, der gezielt den CXCL12-vermittelten Calciumeinstrom in die Zelle inhibiert

(Fricker et al. 2006, De Clercq 2009). Obwohl man zunächst davon ausging, dass AMD3100 keine Interaktionen mit anderen Chemokinrezeptoren aufweist, konnte kürzlich eine allosterische agonistische Wirkung von AMD3100 am CXCR7 nachgewiesen werden. Analog zur Aktivierung des CXCR7-Rezeptors durch das CXCL12, ist AMD3100 in der Lage,  $\beta$ -Arrestin zu rekrutieren. Das Bicyclam erhöht zudem die CXCL12-Bindung an den CXCR7 und begünstigt die CXCL12-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors (De Clercq 2009, Kalatskaya et al. 2009, Wang et al. 2018).

Außer AMD3100 wurden mittlerweile neben weiteren CXCR4-Antagonisten wie TN14003, ALX40-4C oder AMD3465 auch spezifische CXCR7-Inhibitoren entwickelt. Substanzen wie CCX733 oder CCX266, CXCR7-siRNA oder CXCR7-Antikörper finden bisher allerdings nur in Versuchsmodellen *in vitro* oder *in vivo* Anwendung (Bodart et al. 2009, Sun et al. 2010, Wang et al. 2018).

Eine Blockierung der CXCR4- und CXCR7-vermittelten Signalwege, beispielsweise mit dem nicht-peptidischen CXCR4-Antagonisten AMD3100, gilt aufgrund der aktuellen Studienlage inklusive der bekannten pathophysiologischen Funktionen der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse als vielversprechende Therapieoption bei Tumoren mit hoher CXCR4-Expression (Chatterjee et al. 2014, Singla et al. 2015, Wang et al. 2018).

### 2.3 Murines Lungentumor-Modell

Der Prozess der Kanzerogenese ist komplex und umfasst mehrere Schritte, über Veränderungen von genetischem und epigenetischem Material, einem vermehrten Wachstum, einer Vaskularisierung des Tumors, Entzündungsreaktionen bis zu Interaktionen des Tumorgewebes mit seiner Mikroumgebung. Die Etablierung klinisch relevanter und realitätsnaher Tumormodelle ist notwendig für ein besseres Verständnis der Pathogenese und birgt die Möglichkeit, neue Therapieoptionen zu erforschen. Es wird grundsätzlich zwischen spontanen, chemisch induzierten, transgenen Knock-in- oder Knock-out-Modellen und Transplantationsmodellen unterschieden (Heijstek et al. 2005). Die Wahl eines murinen Modells begründet sich in den anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Maus. Zusätzlich sind die hier zu untersuchenden Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowie deren natürlicher Ligand CXCL12 zwischen den beiden Arten stark konserviert (Dutt und Wong 2006).

Um die Rolle von CXCR4 in den Lungentumoren untersuchen und einen möglichen protektiven Effekt von AMD3100 *in vivo* überprüfen zu können, wurde in der Arbeitsgruppe von Frau apl. Prof. Dr. Lupp im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena ein von Keohavong et al. (2011) beschriebenes, realitätsnahes murines Lungentumormodell etabliert. Die Tumorinduktion erfolgt hierbei durch eine kombinierte Verabreichung des Nitrosamin-Ketons NNK, einem Nikotin-Metaboliten, und von Lipopolysacchariden (LPS) gramnegativer Bakterien über einen Zeitraum von 17 Wochen (Keohavong et al. 2011).

Die tabakspezifischen Nitrosamine 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und N-Nitrosornicotin (NNN) wurden durch die IARC als Karzinogene der Gruppe 1 für Menschen eingestuft und spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Lungentumoren. Das Nitrosamin-Keton NNK ist in der Lage, nach einer Cytochrom-P450-abhängigen Metabolisierung und Aktivierung mit nukleophilen DNA-Bestandteilen zu DNA-Addukten zu reagieren. Zusätzlich kann es auch zu einer Alkylierung von DNA-Basen kommen. Die Bildung von DNA-Addukten und von alkylierten DNA-Basen können zu Basenfehlpaarungen und damit zu Mutationen führen (Wang et al. 2019).

Lipopolysaccharide (LPS) bestehen aus Kohlenhydrat- und Lipidanteilen und befinden sich in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien. LPS sind an der Zelladhäsion beteiligt, können B- und T-Lymphozyten, Granulozyten und mononukleäre Zellen aktivieren und sind zudem als Endotoxin in der Lage, eine Vielzahl an pathophysiologischen Reaktionen wie einen



septischen Schock auszulösen (Zdorovenko et al. 2019). Epidemiologische Studien haben einen Zusammenhang zwischen einer chronischen Entzündung von Lungengewebe und einem erhöhten Risiko zur Entwicklung von Lungentumoren aufgezeigt (Keohavong et al. 2011).

Keohavong et al. (2011) untersuchten in vier Gruppen mit jeweils 15 Mäusen die NNK-induzierte Entstehung von Lungentumoren in Abhängigkeit von einer durch LPS ausgelösten chronischen Entzündung der Atemwege. Dazu erhielten die Tiere entweder nur LPS oder nur NNK oder eine Kombination aus LPS und NNK über einen Zeitraum von 16 Wochen. Die vierte Gruppe stellte die Kontrollgruppe dar und bekam lediglich eine Natriumchlorid-Lösung verabreicht. Am ersten Tag jeder Woche erfolgte über den gesamten Zeitraum eine intranasale LPS-Gabe von 5 µg in 30 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung. Am ersten und dritten Tag nach der LPS-Verabreichung wurde den Tieren in den ersten vier Behandlungswochen 3 mg NNK in 200 µl Natriumchlorid-Lösung intraperitoneal injiziert.

In der anschließenden Auswertung wurden in den Versuchsgruppen, bei denen nur NNK oder NNK und LPS appliziert wurde, Adenome und Adenokarzinome in der Lunge gefunden. In der nur mit LPS behandelten Gruppe wurde histologisch vor allem perivaskulär ein vermehrtes Auftreten von Entzündungszellen wie Makrophagen und Lymphozyten festgestellt. Hier fanden sich keine Tumore. Bei den Kontrolltieren wurde ausschließlich histologisch gesundes Gewebe ohne einen Nachweis von Tumoren oder Entzündungsinfiltraten beobachtet (Keohavong et al. 2011).

Die Kombination aus dem tabakspezifischen Karzinogen NNK und einer durch LPS ausgelösten chronischen Bronchitis repräsentiert eine realitätsnahe Ätiologie und Pathogenese von Lungentumoren.

### 3. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollte an einem murinen Lungentumormodell eine Charakterisierung der entstandenen Tumore mittels immunhistochemischer Färbungen sowie ein möglicher therapeutischer Effekt des nicht-peptidischen Bicyclams AMD3100, welches eine antagonistische Wirkung auf den CXCR4- sowie eine partialagonistische Wirkung auf den CXCR7-Rezeptor hat, untersucht werden. Eine Überexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 wurde bereits bei einer Vielzahl von Tumoren, einschließlich Bronchialkarzinomen, beschrieben, wobei eine erhöhte Präsenz der Rezeptoren mit einer verstärkten Proliferation, Invasivität, Metastasierung, Neovaskularisierung und Chemotherapieresistenz der Tumore in Verbindung gebracht wird.

In der Arbeitsgruppe von Frau apl. Prof. Dr. Lupp im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena konnte ein realitätsnahes murines Lungentumormodell etabliert werden, bei dem die Tumorinduktion durch eine kombinierte Verabreichung des Nitrosamin-Ketons NNK, einem Nikotin-Metaboliten, mit Lipopolysacchariden (LPS) gramnegativer Bakterien über einen Zeitraum von 17 Wochen erfolgt. Alle Tiere entwickelten dabei zahlreiche Lungentumore.

Die Experimente sollten an drei transgenen Mauslinien, an *Cxcr4-eGFP*-Mäusen, an *Cxcr7-eGFP*-Mäusen und an *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-Mäusen, erfolgen. *Cxcr4*- bzw. *Cxcr7-eGFP*-Mäuse exprimieren ein *eGFP*-Reportergen unter der Kontrolle des murinen *Cxcr4*- bzw. *Cxcr7*-Promotors. Dies ermöglicht die Erfassung einer CXCR4-Expression bzw. CXCR7-Expression sowohl direkt mittels eines Anti-CXCR4- oder Anti-CXCR7-Antikörpers als auch indirekt über die *eGFP*-Expression. Speziell für den Nachweis des CXCR7 ist dies von Vorteil, da noch keine (käuflichen) Antikörper für diesen Rezeptor verfügbar sind. Die *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-Mäuse ermöglichen einen indirekten Nachweis einerseits des CXCR4 über das *eGFP* und andererseits des CXCL12 über das rot fluoreszierende Protein (RFP). Zusätzlich weisen sie eine erhöhte Expression eines CXCL12-RFP-Fusionsproteins auf und ermöglichen somit die Untersuchung des Einflusses von CXCL12 auf die Tumorentstehung.

Im Einzelnen sollten durch das Projekt folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Kommt es durch eine Behandlung der Tiere mit AMD3100 zu einer Reduktion der Anzahl der Tumore, der Tumorgroße und der Metastasen und welche der Tumore (kleinzellige, nichtkleinzellige Tumore) sprechen auf diese Behandlung an?
- 2.) Welcher Tumorentität entsprechen die induzierten Tumore und welche Tumormarker werden exprimiert?

- 3.) Wie verändert sich das CXCR4-Expressionsmuster in den Tumoren durch die Behandlung der Tiere mit AMD3100?
- 4.) Weisen die Tumore neben der CXCR4- auch eine CXCR7-Expression auf und wie verändert sich das CXCR7-Expressionsmuster durch die Behandlung mit AMD3100?
- 5.) Welchen Einfluss hat eine verstärkte Expression des endogenen CXCR4- und CXCR7-Liganden CXCL12 auf die Tumorentstehung und wie wirkt sich hier eine Behandlung der Tiere mit AMD3100 aus?
- 6.) Weisen die Tumore eine vermehrte Vaskularisation auf und wie verändert sich diese durch die Behandlung der Tiere mit AMD3100?
- 7.) Kommt es zu einer verstärkten Einwanderung von Immunzellen in die Tumore? Welcher Art sind diese Immunzellen und ändert sich das Bild in Abhängigkeit von der Behandlung der Tiere mit AMD3100?

Mittels immunhistologischer Färbungen erfolgte eine Charakterisierung der Tumore in Bezug auf die Tumorentität. Zum Einsatz kamen hierfür spezifische Antikörper gegen die neuroendokrinen Marker Chromogranin A, Synaptophysin und NCAM (CD56), gegen SCCA1/2 und Zytokeratin (34 $\beta$ E12) als Marker für Plattenepithelkarzinome sowie gegen MUC1/EMA (englisch: *Mucin 1/Epithelial Membrane Antigen*) und Panzytokeratin als Marker für Adenokarzinome. Mittels Immunfärbungen gegen CD3, zum Nachweis von T-Lymphozyten, CD20, als Marker für B-Lymphozyten, und F4/80, zum Nachweis von Makrophagen, wurden Immunzellen von Tumorzellen differenziert. Mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 sollte die mitotische Aktivität der Tumorzellen dargestellt werden. Weiterhin sollte die (Neo-)Angiogenese in den Tumoren durch einen gefäßmarkierenden Anti-CD34-Antikörper aufgezeigt werden. Zur weiteren Charakterisierung der Tumore dienten Immunfärbungen gegen CD133 als Stammzellmarker und gegen den Somatostatinrezeptor SSTR2, welcher bei einem hohen Prozentsatz der kleinzelligen Bronchialkarzinome beim Menschen nachweisbar ist (Kaemmerer et al. 2015a). Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen das eGFP, den CXCR4 und das CXCL12 sollte außerdem auch die Expression des CXCR4 und des CXCR7 sowie die Verteilung des Liganden CXCL12 aufgezeigt werden.

Abschließend sollte zur Beantwortung der Frage nach einer möglichen Koexpression der verschiedenen Tumormarker eine Doppelmarkierung von eGFP mit NCAM, SCCA1/2 oder MUC1/EMA, von MUC1/EMA mit SCCA1/2 oder Synaptophysin sowie ergänzend auch von SCCA1/2 mit Synaptophysin durchgeführt werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Mausstämme und Behandlung

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen lag ein vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz genehmigter Tierversuchsantrag mit der Registriernummer 02-045/14 vor. Es wurden in vier Versuchsreihen drei verschiedene transgene Mauslinien auf CD1-Background verwendet. Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich an männlichen Tieren, da das NNK über das Cytochrom-P450-System aktiviert werden muss und bei Mäusen ein sehr ausgeprägter geschlechtsabhängiger Unterschied in der Metabolisierungskapazität über das Cytochrom-P450-System besteht, mit wesentlich höheren Enzymaktivitäten bei den männlichen Tieren. Die Mäuse waren bei Behandlungsbeginn sieben Wochen alt. In Versuchsreihe 1 und 3 wurden *Cxcr4-eGFP*-BAC Mäuse (BAC, englisch: *Bacterial Artificial Chromosome*), in Versuchsreihe 2 *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse und in Versuchsreihe 4 *Cxcr7-eGFP*-BAC-Mäuse verwendet. Die transgenen Mäuse exprimieren ein eGFP-Reportergen (eGFP, englisch: *enhanced Green Fluorescent Protein*) unter der Kontrolle des murinen *Cxcr4*- beziehungsweise *Cxcr7*-Promotors. Die Tiere der zweiten Versuchsreihe weisen ein Fusionsprotein aus dem natürlichen Liganden CXCL12 und dem Produkt des Reportergens RFP (RFP, englisch: *Red Fluorescent Protein*) auf, sodass zusätzlich dieses Fusionsprotein abhängig vom murinen *Cxcl12*-Promotor exprimiert wird, welches am CXCR4 und am CXCR7 agonistisch wirken kann.

Die Mäuse wurden im institutseigenen Tierhaus ausschließlich für Versuchszwecke gezüchtet und gehalten. Die Tiere saßen jeweils zu zweit oder zu dritt unter standardisierten Haltungsbedingungen in Typ-II-Makrolonkäfigen. Diese beinhalten den freien Zugang zu Futter (Altromin 1324-Maus-Haltungsfutter, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage/Deutschland) und Wasser, eine Raumtemperatur von  $22 \pm 2$  °C, eine Luftfeuchtigkeit von etwa 55% sowie einen Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden.

Die Tumorinduktion erfolgte durch eine kombinierte Verabreichung des Nitrosamin-Ketons NNK (Toronto Research Chemicals, Toronto/Kanada) und von Lipopolysacchariden (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland) über einen Zeitraum von 17 Wochen. Unter leichter Narkose mit Isofluran (Isofluran CP®, cp-pharma, Burgdorf/Deutschland) erhielten die Tiere jeweils am ersten Tag der Woche über den gesamten Behandlungszeitraum 5 µg LPS in 30 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in Form einer intranasalen Instillation. Am 1. und am 3. Tag von Woche 1 bis 4 wurden zweimal täglich 3

mg NNK in 200 µl Natriumchlorid-Lösung intraperitoneal injiziert. Zur Überprüfung des Tumormodells in Bezug auf eine spontane Karzinogenese wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, welche keine Tumorinduktion erhielt. Zusätzlich zu der Kontrollgruppe wurde eine Gruppe an Tieren lediglich mit LPS behandelt, sodass auch die alleinigen Auswirkungen einer chronischen Inflammation auf die Tumorgenese untersucht werden konnten.

Nach erfolgter chemischer Induktion der Tumore wurde in den jeweiligen Interventionsgruppen das in phosphatgepufferter Salzlösung gelöste AMD3100 (Tocris Bioscience, Bristol/Großbritannien) mit einer Abgabegeschwindigkeit von 25 µg/Stunde subkutan verabreicht. Hierzu wurde eine osmotische Minipumpe (ALZET Osmotic Pumps, DURECT Corporation, Cupertino, Kalifornien/USA) in das Subkutangewebe unterhalb des rechten Schulterblatts implantiert. Die Behandlung wurde über zwei Wochen durchgeführt. Um einen Eigeneffekt des Lösungsmittels auszuschließen, erhielten die Tiere, die nicht mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 behandelt wurden, über die zwei Wochen 1 µl/h des Lösungsmittels PBS über die osmotischen Minipumpen verabreicht. Am Ende der Behandlungszeit wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran (5 Vol%) getötet, die Lungen und die Lebern entnommen, sofort in 10%igem Formalin fixiert und in dieser Formalin-Lösung bis zur endgültigen Aufarbeitung gelagert.

Ein Überblick über die Versuchsreihen sowie den Ablauf der Behandlung ist der Tabelle 3 und der Abbildung 1 zu entnehmen.

*Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsreihen und die Behandlung*

	Kontrollgruppe	Nur LPS	LPS+NNK	LPS+NNK +AMD3100	Gesamt
<b>Versuchsreihe 1</b> Cxcr4-eGFP	0	6	5	0	11
<b>Versuchsreihe 2</b> Cxcl12- Cxcl12RFP/ Cxcr4-eGFP	1	0	5	3	9
<b>Versuchsreihe 3</b> Cxcr4-eGFP	8	0	5	6	19
<b>Versuchsreihe 4</b> Cxcr7-eGFP	3	0	9	8	20
<b>Gesamt</b>	12	6	24	17	<b>59</b>

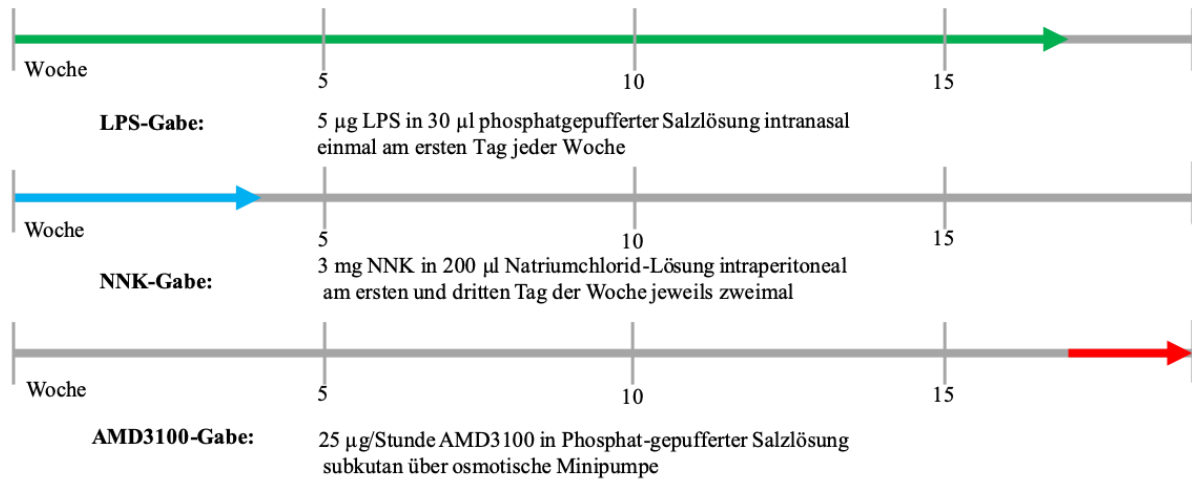


Abbildung 1: Behandlungsschema mit der Gabe von LPS (grün), NNK (blau) und AMD3100 (rot)

#### 4.1.2 Chemikalien und Lösungen

Den Tabellen 4 und 5 sind die Art und Herkunft der verwendeten Chemikalien und die in der Arbeit eingesetzten Lösungen einschließlich deren Herstellung zu entnehmen.

Tabelle 4: Art und Herkunft der in der Arbeit verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Lieferant und Herkunft
<b>AMD3100</b>	Tocris Bioscience, Bristol/Großbritannien
<b>3-Amino-9-ethylcarbazol</b>	BioGenex, Fremont, Kalifornien/USA
<b>Ammoniaklösung 25%</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
<b>Citronensäure-Monohydrat ≥ 99,5%</b>	Karl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
<b>DePex</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg/Deutschland
<b>Diamidinphenylindol (DAPI)</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
<b>Diazabicyclooctan</b>	Karl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
<b>Dinatriumhydrogenphosphat ≥ 99,5%</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
<b>Eosin-Y-Lösung</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
<b>Ethanol 99,8%</b>	Echter Nordhäuser Spirituosen GmbH, Nordhausen/Deutschland
<b>Formalin 10% v/v</b>	J.T. Baker, Deventer/Niederlande
<b>Gesättigte Pikrinsäure (1,3% in H<sub>2</sub>O)</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
<b>Glycerin ≥ 99,5%</b>	Karl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
<b>Isofluran CP®</b>	cp-pharma, Burgdorf/Deutschland
<b>Isopropanol</b>	Karl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
<b>Kaliumchlorid ≥ 99,5%</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
<b>Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 99,0%</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland

<b>Lipopolysaccharid (LPS) Escherichia coli 0111:B4</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
<b>Mayer's Hämatoxylin-Lösung</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
<b>Methanol ≥ 99,0%</b>	Karl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
<b>Mowiol 4-88 p.a.</b>	Karl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
<b>Natriumchlorid ≥ 99,5%</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
<b>Natriumcitrat-Dihydrat ≥ 99,0%</b>	Karl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
<b>Natriumdihydrogenphosphat ≥ 99,9%</b>	Karl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
<b>Natriumhydroxid p.a.</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
<b>Nitrosamin-Keton NNK</b>	Toronto Research Chemicals, Toronto/Kanada
<b>Paraffin-Pellets (Schmelzpunkt 56-58°C)</b>	Medite GmbH, Burgdorf/Deutschland
<b>Perjodsäure-Lösung</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
<b>Rinderserumalbumin (RSA) p.a.</b>	PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich
<b>Schiff's Reagenz</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
<b>Siriusrot (Direct Red 80)</b>	Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm/Deutschland
<b>Thiomersal</b>	AppliChem, Darmstadt/Deutschland
<b>Tissue-Tek-O.C.T.-Compound</b>	Sakura Finetec Germany GmbH, Staufen/Deutschland
<b>Titrisol® 1N HCl</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
<b>TRIS-Hydrochlorid ≥ 99,9%</b>	Karl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
<b>Triton X-100</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
<b>Wasserstoffperoxid-Lösung 30%</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
<b>Xylol-Isomergemisch &gt; 98,0%</b>	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland

*Tabelle 5: Übersicht über verwendete Lösungen und deren Herstellung*

<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>	<b>Chemikalien und Lösung</b>
<b>0,01 N Salzsäure</b>	10 ml ad 1000 ml	Titrisol® 1N HCl Aqua bidestillata
<b>Ammoniakwasser</b>	1,4 ml 248,6 ml	Ammoniak-Lösung 25% Aqua bidestillata
<b>Arbeitspuffer FFM (1% RSA; 0,3% Triton in TPBS)</b>	1 g 99 ml	RSA TPBS-T
<b>Blockierungspuffer FFM (3% RSA; 0,3% Triton in TPBS)</b>	0,75 g 24,25 ml	RSA TPBS-T
<b>Boratpuffer (pH 8,5) (FFM)</b>	0,618 g 80 ml pH-Einstellung 100 ml	Borsäure Aqua bidestillata 0,2 M NaOH Aqua bidestillata
<b>Citrat-Puffer (0,01 M; pH 6)</b>	18 ml 82 ml 900 ml pH-Einstellung	Citrat-Puffer-Stammlösung A Citrat-Puffer-Stammlösung B Aqua bidestillata mit Natriumhydroxid

<b>Citrat-Puffer-Stammlösung A</b>	21,01 g ad 1000 ml	Citronensäure-Monohydrat Aqua bidestillata
<b>Citrat-Puffer-Stammlösung B</b>	29,41 g ad 1000 ml	Natriumcitrat-Dihydrat Aqua bidestillata
<b>Lambda-Phosphatase-Lösung</b>	750 µl 750 µl 100 µl ad 5900 µl	Lambda-Phosphatase-Puffer MnCl <sub>2</sub> -Solution Lambda-Phosphatase Aqua bidestillata
<b>Mowiol-Eindecklösung</b>	5 g 2,4 g 12 ml 5 ml 25 mg/ml	Glycerin Mowiol 4-88 TRIS-Hydrochlorid (pH 8,5) Aqua bidestillata Diazabicyclooctan
<b>PBS-Puffer A (FFM)</b>	27,6 g ad 1000 ml	Natriumdihydrogenphosphat Aqua bidestillata
<b>PBS-Puffer B (FFM)</b>	35,63 g ad 1000 ml	Dinatriumhydrogenphosphat Aqua bidestillata
<b>Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4) (FFM)</b>	19 ml 81 ml	PBS-Puffer A PBS-Puffer B
<b>Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4) (IHC)</b>	8,18 g 1,77 g 0,20 g 0,24 g ad 1000 ml	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Aqua bidestillata
<b>Pikro-Siriusrot</b>	0,1 g ad 100 ml	Siriusrot Gesättigte Pikrinsäure (1,3% in H <sub>2</sub> O)
<b>TPBS-T: Thiomersal mit Phosphat-gepuffertes Salzlösung und 0,3% Triton X-100 (pH 7,4)</b>	1,5 ml 498,5 ml	Triton X-100 TPBS
<b>TPBS: Thiomersal mit Phosphat-gepuffertes Salzlösung (pH 7,4)</b>	2,4 g 1 g 18 g 100 ml ad 2000 ml pH-Einstellung	TRIS Thiomersal NaCl PBS (FFM) Aqua bidestillata 10 N HCl
<b>Tris-EDTA-Puffer (CD133-Antikörper; pH 9)</b>	1,21 g 0,37 g ad 1000 ml	Tris-Base EDTA Aqua bidestillata

**Abkürzungen:** FFM: Free-floating-Methode, IHC: Immunhistochemie an Paraffinschnitten

#### 4.1.3 Antikörper

Die sowohl bei der immunhistochemischen Färbung an paraffineingebetteten Präparaten als auch an den freischwimmenden Präparaten in der Free-Floating-Methode verwendeten Primärantikörper sind mit Antigenstrukturen, Klonbezeichnung, angewandter Verdünnung, Herkunft-Spezies, Klonalität sowie Hersteller in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt. Tabelle 8



sind die zusätzlich bei der immunhistochemischen Färbung verwendeten biotinylierten Sekundärantikörper bzw. gebrauchsfertigen Kits zu entnehmen. Bei der Free-Floating-Methode wurde als Sekundärantikörper Alexa-Fluor-488-gekoppeltes Ziegen-Anti-Huhn-IgG sowie Alexa-Fluor-555-gekoppeltes Streptavidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA) verwendet. Zusätzlich kamen bei der Free-Floating-Methode auch ein biotinyliertes Esel-Anti-Kaninchen- oder -Anti-Maus-IgG (Jackson Immune Research, West Grove, Pennsylvania/USA) als Sekundärantikörper zum Einsatz.

*Tabelle 6: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Primärantikörper*

Antigen	Klon	Verdünnung	Spezies	Klonalität	Methode
<b>CD3</b>	SP7	1:400	Kaninchen	monoklonal	IHC
<b>CD20</b>	L26	1:500	Maus	monoklonal	IHC
<b>CD34</b>	QBEnd 10	1:50	Maus	monoklonal	IHC
<b>CD133</b>	EPR20980-45	1:1000	Kaninchen	monoklonal	IHC
<b>CgA</b>	LK2H10	1:75 in V1/ 1:50 in V2	Maus	monoklonal	IHC
<b>CXCL12/SDF-1</b>	79018	1:500	Maus	monoklonal	IHC
<b>CXCR4</b>	UMB-2	1:2	Kaninchen	monoklonal	IHC
<b>Cytokeratin</b>	34BE12	1:500	Maus	monoklonal	IHC
<b>eGFP</b>		1:500	Huhn	polyklonal	FFM
<b>eGFP</b>		1:1000	Kaninchen	polyklonal	IHC
<b>F4/80</b>	MCA497GA	1:200	Ratte	monoklonal	IHC
<b>Ki-67</b>	MIB-1	1:75	Maus	monoklonal	IHC
<b>MUC1/EMA/CD227</b>	139H2	1:500	Maus	monoklonal	IHC, FFM
<b>NCAM (CD56)</b>	123C3	1:500	Maus	monoklonal	IHC, FFM
<b>Pan-Cytokeratin</b>	AE1/AE3 + 5D3	1:100	Maus	monoklonal	IHC
<b>SCCA1/2</b>	B-9	1:500	Maus	monoklonal	IHC, FFM
<b>SSTR2</b>	UMB-1	1:10	Maus	monoklonal	IHC
<b>Synaptophysin</b>	YE269	1:800 1:1000	Kaninchen	monoklonal	IHC, FFM

**Abkürzungen:** CgA: Chromogranin A, FFM: Free-Floating-Methode, IHC: Immunhistochemie an Paraffinschnitten

*Tabelle 7: Art und Herkunft verwendeter Primärantikörper*

Antigen	Klon	Lieferant und Herkunft
<b>CD3</b>	SP7	Abcam, Cambridge/Vereinigtes Königreich
<b>CD20</b>	L26	Dako Denmark A/S, Glostrup/Dänemark
<b>CD34</b>	QBEnd 10	Dako Denmark A/S, Glostrup/Dänemark
<b>CD133</b>	EPR20980-45	Abcam, Cambridge/Vereinigtes Königreich
<b>CgA</b>	LK2H10	BioLogo, Kronshagen/Deutschland

<b>CXCL12/SDF-1</b>	79018	R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota/USA
<b>CXCR4</b>	UMB-2	Epitomics, Burlingame, Kalifornien/USA
<b>Cytokeratin</b>	34BE12	Abcam, Cambridge/Vereinigtes Königreich
<b>eGFP (FFM)</b>		Aves Labs Inc., Tigard, Oregon/USA
<b>eGFP (IHC)</b>		Synaptic Systems GmbH, Göttingen/Deutschland
<b>F4/80</b>	MCA497GA	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien/USA
<b>Ki-67</b>	MIB-1	Dako Denmark A/S, Glostrup/Dänemark
<b>MUC1/EMA/CD227</b>	139H2	Abeomics Inc., San Diego, Kalifornien/USA
<b>NCAM (CD56)</b>	123C3	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas/USA
<b>Pan-Cytokeratin</b>	AE1/AE3 + 5D3	Abcam, Cambridge/Vereinigtes Königreich
<b>SCCA1/2</b>	B-9	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas/USA
<b>SSTR2</b>	UMB-1	Epitomics, Burlingame, Kalifornien/USA
<b>Synaptophysin</b>	YE269	Abcam, Cambridge/Vereinigtes Königreich

#### 4.1.4 Kits und gebrauchsfertige Reaktionssysteme

In der nachstehenden Tabelle 8 sind die Kits und gebrauchsfertigen Reaktionssysteme aufgeführt, die bei den immunhistochemischen Färbungen zum Einsatz kamen.

*Tabelle 8: Kits und gebrauchsfertige Reaktionssysteme für die immunhistochemische Färbung*

<b>Kit</b>	<b>Inhalt und Funktion</b>	<b>Lieferant und Herkunft</b>
<b>AEC Substrate Pack</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AEC Chromogen (Farbstoff)</li> <li>• Hydrogenperoxid-Acetat-Puffer-Konzentrat</li> </ul>	BioGenex, Fremont, Kalifornien/USA
<b>Lambda-Phosphatase: sc-200312</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lambda-Phosphatase (sc200312/sc-200312A)</li> <li>• Lambda-Phosphatase-Puffer</li> <li>• MnCl<sub>2</sub> solution</li> </ul>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Kalifornien/USA
<b>Vectastain® Elite® ABC Kit Rabbit IgG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekundärantikörper: Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper</li> <li>• Blocking-Serum (Ziege) <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Reagenz A+B = Avidin-Peroxidase-Komplex</li> </ul> </li> </ul>	Vector Laboratories, Burlingame/Kalifornien, USA
<b>Vectastain® Elite® ABC Kit Mouse IgG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekundärantikörper: Pferde-Anti-Maus-Antikörper</li> <li>• Blocking-Serum (Pferd) <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Reagenz A+B = Avidin-Peroxidase-Komplex</li> </ul> </li> </ul>	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien/USA

## 4.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterial

In der nachstehenden Tabelle 9 sind die für die Methoden verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien zusammengefasst.

*Tabelle 9: Art und Herkunft der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien*

<b>Material</b>	<b>Lieferant und Herkunft</b>
<b>12-Well-Mikrotiterplatte</b>	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster/Österreich
<b>ALZET Osmotische Minipumpe</b>	DURECT Corporation, Cupertino, Kalifornien/USA
<b>Analysenwaage A200S</b>	Sartorius AG, Göttingen/Deutschland
<b>Deckgläser</b>	Menzel-Gläser, Braunschweig/Deutschland
<b>Einbettkassetten ohne Deckel, Standard, rot</b>	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth/Deutschland
<b>Glasfärbegestelle</b>	Medite GmbH, Burgdorf/Deutschland
<b>Glasfärbeküvetten mit Deckel</b>	Medite GmbH, Burgdorf/Deutschland
<b>Heizplatte und Magnetrührer SLR</b>	Schott Instruments, Mainz/Deutschland
<b>Histokinette Leica-Jung-Histokinette 2000</b>	Leica, Solms/Deutschland
<b>Kryomikrotom CM3050 S</b>	Leica, Solms/Deutschland
<b>Laser-Scanning-Mikroskop LSM 880</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/Deutschland
<b>Lichtmikroskop</b>	Leica, Solms/Deutschland
<b>Mikroskop Axio Imager A1</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/Deutschland
<b>Mikrotommesser N35HR</b>	Feather, Osaka/Japan
<b>Mikrowelle CB 1271</b>	Bomann, Kempen/Deutschland
<b>Mikrowellene geeignete Plastikkuvetten</b>	Medite GmbH, Burgdorf/Deutschland
<b>NanoZoomer</b>	Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu/Japan
<b>Objektträger SuperFrost®plus</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA
<b>Objektträger, klar mit Mattrand</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA
<b>Paraffin-Gießautomat EG 1110</b>	Leica, Solms/Deutschland
<b>Plattformschüttler - rotierend</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach/Deutschland
<b>Rotationsmikrotom HM 335</b>	Microm, Walldorf/Deutschland
<b>Shandon Coverplates®</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA
<b>Shandon Sequenza®-Färbesystem</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA
<b>Wasserdestilliergerät Milli-Q®, Millipore</b>	MERCK, Darmstadt/Deutschland

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Färbung an Paraffinschnitten

#### Paraffineinbettung

Die Einbettung der in Formalin fixierten Organe erfolgte in einer Histokinette (Jung-Histokinette, Leica, Solms/Deutschland) und begann mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (50% für 60 Minuten, danach 70%, 80%, 96% und 98% für jeweils 100 Minuten), die einer Entwässerung der Gewebe dient. Daraufhin wurden die Proben zwei Mal für 180 Minuten in Isopropanol inkubiert, welches bei dieser Methode als Zwischenmedium fungiert. Um das Zwischenmedium in mehreren Schritten wieder auszuwaschen, folgte zunächst die Überführung in 1:2 mit Isopropanol versetztes Paraffin für 180 Minuten bei 60°C. Danach wurden die Proben zwei Mal in frisches Paraffin gegeben (über Nacht für 12 h bei 60°C, nach dem Wechsel für mindestens 24 h bei 60°C).

Anschließend konnten die Proben unter Verwendung eines Paraffin-Gießautomaten (EG 1110, Leica, Solms/Deutschland) in Blöcke gegossen werden.

#### Herstellen von Schnittpräparaten

Nach der Aushärtung des Paraffins wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom HM335, Microm, Walldorf/Deutschland) 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf nicht beschichtete sowie auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA) aufgebracht.

##### 4.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung

Um einen Überblick über mögliche histopathologische Veränderungen in den untersuchten Lungen- und Lebergeweben zu erhalten, wurde zunächst eine Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung durchgeführt. Die dichromatische Färbung beruht auf unterschiedlichen elektrostatischen Wechselwirkungen der beiden Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin mit verschiedenen Zellbestandteilen. So führt das Hämatoxylin zu einer blauvioletten Färbung anionischer, basophiler Strukturen, welche vor allem in Form von DNA im Zellkern vorkommen. Der saure Farbstoff Eosin färbt dagegen kationische, azidophile Strukturen an und bewirkt so die rotbräunliche Färbung des Zytoplasmas.

Die auf unbeschichtete Objektträger aufbrachten Schnitte wurden zum Entparaffinieren zunächst für dreimal 20 Minuten in Xylol und anschließend für dreimal 20 Minuten in 99,8%igem Ethanol inkubiert, um das Xylol wieder zu entfernen.

Nach zweimaligen Spülen der Schnitte mit bidestilliertem Wasser für je fünf Minuten erfolgte die Kernfärbung für 30 Minuten in Mayer's Hämatoxylin. Der Farbumschlag in das typische Blauviolett wurde durch ein Erhöhen des pH-Wertes ermöglicht. Dazu wurden die Präparate für 20 Minuten in Leitungswasser gestellt, welches alle fünf bis zehn Minuten erneuert wurde. Die Färbung der basischen Zellbestandteile erfolgte anschließend mittels einer achtminütigen Inkubation der Schnitte in Eosin. Nach gründlichem Spülen mit Aqua bidestillata wurden die Schnitte durch zehnmaliges Eintauchen und eine fünfminütige Inkubation in 99,8%igem Alkohol sowie durch dreimaliges Verweilen für je fünf Minuten in Xylol wieder entwässert. Abschließend wurden die Schnitte mit Depex und einem Deckgläschen eingedeckt.

#### 4.2.1.2 PAS-Reaktion (Periodic Acid Schiff Reaction = Periodsäure-Schiff-Reaktion)

Die Periodsäure-Schiff-Reaktion ist eine histochemische Methode zum Nachweis von unsubstituierten Glykolgruppen, welche zum Beispiel in neutralen Polysacchariden wie Glykogen oder Cellulose sowie auch in Mukopolysacchariden vorkommen.

Zum Entparaffinieren der Präparate wurde Xylol als Lösungsmittel verwendet. Nach dreimaligem Inkubieren für jeweils 20 Minuten erfolgte das Auswaschen des Xylols mittels 99,8%igen Ethanol für ebenfalls dreimal 20 Minuten. Der nächste Schritt beinhaltete die Oxidationsreaktion, bei der die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu benachbarten Aldehydgruppen oxidiert wurden. Die Präparate wurden dazu für zehn Minuten in das starke Oxidationsmittel Periodsäure gestellt. Daraufhin folgte ein fünfminütiges Spülen mit Leitungswasser zum Festigen der Oxidationsreaktion. Im nächsten Schritt wurden die Präparate für 30 Minuten im Schiff'schen Reagenz inkubiert. Dieses enthält eine farblose fuchsinschweflige Säure, welche an die durch die Oxidationsreaktion entstandenen Aldehydgruppen binden kann. Es erfolgte ein molekularer Umbau, der eine magentarote Farbe entstehen ließ. Durch zehnminütiges Spülen mit Leitungswasser wurde die Farbreaktion gefestigt.

Für eine Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte anschließend für 30 Minuten in Hämatoxylin inkubiert und dieses darauffolgend über 20 Minuten mit Hilfe von Leitungswasser gebläut. Im Anschluss durchliefen die Präparate eine aufsteigende Alkoholreihe, wobei sie für zwei Minuten in 80%igem und für zweimal fünf Minuten in 99,8%igem Ethanol verweilten. Nach erneutem Inkubieren in Xylol für insgesamt 15 Minuten erfolgte die Eindeckung mit DePex und Deckgläsern.

#### 4.2.1.3 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung dient der Anfärbung von Kollagen in Geweben. Der hierfür benötigte Farbstoff wurde durch Mischung von 0,1g Siriusrot mit 100 ml gesättigter Pikrinsäure hergestellt. Durch die Größe des Farbmoleküls und die damit verbundene langsame Diffusion im Gewebe wird spezifisch eine rote Anfärbung von Kollagen ermöglicht. Der Hintergrund präsentiert sich gelb.

Auch bei dieser Färbung erfolgte zunächst das Entparaffinieren mittels Xylol und Ethanol. Daraufhin wurden die Schnitte zweimal für fünf Minuten mit bidestilliertem Wasser gespült. Es folgte die Inkubation über eine Stunde in dem Farbstoff Pikro-Siriusrot. Danach wurden die Schnitte für 2 Minuten in einer ständig zu erneuernden 0,01 N Salzsäurelösung (HCl) gespült. Die folgende absteigende Alkoholreihe diente der Entwässerung der Präparate. Dafür wurden diese zunächst 10 Mal in 99,8%igen Ethanol getaucht, um daraufhin zweimal für zwei Minuten in 99,8%igem Ethanol zu verweilen. Es folgte die insgesamt fünfzehnminütige Inkubation in Xylol und die Eindeckung der Präparate mit Deckgläsern und DePex.

#### 4.2.1.4 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

##### Prinzip der Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie (IHC) nutzt man die Spezifität verschiedener Antikörper, um gewebe- und zelltypische Antigene zu identifizieren und deren Verteilung darzustellen. Die immunhistochemischen Färbungen wurden an dieser Stelle mithilfe der indirekten Peroxidase-Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Verwendung von Avidin (aus Hühnereiern) beziehungsweise Streptavidin (*Streptomyces avidinii*), welche eine hohe Affinität für das Glykoprotein Biotin aufweisen. Der unkonjugierte Primärantikörper bindet bei Zugabe mit seiner variablen F<sub>ab</sub>-Region an das für ihn spezifische Epitop im zu untersuchenden Gewebe. Der mehrfach biotinylierte Sekundärantikörper ist anschließend in der Lage, an die konstante Region des Primärantikörpers zu binden, welche in diesem Fall als sein spezifisches Epitop gilt. Der Streptavidin-Peroxidase-Komplex wird im folgenden Schritt dazugegeben und bindet mit hoher Affinität das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin. Die eisenhaltige Hämgruppe der Peroxidase bildet mit Wasserstoffperoxid zunächst einen Enzym-Substrat-Komplex, welcher daraufhin in Wasser und Sauerstoff zerfällt. Die dafür benötigten Elektronen liefert der Farbstoff AEC, sodass dieser im Zuge der Oxidationsreaktion rot gefärbt wird.

### Durchführung der Immunhistochemie

Bevor die Immunhistochemie durchgeführt werden konnte, mussten die Schnitte zunächst wieder entparaffiniert werden. Die auf Adhäsivobjektträger aufgebrauchten Schnitte wurden hierzu in einen Glasfärbereinsatz sortiert und analog zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung dreimal für jeweils 20 Minuten in Xylol inkubiert und dieses im Anschluss mit 99,8%igem Ethanol wieder ausgewaschen. Anschließend wurden die in den Geweben vorhandenen endogenen Peroxidasen durch eine 45-minütige Inkubation in in Methanol gelöstem 0,3%igem Wasserstoffperoxid blockiert, um unspezifische Färbungen zu verhindern.

Während der Fixierung von Geweben mit Formalin kann eine Maskierung der gesuchten Antigene entstehen, da sich Formaldehydmoleküle an Proteine binden können. Dabei entstehen Methylolgruppen, Schiff'sche Basen und Methylengruppen, sodass der Zugang des primären Antikörpers zum gesuchten Epitop nicht mehr oder nur erschwert möglich ist. Zur Antigendemaskierung wurde in der vorliegenden Arbeit eine hitzebasierte Methode (HIER, englisch: *Heat Induced Epitope Retrieval*) verwendet. Dabei werden die Präparate für insgesamt 16 Minuten in Citrat-Puffer (0,01 M, pH 6,0) bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht. Die Proben mussten danach für 30 Minuten abkühlen und wurden anschließend für mindestens fünf Minuten in Aqua bidestillata gestellt. Im nächsten Schritt wurde durch eine fünfminütige Inkubation der Proben in PBS/1% Rinderserumalbumin (RSA) eine Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb der Gewebe erreicht. Danach wurden die Objektträger in das Sequenza®-Färbesystem mittels spezieller Klammern eingespannt. Dabei entsteht ein kapillarer Spalt, der einen längeren und gleichmäßigen Kontakt zwischen den Antikörpern und dem Präparat ermöglicht. Über einen kleinen Trichter am oberen Ende der Klammern können die verschiedenen Lösungen gezielt zugegeben werden. Nach dem Einspannen der Präparate in das Färbesystem wurde zunächst der korrekte Sitz durch Spülen mit PBS/1% RSA überprüft. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, erfolgte nachfolgend die Zugabe eines normalen Serums. Dieses muss aus derselben Spezies stammen, aus dem der Sekundärantikörper hergestellt wurde. Nach 20 Minuten wurden die Präparate mit dem Primärantikörper versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte ein zweimaliges Spülen mit PBS/1% RSA, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Darauf folgte die Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers. Nach dreißigminütiger Inkubation und erneutem Spülen mit PBS/1% RSA wurde der Streptavidin-Peroxidase-Komplex hinzupipettiert, die Proben wieder für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut mit PBS/1%RSA gespült.

Danach erfolgte die Zugabe des Chromogens 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) für zweimal 15 Minuten. Die Farbreaktion wurde mittels bidestilliertem Wasser gestoppt.

Die Präparate wurden im Anschluss in die Glas-Färbeküvetten zurücksortiert und für 3 Minuten in dem basischen Farbstoff Hämatoxylin zur Gegenfärbung der Zellkerne inkubiert. Durch wiederholtes Eintauchen in Ammoniakwasser erfolgte die Bläuung des Hämatoxylins. Nach einer Zwischenlagerung in bidestilliertem Wasser konnte das Eindecken der Präparate mittels Mowiol und Deckgläsern erfolgen.

Die Tabelle 10 zeigt eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

*Tabelle 10: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten*

Arbeitsschritt	Lösungen und Mengen	Inkubationszeit
<b>1. Entparaffinieren</b>	Xylol	3 x 20 Minuten
<b>2. Entfernen des Xylols</b>	Ethanol (99,8%)	3 x 20 Minuten
<b>3. Blockierung der endogenen Peroxidasen zur Verhinderung einer unspezifischen Färbung</b>	Wasserstoffperoxid (0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) in Methanol	45 Minuten
<b>4. Rehydrierung der Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe</b>	95% Ethanol	2 x 2 Minuten
	80% Ethanol	2 Minuten
	70% Ethanol	2 Minuten
	Aqua bidestillata	2 x 5 Minuten
<b>5. Demaskierung der Antigene zur Verstärkung der Signalintensität</b>	Im Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0)	
	Kochen	8 Minuten
	Abkühlen	4 Minuten
	Kochen	4 Minuten
	Abkühlen	4 Minuten
Kochen	4 Minuten	
<b>6. Abkühlen der Präparate für mindestens 30 Minuten</b>		
<b>7. Überführen der Präparate in Aqua bidestillata für mindestens 5 Minuten</b>		
<b>8. pH-Pufferung zur Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes</b>	PBS + RSA (1%)	5 Minuten
<b>9. Einsortierung der Objektträger in Sequenza-Färbesysteme (Entstehung eines kapillären Spalts zum Verabreichen der weiteren Lösungen)</b>		
<b>10. pH-Pufferung</b>	PBS + RSA (1%), 1500 µl	
<b>11. Blockierung unspezifischer Bindungen zur Reduktion von Hintergrundfärbungen</b>	Normales Serum aus der gleichen Spezies wie der Sekundärantikörper, 150 µl	20 Minuten
<b>12. Antikörper-Bindung</b>	Spezifischer Antikörper,	Über Nacht bei 4 °C



	300 µl	
<b>13. Waschen der Schnitte zur Entfernung nicht oder unspezifisch gebundener Antikörper</b>	PBS + RSA (1%), 2x 1500 µl	
<b>14. Zugabe des Sekundär-Antikörpers</b>	Biotinylierter Sekundärantikörper, 150 µl	30 Minuten
<b>15. Waschen der Schnitte</b>	PBS + RSA (1%), 1500 µl	
<b>16. Zugabe des enzymgekoppelten Komplexes für die Farbreaktion</b>	Avidin-Peroxidase-Komplex, 150 µl	30 Minuten
<b>17. Waschen der Schnitte</b>	PBS + RSA (1%), 1500 µl	
<b>18. Färbung der Antikörper-gebundenen Bereiche</b>	AEC, 2 x 150 µl	2 x 15 Minuten
<b>19. Stoppen der Färbereaktion durch Waschen der Präparate</b>	Aqua bidestillata, 1500 µl	
<b>20. Zurücksortieren der Präparate in die Glas-Färbeküvetten</b>		
<b>21. Waschen der Schnitte</b>	Aqua bidestillata	2 x 1 Minute
<b>22. Gegenfärbung der Zellkerne</b>	Mayer's Hämatoxylin	3 Minuten
<b>23. Waschen der Schnitte</b>	Aqua bidestillata	2,5 Minuten
<b>24. Hämatoxylin-Bläuung</b>	Ammoniakwasser	5 x Eintauchen
<b>25. Waschen der Schnitte</b>	Aqua bidestillata	2,5 Minuten
<b>26. Eindecken der Präparate mit Mowiol und Deckgläsern</b>		

**Abkürzungen:** AEC: Aminoethylcarbazol, PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung (englisch: *Phosphate Buffered Saline*), RSA: Rinderserumalbumin

#### 4.2.2 Doppel-Immunhistochemie an Free-Floating-Schnitten

Die Free-Floating-Methode umfasst eine Färbung an frei in einer Pufferlösung schwimmenden Gewebeschnitten. Da nicht alle für die Immunhistochemie zur Verfügung stehenden Antikörper paraffingängig sind, bietet diese Methode ein umfassenderes Nachweisspektrum. Zusätzlich ermöglichen Free-Floating-Schnitte Doppelmarkierungen mit mehreren Antikörpern.

Hierfür wurden die Mausorgane sofort nach der Entnahme in 10%iges, gepuffertes Formalin verbracht, darin über Nacht fixiert und anschließend in 30%ige Saccharose/TPBS überführt. In dieser Lösung wurden die Organe bis zur Aufarbeitung bei 4°C gelagert. In Vorbereitung auf das Schneiden am Kryomikrotom wurden sie mittels Tissue-Tek-O.C.T.-Compound auf eine Objektplatte aufgebracht und auf -20°C heruntergekühlt. Von den Gewebestücken wurden anschließend 40 µm dicke Schnitte hergestellt, welche sogleich in die mit TPBS befüllten Vertiefungen einer 12-well-Mikrotiterplatte überführt wurden. Das im TPBS enthaltene

Konservierungsmittel Thiomersal verhindert dabei eine mikrobielle Kontamination der Präparate während des dreitägigen Zeitraums der Färbung.

Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst für 20 Minuten mit TPBS gespült. Anschließend erfolgte eine Permeabilisierung der lipophilen Grenzmembranen durch eine 30-minütige Inkubation der Proben in einer Methanol/TPBS-Lösung. Die Permeabilisierung, welche im nächsten 15-minütigen Schritt durch das Detergens Triton X-100 unterstützt wurde, ermöglicht das Eindringen der Primär- und Sekundärantikörper in die Zellen. Als nächstes folgte eine Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb der Gewebe durch eine 60-minütige Inkubation in einem TPBS-T-Blockierungspuffer mit 3% Rinderserumalbumin (RSA). Daraufhin wurden die Primärantikörper, die bei Doppelmarkierungen von unterschiedlichen Spezies stammen mussten, in TPBS-T/1 % RSA hinzugegeben und die Schnitte darin über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte mehrmals mit TPBS-T gespült, um die nicht oder nur unspezifisch gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Danach wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper gegen den ersten der beiden Primärantikörper hinzugegeben und die Proben für 120 Minuten inkubiert. Nach einem dreimaligen Spülen für jeweils 5 Minuten mit TPBS-T wurden die Schnitte für 60 Minuten mit dem Avidin-Peroxidase-Komplex inkubiert und danach wiederum für dreimal 5 Minuten mit TPBS-T gespült. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation der Präparate mit biotinyliertem Tyramin, wodurch eine Signalamplifikation bei der Detektion des über den biotinylierten Sekundärantikörper nachgewiesenen ersten Primärantikörpers erreicht wird. Nach erneuter dreimaliger Spülung mit TPBS-T für 5 Minuten erfolgte die Zugabe des Fluorophor-gekoppelten Streptavidins (AF-555) zur Detektion des ersten Primärantikörpers und eines Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpers gegen den zweiten Primärantikörper. Anschließend wurden die Proben über Nacht inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Proben dreimal für 5 Minuten mit TPBS gespült und dann zur Färbung der Zellkerne für 4 Minuten im Fluoreszenzfarbstoff Diamidinphenylindol (DAPI) inkubiert. DAPI geht spezifische Bindungen mit der DNA und RNA ein, was eine Zuordnung der dargestellten Antigene zu den Zellen und deren Strukturen ermöglicht.

Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte der Free-Floating-Methode ist der Tabelle 11 zu entnehmen.

*Tabelle 11: Protokoll zur Free-Floating-Methode bei Doppelmarkierungen*

Arbeitsschritt	Lösung	Inkubationszeit
<b>1. Spülen der Schnitte</b>	TPBS	20 Minuten
<b>2. Permeabilisierung der Schnitte</b>	Methanol/TPBS	30 Minuten
<b>3. Spülen der Schnitte</b>	TPBS-T	3 x 5 Minuten
<b>4. Blockierung unspezifischer Bindungen</b>	TPBS-T mit RSA (3%)	60 Minuten
<b>5. Zugabe der beiden Primärantikörper</b>	Primärantikörper in TPBS-T mit RSA (1%)	Über Nacht bei 4°C
<b>6. Spülen der Schnitte</b>	TPBS-T	3 x 5 Minuten
<b>7. Zugabe des Sekundärantikörpers gegen den ersten Primärantikörper</b>	Biotinylierter Sekundärantikörper gegen den ersten Primärantikörper in TPBS-T mit RSA (1%)	120 Minuten
<b>8. Spülen der Schnitte</b>	TPBS-T	3 x 5 Minuten
<b>9. Zugabe des enzym-gekoppelten Komplexes zur Signalamplifikation</b>	Avidin-Peroxidase-Komplex	60 Minuten
<b>10. Spülen der Schnitte</b>	TPBS-T	3 x 5 Minuten
<b>11. Signalamplifikation</b>	Biotin/Tyramin	20 Minuten
<b>12. Spülen der Schnitte</b>	TPBS	3 x 5 Minuten
<b>13. Signalamplifikation</b>	Streptavidin zur Detektion des ersten Primärantikörpers und Alexa-488-gekoppelter Sekundärantikörper gegen den zweiten Primärantikörper in TPBS-T mit RSA (1%)	Über Nacht bei 4°C
<b>14. Spülen der Schnitte</b>	TPBS	3 x 5 Minuten
<b>15. DAPI-Färbung der Zellkerne</b>	DAPI	4 Minuten
<b>16. Spülen der Schnitte</b>	TPBS	3 x 5 Minuten
<b>17. Aufziehen der Schnitte auf einen Objektträger mit anschließender Lufttrocknung</b>		
<b>18. Eintauchen in Xylol-Bad und Eindecken der Präparate mittels Depex und Deckgläsern</b>		

**Abkürzungen:** DAPI: Diamidinphenylindol, RSA: Rinderserumalbumin, TPBS: Thiomersal mit Phosphat-gepuffertes Salzlösung, TPBS-T: Thiomersal mit Phosphat-gepuffertes Salzlösung und Triton X-100

#### 4.2.3 Digitale Auswertung

Vorbereitend auf die digitale Bildauswertung wurden die HE-Übersichtsfärbungen der Lungen-Präparate mittels eines NanoZoomers (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu/Japan) eingescannt. Unter Zuhilfenahme der dazugehörenden Software NDP.view2 (NanoZoomer Digital Pathology) ist eine bis zu 400-fach vergrößerte Darstellung der Schnitte möglich. Es erfolgte eine Einteilung und Nummerierung der Tumore sowie eine deskriptive Beschreibung des gesamten Lungenparenchyms. Das Programm ermöglicht zudem ein Ausmessen der Tumore und eine Berechnung von Durchmesser und Fläche. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programms SPSS (IBM SPSS, Version 25).

#### 4.2.4 Visuell-histologische Auswertung

Mithilfe eines Lichtmikroskops (Leica, Solms/Deutschland) erfolgte eine deskriptive Beschreibung der immunhistochemischen Färbungen sowie der Pikro-Siriusrot- und der PAS-Färbung. Schwerpunktmäßig wurden unter Abgleichung der durchnummerierten Tumore im eingescannten HE-Schnitt jeweils die Farbintensität, der Anteil der gefärbten Tumorzellen, die Art und Weise der Färbung sowie auch Positivitäten im Normalgewebe betrachtet. Die Fotos wurden mithilfe des Mikroskops Axio Imager A1 (Carl Zeiss Microscopy, Jena/Deutschland) erstellt.

#### 4.2.5 Auswertung der Free-Floating-Schnitte

Mithilfe des Laser-Scanning-Mikroskops LSM880 (Carl Zeiss Microscopy, Jena/Deutschland) wurden die Präparate der Free-Floating-Methode ausgewertet. Dabei wurde das an den Sekundärantikörper gekoppelte Alexa-Fluor-488 mithilfe eines Argon-Ionen-Lasers und einer Anregungswelle von 488 nm mit grüner Fluoreszenz nachgewiesen. Der Helium-Neon-Laser regt mit einer Wellenlänge von 543 nm AF-555 an, welches an Streptavidin gekoppelt vorliegt. Dabei zeigt sich eine rote Fluoreszenz. Diamidinphenylindol (DAPI) bindet an Strukturen des Zellkernes und kann mithilfe eines Diodenlasers und der Anregungswellenlänge von 405 nm mit blauer Fluoreszenz nachgewiesen werden. Anhand von angefertigten Scanaufnahmen konnte eine deskriptive Beschreibung erfolgen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Histologischer Tumornachweis in den Lungen

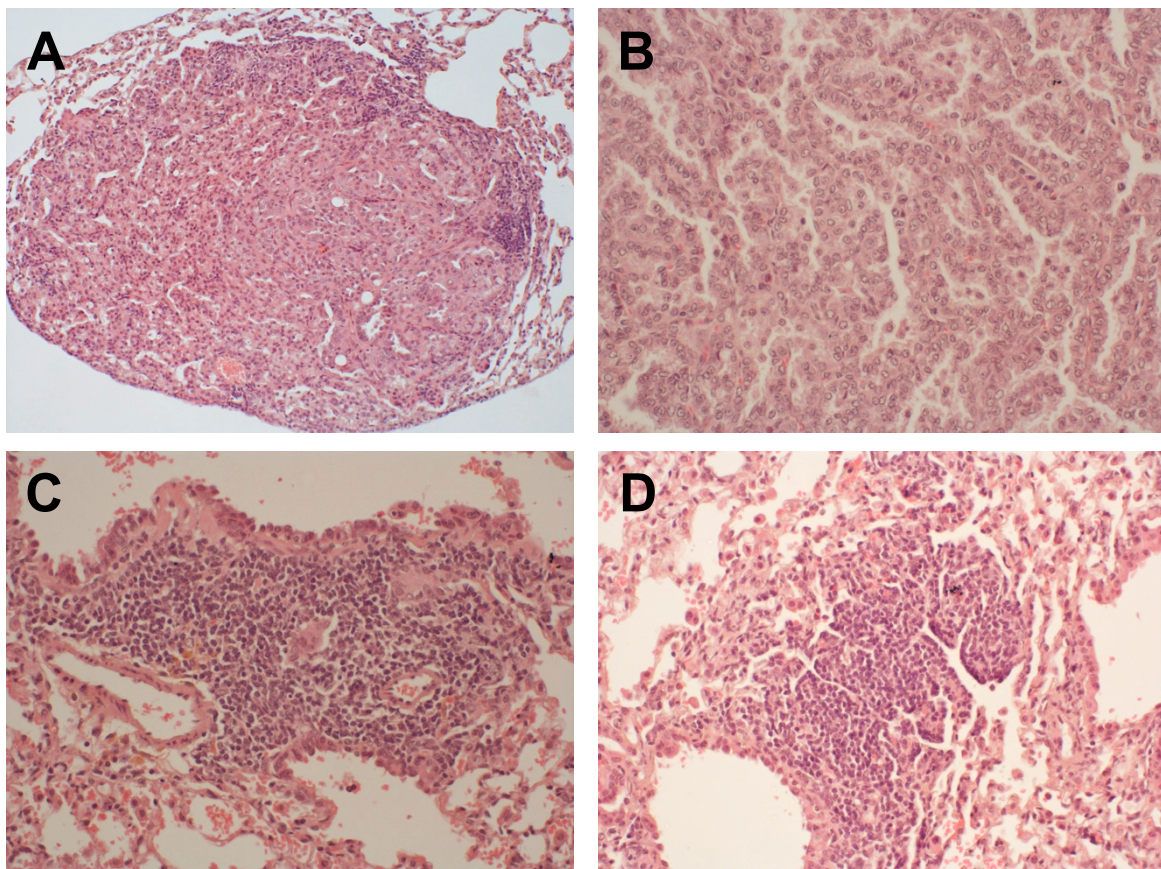
Nach der 17-wöchigen Behandlung erfolgten die Tötung der Tiere und die Entnahme der Organe. Bei den mit NNK und LPS behandelten Mäusen, allerdings nicht bei den nur mit LPS behandelten Tieren und bei den unbehandelten Kontrollmäusen, waren bereits makroskopisch auf der Lungenoberfläche Tumore erkennbar. Im Rahmen der mikroskopischen Auswertung wurden zunächst Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbungen der Lungen angefertigt, mittels NanoZoomer eingescannt und deskriptiv sowie quantitativ ausgewertet.

Im mikroskopischen Bild waren in den Lungen aller mit NNK und LPS behandelten Mäuse die peripher im Lungengewebe liegenden adenoiden Tumore gut zu erkennen (siehe Abbildung 2A, B). Die neoplastischen Zellen zeigten eine gleichförmige Struktur, einen runden oder ovalen Kern mit ein oder zwei Nukleoli und reichlich Zytoplasma. Sie waren in Strängen und Ballen angeordnet und gut vom umliegenden Lungengewebe abgegrenzt. Mitosefiguren waren nur selten zu finden. Auch konnten zwischen den Tumorzellsträngen nur wenige Gefäße nachgewiesen werden. Die Größe der adenoiden Tumore variierte in allen Versuchsreihen ohne AMD3100-Behandlung zwischen  $0,009 \text{ mm}^2$  und  $6,450 \text{ mm}^2$ , wobei der Mittelwert bei  $0,402 \text{ mm}^2$  lag. Die Größe der adenoiden Tumore in allen mit AMD3100 behandelten Tieren reichte von  $0,009$  bis  $6,550 \text{ mm}^2$ , mit einer Durchschnittsgröße von  $0,440 \text{ mm}^2$ . Im Mittel betrug der Anteil der adenoiden Tumore bei den unbehandelten Mäusen etwa  $0,93\%$  und bei den AMD3100-behandelten Tieren  $0,87\%$  der angeschnittenen Gesamtlungenfläche. In den adenoiden Tumoren zeigten sich oftmals zusätzlich Strukturen mit einer erhöhten Dichte an kleinen Zellen. Diese Zellverbände befanden sich entweder in unmittelbarer Nähe eines Gefäßes oder am Rand der adenoiden Stränge. Diese kleinen Zellen waren meist rund, mit einem schmalen Zytoplasmasaum, sie wiesen jedoch teilweise auch eine unregelmäßige Form auf. In einigen Lungenpräparaten waren zudem frühe Stadien eines adenoiden Tumors in Form von Zellverbänden mit dysplastischen Zellen zu sehen.

Anliegend an zentralen Bronchien, Bronchiolen oder Gefäßen waren weiterhin Ansammlungen an kleinen, teilweise polymorphen Zellen zu finden. Diese zeigten unscharfe Zellgrenzen und ein ungeordnetes Wachstumsmuster. Die Gestalt reichte von runden Zellen bis hin zu ovalen oder spindelförmigen Zellen mit wenig Zytoplasma. Eine scharfe Abgrenzung zum Lungengewebe war vor allem durch vereinzelt weit verstreut liegende Zellen nicht sicher möglich. Das angrenzende Bronchialepithel war dabei entweder intakt, atrophisch oder durch Zellen der Zellansammlungen infiltriert, wobei in diesen Fällen die Basalmembran des Epithels durchbrochen war. Die Zellansammlungen besaßen aufgrund der spindelförmigen Form, des

geringen Zytoplasmagehaltes sowie der unscharfen Begrenzung der Zellen morphologisch den Charakter von kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Teilweise waren in den Strukturen auch nekrotische Areale zu detektieren (siehe Abbildung 2C, D). Die Ausdehnung der Strukturen mit kleinzelligem Charakter in den unbehandelten Mäusen aller Versuchsreihen variierte von 0,003 mm<sup>2</sup> bis maximal 0,196 mm<sup>2</sup>. Der kleinste nachgewiesene Tumor mit kleinzelligem Charakter in den mit AMD3100 behandelten Tieren war 0,002 mm<sup>2</sup> groß und der größte 0,590 mm<sup>2</sup>. Die Tumore mit kleinzelliger Differenzierung machten in den unbehandelten Mäusen im Durchschnitt 0,10% und bei den AMD3100-behandelten Tieren 0,094% der angeschnittenen Gesamtlungenfläche aus.

Neben den neoplastischen Veränderungen fielen in den Lungen der mit NNK und LPS behandelten Tiere Atelektasen, emphysemartig erweiterte oder mit Makrophagen gefüllte Alveolen sowie Siderophagen auf.



**Abbildung 2:** Mikroskopische Darstellung der Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. A, B: Adenoider Tumor C, D: SCLC. Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung. Originalvergrößerung: 200fach (A), 400fach (B-D).

## 5.2 Quantitative Analyse der Lungentumore und Vergleich der Versuchsreihen

### 5.2.1 Versuchsreihe 1: Pilotversuch an *Cxcr4-eGFP*-Mäusen

Im Pilotversuch erfolgte die Tumorinduktion mit NNK und LPS in einer Gruppe von 5 Tieren. In einer weiteren Gruppe, bestehend aus 6 Mäusen, wurde eine mögliche LPS-induzierte Tumorbildung durch die ausschließliche Gabe von LPS untersucht. In allen mit NNK und LPS behandelten Tieren zeigten sich zahlreiche adenoide Tumore und Tumore mit kleinzelligem Charakter. In den Lungen der nur mit LPS behandelten Mäuse fanden sich ebenfalls kleinzellige Läsionen, allerdings im Vergleich zu den Tieren, die zusätzlich mit NNK behandelt wurden, in geringerer Zahl. Es ließen sich jedoch keine adenoiden Veränderungen in den nur mit LPS behandelten Tieren feststellen.

### 5.2.2 Versuchsreihe 2: *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-Mäuse

Die insgesamt neun in der zweiten Versuchsserie eingesetzten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-Mäuse weisen eine erhöhte Expression eines CXCL12-RFP-Fusionsproteins auf und damit auch eine verstärkte Aktivierung des CXCR4 und des CXCR7. In den sechs Tieren, die keine AMD3100-Behandlung erhielten, konnten insgesamt 38 Tumore, d.h. durchschnittlich 6,33 Neoplasien pro Maus, festgestellt werden. Davon waren 17 Tumore, d.h. im Mittel 2,83 Tumore pro Maus, adenoide Neoplasien, mit einer durchschnittlichen Größe von 0,19 mm<sup>2</sup>. Im Mittel nahmen die adenoiden Tumore hier 0,29% der angeschnittenen Lungenoberfläche ein. 21 der 38 Tumore, d.h. durchschnittlich 3,5 Neoplasien pro Maus, präsentieren sich als kleinzellige Strukturen mit einer mittleren Größe von 0,04 mm<sup>2</sup> und einem Anteil von 0,06% an der Gesamtlungenfläche. In den nicht behandelten Tieren ergab sich somit eine durchschnittliche Anzahl von 0,056 adenoiden Tumoren und 0,07 kleinzelligen Strukturen pro mm<sup>2</sup> Lungenfläche.

Die anderen drei Mäuse in Versuchsreihe zwei wurden mit AMD3100 behandelt und zeigten insgesamt 16 Tumore, d.h. durchschnittlich 5,33 Neoplasien pro Maus. Von den 16 Tumoren waren acht, d.h. im Mittel 2,67, Tumore adenoid mit einer Durchschnittsgröße von 0,519 mm<sup>2</sup> und einem durchschnittlichen Anteil von 1,06% der Lungenfläche. Die insgesamt acht kleinzelligen Strukturen, d.h. 2,67 Tumore pro Maus, wiesen im Mittel eine Größe von 0,039 mm<sup>2</sup> mit einem durchschnittlichen Gesamtanteil von 0,05% der angeschnittenen Lungenfläche auf. Insgesamt wurden in den mit AMD3100-behandelten Tieren eine durchschnittliche Anzahl von 0,050 adenoiden Tumoren und 0,035 kleinzelligen Strukturen pro mm<sup>2</sup> der angeschnittenen Lungenfläche gefunden.

Die Behandlung mit AMD3100 führte zu einer signifikanten Verringerung der prozentualen Tumorflächen der adenoiden Tumore (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,006$ ). Bei den als kleinzellige Strukturen identifizierten Tumoren ergab sich bezogen auf die prozentuale Tumorfläche dagegen kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,845$ ), sodass bezogen auf die beiden Tumorentitäten ein tendenzieller Unterschied (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,067$ ) blieb. Die Anzahl der Tumore war unabhängig von der Tumorentität nicht signifikant unterschiedlich.

### 5.2.3 Versuchsreihe 3: *Cxcr4-eGFP*-Mäuse

In den elf *Cxcr4-eGFP*-Mäusen aus Versuchsreihe 3 wurden insgesamt 132 Tumore nachgewiesen. Davon ließen sich 59 bei den 5 nicht mit AMD3100 behandelten Tieren, d.h. 11,80 Neoplasien pro Maus, und 73 bei den 6 AMD3100-behandelten Tieren, d.h. 12,17 Tumore pro Maus, feststellen. Die durchschnittliche Fläche der insgesamt 25 adenoiden Tumore, entsprechend 5 Tumoren pro Maus, in der nicht behandelten Gruppe betrug  $0,323 \text{ mm}^2$ , mit einem mittleren prozentualen Anteil von  $0,78\%$  der angeschnittenen Gesamtlungenfläche. Die behandelten Tiere wiesen insgesamt 27 adenoide Tumore, entsprechend 4,5 Tumoren pro Maus, mit einer Durchschnittsgröße von  $0,268 \text{ mm}^2$  auf. Diese machten insgesamt im Mittel  $0,466\%$  der angeschnittenen Gesamtfläche aus. Die durchschnittliche Anzahl der adenoiden Tumore pro  $\text{mm}^2$  der angeschnittenen Lungenfläche betrug bei den nicht mit AMD3100 behandelten Mäusen  $0,11$  und bei den AMD3100-behandelten Mäusen  $0,082$ .

Bei den kleinzelligen Strukturen konnten in den Tieren ohne Behandlung insgesamt 34 Tumore, d.h. durchschnittlich  $6,8$  Neoplasien pro Maus, nachgewiesen werden. Diese waren durchschnittlich  $0,039 \text{ mm}^2$  groß und machten im Mittel  $0,07\%$  der angeschnittenen Lungenfläche aus. In der Behandlungsgruppe konnten insgesamt 46 kleinzellige Strukturen, entsprechend durchschnittlich  $7,67$  Tumoren pro Maus, identifiziert werden. Der Mittelwert der ermittelten Tumorfläche lag bei  $0,029 \text{ mm}^2$  und umfasste durchschnittlich  $0,05\%$  der angeschnittenen Lungenfläche. Im Durchschnitt betrug die Anzahl der kleinzelligen Tumore pro angeschnittenem Quadratmillimeter Lunge in den nicht behandelten Tieren  $0,14$  und in den behandelten Tieren  $0,13$ .

Die Behandlung mit AMD3100 hatte in den *Cxcr4-eGFP*-Mäusen keinen signifikanten Einfluss auf die der Anzahl der Tumore beider Entitäten. Es zeigte sich jedoch ein tendenzieller Unterschied bei den prozentualen Tumorflächen bezogen auf die Gesamtlungenfläche, allerdings nur, wenn beide Tumorentitäten zusammen betrachtet wurden (Mann-Whitney-Test:



$p = 0,067$ ), wobei die mit AMD3100 behandelten Mäuse eine insgesamt geringere Tumorfläche aufwiesen.

#### 5.2.4 Versuchsreihe 4: *Cxcr7-eGFP*-Mäuse

Die vierte Versuchsreihe umfasste 17 *Cxcr7-eGFP*-Mäuse mit neun unbehandelten und acht AMD3100-behandelten Tieren. Insgesamt ließen sich in den Tieren dieser Versuchsreihe 113 adenoide und kleinzellige Tumore nachweisen. Die nicht behandelten Mäuse entwickelten 27 adenoide Tumore, d.h. im Mittel 3 Neoplasien pro Maus, mit einer Durchschnittsgröße von  $0,61 \text{ mm}^2$ , sodass diese Tumore im Mittel einen Gesamtanteil von 1,46% der angeschnittenen Lungenfläche einnahmen. In den mit AMD3100 behandelten Tieren fanden sich 18 adenoide Tumore, d.h. durchschnittlich 2,25 Neoplasien pro Maus, mit einer Durchschnittsgröße von  $0,66 \text{ mm}^2$  und einem Anteil von 1,4% der Fläche der angeschnittenen Lunge. Es zeigten sich im Mittel 0,061 adenoide Tumore pro  $\text{mm}^2$  Lunge in den nicht behandelten Mäusen und 0,079 adenoide Tumore pro  $\text{mm}^2$  Lunge in den mit AMD3100 therapierten Mäusen.

An kleinzelligen Strukturen konnten in den nicht behandelten Mäusen insgesamt 39 Tumore, d.h. im Mittel 4,33 Neoplasien pro Maus, mit einer Durchschnittsgröße von  $0,053 \text{ mm}^2$  und einem mittleren Anteil an der angeschnittenen Lungenfläche von 0,15% nachgewiesen werden. In den mit AMD3100 behandelten Mäusen fanden sich 29 kleinzellige Strukturen, d.h. durchschnittlich 3,63 Tumore pro Maus, mit einer Durchschnittsgröße von  $0,07 \text{ mm}^2$  und einem mittleren Anteil von 0,17% an der Gesamtlungenfläche. Die durchschnittliche Tumoranzahl bei den kleinzelligen Tumoren pro  $\text{mm}^2$  Lunge lag bei den nicht behandelten Mäusen bei 0,099 und den behandelten Mäusen bei 0,097.

In Bezug auf Tumorgröße und Tumoranzahl fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlungsgruppe und den Tieren, die keine AMD3100-Behandlung erhalten hatten.

#### 5.2.5 Vergleiche zwischen den Versuchsserien

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Versuchsserien ergab signifikant mehr Tumore pro  $\text{mm}^2$  Lunge mit kleinzelligem Charakter in Versuch 3 als in Versuch 2, wenn beide Behandlungsgruppen (nicht behandelte und AMD3100-behandelte Mäuse) zusammengenommen wurden (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,010$ ). Auch bei alleiniger Betrachtung der unbehandelten Tiere konnte bei den Mäusen in Versuch 3 eine signifikant höhere Anzahl an kleinzelligen Tumoren festgestellt werden als bei den entsprechenden Tieren in Versuch 2 (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,028$ ). Bei ausschließlicher Betrachtung der

AMD3100-behandelten Tiere konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsserien aufgezeigt werden.

Auch in Versuch 4 konnte ein signifikant höherer Anteil an adenoiden Tumoren bezogen auf die Gesamtlungenfläche im Vergleich zur der Versuchsreihe 2 verzeichnet werden. Dieser Unterschied zeigte sich sowohl bei beiden Behandlungsgruppen zusammengenommen (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,002$ ) als auch bei der alleinigen Betrachtung der unbehandelten Tiere (Mann-Whitney-Test:  $p < 0,001$ ). Analog zu der anteilmäßig größeren Tumorfläche bei den adenoiden Tumoren fand sich in Versuch 4 auch eine größere prozentuale Tumorfläche bei den kleinzelligen Strukturen als in Versuch 2. Hier konnten im Vergleich zu Versuch 2 signifikant höhere Werte sowohl bei den unbehandelten Mäusen (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,003$ ) als auch bei den mit AMD3100 behandelten Tieren nachgewiesen werden (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,043$ ).

In der Gegenüberstellung von Versuch 3 und 4 zeigten sich signifikant höhere prozentuale Tumoranteile in Versuch 3 bezogen auf die angeschnittene Gesamtlungenfläche. Dies konnte unabhängig von der Behandlungsgruppe sowohl bei den nichtkleinzelligen adenoiden Tumoren (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,030$  ohne AMD3100-Behandlung;  $p = 0,023$  mit AMD3100-Behandlung) als auch bei den kleinzelligen Strukturen (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,001$  ohne AMD3100-Behandlung;  $p < 0,001$  mit AMD3100-Behandlung) festgestellt werden.

Die Behandlung mit AMD3100 hatte, bezogen auf alle Versuchsreihen, weder einen Einfluss auf die Entstehung der beiden unterschiedlichen Lungentumorentitäten noch auf die Anzahl und die Ausdehnung der kleinzelligen Läsionen. Alle Versuchsreihen zusammengenommen zeigte sich jedoch eine Tendenz zu einer geringeren Größe der adenoiden Tumore (Mann-Whitney-Test:  $p = 0,054$ ).

### 5.3 Immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten

#### 5.3.1 Immunhistochemische Untersuchung der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse

##### 5.3.1.1 Expression von CXCR4

Die immunhistochemische Darstellung des Chemokinrezeptors CXCR4 erfolgte mithilfe des phosphosensitiven Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2. Dieser kann nur an den CXCR4 binden, wenn sich dieser im dephosphorylierten Zustand befindet. Durch eine vorherige Behandlung der Schnitte mit Lambda-Protein-Phosphatase (LPP) wird eine Dephosphorylierung des Rezeptors bewirkt und der Rezeptor kann so im phosphorylierten und dephosphorylierten Zustand dargestellt werden. Im Vergleich zu nicht mit LPP behandelten Schnitten ist so eine Beurteilung des Anteils an phosphoryliert vorliegenden Rezeptoren möglich.

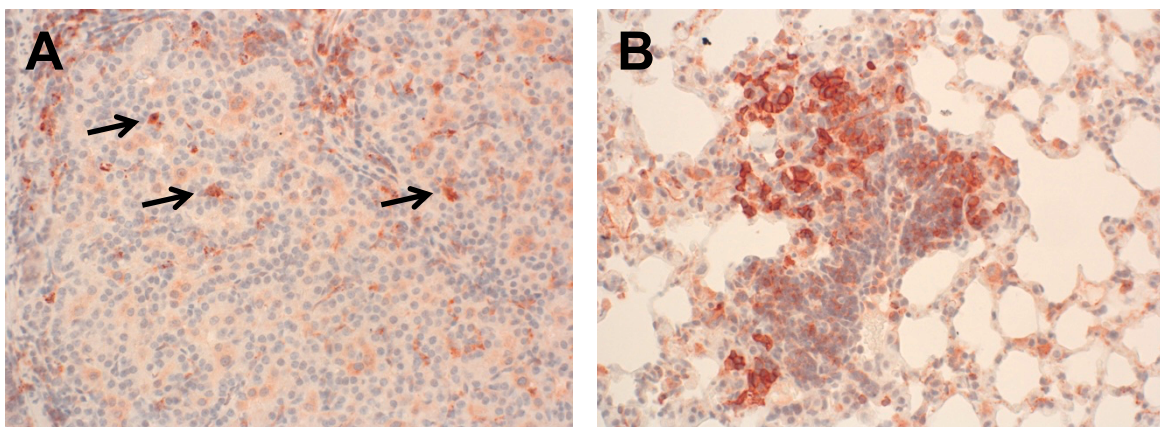
CXCR4-positive Zellen zeigten sich in den nicht mit AMD3100 behandelten Tieren sowohl im Normalgewebe der Lunge als auch in den kleinzelligen und nichtkleinzelligen Tumoren. Im tumorfreien Normalgewebe der Lunge konnte ein homogenes Verteilungsmuster an CXCR4-positiven Zellen nachgewiesen werden. Eine erhöhte Konzentration membranständig und zytoplasmatisch gefärbter Zellen zeigte sich in der Nähe zu Bronchien sowie in der Umgebung der Neoplasien. Die einzeln oder in kleinen Gruppen liegenden Zellen stellen aufgrund des Verteilungsmusters, ihrer Größe und Form am ehesten Immunzellen wie Alveolarmakrophagen, Monozyten oder Granulozyten dar.

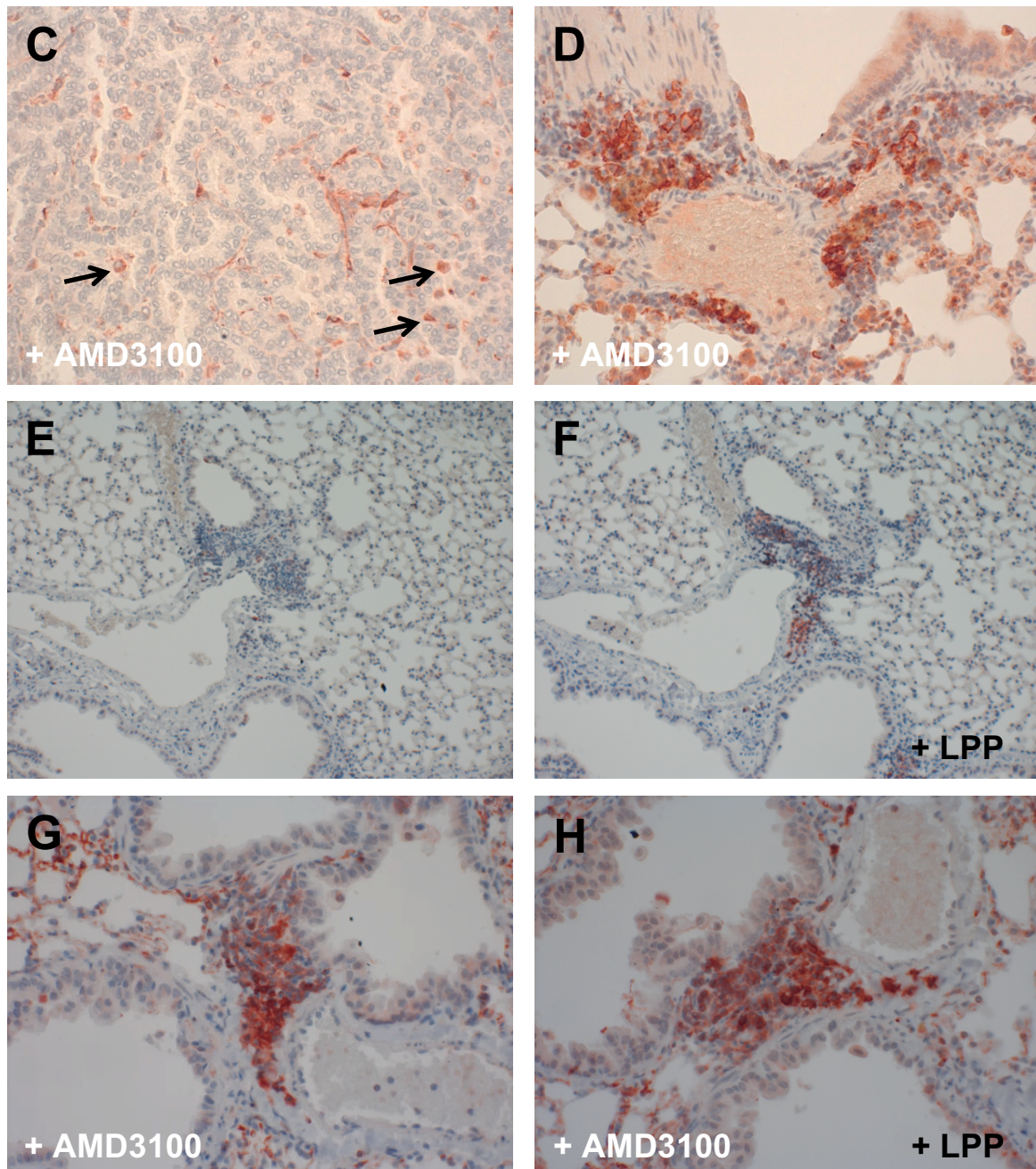
In den adenoiden Tumoren fand sich ein inhomogenes Verteilungsmuster an CXCR4-positiven Zellen. Es traten ebenfalls große, einzeln liegende Zellen auf, die zytoplasmatisch und membranständig gefärbt waren und am ehesten Immunzellen entsprechen. Es zeigte sich ein erhöhtes Vorkommen der CXCR4-positiven Immunzellen in der Nähe sowie auch in den größeren adenoiden Tumoren selbst. Die neoplastischen Zellen der adenoiden Tumore selbst waren dagegen nur selten positiv. Deutlich wurde hier auch das Ausmaß an phosphoryliert vorliegenden Rezeptoren. Durch eine Behandlung mit LPP kam es zu einer starken Zunahme bei der Anzahl an positiven Zellen wie auch bei der Intensität der Färbung (siehe Abbildung 3A).

Im Gegensatz zu den adenoiden Tumoren zeigte sich in den Strukturen mit kleinzelligem Charakter eine hohe Präsenz der CXCR4-Chemokinrezeptoren durch eine hohe Anzahl an zytoplasmatisch und membranständig gefärbten Zellen. In den Ansammlungen der unscharf begrenzten Zellen mit polymorphem Aussehen waren 50-70% der Zellen positiv. Nach der LPP-Behandlung stiegen auch hier die Intensität der Färbung sowie der Anteil an positiven Zellen. Die Verteilung der CXCR4-positiven Zellen in den kleinzelligen Tumoren erscheint

willkürlich (siehe Abbildung 3B). Vereinzelt fanden sich ferner Mischtumore mit adenoiden und sehr stark CXCR4-positiven kleinzelligen Tumorbereichen.

In der Behandlungsgruppe mit AMD3100 zeigte sich sowohl im Lungen-Normalgewebe als auch in den Tumorealen eine analoge Verteilung der CXCR4-positiven Zellen wie bei den Tieren ohne Blockierung des Rezeptors (siehe Abbildung 3C, D). Bei beiden Behandlungsgruppen fanden sich positive Immunzellen im Normal- und Tumorgewebe und auch das CXCR4-Expressionsmuster in den Tumoren wies keine prinzipiellen Unterschiede auf. Allerdings zeigte sich bei den behandelten Tieren mehrheitlich eine membranständige Färbung der CXCR4-positiven Zellen und damit eine membranständige Lokalisierung der Rezeptoren, während die positiven Zellen bei der Kontrollgruppe größtenteils neben der membranständigen auch eine zytoplasmatische Färbung aufwiesen. Durch die Phosphosensitivität des Antikörpers UMB-2 konnte ein weiterer Nachweis einer erfolgreichen Antagonisierung des Rezeptors durch AMD3100 erbracht werden. Die Blockierung des CXCR4 durch AMD3100 verhindert eine Aktivierung des Rezeptors durch CXCL12, sodass im Folgenden eine Internalisierung und Phosphorylierung des Rezeptors nicht stattfinden kann. Da alle blockierten Rezeptoren im nicht-phosphorylierten Zustand vorliegen, ist eine Bindung des Antikörpers UMB-2 an sie möglich. Dadurch, dass eine Behandlung der Gewebeschnitte mit LPP bei den mit AMD3100 behandelten Tieren weder im gesunden Lungengewebe noch in den Tumorgeweben zu einem bedeutenden Unterschied in der Anzahl an positiven Zellen und in der Farbintensität führte, kann belegt werden, dass zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere die CXCR4-Rezeptoren durch AMD3100 nahezu komplett blockiert waren. Damit konnte bestätigt werden, dass das AMD3100 über mindestens 2 Wochen in Lösung stabil bleibt und dass die gewählte Freisetzungsrate aus den Minipumpen ausreicht, um die CXCR4-Rezeptoren effektiv zu blockieren (siehe Abbildung 3E-H).





**Abbildung 3:** Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des phosphosensitiven Antikörpers UMB-2. Es findet sich eine analoge CXCR4-Verteilung in den adenoiden Tumoren ohne (A: Pfeile: CXCR4-positive Zellen) und mit AMD3100-Behandlung (C: Pfeile: CXCR4-positive Zellen). B: SCLC einer nicht mit AMD3100-behandelten Maus. D: SCLC einer mit AMD3100 behandelten Maus. Nachweis der CXCR4-Expression in SCLC mit Hilfe von UMB-2 entweder ohne Lambda-Phosphatase (LPP)-Behandlung (E, G) oder mit LPP-Behandlung der Lungenschnitte (F, H) von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4*-eGFP-Mäusen. E, F: Mäuse ohne AMD3100-Behandlung; G, H: Mäuse mit AMD3100-Behandlung. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (E, F), 400fach (A-D, G, H).

### 5.2.1.2 Expression von eGFP

Da die *Cxcr4*- bzw. *Cxcr7-eGFP*-Mäuse ein *eGFP*-Reportergen (englisch: *enhanced Green Fluorescent Protein*) unter der Kontrolle des murinen *Cxcr4*- bzw. *Cxcr7*-Promotors exprimieren, ermöglicht die immunhistochemische Darstellung von eGFP eine indirekte Erfassung der CXCR4- bzw. der CXCR7-Expression. Somit sind für den CXCR4-Rezeptor eine direkte Darstellung mittels des Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 und eine indirekte Detektion über den Nachweis von eGFP möglich. Die transgenen *Cxcr7-eGFP*-Mäuse ermöglichen die Darstellung des CXCR7-Rezeptors, da für diesen zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch kein Antikörper verfügbar war.

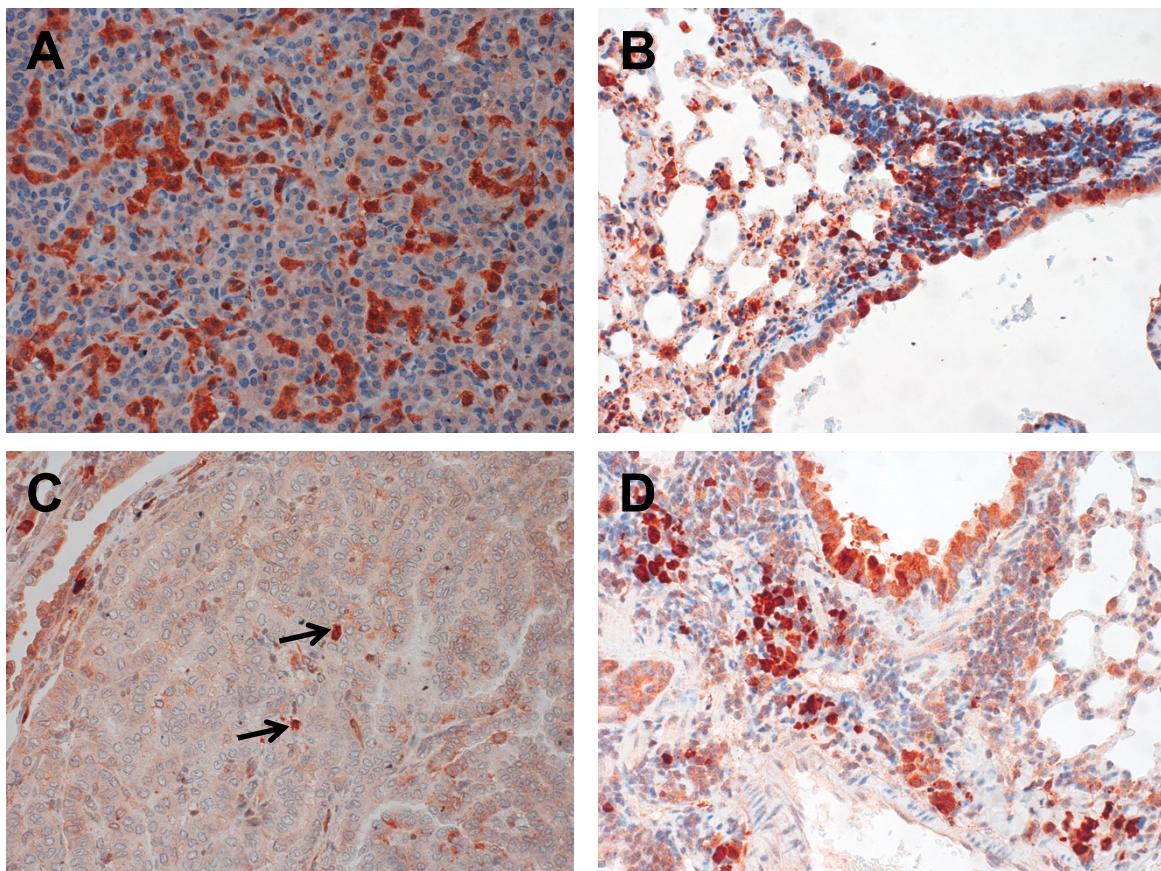
Die Untersuchung der *Cxcr4-eGFP*-Mäuse ergab einen zytoplasmatischen Nachweis von eGFP an einzelnen Stellen des Bronchialepithels. Zusätzlich waren, analog zur CXCR4-Expression, positive Zellen im Alveolarepithel und im Interstitium des tumorfreien Normalgewebes mit homogener Verteilung zu finden. Die am ehesten als Alveolarmakrophagen und andere Immunzellen zu identifizierenden positiven Zellen fanden sich vor allem in der Nähe zu Tumorgewebe und in zentralen Bereichen in der Nähe der Bronchien. In den adenoiden Tumoren waren vor allem randständig Zellgruppen mit einer eGFP-Expression nachweisbar. Insgesamt zeigte sich in den nichtkleinzelligen Neoplasien ein unterschiedliches eGFP-Verteilungsmuster (siehe Abbildung 4A). So waren mehr Zellen in den größeren Tumoren aufzufinden. Weiterhin zeigte sich in den Strukturen mit kleinzelligem Charakter eine erhöhte Konzentration an zytoplasmatisch eGFP-gefärbten Zellen. Diese wiesen kein bestimmtes Muster bezüglich ihrer Lage im Tumorgewebe auf (siehe Abbildung 4B).

Grundsätzlich zeigten sich die erwarteten Übereinstimmungen zwischen dem CXCR4- und dem eGFP-Expressionsmuster. Die eGFP-Färbung ergab allerdings insgesamt eine höhere Färbeintensität wie auch eine größere Anzahl an positiven Zellen.

*Cxcr7-eGFP*-Mäuse ermöglichen die Darstellung des CXCR7-Rezeptors. Die bereits in den CXCR4-Färbungen dargestellten Immunzellen präsentierten sich ebenfalls positiv für den CXCR7-Rezeptor. Die eGFP-positiven Immunzellen im tumorfreien Normalgewebe wiesen ein homogenes Verteilungsmuster und eine erhöhte Dichte in der Nähe der Bronchien und der Neoplasien auf. Das Bronchialepithel zeigte sich gelegentlich intensiv positiv für den CXCR7-Rezeptor. In den adenoiden Tumoren waren nur wenige eGFP-positive Zellen zu sehen. Diese waren groß und rund und am ehesten ebenfalls als Immunzellen zu interpretieren (siehe Abbildung 4C). In den kleinzelligen Strukturen, die sich in den adenoiden Tumoren befanden, ließ sich das eGFP zytoplasmatisch nachweisen. Die Strukturen mit kleinzelliger

Differenzierung in der Nähe der Bronchien wiesen ein variables Expressionsmuster auf. So waren einige dieser Strukturen komplett eGFP-negativ, während andere einen hohen Anteil an positiven Zellen aufwiesen (siehe Abbildung 4D).

Die Behandlung mit AMD3100 hatte sowohl im Normalgewebe als auch in den Tumoren keinen Einfluss auf die CXCR4/eGFP- oder die CXCR7/eGFP-Expression. Auch zeigte sich kein Unterschied in der Häufigkeit und in der Intensität der Färbung der eGFP-positiven Zellen zwischen den verschiedenen Versuchsreihen.

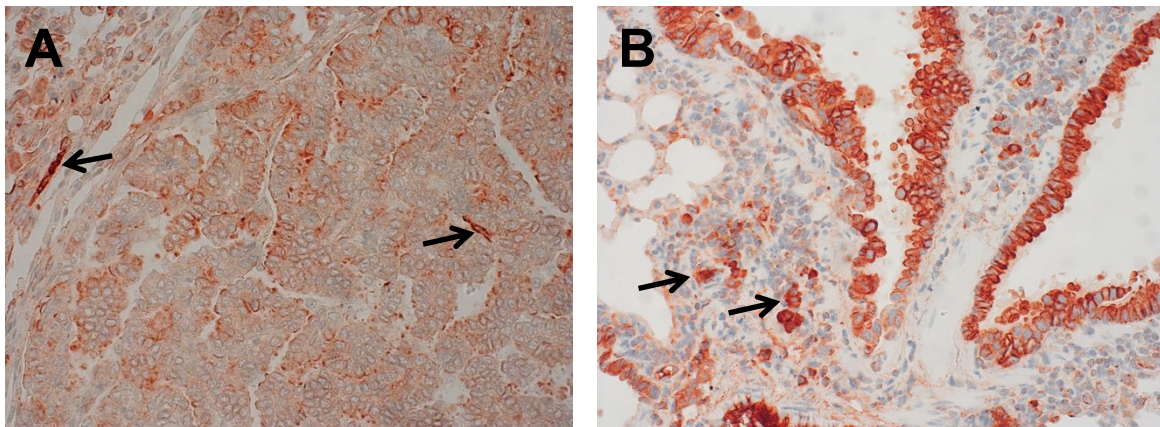


**Abbildung 4:** Indirekter Nachweis der CXCR4-Expression in den Lungen von *Cxcr4*-eGFP-Mäusen aus der dritten Versuchsreihe (A, B) und indirekter Nachweis der CXCR7-Expression in den Lungen von *Cxcr7*-eGFP-Mäusen aus der vierten Versuchsreihe (C, D) durch die Darstellung von eGFP. A, C: Adenoider Tumor. C: Pfeile markieren positive Zellen in dem adenoiden Tumor. B, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach (A-D).

### 5.3.1.3 Expression von CXCL12/SDF-1

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der CXCL12-Expression zeigten sich leichte bis mittelmäßig starke zytoplasmatische Positivitäten im Bronchialepithel sowie in verschiedenen Zellen des normalen Lungengewebes. Auch am Gefäßendothel konnte CXCL12 nachgewiesen werden. Die nichtkleinzelligen Lungentumore wiesen ein variables CXCL12-Expressionsmuster auf. Es präsentierten sich vor allem CXCL12-exprimierende Gefäße (siehe Abbildung 5A). Auffällig war, dass die CXCR4-positiven Bereiche in den adenoiden Tumoren für das CXCL12 negativ waren. In den kleinzelligen Strukturen waren vor allem in den peripheren Tumorbereichen einige wenige positive Zellen mit einer schwachen bis mittelstarken Färbintensität zu finden (siehe Abbildung 5B). Es zeigte sich allgemein ein inverses Expressionsmuster zwischen dem CXCR4 und dem CXCL12/SDF-1. Tumorbereiche, in denen eine hohe CXCR4-Expression nachgewiesen werden konnte, zeigten nur eine geringe CXCL12-Expression und umgekehrt.

Es fanden sich weder Unterschiede im CXCL12-Expressionsmuster zwischen den verschiedenen Versuchsreihen noch zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen.



**Abbildung 5:** Darstellung der CXCL12/SDF-1-Expression in einem adenoiden Tumor (A) und in einem kleinzelligen Tumor (B) in Lungenanschnitten von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. A: Pfeile markieren CXCL12-positive Gefäße. B: Neben CXCL12-positiven Zellen im SCLC (Pfeile), zeigt das Bronchialepithel eine hohe CXCL12-Expression. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach.

## 5.3.2 Immunhistochemische Untersuchung der Tumormarker

### 5.3.2.1 Expression der neuroendokrinen Marker

Die Untersuchung des neuroendokrinen Markers Chromogranin A erbrachte den Nachweis einer Expression sowohl im Normalgewebe als auch in den beiden Tumorentitäten. Im normalen Lungengewebe waren mäßig starke zytoplasmatische Positivitäten im Bronchialepithel zu erkennen sowie eine erhöhte Konzentration an positiven Zellen in den

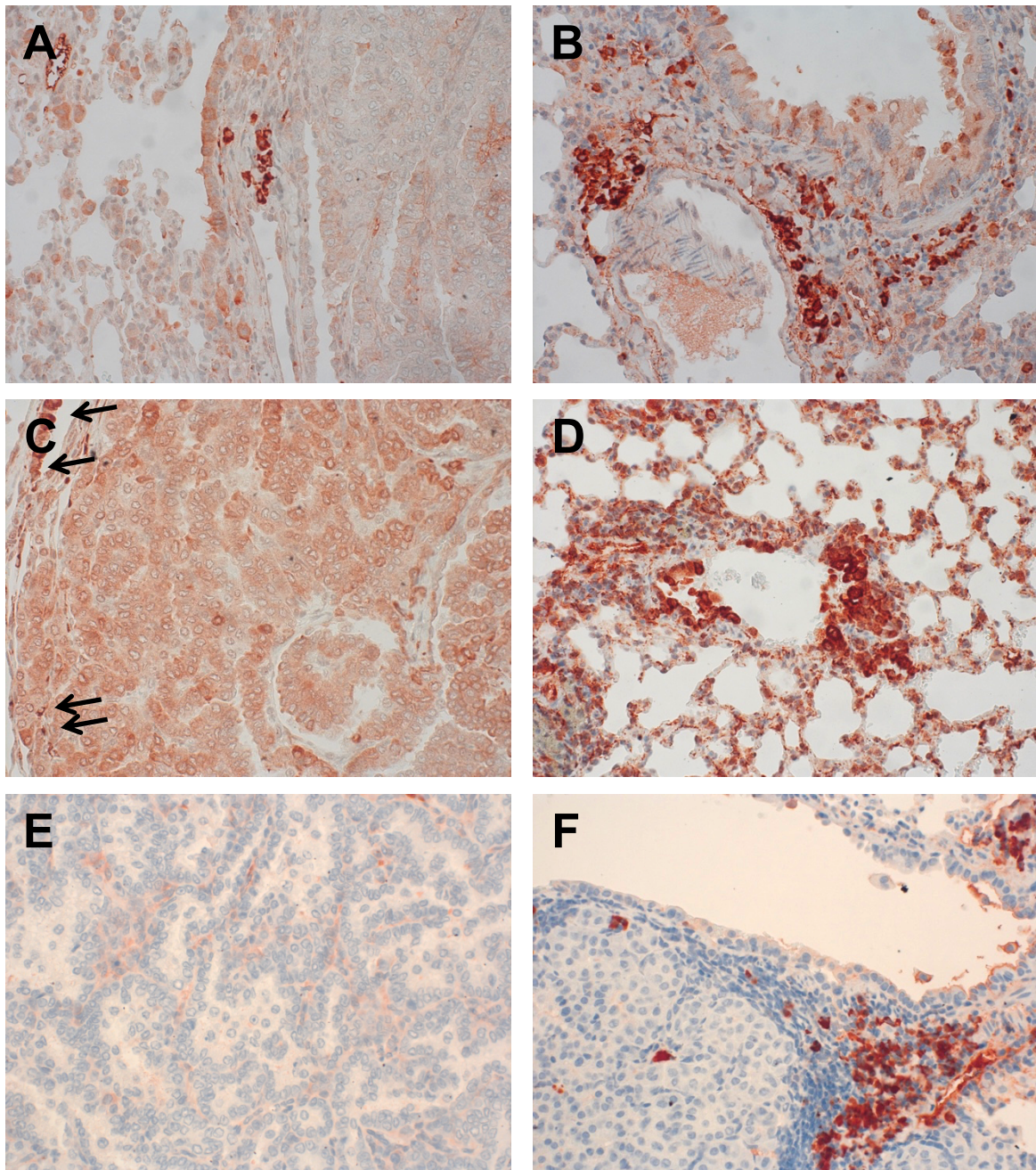


randständigen Abschnitten der Lunge. Die adenoiden Tumore zeigten ein variables Expressionsmuster von Chromogranin A. Hier fielen vor allem in den randständigen Bereichen Zellgruppen mit einer starken zytoplasmatischen Expression von Chromogranin A auf (siehe Abbildung 6A). Hierbei zeigte sich meist eine vesikuläre Speicherung von Chromogranin A. Teilweise fanden sich zusätzlich mittelstarke Positivitäten im gesamten Tumor, während in einigen anderen adenoiden Tumoren außer in den einzelnen stark gefärbten Zellen und Zellgruppen kein Chromogranin A nachweisbar war. Die in einigen Schnitten anzutreffenden Vorstufen der nichtkleinzelligen Tumore waren komplett Chromogranin-A-negativ. Im Gegensatz zu den adenoiden Tumoren wiesen Anteile der kleinzelligen Lungentumore eine intensive zytoplasmatische Färbung auf, wobei sich eine unregelmäßige intratumorale Verteilung der positiven Zellen zeigte (siehe Abbildung 6B). Gleichzeitig präsentieren sich einige kleinzellige Zellansammlungen einheitlich negativ für den neuroendokrinen Marker. Eine Antagonisierung des CXCR4-Rezeptors mit AMD3100 hatte keinen Einfluss auf die Expression von Chromogranin A. Auch zeigten sich keine Unterschiede in der Häufigkeit oder der Intensität der Chromogranin-A-gefärbten Zellen zwischen den Versuchsreihen.

Die immunhistochemische Untersuchung des neuroendokrinen Markers Synaptophysin ergab ein ähnliches Expressionsmuster wie beim Chromogranin A. Das Bronchialepithel war meist mäßig bis stark zytoplasmatisch gefärbt. Vereinzelt fanden sich ebenfalls zytoplasmatisch positive Zellen in den Alveolen. Die adenoiden Tumore wiesen variable Expressionsmuster auf. Peripher zeigte sich hierbei eine meist intensivere zytoplasmatische Färbung, während die Intensität Richtung Tumormitte abnahm (siehe Abbildung 6C). Die kleinzelligen Strukturen wiesen dagegen Zellgruppen mit einer intensiven zytoplasmatischen Färbung auf (siehe Abbildung 6D). In einigen Tumoren mit kleinzelligem Charakter konnte jedoch auch keine Positivität für Synaptophysin detektiert werden. Das Synaptophysin-Expressionsmuster zeigte sich unabhängig von der AMD3100-Behandlung und von der transgenen Mauslinie.

Immunhistochemisch konnte das neuroendokrine Oberflächenprotein NCAM (CD56) im tumorfreien Lungengewebe nicht nachgewiesen werden. Die nichtkleinzelligen adenoiden Tumore waren bis auf in wenigen Tumoren solitär verteilte, membranständig positiv gefärbte Zellen negativ (siehe Abbildung 6E). In den Strukturen mit kleinzelligem Charakter zeigten sich intensiv membranständig gefärbte Zellen (siehe Abbildung 6F). Dabei variierte der Anteil an positiven Zellen zwischen den Tumoren, ohne ein spezifisches Lokalisationsmuster aufzuweisen. Allerdings waren einige wenige kleinzellige Strukturen auch NCAM-negativ.

Das NCAM-Expressionsmuster wurde weder von der Behandlung mit AMD3100 beeinflusst noch unterschied es sich zwischen den verschiedenen transgenen Mauslinien.



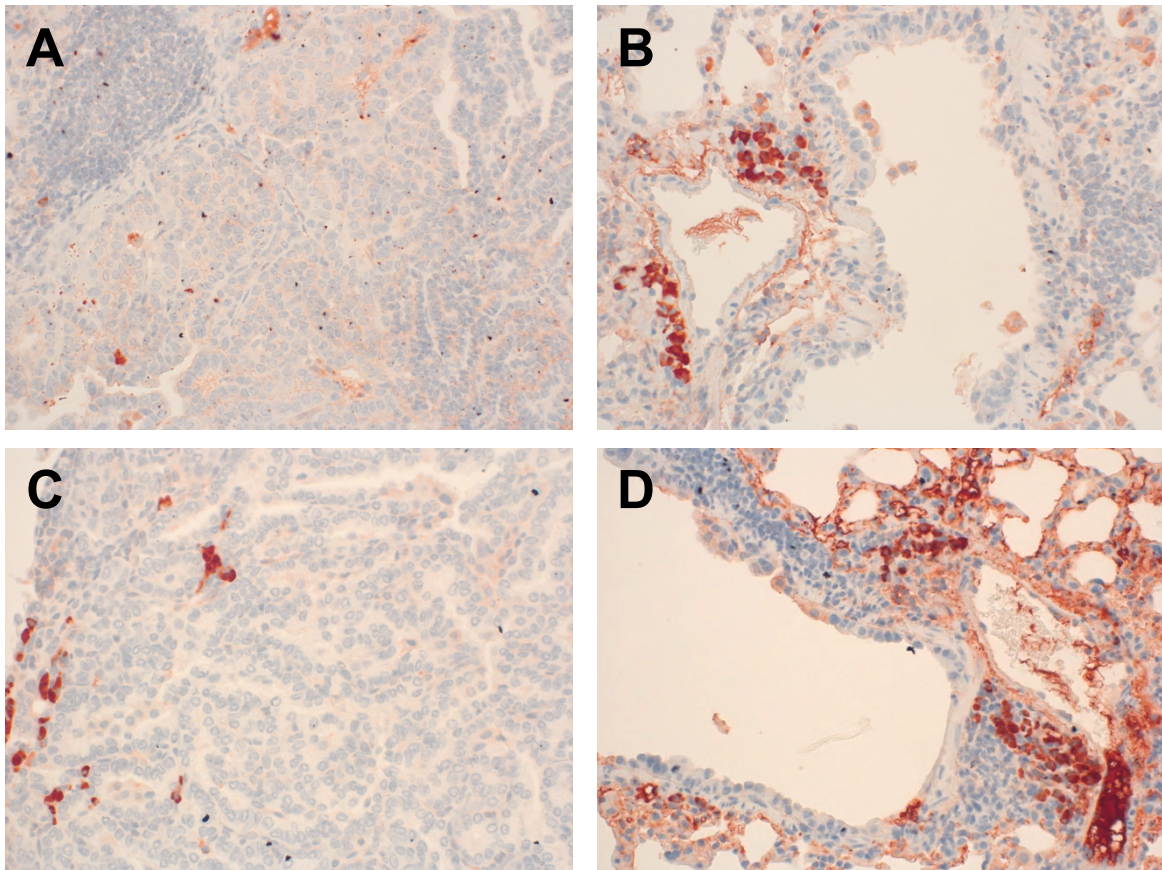
**Abbildung 6:** Nachweis der neuroendokrinen Marker Chromogranin A (A, B), Synaptophysin (C, D) und CD56 (E, F). Dargestellt sind adenoide Tumore (A, C, E) und kleinzellige Tumore (B, D, F) aus Lungenanschnitten von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. C: Pfeile markieren die Synaptophysin-positiven Tumorzellen. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach.

### 5.3.2.1 Expression der Plattenepithelkarzinom-Marker

Der gegen die Zytokeratine 1, 5, 10 und 14 gerichtete Antikörper 34 $\beta$ E12 ist ein Marker für Plattenepithelkarzinome. Im tumorfreien Normalgewebe der Lunge fanden sich intensive membranständige Positivitäten im Bronchialepithel sowie im Endothel der Gefäße. In den meisten adenoiden Tumoren waren die neoplastischen Zellen für den Marker negativ. Lediglich die Gefäße zeigten sich hier positiv. Daneben fanden sich einzelne große, annähernd runde Zellen, die membranständig gefärbt waren und ein unregelmäßiges Verteilungsmuster im Tumor aufwiesen. Diese Zellen sind vermutlich Immunzellen. Nur in einigen wenigen nichtkleinzelligen Neoplasien fanden sich in der Peripherie Zellgruppen, welche intensiv membranständig gefärbt waren (siehe Abbildung 7A). In den kleinzelligen Strukturen gelang dagegen grundsätzlich der Nachweis der Zytokeratine, wobei der Anteil sowie die Lokalisierung der positiven Zellen im Tumorgewebe stark variierten (siehe Abbildung 7B). Es zeigten sich keine Unterschiede im 34 $\beta$ E12-Expressionsmuster der kleinzelligen oder nichtkleinzelligen Tumoren in Abhängigkeit von der AMD3100-Behandlung oder der transgenen Mauslinie.

SCCA1/2 (englisch: *Squamous Cell Carcinoma Antigen*) wird als Plattenepithelkarzinom-Marker verwendet. Das SCCA1/2-Expressionsmuster stellte sich analog zur Zytokeratin-Expression dar. Die neoplastischen Zellen der adenoiden Tumore waren größtenteils negativ für SCCA1/2. Die oben beschriebenen, in einigen nichtkleinzelligen Tumoren vorzufindenden randständigen Zellgruppen waren auch hier intensiv membranständig und zytoplasmatisch gefärbt (siehe Abbildung 7C). Bei den kleinzelligen Strukturen waren einige komplett negativ für den Plattenepithelkarzinom-Marker, während andere intensive zytoplasmatische und membranständige Färbungen aufwiesen (siehe Abbildung 7D). Dabei war ein großer Anteil des Tumors positiv.

Es zeigten sich auch beim SCCA1/2 keine Unterschiede im Expressionsmuster bei den kleinzelligen oder nichtkleinzelligen Tumoren in Abhängigkeit von der AMD3100-Behandlung. Auch bei den verschiedenen Mauslinien war das SCCA1/2-Expressionsmuster gleich.

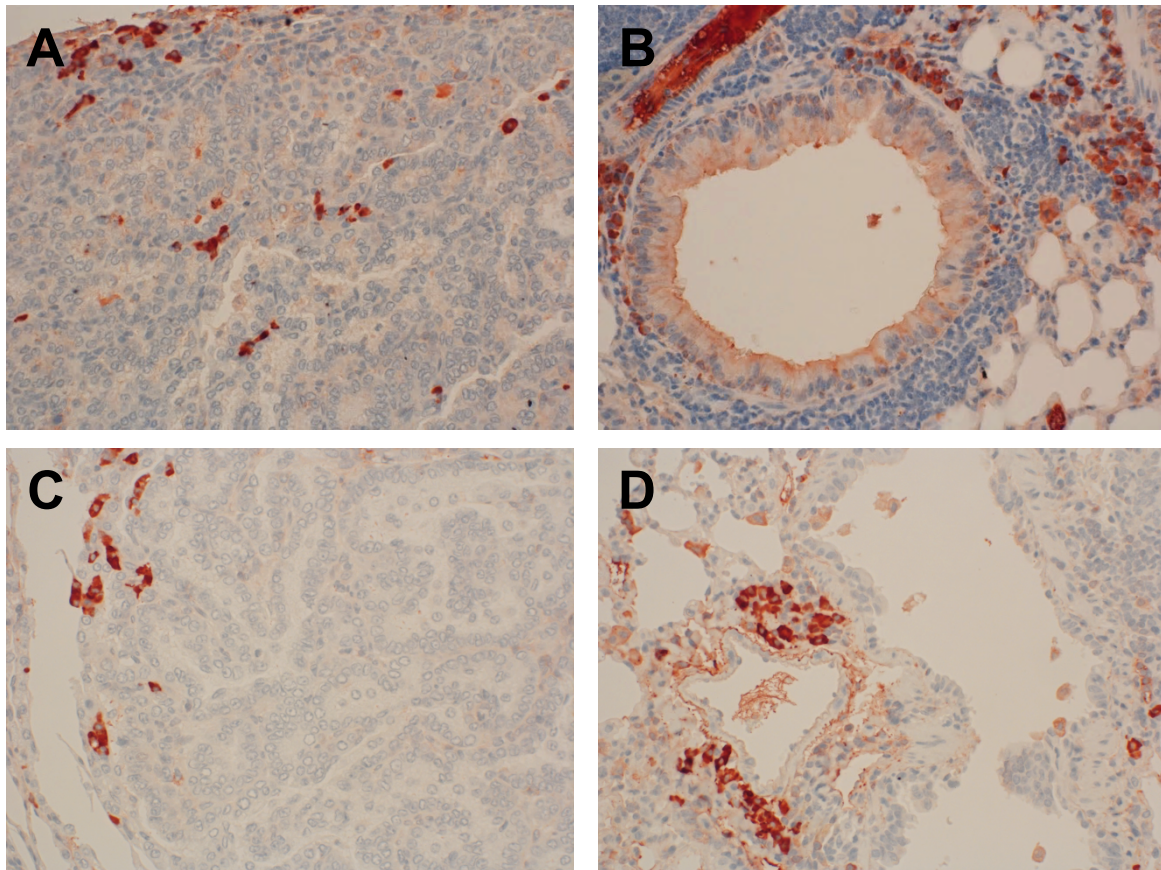


**Abbildung 7:** Nachweis der Expression der Plattenepithelkarzinom-Marker 34 $\beta$ E12 (A, B) und SCCA1/2 (C, D) in Lungenanschnitten von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. A, C: Adenoider Tumor. B, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach.

### 5.3.2.3 Expression der Adenokarzinom-Marker

Das Antikörpergemisch AE1/AE3+5D3 gegen saure und basische Zytokeratine (Panzytokeratin) wurde in der vorliegenden Arbeit als ein Marker für Adenokarzinome verwendet. Im tumorfreien Normalgewebe fand sich ein homogenes Verteilungsmuster an solitären, großen, rundlichen, zytoplasmatisch mittelstark gefärbten Zellen, die wahrscheinlich großen Immunzellen wie Monozyten oder Makrophagen entsprechen. Im Bronchialepithel ließ sich eine Expression des Panzytokeratins ebenfalls nachweisen. Hier zeigte sich eine leichte bis mittelstarke zytoplasmatische Färbung. Die adenoiden Tumore waren zum großen Teil negativ für Panzytokeratin. Lediglich in einigen wenigen, in den adenoiden Tumoren verteilten solitären Zellen ließ sich das Panzytokeratin nachweisen. Zusätzlich fanden sich in einigen Tumoren randständige Gruppen an intensiv zytoplasmatisch positiven Zellen (siehe Abbildung 8A). In den kleinzelligen Strukturen ließen sich ebenfalls Panzytokeratin-positive Anteile nachweisen, wobei sich Tumorbereiche mit sehr hoher Zelldichte allerdings negativ präsentierten. In Bereichen, in denen die Zellen etwas lockerer aneinander lagen, fanden sich dagegen viele für Panzytokeratin positive Zellen (siehe Abbildung 8B). Die Expression des Adenokarzinom-Markers Panzytokeratin war in den verschiedenen Mauslinien gleich und wurde auch von der AMD3100-Behandlung nicht beeinflusst.

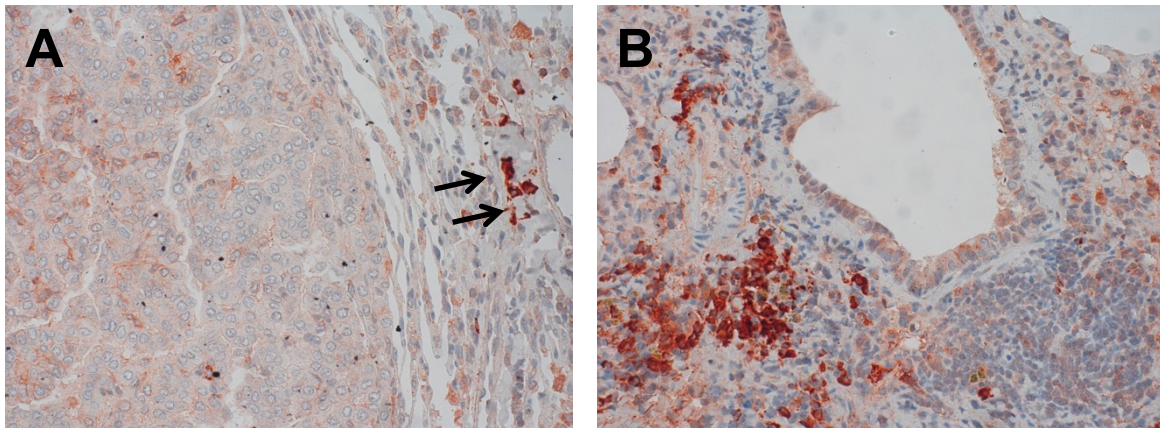
MUC1/EMA (englisch: *Mucin 1/Epithelial Membrane Antigen*) ist ein großes Oberflächenprotein, welches von den meisten Drüsen- und Drüsengangepithelzellen sowie von zahlreichen Adenokarzinomen exprimiert wird. Insgesamt zeigte sich in dieser Färbung eine hohe Übereinstimmung mit der Panzytokeratin-Färbung. So ließ sich MUC1/EMA ebenfalls in den Zellen des Bronchialepithels nachweisen. Das Gefäßendothel präsentierte sich ferner positiv. Die neoplastischen Zellen der nichtkleinzelligen Tumore wiesen bis auf wenige Ausnahmen keine Positivitäten auf. Die solitären oder in kleinen Zellgruppen liegenden Zellen mit einer zytoplasmatischen Färbung für Panzytokeratin waren für MUC1/EMA ebenfalls positiv. Diese positiven Zellen in den adenoiden Tumoren waren vorwiegend am Rand der Tumore gelegen (siehe Abbildung 8C). Die Zellen in den kleinzelligen Strukturen wiesen anteilsweise intensive zytoplasmatische Färbungen auf. Auch hier lagen die intensiv gefärbten Zellen in den eher locker aneinander liegenden Zellverbänden, während die Zellverbände der Tumore, die sehr dicht beieinander lagen, negativ für das Oberflächenprotein waren (siehe Abbildung 8D). Das MUC1/EMA-Expressionsmuster wurde durch die AMD3100-Behandlung nicht beeinflusst und zeigte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien.



**Abbildung 8:** Nachweis der Expression der Adenokarzinom-Marker Panzytokeratin (A, B) und MUC1/EMA (C, D) in Lungenanschnitten von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. A, C: Adenoide Tumor. B, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung 400fach.

#### 5.3.2.4 Ki-67- Expression

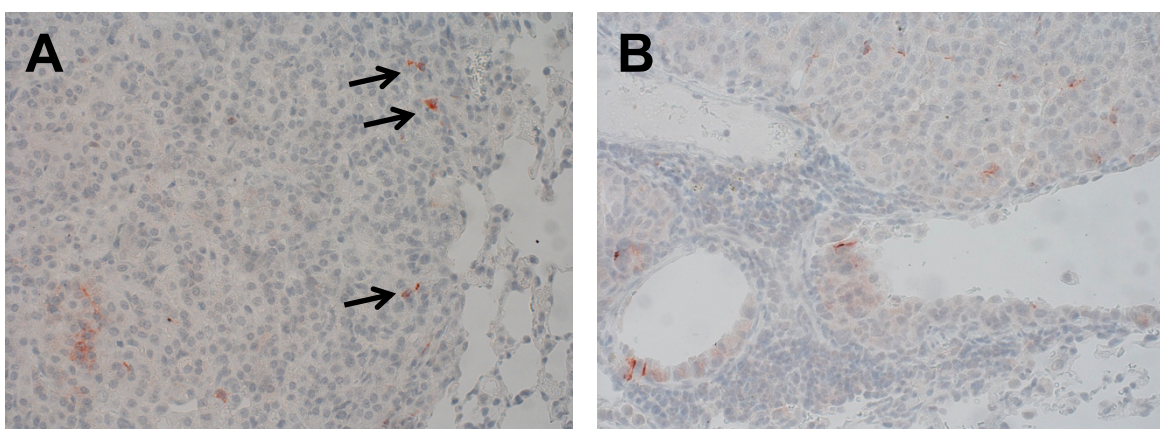
Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, welcher in allen Phasen der Zellteilung außer in der G<sub>0</sub>-Phase im Zellkern exprimiert wird. Trotz der physiologisch hohen Teilungsaktivität des Bronchial- und Alveolarepithels wurde in den gefärbten Lungenschnitten keine spezifische Färbung deutlich. Das Gefäßendothel war hingegen gefärbt. Bei den adenoiden Tumoren zeigten nur wenige, peripher gelegene Zellen ein intensives Immunsignal (siehe Abbildung 9A). Die kleinzelligen Strukturen weisen ein variables Expressionsmuster auf. In einigen Tumoren war kein Ki-67 nachzuweisen. Die meisten kleinzelligen Strukturen zeigten dagegen eine hohe Proliferationsaktivität (siehe Abbildung 9B). Eine Behandlung mit AMD3100 hatte keinen Einfluss auf die Teilungsaktivität des Normalgewebes oder der beiden Tumorentitäten. Auch zwischen den verschiedenen transgenen Mauslinien wies die Ki-67-Expression im Normalgewebe der Lunge oder in den Tumoren keine Unterschiede auf.



**Abbildung 9:** Darstellung der Ki-67-Expression in einem adenoiden Lungentumor (A) und einem kleinzelligen Tumor (B) von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. A: Pfeile markieren Zellen mit einer hohen Ki-67-Expression in der Peripherie eines adenoiden Tumors. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach.

### 5.3.2.5 Expression des Somatostatin-Rezeptors SSTR2

Der Somatostatin-Rezeptor SSTR2 konnte in wenigen Abschnitten des Bronchialepithels mit einer leichten bis mittelstarken zytoplasmatischen Färbung nachgewiesen werden. In den Tumoren mit nichtkleinzelliger Differenzierung fanden sich zwischen 0 und maximal 5 Zellen, die eine zytoplasmatische SSTR2-Expression aufwiesen, wobei diese Zellen keine spezifische Lokalisierung innerhalb der jeweiligen Neoplasie zeigten (siehe Abbildung 10A). In den kleinzelligen Tumoren war ebenfalls mehrheitlich keine SSTR2-Expression nachweisbar (siehe Abbildung 10B). Auch hier konnten lediglich einzelne Zellen, die eine SSTR2-Positivität aufwiesen, aufgefunden werden. Der Lymphknotenanschnitt war SSTR2-negativ. Es zeigten sich keine Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den Mäusen mit und ohne AMD3100-Behandlung oder zwischen den verschiedenen Mauslinien.

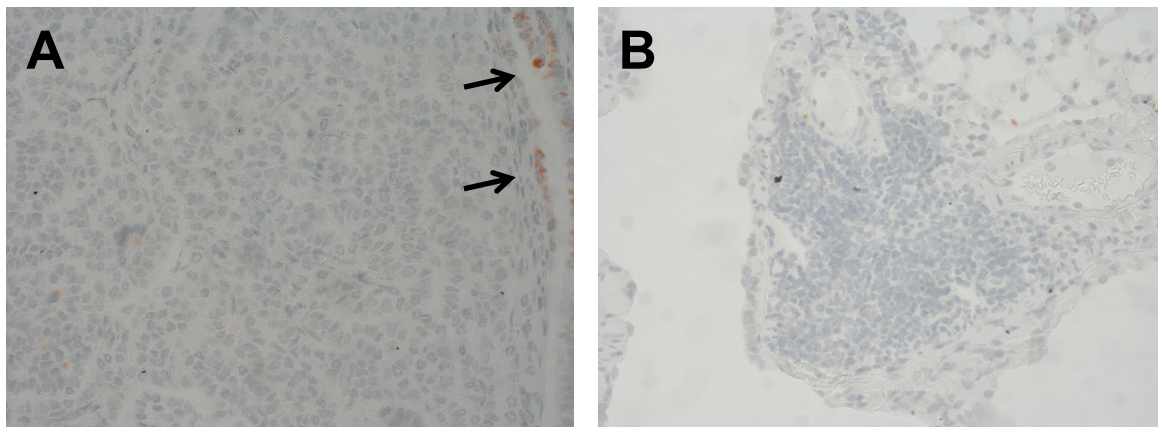


**Abbildung 10:** Darstellung der Expression des Somatostatin-Rezeptors SSTR2 in einem adenoiden Tumor (A) und einem kleinzelligen Tumor (B) in den Lungenanschnitten von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. A: Pfeile markieren SSTR2-positive Zellen in einem adenoiden Tumor. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach.

### 5.3.2.6 Expression von CD133

Das Glykoprotein CD133 befindet sich physiologisch in der Zellmembran von hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Vorläuferzellen sowie neuronalen und glialen Stammzellen. Es wird außerdem von einigen Tumor-Stammzellen exprimiert. Der Marker wurde in der vorliegenden Arbeit als Tumorstammzellmarker eingesetzt.

Im tumorfreien Normalgewebe waren Positivitäten im Gefäßendothel, im Bronchialepithel sowie in den Alveolarsepten zu verzeichnen. Der angeschnittene Lymphknoten zeigte eine hohe Konzentration an membranständig positiven Zellen. In den beiden Tumorentitäten ließ sich der Tumorstammzellmarker mehrheitlich nicht nachweisen (siehe Abbildung 11A, B). Lediglich wenige adenoiden Tumore wiesen einige peripher gelegene membranständig positive Zellen auf (siehe Abbildung 11A). Die Häufigkeit und die Intensität der gefärbten Zellen zeigten keine Unterschiede in Abhängigkeit von der AMD3100-Behandlung sowie zwischen den unterschiedlichen Mauslinien.



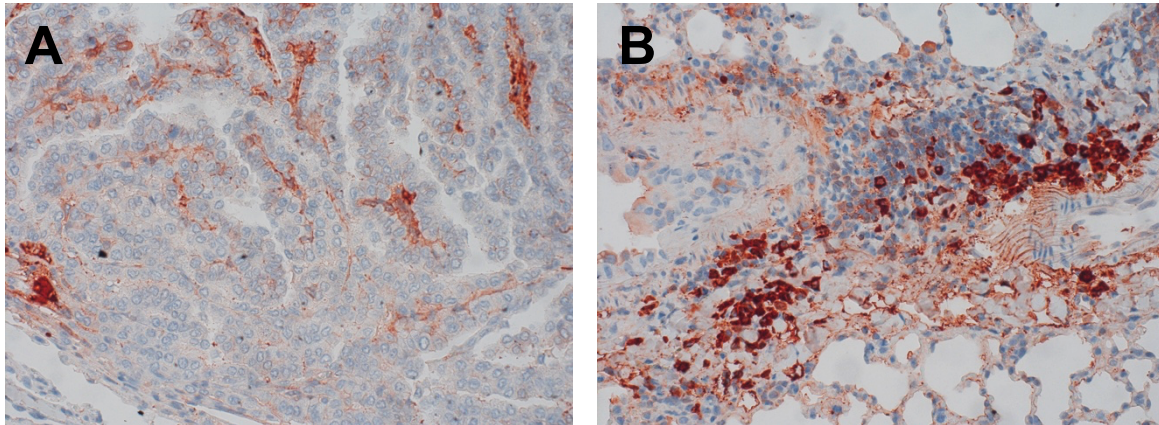
**Abbildung 11:** Darstellung der Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 in einem adenoiden Tumor (A) und einem kleinzelligem Tumor (B) in den Lungenanschnitten von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. A: Pfeile zeigen auf CD133-positive Zellen im Randbereich eines adenoiden Tumors. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach.

### 5.3.3 Expression von CD34

Das Oberflächenprotein CD34 wird physiologisch von den Endothelzellen der Gefäße und von unreifen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Das CD34 zeigte sich membranständig und zytoplasmatisch in den angeschnittenen Gefäßen des tumorfreien Lungengewebes. In den nichtkleinzelligen Tumoren fanden sich ebenfalls CD34-positive Gefäßanschnitte (siehe Abbildung 12A). Es zeigte sich allerdings kein erhöhter Vaskularisierungsgrad in Abhängigkeit von der Größe des Tumors. In der Nähe von Bronchien und kleineren Abschnitten des Bronchialsystems sowie in enger Beziehung zu den Tumoren waren ebenfalls CD34-positive Zellen zu verzeichnen. Zusätzlich fanden sich in den adenoiden Tumoren einzelne, vor allem



zytoplasmatisch positive Zellen, die allerdings keine bestimmte Lokalisierung innerhalb der Tumore aufweisen. Die Dichte an positiven Zellen nahm jedoch zur Peripherie der Tumore hin zu. In den Tumoren mit kleinzelliger Differenzierung gelang ebenfalls ein Nachweis von CD34-positiven Zellen (siehe Abbildung 12B). Die Positivitäten zeigten sich unabhängig von der TumorgroÙe, der Behandlungsgruppe und der Mauslinie. In dem angeschnittenen Lymphknoten fand sich ebenfalls ein kleiner Anteil an CD34-exprimierenden Zellen.



*Abbildung 12: Darstellung der Expression des Oberflächenproteins CD34 in einem adenoiden Tumor (A) und einem kleinzelligen Tumor (B) in den Lungenanschnitten von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach.*

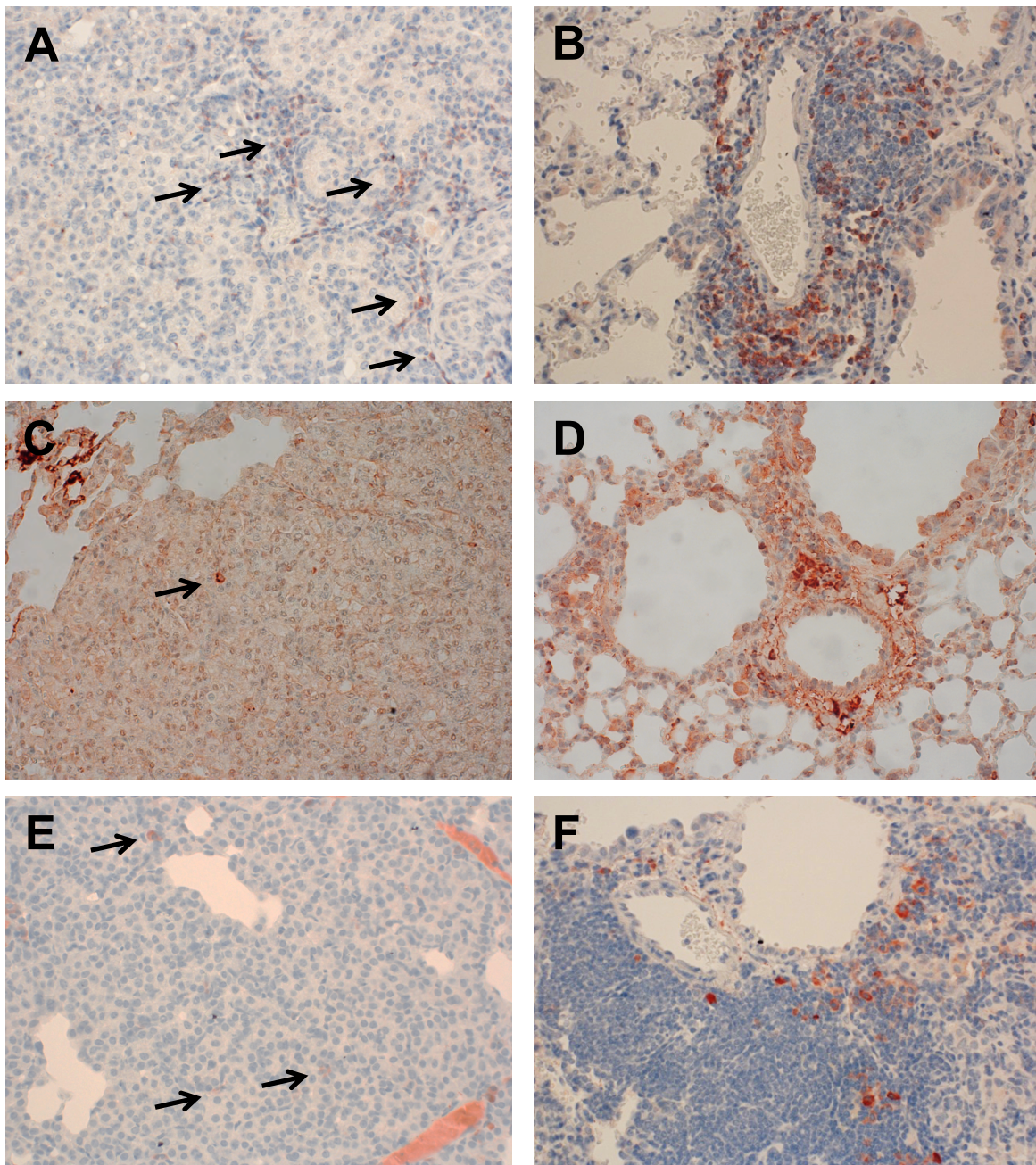
#### 5.3.4 Expression der Immunzellmarker

Das CD3-Antigen wird von T-Lymphozyten exprimiert und dient zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor einer Aktivierung der Zellen. Die immunhistochemische Untersuchung des CD3-Antigens ergab im tumorfreien Alveolarepithel und in den Alveolarsepten den Nachweis von solitären T-Lymphozyten. Die in geringer Dichte vorliegenden kleinen, membranständig CD3-positiven Zellen zeigten einen großen runden Zellkern und einen schmalen Zytoplasmasaum. Eine erhöhte Konzentration an CD3-positiven T-Lymphozyten fand sich in der Nähe der Neoplasien sowie in den zentralen Bereichen der Lunge. Der Anschnitt eines Lymphknotens zeigte die hohe Konzentration der sich dort befindenden T-Lymphozyten. Hierbei konnte die höchste Dichte der CD3-positiven Zellen im Parakortex des Lymphknotens verzeichnet werden. In den adenoiden Tumoren fanden sich solitäre oder in Zellgruppen zusammenliegende CD3-positive Zellen (siehe Abbildung 13A). Die Anzahl an positiven Zellen war insbesondere in den größeren Tumoren erhöht. In einigen adenoiden Neoplasien konnte allerdings kein Nachweis von T-Lymphozyten erbracht werden. Auch in den dysplastischen Vorstufen der adenoiden Tumore konnten keine T-Lymphozyten nachgewiesen werden. In den kleinzelligen Strukturen war eine hohe Konzentration an membranständig positiven Zellen nachzuweisen.

Der Anteil an positiven Zellen variierte hierbei deutlich zwischen einem sehr geringen Anteil mit nur einzeln verteilten Zellen und Anteilen von bis zu 50% (siehe Abbildung 13B). Somit ist ein Teil der kleinzelligen Strukturen als CD3-präsentierende T-Lymphozytenansammlungen zu werten. Die Anzahl der T-Lymphozyten war hierbei unabhängig von der Behandlung mit AMD3100 und von den verschiedenen transgenen Mauslinien.

Mithilfe des CD20-Antigens wird eine weitere Differenzierung der Immunzellen in B-Lymphozyten ermöglicht. CD20 wird mit Ausnahme des ersten und letzten Entwicklungsstadiums in allen Stadien der B-Zell-Entwicklung exprimiert. Die membranständig positiven Zellen zeigten einen in Relation zur insgesamt geringen Zellgröße großen Zellkern und wenig Zytoplasma. Zwischen den tumorfreien Alveolarepithelzellen und in den Alveolarsepten fanden sich nur wenige, meist solitäre B-Lymphozyten. In der Nähe zu den Bronchien sowie weiteren Aufzweigungen des Bronchialsystems zeigte sich eine erhöhte Anzahl an positiven Zellen. Nur in wenigen adenoiden Tumoren waren B-Lymphozyten aufzufinden (siehe Abbildung 13C). Analog zum CD3-Nachweis wurde auch an dieser Stelle die Unterteilung der kleinzelligen Strukturen in zwei Entitäten deutlich. Ein Teil der Läsionen konnte als Ansammlungen von CD20-exprimierenden B-Lymphozyten identifiziert werden (siehe Abbildung 13D).

F4/80 ist ein Glykoprotein, welches in hohen Konzentrationen auf Makrophagen der Maus exprimiert wird. Die positiven Zellen stellten sich groß, rundlich und zytoplasmatisch gefärbt dar. Es fand sich ein annähernd homogenes Verteilungsmuster an großen rundlichen Zellen mit zytoplasmatischer Färbung zwischen den Alveolarepithelzellen und in den Alveolarsepten. Die Positivitäten entsprachen offensichtlich den Alveolarmakrophagen und wiesen in der Nähe von Tumoren und in direkter Beziehung zu Bronchien eine erhöhte Präsenz auf. Die vereinzelt im Inneren der adenoiden Tumore aufzufindenden CXCR4-exprimierenden Zellen (siehe oben) ließen sich als F4/80-positive Makrophagen identifizieren (siehe Abbildung 13E). Die kleinzelligen Strukturen waren ebenfalls von Makrophagen infiltriert. Die Dichte der Makrophagen, die sich in den kleinzelligen Tumoren oder in direkter Nähe dazu befanden, war variabel. Die im Vergleich zu den kleinen Zellen der Läsionen deutlich größeren Zellen lagen verteilt oder in kleinen Zellgruppen zusammen und zeigten eine variable Inzidenz zwischen 0 und 10 Zellen pro kleinzelliger Zellansammlung (siehe Abbildung 13F). Die Anzahl der mit dieser Färbung als Makrophagen identifizierten Zellen erwies sich als unabhängig von der verwendeten Mauslinie sowie auch von einer AMD3100-Behandlung.



**Abbildung 13:** Darstellung der Immunzellen in adenoiden Tumoren (A, C, E) und kleinzelligen Tumoren (B, D, F) in Lungenanschnitten von mit NNK und LPS behandelten Mäusen. CD3-Expression als Marker für T-Lymphozyten in (A: Pfeile markieren positive Zellen) und (B). CD20-Expression als Marker für B-Lymphozyten in (C; Pfeil markiert eine positive Zelle) und (D). F4/80-Expression zur Markierung von Makrophagen in (E: Pfeile markieren positive Zellen) und (F). Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach.

## 5.4 Doppel-Immunhistochemie an Free-Floating-Schnitten

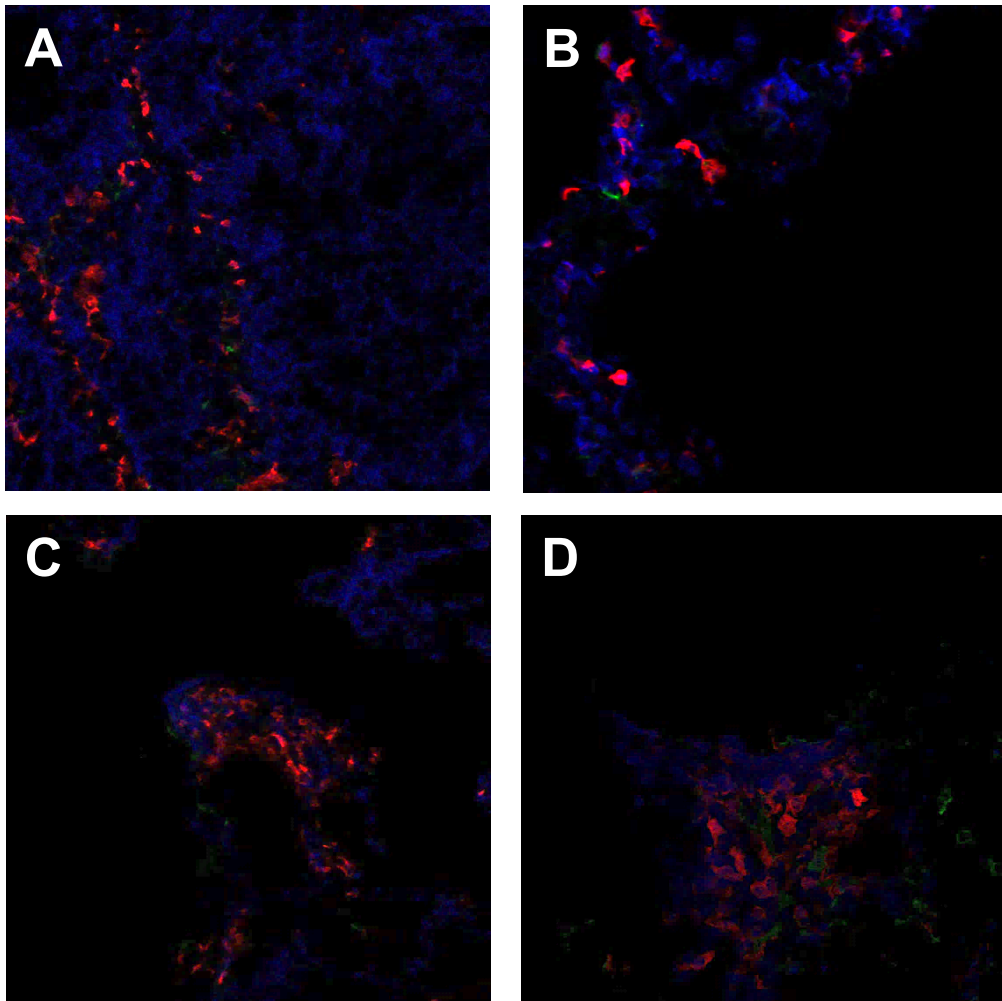
Immunhistochemische Fluoreszenz-Färbungen an Free-Floating-Schnitten ermöglichen mittels einer Doppelmarkierung die Betrachtung von Koexpressionen der verwendeten Tumormarker. Diese Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich an den Lungen der Tiere der Versuchsserie 3, d.h. von *CXCR4-eGFP*-Mäusen, vorgenommen

### 5.4.1 eGFP und NCAM

Zunächst wurde die Expression von eGFP, und somit von CXCR4, mit der Expression des neuroendokrinen Markers NCAM (CD56) verglichen. Im tumorfreien Lungengewebe konnte eGFP im Bronchialepithel und in einzelnen Zellen des Alveolarepithels dargestellt werden. NCAM fand sich in wenigen solitären Zellen im Normalgewebe, wobei diese Zellen kein bestimmtes Lokalisationsmuster aufwiesen. Insgesamt konnte im Normalgewebe keine Kolo-kalisation von eGFP und NCAM verzeichnet werden.

In den Tumoren mit nichtkleinzelliger Differenzierung waren nur wenige bis keine eGFP-positiven Zellen zu sehen. Die NCAM-exprimierenden Zellen präsentierten sich mit intensiver membranständiger und teilweise auch zytoplasmatischer Färbung vor allem in der Peripherie der jeweiligen Neoplasien. Es konnten keine Zellen, die beide Marker gleichzeitig aufwiesen, detektiert werden (siehe Abbildung 14A, B).

In den kleinzelligen Strukturen zeigten sich ebenfalls nur wenige eGFP-positive Zellen. Dagegen fand sich eine hohe Dichte an zytoplasmatisch und membranständig für NCAM gefärbten Zellen. Es konnte dabei keine Abhängigkeit von der Tumorgöße beobachtet werden. Obwohl der Nachweis von eGFP nur schwach gelang, wurde eine Koexpression der beiden Marker vor allem in den kleinzelligen Tumoren deutlich (siehe Abbildung 14C, D). Beide Marker zeigten keine Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den Mäusen ohne oder mit AMD3100-Behandlung.



**Abbildung 14:** Nachweis der NCAM-Expression und indirekter Nachweis der CXCR4-Expression durch die Darstellung von eGFP in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4*-eGFP-Mäusen aus Versuch 3. Fluoreszenzmikroskopie (grün: eGFP, rot: NCAM (CD56), blau: DAPI). A, B: Adenoide Tumore. C, D: SCLC. Originalvergrößerung: 200fach (A, C), 400fach (B, D).

#### 5.4.2 eGFP und SCCA1/2

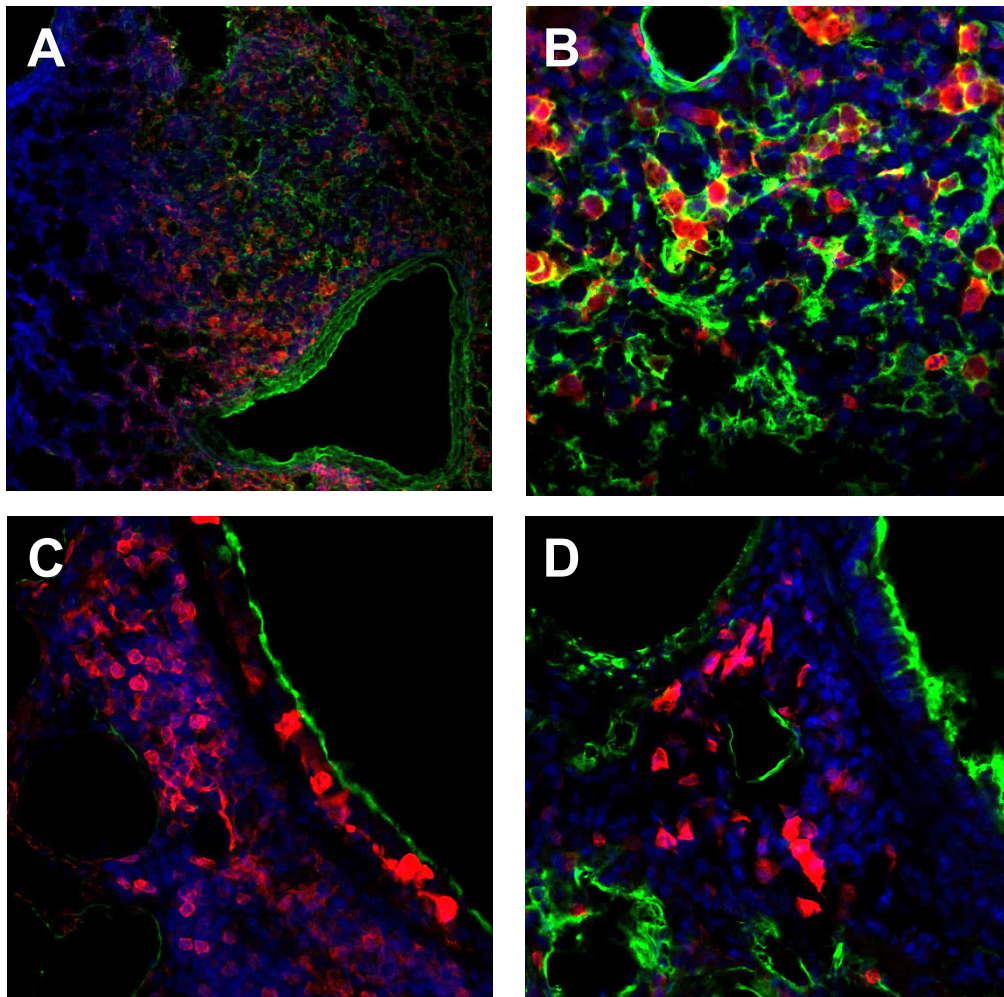
Während ein Großteil des Bronchialepithels eGFP und somit CXCR4 exprimierte, zeigten sich nur stellenweise solitäre Zellen im Bronchialepithel, die eine intensive zytoplasmatische Positivität für SCCA1/2 aufwiesen. Im Normalgewebe konnte keine Koexpression der beiden Marker detektiert werden.

In den nichtkleinzelligen Tumoren konnten vor allem peripher im Tumorgewebe große, runde Zellen nachgewiesen werden, die eine Koexpression beider Marker aufwiesen. Dabei waren beide Marker zytoplasmatisch exprimiert. Insgesamt war nur ein kleiner Teil der adenoiden Tumore jeweils für die Marker positiv und die solitären Zellen waren insgesamt inhomogen in diesen Tumoren verteilt (siehe Abbildung 15A, B).

Im Vergleich zu den nichtkleinzelligen Tumoren fanden sich in den kleinzelligen Strukturen keine Zellen, in denen eine Koexpression der beiden untersuchten Marker zu finden war.

Insgesamt ließen sich nur wenige eGFP-positive Zellen detektieren. Es zeigte sich jedoch eine hohe Konzentration an intensiv zytoplasmatisch SCCA1/2-positiven Zellen. Einige kleinzellige Läsionen wiesen weder eine eGFP- noch eine SCCA1/2-Expression auf (siehe Abbildung 15C, D).

Die eGFP- bzw. SCCA1/2-Expressionsmuster wurden durch die AMD3100-Behandlung nicht beeinflusst.



**Abbildung 15:** Nachweis der SCCA1/2-Expression und indirekter Nachweis der CXCR4-Expression durch die Darstellung von eGFP in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4*-eGFP-Mäusen aus Versuch 3. Fluoreszenzmikroskopie (grün: eGFP, rot: SCCA1/2, blau: DAPI). A, B: Adenoider Tumor. C, D: SCLC. Originalvergrößerung: 100fach (A), 400fach (B-D).

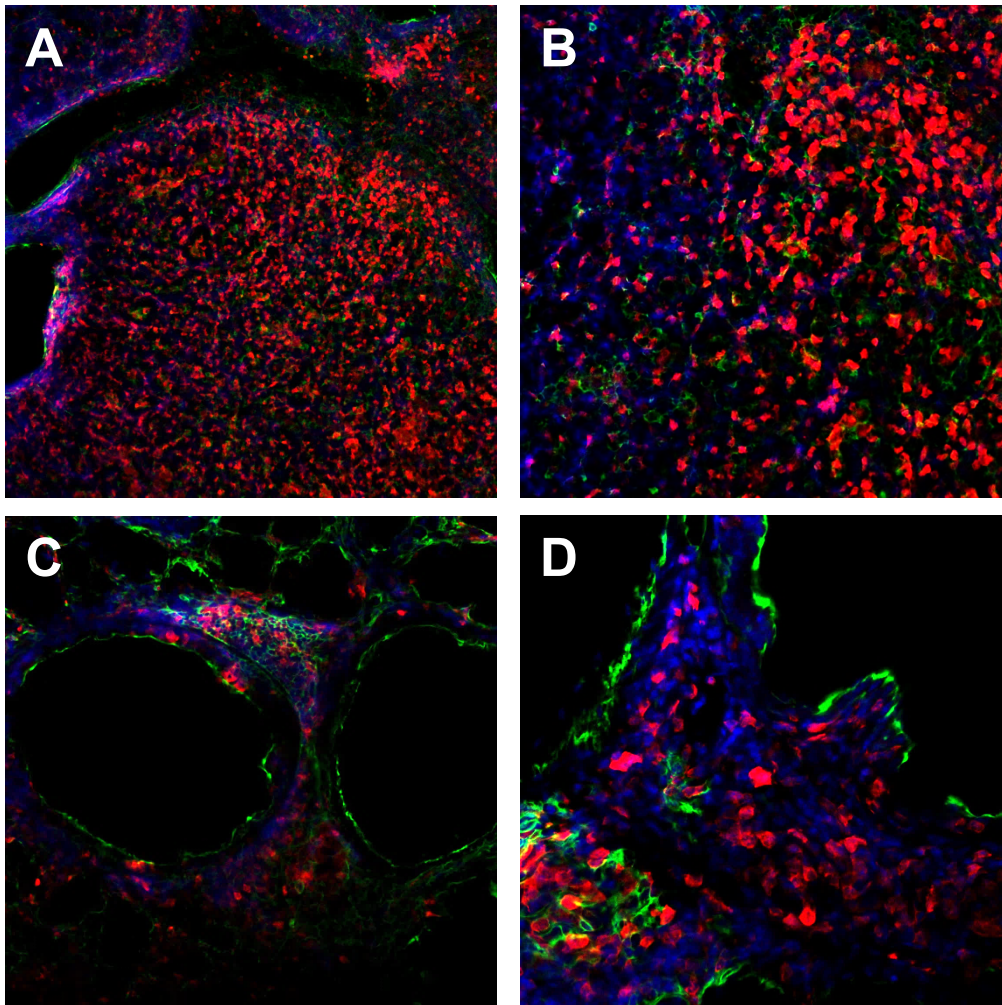
### 5.4.3 eGFP und MUC1/EMA

Im tumorfreien Normalgewebe der Lunge konnte das eGFP wiederum im Bronchialepithel und in einzelnen Zellen des Alveolarepithels dargestellt werden. An einigen Abschnitten des Bronchialepithels zeigte sich auch eine zytoplasmatische Expression von MUC1/EMA. Es fand sich keine Koexpression der beiden Marker im tumorfreien Lungengewebe.

Anders als in den immunhistochemischen Färbungen an Paraffinschnitten, in denen der Nachweis des Adenokarzinom-Markers nur in wenigen solitären Zellen in den nichtkleinzelligen Tumoren gelang, zeigten sich in den Free-Floating-Untersuchungen Tumore, die zu hohen Anteilen MUC1/EMA exprimierten. Die eGFP-exprimierenden Zellen fanden sich vereinzelt und homogen verteilt zwischen den MUC1-positiven Zellen. Eine Koexpression der beiden Marker war allerdings nur in wenigen Fällen nachweisbar (siehe Abbildung 16A, B).

In den kleinzelligen Strukturen gelang der Nachweis des Adenokarzinom-Markers MUC1/EMA ebenfalls. Hierbei zeigte sich wiederum eine zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen. In seltenen Fällen konnte auch eine Koexpression mit eGFP nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnten Zellen ausgemacht werden, die ausschließlich eGFP exprimierten. Andere kleinzellige Strukturen wiesen hingegen keine eGFP-Expression auf, sondern in Gruppen liegende MUC-exprimierende Zellen. Eine Koexpression der beiden Marker stellte bei den Zellen in den kleinzelligen Tumoren aus diesem Grund eher eine Ausnahme dar (siehe Abbildung 16C, D).

Die Expression des eGFP und des MUC1/EMA zeigte analog zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen an Paraffinschnitten keine Beeinflussung durch eine Behandlung mit AMD3100.



**Abbildung 16:** Nachweis der MUC1/EMA-Expression und indirekter Nachweis der CXCR4-Expression durch die Darstellung von eGFP in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4*-eGFP-Mäusen aus Versuch 3. Fluoreszenzmikroskopie (grün: eGFP, rot: MUC1/EMA, blau: DAPI). A, B: Adenoide Tumore. C, D: SCLC. Originalvergrößerung: 100fach (A), 200fach (B, C), 400fach (D).

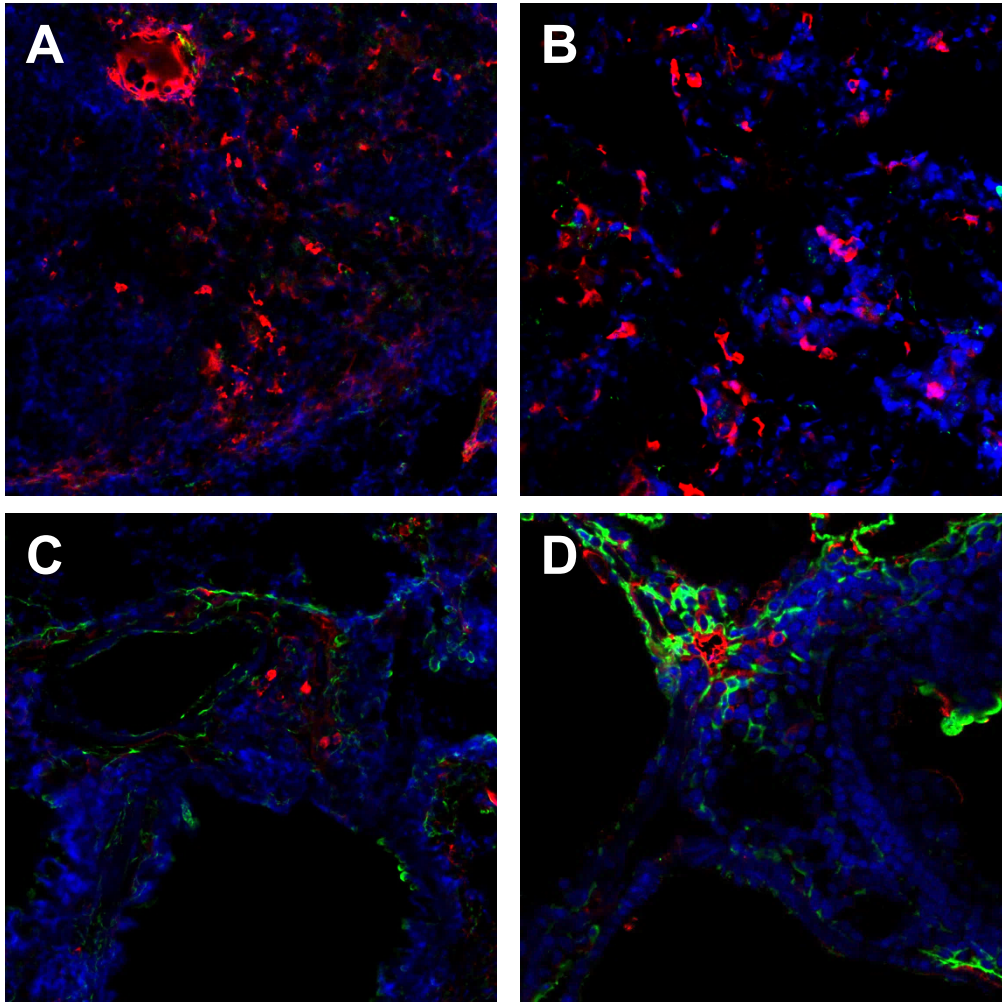
#### 5.4.4 SCCA1/2 und Synaptophysin

Weiterführend wurde eine mögliche Koexpression des Plattenepithelkarzinom-Markers SCCA1/2 und des neuroendokrinen Markers Synaptophysin untersucht. Das Bronchialepithel exprimierte SCCA1/2 zytoplasmatisch. Vereinzelt fanden sich zytoplasmatisch Synaptophysin-positive Zellen im Lungengewebe. Im tumorfreien Gewebe war keine Koexpression der beiden Marker zu finden. Die Tumore mit nichtkleinzelligem Charakter wiesen, wie bereits in den immunhistochemischen Färbungen an Paraffinschnitten gezeigt, vor allem randständig positive Zellen für die beiden Tumormarker auf. Dabei zeigte sich eine Koexpression von SCCA1/2 und Synaptophysin, wobei jedoch deutlich mehr Zellen Synaptophysin als SCCA1/2 exprimierten (siehe Abbildung 17A, B).

Auch in den Anschnitten der kleinzelligen Strukturen konnten SCCA1/2- und Synaptophysin-positive Zellen mit variablen Anteilen und Lokalisationen im Tumorgewebe nachgewiesen



werden. Es zeigte sich in dieser Färbung anders als in den adenoiden Tumoren keine Koexpression der beiden Marker (siehe Abbildung 17C, D). Die Behandlung mit AMD3100 hatte keinen Einfluss auf das Expressionsmuster der beiden Marker.



**Abbildung 17:** Darstellung der SCCA1/2- und Synaptophysin-Expressionen in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-Mäusen aus Versuch 3. Fluoreszenzmikroskopie (grün: SCCA1/2, rot: Synaptophysin, blau: DAPI). A, B: Adenoide Tumore. C, D: SCLC. Originalvergrößerung: 200fach (A, C), 400fach (B, D).

#### 5.4.5 MUC1/EMA und SCCA1/2

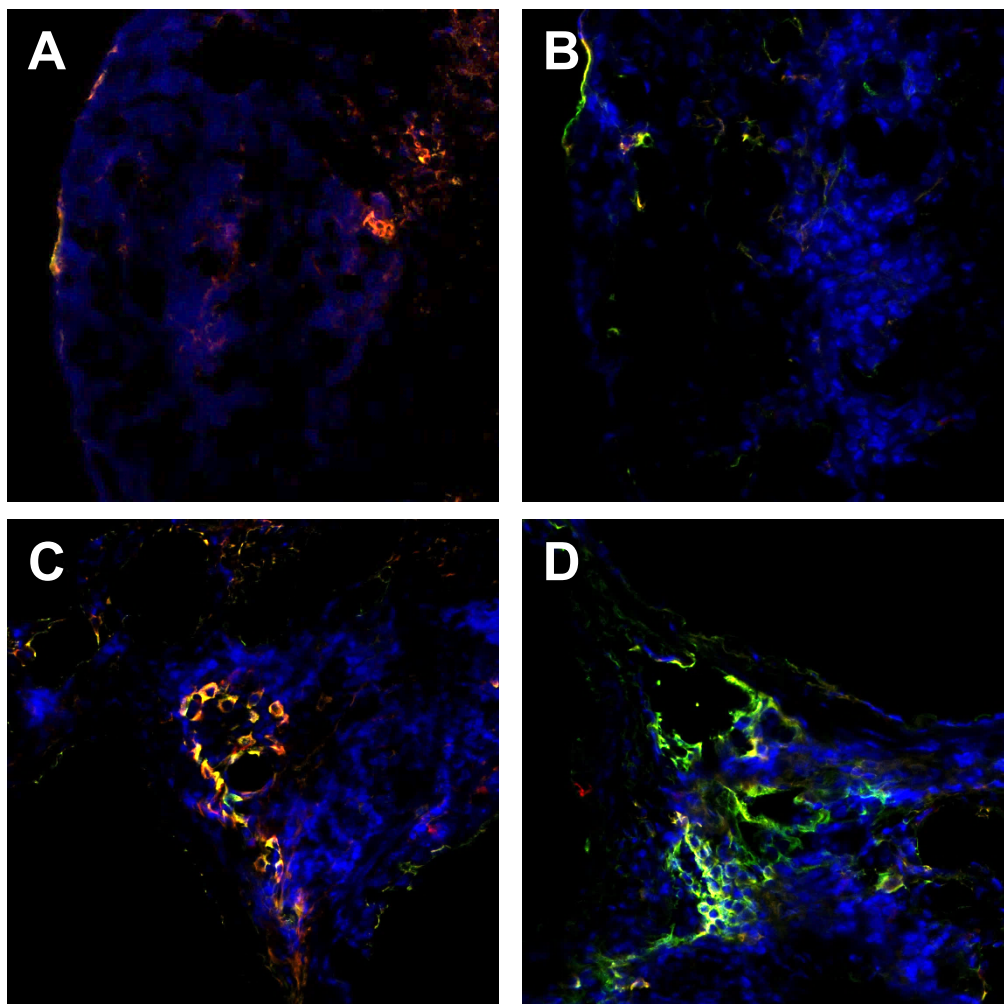
Im Bronchialepithel ließen sich solitäre Zellen nachweisen, die eine zytoplasmatische Expression von SCCA1/2 aufwiesen. An einigen Abschnitten des Bronchialepithels wurde auch MUC1/EMA zytoplasmatisch exprimiert, wobei keine Koexpression dieser Marker im tumorfreien Normalgewebe zu finden war. Wenige Zellen zwischen den Alveolarepithelzellen zeigten ebenfalls zytoplasmatisch den Adenokarzinom-Marker MUC1/EMA.

In den adenoiden Tumoren waren bei beiden Markern nur wenige Positivitäten zu verzeichnen. Es fanden sich vor allem am Rande der Tumore oder in der Nähe von Gefäßen einige wenige

Zellen, die zytoplasmatisch entweder MUC1/EMA oder SCCA1/2 exprimierten. Dabei wiesen nur wenige Zellen beide Tumormarker gleichzeitig auf (siehe Abbildung 18A, B).

Im Gegensatz dazu konnten in den kleinzelligen Strukturen viele Zellen nachgewiesen werden, die eine zytoplasmatische Koexpression von MUC1/EMA und SCCA1/2 aufwiesen. Die beide Marker koexprimierenden Zellen zeigten kein bestimmtes Lokalisationsmuster in den Tumoren und auch die Anteile dieser Zellen im Tumorgewebe variierten stark. Anhand der Intensität der Immunfluoreszenz ließen sich Zellen identifizieren, die vermehrt MUC1/EMA exprimierten oder mehr SCCA1/2. Vereinzelt fanden sich auch Zellgruppen, die nur MUC1/EMA oder nur SCCA1/2 exprimierten (siehe Abbildung 18C, D).

Es konnte weder im tumorfreien Lungengewebe noch in den Tumoren eine Beeinflussung des Expressionsmusters durch AMD3100 festgestellt werden.



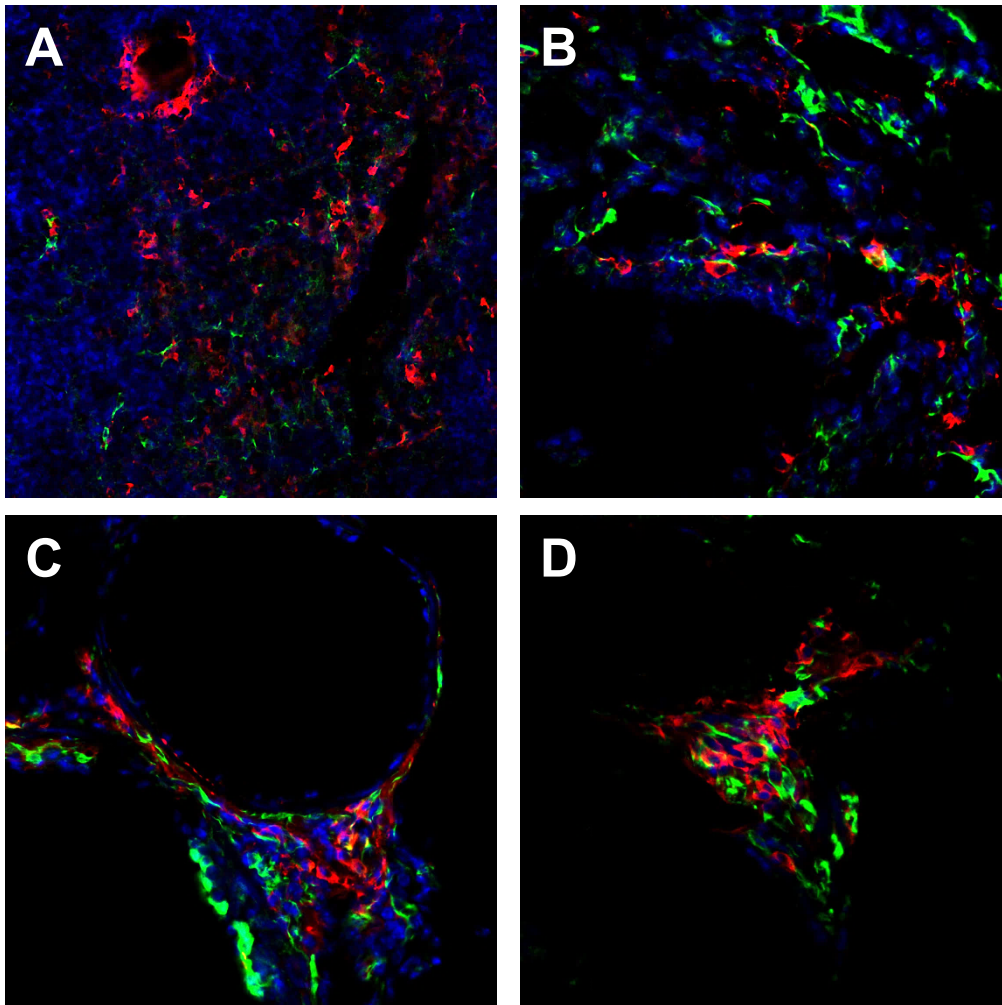
**Abbildung 18:** Darstellung der MUC1/EMA- und SCCA1/2-Expressionen in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-Mäusen aus Versuch 3. Fluoreszenzmikroskopie (grün: MUC1/EMA, rot: SCCA1/2, blau: DAPI). A, B: Adenoide Tumore. C, D: SCLC. Originalvergrößerung: 100fach (A), 200fach (B), 400fach (C, D).

#### 5.4.6 MUC1/EMA und Synaptophysin

Das Bronchialepithel zeigte eine zytoplasmatische Expression von MUC1/EMA. Vereinzelt fanden sich Zellen zwischen den Pneumozyten, die eine zytoplasmatische Synaptophysin-Expression aufwiesen. Im Normalgewebe waren keine koexprimierenden Zellen zu verzeichnen.

In den adenoiden Tumoren konnte vor allem in der Peripherie und in der Nähe von Gefäßen eine erhöhte Dichte an MUC1/EMA- oder Synaptophysin-positiven Zellen beobachtet werden. Hierbei lagen die für MUC1/EMA und die für Synaptophysin positiven Zellen nebeneinander und zeigten keine Koexpression der Marker (siehe Abbildung 19A, B). Die Tumore mit kleinzelliger Differenzierung wiesen analog zu den nichtkleinzelligen Tumoren nebeneinanderliegend Zellen mit einer Positivität für jeweils einen der beiden Marker auf. Auch hier war keine Koexpression der beiden Marker zu detektieren. Insgesamt zeigten hohe Anteile der kleinzelligen Strukturen entweder eine MUC1/EMA- oder eine Synaptophysin-Expression (siehe Abbildung 19C, D).

Die Expressionsmuster von MUC1/EMA und Synaptophysin änderten sich nicht in Abhängigkeit von einer Behandlung mit AMD3100.



**Abbildung 19:** Darstellung der MUC1/EMA- und Synaptophysin-Expressionen in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-Mäusen aus Versuch 3. Fluoreszenzmikroskopie (grün: MUC1/EMA, rot: Synaptophysin, blau: DAPI). A, B: Adenoide Tumore. C, D: SCLC. Originalvergrößerung: 100fach (A), 400fach (B- D).

## 5.5 Untersuchung der Lebern auf histopathologische Veränderungen

Die zu den häufigsten extrathorakalen Metastasierungsorten von Bronchialkarzinomen gehörende Leber wurde auf Fernmetastasen und pathologische Veränderungen hin untersucht. Die Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung ergab in den Kontrolltieren, in denen keine Tumorinduktion mittels NNK und LPS stattgefunden hatte, normales Leberparenchym ohne Zeichen einer Verfettung, entzündlichen Infiltration oder Fibrosierung des Gewebes. Die polyedrischen Hepatozyten zeigten sich in radiär auf die Zentralvene zulaufenden Leberzellbalken angeordnet. In den Hepatozyten ließen sich große, runde Zellkerne mit meist mehr als zwei Nukleoli nachweisen. Wenige Zellen besaßen mehr als einen Zellkern. Das Zytoplasma der Hepatozyten enthielt reichlich Glykogen (siehe Abbildung 20A).

Analog dazu präsentieren sich die Lebern der Tiere, die eine Tumorinduktion mittels NNK und LPS erhalten hatten. Auch hier fand sich ein relativ homogenes Leberparenchym mit einer radiären Anordnung der Hepatozyten. Die Hepatozyten präsentieren sich allerdings ödematös vergrößert. Weiterhin zeigte sich eine vermehrte Infiltration mit Immunzellen, vor allem im Bereich der Portalfelder. Diese Veränderungen konnten dabei gleichermaßen in den Lebern von nicht behandelten und von mit AMD3100 behandelten Tieren festgestellt werden (siehe Abbildung 20B).

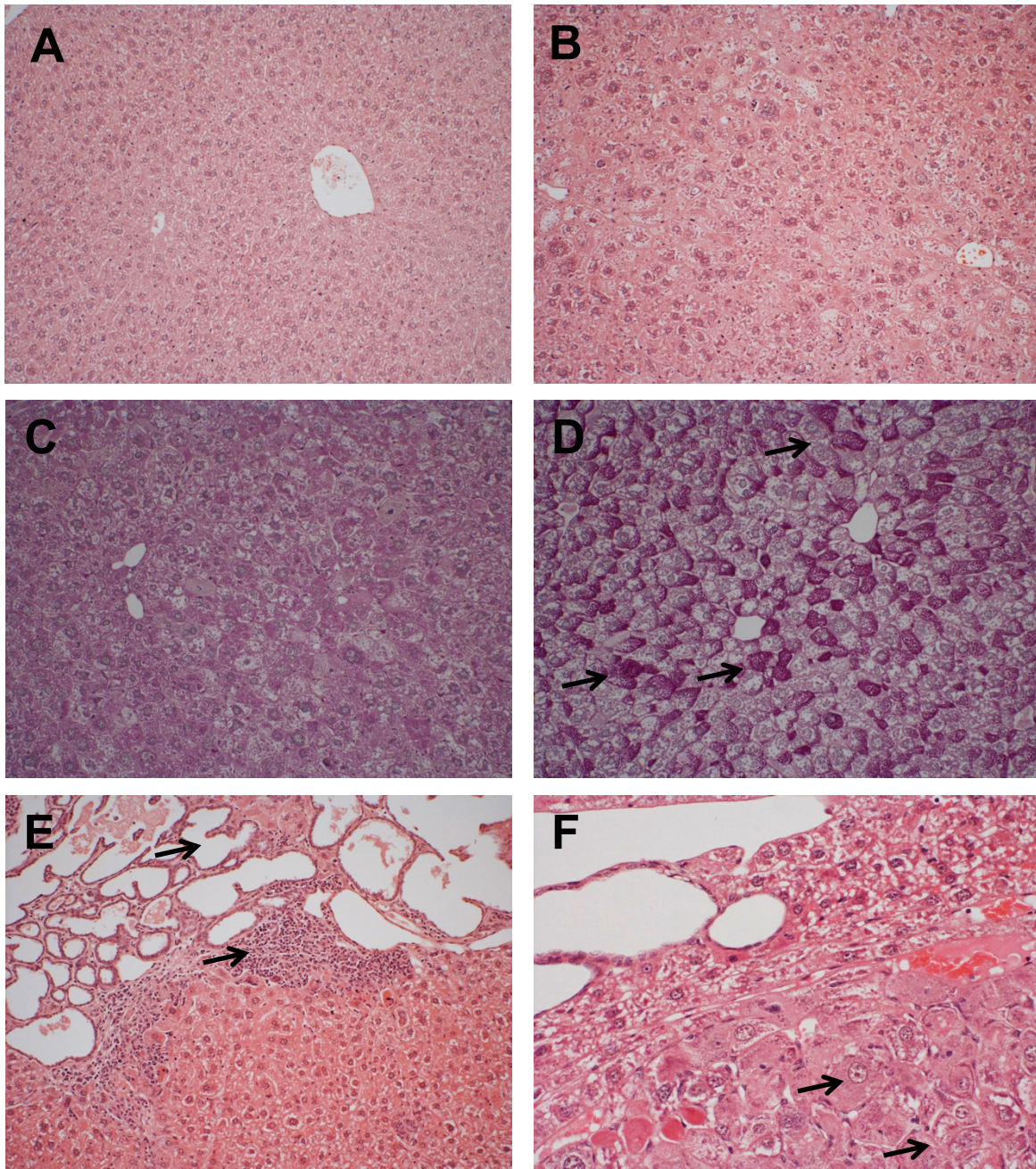
Trotz der teilweise recht großen Ausdehnung insbesondere der adenoiden Tumore bei den mit NNK und LPS behandelten Mäusen konnten bei keinem der Tiere Lebermetastasen gefunden werden. Weiterhin konnten keine primären Lebertumore nachgewiesen werden. Die systemische Behandlung mit dem Kanzerogen NNK hatte demzufolge offensichtlich keine Tumorinduktion in der Leber selbst zur Folge.

Die PAS-Reaktion dient einer Anfärbung von Kohlenhydraten und ermöglicht in der Leber eine Darstellung von gespeichertem Glykogen. In den Lebern der Kontrolltiere stellten sich die Hepatozyten sehr glykogenreich dar. Ein ähnlich hoher Glykogengehalt ließ sich auch in den Lebern der nur mit LPS bzw. mit NNK und LPS behandelten Tiere verzeichnen. Bei den mit NNK und LPS behandelten Tieren zeigte sich jedoch eine Tendenz zu einer höheren Glykogenspeicherung in den zusätzlich mit AMD3100-behandelten Tieren (siehe Abbildung 20C, D).

Die Pikro-Siriusrot-Färbung dient der Darstellung von Kollagen. In den Kontrolltieren, in den nur mit LPS behandelten Mäusen sowie in den mit NNK und LPS oder mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten Tieren ließ sich das Kollagen in den Periportalfeldern, in der

bindegewebigen Begrenzung der Zentralvenenläppchen sowie in den Gefäßwänden nachweisen. Es konnte kein erhöhter Fibrosierungsgrad in den mit NNK und LPS behandelten Tieren festgestellt werden. Es zeigte sich dabei auch kein Einfluss der AMD3100-Behandlung.

Eine Ausnahme bei den oben beschriebenen Beobachtungen stellten zwei Geschwistertiere dar, in deren Leberanschnitten gleichartige pathologische Veränderungen gefunden wurden (siehe Abbildung 20E, F). Die Lebern dieser nicht mit AMD3100 behandelten Tiere wiesen zahlreiche große, mit flachem Endothel ausgekleidete Kavernen auf. Diese waren durch dünne Bindegewebssepten getrennt und mit Erythrozyten gefüllt. Das Bild entspricht am ehesten einem kavernösen Hämangiom. In unmittelbarer Umgebung zu den Kavernen waren zwei verschiedene Zellpopulationen auffällig. Einerseits fanden sich kleine Zellen mit geringem Zytoplasmagehalt, die Immunzellen entsprechen könnten. Andererseits schloss sich an das Hämangiom eine Zellpopulation mit deutlich vergrößerten Hepatozyten mit polymorpher Kern- und Zellgestalt an. Die großzellige pathologische Veränderung wies in der PAS-Färbung keine vermehrte Glykogenspeicherung auf. In der Pikro-Siriusrot-Färbung zeigte sich ein erhöhter Kollagengehalt in den Kavernenwänden. In dem Abschnitt mit den vergrößerten atypischen Zellen fand sich ein gesteigerter Fibrosierungsgrad.



**Abbildung 20:** Mikroskopische Veränderungen in den Lebern der mit NNK und LPS behandelten Mäuse. Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbungen (A-B, E-F). A: Leber einer Kontroll-Maus ohne chemische Tumorinduktion. B: Leber einer mit AMD3100 behandelten Maus nach erfolgter chemischer Tumorinduktion. C: Leber einer Maus ohne AMD3100-Behandlung nach erfolgter chemischer Tumorinduktion in einer PAS-Färbung. D: Leber einer Maus mit AMD3100-Behandlung nach erfolgter chemischer Tumorinduktion in einer PAS-Färbung. Hier zeigt sich eine vermehrte Glykogeneinlagerung. E: Hämangiom; die Pfeile zeigen auf Kavernen mit angrenzendem entzündlichen Infiltrat. F: die Pfeile zeigen auf große polymorphe Hepatozyten neben dem Hämangiom. Originalvergrößerung: 200fach (A-E), 400fach (F).

## 6. Diskussion

### 6.1 Tumorinduktion mit NNK und LPS

Mit der Zielstellung, ein klinisch relevantes Tumormodell zu reproduzieren, zu etablieren und zu charakterisieren, erfolgte im Rahmen dieser Dissertation eine chemische Induktion von Lungentumoren, die sich auf ein von Keohavong et al. (2011) beschriebenes Modell stützt. Die hierbei durchgeführte kombinierte Verabreichung des tabakspezifischen Karzinogens NNK und von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien mit einer dadurch generierten chronischen Bronchitis repräsentiert eine realitätsnahe Ätiologie und Pathogenese von Lungentumoren (Keohavong et al. 2011, Herold 2018). Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen transgenen Mauslinien in insgesamt vier Versuchsreihen durchgeführt. In Versuchsreihe 1 und 3 erfolgte die Tumorinduktion an *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen, in Versuchsreihe 2 an *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen und in Versuchsreihe 4 an *Cxcr7-eGFP*-BAC-Mäusen.

In jeder der insgesamt 41 mit NNK und LPS behandelten Mäuse aus allen Versuchsreihen konnten mikroskopisch zahlreiche Lungentumore nachgewiesen werden. Dabei konnte in der HE-Auswertung bereits eine Einteilung in große, peripher im Lungengewebe gelegene adenoide Tumore sowie in eher zentral lokalisierte kleinzellige Läsionen vorgenommen werden. Bei den nicht mit NNK und LPS behandelten Kontrolltieren fanden sich dagegen weder eine perivaskuläre oder peribronchiale Infiltration mit Entzündungszellen noch Neoplasien. Damit lässt sich eine spontane Lungentumorbildung in den drei transgenen Mauslinien ausschließen. Es wurde zusätzlich der alleinige Einfluss von LPS auf die Tumorinduktion untersucht. Dabei fielen perivaskuläre und peribronchiale Ansammlungen von kleinen Zellen auf, die aufgrund ihrer Morphologie am ehesten als Immunzellen zu identifizieren sind.

Die bei allen entweder nur mit LPS oder mit LPS und NNK behandelten Mäusen im Lungengewebe nachzuweisenden Immunzellen sind am ehesten als Folge einer LPS-vermittelten Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems anzusehen. Die Zellen konnten mithilfe der immunhistochemischen Färbungen als Makrophagen sowie auch als B- oder T-Lymphozyten identifiziert werden. Eine chronische Entzündung der Lunge gilt als ein Risikofaktor, auf dessen Grundlage die Entstehung von Lungentumoren begünstigt werden kann. Dies beruht auf den bei einer Entzündungsreaktion freiwerdenden reaktiven Sauerstoffverbindungen und der Aktivierung von proteolytischen Enzymen, die akut und chronisch Lungengewebe, DNA-Reparaturenzyme und auch die DNA selbst schädigen können



(Khair et al. 1996, Engels 2008, Keohavong et al. 2011). Aus epidemiologischen Studien geht hervor, dass eine chronische Entzündung in der Lunge insbesondere in Kombination mit Tabakkonsum die Entstehung von Bronchialkarzinomen fördern kann (Krysan et al. 2019). Hierbei führt das tabakspezifische Nitrosamin-Keton NNK über die Bildung von DNA-Addukten und eine Alkylierung von DNA-Basen zu Mutationen (Wang et al. 2019).

Die bereits makroskopisch sichtbaren und mikroskopisch zunächst als nichtkleinzellige Tumore identifizierten Neoplasien konnten anhand der immunhistochemischen Untersuchungen weiter charakterisiert werden. Die nichtkleinzelligen Tumore zeigten aufgrund ihres drüsenartigen Wachstums mit runden oder ovalen Zellkernen sowie ihrer peripheren Lage in der Lunge morphologische Eigenschaften von Adenomen oder Adenokarzinomen. Die Tumore wiesen ein regelmäßiges Wachstumsmuster auf und waren vom umliegenden tumorfreien Lungengewebe gut abzugrenzen. Diese Befunde sprechen für ein (noch) benignes Stadium dieser Neoplasien (Schmitz-Moormann et al. 1995). Der Prozess der Kanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess. Dieser beinhaltet neben der Initiation durch ein genotoxisches Karzinogen wie NNK Tumor-promovierende Effekte durch chronisch-entzündliche oder chronisch-toxische Reize, die dann zu dysregulierten Signalübertragungswegen, genetischen Aberrationen und veränderten Molekülen führen. Entscheidend für die Entartung ist dabei eine hohe Mutationslast. Insgesamt können beim Menschen zwischen den anfänglichen Veränderungen und der Entstehung eines malignen Volltumors Jahre bis Jahrzehnte liegen. (Ridge et al. 2013, Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Herold 2018, Krysan et al. 2019).

Auch in der immunhistochemischen Untersuchung der adenoiden Tumore zeigten sich nur wenige bereits entartete Tumorzellen, die den Proliferationsmarker Ki-67 und Adeno- und Plattenepithelkarzinom-Marker exprimierten. Die entarteten Zellen wiesen dabei am ehesten eine adenosquamöse Differenzierung auf. Der Zeitraum von 17 Wochen für eine Induktion von malignen Tumoren mit einer durchschnittlichen Tumorverdopplungszeit von 300 Tagen, wie sie bei Adenokarzinomen beim Menschen beobachtet wird, ist wahrscheinlich auch bei Mäusen zu kurz für die Entstehung eines malignen Volltumors. Für zukünftige Versuche erscheint daher eine Verlängerung der Tumorinduktionszeit sinnvoll. Andererseits ist es auch möglich, die Dosis von LPS und/oder NNK zu steigern, um eine schnellere Entartung der Tumore zu provozieren (Colby et al. 2004, Herold 2018).

In den HE-Übersichtsfärbungen der Lungenschnitte fielen in den nur mit LPS und in den mit LPS und NNK behandelten Tieren anliegend an zentralen Bronchien, Bronchiolen oder

Gefäßen zusätzlich Zellansammlungen mit kleinzelligem Charakter auf. Morphologisch zeigten die Zellen in diesen Läsionen aufgrund ihrer polymorphen Gestalt, dem Auftreten von einigen spindelförmigen Zellen, dem geringem Zytoplasmagehalt sowie der typischen zentralen Lage Eigenschaften von kleinzelligen Lungentumoren. Mithilfe der immunhistochemischen Untersuchungen an Paraffinschnitten und der Doppelfärbungen an Free-Floating-Schnitten konnte jedoch eine Einteilung in verschiedene Zellpopulationen getroffen werden. Einige der Zellansammlungen bzw. teilweise auch nur Anteile von diesen konnten durch den Nachweis einer Expression der drei getesteten neuroendokrinen Marker Chromogranin A, Synaptophysin und CD56 (NCAM), des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie des Chemokinrezeptors CXCR4 tatsächlich als kleinzellige Bronchialkarzinome eingeordnet werden. Andere Zellpopulationen wurden dagegen aufgrund der Expression von B- oder T-Zellmarkern als Lymphozytenansammlungen identifiziert (Colby et al. 2004, Chatterjee et al. 2014, Schnabel und Junker 2015).

Insgesamt erwies sich das von Keohavong et al. (2011) beschriebene Modell als zuverlässiges und reproduzierbares murines Lungentumor-Modell. Bei den als kleinzelligen Lungentumoren identifizierten Läsionen zeigten sich bereits Hinweise auf eine Malignität. Allerdings waren diese Neoplasien noch sehr klein. Die nichtkleinzelligen Tumore befanden sich größtenteils noch in einem gutartigen Stadium. Eine Verlängerung und/oder Intensivierung der chemischen Induktion erscheint aus diesem Grund für zukünftige Untersuchungen durchaus sinnvoll, um ein noch aussagekräftigeres Modell für die Testung von neuartigen Diagnostik- oder Therapieoptionen bei Bronchialkarzinomen zu erhalten.

## 6.2 Charakterisierung der Lungentumore

### 6.2.1 Immunhistochemische Untersuchung der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse

#### 6.2.1.1 Expression von CXCR4

Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 im normalen Lungengewebe sowie in den induzierten Bronchialtumoren wurde an Paraffinschnitten von Lungen von *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen (erste und dritte Versuchsreihe), von *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen (zweite Versuchsreihe) sowie von *Cxcr7-eGFP*-BAC-Mäusen (vierte Versuchsreihe) sowohl direkt mittels des Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 und in den *CXCR4-eGFP*-Mäusen indirekt durch den Nachweis von eGFP dargestellt. Der phosphosensitive UMB-2 richtet sich gegen den unphosphorylierten C-Terminus des CXCR4. Eine CXCL12/SDF-1-vermittelte Aktivierung und Phosphorylierung des C-terminalen Endes des CXCR4 verhindert die Bindung von UMB-

2. Durch eine Behandlung der Schnitte mit dem Enzym Lambda-Phosphatase (LPP) wird durch Dephosphorylierung des Rezeptors vergleichend zu den unbehandelten Schnitten, in denen nur der unphosphorylierte Rezeptor nachgewiesen werden kann, die Darstellung des CXCR4 sowohl im unphosphorylierten als auch im ehemals phosphorylierten Zustand ermöglicht.

Zur Evaluierung einer möglichen Koexpression des CXCR4 mit weiteren Tumormarkern wurden zusätzlich Doppelfärbungen an Free-Floating-Schnitten mit Antikörpern gegen das eGFP (als indirekter Nachweis einer CXCR4-Expression) und gegen den Adenokarzinom-Marker MUC1/EMA, den Plattenepithelkarzinom-Marker SCCA1/2 sowie den neuroendokrinen Marker CD56 (NCAM) durchgeführt. Hierbei wurden ausschließlich die *CXCR4*-eGFP-Mäuse der dritten Versuchsreihe untersucht.

Im tumorfreien Normalgewebe der Lungen konnten die solitären, größeren, rundlichen CXCR4-exprimierenden Zellen mit zytoplasmatischer und membranständiger Anfärbung im Bereich des Bronchialepithels sowie auch in den Alveolarsepten unter anderem als F4/80-exprimierende Makrophagen identifiziert werden (Austyn und Gordon 1981, Teicher und Fricker 2010, Chatterjee et al. 2014). Die restlichen CXCR4-positiven Zellen stellen am ehesten CXCR4-exprimierende Monozyten oder neutrophile Granulozyten dar. Das eGFP- und CXCR4-Färbungsmuster im tumorfreien Alveolarepithel präsentierte sich größtenteils kongruent. In den Paraffinschnitten sowie auch in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Free-Floating-Schnitte fand sich im Vergleich jedoch eine deutlich höhere eGFP-Expression. Dies ist dadurch zu erklären, dass das eGFP eine durchschnittliche Halbwertszeit von über 24 Stunden aufweist und so intrazellulär akkumuliert (Jung et al. 2000, Leveau und Lindow 2001), während die CXCR4-mRNA nur eine Halbwertszeit von ein bis zwei Stunden besitzt und der Rezeptor rasch abgebaut wird (Nagase et al. 2002, Petruzzello-Pellegrini et al. 2012). Außer in den Immunzellen innerhalb des Normalgewebes war der Chemokinrezeptor sowohl im tumorfreien Lungengewebe als auch in den induzierten Bronchialtumoren auf Endothelzellen von Gefäßen zu finden. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete CXCR4-Expression auf den Endothelzellen sowie auf einzelnen CD34-positiven Stammzellen bestätigt die aus der Literatur bekannte Koexpression des CXCR4 mit dem CD34 (Salcedo et al. 1999, Chatterjee et al. 2014). Die gesteigerte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 weist auf eine erhöhte Teilungsaktivität der infolge der LPS-induzierten chronischen Bronchitis eingewanderten Immunzellen hin. Dabei scheint eine hohe Kongruenz zwischen der CXCR4- und der Ki-67-Expression zu bestehen, was darauf schließen lässt, dass eine Präsenz des CXCR4 auf diesen Zellen mit einer erhöhten Teilungsaktivität einhergeht (Folescu et al. 2018, Wei et al. 2018).

Sowohl in der direkten als auch (über eGFP) indirekten Darstellung des CXCR4 ließen sich an den Rändern der adenoiden Tumore CXCR4-exprimierende Zellen nachweisen. Diese zeigten eine Koexpression des CXCR4 mit dem verwendeten Adenokarzinom-Marker MUC1/EMA, dem Plattenepithelkarzinom-Marker SCCA1/2 sowie dem neuroendokrinen Marker NCAM. Durch die zusätzlich durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Tumormarker in Doppelfärbungen ließen sich hierbei zwei verschiedene Zellgruppen abgrenzen. So fanden sich Tumorzellen, die neben einer Expression von eGFP auch SCCA1/2 und MUC1/EMA exprimierten. MUC1/EMA und SCCA1/2 zeigten allerdings keine Koexpression mit den verwendeten neuroendokrinen Markern. Auf der einen Seite zeigte sich somit eine Zellpopulation mit MUC1/EMA-, SCCA1/2- und CXCR4-Positivität, jedoch ohne Nachweis einer neuroendokrinen Differenzierung, womit diese Zellpopulation Eigenschaften eines adenosquamösen Karzinoms aufweist. Auf der anderen Seite fanden sich Zellen, die den CXCR4 zusammen mit einem neuroendokrinen Marker exprimierten und damit Eigenschaften eines neuroendokrinen Karzinoms zeigten (Colby et al. 2004). Eine Überexpression des CXCR4 in nichtkleinzelligen Lungentumoren wird mit einer schlechteren Prognose durch schnelles Tumorwachstum und durch eine frühe Metastasierung verbunden. Da in den adenoiden Tumoren nur sehr wenige Zellen den CXCR4 exprimierten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei am ehesten noch um eine gutartige Vorstufe von Adenokarzinomen handelt, bei der sich erst einzelne Zellen im Prozess der Entartung befinden (Chatterjee et al. 2014). Einige intratumoral gelegene CXCR4-exprimierende Zellen konnten anhand der immunhistochemischen Färbungen gegen das F4/80, CD3, CD20 oder CD34 als Immunzellen oder Gefäßendothelzellen identifiziert werden.

Die Läsionen mit kleinzelligem Charakter fanden sich typischerweise in unmittelbarer Nähe zu Abschnitten des Bronchialsystems. Der Anteil der CXCR4-exprimierenden Zellen betrug hier im Mittel zwischen 50 und 70%. Aufgrund der immunhistochemischen Darstellung des CXCR4, der Tumormarker sowie der Immunzellmarker konnten die kleinzelligen Strukturen in zwei verschiedene Entitäten differenziert werden. Ein Teil der CXCR4-positiven Zellen ließ sich als CD3- oder CD20-positive Lymphozyten identifizieren. Der andere Teil der Zellpopulationen exprimierte neben dem CXCR4 die neuroendokrinen Marker Chromogranin A, Synaptophysin und CD56, die charakteristisch für das kleinzellige Bronchialkarzinom sind. Ein erhöhter Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 deutet auf eine verstärkte Teilungsaktivität hin (Colby et al. 2004). Aus den fluoreszenzmikroskopischen Doppelfärbungen geht hervor, dass die für den CXCR4 und die neuroendokrinen Marker

positiven Zellen weder Adeno- noch Plattenepithelkarzinom-Marker exprimierten. Bei diesen Zellpopulationen handelt es sich damit am ehesten um kleinzellige Lungenkarzinome. Eine Überexpression des CXCR4 ist für kleinzellige Lungentumore typisch und geht mit einem verstärkten Tumorwachstum, einer erhöhten Invasivität, Angiogenese und Vaskularisierung sowie Metastasierung und damit einer schlechten Prognose einher (Balkwill 2004, Chatterjee et al. 2014, Zhao et al. 2015). Durch die Expression des CXCR4 sowie der nachgewiesenen erhöhten Teilungsaktivität ist bereits von einem fortgeschrittenen Tumorstadium auszugehen, auch wenn die Tumore insgesamt noch recht klein sind.

In der immunhistochemischen Darstellung des CXCR4 wurde die Wirkung des Chemokinrezeptor-Antagonisten AMD3100 deutlich. In den nicht mit AMD3100 behandelten Mäusen führte die Vorbehandlung der Schnitte mit LPP sowohl im tumorfreien Normalgewebe der Lunge als auch in den beiden Tumorentitäten zu einer gleichmäßigen Verstärkung des membranständigen und des zytoplasmatischen CXCR4-Immunsignals, was darauf hinweist, dass ein Teil der membranständigen und der internalisierten Rezeptoren im phosphorylierten Zustand vorgelegen haben musste. In den mit AMD3100 behandelten Mäusen zeigte sich hingegen eine ausschließlich membranständige Lokalisation des CXCR4. Die Vorbehandlung der Schnitte mit LPP veränderte das CXCR4-Immunsignal hier nicht. Dies weist darauf hin, dass durch die Behandlung mit AMD3100 die CXCL12/SDF1-bedingte Aktivierung, C-terminale Phosphorylierung und anschließende Internalisierung des Rezeptors komplett verhindert werden konnte (Hatse et al. 2002, Neel et al. 2005). Damit konnte gezeigt werden, dass die gewählte Dosis und Freisetzungsrate an AMD3100 aus den Minipumpen für eine vollständige Antagonisierung des CXCR4 ausreicht und dass das AMD3100 über mindestens 2 Wochen in Lösung stabil bleibt.

#### 6.2.1.2 Expression von CXCR7

Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR7 wurde im Rahmen dieser Arbeit an den Paraffinschnitten der Lungen der *Cxcr7-eGFP*-BAC-Mäuse der vierten Versuchsreihe untersucht. Die *Cxcr7-eGFP*-BAC-Mäuse exprimieren ein eGFP-Reportergen unter der Kontrolle des murinen *Cxcr7*-Promotors, sodass eine indirekte Darstellung des CXCR7 über die eGFP-Expression gelingt. Der CXCR7 gehört zu den atypischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und nimmt die Rolle eines „Scavengers“ ein, indem er CXCL12 bindet und dem Abbau zuführt (Naumann et al. 2010, Memi et al. 2013). Studien weisen darauf hin, dass das Ausmaß der CXCR7-Expression die des CXCR4 reguliert und folglich das CXCR4/CXCL12-

Signaling (indirekt) kontrolliert. Das heißt, eine verminderte CXCR7-Expression führt zu einem Anstieg des extrazellulären CXCL12-Spiegels, was wiederum zu einer vermehrten CXCL12-Bindung an den CXCR4 und letztendlich zu dessen Internalisierung und Abbau führt (Levoye et al. 2009, Hattermann und Mentlein 2013).

Im tumorfreien Normalgewebe der Lungen fanden sich gleichmäßig über das Gewebe verteilte CXCR7-positive Zellen, welche aufgrund der bekannten physiologischen Expression des CXCR7 in Immunzellen am ehesten als neutrophile Granulozyten, Monozyten oder auch B-Lymphozyten identifiziert werden konnten (Maksym et al. 2009). CXCR7-exprimierende Immunzellen konnten ebenfalls in den nichtkleinzelligen Tumoren nachgewiesen werden. Von den eigentlichen Zellen der noch als gutartig eingeschätzten nichtkleinzelligen Tumore wurde der Rezeptor jedoch (noch) nicht exprimiert. Ebenso wie beim CXCR4 wird auch beim CXCR7 vermutet, dass er Tumorzellen einen Wachstums- und Überlebensvorteil verschafft (Vandercappellen et al. 2008, Maksym et al. 2009, Wang et al. 2018). Die Läsionen mit kleinzelligem Charakter zeigten ein variables CXCR7-Expressionsmuster. Während in einigen dieser Strukturen eine deutliche CXCR7-Expression nachgewiesen werden konnte, waren andere Läsionen komplett negativ. Vor dem Hintergrund einer ähnlichen Morphologie der CXCR7-exprimierenden Zellen wie die ebenfalls CXCR7-positiven Lymphozyten in dem angeschnittenen Lymphknoten, sind die CXCR7-exprimierende Zellpopulationen am ehesten als lymphatische Zellansammlungen einzuordnen. In den eigentlichen kleinzelligen Tumorzellen konnte eine CXCR7-Expression dagegen nicht nachgewiesen werden, was möglicherweise auch hier auf ein noch frühes Stadium der Tumore zurückzuführen ist.

#### 6.2.1.3 Expression von CXCL12

Das Chemokin CXCL12/SDF-1 ist der einzige natürliche endogene Ligand für den CXCR4. Es ist zudem in der Lage, mit einer deutlich höheren Affinität an den CXCR7 zu binden. Das homöostatische Chemokin bewirkt eine gerichtete Migration CXCR4-exprimierender Zellen. Physiologisch wird das CXCL12 in verschiedenen Organen wie Leber, Lunge, Niere, Skelettmuskel, Herz, Haut, Knochenmark oder Gehirn konstitutiv exprimiert. Im Lungengewebe findet sich eine CXCL12-Expression vor allem in Pneumozyten und Bronchialepithelzellen (Sun et al. 2010, Teicher und Fricker 2010, Chatterjee et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Präsenz des CXCL12 in den Lungengeweben der Mäuse aller Versuchsreihen untersucht. In den tumorfreien Lungenarealen ließ sich die zu erwartende physiologische Expression des Chemokins in Bronchialepithelzellen sowie in Pneumozyten anhand einer mittelstarken zytoplasmatischen Färbung nachweisen. In den nichtkleinzelligen

adenoiden Tumoren zeigte sich ein inverses Expressionsmuster zwischen dem CXCR4 und dem CXCL12. In Arealen mit hohem CXCR4-Nachweis konnte nur wenig CXCL12 detektiert werden und umgekehrt. Die Expression präsentierte sich hier unabhängig von der TumorgroÙe und der AMD3100-Behandlung der Mäuse. In den kleinzelligen Tumoren zeigte sich vor allem in peripheren Tumorbereichen eine erhöhte CXCL12-Konzentration.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper gegen CXCL12/SDF-1 bindet zwischen dem N-terminalen Lysin 22 und dem Lysin 89 am C-terminalen Ende des Chemokins. In den CXCR4-positiven Arealen ist der N-terminale Bereich des CXCL12 inklusive des Lysins 22 an einer Wechselwirkung mit dem CXCR4 beteiligt (Xu et al. 2013). Diese Wechselwirkung in CXCR4-positiven Tumorarealen bewirkt wahrscheinlich eine verminderte Bindungsfähigkeit des Antikörpers, woraus eine fehlende CXCL12-Darstellung resultieren könnte.

## 6.2.2 Immunhistochemische Untersuchung der Tumormarker

### 6.2.2.1 Expression der neuroendokrinen Marker

Zur weiteren Charakterisierung des Lungentumor-Modells sollten die induzierten Lungentumore auf das Vorliegen von neuroendokrinen Zellen untersucht werden. Zu den Lungentumoren mit neuroendokrinen Eigenschaften gehören das kleinzellige Bronchialkarzinom, das dadurch sehr häufig mit paraneoplastischen Syndromen assoziiert ist, das großzellige neuroendokrine Lungenkarzinom sowie die typischen und atypischen Karzinoide. Immunhistochemisch wurden die wichtigsten Biomarker Chromogranin A, Synaptophysin und CD56 (NCAM) zur Identifizierung neuroendokriner Zellen und Tumore verwendet. Für eine immunhistochemische Diagnose eines neuroendokrinen Tumors sollte mindestens einer der neuroendokrinen Marker positiv sein. Weniger als 10% aller kleinzelligen Bronchialkarzinome sind negativ für alle drei neuroendokrinen Marker. Hierbei stellt das CD56 den sensitivsten Marker für kleinzellige Lungentumore dar (Colby et al. 2004, Sayeg et al. 2014, Schnabel und Junker 2015). Beim Menschen finden sich auch im gesunden Lungengewebe Zellen mit einem neuroendokrinen Phänotyp. Diese werden als Pulmonale Neuroendokrine Zellen (PNEC) bezeichnet und finden sich verstreut in den oberen und unteren Atemwegen (Sayeg et al. 2014).

Das Polypeptid Chromogranin A gehört zur Granin-Familie, wird im Endoplasmatischen Retikulum produziert und als Prohormon in den Sekretgranula von neuroendokrinen (Tumor-) Zellen gespeichert (Modlin et al. 2010, Bartolomucci et al. 2011). Das Glykoprotein Synaptophysin befindet sich in Vesikeln von Synapsen gespeichert und ist ebenfalls in neuroendokrinen Zellen nachweisbar (Calhoun et al. 1996). Das neuronale

Zelladhäsionsmolekül CD56 (NCAM) ist ein Glykoprotein, welches in der prä- und postsynaptischen Membran von Neuronen sowie in neuroendokrinen Zellen exprimiert wird (Yang et al. 2014).

Die Expression von Chromogranin A wurde ausschließlich an Paraffinschnitten untersucht. Die vereinzelt im tumorfreien Normalgewebe vorkommenden für Chromogranin-A-positiven Zellen stellen am ehesten pulmonale neuroendokrine Zellen dar. Während der mittelstark angefärbte Anteil des Bronchialepithels als unspezifische Hintergrundfärbung zu werten ist, lassen sich die stark und spezifisch gefärbten Zellen im Bronchialepithel ebenfalls als neuroendokrine pulmonale Zellen einordnen. In den Tumoren mit nichtkleinzelliger Differenzierung fanden sich bevorzugt peripher liegende Zellen mit starker zytoplasmatischer Positivität. Diese positiven Zellen waren größtenteils auch für die beiden weiteren neuroendokrinen Marker positiv. Hierbei könnte es sich um einen Anteil des Tumors handeln, der bereits maligne entartet ist und neuroendokrine Eigenschaften aufweist. Im Gegensatz dazu zeigten die kleinzelligen Strukturen eine sehr hohe Konzentration an Chromogranin-A-exprimierenden Zellen, was den neuroendokrinen Charakter dieser Tumore und damit die Zuordnung dieser Läsionen zu den kleinzelligen Bronchialkarzinomen bestätigt.

Die Untersuchung des neuroendokrinen Markers Synaptophysin erfolgte immunhistochemisch an Paraffinschnitten sowie fluoreszenzmikroskopisch im Rahmen einer Doppelfärbung mit MUC1/EMA als Adenokarzinommarker sowie mit SCCA1/2 als Plattenepithelkarzinommarker. Insgesamt zeigte das Synaptophysin das gleiche Expressionsmuster wie der neuroendokrine Marker Chromogranin A, sodass die Präsenz von neuroendokrinen Zellen sowohl im normalen Lungengewebe als auch in Anteilen der nichtkleinzelligen Tumore und in den kleinzelligen Neoplasien als gesichert angesehen werden kann. Der Nachweis neuroendokriner Eigenschaften der peripheren Zellen von adenoiden Tumoren, wie in der Chromogranin A- und Synaptophysin-Färbung an Paraffinschnitten dargestellt, bestätigte sich auch in der fluoreszenzmikroskopischen Doppelfärbung. Es zeigte sich jedoch keine Koexpression von Synaptophysin und MUC1/EMA. Analog zu den Färbungen an Paraffinschnitten wiesen die Tumore mit kleinzelliger Differenzierung in hohen Anteilen eine Synaptophysin-Expression auf. Die Tumorzellen zeigten auch hier keine Koexpression des neuroendokrinen Markers mit MUC1/EMA.

Das Lungengewebe der Mäuse aller Versuchsreihen wurde weiterhin lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein des neuroendokrinen Markers CD56 (NCAM) untersucht. Zusätzlich wurde



auch die Koexpression mit eGFP (und damit indirekt mit CXCR4) in den transgenen *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen analysiert. Auch in diesen Färbungen zeigte sich ein sehr ähnliches Bild wie bei den beiden anderen neuroendokrinen Markern. In der Färbung an Paraffinschnitten konnten im Normalgewebe jedoch nur sehr wenige bis keine NCAM-positiven Zellen gefunden werden. Anhand der Doppelfärbung ließen sich im Fluoreszenzmikroskop aber auch die pulmonalen neuroendokrinen Zellen im Normalgewebe ausmachen. In der Doppelfärbung mit eGFP wurde wiederum deutlich, dass ein Großteil der kleinzelligen CXCR4-positiven Zellen ebenfalls NCAM exprimiert und somit neuroendokrine Eigenschaften aufweist.

Insgesamt ist es gelungen, anhand von drei neuroendokrinen Markern in den peripheren Abschnitten der adenoiden Tumore Tumorareale mit neuroendokriner Differenzierung nachzuweisen. Auch ließ sich der Großteil der Strukturen mit kleinzelligem Charakter als neuroendokrin einstufen. Die Tumorzellen zeigten dabei keine Koexpression der neuroendokrinen Marker mit Adeno- oder Plattenepithelkarzinommarkern. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls bewiesen werden, dass die kleinzelligen Tumore neben den neuroendokrinen Markern auch den CXCR4 exprimieren. Diese Koexpression von neuroendokrinen Markern und dem CXCR4 in kleinzelligen Bronchialkarzinomen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Chatterjee et al. 2014).

#### 6.2.2.2 Expression der Plattenepithelkarzinom-Marker

Die Immunhistochemie wird zunehmend zur Unterscheidung von Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Lunge verwendet. Die Differenzierung der beiden nichtkleinzelligen Lungentumorentitäten ist vorbereitend auf die Therapie des Patienten essenziell. In der vorliegenden Arbeit wurden die Lungentumore zur weiteren Charakterisierung auf die Expression der Plattenepithelkarzinom-Marker 34 $\beta$ E12 und SCCA1/2 untersucht. Karzinome sind durch die Expression spezifischer Keratinproteine charakterisiert und lassen damit häufig bei selbst stark entdifferenzierten Tumorzellen Rückschlüsse auf den Gewebeansprung zu.

Der Antikörper 34 $\beta$ E12 richtet sich gegen die Zytokeratine 1, 5, 10 und 14, die häufig in Plattenepithelkarzinomen exprimiert werden. Ein erhöhter Nachweis des Markers ist dabei mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Pohl et al. 2016). Die Zytokeratine 5 und 14 werden in den Basalschichten von geschichteten Plattenepithelien und Basalzellen verschiedener Drüsen einschließlich des Bronchialepithels physiologisch exprimiert. (Colby et al. 2004, Pohl et al. 2016). Die Expression der für das Plattenepithelkarzinom typischen

Zytokeratine, wie zum Beispiel Zytokeratin 5, ist beim kleinzelligen Lungenkarzinom selten (Zhang et al. 2015).

Das SCCA1/2 gilt als tumorspezifisches Antigen und wird als Tumormarker für verschiedene Arten von Plattenepithelkarzinomen verwendet. Eine SCCA1/2-Überexpression in Lungentumoren wird mit einer erhöhten Tumorgroße durch eine Hemmung von Apoptoseprozessen, mit einem verstärkten Zellwachstum sowie mit einer Hemmung der Immunabwehr gegen Tumore in Verbindung gebracht (Izuhara et al. 2018).

Der 34 $\beta$ E12-Nachweis erfolgte an den Paraffinschnitten der Lungen aller Mäuse aller Versuchsserien. Im tumorfreien Normalgewebe zeigte sich eine Expression der Zytokeratine 1, 5, 10 oder 14 im Bronchialepithel sowie im Endothel der Gefäße. Der Nachweis gelang ebenfalls in einzelnen, größeren und annähernd runden Zellen. Aufgrund des unregelmäßigen Verteilungsmuster im Tumor sowie im tumorfreien Normalgewebe ist hierbei am ehesten von Immunzellen auszugehen. Weiterhin fanden sich in den mehrheitlich negativen nichtkleinzelligen Tumoren peripher positive Zellgruppen mit einer intensiven membranständigen Färbung. Im Gegensatz zu den Befunden von Zhang et al. (2015) ließen sich die Zytokeratine 1, 5, 10 oder 14 auch teilweise in den kleinzelligen Läsionen nachweisen.

In den Färbungen an Paraffinschnitten war das Expressionsmuster des zweiten Plattenepithelkarzinom-Markers SCCA1/2 identisch mit dem von 34 $\beta$ E12, was für die Spezifität der beiden Marker spricht. Der Marker SCCA1/2 wurde zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch im Rahmen von Doppelfärbungen mit eGFP (und somit CXCR4), mit dem Adenokarzinom-Marker MUC1/EMA sowie mit dem Marker für eine neuroendokrine Differenzierung Synaptophysin untersucht. In der Doppelfärbung mit dem Adenokarzinom-Marker wurde deutlich, dass die SCCA1/2-positiven Zellen zusätzlich MUC1/EMA exprimieren. Dies spricht für die Tumorentität eines adenosquamösen Karzinoms und somit einer Mischentität zwischen Plattenepithel- und Adenokarzinom. Dies geht typischerweise mit einer Koexpression mehrerer Tumormarker für Plattenepithelkarzinome und auch für Adenokarzinome wie AE1/AE3 (Panzytokeratin) oder auch MUC1/EMA einher. Das regelmäßige histologische Bild des adenoiden Tumors, mit gleichförmigen neoplastischen Zellen in Strängen, gut abgegrenzt vom umliegenden Lungengewebe entspricht allerdings nicht dem zu erwartenden Bild eines adenosquamösen Tumors. An dieser Stelle wären ein eindeutiger Nachweis von Keratin oder von intrazellulären Brücken, vermischt mit den für Adenokarzinome typischen Acini, Tubuli oder papillären Strukturen zu erwarten gewesen. Als

eine Konsequenz dessen ist davon auszugehen, dass in den erzeugten Tumoren nur einige wenige Zellen bereits entartet waren. Die beide Marker koexprimierenden Zellen zeigten auch eine erhöhte Proliferationsrate, wie durch den vermehrten Nachweis von Ki-67 deutlich wurde (Colby et al. 2004). Eine Koexpression von SCCA1/2 mit dem neuroendokrinen Marker CD56 lag in den adenoiden Tumoren nicht vor. In der Doppelfärbung mit eGFP (als indirekter Nachweis für eine CXCR4-Expression) wurde deutlich, dass ein Großteil der eGFP-positiven nichtkleinzelligen Tumorzellen auch SCCA1/2 exprimiert. Beide Marker, CXCR4 und SCCA1/2, werden mit malignen Charakteristika von Tumorzellen in Verbindung gebracht (Chatterjee et al. 2014).

Wie auch bei der 34 $\beta$ E12-Färbung wiesen einige Tumore mit kleinzelligem Charakter eine SCCA1/2-Expression auf. Es zeigte sich weder eine Koexpression mit Synaptophysin noch mit eGFP, jedoch analog zu den nichtkleinzelligen Tumoren mit MUC1/EMA.

#### 6.2.2.3 Expression der Adenokarzinom-Marker

Für die weitere Charakterisierung der Tumore wurden die zwei Adenokarzinom-Tumormarker Panzytokeratin und MUC1/EMA verwendet. Obwohl die immunhistochemischen Merkmale von Adenokarzinomen vom Subtyp abhängen und auch mit dem Differenzierungsgrad variieren können, ist die Expression von Panzytokeratin und MUC1/EMA für diese Tumorentität typisch (Colby et al. 2004, Ota et al. 2019). Neben dem Plattenepithelkarzinom stellt auch das großzellig-neuroendokrine Lungenkarzinom (LCNEC, englisch: *Large Cell Neuroendocrine Carcinoma*) eine Differentialdiagnose für Adenokarzinome dar. Bei diesen Tumoren lassen sich neben neuroendokrinen Markern auch Zytokeratine wie Panzytokeratin (AE1/AE3) nachweisen, wobei sich hier eine charakteristische punkt-oder kappenförmige paranukleäre Positivität zeigt (Sayeg et al. 2014).

Zelloberflächenmuzine sind transmembranäre Glykoproteine. Sie werden von allen Epithelzellen physiologisch produziert, wobei die Zusammensetzung je nach Zell- und Gewebetyp variieren kann. Das Muzin MUC1/EMA wird auch unter Normalbedingungen in der Lunge exprimiert und dient als Schutz gegen Pathogene sowie zur Regulierung der zellulären Signalübertragung und Transkription. Eine MUC1-Überexpression tritt häufig bei Adenokarzinomen der Lunge auf und nimmt in fortgeschrittenen Tumorstadien zu. Bei einer physiologischen Expression in der Lunge ist das Muzin ausschließlich membranständig zu erwarten. Im Gegensatz dazu findet sich bei Tumorzellen eine deutlich stärkere Expression sowie ein membranständiges und zytoplasmatisches Vorkommen (Hatstrup und Gendler 2008).

Bei der Untersuchung des Adenokarzinom-Markers Panzytokeratin (AE1/AE3/5D3) zeigte sich die erwartete Expression der Zytokeratine in den Bronchialepithelzellen sowie in gleichmäßig über das Lungengewebe verteilten Immunzellen. Kongruent zu den neuroendokrinen und zu den Plattenepithelkarzinom-Markern konnten in den adenoiden Tumoren peripher gelegene Panzytokeratin-positive Zellen beobachtet werden. Es handelt sich dabei, wie bereits oben erwähnt, höchstwahrscheinlich um bereits entartete Zellen, die einen adenosquamösen Charakter aufweisen. Bei den kleinzelligen Läsionen konnten zwei unterschiedliche Populationen differenziert werden. So zeigten sich Zellansammlungen, die in einem sehr dichten Verband beieinander lagen, negativ für den Marker, während sich in den sich teilweise unmittelbar angrenzenden Populationen mit locker aneinander liegenden Zellen viele Positivitäten fanden. Die Anwesenheit von Zytokeratin-Markern in kleinzelligen Lungentumoren ist allerdings sehr ungewöhnlich (Colby et al. 2004).

Die Expression des Oberflächenproteins MUC1/EMA wurde an Paraffinschnitten und fluoreszenzmikroskopisch in Doppelfärbungen mit eGFP, dem Plattenepithelkarzinom-Tumormarker SCCA1/2 bzw. mit dem neuroendokrinen Marker Synaptophysin untersucht. Hierbei konnten bei den adenoiden Neoplasien, wie bereits oben beschrieben, zwei verschiedene Tumorzellpopulationen ausgemacht werden: Tumorzellen mit adenosquamösem Charakter, die eine Koexpression von MUC1/EMA und SCCA1/2, nicht jedoch mit Synaptophysin, aufwiesen, und solche mit neuroendokriner Differenzierung, die nur eine Expression von Synaptophysin zeigten. Zudem fand sich eine Koexpressionen von MUC1/EMA und eGFP (und somit CXCR4).

Bei den Läsionen mit kleinzelligem Charakter konnte in Übereinstimmung mit dem Nachweis von Panzytokeratin auch eine Expression von MUC1/EMA dargestellt werden. Während sich in der Doppelfärbung mit eGFP nur wenige kleinzellige Tumorzellen mit einer Koexpression von MUC1/EMA finden ließen, gab es keine Tumorzellen, die den neuroendokrinen Marker Synaptophysin und den Adenokarzinom-Marker MUC1/EMA gemeinsam trugen. Bei den MUC1/EMA-exprimierenden Zellen handelt es sich aufgrund der fehlenden Koexpression mit Synaptophysin nicht um die neuroendokrinen oder CXCR4-exprimierenden Zellen. Daher sind diese Zellen am ehesten als Immunzellen einzuordnen.

#### 6.2.2.4 Ki-67-Expression

In der Histopathologie dient das Ki-67 als Proliferationsmarker zur Detektion sich teilender Zellen. Das Kernantigen Ki-67 wird in allen aktiven Zellzyklusstadien (G1-, S-, G2-, M-Phase) exprimiert, nicht jedoch in der ruhenden Zelle, die sich im G0-Stadium befindet (Folescu et al.

2018). Aus einer Metaanalyse geht hervor, dass eine Überexpression von Ki-67 bei Lungenkrebspatienten mit einer schlechteren Differenzierung der Tumore, größerer Tumorgöße, einer Lymphknotenmetastasierung und daher mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium und einer schlechteren Prognose einhergeht (Wei et al. 2018).

Die Ki-67-Expression wurde immunhistochemisch an Paraffinschnitten der Lungen aller Tiere aller Versuchsreihen untersucht. Obwohl Bronchial- und Alveolarepithelzellen physiologisch in der Lage sind, sich zu teilen, konnte in diesen Zellen kein Nachweis einer erhöhten Ki-67-Expression erbracht werden. Im tumorfreien Normalgewebe der Lunge zeigte sich jedoch das Gefäßendothel intensiv positiv, sodass hier, wie erwartet, eine erhöhte Teilungsrate verzeichnet werden konnte. Die wenigen zusätzlichen Positivitäten im Normalgewebe sind am ehesten auf Immunzellen zurückzuführen, die infolge der LPS-induzierten Entzündungsreaktion eingewandert waren. Die nichtkleinzelligen Tumore zeigten randständig in Zellverbänden liegende positive Zellen. Die Ki-67-Expression dieser Zellgruppen zeigte eine hohe Kongruenz mit den Färbungen für Zytokeratin, Panzytokeratin, SCCA1/2 und MUC1/EMA. Die nichtkleinzelligen Tumore wiesen jedoch insgesamt bis auf diese wenigen positiven Zellen nur eine sehr geringe Teilungsaktivität auf. Auch dieser Befund legt nahe, dass sich diese Tumore größtenteils noch in einem benignen Stadium befinden. Obwohl die Tumore mit kleinzelliger Differenzierung ein variables Ki-67-Expressionsmuster aufwiesen, präsentierte sich der Großteil mit einer hohen Ki-67-Expression, was auf eine erhebliche Teilungsaktivität hinweist.

#### 6.2.2.5 Expression des Somatostatin-Rezeptors SSTR2

Der Somatostatin-Rezeptor SSTR2 ist einer von fünf Somatostatin-Rezeptoren und gehört zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der Rezeptor wird physiologisch in neuronalen Zellen, in neuroendokrinen Zellen des Magen-Darm-Traktes und der Lunge sowie in den Inselzellen des Pankreas exprimiert und konnte insbesondere in gastroenteropankreatischen und bronchopulmonalen neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen werden (Reubi et al. 2001, Kaemmerer et al. 2015a, Lehman et al. 2019).

Die Darstellung des Somatostatin-Rezeptors 2 erfolgte an den Paraffinschnitten der Lunge von allen Mäusen aller Versuchsreihen. Im tumorfreien Normalgewebe gelang der immunhistochemische Nachweis in vereinzelt Zellen des Bronchialepithels. Das Alveolargewebe präsentierte sich komplett negativ für den Rezeptor. In den nichtkleinzelligen sowie auch in den kleinzelligen Tumoren fanden sich nur wenige SSTR2-exprimierende Tumorzellen.

Beim Menschen konnte unter anderem von Kaemmerer et al. (2015), Lapa et al. (2016) und Lehmann et al. (2019) eine SSTR2-Expression in etwa der Hälfte der kleinzelligen Lungentumore nachgewiesen werden. Eine solche SSTR2-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit in den bei Mäusen induzierten kleinzelligen Tumoren nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz kann auf ein möglicherweise zu frühes Tumorstadium zurückgeführt werden, könnte aber auch im eingesetzten Tumormodell oder der verwendeten Spezies begründet sein.

#### 6.2.2.6 Expression von CD133

Aufgrund der Koexpression von verschiedenen Tumormarkern für Adeno- und Plattenepithelkarzinome sowie für neuroendokrine Tumore in einigen kleinzelligen und nichtkleinzelligen Tumorzellen, stellte sich die Frage, ob es sich bei diesen Zellen um Tumorstammzellen (CSC, englisch: *Cancer Stem Cells*) handeln könnte. Krebsstammzellen sind in der Lage, sich wie andere Tumorzellen zu teilen. Dabei entstehen neue Tumorstammzellen sowie auch differenzierte Krebszellen. CSCs metastasieren und sind häufig resistent gegen Chemotherapeutika, woraus sich Probleme bei der Therapie der Tumore ergeben können. Der Ursprung der Krebsstammzellen liegt meist bei den regionalen Stammzellen des jeweiligen Gewebes. Krebsstammzellen können ebenfalls den Chemokinrezeptor CXCR4 exprimieren (Irollo und Pirozzi 2013, Kim et al. 2017). Der am häufigsten zum Nachweis von CSC verwendete Marker ist CD133. Das Glykoprotein CD133, ursprünglich als Marker für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen von CD34-positiven Zellen verwendet, gilt als Marker für CSC-Populationen in verschiedenen menschlichen Tumoren, darunter auch von Bronchialkarzinomen (Kim et al. 2017).

Die Regenerationsfähigkeit des Gefäßendothels sowie des Bronchialepithels wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis von CD133-positiven Zellen bestätigt. Die im angeschnittenen Lymphknoten vorzufindenden sowie die homogen im Lungengewebe verteilten Zellen repräsentieren am ehesten Vorläuferstadien sowie auch weiter entwickelte Stadien von Immunzellen. Da sich der Tumorstammzell-Marker weder in den großzelligen noch in den kleinzelligen Tumoren finden ließ, handelt es sich trotz der Heterogenität der Tumorzellen bei den die Tumormarker exprimierenden Zellen wahrscheinlich nicht um Tumorstammzellen.

### 6.2.3 Expression von CD34

CD34, ein 115-kD schweres transmembranäres Glykoprotein, wird unter anderem von pluripotenten Stammzellen, differenzierten Vorläuferzellen, Leukämiezellen sowie von embryonalen Fibroblasten und Fibroblasten des Knochenmarks exprimiert. Da CD34 in hohen Konzentrationen auf Endothelzellen zu finden ist, dient das Glykoprotein in der Histopathologie als diagnostischer Marker für Gefäße. In Lungengewebe zeigen kapilläre Endothelzellen die höchste Expression von CD34, gefolgt von Arterien, Venen und Arteriolen (Müller et al. 2002). In der Arbeitsgruppe um Salcedo et al. (1999) konnte in Zellkulturen eine Beteiligung von CXCL12 und CXCR4 an dem Prozess der Angiogenese bewiesen werden. Eine nachgewiesene CXCR4-Expression auf Endothelzellen lässt eine Koexpression von CXCR4 und CD34 vermuten.

Die Expression von CD34 wurde in der vorliegenden Arbeit nur an Paraffinschnitten untersucht. In allen Versuchsreihen fanden sich CD34-Positivitäten in angeschnittenen Kapillaren im tumorfreien Normalgewebe der Lungen, vor allem in der Nähe von Bronchien, Bronchiolen und Alveolarsepten sowie in enger Beziehung zu Tumoren. Auch in den nichtkleinzelligen Tumoren zeigten sich positive Gefäßanschnitte. In Tumoren mit kleinzelligem Charakter, in Alveolarsepten, in der Nähe zu Bronchien sowie zu nichtkleinzelligen Tumoren präsentierten sich einzelne oder in Zellgruppen zusammenliegende CD34-positive Zellen in erhöhter Konzentration. Da auch ein angeschnittener Lymphknoten Positivitäten enthielt, handelt es sich bei den beschriebenen Zellen am ehesten um Vorläuferzellen von Immunzellen (Müller et al. 2002). Im Gegensatz zu den nichtkleinzelligen Tumoren fanden sich in den Tumoren mit kleinzelligem Charakter, wohl aufgrund der geringen Größe dieser Neoplasien, (noch) keine intratumoralen Gefäßanschnitte.

Die CD34-Positivitäten in den Gefäßanschnitten und einzelnen Zellen im Normalgewebe sowie in den kleinzelligen Tumoren zeigten eine hohe Kongruenz mit der CXCR4-Färbung, sodass eine Koexpression der beiden Marker nahe liegt.

### 6.2.4 Expression der Immunzellmarker

B- und T-Lymphozyten sind die wichtigsten Träger der adaptiven Immunantwort und stellen sich in der Histologie als kleine, runde Zellen mit schmalem Zytoplasmasaum dar. Mittels Immunhistochemie kann dabei zwischen CD3-positiven T-Lymphozyten und CD20-positiven B-Lymphozyten unterschieden werden (Löffler 2008). Makrophagen gehören zum angeborenen Immunsystem und können immunhistochemisch in Mäusen mittels des monoklonalen Antikörpers F4/80 identifiziert werden (Austyn und Gordon 1981).

Im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Tumorinduktion fanden sich deutlich mehr Immunzellen im tumorfreien Lungengewebe der nur mit LPS und der mit LPS und NNK behandelten Tiere.

Die vereinzelt im Inneren der adenoiden Tumore aufzufindenden CXCR4-exprimierenden Zellen ließen sich als F4/80-positive Makrophagen, CD3-positive T-Lymphozyten oder CD20-positive B-Lymphozyten identifizieren.

Die in der Regel in der Nähe der Bronchien gelegenen kleinzelligen Läsionen konnten aufgrund der immunhistologischen Färbungen, wie bereits oben beschrieben, in zwei verschiedene Entitäten aufgeteilt werden. Ein Teil der Läsionen entsprach, wie auch bei den nur mit LPS behandelten Tieren, Lymphozytenansammlungen, welche neben einer sehr starken CXCR4-Expression CD3- bzw. CD20-Positivitäten zeigten. Daneben fanden sich aber auch Läsionen (teilweise im lymphatischen Gewebe gelegen oder an dieses angrenzend, teilweise aber auch solitär), die ebenfalls für den CXCR4, aber auch für die Marker für Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome oder neuroendokrine Tumore positiv waren. In diesen kleinzelligen Tumoren zeigte sich auch eine Infiltration durch F4/80-positive Makrophagen sowie durch CD3- bzw. CD20-positive T- oder B-Lymphozyten.

### 6.3 Behandlung mit AMD3100

Eine Überexpression von CXCR4 und CXCR7 auf Krebszellen wird mit einer verstärkten Proliferation, Invasivität, Metastasierung, Neovaskularisierung und Chemotherapieresistenz der Tumore in Verbindung gebracht. Eine Blockierung insbesondere der CXCR4-vermittelten Signalwege gilt daher als vielversprechender Therapieansatz bei Tumoren mit einer Überexpression der Chemokinrezeptoren. Im vorliegenden Tumormodell konnte eine erhöhte CXCR4-Expression vor allem in den kleinzelligen Tumoren nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten CXCR4-positive Immunzellen gezeigt werden. AMD3100 ist in der Lage, an CXCR4 zu binden und die CXCL12-vermittelten Wirkungen zu antagonisieren (De Clercq 2009, Fricker et al. 2006). Zusätzlich wird dem AMD3100 eine allosterische agonistische Wirkung an dem Chemokinrezeptor CXCR7 zugeschrieben (De Clercq 2009, Kalatskaya et al. 2009, Wang et al. 2018).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei subkutaner Verabreichung von AMD3100 in der gewählten Dosierung und Abgaberate, wie in Abschnitt 6.2.1 bereits dargestellt, eine vollständige Antagonisierung des Chemokinrezeptors CXCR4 erreicht werden. Dennoch hatte die Behandlung mit AMD3100 weder einen Einfluss auf die Anzahl noch auf die Ausdehnung der kleinzelligen Läsionen, obwohl in diesen eine deutliche Überexpression des CXCR4



nachgewiesen werden konnte. Dies könnte einerseits an der noch geringen Größe dieser Tumore liegen, die das Erfassen von geringen Größenunterschieden erschwert, und andererseits aber auch an einem zu kurzen Behandlungszeitraum. In nachfolgenden Untersuchungen sollten daher ein späterer Untersuchungszeitpunkt, bei dem sich die Tumore in einem bereits stärker fortgeschrittenen Stadium befinden, und eine längere Behandlungsdauer gewählt werden. Wohl aus den gleichen Gründen hatte das AMD3100 keinen Einfluss auf die Anzahl der CD34-positiven Gefäße in den Tumoren, obwohl auch in den Gefäßen eine CXCR4-Expression nachgewiesen werden konnte.

Ebenso konnte kein Unterschied in der LPS-induzierten Infiltration von Immunzellen in Abhängigkeit von einer CXCR4-Blockade beobachtet werden, obwohl die detektierten Immunzellen den CXCR4 exprimieren.

Neben dem Aspekt der Behandlungsdauer wäre möglicherweise statt einer alleinigen Behandlung mit AMD3100 eine kombinierte Gabe mit einem klassischen Chemotherapeutikum sinnvoll. Dadurch, dass dem Chemokinrezeptor CXCR4 eine Rolle bei der Chemotherapieresistenz zugeschrieben wird, könnte AMD3100 hier eine Rolle als „Chemotherapie-Sensitizer“ zukommen. In einer Studie an Leukämiezellen konnte die Sensibilisierung der Krebszellen für Chemotherapeutika durch AMD3100 bereits bewiesen werden (Domanska et al. 2013). So könnte eine kombinierte Gabe von AMD3100 mit einem für die Tumorentität geeigneten Chemotherapeutikum besonders für chemotherapieresistente CXCR4-positive kleinzellige Lungenkarzinome eine erweiterte Behandlungsoption darstellen. Ein Aufheben der Wechselwirkungen zwischen CXCR4-exprimierenden Tumorzellen und dem sie umgebenden Tumormikromilieu durch AMD3100 und damit einhergehend eine mögliche Sensibilisierung gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht beurteilt werden. In einer Arbeit von Conley-LaComb et al. (2016) wurde die Auswirkung einer alleinigen CXCR4-Blockade auf Prostatatumoren untersucht. Auch hierbei konnte keine Reduktion der Tumorgröße festgestellt werden. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass AMD3100 zwar die anfängliche Initiierung der Tumorentstehung hemmen könne, das Wachstum von bereits etablierten Tumoren allerdings offensichtlich nicht beeinflusst (Conley-LaComb et al. 2016).

## 6.4 Histopathologische Veränderungen in der Leber

Ergänzend zu den bereits von Keohavong et al. (2011) beschriebenen Primärtumoren in der Lunge sollte in der vorliegenden Arbeit das Modell auch auf Metastasen untersucht werden. Zu den häufigsten extrathorakalen Metastasierungsorten von Lungentumoren gehört neben dem Gehirn, dem Knochenmark und den Nebennieren die Leber. Besonders das kleinzellige Bronchialkarzinom metastasiert frühzeitig, sodass bei 80% der Patienten bei Diagnosestellung bereits Metastasen vorliegen (Colby et al. 2004, Herold 2018).

Die histologische Untersuchung erfolgte an Paraffinschnitten aller sechs Leberlappen aller Mäuse. Trotz der teilweise recht großen Ausdehnung, insbesondere der adenoiden Tumore bei den mit NNK und LPS behandelten Mäusen, konnten bei keinem der Tiere Lebermetastasen und auch keine primären Lebertumore gefunden werden. Die PAS-Färbung konnte das Vorhandensein von nicht Glykogen speichernden Zellen als Hinweis auf das Vorliegen von Bronchialkarzinommetastasen oder primäre Lebertumore ebenfalls nicht bestätigen. Die systemische Behandlung mit NNK hatte somit offensichtlich in der Leber selbst, obwohl die Substanz dort erst zum ultimalen Kanzerogen aktiviert wird, keine Tumorinduktion zur Folge. Weiterhin waren die nichtkleinzelligen Tumore in den Lungen augenscheinlich noch zu gutartig und die kleinzelligen Neoplasien noch zu klein, um bereits in die Leber metastasiert zu haben. Die Lebern der mit NNK und LPS behandelten Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren jedoch ödematös vergrößerte Hepatozyten. Zusätzlich wiesen die Lebern, unabhängig von einer Behandlung mit AMD3100, eine vermehrte Infiltration von Immunzellen auf. Die beobachtete Immunzellinfiltration sowie die ödematöse Veränderung der Hepatozyten sind am ehesten als systemische Antwort auf das lokal applizierte LPS anzusehen.

In der PAS-Färbung zeigte sich eine Tendenz zu einer vermehrten Glykogenspeicherung in den Lebern der mit AMD3100 behandelten Tiere. Der Zusammenhang zwischen CXCL12, CXCR4 und der Pathogenese von Diabetes mellitus wird kontrovers diskutiert. Der CXCL12/CXCR4-Achse wird auf der einen Seite eine proinflammatorische Rolle zugeschrieben, durch welche eine Insulinresistenz gefördert wird. Auf der anderen Seite wird eine antiinflammatorische Wirkung mit einer Besserung der diabetischen Nephropathie bei einer Therapie mit erhöhten CXCL12-Konzentrationen in Betracht gezogen (Zhang et al. 2013, Vidakovic et al. 2015). Im vorliegenden Fall würde eine vermehrte Speicherung von Glucose in Form von Glykogen in der Leber zu einem geringeren Glucosespiegel im Blut und damit möglicherweise zu einer Verbesserung einer diabetischen Stoffwechsellage führen.

Weder die Tumorinduktion mit NNK und LPS noch die Behandlung mit AMD3100 scheinen, wie in den Piko-Siriusrot-Färbungen gezeigt werden konnte, zu einer vermehrten Fibrosierung

der Lebern geführt zu haben. Die durch die lokale LPS-Gabe hervorgerufene Entzündungsreaktion der Leber scheint daher (noch) nicht zu größeren Leberschäden geführt zu haben.

Einen interessanten Befund bezüglich der Lebern zeigte sich jedoch bei zwei Geschwistertieren, die ein kavernoöses Hämangiom in der Leber aufwiesen. Leberhämangiome sind die weltweit häufigsten benignen Lebertumore. Aufgrund der Epidemiologie und Ätiologie sind die kavernoösen Hämangiome bei den beiden Tieren am ehesten kongenitaler Genese (Gassel et al. 2005). Eine möglicherweise erhöhte Vulnerabilität dieser Lebern begünstigt die Entstehung von entarteten Zellen, wie sie in unmittelbarer Umgebung zu Hämangiomen häufig zu finden sind. Damit im Zusammenhang steht auch eine erhöhte Fibrosierungsneigung in der Umgebung von Hämangiomen, was auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

## 7. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte das von Keohavong et al. (2011) beschriebene, chemisch induzierte, murine Lungentumormodell reproduziert und als zuverlässiges tierexperimentelles Modell etabliert und weiterführend charakterisiert werden. Die Behandlung mit dem vom Nikotin abgeleiteten Nitrosamin-Keton NNK als Karzinogen in Kombination mit der Lipopolysaccharid-vermittelten chronischen Entzündung der Lunge führte in den drei untersuchten transgenen Mauslinien zur Entstehung von sowohl nichtkleinzelligen als auch kleinzelligen Lungentumoren. Die chronische Lungenentzündung ließ sich anhand der peribronchialen und perivaskulären Infiltration unter anderem mit B- und T-Lymphozyten sowie Makrophagen nachweisen. Die unbehandelten Kontrolltiere zeigten keine pathologischen Veränderungen; eine spontane Lungentumorbildung konnte somit in den untersuchten Mauslinien ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Morphologie und anhand der weiterführenden immunhistochemischen Untersuchungen ließen sich die nichtkleinzelligen Tumore als größtenteils noch benigne einstufen. Nur wenige Zellen in den adenoiden Tumoren zeigten eine Expression von Adeno- und Plattenepithelkarzinom-Markern, exprimierten den CXCR4 und waren für den Proliferationsmarker Ki-67 positiv. Aufgrund der Koexpression von Adeno- und Plattenepithelzellmarkern, nicht jedoch von Markern für eine neuroendokrine Differenzierung, ließen sich diese bereits entarteten Zellen als adenosquamöse Karzinomzellen identifizieren. Einige der vereinzelt in den nichtkleinzelligen Neoplasien anzutreffenden CXCR4-exprimierenden Zellen konnten als Immunzellen wie Makrophagen, B- oder T-Lymphozyten charakterisiert werden. Aufgrund der morphologischen Eigenschaften (kleine, polymorphe Zellen mit geringem Zytoplasmagehalt) sowie der Expression der neuroendokrinen Marker Synaptophysin, Chromogranin A und CD56, einer Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 und des erhöhten Nachweises des Proliferationsmarkers Ki-67 konnte ein Teil der kleinzelligen Strukturen als kleinzellige Lungenkarzinome eingestuft werden. Andere kleinzellige Läsionen entsprachen, wie auch bei den nur mit LPS behandelten Tieren, Ansammlungen von Lymphozyten, welche neben einer sehr starken CXCR4-Expression auch eine Positivität für CD3 oder CD20 aufwiesen.

Trotz der nachgewiesenen, erfolgreichen Blockade der CXCR4-Chemokinrezeptoren durch die 14-tägige Behandlung mit AMD3100 und trotz einer starken CXCR4-Expression durch die Tumorzellen konnte kein Einfluss von AMD3100 auf die Anzahl und Ausdehnung der kleinzelligen Lungentumore festgestellt werden.

Die histologische Aufbereitung der Lebern als eines der häufigsten Metastasierungsorte von Bronchialkarzinomen ergab keine Metastasen, es zeigte sich jedoch eine ödematös-entzündliche Veränderung des Leberparenchyms mit einer Infiltration von Immunzellen.

In zukünftigen Untersuchungen sollte eine Verlängerung der Tumorinduktionsphase erwogen werden, um bereits weiter fortgeschrittene Tumore zu erhalten. Sinnvoll wäre auch eine längere Behandlungsdauer mit AMD3100 bzw. eine kombinierte Behandlung mit einem geeigneten „klassischen“ Chemotherapeutikum. Bei weiter fortgeschrittenen Tumoren wäre unter Umständen neben der Leber auch die Analyse weiterer typischer Metastasierungsorte für Bronchialkarzinome wie Gehirn, Wirbelsäule oder Nebennieren von Interesse.

## 8. Literatur-und Quellenverzeichnis

- Austyn JM, Gordon S. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, 11 (10):805-815.
- Balkwill F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4 (7):540-550.
- Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SR. 2011. The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev*, 32 (6):755-797.
- Bodart V, Anastassov V, Darkes MC, Idzan SR, Labrecque J, Lau G, Mosi RM, Neff KS, Nelson KL, Ruzek MC, Patel K, Santucci Z, Scarborough R, Wong RS, Bridger GJ, Macfarland RT, Fricker SP. 2009. Pharmacology of AMD3465: a small molecule antagonist of the chemokine receptor CXCR4. *Biochem Pharmacol*, 78 (8):993-1000.
- Busillo JM, Benovic JL. 2007. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1768 (4):952-963.
- Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. 1996. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol*, 25 (12):821-828.
- Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. 2014. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res*, 124:31-82.
- Colby T, Noguchi M, Henschke C, Vazquez M, Geisinger K, Yokose T, Ohori P, Rami-Porta R, Franks T, Shimosato Y, Matsuno Y, Khor A, Westra W, Jambhekar N, Petersen I, Takahashi T, Kawai T, Meyerson M, Hanash S, Jen J. 2004. Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: IARC Press, 35-44. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC:35-44.
- Conley-LaComb MK, Semaan L, Singareddy R, Li Y, Heath EI, Kim S, Cher ML, Chinni SR. 2016. Pharmacological targeting of CXCL12/CXCR4 signaling in prostate cancer bone metastasis. *Mol Cancer*, 15 (1):68.
- De Clercq E. 2009. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol*, 77 (11):1655-1664.
- De Clercq E. 2015. AMD3100/CXCR4 Inhibitor. *Front Immunol*, 6:276.
- Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. 2018. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Leitlinienprogramm Onkologie.
- Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, Walenkamp AM. 2013. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer*, 49 (1):219-230.
- Dutt A, Wong KK. 2006. Mouse models of lung cancer. *Clin Cancer Res*, 12 (14 Pt 2):4396s-4402s.
- Engels EA. 2008. Inflammation in the development of lung cancer: epidemiological evidence. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8 (4):605-615.
- Folescu R, Levai CM, Grigoras ML, Arghirescu TS, Talpos IC, Gindac CM, Zamfir CL, Poroch V, Anghel MD. 2018. Expression and significance of Ki-67 in lung cancer. *Rom J Morphol Embryol*, 59 (1):227-233.
- Fricker SP. 2013. Physiology and pharmacology of plerixafor. *Transfus Med Hemother*, 40 (4):237-245.
- Fricker SP, Anastassov V, Cox J, Darkes MC, Grujic O, Idzan SR, Labrecque J, Lau G, Mosi RM, Nelson KL, Qin L, Santucci Z, Wong RS. 2006. Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochem Pharmacol*, 72 (5):588-596.
- Furusato B, Mohamed A, Uhlen M, Rhim JS. 2010. CXCR4 and cancer. *Pathol Int*, 60 (7):497-505.
- Gassel HJ, Klein I, Steger U, Simon M, Thiede A. 2005. Das kavernöse Leberhämangiom: Rationale Diagnostik und therapeutisches Vorgehen. *Viszeralchirurgie*, 40 (1):37-44.

- Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD. 2017. Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat Rev Cancer*, 17 (12):725-737.
- Gerrits H, van Ingen Schenau DS, Bakker NE, van Disseldorp AJ, Strik A, Hermens LS, Koenen TB, Krajnc-Franken MA, Gossen JA. 2008. Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis*, 46 (5):235-245.
- Griesinger F, Eberhardt W, Früh M, Gautschi O, Hilbe W, Hoffmann H, Huber RM, Pirker R, Pöttgen C, Pritzkeleit R, Reck M, Reinmuth N, Sebastian M, Ukena D, Waller C, Wolf Jr, Wolf M, Wörmann B Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC) [www.onkopedia.com](http://www.onkopedia.com).
- Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E, Schols D. 2002. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Letters*, 527 (1-3):255-262.
- Hattermann K, Mentlein R. 2013. An infernal trio: the chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 in tumor biology. *Ann Anat*, 195 (2):103-110.
- Hattrup CL, Gendler SJ. 2008. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol*, 70:431-457.
- Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. 2005. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg*, 22 (1-2):16-25.
- Herold G. 2018. Innere Medizin. Köln.
- Irollo E, Pirozzi G. 2013. CD133: to be or not to be, is this the real question? *American Journal of Translational Research*, 5 (6):563-581.
- Izuhara K, Yamaguchi Y, Ohta S, Nunomura S, Nanri Y, Azuma Y, Nomura N, Noguchi Y, Aihara M. 2018. Squamous Cell Carcinoma Antigen 2 (SCCA2, SERPINB4): An Emerging Biomarker for Skin Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*, 19 (4).
- Janssens R, Struyf S, Proost P. 2018. Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev*, 44:51-68.
- Jung MJ, Rho JK, Kim YM, Jung JE, Jin YB, Ko YG, Lee JS, Lee SJ, Lee JC, Park MJ. 2013. Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncogene*, 32 (2):209-221.
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*, 20 (11):4106-4114.
- Kaatsch DP, Spix DC, Katalinic PDA, Hentschel DS, Luttmann DS, Christa Stegmaier, Waldeyer-Sauerland DM, Waldmann PDA, Caspritz DS, Christ DM, Ernst DA, Folkert DJ, Dr. Jutta Hansmann, Klein DS, Kranzhöfer DK, Kunz DB, Manegold DK, Penzkofer DA, Treml DK, Weg-Remers DS, Wittenberg DK, Barnes DB, Bertz DJ, Buttman-Schweiger N, Dahm DS, Fiebig J, Haberland DJr, Kraywinkel DK, Wienecke A, Wolf DU Krebs in Deutschland für 2013/14 [www.gekid.de](http://www.gekid.de); [www.krebsdaten.de](http://www.krebsdaten.de).
- Kaemmerer D, Specht E, Sanger J, Wirtz RM, Sayeg M, Schulz S, Lupp A. 2015a. Somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms: new diagnostic, prognostic, and therapeutic markers. *J Clin Endocrinol Metab*, 100 (3):831-840.
- Kaemmerer D, Reimann C, Specht E, Wirtz RM, Sayeg M, Baum RP, Schulz S, Lupp A. 2015b. Differential expression and prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Oncotarget*, 6 (5):3346-3358.
- Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. 2009. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol*, 75 (5):1240-1247.
- Keohavong P, Kahkonen B, Kinchington E, Yin J, Jin J, Liu X, Siegfried JM, Di YP. 2011. K-ras Mutations in Lung Tumors from NNK-treated Mice with Lipopolysaccharide-elicited Lung Inflammation. *Anticancer Research* 31 (9):2877-2882.

- Khair OA, Davies RJ, Devalia JL. 1996. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J*, 9 (9):1913-1922.
- Kim YS, Kaidina AM, Chiang JH, Yarygin KN, Lupatov AY. 2017. Cancer stem cell molecular markers verified in vivo. *Biochemistry (Moscow)*, Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 11 (1):43-54.
- Krysan K, Tran LM, Grimes BS, Fishbein GA, Seki A, Gardner BK, Walser TC, Salehi-Rad R, Yanagawa J, Lee JM, Sharma S, Aberle DR, Spira AE, Elashoff DA, Wallace WD, Fishbein MC, Dubinett SM. 2019. The Immune Contexture Associates with the Genomic Landscape in Lung Adenomatous Premalignancy. *Cancer Res*, 79 (19):5022-5033.
- Lehman JM, Hoeksema MD, Staub J, Qian J, Harris B, Callison JC, Miao J, Shi C, Eisenberg R, Chen H, Chen SC, Massion PP. 2019. Somatostatin receptor 2 signaling promotes growth and tumor survival in small-cell lung cancer. *Int J Cancer*, 144 (5):1104-1114.
- Leveau JH, Lindow SE. 2001. Predictive and interpretive simulation of green fluorescent protein expression in reporter bacteria. *J Bacteriol*, 183 (23):6752-6762.
- Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, Lagane B. 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113 (24):6085-6093.
- Löffler PDG. 2008. *Basiswissen Biochemie 7Aufl.:* Springer Medizin Verlag Heidelberg
- Maksym RB, Tarnowski M, Grymula K, Tarnowska J, Wysoczynski M, Liu R, Czerny B, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. 2009. The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol*, 625 (1-3):31-40.
- Medizin NG Treibermutationen beim Lungenkrebs <https://ngm-cancer.com/molekularpathologie/treibermutationen-beim-lungenkrebs/>.
- Memi F, Abe P, Cariboni A, MacKay F, Parnavelas JG, Stumm R. 2013. CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) affects the migration of GnRH neurons by regulating CXCL12 availability. *J Neurosci*, 33 (44):17527-17537.
- Mirsadraee S, Oswal D, Alizadeh Y, Caulo A, van Beek E, Jr. 2012. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol*, 4 (4):128-134.
- Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, Pavel M, Tsolakis AV, Kidd M. 2010. Chromogranin A-biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease. *Ann Surg Oncol*, 17 (9):2427-2443.
- Müller AM, Nesslinger M, Skipka G, Müller KM. 2002. Expression of CD34 in pulmonary endothelial cells in vivo. *Pathobiology*, 70 (1):11-17.
- Nagasawa T. 2014. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *J Mol Med (Berl)*, 92 (5):433-439.
- Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Imanishi M, Nelson H, Matsushima. 2002. Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 71:711-717.
- Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleswar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M. 2010. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 5 (2):e9175.
- Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A. 2005. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16 (6):637-658.
- Ota T, Kirita K, Matsuzawa R, Udagawa H, Matsumoto S, Yoh K, Niho S, Ishii G, Goto K. 2019. Validity of using immunohistochemistry to predict treatment outcome in patients with non-small cell lung cancer not otherwise specified. *J Cancer Res Clin Oncol*, 145 (10):2495-2506.
- Petruzzello-Pellegrini TN, Yuen DA, Page AV, Patel S, Soltyk AM, Matouk CC, Wong DK, Turgeon PJ, Fish JE, Ho JJ, Steer BM, Khajooe V, Tigdi J, Lee WL, Motto DG, Advani



- A, Gilbert RE, Karumanchi SA, Robinson LA, Tarr PI, Liles WC, Brunton JL, Marsden PA. 2012. The CXCR4/CXCR7/SDF-1 pathway contributes to the pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome in humans and mice. *J Clin Invest*, 122 (2):759-776.
- Pohl M, Olsen KE, Holst R, Donnem T, Busund LT, Bremnes RM, Al-Saad S, Andersen S, Richardsen E, Ditzel HJ, Hansen O. 2016. Keratin 34betaE12/keratin7 expression is a prognostic factor of cancer-specific and overall survival in patients with early stage non-small cell lung cancer. *Acta Oncol*, 55 (2):167-177.
- Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. 2001. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, 28 (7):836-846.
- Ridge CA, McErlean AM, Ginsberg MS. 2013. Epidemiology of lung cancer. *Semin Intervent Radiol*, 30 (2):93-98.
- Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. 1999. Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells. *The American Journal of Pathology*, 154 (4):1125-1135.
- Sanchez-Martin L, Sanchez-Mateos P, Cabanas C. 2013. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med*, 19 (1):12-22.
- Sayeg Y, Sayeg M, Baum RP, Kulkarni HR, Presselt N, Mader I, Kunze A, Sanger J, Horsch D, Bonnet R. 2014. [Pulmonary neuroendocrine neoplasms]. *Pneumologie*, 68 (7):456-477.
- Schmitz-Moormann P, Gebert G, Thomas C. 1995. *Allgemeine Pathologie Stuttgart Schattauer*.
- Schnabel PA, Junker K. 2015. [Pulmonary neuroendocrine tumors in the new WHO 2015 classification: Start of breaking new grounds?]. *Pathologe*, 36 (3):283-292.
- Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez-A C, Mackay CR, Mackay F. 2007. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (37):14759–14764.
- Singla AK, Downey CM, Bebb GD, Jirik FR. 2015. Characterization of a murine model of metastatic human non-small cell lung cancer and effect of CXCR4 inhibition on the growth of metastases. *Oncoscience*, 2 (3):263-271.
- Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, Taichman RS, Pienta KJ, Wang J. 2010. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, 29 (4):709-722.
- Teicher BA, Fricker SP. 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 16 (11):2927-2931.
- Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. 2008. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*, 267 (2):226-244.
- Vidakovic M, Grdovic N, Dinic S, Mihailovic M, Uskokovic A, Arambasic Jovanovic J. 2015. The Importance of the CXCL12/CXCR4 Axis in Therapeutic Approaches to Diabetes Mellitus Attenuation. *Front Immunol*, 6:403.
- Wang C, Chen W, Shen J. 2018. CXCR7 Targeting and Its Major Disease Relevance. *Front Pharmacol*, 9:641.
- Wang Y, Narayanapillai SC, Hu Q, Fujioka N, Xing C. 2019. Detection and quantification of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (HPB) from smoker albumin and its potential as a surrogate biomarker of tobacco-specific nitrosamines exposure and bioactivation. *Toxicol Lett*, 311:11-16.
- Wei DM, Chen WJ, Meng RM, Zhao N, Zhang XY, Liao DY, Chen G. 2018. Augmented expression of Ki-67 is correlated with clinicopathological characteristics and prognosis

- for lung cancer patients: an up-dated systematic review and meta-analysis with 108 studies and 14,732 patients. *Respir Res*, 19 (1):150.
- Wolf M, Eberhardt W, Früh M, Gautschi O, Griesinger F, Hilbe W, Hoffmann H, Huber RM, Pirker R, Pöttgen C, Pritzkeleit R, Sebastian M, Thomas M, Dieter Ukena, Wolf ur, Wörmann B. 2017. Lungenkarzinom, kleinzellig (SCLC).
- Xu L, Li Y, Sun H, Li D, Hou T. 2013. Structural basis of the interactions between CXCR4 and CXCL12/SDF-1 revealed by theoretical approaches. *Mol Biosyst*, 9 (8):2107-2117.
- Yang X, Hou D, Jiang W, Zhang C. 2014. Intercellular protein-protein interactions at synapses. *Protein Cell*, 5 (6):420-444.
- Zdorovenko EL, Kadykova AA, Shashkov AS, Varbanets LD, Bulyhina TV. 2019. Pantoea agglomerans P1a lipopolysaccharide: Structure of the O-specific polysaccharide and lipid A and biological activity. *Carbohydr Res*, 484:107767.
- Zhang D, Shao S, Shuai H, Ding Y, Shi W, Wang D, Yu X. 2013. SDF-1alpha reduces fibronectin expression in rat mesangial cells induced by TGF-beta1 and high glucose through PI3K/Akt pathway. *Exp Cell Res*, 319 (12):1796-1803.
- Zhang L, Hou L, Xie H, Dong Z, Wu W, Kong J, Chen G, Wu C. 2015. Expression of p63, p40 and CK5/6 in small cell lung cancer. *Chinese Journal of Pathology*, 44 (9):644-647.
- Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B. 2015. CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget*, 6 (7):5022-5040.
- Zlotnik A, Yoshie O. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36 (5):705-716.

## 9. Anhang

### 9.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. med. habil. Amelie Lupp,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Hamburg, den

Viktoria Emken

## 9.2 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die am Gelingen dieser Arbeit entscheidend beteiligt waren.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Frau apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp für die Überlassung dieses interessanten Themas, die regelmäßigen Besprechungen und für die stetige Unterstützung auf fachlicher und persönlicher Ebene. Ich bin dankbar für ihre konstruktiven Ratschläge und für die ausgezeichnete Einarbeitung und Betreuung im Labor. Sie ermöglichte mir mit ihrer jahrelangen Erfahrung ein komplikationsloses Durchführen der Experimente.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, allen Doktoranden, Diplom- und Masterstudenten, die während meiner Zeit im Labor tätig waren, bedanken. Die gemeinsame Zeit war lehrreich und sehr angenehm.

Ebenfalls danken möchte ich dem Interdisziplinärem Zentrum für klinische Forschung (IZKF) Jena für die finanzielle Unterstützung während meines Forschungssemesters.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und Freunden für die bedingungslose Unterstützung, Motivation und Entlastung.