

Aus dem Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Auswirkung der Bestrahlung des Primärtumors  
und/oder der Chemotherapie auf die Metastasierung  
des kleinzelligen Bronchialkarzinoms  
in Xenograft Mausmodellen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Jordana Siekmann  
Tierärztin  
aus Osnabrück

**Berlin 2017**

**Journal-Nr.: 3937**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Udo Schumacher  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Robert Klopffleisch

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

mice; animal models; lung cancer; small cell lung carcinoma (MeSH); radiotherapy;  
drug therapy; DNA; polymerase chain reaction; immunohistochemistry; neoplastic  
cells; circulating (MeSH); necrosis; microvessels (MeSH); leucocytes; dendritic cells

Tag der Promotion: 30.06.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-826-9

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Für meine Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tumorerkrankung .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Bronchialkarzinoms .....	1
1.1.2 Klassifikation.....	1
1.1.3 TNM-Klassifikation .....	2
1.2 Das kleinzellige Bronchialkarzinom.....	5
1.2.1 Epidemiologie und Therapie.....	5
1.2.2 Metastasen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms .....	6
1.3 Maus-Tumormodell .....	7
1.4 Fragestellungen.....	10
<b>2 Tiere, Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1 Material.....	13
2.1.1 Chemikalien.....	13
2.1.2 Lösungen und Puffer .....	14
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	14
2.1.4 Kits .....	15
2.1.5 Medikamente .....	16
2.1.6 Lektine, Antikörper und Kontrollen von Antikörpern.....	16
2.1.7 Geräte .....	17
2.1.8 Oligonukleotide .....	18
2.2 Methoden .....	18
2.2.1 Humane kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien OH-1 und H69 .....	18
2.2.1.1 Zelllinien .....	18
2.2.1.2 Kultivierung der Zelllinien .....	18
2.2.1.3 Mykoplasmentest.....	19
2.2.1.4 Zellzahlbestimmung .....	19

2.2.1.5	Injektion der Tumorzellen OH-1 und H69.....	19
2.2.2	Maus Tumormodell.....	20
2.2.2.1	Versuchstiere .....	20
2.2.2.2	Tierhaltung.....	20
2.2.2.3	Tiervisiten .....	20
2.2.3	Gruppeneinteilung .....	21
2.2.3.1	Humane kleinzellige Bronchialkarzinomzell linie OH-1 .....	21
2.2.3.2	Humane kleinzellige Bronchialkarzinomzell linie H69 .....	21
2.2.4	Therapie .....	22
2.2.5	Probenanalyse .....	23
2.2.5.1	Sektion, Probengewinnung und -aufarbeitung....	23
2.2.5.2	DNA Extraktion.....	25
2.2.5.3	Einstellen der DNA Konzentration.....	26
2.2.5.4	Alu-PCR .....	26
2.2.5.5	Mastermix-Ansatz.....	27
2.2.5.6	Histologie und Immunhistochemie der Primärtumoren .....	28
2.2.6	Auswertung.....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Tierverluste .....	37
3.1.1	OH-1 Gruppe .....	38
3.1.2	H69 Gruppe .....	38
3.2	Tumorgröße.....	40
3.3	Alu-PCR.....	41
3.3.1	Blut .....	42
3.3.2	Lunge .....	44
3.3.3	Leber.....	46
3.3.4	Knochenmark.....	48
3.3.5	Gehirn .....	50
3.4	Histologische Aufarbeitung der Primärtumore .....	53

---

3.4.1	HE-Färbung .....	53
3.4.2	Feulgen-Färbung.....	55
3.4.3	S1P1-Rezeptor-Darstellung .....	56
3.4.4	Ki67-Markierung .....	58
3.4.5	CD45-Markierung .....	60
3.4.6	CD 11b-Markierung .....	64
3.4.7	BSA-I-Färbung .....	68
3.4.8	NCAM-Darstellung .....	71
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>87</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>99</b>
	Scoringliste Antrag.....	99
	Dokumentationsblatt .....	100
	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>103</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>104</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Darstellung der palperten Tumorumina zu Therapiebeginn und der gemessenen Tumorgewichte bei der Sektion für die OH-1 (A) und die H69 (B) Gruppe.....	41
Abb. 2a	Ergebnisse der Alu-PCR der Blutproben in der OH-1 Gruppe.....	43
Abb. 2b	Ergebnisse der Alu-PCR der Blutproben in der H69 Gruppe.....	44
Abb. 2c	Ergebnisse der Alu-PCR der Lungen in der OH-1 Gruppe.....	45
Abb. 2d	Ergebnisse der Alu-PCR der Lungen in der H69 Gruppe.....	46
Abb. 2e	Ergebnisse der Alu-PCR der Lebern in der OH-1 Gruppe.....	47
Abb. 2f	Ergebnisse der Alu-PCR der Lebern in der H69 Gruppe.....	48
Abb. 2g	Ergebnisse der Alu-PCR vom Knochenmark in der OH-1 Gruppe.....	49
Abb. 2h	Ergebnisse der Alu-PCR vom Knochenmark in der H69 Gruppe.....	50
Abb. 2i	Ergebnisse der Alu-PCR der Gehirne in der OH-1 Gruppe.....	51
Abb. 2j	Ergebnisse der Alu-PCR der Gehirne in der H69 Gruppe.....	52
Abb. 3 a-d	Primärtumore HE gefärbt. ....	54
Abb. 4 a-d	Primärtumore gefärbt nach Feulgen. ....	55
Abb. 4e	Anzahl der apoptotischen Zellen/Gesichtsfeld in %.....	56
Abb. 5 a-d	Primärtumore S1P1-Rezeptor-Darstellung.....	57
Abb. 5e	Absolute Anzahl der Gefäße/ Gesichtsfeld.....	58
Abb. 6 a-d	Primärtumore Ki67 gefärbt.....	59

Abb. 6e	Anzahl proliferierender Zellen/ Gesichtsfeld in % .....60
Abb.7a	Darstellung des prozentualen Anteils CD45 markierter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytierender Zellen (OH-1). .....61
Abb. 7b	Darstellung des prozentualen Anteils CD45 markierter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytierender Zellen (H69).....62
Abb. 7 c-f	Darstellung bestrahlter (RT) Tumore (7 c und e) und unbehandelter (E) Tumore (7d und f) beider Zelllinien mit der CD45-Markierung. ....63
Abb. 8a	Darstellung des prozentualen Anteils CD11b markierter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytierender Zellen (OH-1). .....65
Abb. 8b	Darstellung des prozentualen Anteils CD11b markierter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytierender Zellen (H69).....66
Abb. 8 c bis f	Darstellung eines bestrahlten und eines unbehandelten Tumors beider Zelllinien mit einer CD11b- Markierung. ....67
Abb. 9a	Darstellung des prozentualen Anteils BSA-I gefärbter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytierender Zellen (OH-1). ....69
Abb. 9b	Darstellung des prozentualen Anteils BSA-I gefärbter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytierender Zellen (H69).....70
Abb. 9c bis f	Darstellung eines bestrahlten und eines unbehandelten Tumors der OH-1 Gruppe (Abb. 9 c und d) und der H69 Gruppe (Abb. 9 e und f) .....71
Abb. 10 a und b	Darstellung der NCAM-Markierung eines Zellpellets (a) und eines Primärtumors aus der OH-1 Gruppe (b).....72
Abb. 10c	Darstellung einer OH-1 Lungenmetastase. ....72

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Histopathologische Klassifikation des Bronchialkarzinoms der WHO .....	2
Tab. 2:	Einteilung der Tumore nach der TNM-Klassifikation.....	3
Tab. 3:	Eigenschaften der verwendeten Zelllinien OH-1 und H69.....	9
Tab. 4:	Das Programm des Light Cycler 480 für die Alu-PCR .....	28
Tab. 5:	Übersicht über die verwendeten Antikörper/ Lektine.....	29
Tab. 6a:	Übersicht über die Tierzahlen (OH-1).....	39
Tab. 6b:	Übersicht über die Tierzahlen (H69).....	40



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE Puffer	Elutionspuffer
ALT Puffer	Lysepuffer
aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bandeiraea simplicifolia ayglutinin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
ChT	Chemotherapiegruppe
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTC	circulating tumor cells
d.h.	das heißt
DTC	disseminated tumor cells
E	Endkontrollgruppe
ED	Extensive disease
et al.	et alii
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
Gy	Gray
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin- Eosin
H <sub>2</sub> O	Wasser
H69	Kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie
i. p.	intraperitoneal
K	(Anfangs-) Kontrollgruppe

---

kg	Kilogramm
l	Liter
LCMM	LightCycler Mastermix
LD	Limited disease
M	Mol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl
NCAM	neural cell adhesion molecule
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NSCLC	Non-small-cell-lung-cancer
OH-1	Kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie
p	Wahrscheinlichkeit
%	Prozent
RT	Radiatio-Gruppe
RChT	Radiatio-Chemotherapie-Gruppe
SCID	Severe combined immunodeficiency
SCLC	Small-cell-lung-cancer
sek	Sekunde
s. k.	subkutan
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
Std	Stunde
Tab.	Tabelle

---

TBS	gepufferte Salzlösung
TBS-T	gepufferte Salzlösung mit Zusatz von Tween 20
TNM	T = Tumor, N = lymphatic nodes = Lymphknoten, M = Metastasen
rpm	revolutions per minute
v. a.	vor allem
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter



---

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorerkrankung

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Bronchialkarzinoms

Krebs ist in Deutschland nach den Herz-Kreislaufferkrankungen mit ca. 25,5% die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2015 (Internetquelle Nr. 1)). Das Bronchialkarzinom stellt sowohl in Deutschland als auch weltweit die dritthäufigste Tumorerkrankung dar. Dabei liegt die Inzidenz für Deutschland bei 35 pro 100.000 Einwohnern bei den Frauen und 81 pro 100.000 bei den Männern (Kaiser *et al.*, 2011). Vergleicht man die Anzahl der Todesfälle innerhalb der verschiedenen Krebsentitäten, ist das Bronchialkarzinom die häufigste Todesursache (23,6%) des Mannes und die zweithäufigste (13,8%) der Frau (DrED (Internetquelle Nr. 2)). Noch immer gilt das Rauchen als Hauptrisikofaktor an Lungenkrebs zu erkranken (90% der an Lungenkrebs erkrankten Männer und 60% der Frauen rauchen) (Husmann *et al.*, 2010). In den letzten Jahren ist zu beobachten, dass die Erkrankungshäufigkeit bei den Männern rückläufig, bei den Frauen allerdings steigend ist (Kaiser *et al.*, 2011). Ein weiterer Risikofaktor ist die Schadstoffbelastung in der Luft durch Feinstaub und Dieselruß (Deutsches Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst (Internetquelle Nr. 3)). Auch gilt der Kontakt mit Radon, Asbest oder verschiedenen Metallen als erhöhtes Risiko, denen man beruflich oder umweltbedingt ausgesetzt sein kann (Saracci und Boffetta, 1994).

### 1.1.2 Klassifikation

Die *World Health Organization* (WHO) veröffentlichte im Jahr 1999 eine weltweit geltende histopathologische Klassifikation der Bronchialkarzinome. In Tab.1 ist eine Übersicht der unterschiedlichen Subtypen aufgeführt. Klinisch werden das kleinzellige (engl. *small cell lung cancer* = SCLC) und das nicht kleinzellige (engl. *non-small cell lung cancer* = NSCLC) Bronchialkar-

zinom unterschieden. Das SCLC wird häufig erst im metastasierten Stadium diagnostiziert und ist somit meist inoperabel. Die Therapie der Wahl ist die Chemotherapie. Das NSCLC wird primär operativ entfernt, kann aber auch mit einer Chemotherapie behandelt werden.

**Tab. 1: Histopathologische Klassifikation des Bronchialkarzinoms der WHO** (Travis *et al.*, 1999) mit prozentualen Anteilen (gemessen an allen Bronchialkarzinomen) (Travis *et al.*, 1995). Angelehnt an Wunder (2011).

Histopathologischer Subtyp	Prozentualer Anteil
Adenokarzinom	31,5%
Plattenepithelkarzinom	29,4%
Kleinzelliges Karzinom	17,8%
Großzelliges Karzinom	9,2%
Karzinoidtumor	1%
Karzinome mit pleomorphen sarkomatoiden oder sarkomatösen Anteilen	0,1%
Karzinome vom Speicheldrüsentyp (Bronchialdrüsenkarzinom)	0,1%
Unklassifizierbare Tumore	<0,1%

### 1.1.3 TNM-Klassifikation

Die Behandlung der Patienten hängt stark von dem Stadium ihrer Erkrankung ab. Die NSCLC Tumoren werden heute nach der üblichen TNM-Klassifikation eingeteilt (Klassifikation nach Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasen (M), eingeführt durch Denoix, 1964), modifiziert nach Mountain *et al.* (Mountain, 1997). Diese Einteilung ist in Tab. 2 aufgeführt.

**Tab. 2: Einteilung der Tumore nach der TNM-Klassifikation**

Primärtumor (T)	T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
	TX	Primärtumor nicht beurteilbar oder Tumorzellen in Sputum oder Bronchiallavage zwar nachgewiesen, aber weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Tumor in der größten Ausdehnung $\leq 3$ cm, umgeben von Lunge oder viszeraler Pleura ohne bronchoskopischen Anhalt für einen Befall dieser Strukturen, proximal eines Lobärbronchus
	T2	Tumor mit einem der folgenden Merkmale: <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 3 cm in der größten Ausdehnung</li> <li>■ Befall des Hauptbronchus <math>\geq 2</math> cm distal der Carina</li> <li>■ Infiltration der viszeralen Pleura</li> <li>■ Atelektase oder obstruktive Entzündung im Bereich des Hilus, aber nicht der ganzen Lunge</li> </ul>
	T3	Tumor jeder Größe, der eine der folgenden Strukturen direkt infiltriert: <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Brustwand (einschließlich Tumoren des Sulcus superior)</li> <li>■ Diaphragma</li> <li>■ mediastinale Pleura</li> <li>■ parietales Perikard</li> <li>■ Tumor mit Befall des Hauptbronchus <math>&lt; 2</math> cm distal der Carina, aber ohne Befall der Carina selbst</li> <li>■ Assoziierte Atelektasen oder obstruktive Entzündungen der gesamten Lunge</li> </ul>

Primärtumor (T)	T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
	T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration einer der folgenden Strukturen: <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Mediastinum</li> <li>■ Herz</li> <li>■ große Gefäße</li> <li>■ Trachea</li> <li>■ Oesophagus</li> <li>■ Wirbelkörper</li> <li>■ Carina</li> <li>■ Tumore mit malignem Pleura- oder Perikarderguss oder mit Satellitentumoren im ipsilateralen Lungenlappen des Primärtumors</li> </ul>
Regionäre Lymphknoten (N)	NX	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen vorhanden
	N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und / oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und in intrapulmonalen Lymphknoten
	N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und / oder ipsilateralen subcarinalen Lymphknoten
	N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen oder hilären Lymphknoten, in ipsi- oder kontralateralen Scalenus- oder supraclaviculären Lymphknoten
Fernmetastasen (M)	MX	Vorkommen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
	M0	keine Fernmetastasen nachweisbar
	M1	Fernmetastasen sind vorhanden

Die Einteilung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms erfolgt nicht nach der TNM-Klassifikation, sondern nach einem System, das von der *Veterans Administration Lung Group* entwickelt wurde. Dieses System unterteilt das Bronchialkarzinom in *very limited disease* (auf eine Thoraxhälfte begrenzt),

*limited disease* (auf den Thorax begrenzt) und *extensive disease* (jede Erkrankung, die nicht mehr nur auf den Thorax begrenzt ist) (Simon, Wagner, & American College of Chest, 2003).

## 1.2 Das kleinzellige Bronchialkarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie und Therapie

Die kleinzelligen Bronchialkarzinome machen etwa 13% der Lungentumore aus (Zhang et al., 2014), gelten als besonders aggressiv und haben aufgrund ihrer frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung eine wesentlich schlechtere Prognose (Byers et al., 2015, Pillai et al., 2014). Die mediane Überlebenszeit beträgt unbehandelt lediglich 2-4 Monate (Simon et al., 2003) bzw. behandelt 9-12 Monate (Bülzebruck, 1998, Wolf, 1998). Die 5-Jahres-Überlebensrate ist mit 3-8% die niedrigste unter allen Lungentumoren (Bülzebruck, 1998). Der SCLC geht aus Epithelzellen mit neuroektodermalen Ursprung hervor (Onganer et al., 2005). Meistens bildet sich der Tumor zentral in der Lunge und umgibt die Hauptbronchien.

Eine häufige Begleiterscheinung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist ein paraneoplastisches Syndrom (Cooper & Spiro, 2006).

Die Therapie unterscheidet sich je nach Stadium der Erkrankung. Befindet sich der Patient im Stadium der *limited disease*, ist in seltenen Fällen eine operative Entfernung des Primärtumors möglich. Es folgt eine Chemotherapie um eventuell vorhandene Mikrometastasen zu therapieren. Auch hier ist eine Bestrahlung des Thorax indiziert, wenn der Tumor nicht vollständig entfernt werden konnte.

Ist der Tumor bereits größer, ist die Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Chemotherapie die wirkungsvollste. Ein Überlebensvorteil zeigt sich, wenn die Bestrahlung des Tumors und des Mediastinums parallel zur Chemotherapie stattfindet (Payne, Murray, & Warde, 1994), (Fried et al., 2004), (Stuschke & Pottgen, 2004). Erfolgt die Bestrahlung im Anschluss an die

Chemotherapie, so ergibt sich kein Therapievorteil, jedoch sind die Nebenwirkungen geringer (Souhami et al., 1984, Osterlind et al., 1986, Gregor et al., 1997).

Da sich häufig Metastasen im Gehirn bilden, gehört die prophylaktische Bestrahlung des Schädels nach der Therapie des Thorax heute zu der Standardtherapie (Zhang et al., 2014).

In 60-70% der Fälle befinden sich die Patienten bei der Diagnosestellung bereits im Stadium des extensive *small cell lung cancer*, d. h. dass es bereits zu Metastasen außerhalb des Brustkorbes und den angrenzenden Lymphknoten gekommen ist. Zu diesem Zeitpunkt ist eine operative Entfernung des Primärtumors nicht mehr möglich und die Therapie ist rein palliativ. Eine systemische Therapie ist kaum angezeigt. Aufgrund der hohen Proliferationsrate ist das Bronchialkarzinom sensibel gegenüber Chemotherapeutika. Eine Kombination aus Cisplatin und Etoposid verabreicht in 4-6 Zyklen stellt die Standardtherapie dar (Christodoulou & Skarlos, 2005). Zunächst lässt sich der Tumor so deutlich verkleinern, verschwindet in manchen Fällen sogar komplett. Eine dauerhaft vollständige Heilung ist aber sehr selten, da es in den meisten Fällen zu einem Rezidiv kommt, welches nicht mehr sensibel gegenüber einer Chemotherapie ist (Hurwitza *et al.*, 2009).

Eine Bestrahlung des Schädels um Hirnmetastasen vorzubeugen oder diese möglichst früh zu therapieren, ist auch im fortgeschrittenen Stadium angezeigt (Christodoulou & Skarlos, 2005).

### **1.2.2 Metastasen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms**

Die meisten Patienten sterben nicht an dem Primärtumor, sondern an den Metastasen. Als primäres Metastasierungsorgan des kleinzelligen Bronchialkarzinoms gilt das Gehirn, aber auch Knochenmetastasen, Metastasen in Leber und in der Nebennierenrinde kommen häufig vor (Valastyan & Weinberg, 2011, Hanahan & Weinberg, 2011).

Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse zu untersuchen, wie sich unterschiedliche, in der Klinik angewandte Therapien auf die Metastasierung auswirken. Camphausen et al. (2001) zeigten im Mausmodell, dass eine operative Entfernung oder die Bestrahlung des Primärtumors einen Anstieg der Metastasen zur Folge hat. Da mittlerweile fast jeder Tumorpatient bestrahlt wird, stellen diese Ergebnisse die klinische Vorgehensweise infrage und bedürfen einer Kontrolle durch weitere Untersuchungen.

### 1.3 Maus-Tumormodell

Mäuse sind die in der medizinischen Krebsforschung am häufigsten verwendeten Säugetiere (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (Internetquelle Nr. 4)). Sie sind gut handelbar und in größeren Mengen gut und relativ kostengünstig zu halten. Da Mäuse ein Immunsystem besitzen, das dem menschlichen ähnelt werden immunsupprimierte Tiere verwendet, um ein Abstoßen der organismusfremden Zellen durch das mauseigene Immunsystem zu verhindern. Betrachtet man all diese Argumente, sind Mausmodelle noch immer die favorisierte Methode, um möglichst kliniknahe Forschung zu betreiben. Natürlich sollten Tierversuche gemäß der drei R's „reduction, refinement, replacement“ (Reduktion, Verfeinerung und Ersatz) auf ein Minimum reduziert werden und lediglich angewendet werden, wenn die *in vitro* Forschung nicht ausreicht. Da es aber gerade in der Krebsforschung wichtig ist, die Entwicklung auf den gesamten Organismus zu betrachten und nicht nur auf einzelne Organe, sind in diesem Bereich Mausmodelle häufig unersetzlich. Für unsere Untersuchungen wurden SCID (Severe Combined Immunodeficiency) Mäuse verwendet, genauer CB17/Icr-Prkdc<sup>SCID</sup>/IcrIcoCrl Mice. Diese tragen eine autosomal rezessive Mutation auf dem Chromosom 16 (Prkdc<sup>SCID</sup>), welche ein Fehlen der B- und T- Lymphozyten zur Folge hat. Entdeckt wurde diese Mutation erstmals 1980 von Dr. M. J. Bosma in BALB/c-Igh<sup>b</sup> Mäusen (C.B.-17/Icr) (Bosma & Carroll, 1991), (Charles River (Internetquelle Nr. 5)).

Die Immundefizienz der SCID Mäuse manifestiert sich in mehreren Charakteristika, unter anderem in einer Leukopenie, Agammaglobulinämie und einer hohen Anfälligkeit für Infektionen. 2-10% der Jungtiere sind ‚Leaky‘, d.h. sie entwickeln ein paar wenige funktionsfähige Klone der B- und T- Zellen, die wiederum Serum IgM und IgG produzieren (weniger als 1% der nicht supprimierten Tiere) (Bosma & Carroll, 1991), (Internetquelle Nr. 5).

Andere, nicht lymphoide Blutzellen, sind weder in ihrer Anzahl noch in ihrer Funktion verändert. Die SCID Mäuse haben Lymphknoten und einen sehr kleinen Thymus. Sie sind Thy-1 Zellen defizient, was dazu führt, dass keine Antikörper gegen übliche Antigene gebildet werden. Die lymphatischen Milzzellen proliferieren nicht als Reaktion auf B- und T-Zell spezifischen Mitogene. 15% der Tiere entwickeln spontane Lymphome (Bosma & Carroll, 1991), (Internetquelle Nr. 5).

Aus den oben genannten Gründen müssen die Mäuse unter ganz speziellen Bedingungen gehalten werden, um Infektionen auszuschließen. Gleichzeitig bedingt diese Immundefizienz eine Toleranz gegenüber fremden Zellen und Geweben, sodass sie sich sehr gut für die Tumor- und Transplantationsforschung eignen. Bei diesem Projekt handelt es sich um ein Xenograft-Mausmodell, da humane Tumorzellen in den Maus-Organismus injiziert wurden.

Die Verwendung humaner Tumorzellen ist ein weiterer Aspekt möglichst kliniknah zu forschen. Es gibt viele Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Weil OH-1 und H69 Zellen besonders gut metastasieren (Sodeur, Ullrich, Gustke, Zangemeister-Wittke, & Schumacher, 2009), wurden diese beiden Zelllinien verwendet.

Weitere Eigenschaften der OH-1 und H69 Zellen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tab. 3: Eigenschaften der verwendeten Zelllinien OH-1 und H69.**  
Nach Nagel (2008).

OH-1	■ gewonnen aus einem weißen, männlichen Patienten, 43 Jahre alt, vorher therapiert	(Gazdar et al., 1980)
	■ aus dem Pleuraerguss	(Gazdar et al., 1980)
	■ Zellen sind aneuploid	(Gazdar et al., 1980)
	■ Zellen weisen eine hohe L-Dopa Decarboxylase Aktivität auf	(Carney et al., 1985)
	■ nichtadhärentes Wachstum	(Griffin & Baylin, 1985) (Gazdar, Carney, & Minna, 1981) (Rein, Schultz, Bader, & Bassin, 1982)
	■ geringe c-myc-Genexpression	(Gazdar, Carney, Nau, & Minna, 1985)
	■ keine vermehrte c-myc-DNA	(Little, Nau, Carney, Gazdar, & Minna, 1983) (Nau et al., 1985)
	■ kein phänotypischer Effekt durch v-Ha-ras-Expression	(Mabry et al., 1988)
	■ Enzymmarker L-Dopa Decarboxylase	(Luk, Goodwin, Marton, & Baylin, 1981)
	■ erhöhte L-Dopa Decarboxylase Spiegel	(Gazdar et al., 1980)
	■ Difluoromethylornithin inhibiert Zellwachstum	(Luk et al., 1981)
	■ reduzierte Expression von Lamin A und C	(Kaufmann, Mabry, Jasti, & Shaper, 1991)
	■ weist lediglich einen Adhäsionsrezeptor für Thrombospondin-1 auf	(Guo et al., 2000)

---

H69	■ gewonnen aus einem weißen, männlichen Patienten, 56 Jahre, vorher therapiert	(Gazdar et al., 1980)
	■ aus dem Pleuraerguss	(Gazdar et al., 1980)
	■ Zellen wachsen als Aggregate	ATCC
	■ Zellen sind aneuploid	(Gazdar et al., 1980)
	■ Zellen exprimieren epitheliales Glykoprotein 2	(Jojovic, Adam, Zangemeister-Wittke, & Schumacher, 1998)
	■ Zellen exprimieren alpha 7 nicotiner-gen Acetylcholin- Rezeptor	(Plummer, Dhar, & Schuller, 2005)
	■ hohe Bcl-2 – Expression	(Zangemeister-Wittke, Schenker, Luedke, & Stahel, 1998)
	■ erhöhte Expression von c-myc, raf, ras	(Gazdar & Minna, 1996)
	■ erhöhte Expression von Recoverin in Anwesenheit von Butyrat	(Bazhin et al., 2004)

---

In dieser Arbeit wurden humane Tumorzellen in immundefiziente Mäuse injiziert. Nach Anwachsen eines Primärtumors kommt es zu spontaner Metastasierung im Tier. Diese wurden im Rahmen des Projekts näher untersucht.

#### 1.4 Fragestellungen

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte die Fragestellung bearbeitet werden, welchen Einfluss die Bestrahlung, die Chemotherapie und die Kombinationstherapie aus diesen beiden, auf die Metastasierung des SCLCs hat. Verringert sich die Anzahl der CTCs und DTCs nach einer lokalen Bestrahlung des Primärtumors? Oder erhöht sie sich? Wie wirkt sich die Chemotherapie auf die Anzahl der Metastasen aus? Kann durch eine Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Chemotherapie ein besseres Ergebnis erzielt werden? Welche Therapieform eignet sich am besten, um sowohl den Primärtumor unter Kontrolle zu halten bzw. zu zerstören, als auch die Anzahl der Metastasen zu

minimieren? Das Interesse und die große Relevanz all diese Fragen zu beantworten waren Anlass die Versuche durchzuführen und die Anzahl der CTCs und DTCs in verschiedenen Geweben mittels Alu-PCR quantitativ zu ermitteln. Gleichzeitig erhoffe ich mir die Hypothese, dass die Bestrahlung des Primärtumors zu einem Anstieg der Metastasen führt, durch meine Untersuchungen widerlegen zu können.

Ein weiteres Anliegen in dieser Arbeit war es, auf histologischer Ebene zu untersuchen, wie sich die Bestrahlung auf den Primärtumor auswirkt. Wie ist das morphologische Bild? Welche Zellen überwiegen? Wie wirkt sich die Bestrahlung auf die Ausbildung neuer Gefäße und die Proliferation der Zellen in den Tumoren aus? Wird durch die Bestrahlung eine Entzündungsreaktion ausgelöst? Welche Entzündungszellen findet man vermehrt in Tumoren, die bestrahlt wurden? Reagiert jeder Tumor gleichermaßen auf die Bestrahlung? Dafür wurden verschiedene immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt und ausgewertet.



## 2 Tiere, Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

100 E/ml Penicillin	Gibco, Waltham, USA
100 µg/ ml Streptomycin	Gibco, Waltham, USA
ABC-AP	Vector Labs, Burlingame, USA
Antikörper-Diluent	Medac, Wedel, Deutschland
Dulbecco's PBS (DPBS, ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub> )	Gibco, Detroit, USA
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eukitt	Kindler, Freiburg, Deutschland
Ethanol <i>pro Analysis</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Fötales Kälberserum</i>	Gibco, Detroit, USA
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Matrigel	BD biosciences, San Jose, USA
Methylenbutan	Sigma, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (Lösung)	Braun, Melsingen, Deutschland
O.C.T. Medium	Sakuran Tissue-Tek, Staufen, Deutschland
Paraffin	McCormick, St. Louis, USA
Permanent Red	Dako, Hamburg, Deutschland
Propanol	Theodor Geyer, Berlin, Deutschland
RPMI-1640 Medium (+ L-Glutamin)	Gibco, Waltham, USA
Salzsäure (HCl) 2N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schiffs Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland

Succrose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trizma Base	Sigma, München, Deutschland
Trizol	Qiagen, Hilden, Deutschland
Xylol	DiaTec, Hallstadt, Deutschland

### 2.1.2 Lösungen und Puffer

Formalin 4%	5 Teile 0,2 M Phosphatpuffer, 4Teile aqua dest. und 1 Teil Formaldehyd 37%
Lektinpuffer	30,29 g Trizma Base, 43,54 g NaCl, 100ml HCl 2N, 1,016 g MgCl <sub>2</sub> und 0,555 g CaCl <sub>2</sub> ad 5l aqua dest., pH 7,6
Paraformaldehyd	4g Paraformaldehyd, 30ml aqua dest., 50ml 0,2 M Phosphatpuffer, 1 N NaOH ad 100ml aqua dest.
0,2 M Phosphatpuffer	28,42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O und 2,76 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O ad 1l aqua dest., pH 7,2-7,4
<i>Tris Buffered Saline (TBS)</i>	30,29 g Trizma Base, 43,54 g NaCl und 100ml HCl 2N ad 5l aqua dest., pH 7,6
<i>Tris Buffered Saline (TBS) + Tween 20</i>	30,29 g Trizma Base, 43,54 g NaCl und 100ml HCl 2N ad 5l aqua dest., pH 7,6 + 1ml Tween 20
Zell-Kulturmedium	10% <i>Fötales Kälberserum</i> und 1% Penicillin/Streptomycin in 500ml RPMI-1640

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen (1ml)	Nunc, Schwerte, Deutschland
Eppendorfröhrchen (0,5ml, 1,5ml, 2ml, 5ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einbettungskassetten	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Einmalpipetten (2ml, 5ml, 10ml,	Falcon, Lincoln Park, USA

25ml)	
7ml Röhrchen	Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland
30ml Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
50ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Kanülen	BD biosciences, San Jose, USA
Küvetten	Sakura Tissue-Tek, Staufen, Deutschland
Objektträger und Histobond	Marienfeld, Lauda- Königshofen, Deutschland
Pinzette	Aeskulap, Tuttlingen, Deutschland
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl, 5000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schere	Aeskulap, Tuttlingen, Deutschland
Skalpell	Bayha, Tuttlingen, Deutschland
Spritzen (2ml)	Braun, Melsingen, Deutschland
Wägeschalen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
96-Well Platten (Alu-PCR)	Roche, Rotkreuz, Schweiz
96-Well Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

#### 2.1.4 Kits

Alu-PCR Kit	Roche, Rotkreuz, Schweiz
K5005 Kit	Dako, Hamburg, Deutschland
QIAamp Blood MiniKit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QiAamp Minikit	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 2.1.5 Medikamente

Cisplatin	Accord, North Harrow, UK
Ketamin	WDT, Garbsen, Deutschland
Rompun	WDT, Garbsen, Deutschland

### 2.1.6 Lektine, Antikörper und Kontrollen von Antikörpern

CD 11b, monoklonal, Kaninchen anti human/Maus	abcam, ab 133357, Cambridge, UK
CD45, monoklonal, Ratte anti Maus	BD biosciences, San Jose, USA
Ki67, monoklonal	Dako, M7240, MIB-1, Hamburg, Deutschland
Ziege anti Maus, polyklonal	Dako, E0433, Hamburg, Deutschland
Lektin BSA-1	Sigma, L3759, München, Deutschland
Maus IgG1	Dako, X0931, Hamburg, Deutschland
NCAM, monoklonal, Maus anti human	Leica, NCL-CD56-1B6, Wetzler, Deutschland
Schwein anti Kaninchen	Dako, E0353, Hamburg, Deutschland
Kaninchen neg. Kontrolle	Dako, X0903, Hamburg, Deutschland
Ratte IgG2b	Biolegend, RTK4530, San Diego, USA
Kaninchen anti Ratte	Jackson immuno research, 312-065-048, West Grove, USA
Kaninchen mono IgG, monoklonal	Abcam, ab 125938, Cambridge, UK
S1P1, polyklonal, Kaninchen anti human	Santa Cruz, sc 25489, Texas, USA

### 2.1.7 Geräte

Absaugpumpe	Ditabis HLC, Pforzheim, Deutschland
Analysenwaage ALS 120-4	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
Bestrahlungsröhre	Rich. Seifert & Co. GmbH & Co. KG, Ahrensburg, Deutschland
Einbettautomat	Leica, Wetzler, Deutschland
Finnpipetten (0,5-10µl, 5-40µl, 40-200µl, 200-1000µl)	Thermo, Waltham, USA
HE Automat	Thermo, Waltham, USA
Heracell Wärmeschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laborfuge A	Heraeus, Hanau, Deutschland
Light Cycler 480	Roche, Rotkreuz, Schweiz
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Olympus BX50	Olympus, Tokio, Japan
Mikrotom	Thermo, Waltham, USA
Mirax Midi	Zeiss, Jena, Deutschland
NanoDrop	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten Reasearch Plus (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Steamer	Noratel, Grafenau, Deutschland
Sterilwerkbank SterilGARD	The Baker Company, Sanford, USA
Thermoblock	Ditabis HLC, Pforzheim, Deutschland
Tissue Lyser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Universal 32R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Wärmeplatte	Medax, Neumünster, Deutschland
Wasserbad	Medax, Neumünster, Deutschland

### 2.1.8 Oligonukleotide

Alu Primer forward TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Alu Primer reverse GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Humane kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien OH-1 und H69

#### 2.2.1.1 Zelllinien

Für die Analysen wurden die humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien OH-1 und H69 verwendet, die uns von Herrn Prof. Dr. Uwe Zangenmeister-Wittke (Universität Bern, Institut für Pharmakologie) in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt wurden. Bei diesen Zellen handelte es sich um Suspensionszelllinien.

#### 2.2.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden in T 75 oder T 175 Flaschen in RPMI Medium (RPMI 1640 von Gibco + 10% FKS + Penicillin- Streptomycin 1%) kultiviert und bei 37 ° C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% inkubiert. Einmal in der Woche wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde die gesamte Zellsuspension in ein 30 ml Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde in jeweils eine neue T75 Flasche mit 15 ml Medium überführt. Um die Zellen zu expandieren wurden jeweils 5 ml der Zellsus-

pension in eine neue T175 Flasche überführt und diese mit 25 ml Medium aufgefüllt.

### **2.2.1.3 Mykoplasmentest**

Die Zelllinien wurden zunächst durch DNA-Präparation mit dem QIAamp Blood MiniKit (QIAGEN Nr. 51106) und PCR auf Mykoplasmen getestet. Mykoplasmen-positive Tumorzellen weisen veränderte Wachstumseigenschaften auf und können somit Versuche beeinflussen, sodass mykoplasmen-positive Chargen verworfen wurden.

### **2.2.1.4 Zellzahlbestimmung**

Die Bronchialkarzinomzelllinien OH-1 und H69 wurden mit einer definierten Zellzahl (1.000.000 Zellen / 200µl RPMI Medium) subkutan in die rechte Flanke der Versuchstiere injiziert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension in ein 30 ml Röhrchen überführt und dieses 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml RPMI Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 4 ml zusatzfreiem Medium resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde eine 1:10 Verdünnung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) angesetzt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit der Neubauer- Zählkammer.

### **2.2.1.5 Injektion der Tumorzellen OH-1 und H69**

Für die Injektion der Tumorzellen wurden die Versuchstiere mit einem CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Gemisch narkotisiert. Hierfür wurde jedes Tier einzeln in eine luftdichte Box gesetzt, in die das Gasgemisch einströmte. Um die Maus möglichst schnell zu narkotisieren, wurde ein Mischverhältnis von 80% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> gewählt.

Es wurden jeweils 10<sup>6</sup> Zellen subkutan in die rechte Flanke der Mäuse injiziert. Das verabreichte Volumen pro Tier betrug 200 µl. Zur Optimierung des Anwachsens wurden die OH-1 Zellen mit Matrigel versehen, d.h. 10<sup>6</sup> Zellen wurden in 100 µl Medium und 100 µl Matrigel suspendiert. Um das Ausflo-

cken des Matrigels zu verhindern, wurden sowohl die Zellen als auch die Spritzen bis zur Injektion bei 4° C gelagert.

## **2.2.2 Maus Tumormodell**

### **2.2.2.1 Versuchstiere**

Für die Experimente wurden 154 immundefiziente SCID-Mäuse (CB17/Icr-Prkdc<sup>scid</sup>/IcrIcoCrl aus den Charles River Laboratories International Inc., 251 Ballardvale Street, Wilmington, MA 01887, USA) verwendet. Das Verhältnis zwischen Männchen und Weibchen war ausgeglichen, die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 8 und 12 Wochen alt.

### **2.2.2.2 Tierhaltung**

Die Tierversuche wurden unter der Nummer G14/13 von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freie- und Hansestadt Hamburg genehmigt.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Filter-Top-Käfigen (max. 5 Tiere pro Käfig) in der Tierhaltung, Campus Forschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen, d.h. bei 20° C ± 1° C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%, bei einem 12 Std zirkadianen Rhythmus gehalten.

Einmal wöchentlich wurden die Mäuse in einen frischen Käfig umgesetzt, das sterile Wasser und das Standard Einstreufutter, welches den Tieren ad libitum zur Verfügung stand, wurde täglich kontrolliert und ggf. aufgefüllt.

Zur Identifizierung der einzelnen Tiere innerhalb eines Käfigs wurden diese durch Picrinsäure an Kopf, Hals, Rumpf, Schwanz und linker Flanke markiert.

### **2.2.2.3 Tiervisiten**

Die Tiere, denen Tumorzellen injiziert wurden, wurden einmal wöchentlich visitiert. Bei der Visite wurden das Gewicht, das Verhalten, das Fell, die

Bewegungen, die Körperöffnungen und die Atmung der Tiere untersucht. Des Weiteren wurde der Primärtumor palpiert und seine Größe anhand eines Modells mit unterschiedlich großen (1 - 12 mm im Durchschnitt) Metallkugeln ähnlich dem Prader Orchidometer, bestimmt. In einer speziell für das Experiment entwickelten Datenbank (Frenzel et. al, 2014), wurden die körperlichen Konditionen der Tiere protokolliert. Eine Verschlechterung des Allgemeinbefindens wurde anhand eines Scoringsystems unmittelbar angezeigt (s. Anhang) und es konnte durch Substitution spezieller Zusatznahrung (LABGEL BANANA, ClearH<sub>2</sub>O) oder Euthanasie des Tieres eingegriffen werden.

### **2.2.3 Gruppeneinteilung**

#### **2.2.3.1 Humane kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie OH-1**

Die mit der Zelllinie OH-1 injizierten Mäuse wurden in 2 Untergruppen mit jeweils 25 Individuen und eine Untergruppe mit 29 Tieren eingeteilt. Es war zeitlich nicht möglich, mehr als 10 Tiere an einem Tag zu bestrahlen. Allen Tieren einer Untergruppe wurden die Tumorzellen an demselben Tag appliziert.

Nachdem ein palpierbarer Tumorknoten angewachsen war, wurden die 25 Mäuse in 5 Versuchsarme eingeteilt (5 x Anfangskontrolle (K), 5 x Radiotherapie (RT), 5 x Chemotherapie (ChT), 5 x Radio- und Chemotherapie (RChT) und 5 x Endkontrolle (E)). Die Tiere (m/w) mit unterschiedlich großem Tumor (nicht alle Tumore wuchsen gleich schnell) wurden in die oben genannten Gruppen verteilt.

#### **2.2.3.2 Humane kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie H69**

Die mit der Bronchialkarzinomzelllinie H69 injizierten Mäuse, wurden in 3 Untergruppen mit je 25 Tieren eingeteilt. Die Applikation der Zellen erfolgte innerhalb einer Untergruppe an demselben Tag. Nach Anwachsen eines lokalen Tumorknotens wurden die Tiere in die 5 Versuchsarme eingeteilt. Da die Tumorzellen nicht gleichmäßig anwuchsen, mussten bei den H69 Tieren

mehrere Kleingruppen (unterschiedlicher Größe) therapiert werden. Die größten Tumore wären sonst ulzeriert, bevor alle Tiere einer Untergruppe einen palpierbaren Tumor entwickelten.

#### **2.2.4 Therapie**

Die Therapie erfolgte in einem speziellen Strahlenschutzraum auf dem Gelände des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Die Tiere wurden aus der Tierhaltung im Campus Forschung in das Gebäude gebracht und dort in einen frischen Filter-Top Käfig gesetzt. Steriles Wasser und das Standardfutter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Auch der Tag-Nacht Rhythmus wurde eingehalten. Zusätzlich bekamen sie ein spezielles, hochkalorisches Futter (LABGEL BANANA, ClearH<sub>2</sub>O), um einen zu großen Gewichtsverlust bedingt durch die Belastung der Therapie zu vermeiden.

Ab Therapiestart (= Tag 1) wurden alle Tiere täglich visitiert und anhand des Gewichtes, der palperten Tumorgröße und des Allgemeinbefindens überwacht. Hatte ein Tier einen zu hohen Belastungsscore (>20, s. Anhang), wurde es aus dem Versuch genommen.

Im Folgenden werden die Kriterien der 5 Versuchsarme aufgelistet:

**K:** Die Tiere in dieser Gruppe bekamen keine Therapie und wurden einen Tag nachdem die Tiere aus RT, RChT, ChT die Therapie begannen (Tag 2) getötet. Die Anzahl der Metastasen wurden quantitativ durch ALU-PCR ermittelt.

**RT:** Um eine Bestrahlung durchzuführen, die möglichst nah an der Therapie des Menschen mit kleinzelligen Bronchialkarzinomen ist, wurden die Tiere mit einer speziell für Kleintiere adaptierten Röntgenröhre (200 kV, 20 mA, 1 Gy/ min) mit einer täglichen Dosis von 10 Gy bestrahlt. Diese Therapie erfolgte an 5 aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 1-5), sodass sich eine Gesamtdosis von 50 Gy ergab. Die Röntgenröhre und ihre Dosimetrie ist in einer Arbeit von Frenzel et al., (2014) näher beschrieben.

Zur Bestrahlung des Primärtumors wurde ein Kollimeter verwendet, das die Strahlung auf ein tumorumschließendes Feld begrenzte. In den meisten Fällen reichte ein 1 cm<sup>2</sup> großes Feld aus. Bei besonders großen Tumorknoten musste das Feld auf 2 x 1 cm oder 2 x 2 cm erweitert werden.

Die Tiere wurden für die Zeit der Therapie (je nach Größe des Bestrahlungsfeldes) in eine Inhalationsnarkose mit Isofluran gelegt. Die Mäuse wurden mit einem Pulsoximeter und über Kameras im Raum überwacht.

ChT: Die intraperitoneale Applikation des Chemotherapeutikums Cisplatin (6mg/kg) erfolgte in einer Inhalationsnarkose mit Isofluran an Tag 1 der Strahlenbehandlung.

RChT: In diesem Versuchsarm erfolgte die Cisplatinapplikation (6mg/kg) unmittelbar nach der ersten Bestrahlung.

E: Die 5 Mäuse in dieser Therapiegruppe erhielten keine Therapie.

Alle Tiere wurden an Tag 15 nach Therapiebeginn (Tag 1 = Tag des Therapiestarts) getötet, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

## **2.2.5 Probenanalyse**

### **2.2.5.1 Sektion, Probengewinnung und -aufarbeitung**

Wie bereits in Punkt 2.2.4. beschrieben, wurden alle Tiere an Tag 15 nach Therapiebeginn getötet. Ausnahmen bildeten die Mäuse aus der Anfangskontrollgruppe. Diese wurden bereits an Tag 2 getötet.

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Rompun (2%) / Ketamin (100 mg/ml) in Narkose gelegt. Anschließend wurde eine terminale intracardiale Blutentnahme durchgeführt und das gewonnene Blut in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen und über Nacht bei 4° C aufbewahrt. Nach Öffnung des Brustkorbes wurden der rechte und der linke Lungenflügel entnommen und getrennt voneinander gewogen. Der rechte Lungenlappen wurde 1 Stunde in 3,7% Formalin fixiert, anschließend in PBS Puffer überführt und bei 4° C über Nacht gelagert.

Der linke Lungenlappen wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Im weiteren Schritt wurde die Bauchhöhle geöffnet und die Leber entnommen. Diese wurde einmal im Ganzen gewogen, der größte Lappen wurde anschließend gedrittelt und jedes Drittel noch einmal einzeln gewogen. Ein Teil wurde in flüssigen Stickstoff überführt, die anderen beiden Leberlappen-teile wurden 1 Stunde in Formalin fixiert. Nach 60 Minuten wurde ein Teil der Leber für eine Stunde in 70%iges Propanol transferiert. Nach einer weiteren Stunde wurde das 70%ige Propanol durch 90%iges ausgetauscht. Darin verblieb die Probe über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Das in Formalin verbliebene Drittel lagerte über Nacht im Kühlraum.

Die linke hintere Gliedmaße wurde exartikuliert. Der Femur und die Tibia wurden präpariert und die Markhöhle mit 0,9 % NaCl gespült. Das Knochenmark wurde in einem Eppendorfröhrchen aufgefangen.

Zur Entnahme des Gehirns wurde das Cranium mit einer chirurgischen Schere von rostral über temporal nach okzipital gespalten. Das gesamte Hirn konnte so entnommen und sagittal halbiert werden. Beide Teile wurden einzeln gewogen. Die rechte Hemisphäre wurde in flüssigen Stickstoff überführt. Die linke Hemisphäre wurde über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  in 4%igem Formalin fixiert.

Im letzten Schritt wurde der Primärtumor in der rechten Flanke präpariert und gewogen. Der Knoten wurde geviertelt:  $\frac{3}{4}$  wurden in Formalin fixiert, wovon  $\frac{1}{4}$  nach einer Stunde in 70%iges und nach weiteren 60 Minuten in 90%iges Propanol überführt wurde,  $\frac{1}{4}$  kam nach 60 Minuten in Succrose (30%),  $\frac{1}{4}$  wurde über Nacht in Formalin fixiert. Das letzte Viertel wurde in ein mit Trizol gefülltes Röhrchen überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Proben wurden am darauf folgenden Tag in Paraffin eingebettet. Blut und Knochenmark wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und für die DNA-Isolierung verwendet (s. 2.2.5.2.)

### 2.2.5.2 DNA Extraktion

#### *Blut und Knochenmark*

Die DNA-Isolierung aus Blut und Knochenmark erfolgte mit dem QIAamp Blood MiniKit (QIAGEN Nr. 51106). Die Aufarbeitung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls. Das Blut und die Knochenmarks-Zellsuspension (PBS) wurden mit 200  $\mu$ l AL-Puffer und 20  $\mu$ l Protease K aufgefüllt. Nach guter Durchmischung wurde das Eppendorfröhrchen für 10 Minuten bei 56° C in den Thermoblock gestellt. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l 96%-100%iges Ethanol wurde das Eppendorfröhrchen erneut per vortex gemischt und kurz zentrifugiert. Die Probe (ca. 650  $\mu$ l) wurde nun auf eine Säule mit einem Sammelröhrchen (Spin Column) transferiert und dieses bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Anschließend wurden 500  $\mu$ l AW1 Puffer dazugegeben und erneut für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde das Eluat verworfen, die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt und 500  $\mu$ l AW2 Puffer hinzugegeben. Das Gemisch wurde bei 13.000 rpm für 4 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein Eppendorfröhrchen gesetzt. Zuletzt wurden 200  $\mu$ l vorgewärmter AE Puffer hinzugefügt. Nach Inkubation (5 min bei Raumtemperatur), wurden die Proben erneut für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und die DNA in AE Puffer eluiert.

#### *Gewebeprozessierung*

Die Extraktion der DNA aus Lunge, Leber und Gehirn erfolgte mit dem QiAamp Minikit (QIAGEN Nr. 51306) und wurde gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Das Gewebe wurde mit 150 ml TBS Puffer verdünnt. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte im Tissue Cycler.

Zu 100  $\mu$ l Lunge bzw. 40  $\mu$ l Leber und Gehirn verdünnt mit 60  $\mu$ l PBS wurden 180  $\mu$ l ATL Puffer und 20  $\mu$ l Protease zugegeben. Die Proben wurden

kurz durchmischt und zentrifugiert, bevor sie 1 Stunde bei 56° C im vorgeheizten Thermoblock inkubiert wurden. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer wurden die Proben weitere 10 Minuten bei 70° C inkubiert. Danach wurden 210 µl 96%-100% Ethanol hinzugegeben, die Proben erneut gemischt und zentrifugiert und dann auf eine Säule (Spin Column) pipettiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 8000 rpm für 1 Minute. Die Säulen wurden in neue Sammelgefäße gesetzt und nach Zugabe von 500 µl des ersten Waschpuffer 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und nach Zugabe von 500 µl des Waschpuffer 2 wurden die Proben 4 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden jetzt in 2 ml Eppendorfröhrchen gesetzt, 100 µl vorgewärmter AE Puffer dazu gegeben und dieses für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch erneutes Zentrifugieren bei 8000 rpm für 1 Minute wurde die DNA aus den Säulen gelöst.

#### **2.2.5.3 Einstellen der DNA Konzentration**

Für die Alu-PCR (2.2.5.4) wurde die DNA Konzentration der Gewebeproben auf 30 ng/µl eingestellt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die DNA Konzentration in den Blutproben betrug 10 ng/µl.

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet. Um die gewünschte Konzentration zu erreichen wurden die Proben mit AE Puffer verdünnt.

#### **2.2.5.4 Alu-PCR**

Die Quantifizierung der humanen DNA in den Proben wurde durch eine Alu-PCR ermöglicht. Für die Detektion der humanen DNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green verwendet, der unspezifisch in die dsDNA interkaliert. Der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 488 nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 522 nm. Im ersten Schritt der PCR wird die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge gespalten. Das Primerpaar kann nun spezifisch an die zu amplifizierende Sequenz binden, woraufhin die Elongation der Tochterstränge

erfolgt. Im Amplifikationsschritt wird die DNA in jedem Zyklus verdoppelt, was einen Anstieg der SYBR®Green Intensität zur Folge hat. Am Ende eines jeden Zyklus wird die Emission des SYBR®Green gemessen. Ab einer gewissen Intensität tritt die spezifische Fluoreszenz signifikant aus der Hintergrundfluoreszenz hervor. Dieser Punkt wird als Crossing point (cp-Wert) bezeichnet. Die cp-Werte der Proben werden mit den cp-Werten der Standardreihe verglichen und entsprechend eingeordnet, sodass auf die absolute humane Zellzahl in der Probe geschlossen werden kann.

Es wurde eine Standardreihe gemessen, deren Zellkonzentration bekannt ist. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe aus muriner DNA (Hintergrund (ohne Tumorzellen)) und den jeweiligen humanen Zelllinien (OH-1 oder H69) angefertigt. Dazu wurden 12,5 µl Zellen in 50 µl Background pipettiert und anschließend durchmischt. Aus dieser Lösung wurden 2 µl entnommen und in 18 µl Background suspendiert. Es wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe angefertigt ( $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$ ). Als Negativkontrolle diente 20 µl reiner Hintergrund ohne Tumorzellen.

Der Mastermix, der zu den Proben gegeben wurde, beinhaltete die Primer und das Light Cycler Mastermix mit dem SYBR®Green.

#### 2.2.5.5 Mastermix-Ansatz

- 0,2 µl Primer forward (100pmol/µl)
- 0,2 µl Primer reverse (100pmol/µl)
- 5 µl LCMM (Light Cycler Mastermix)
- 2,6 µl aqua dest.

Für die Quantifizierung der Alu-Sequenz wurde eine 96 Lochplatte verwendet. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Pro Napf hatten wir eine DNA Konzentration von 10 µg (Blut) bzw. 30 µg (Gewebe).

Die PCR wurde in einem Light Cycler 480 (Roche) durchgeführt.

**Tab. 4: Das Programm des Light Cycler 480 für die Alu-PCR**

		Temperatur	Zeit	°C/s	Anzahl der Zyklen
Präinkubation		95°C	00:05:00	4,4	1
Amplifikation	Denaturierung	95°C	00:00:10	4,4	40
	Annealing	67°C	00:00:10	2,2	
	Extension	72°C	00:00:10	4,4	
Schmelzkurve	Denaturierung	95°C	00:00:05		1
	Annealing	65°C	00:01:00		
	Schmelztemperatur	97°C	00:00:00		
Kühlung		40°C	00:00:30	2,2	1

### 2.2.5.6 Histologie und Immunhistochemie der Primärtumoren

Um einen Überblick über die Morphologie der unterschiedlich therapierten Tumore zu bekommen und für den spezifischen Nachweis von Antigenen im jeweiligen Primärtumor der verschiedenen Behandlungsgruppen wurden verschiedene Färbungen und immunhistochemische Markierungen durchgeführt. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Epitop des entsprechenden Antigens. Zur Detektion der Bindung wird ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet, der an den Antigen-Antikörper Komplex bindet. Als Negativkontrolle diente eine Isotypenkontrolle, die nicht an dem Antigen bindet.

**Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper/ Lektine**

Primärantikörper und Lektine	Markierte Zellen
BSA-I	Dendritische Zellen
CD11b	Makrophagen und natürliche Killerzellen
CD45	Leukozyten
Ki67	Sich teilende Zellen (S1 bis M-phase)
NCAM	Neuronales Zelladhäsionsmolekül auf OH-1 und H69 Zellen
S1P1-Rezeptor	Endothelzellen

### *Schnitte*

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an 4 µm dünnen Paraffinschnitten vorgenommen. Dafür wurde der Paraffinblock in ein Mikrotom eingespannt, die Schnittdicke eingestellt und soweit angeschnitten bis der gesamte Tumor im Querschnitt angeschnitten war. Dann wurden die Schnitte aufgefangen, auf einen Objektträger aufgebracht und getrocknet (37° C über Nacht im Brutschrank). Vor Beginn der Färbungen wurden die Schnitte 2 x 5 min in Xylol entparaffiniert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe je 2 x in Isopropanol (3 und 5 min), je 1 x in 96% Ethanol (5 min), 70% Ethanol (5 min) und 50% Ethanol (5 min), sowie 2 min in aqua dest. rehydriert. Dieser Vorgang fand automatisiert statt.

### *Klassische Histologie*

#### a) HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung erfolgte automatisiert in einem Färbautomaten der Firma Thermo. Die ersten Schritte waren identisch denen der Entparaffinierung. Die Schnitte verblieben dann 2 x 2 min in aqua dest., dann folgte die Färbung mit Hämalaun für 3 min, gefolgt von 2 min in aqua dest und 3 min in H<sub>2</sub>O, dann 3 min Färbung mit Eosin, 30

sek aqua dest., 15 sek 70% Ethanol, 2 x 30 sek 96% Ethanol, 2 x 5 min 100% Ethanol und 3 x 5 min Xylol.

b) Feulgen-Färbung

Mit der histochemischen Färbung nach Feulgen und Rosebeck wird die DNA in den Zellkernen sichtbar gemacht. Es handelt sich hierbei um eine direkte Farbreaktion, bei der die Desoxyribose mit fuchsin-schwefeliger Säure (Schiffs Reagenz) angefärbt wird, wodurch ein selektiver Nachweis der DNA möglich ist.

Nach der Entparaffinierung der Schnitte und kurzem (2 - 3 min) Spülen mit aqua dest., folgte die Hydrolyse der Ribose-Purin-Bindungen in der DNA zu Zucker- und Aldehydresten durch Salzsäure. Dazu wurden die Präparate 1 min in 4° C kalte, 1 molare HCL gestellt, dann für 4 min in auf 60° C erhitzte HCl ins Wasserbad und anschließend erneut in kalte Salzsäure. Nach kurzem Spülen mit aqua dest. folgte die Färbung mit dem Schiffs Reagenz. Die Schnitte wurden dazu 30 min in einem dunklen Raum in einer Küvette mit der Reagenz inkubiert und anschließend 3 x 2 min in SO<sub>2</sub> Wasser (200 ml H<sub>2</sub>O, 10 ml 10%ige Kalium oder Natrium-Bisulfit-Lösung und 10 ml 1 molare Salzsäure) getaucht. Es folgte das Wässern mit Leitungswasser für 5 min und ein kurzes Spülen mit aqua dest. Anschließend wurden die Schnitte entwässert (aufsteigende Alkoholreihe: 70% Ethanol, 96%, 2 x 100% Ethanol und 2 x Xylol jeweils 5 min) und mit Eukitt eingedeckelt.

### *Immunhistochemie*

a) S1P1-Rezeptor-Darstellung

Der S1P1-Rezeptor ist ein Protein, welches in den Endothelzellen lokalisiert ist. Für diese Färbung wurde das Kit K5005 verwendet.

Nach der Entparaffinierung der Schnitte wurden diese in vorgewärmten S1699-Puffer 20 min in einem auf 85° C erhitzten Wasserbad vorbe-

handelt. Anschließend wurden sie abgekühlt (30 - 40 min) und dann 20 min in TBS, 2 x 5 min in TBS-T und erneut 5 min in TBS gewaschen. Nach Zugabe des Primärantikörpers (S1P1- Rezeptor 1: 125 von Santa Cruz) bzw. der Isotypenkontrolle (Kaninchen neg. Kontrolle 1: 12000 von DAKO) folgte eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte in TBS-T und TBS (Isotypenkontrollen in einer separaten Küvette) für jeweils 5 min gewaschen, bevor der Sekundärantikörper (Flasche A) auf die Schnitte gegeben wurde und 15 min inkubiert. Wieder wurde in TBS-T und TBS gewaschen und anschließend Streptavidin Alkaline Phosphatase für 15 min auf die Schnitte pipettiert. Nach erneutem Waschen wurde das Chromogen Red hinzugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit H<sub>2</sub>O (5 min) und aqua dest. (1 - 2 min) gewaschen und die Kerne mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend wurde erneut mit H<sub>2</sub>O und aqua dest. gewaschen. Dann folgte die Entwässerung im Färbeautomaten, bei der die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (15 sek 70% Ethanol, 2 x 30 sek 96% Ethanol, 2 x 5 min in Isopropanol und weitere 3 x 5 min in Xylol) dehydriert wurden.

Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt und über Nacht unter einem Abzug getrocknet.

#### b) Ki67-Darstellung

Ki67 ist ein Protein, das im Inneren des Zellkerns lokalisiert ist. Ki67 wird als Marker für die Zellproliferation verwendet, da es nur in der S1 bis M-phase exprimiert wird (Gerdes et al., 1986)

Bei dieser Markierung erfolgte die Vorbehandlung in vorgewärmten S1699- Puffer (85° C) über Nacht in einem auf 85° C erhitzten Wasserbad. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach dem Abkühlen 2 x 5 min in TBS-T und 5 min in TBS gewaschen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur blockiert (Ziegen Serum 1:10 in TBS).

Nach Abkippen des Serums wurde der Primärantikörper (Ki67 Mib1 1:32 in AK Diluent (M7240, DAKO)) bzw. die Isotypenkontrolle (Maus IgG 1 1:91 in AK Diluent) auf die Schnitte pipettiert und 1 Std. inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in TBS-T und TBS gewaschen (die Isokontrollen in einer separaten Küvette) und anschließend der Sekundärantikörper (Ziege anti Maus 1:200 in TBS) pipettiert. Nach 30 min wurde gewaschen, dann folgte die Inkubation für 30 min in ABC-AP (Alkalische Phosphatase), bevor wieder gewaschen wurde. Anschließend wurde das Substrat-Chromogen-Gemisch Permanent Red auf die Schnitte pipettiert. Unter Sichtkontrolle inkubierte dieser ca. 12 min. Nach ausreichend starker Färbung wurde in H<sub>2</sub>O (5 min) und aqua dest. (1-2 min) gewaschen und mit Hämalaun gegengefärbt. Es folgte ein erneutes Waschen in H<sub>2</sub>O und aqua dest., bevor die Schnitte zum Entwässern (s. oben) in den Färbeautomaten gestellt und anschließend eingedeckelt wurden.

c) CD45-Darstellung

CD45 ist ein Pan-Leukozytenmarker.

Nachdem die Schnitte entparaffiniert wurden, folgte die Vorbehandlung in S1699 für 2 x 4 min in der Mikrowelle bei 750 W. Anschließend wurden die Schnitte 2 x 5 min in TBS-T und 5 min in TBS gewaschen. Dann wurde der Primärantikörper (CD 45, BD P., 550539, in der Verdünnung 1:25 mit Antikörperdiluent) bzw. die Isotypenkontrolle (Ratte IgG2b, in einer 1:400 Verdünnung in Antikörperdiluent) auf die Schnitte pipettiert und 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte erneut 2 x 5 min in TBS-T und 5 min in TBS gewaschen (die Isokontrollen separat), bevor der Sekundär-Antikörper (Kaninchen anti Ratte, 1:100 verdünnt in TBS) aufgebracht wurde. Hier betrug die Inkubationszeit 30 min. Nach erneutem Waschen wurde die alkalische Phosphatase auf die Schnitte pipettiert und ebenfalls 30 min inkubiert. Wieder wurden die Schnitte gewaschen, bevor

das unverdünnte Substrat-Chromogen-Gemisch (Permanent Red) auf die Schnitte pipettiert wurde. Nach 20 min wurde der Färbevorgang gestoppt und die Schnitte 5 min unter fließendes Leitungswasser gestellt, bevor sie 1 min in aqua dest. waren. Es folgte die Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun für 7 sek. Anschließend wurden die Schnitte erneut 5 min unter fließendes Leitungswasser und 1 weitere min. in aqua dest. gestellt. Es folgte die Entwässerung im Automaten und das Eindeckeln mit Eukitt.

d) CD11b-Darstellung

CD 11b ist ein Integrin, das auf der Zelloberfläche von Makrophagen und NK-Zellen vorkommt.

Die Schnitte wurden entparaffiniert und anschließend im Druckkochtopf bei 121° C 10 min vorbehandelt. Der Druckkochtopf war mit Citratpuffer mit einem pH von 6,0 gefüllt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 2 x in TBS-T und 1 x in TBS für jeweils 5 min gewaschen und anschließend der Primärantikörper (CD 11b, ab 133357, abcam, 1,143 mg/ml, 1:200 Verdünnung in Antikörper Diluent) bzw. die Isotypenkontrolle (Kaninchen mono IgG, ab 1259328, abcam, 1:36 Verdünnung in Antikörper Diluent) auf die Schnitte pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben 2 x 5 min in TBS-T und 5 min in TBS gewaschen (Isotypenkontrollen in einer separaten Küvette). Anschließend wurde auf alle Proben der Sekundärantikörper (Schwein anti Kaninchen, 1:200 in TBS verdünnt) pipettiert und 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS-T und TBS, folgte das Aufbringen des ABC-AP Komplexes. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur. Es folgte das Waschen 2 x 5 min in TBS-T und 5 min in TBS und das pipettieren des Permanent Red auf die Proben. Nach 20 min Inkubation wurden die Schnitte 3 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend 1 min in aqua dest. gestellt. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalaun (8 sek). Dann

wurden die Proben erneut unter fließendes Leitungswasser gestellt (5 min) und 1 min in aqua dest. Abschließend wurden die Schnitte im Automaten entwässert und mit Eukitt eingedeckelt.

e) Lektinfärbung

Das *Bandeiraea simplicifolia* lectin (BSA-I) ist ein Lektin, das an dendritische Zellen bindet.

Die entparaffinierten Schnitte wurden 5 min in Lektinpuffer bei Raumtemperatur und anschließend in eine Küvette, gefüllt mit 0,1% Trypsin in Lektinpuffer verdünnt, gestellt (das Lektin bindet an Calcium, deshalb wurde Lektinpuffer verwendet). Es folgte die zehnminütige Vorbehandlung in einem auf 37° C erhitztes Wasserbad. Dann erfolgte das Spülen mit Leitungswasser für 5 min und das dreimalige Tauchen der Schnitte in Lektinpuffer für je 5 min. Danach folgte die Inkubation des Lektin BSA-I (1:100 verdünnt in Lektinpuffer, 1 Std bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Proben 3 x 5 min mit TBS gespült, bevor das ABC-AP (Alkalische Phosphatase) auf die Schnitte aufgebracht wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde erneut 3 x 5 min gewaschen und anschließend die Farb-Entwicklungslösung (für 200 ml: 400 mg Natrium-Nitrit, 10 ml aqua dest., 400 µl Neufuchsin, 200 ml Trispuffer mit einem pH von 8,24, 30 mg Naphtol AS, 1000 µl Dimethylformamid, 260 µl Tween 20 und 80 mg Levamisol) auf die Proben pipettiert. Unter Sichtkontrolle wurde die Inkubation gestoppt und die Schnitte unter fließendes Leitungswasser gestellt, bevor sie 1 min in aqua dest. gestellt wurden. Danach wurde die Kerngegenfärbung mit Hämalaun für 5 sek durchgeführt, und die Schnitte wurden erneut mit Leitungswasser abgespült. Als letzter Schritt wurden die Schnitte im Automaten entwässert und anschließend mit Eukitt eingedeckelt.

f) Neural cell adhesion molecule (NCAM)-Darstellung

NCAM ist ein Glykoprotein aus der Gruppe der Immunglobulin-artigen Adhäsionsmoleküle. Diese immunhistochemische Markierung wurde an einem Zellpellet der OH-1 Zellen und an einem Primärtumor durchgeführt, um zu zeigen, dass die Zellen dieses Glykoprotein exprimieren. Anschließend wurde ein Lungenschnitt mit anti-NCAM gefärbt, um Metastasen zu zeigen und dadurch die Ergebnisse der Alu-PCR histologisch zu belegen.

Die Schnitte wurden entparaffiniert und anschließend in S1699 Puffer in der Mikrowelle vorbehandelt (2 x 4 min bei maximaler Leistung). Nach dem Abkühlen (30 - 60 min) wurden sie mit TBS-T und TBS gespült, bevor der Primärantikörper (NCAM 1:100 in AK- Diluent) bzw. die Isokontrolle (Maus IgG1 1:228 in AK-Diluent) auf die Präparate gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde mit TBS-T und TBS gespült und anschließend der Sekundärantikörper (Flasche A) aufgebracht. Es folgte eine 15-minütige Inkubation. Nach erneutem Spülen wurde Streptavidin-alkalische Phosphatase (Flasche B) auf die Schnitte pipettiert und 15 min inkubiert. Nach dem Spülen wurde das Substrat-Chromogen-Gemisch aufgebracht und 15 min inkubiert. Unter Sichtkontrolle wurde die Farbreaktion gestoppt und die Schnitte 5 min unter fließendes Leitungswasser und anschließend in aqua dest. gestellt. Dann folgte die Gegenfärbung mit Hämalun (2 sek). Nachdem die Präparate erneut 5 min unter Leitungswasser und 1 min in aqua dest. gestellt wurden, folgte die Entwässerung im Färbeautomaten und schließlich das Eindeckeln mit Eukitt.

### 2.2.6 Auswertung

Die statistische Auswertung der S1P1-Rezeptor und Feulgenfärbung erfolgte durch Zählen der Gefäße bzw. der apoptotischen Zellen (Sharma et al., 1997). Dazu wurde ein Okular mit Raster in das Mikroskop eingesetzt und jeweils 100 Zellen pro Gesichtsfeld gezählt. Insgesamt wurden 3 Gesichtsfelder pro

Schnitt ausgewertet. In die Auswertung der immunhistochemischen Markierungen flossen die Tumore der bestrahlten und der unbehandelten Tiere ein. Es wurden je 3 Schnitte pro Gruppe ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Balkendiagramm dargestellt und als Bilder gezeigt.

Die Ki67-Färbung wurde mit ImageJ und dem threshold colour (NIH Image Java) Programm ausgewertet. Dafür wurden 3 Schnitte pro Gruppe mit dem Mirax fotografiert. Mit Hilfe des threshold colour Programms wurde der Prozentsatz an proliferierenden Kernen ermittelt und graphisch als Balkendiagramm dargestellt.

Die Auswertung der CD45, CD11b und BSA-I Markierungen erfolgte durch Schätzen der angefärbten Zellen in Prozent (o =  $\leq 5\%$ , + =  $\leq 20\%$ , ++ =  $\leq 40\%$  und +++ =  $\geq 40\%$ ). Dabei wurden verschiedene Bereiche des Tumors untersucht und geschätzt. Unterschieden wurden: Tumorrand, nekrotisches Tumorgewebe, Bindegewebssepten, vitales Tumorgewebe und entsprechende phagozytierende Entzündungszellen. Die Ergebnisse sind als Tortendiagramme dargestellt und zusätzlich werden Bilder der Färbungen gezeigt.

Die Ergebnisse der Alu-PCR wurden mit dem Programm GraphPad Prism als Boxplot dargestellt und mit dem Mann-Whitney-U-Test auf ihre Signifikanz geprüft.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Tierverluste

Mit Hilfe der speziell für das Experiment entwickelten Datenbank (s. Material und Methoden) konnte das Befinden der Versuchstiere im System dokumentiert und überwacht werden. Eine Verschlechterung des Allgemeinbefindens wurde sofort aufgrund eines einprogrammierten Algorithmus angezeigt. Eine Verschlechterung konnte entweder auf die Belastung durch die Therapie zurückgeführt werden, auf einen rapiden Anstieg des Tumorwachstums in der Endkontrollgruppe oder aber auf ein mauseigenes Lymphom. Dadurch kam es vor, während und nach der Therapie zu Tierverlusten. Mit einem Belastungsscore von 20 (s. Anhang) war das Abbruchkriterium erreicht; die betroffenen Tiere wurden entsprechend aus dem Versuch genommen und getötet. Trotz genauer Observation und Dokumentation des Körpergewichts, des Tierverhaltens und des Fells, der Körperöffnungen, der Atmung, der Bewegung und der Tumorgröße kam es zu spontanen Tierverlusten ohne Indikation einer Verschlechterung.

In Tab. 6 ist die Anzahl der Tiere aufgelistet, die das Experiment regulär beendet haben und die bereits vorher verstorben sind. Die Mäuse wurden in Männchen und Weibchen unterteilt und den entsprechenden Behandlungsgruppen zugeordnet (K: Anfangskontrollgruppe, RT: Bestrahlung, RChT: Radiochemotherapie, ChT: Chemotherapie und E: Endkontrolle).

Des Weiteren sind die palperten Tumorgewichte zu Therapiebeginn und die gemessenen Tumorgewichte bei der Sektion in Abb. 1 dargestellt. Das Tumolvolumen und das Tumorgewicht ist eins zu eins (Dichte = 1), sodass man die Werte miteinander vergleichen kann. Das größte Tumolvolumen bei der Sektion hatten die Tiere aus der Endkontrollgruppe, obwohl sie zu Therapiebeginn nach Palpation kleiner waren als die der Therapiegruppen (K, RT, RChT, ChT).

### 3.1.1 OH-1 Gruppe

Von den insgesamt 79 Mäusen, denen OH-1 Zellen injiziert wurden, verblieben 69 Tiere wie geplant bis zum Ende in dem Versuch. 10 Mäuse verstarben vorher (36 von 43 Männchen und 33 von 36 Weibchen). Die meisten Tierverluste wurden in der Kombinationstherapiegruppe verzeichnet, in der die Tiere mit einer Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie behandelt wurden. In diesem Versuchsarm starben drei Tiere ohne bekannten Grund und vier Tiere mussten aufgrund eines verschlechterten Allgemeinbefindens vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. In der Bestrahlungsgruppe waren zwei Tierverluste zu verzeichnen. Ein Tier verstarb ebenfalls ohne makroskopisch erkennbaren Grund, das andere Tier musste aus dem Versuch genommen werden, weil der Belastungsscore erreicht war. In der mit Cisplatin behandelten Gruppe gab es ein Tier mit ulceriertem Tumor. Zwei Mäuse verstarben bereits vor Therapiebeginn.

### 3.1.2 H69 Gruppe

75 Mäusen wurden Zellen der H69-Zelllinie injiziert, davon beendeten 57 Tiere den Versuch lebend (27 von 40 Männchen und 30 von 35 Weibchen), die anderen verstarben vorher aus unterschiedlichen Gründen.

Die meisten Tierverluste wurden in der Bestrahlungsgruppe verzeichnet. Sechs Mäuse aus dieser Gruppe verstarben spontan, drei Tiere mussten aufgrund eines verschlechterten Allgemeinbefindens vorzeitig getötet werden. Weitere sechs Mäuse aus der Kombinationsgruppe verstarben spontan, ein Tier musste getötet werden. Eine Maus aus der Chemotherapiegruppe verstarb ohne bekannten Grund und ein Tier der Endkontrollgruppe musste vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

**Tab. 6a: Übersicht über die Tierzahlen (OH-1).**

Die Anzahl der Tiere zu Beginn des Experiments ist unter dem Punkt ‚Beginn‘ aufgeführt. Im Vergleich dazu werden die Tiere, die den Versuch regulär beendet haben, in der Zeile ‚Ende‘ aufgelistet. Die Anzahl der Tierverluste ist unter ‚Verlust‘ verzeichnet. (OH-1 Gruppe) M+W= Männlich und Weiblich, K= Anfangskontrolle, RT= Bestrahlungsgruppe, RChT= Kombinationsgruppe (Bestrahlung und Chemotherapie), ChT= Chemotherapiegruppe, E= Endkontrollgruppe

Geschlecht		K	RT	RCHT	CHT	E	Summe
Männlich	Beginn	8	6	11	8	10	43
	Ende	8	4	7	8	10	37
	Verlust	0	2	4	0	0	6
Weiblich	Beginn	5	9	8	7	7	36
	Ende	5	9	5	6	7	32
	Verlust	0	0	3	1	0	4
M+W	Regulär beendet	13	13	12	14	17	69
	Verlust	0	2	7	1	0	10

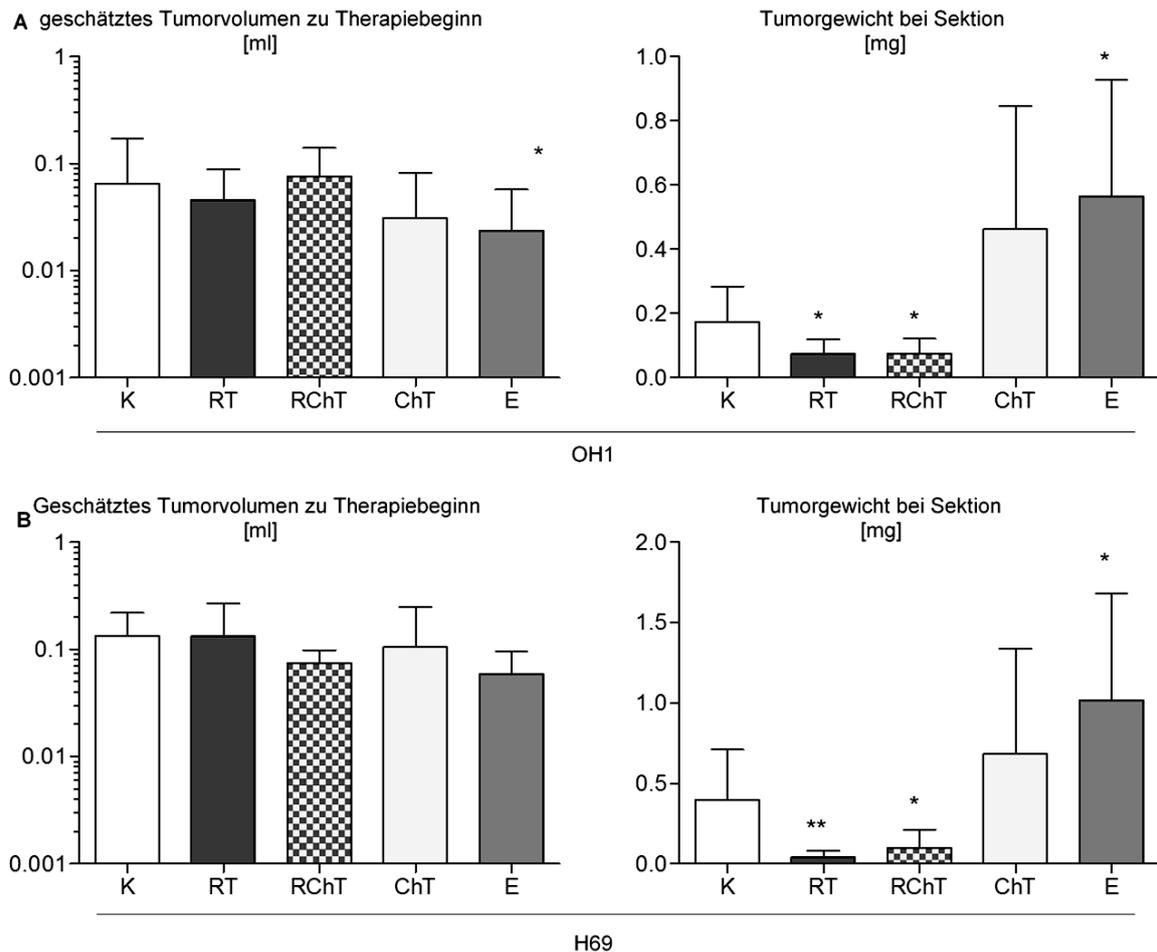
**Tab. 6b: Übersicht über die Tierzahlen (H69).**

Die Anzahl der Tiere zu Beginn des Experiments ist unter dem Punkt ‚Beginn‘ aufgeführt. Im Vergleich dazu werden die Tiere, die den Versuch regulär beendet haben, in der Zeile ‚Ende‘ aufgelistet. Die Anzahl der Tierverluste ist unter ‚Verlust‘ verzeichnet. (H69-Gruppe) M+W= Männlich und Weiblich, K= Anfangskontrolle, RT= Bestrahlungsgruppe, RChT= Kombinationsgruppe (Bestrahlung und Chemotherapie), ChT= Chemotherapiegruppe, E= Endkontrollgruppe

Geschlecht		K	RT	RChT	ChT	E	Summe
Männlich	Beginn	4	11	10	7	8	40
	Ende	4	3	7	6	7	27
	Verlust	0	8	3	1	1	13
Weiblich	Beginn	6	5	7	8	9	35
	Ende	6	4	3	8	9	30
	Verlust	0	1	4	0	0	5
M+W	Regulär beendet	10	7	10	14	16	57
	Verlust	0	9	7	1	1	18

### 3.2 Tumorgröße

Das Volumen des Tumors wurde bei den Tiervisiten durch Palpation zunächst geschätzt (ml) und am Tag der Sektion wurde das Gewicht durch Wiegen bestimmt (mg). Die ermittelten Daten sind als Boxplots in Abb. 1 dargestellt. Die Daten lassen darauf schließen, dass die Tumorgröße durch die Bestrahlung und die Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie signifikant abnahm, während sich die Chemotherapie allein nicht auf die Größe des Tumors auswirkte.



**Abb. 1** Darstellung der palperten Tumorumfangen zu Therapiebeginn und der gemessenen Tumorgewichte bei der Sektion für die OH-1 (A) und die H69 (B) Gruppe.

In beiden Gruppen konnte gezeigt werden, dass die Tumore der Tiere, die bestrahlt wurden (RT) oder eine Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie (RChT) bekamen, signifikant an Größe durch die Therapie verloren, während die Tumore der mit Cisplatin behandelten (ChT) und der unbehandelten Tiere (E) über die Zeit weiter wuchsen. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  zeigt die Signifikanz in Bezug auf die Anfangskontrolle (K).

### 3.3 Alu-PCR

Zur Bestimmung der absoluten Anzahl humaner Zellen in der Maus, wurde eine Alu-PCR auf humane Gensequenzen durchgeführt. Der Einfluss der unterschiedlichen Therapien auf zirkulierende Tumorzellen im Blut (circulating tumor cells, CTC) und disseminierte Tumorzellen (disseminated tumor

cells, DTC) in verschiedenen Geweben (Knochenmark, Lunge, Leber und Gehirn) konnte mit dieser Methode quantitativ beschrieben werden.

### **3.3.1 Blut**

Die Auswertung der Alu-PCR aus den Blutproben zeigt, dass die Endkontrollgruppe (E) die meisten CTCs aufweist (OH-1: 316 und H69: 1087). Die Anzahl zirkulierender Tumorzellen nimmt zu, je länger die Tiere unbehandelt bleiben. Im Vergleich zu der Anfangskontrolle (K) weisen die Tiere aus der Bestrahlungsgruppe (RT) die deutlichste Reduzierung der CTCs auf (OH-1 K: 4,34, RT: 0,14; H69 K: 272, RT: 20,9). Die zweiteffektivste Therapie ist, laut der Ergebnisse dieser Arbeit, die kombinierte Therapie aus Bestrahlung und Chemotherapie (RChT) mit OH-1: 0,12 und H69 : 16,2 humanen Zellen. Die alleinige Applikation von Cisplatin (ChT) zeigt keine signifikante Verminderung der Anzahl an Krebszellen im Blut (OH-1: 403, H69: 313)

Die Ergebnisse sind in Abb. 2a und 2b dargestellt.

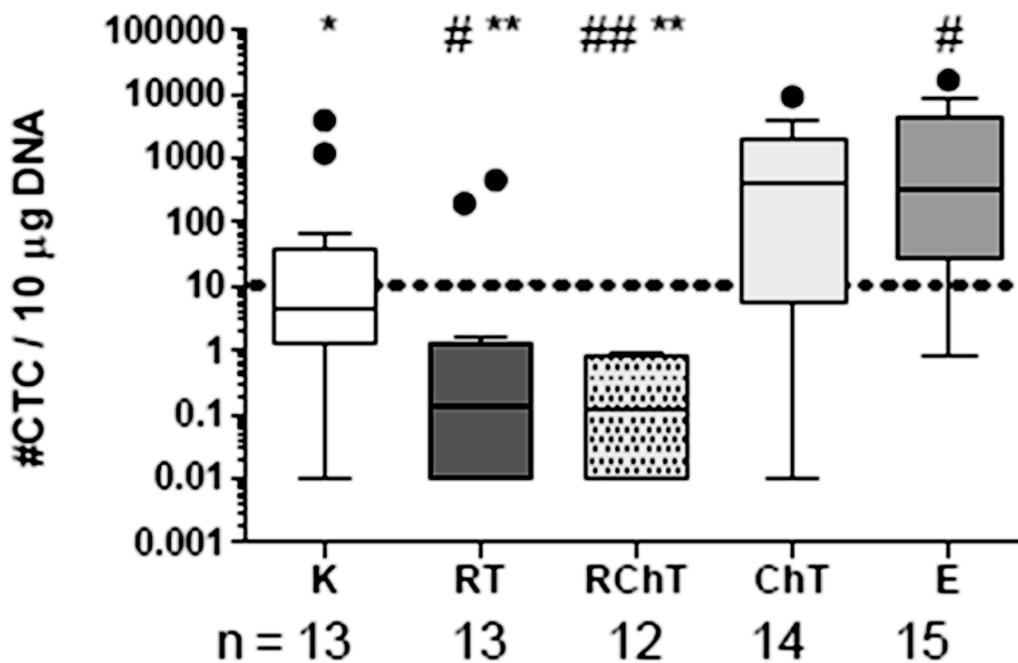
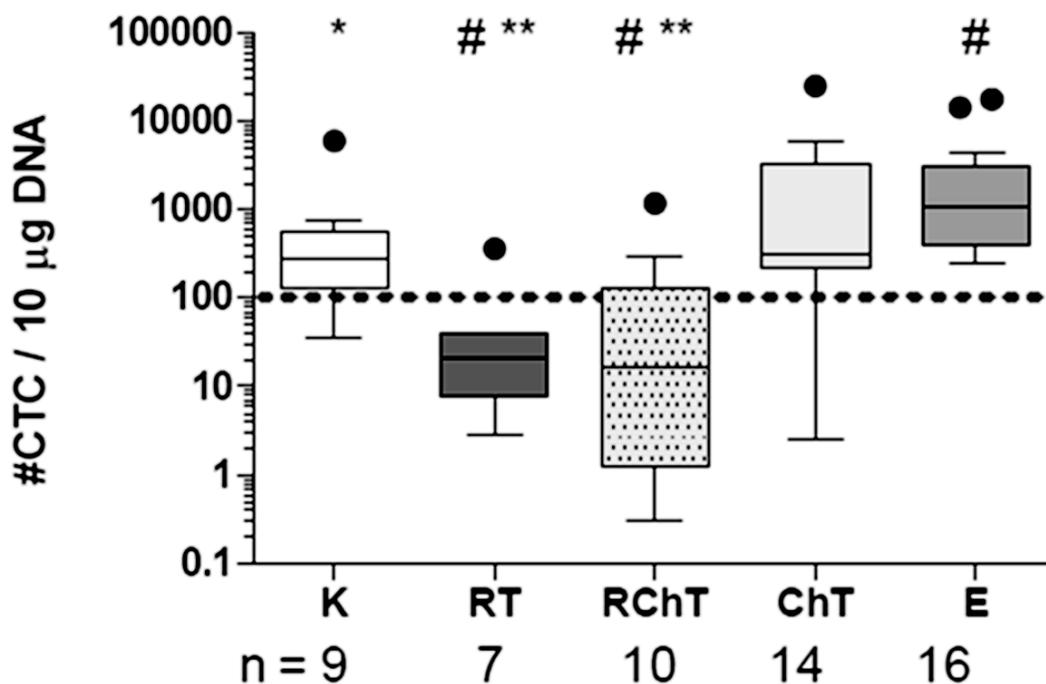


Abb. 2a

#### Ergebnisse der Alu-PCR der Blutproben in der OH-1 Gruppe

Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchsarmen aufgetragen (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio- und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle). Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 10 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/# =  $p < 0,05$ ; \*\*/### =  $p < 0,001$ ). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass in den Proben der RT- und der RChT-Gruppe signifikant weniger humane Zellen nachweisbar sind, als in der Anfangskontrolle. Die Endkontrolltiere weisen die höchste Anzahl Tumorzellen auf. Die Chemotherapie allein zeigt keinen Effekt auf die Anzahl der humanen Zellen.



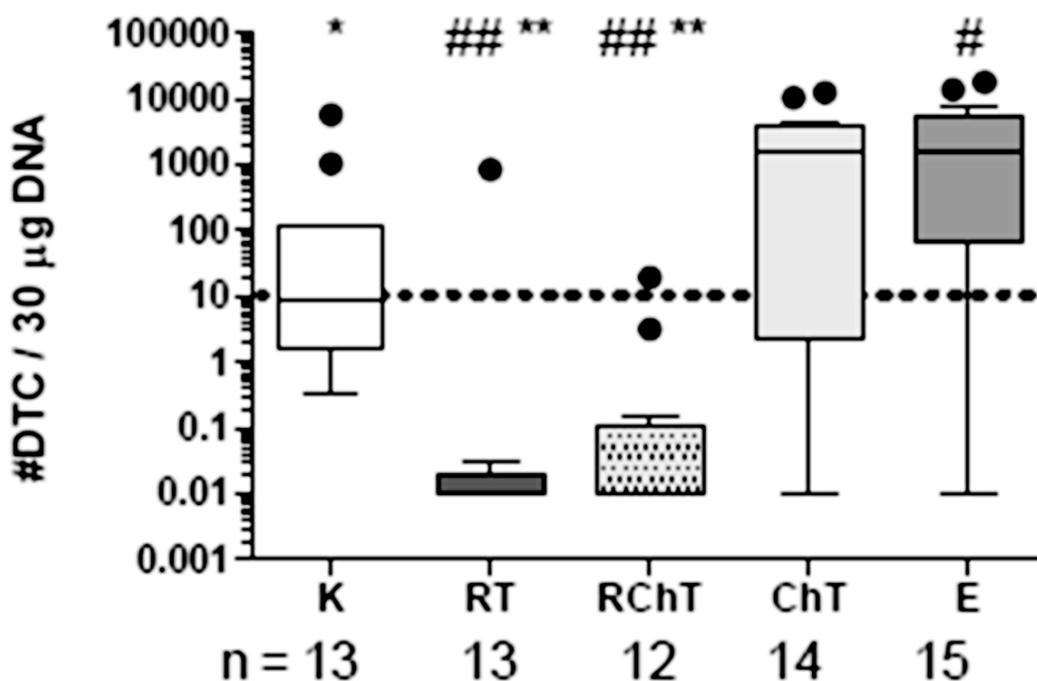
**Abb. 2b** Ergebnisse der Alu-PCR der Blutproben in der H69 Gruppe

Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchsarmen aufgetragen. (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio-und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle) Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 10 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/# =  $p < 0,05$ ; \*\*/## =  $p < 0,001$ ). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass in den Proben der RT- und die RChT-Gruppe signifikant weniger humane Zellen nachweisbar sind, als in der Anfangskontrolle. Die Endkontrolltiere weisen die höchste Anzahl Tumorzellen auf. Die Chemotherapie allein zeigt keinen Effekt auf die Anzahl der humanen Zellen.

### 3.3.2 Lunge

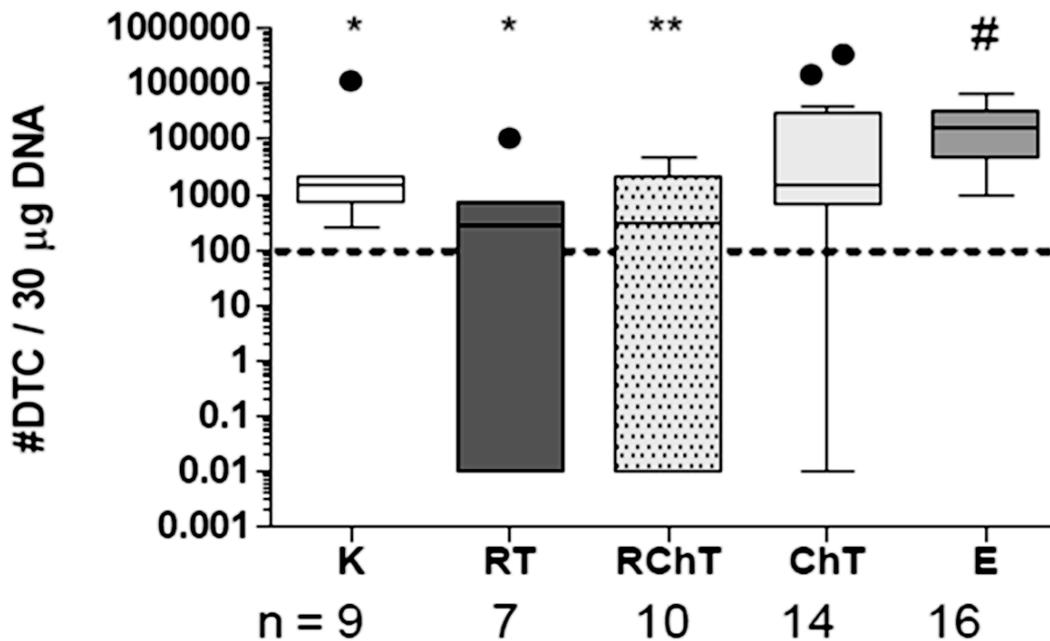
Die Daten zeigen einen deutlichen Anstieg der DTCs in den Lungen der Tiere in E (OH-1: 1635, H69: 16425) verglichen mit denen der Anfangskontrolle (OH-1: 8,71, H69: 1525). Ein signifikanter Rückgang der DTCs konnte bei der Bestrahlungsgruppe gezeigt werden (OH-1: 0,01, H69: 277). Die Kombinationstherapie hatte ebenfalls einen deutlichen Effekt auf die DTCs

(OH-1: 0,01, H69: 306). Die alleinige Behandlung mit Cisplatin lieferte keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Tumorzellen verglichen mit denen der Anfangskontrollgruppe (OH-1: 1564, H69: 1421). Insgesamt waren die Effekte der Behandlungen auf die OH-1 Tumore deutlicher als auf die H69 Tumore. Die Ergebnisse der Alu-PCR der Lungen sind in Abb. 2c und d dargestellt.



**Abb. 2c Ergebnisse der Alu-PCR der Lungen in der OH-1 Gruppe**

Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchssarmen aufgetragen (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio- und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle). Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 30 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/# =  $p < 0,05$ ; \*\*/### =  $p < 0,001$ ). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass in den Proben der RT- und die RChT-Gruppe signifikant weniger humane Zellen nachweisbar sind, als in der Anfangskontrolle. Die Endkontrolltiere weisen die höchste Anzahl Tumorzellen auf. Die Chemotherapie allein zeigt keinen Effekt auf die Anzahl der humanen Zellen.



**Abb. 2d Ergebnisse der Alu-PCR der Lungen in der H69 Gruppe**

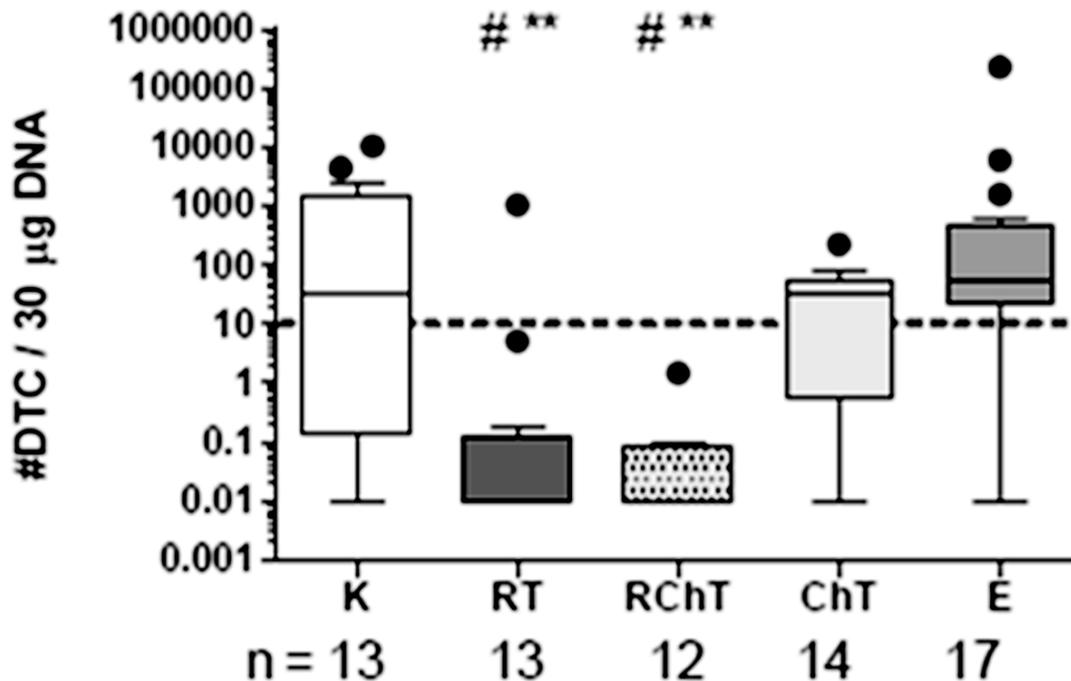
Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchsaufsetzungen aufgetragen (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio- und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle). Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 30 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/#=  $p < 0,05$ ; \*\*/## =  $p < 0,001$ ). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass in den Proben der RT- und die RChT-Gruppe signifikant weniger humane Zellen nachweisbar sind, als in der Anfangskontrolle. Die Endkontrolltiere weisen die höchste Anzahl Tumorzellen auf. Die Chemotherapie allein zeigt keinen Effekt auf die Anzahl der humanen Zellen.

### 3.3.3 Leber

Die Quantifizierung der DTCs in den Lebern ergab einen signifikanten Anstieg in der Endkontrolle (OH-1: 56,5, H69: 89,2) gegenüber der Anfangskontrolle (OH-1: 31,9, H69: 18,2). Auch hier konnte durch die Bestrahlung (OH-1: 0,01, H69: 2,93) und die Kombinationstherapie (OH-1: 0,01, H69: 0,45) ein deutlicher Rückgang der DTCs im Vergleich zu der Anfangskontrolle erzielt und gezeigt werden. Die Chemotherapie bewirkte keine signifi-

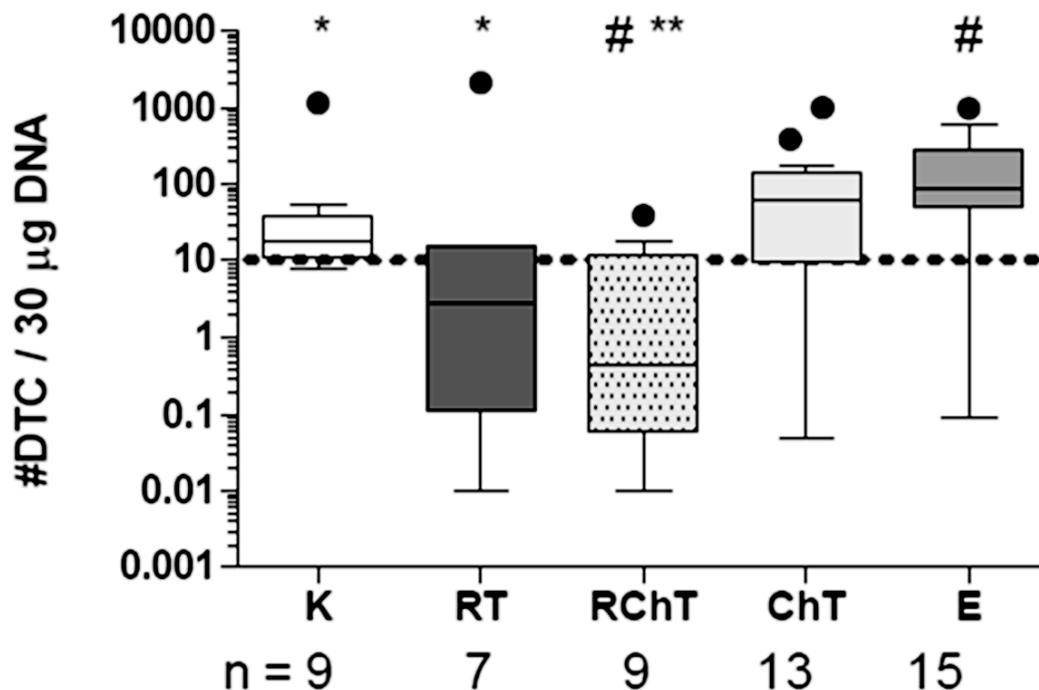
kante Reduzierung im Vergleich zu der Anfangskontrollgruppe (OH-1: 33,9, H69: 63,2).

Die Ergebnisse sind in Abb. 2 e und f dargestellt.



**Abb. 2e Ergebnisse der Alu-PCR der Lebern in der OH-1 Gruppe**

Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchsarmen aufgetragen (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio- und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle). Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 30 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/#=  $p < 0,05$ ; \*\*/## =  $p < 0,001$ ). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass in den Proben der RT- und die RChT-Gruppe signifikant weniger humane Zellen nachweisbar sind, als in der Anfangskontrolle. Die Endkontrolltiere weisen die höchste Anzahl Tumorzellen auf. Die Chemotherapie allein zeigt keinen Effekt auf die Anzahl der humanen Zellen.



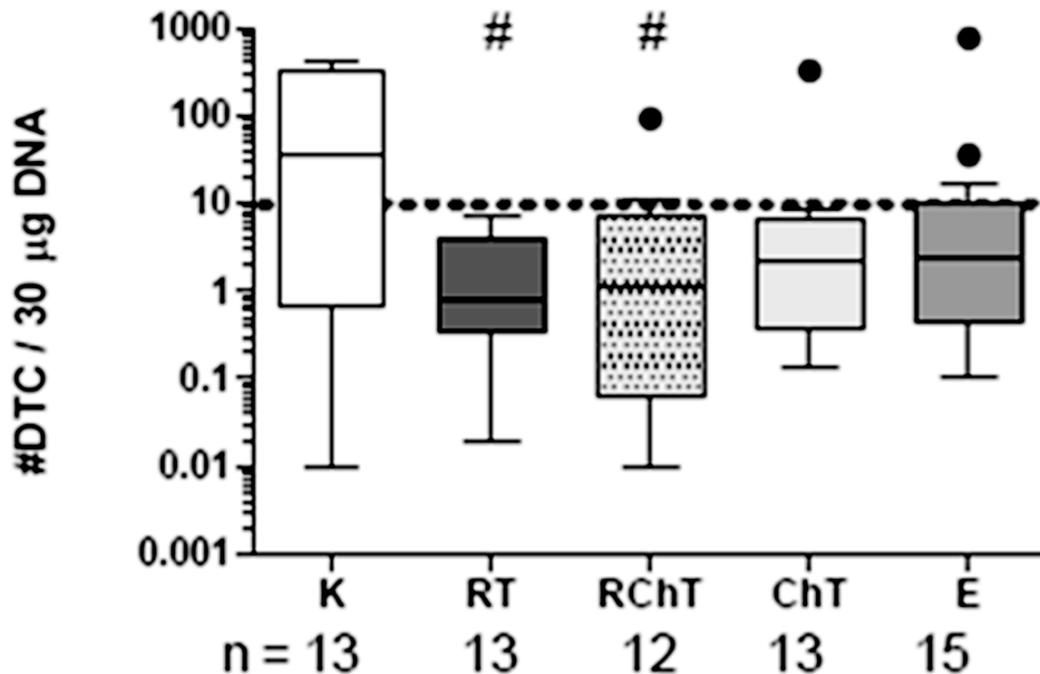
**Abb. 2f Ergebnisse der Alu-PCR der Lebern in der H69 Gruppe**  
 Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchsarmen aufgetragen (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio- und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle). Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 30 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/#=  $p < 0,05$ ; \*\*/#=# =  $p < 0,001$ ). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass in den Proben der RT- und die RChT-Gruppe signifikant weniger humane Zellen nachweisbar sind, als in der Anfangskontrolle. Die Endkontrolltiere weisen die höchste Anzahl Tumorzellen auf. Die Chemotherapie allein zeigt keinen Effekt auf die Anzahl der humanen Zellen.

### 3.3.4 Knochenmark

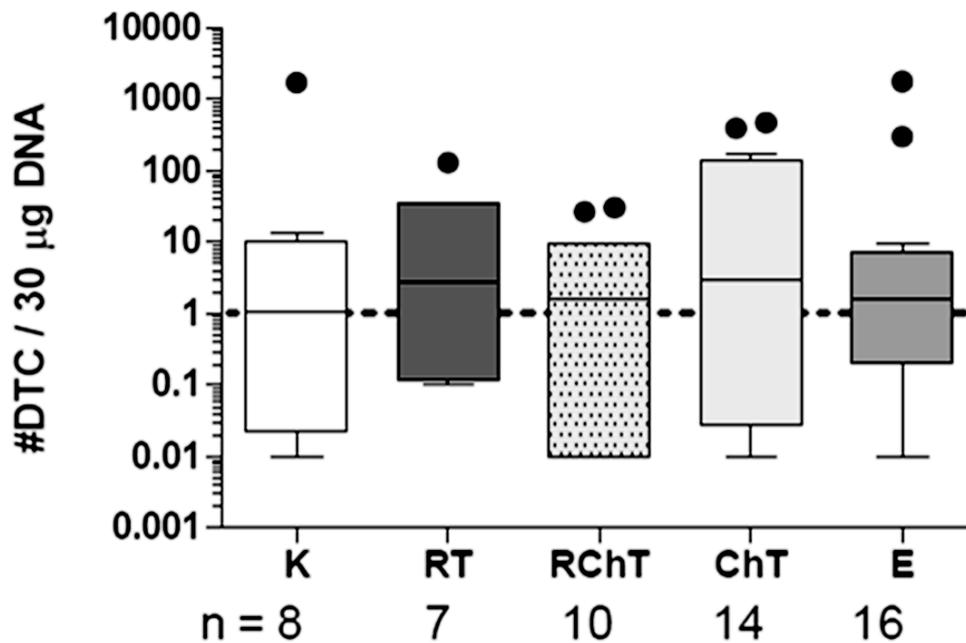
Im Vergleich zu den Lungen und Lebern konnte im Knochenmark kein Anstieg der DTCs in der Endkontrollgruppe (OH-1: 2,51, H69: 1,59) verglichen mit der Anfangskontrollgruppe (OH-1: 34,3, H69: 1,02) verzeichnet werden. In den Proben der mit OH-1 injizierten Tiere ist sogar ein Rückgang der Anzahl der humanen Zellen zu erkennen. Lediglich die Bestrahlungstherapie

(OH-1: 0,77) und die Kombinationstherapie (OH-1: 1,12) der OH-1 Tiere zeigten eine deutliche Reduzierung der DTCs. Dieses Ergebnis konnte in den H69 Tieren nicht gezeigt werden. Die Chemotherapie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der DTCs.

Ergebnisse siehe Abb. 2 g und h



**Abb. 2g Ergebnisse der Alu-PCR vom Knochenmark in der OH-1 Gruppe**  
 Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchssarmen aufgetragen (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio-und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle). Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 30 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/#=  $p < 0,05$ ; \*\*/## =  $p < 0,001$ ). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass in den Proben der RT- und die RChT-Gruppe weniger humane Zellen nachweisbar sind (in der OH-1 Gruppe signifikant), als in der Anfangskontrolle. Jedoch ist auch die Anzahl der Tumorzellen, sowohl in der Chemotherapiegruppe, als auch in der Endkontrollgruppe, geringer als zu Beginn der Therapie.



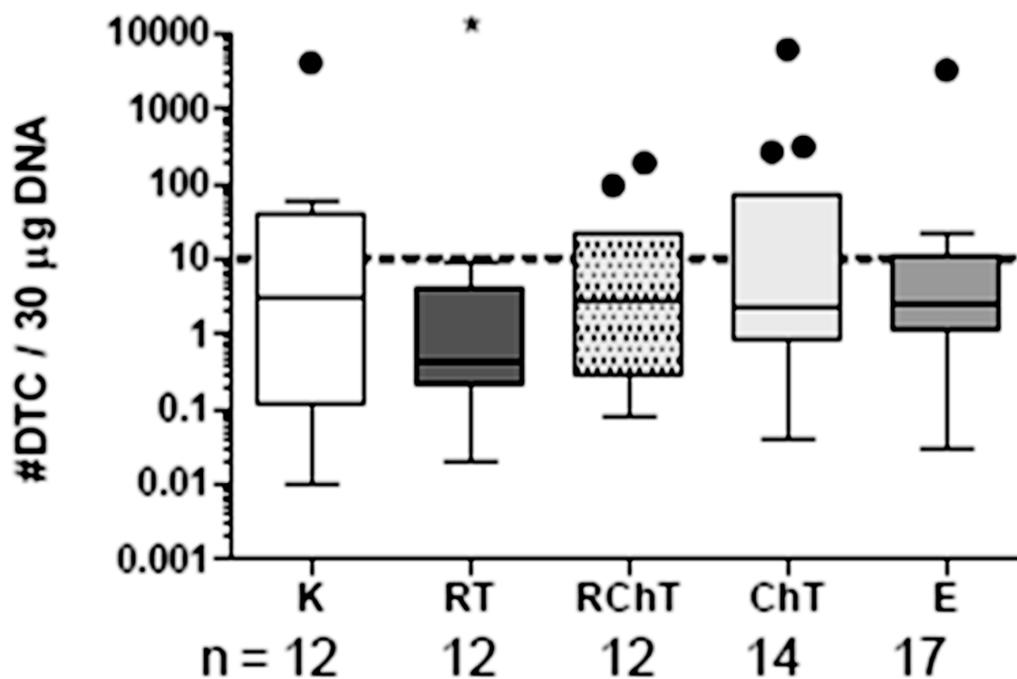
**Abb. 2h Ergebnisse der Alu-PCR vom Knochenmark in der H69 Gruppe**  
 Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchsarmen aufgetragen (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio-und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle). Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 30 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/#= p<0,05; \*\*/## = p<0,001). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass in der Endkontrollgruppe eine ähnliche Anzahl Tumorzellen wie in der Anfangskontrollgruppe nachweisbar ist. In der Bestrahlungsgruppe und auch in der Chemotherapiegruppe finden sich vermehrt humane Zellen, während in der Kombinationsgruppe die Menge Tumorzellen den beiden Kontrollgruppen gleicht.

### 3.3.5 Gehirn

Die Alu-PCR zur Ermittlung von DTCs im Gehirn ergab ein vergleichbares Ergebnis zu dem im Knochenmark. Es kam zu keinem signifikanten Anstieg der DTCs in der Endkontrolle (OH-1: 2,62, H69: 12,1) im Vergleich zur Anfangskontrolle (OH-1: 3,13, H69: 0,02). Die Behandlungen zeigten zudem keinen deutlichen Rückgang der DTCs. Die absolute Anzahl nach Bestrah-

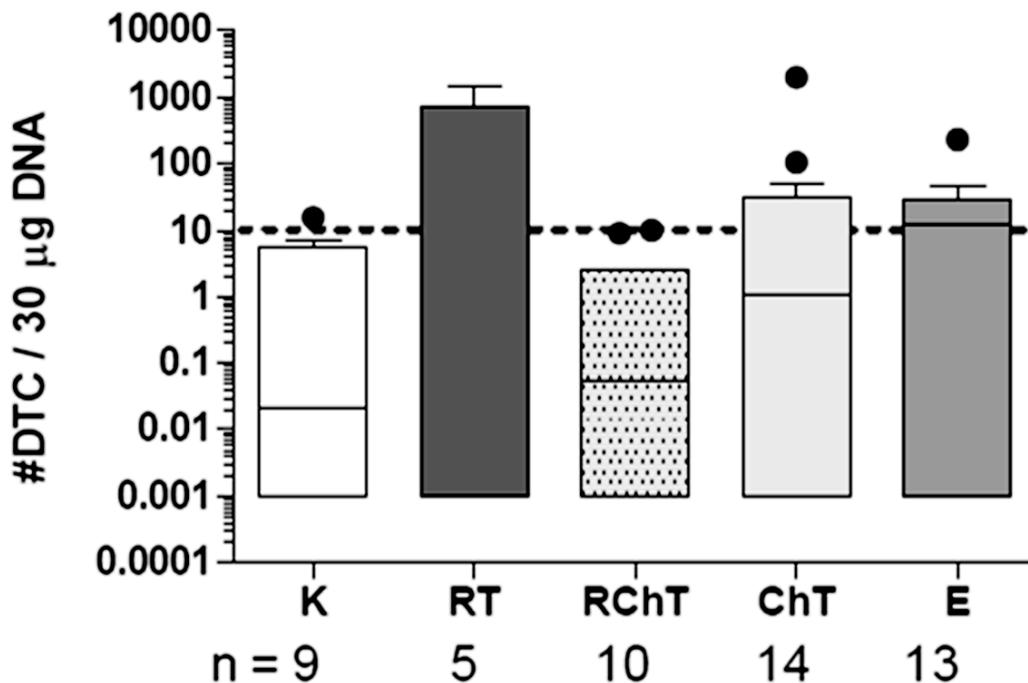
lung beträgt in der OH-1 Gruppe 0,42 Zellen, in der H69 Gruppe 0,001 Zellen pro 30 ng DNA, nach der Kombinationstherapie 2,80 Zellen (OH-1) bzw. 0,055 Zellen (H69) und nach der alleinigen Chemotherapie 2,31 Zellen (OH-1) bzw. 1,08 Zellen (H69).

Die Ergebnisse sind in Abb. 2 i und j dargestellt.



**Abb. 2i Ergebnisse der Alu-PCR der Gehirne in der OH-1 Gruppe**

Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchssarmen aufgetragen (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio- und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle). Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 30 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/#=  $p < 0,05$ ; \*\*/### =  $p < 0,001$ ). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass in der Endkontrollgruppe weniger humane Zellen als in der Anfangskontrolle zu finden sind. Die Bestrahlung konnte die Anzahl der Tumorzellen signifikant senken, während die anderen beiden therapierten Gruppen keinen deutlichen Rückgang zeigen.



**Abb. 2j Ergebnisse der Alu-PCR der Gehirne in der H69 Gruppe**

Auf der x-Achse ist die Anzahl der Tiere (n) in den verschiedenen Versuchsarmen aufgetragen (K=Anfangskontrolle, RT=Bestrahlungsgruppe, RChT=Radio-und Chemotherapiegruppe, ChT=Chemotherapiegruppe, E=Endkontrolle). Dem gegenübergestellt ist auf der y-Achse die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro 30 µg DNA. Die Werte wurden mit dem Mann Whitney U-Test auf ihre Signifikanz geprüft. \* steht für die Signifikanz in Bezug auf K, # für die Signifikanz in Bezug auf E (\*/#=  $p < 0,05$ ; \*\*/## =  $p < 0,001$ ). Die rot gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der verlässliche Werte gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte sind gemessene Werte, die weit außerhalb des Mittels liegen, sogenannte Ausreißerwerte. Es ist zu sehen, dass sich in der Endkontrollgruppe mehr Tumorzellen befinden als in der Anfangskontrolle. Die Anzahl humaner Zellen in der bestrahlten Gruppe ist größer, die der Radio-und Chemotherapiegruppe geringer. Die Chemotherapiegruppe ist auf einem Niveau mit der Endkontrollgruppe.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich insbesondere die Bestrahlung, aber auch die Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Chemotherapie auf die CTCs im Blut und DTCs in der Lunge und Leber insofern auswirken, sodass es zu einer signifikanten Reduzierung dieser Zellzahlen kommt. Im Knochenmark und Gehirn konnte kein deutlicher Effekt durch die Therapie gezeigt werden. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass es

auch ohne Therapie (E) zu keinem Anstieg der Tumorzellen in diesen Geweben kam.

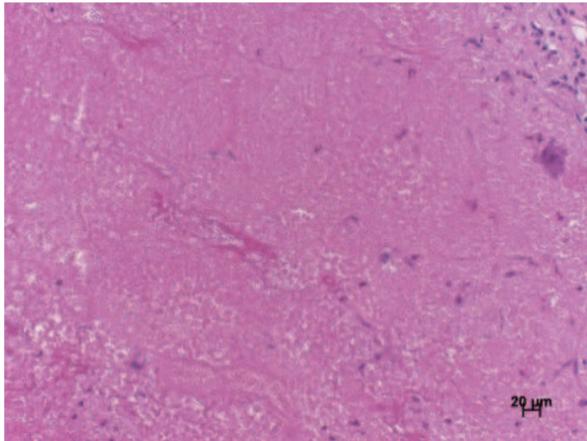
### **3.4 Histologische Aufarbeitung der Primärtumore**

Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Bestrahlung auf den Primärtumor morphologisch und histologisch analysiert. Für die Färbungen wurden jeweils 3 Schnitte von Tumoren der Tiere, die bestrahlt wurden und 3 Schnitte aus der Gruppe, die keine Therapie erhielten, verwendet (ein Schnitt pro Tier). Zur Quantifizierung wurden je 100 Zellen in 3 Gesichtsfeldern aus unterschiedlichen Bereichen des Tumors ausgezählt und die Ergebnisse verglichen. Die histologische Auswertung erfolgte sowohl für OH-1 als auch für H69.

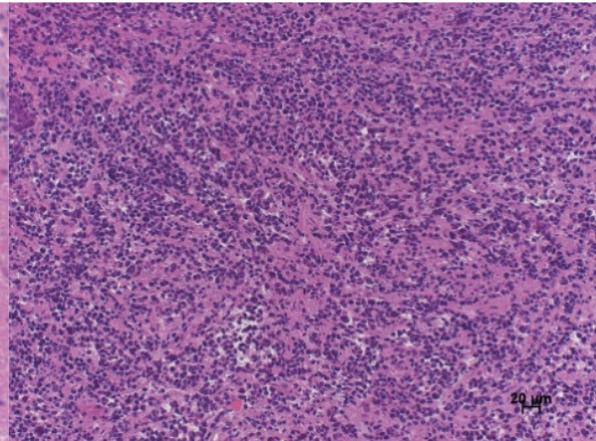
#### **3.4.1 HE-Färbung**

Es wurden OH-1 und H69-Primärtumore der Endkontrolle und der Bestrahlungsgruppe HE gefärbt, um eventuelle Unterschiede in der Morphologie zu zeigen. Die Tumore der bestrahlten Tiere bestehen zu einem Großteil aus nekrotischem Gewebe (3a, c), vitale Zellen können kaum noch detektiert werden. In den Tumoren der unbehandelten Tiere kann man hingegen vereinzelte kleine nekrotische Herde sehen, vitale Tumorzellen machen aber den Großteil aus (3b, d).

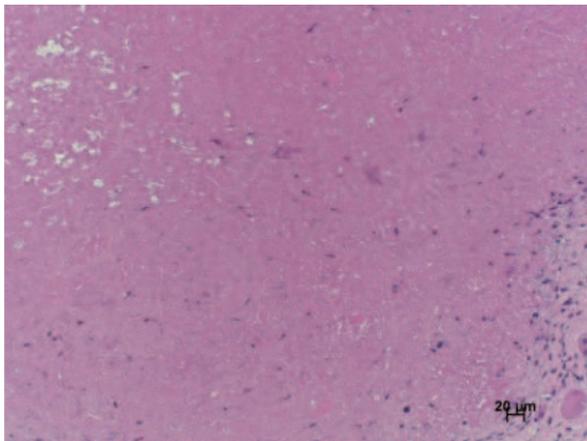
3a) Primärtumor RT (OH-1)



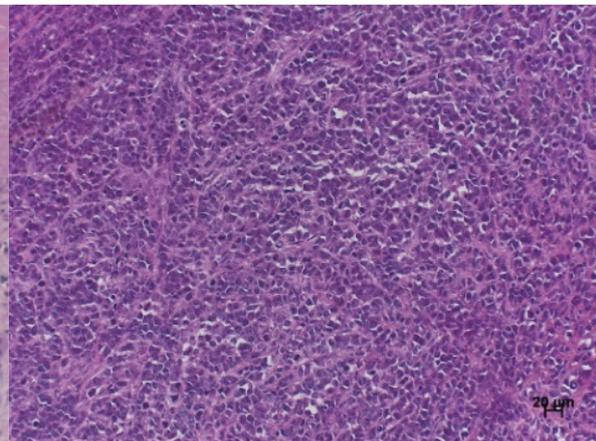
3b) Primärtumor E (OH-1)



3c) Primärtumor RT (H69)



3d) Primärtumor E (H69)

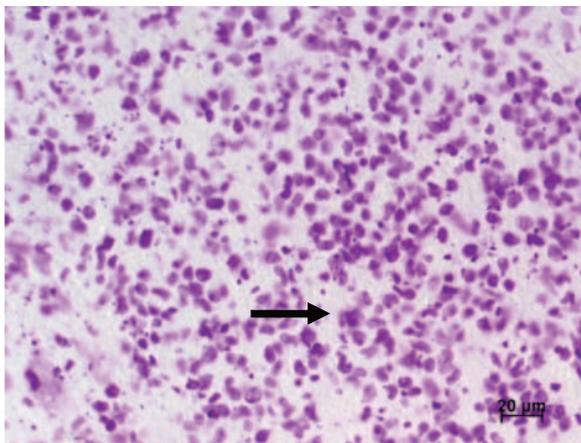
**Abb. 3 a-d Primärtumore HE gefärbt.**

Vergleich bestrahlter (RT) Primärtumore (3a und c) mit unbehandelten (E) Tumoren (3 b und d) beider Zelllinien. In den bestrahlten Tumoren sind keine vitalen Tumorzellen mehr zu erkennen, es ist fast ausschließlich fibrotisches Narbengewebe vorhanden.

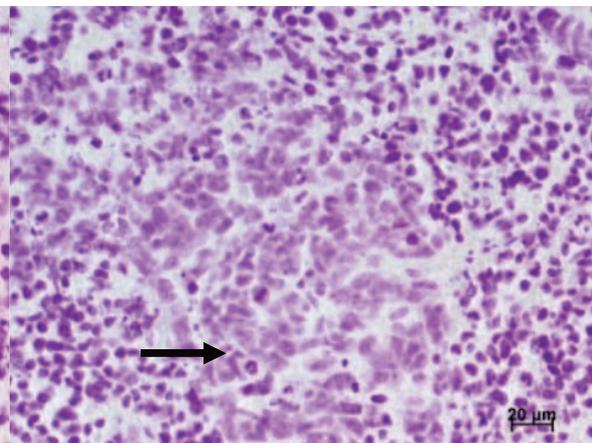
### 3.4.2 Feulgen-Färbung

Die Feulgen-Färbung dient zur Detektion apoptotischer Zellkerne (hier in % angegeben). Der Vergleich der Tumoren aus der Bestrahlungsgruppe (OH-1: 46%, H69: 55%) und denen der Endkontrolle (OH-1: 17%, H69: 20%) zeigt einen deutlichen Anstieg der apoptotischen Tumorzellen pro Gesichtsfeld in der Bestrahlungsgruppe (s. Abb. 4e). In Abbildung 4 a-d sind Bilder der angefärbten Tumore dargestellt.

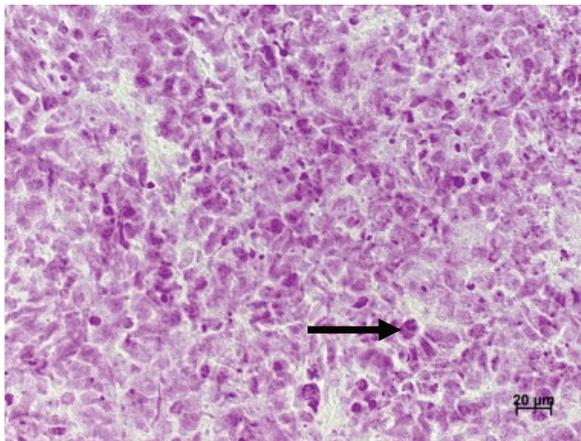
4a) Primärtumor RT (OH-1)



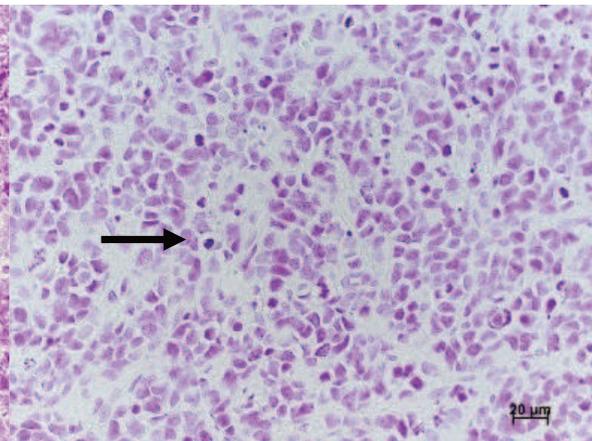
4b) Primärtumor E (OH-1)



4c) Primärtumor RT (H69)

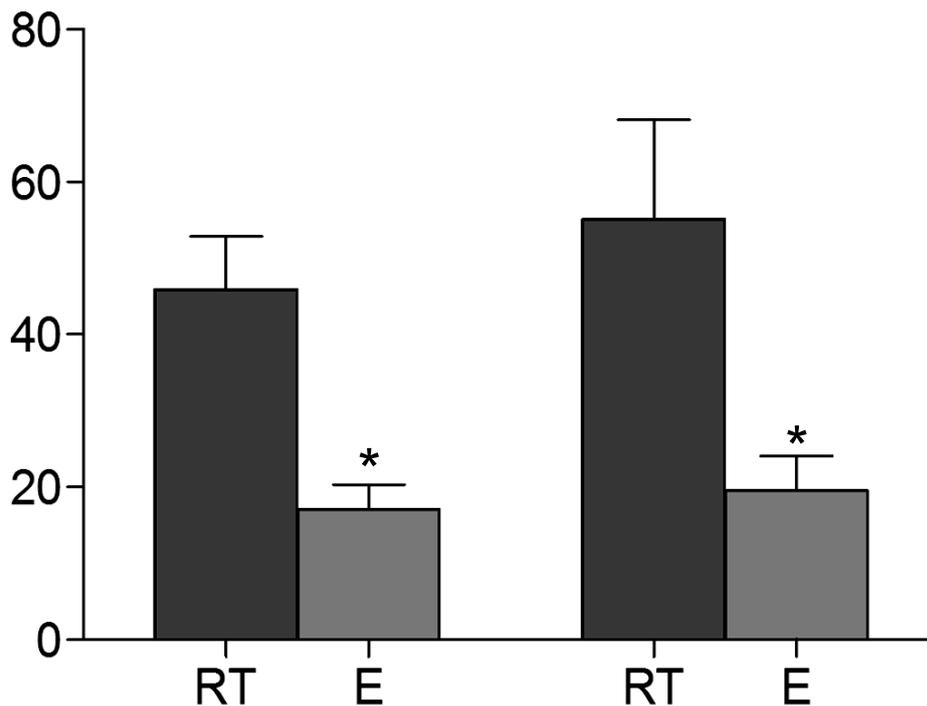


4d) Primärtumor E (H69)



**Abb. 4 a-d Primärtumore gefärbt nach Feulgen.**

Vergleich bestrahlter (RT) Tumore (4 a und c) mit unbehandelten (E) Tumoren (4 b und d) beider Zelllinien. Die DNA in den Zellkernen färbt sich dunkellila an und somit kann gezeigt werden, wieviele noch vitale Zellen sich in den Tumoren befinden. Es sind deutlich mehr vitale Tumorzellen in den unbehandelten Tumoren. Die Zellkerne in den bestrahlten Tumoren sind größtenteils fragmentiert und apoptotisch.

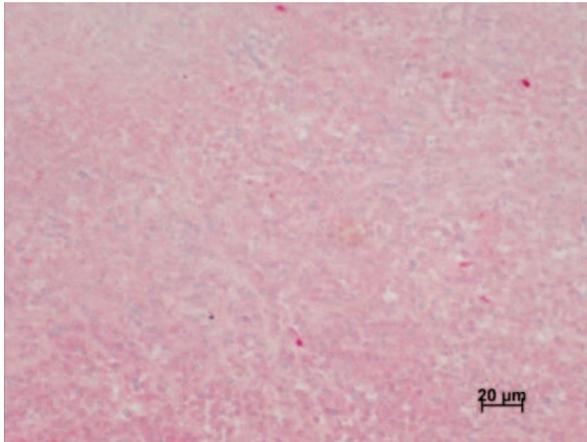


**Abb. 4e** Anzahl der apoptotischen Zellen/Gesichtsfeld in % OH-1 (links) und H69 (rechts). Man sieht, dass sowohl in der OH-1 Gruppe, als auch in der H69 Gruppe in der Bestrahlungsgruppe deutlich mehr apoptotische Zellen (blau) zu finden sind, als in den unbehandelten Tumoren (grau).\* =  $p < 0,05$ .

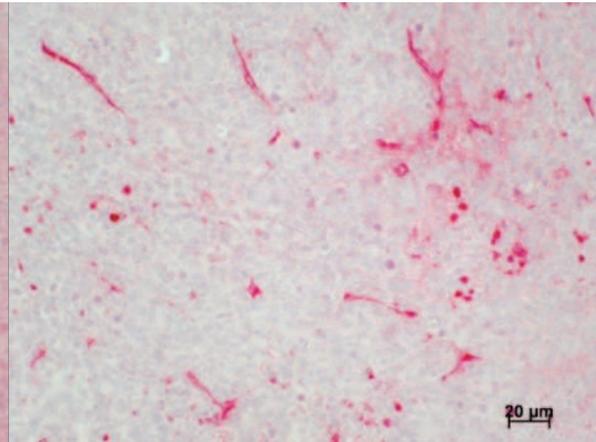
### 3.4.3 S1P1-Rezeptor-Darstellung

Um die Ausbildung kleinster Blutgefäße im Primärtumor zu untersuchen, wurden die Tumore mit dem Antikörper S1P1 markiert und rot angefärbt (s. Abb. 5 a-d). Die Anzahl der Blutgefäße in den Tumoren (in Prozent angegeben) ist in der Bestrahlungsgruppe deutlich reduziert (OH-1: 2,4%, H69: 3,2%) im Vergleich zu den Tumoren der Endkontrolle (OH-1: 17%, H69: 11%) (s. Abb. 5e).

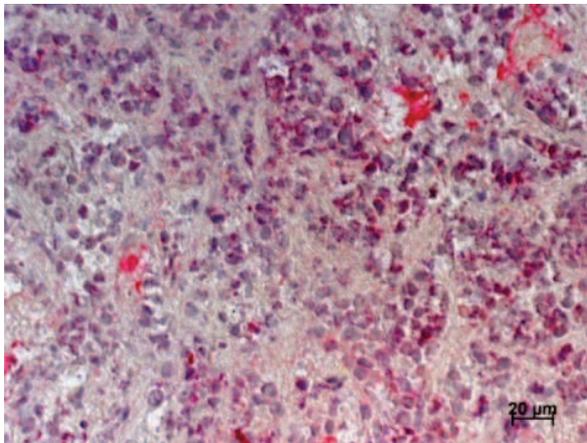
5a) Primärtumor RT (OH-1)



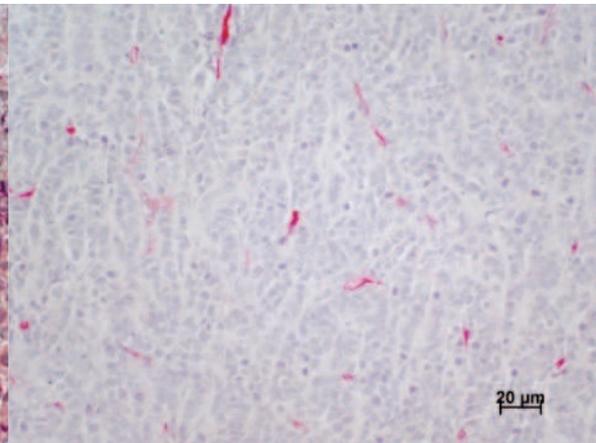
5b) Primärtumor E (OH-1)



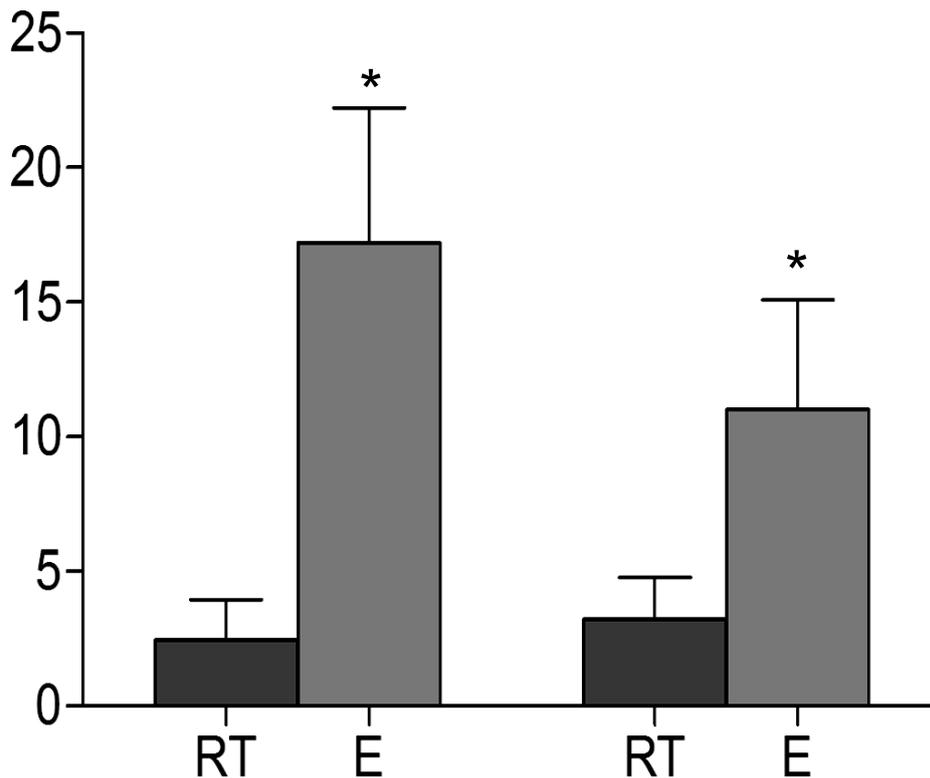
5c) Primärtumor RT (H69)



5d) Primärtumor E (H69)

**Abb. 5 a-d****Primärtumore S1P1-Rezeptor-Darstellung**

Vergleich bestrahlter (RT) Tumore (5 a und c mit unbehandelten (E) Tumoren (5 b und d) beider Zelllinien. Rot angefärbt werden hier die Endothelzellen der Gefäße in den Tumoren. Es ist zu sehen, dass sich wesentlich mehr Gefäße in den unbehandelten Tumoren befinden.

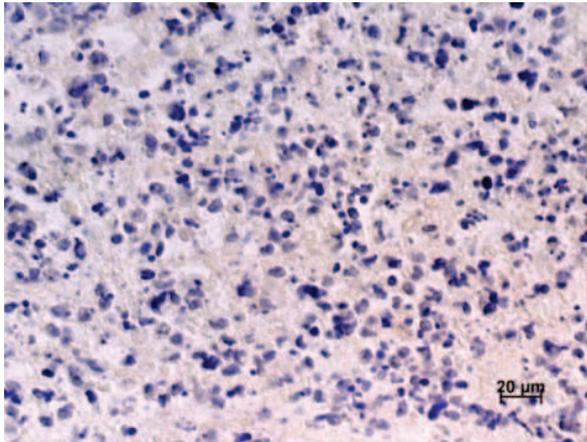


**Abb. 5e Absolute Anzahl der Gefäße/ Gesichtsfeld**  
OH-1 (links) und H69 (rechts). Bei beiden Zelllinien ist eine deutlich höhere Anzahl an Gefäßen in der unbehandelten Gruppe (grau) zu detektieren. \* =  $p < 0,05$ .

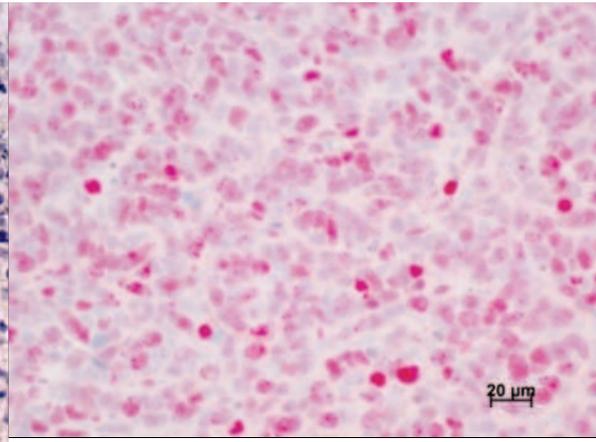
#### 3.4.4 Ki67-Markierung

Zur Detektion proliferativer Zellen im Tumorgewebe (angegeben in Prozent), wurde eine Ki-67 Markierung mit dem Primärantikörper Mib1 durchgeführt (Abb. 6 a-d). Die Bestrahlung des Primärtumors führte zu einer deutlichen Abnahme der Proliferation der Tumorzellen (OH-1: 2,3%, H69: 0,9%) verglichen mit der Endkontrollgruppe (OH-1: 24%, H69: 4,6%) (s. Abb. 6e).

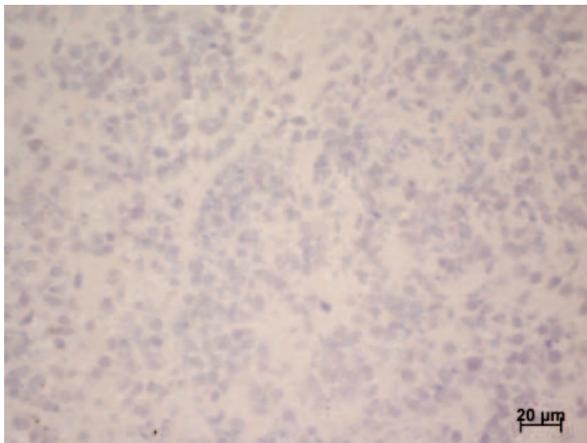
6a) Primärtumor RT (OH-1)



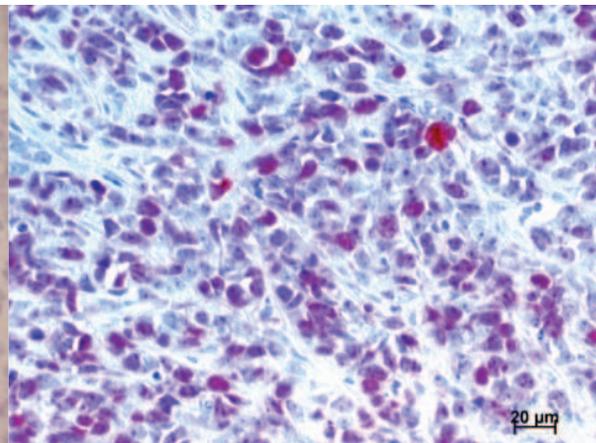
6b) Primärtumor E (OH-1)



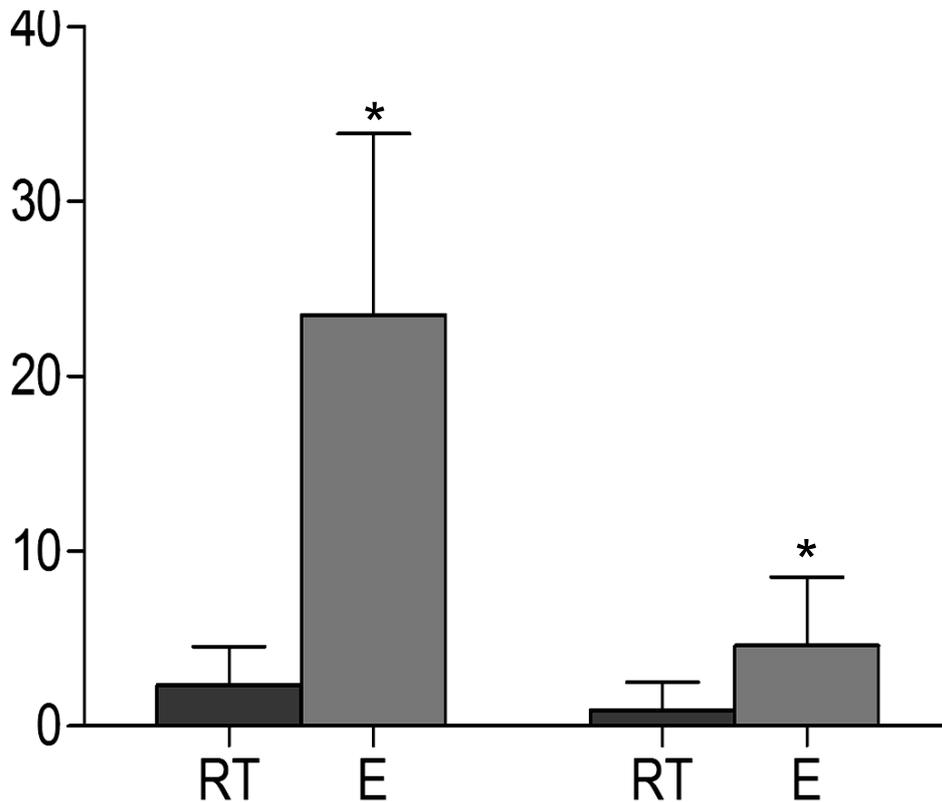
6c) Primärtumor RT (H69)



6d) Primärtumor E (H69)

**Abb. 6 a-d****Primärtumore Ki67 gefärbt.**

Vergleich bestrahlter (RT) Tumore (6 a und c) mit unbehandelten (E) Tumoren (6 b und d) beider Zelllinien. Rot angefärbt ist hier spezifisch das Ki67- Protein, das im Zellkern vorkommt und als Proliferationsmarker dient. In den behandelten Tumoren befinden sich deutlich weniger proliferierenden Zellen als in den unbehandelten.



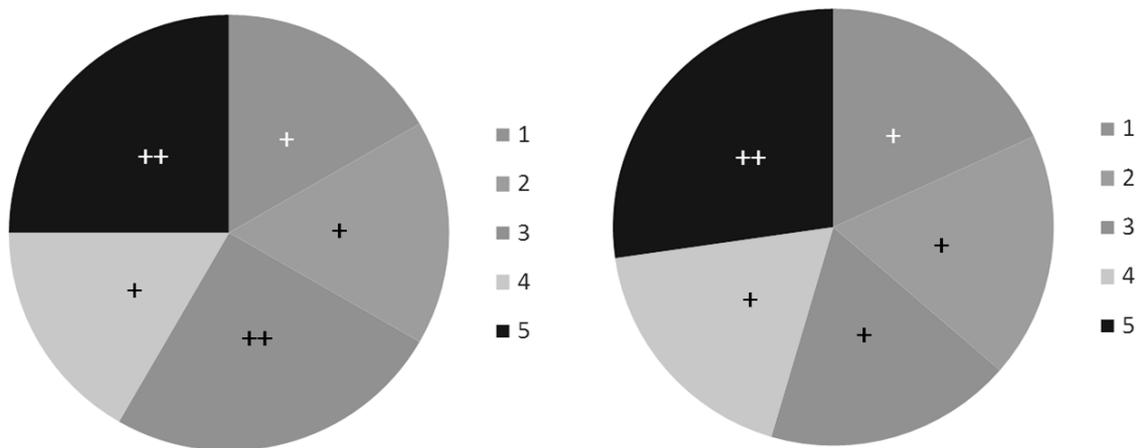
**Abb. 6e** Anzahl proliferierender Zellen/ Gesichtsfeld in % OH-1 (links) und H69 (rechts). Es wird gezeigt, dass sowohl in der OH-1-Gruppe, als auch in der H69-Gruppe vermehrt proliferierende Zellen in den unbehandelten Tieren (grau) vorkommen.\* =  $p < 0,05$ .

### 3.4.5 CD45-Markierung

CD45 ist ein Protein, das auf der Zellmembran von allen Leukozyten vorkommt und als Pan-Leukozytenmarker gilt (Lai et al., 1998). Um die Leukozyteninfiltration in den Tumoren beurteilen und vergleichen zu können, wurde eine immunhistochemische Markierung der Tumore aus der Endkontrollgruppe und denen aus der Bestrahlungsgruppe durchgeführt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert aus den geschätzten Zellen der jeweiligen Gruppen ermittelt. Es ist jedoch zu erwähnen, dass sowohl die Anzahl, als auch die Verteilung der Leukozyten in den Tumoren (einer Zelllinie und Therapiegruppe) sehr stark variieren und ein inhomogenes Bild ergeben. Ausgewertet wurden der Rand der Tumore (1), die nekrotischen Areale (2), Bindegewebssepten (3), vitales Tumorgewebe (4) und der sich hierauf bezogene prozentuale Anteil an phagozytierenden Zellen. Im Vergleich zur Endkontrollgruppe

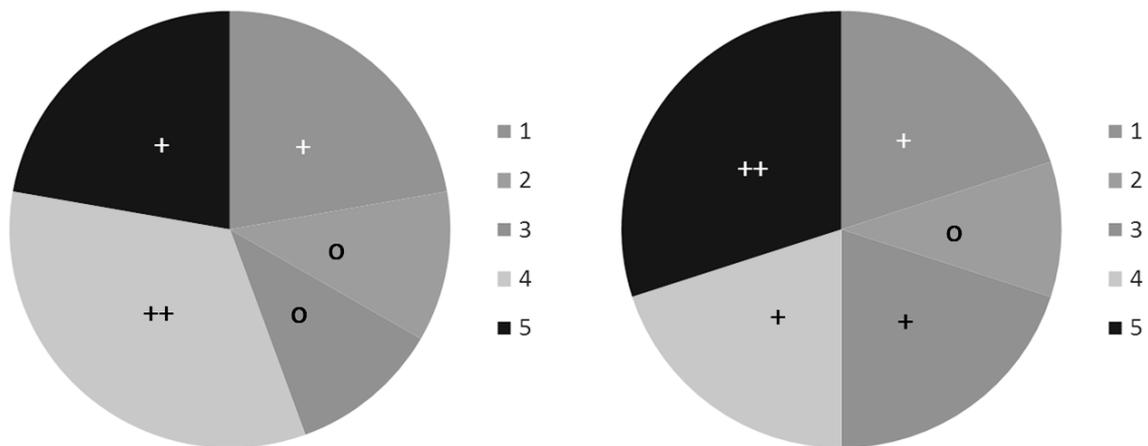
können in der OH-1 Gruppe in allen Bereichen des Tumors entweder eine identische Anzahl von Entzündungszellen oder mehr detektiert werden (1: RT: 14,6%, E: 12,3%; 2: RT: 10,2%, E: 6,3%; 3: RT: 21%, E: 14,9%; 4: RT: 17,6%, E: 15,2% und 5: RT: 37%, E: 27,5%). Die Ergebnisse aus der H69 Gruppe unterscheiden sich hingegen deutlich von denen aus der OH-1 Gruppe: in den Tumorrändern und im Bindegewebe ist der Anteil der Entzündungszellen in den unbehandelten Tumoren höher, während er in den nekrotischen Bereichen und auch im vitalen Tumorgewebe geringer ist. Vergleicht man den Anteil phagozytischer Zellen, ist dieser in den unbehandelten Tumoren größer (1: RT: 5,8%, E: 13,2%; 2: OH-1 RT: 63,2%, E: 1,8%; 3: RT: 4,8%, E: 9,2%; 4: RT: 35,6%, E: 16,6% und 5: RT: 18%, E: 28%).

Die entsprechenden Ergebnisse und Abbildungen sind in Abb. 7 a - f zusammengefasst.



**Abb.7a** Darstellung des prozentualen Anteils CD45 markierter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytischer Zellen (OH-1).

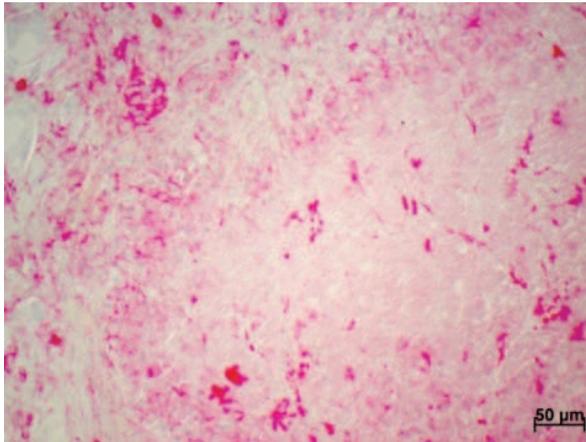
Gezeigt wird der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen, wobei 0 =  $\leq 5\%$ , + =  $\leq 20\%$ , ++ =  $\leq 40\%$ , +++ =  $\geq 40\%$  entsprechen. In dem linken Diagramm sind die Werte der bestrahlten Tumore aus der OH-1 Gruppe gezeigt, in dem rechten die Werte der unbehandelten Tumore dieser Gruppe. Es ist zu sehen, dass die Menge Leukozyten im Rand der Tumoren (1), in den nekrotischen Arealen (2), im vitalen Tumorgewebe (4) und der Anteil phagozytischer Zellen (5) ähnlich ist, während in den Bindegewebssepten (3) mehr Leukozyten in den behandelten Tumoren vorkommen.



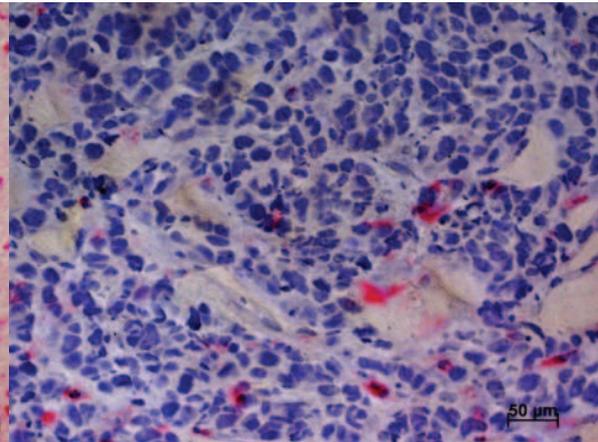
**Abb. 7b** Darstellung des prozentualen Anteils CD45 markierter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytischer Zellen (H69).

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen, wobei o =  $\leq 5\%$ , + =  $\leq 20\%$ , ++ =  $\leq 40\%$ , +++ =  $\geq 40\%$  entsprechen. In dem linken Diagramm sind die Werte der bestrahlten Tumore aus der H69 Gruppe gezeigt, in dem rechten die Werte der unbehandelten Tumore dieser Gruppe. Im Tumorrand (1) und den nekrotischen Arealen (2) ist die Anzahl der Leukozyten in den behandelten und unbehandelten Tumoren ungefähr gleich, in den Bindegewebssepten (3) sind mehr angefärbte Zellen in den Tumoren der Endkontrolle, während im vitalen Tumorge-webe (4) vermehrt Leukozyten in den bestrahlten Tumoren vorkommen. Die Anzahl phagozytischer Zellen ist in den unbehandelten Tumoren höher.

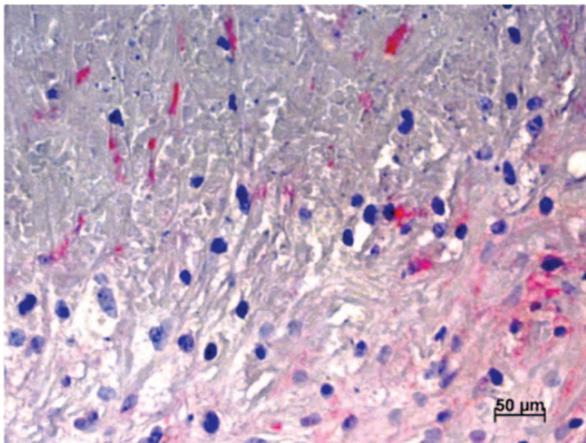
7c) Primärtumor RT (OH-1)



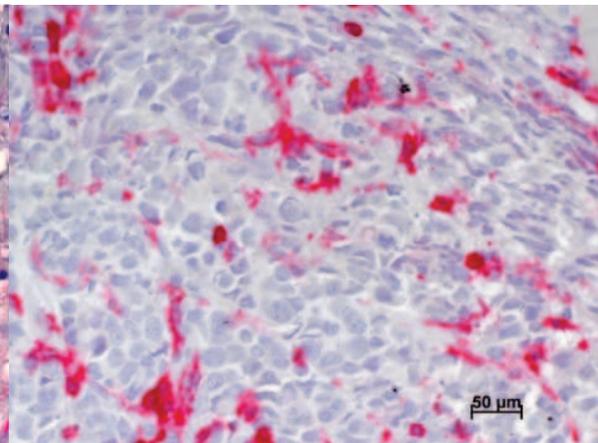
7d) Primärtumor E (OH-1)



7e) Primärtumor RT (H69)



7f) Primärtumor E (H69)

**Abb. 7 c-f**

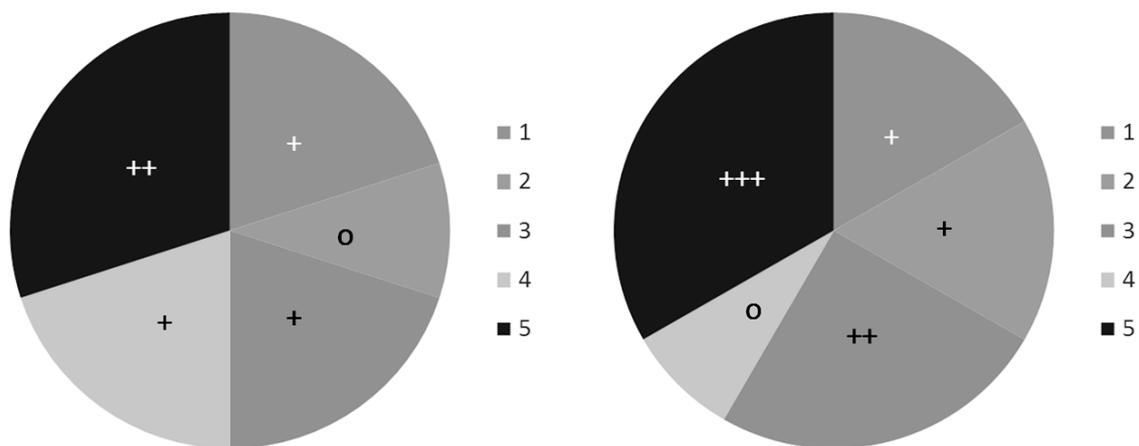
**Darstellung bestrahlter (RT) Tumore (7 c und e) und unbehandelter (E) Tumore (7d und f) beider Zelllinien mit der CD45-Markierung.**

Die Leukozyten erscheinen in der CD45-Markierung rot. Man sieht eine vermehrte Leukozyteninfiltration in den bestrahlten Tumoren der OH-1 Gruppe, aber eine verminderte in den behandelten Tumoren der H69 Gruppe.

### 3.4.6 CD 11b-Markierung

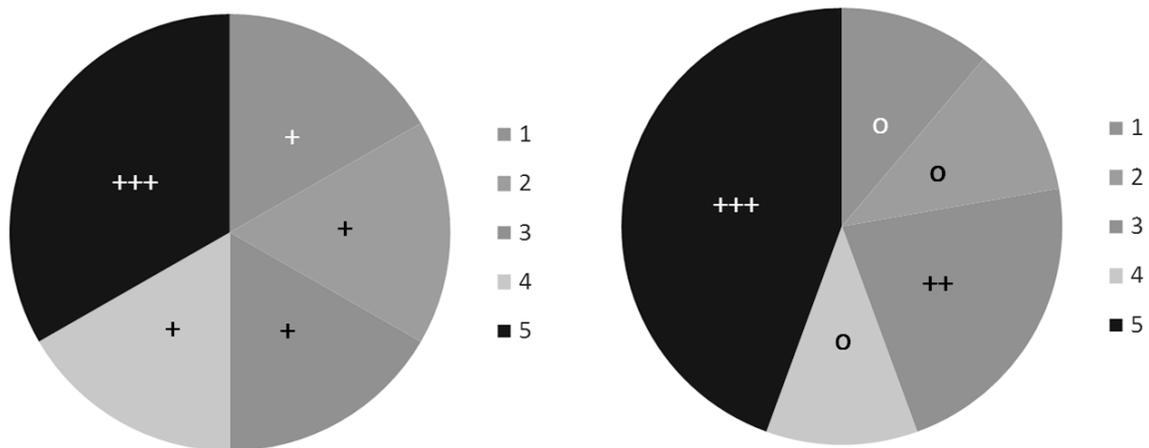
Das Protein CD 11b ist ein Marker, der v.a. von Makrophagen und NK-Zellen exprimiert wird. Es wurden Schnitte aus der Endkontrolle und der Radiatigruppe ausgewertet und jeweils der Mittelwert gebildet. Es ist jedoch zu erwähnen, dass sowohl die Anzahl, als auch die Verteilung der Makrophagen und NK-Zellen in den Tumoren (einer Zelllinie und Therapiegruppe) sehr stark variieren und ein inhomogenes Bild ergeben. Die Ergebnisse der OH-1 Gruppe zeigen, dass vermehrt Makrophagen und NK-Zellen im Randbereich (11%) und im vitalen Tumorgewebe (16,7%) der bestrahlten Tumore sind (E: 8,5% / 4,3%). Die Anzahl im nekrotischen Gewebe (4,7%) und auch im Bindegewebe (9%) ist geringer als in den Tumoren der Endkontrolle (5,6% / 20,1%). Phagozytose betreibende Makrophagen und NK-Zellen sind in der unbehandelten Gruppe vermehrt zu finden (50% zu 31,3% in RT). In der H69 Gruppe finden sich vermehrt Makrophagen und NK-Zellen in den bestrahlten Tumoren (OH-1: 13,2%, 8,2%, 8%; H69: 3%, 0,2%, 3%). Ausgenommen davon ist das Bindegewebe (16,2%), denn dort befindet sich eine höhere Anzahl Zellen in den Tumoren der Endkontrollgruppe (20%). Phagozytose aktive Zellen finden sich in beiden Gruppen gleichermaßen (OH-1: 52%, H69: 65% (alles > 40% = +++)).

Die Ergebnisse sind in einem Tortendiagramm in Abb. 8 a und b dargestellt.



**Abb. 8a** Darstellung des prozentualen Anteils CD11b markierter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytischer Zellen (OH-1).

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen, wobei o =  $\leq 5\%$ , + =  $\leq 20\%$ , ++ =  $\leq 40\%$ , +++ =  $\geq 40\%$  entsprechen. In dem linken Diagramm sind die Werte der bestrahlten Tumore aus der OH-1 Gruppe gezeigt, in dem rechten die Werte der unbehandelten Tumore dieser Gruppe. Im Rand (1) sind eine ähnliche Anzahl Leukozyten in den Tumoren der behandelten und der unbehandelten Tumore. In den nekrotischen Arealen (2) und den Bindegewebssepten (3) sind vermehrt angefärbte Zellen in der unbehandelten Gruppe, während im vitalen Tumorgewebe (4) mehr Leukozyten in den bestrahlten Tumoren vorkommen. Der Anteil phagozytischer Leukozyten ist in der Endkontrollgruppe höher.

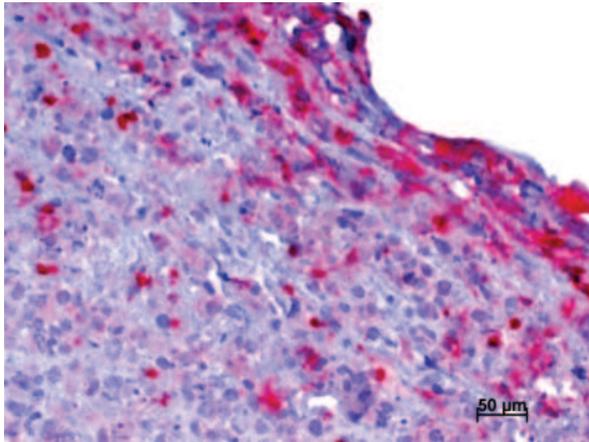


**Abb. 8b** Darstellung des prozentualen Anteils CD11b markierter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytierender Zellen (H69).

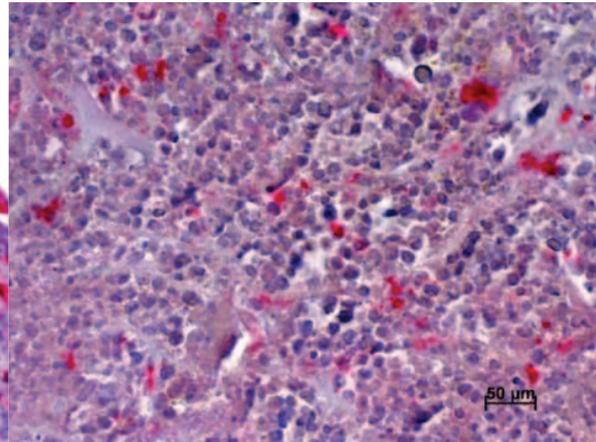
Gezeigt wird der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen, wobei o =  $\leq 5\%$ , + =  $\leq 20\%$ , ++ =  $\leq 40\%$ , +++ =  $\geq 40\%$  entsprechen. In dem linken Diagramm sind die Werte der bestrahlten Tumore aus der H69 Gruppe gezeigt, in dem rechten die Werte der unbehandelten Tumore dieser Gruppe. Im Rand des Tumors (1), im nekrotischen Gewebe (2) und im vitalen Tumorgewebe (4) ist die Menge angefärbter Leukozyten in den bestrahlten Tumoren größer, in den Bindegewebssepten (3) sind mehr Zellen in den unbehandelten Tumoren gefärbt. Der Anteil der phagozytierenden Leukozyten (5) ist ähnlich ( $\geq 40\%$ ).

In Abb. 8 c – f sind Abbildungen der CD11b gefärbten Primärtumore der OH-1 (c und d) und der H69 (e und f) Gruppe dargestellt.

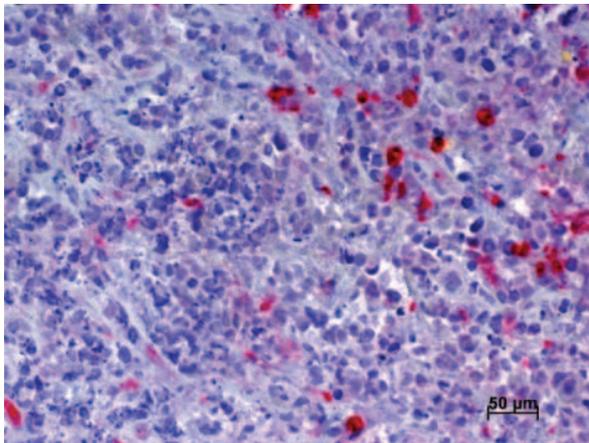
8c) Primärtumor RT (OH-1)



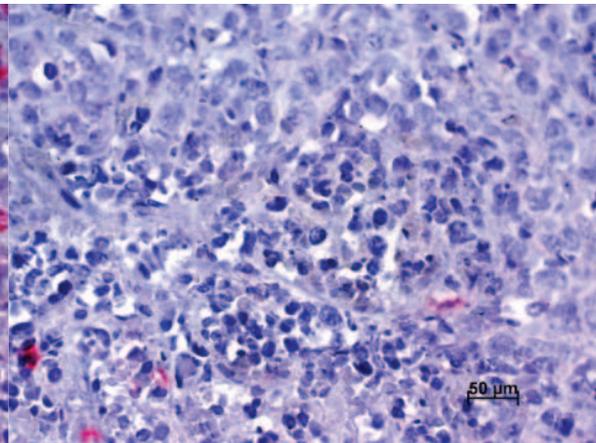
8d) Primärtumor E (OH-1)



8e) Primärtumor RT (H69)



8f) Primärtumor E (H69)

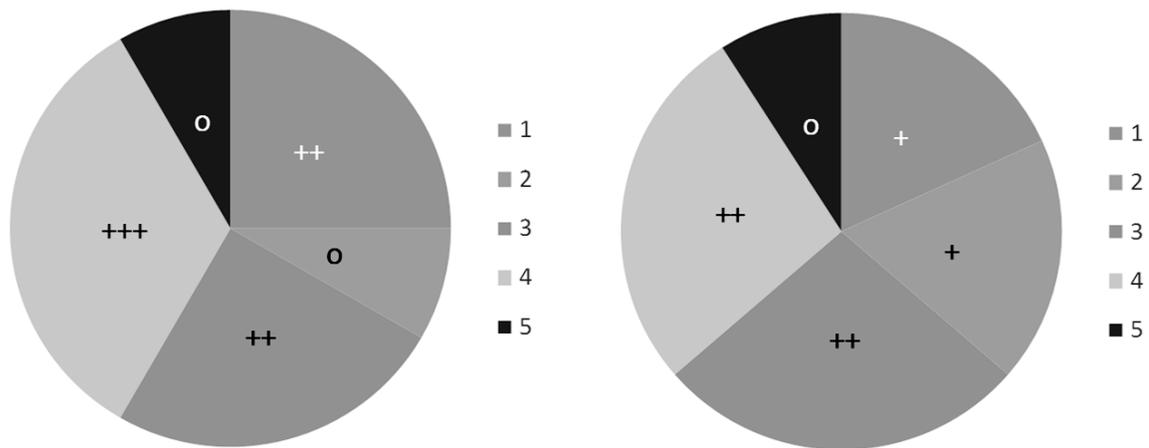
**Abb. 8 c bis f****Darstellung eines bestrahlten und eines unbehandelten Tumors beider Zelllinien mit einer CD11b-Markierung.**

In der CD11b-Markierung sind die Makrophagen und NK-Zellen rot gefärbt. Zu sehen ist eine deutlich höhere Anzahl an angefärbten Zellen in dem unbehandelten Tumor der OH-1 Gruppe (Abb. 8d). Ausnahme ist das vitale Tumorgewebe, dort sind vermehrt Zellen in dem bestrahlten Tumor (Abb. 8c) zu sehen. In der H69 Gruppe ist eine höhere Anzahl an markierten Zellen in dem behandelten Tumor (Abb. 8e) zu erkennen. Nur im Bindegewebe finden sich mehr markierte Zellen in dem unbehandelten Tumor (Abb. 8f).

### 3.4.7 BSA-I-Färbung

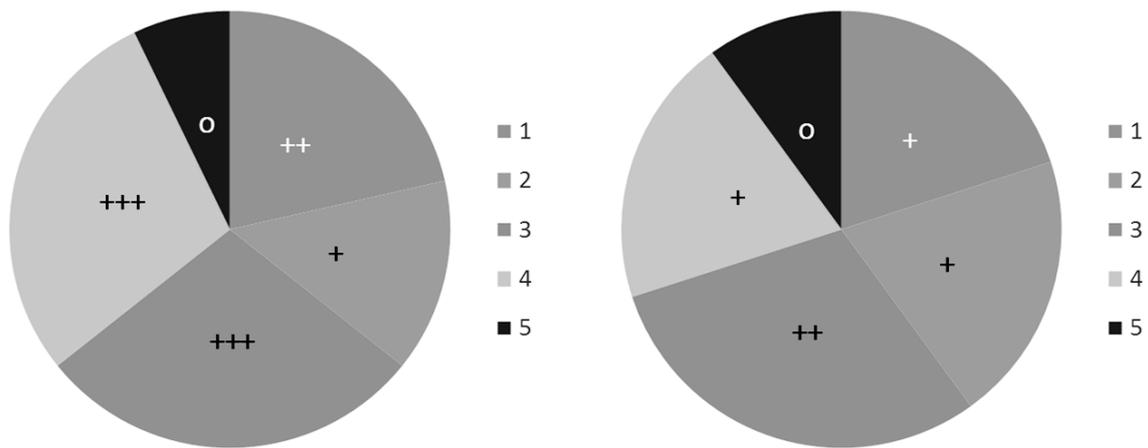
BSA-I ist ein Lektin, das Zuckerbindungsstellen auf dendritischen Zellen erkennt. Diese Zellen sind Zellen des Immunsystems. Ausgewertet wurden die Schnitte aus der Endkontrollgruppe und der Bestrahlungsgruppe. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet. Es ist jedoch zu erwähnen, dass sowohl die Anzahl, als auch die Verteilung der dendritischen Zellen in den Tumoren (einer Zelllinie und Therapiegruppe) sehr stark variieren und ein inhomogenes Bild ergeben. Die Anzahl dendritischer Zellen ist in der OH-1 Gruppe in den bestrahlten Tumoren gleich (RT: 3: 36,6%, E: 3: 34,2%; 5: 4% in RT zu 2% in E) oder größer (RT: 1: 24,2%, E: 19,3%; RT: 4: 46,6%, E: 23,9%). Die nekrotischen Areale sind in der Endkontrollgruppe (5,3%) vermehrt angefärbt im Vergleich zu der bestrahlten Gruppe (4,6%). In der H69 Gruppe sind alle Bereiche in den bestrahlten Tumoren vermehrt mit dendritischen Zellen durchsetzt (RT: 1: 33%, E: 11,8%; RT: 3: 40%, E: 23,6%; RT: 4: 41%, E: 18,6%). Die Anzahl im nekrotischen Areal (RT: 8%) und die Phagozytose aktiven Zellen (RT: 4%) ist gleich mit denen der unbehandelten Tumoren (2: 10,8%, 4: 3,5%).

Die Ergebnisse sind in Abb. 9 a und b als Tortendiagramm dargestellt.



**Abb. 9a** Darstellung des prozentualen Anteils BSA-I gefärbter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytierender Zellen (OH-1).

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen, wobei o= ≤5%, x= ≤20%, xx= ≤40%, xxx= ≥40% entsprechen. In dem linken Diagramm sind die Werte der bestrahlten Tumore aus der OH-1 Gruppe gezeigt, in dem rechten die Werte der unbehandelten Tumore dieser Gruppe. In den Bindegewebssepten (3) ist die Anzahl der Leukozyten in den bestrahlten und unbehandelten Tumoren ähnlich, während in dem Tumorrand (1) und dem vitalen Gewebe (4) mehr Zellen in den behandelten Tumoren angefärbt sind. In den nekrotischen Arealen (2) sind vermehrt Leukozyten in der unbehandelten Gruppe. Der Anteil phagozytierender Zellen ist in behandelten und unbehandelten Tumoren ähnlich.

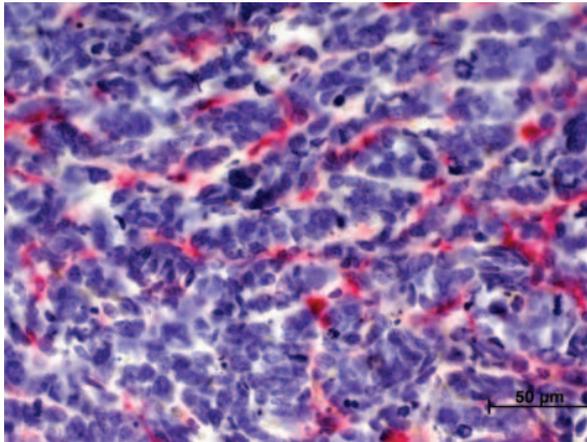


**Abb. 9b** Darstellung des prozentualen Anteils BSA-I gefärbter Zellen in den verschiedenen Tumorbereichen und des Anteils phagozytierender Zellen (H69).

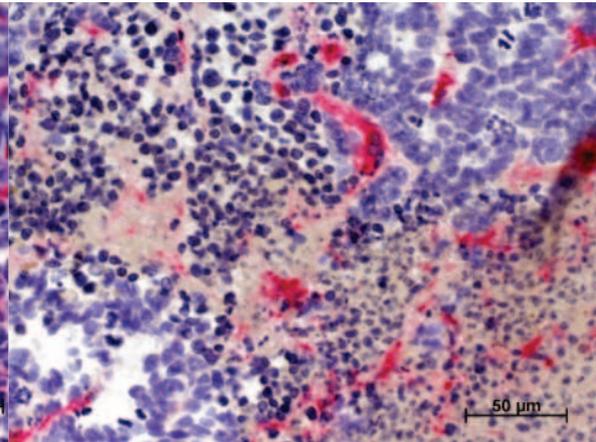
Gezeigt wird der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen, wobei o =  $\leq 5\%$ , + =  $\leq 20\%$ , ++ =  $\leq 40\%$ , +++ =  $\geq 40\%$  entsprechen. In dem linken Diagramm sind die Werte der bestrahlten Tumore aus der H69 Gruppe gezeigt, in dem rechten die Werte der unbehandelten Tumore dieser Gruppe. Im Tumorrand (1), in den Bindegewebssepten (3) und im vitalen Tumorgewebe (4) sind vermehrt Leukozyten in den bestrahlten Tumoren zu finden, während die Anzahl in den nekrotischen Bereichen (2) in den bestrahlten und unbestrahlten Tumoren ähnlich hoch ist.. Auch der Anteil phagozytierender Zellen ist ähnlich.

Bilder der BSA-I gefärbten Tumoren sind in Abb. 9 c - f gezeigt.

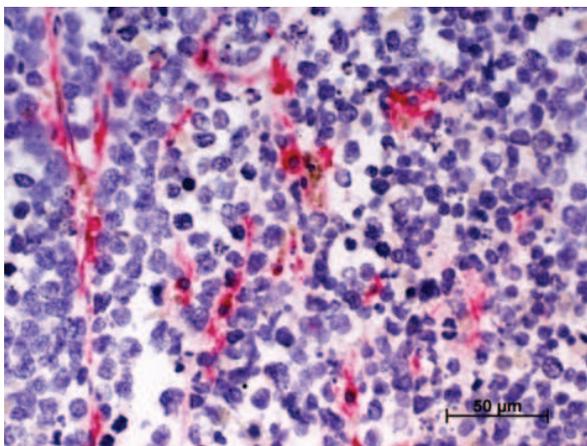
9c) Primärtumor RT (OH-1)



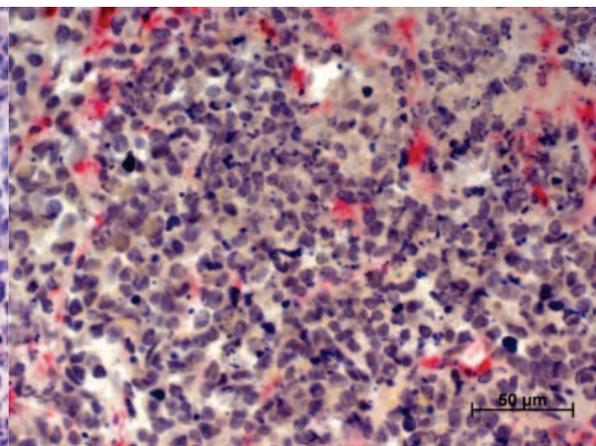
9d) Primärtumor E (OH-1)



9e) Primärtumor RT (H69)



9f) Primärtumor E (H69)



**Abb. 9c bis f** Darstellung eines bestrahlten und eines unbehandelten Tumors der OH-1 Gruppe (Abb. 9 c und d) und der H69 Gruppe (Abb. 9 e und f)

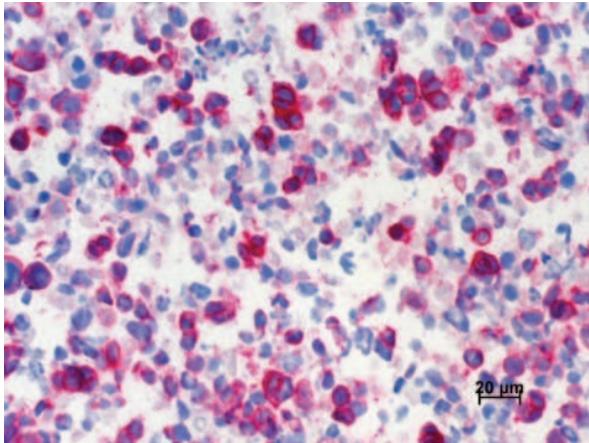
Dendritische Zellen sind in der BSA-I-Färbung rot gefärbt. Es ist zu sehen, dass sich in den bestrahlten Tumoren vermehrt angefärbte Zellen befinden.

### 3.4.8 NCAM-Darstellung

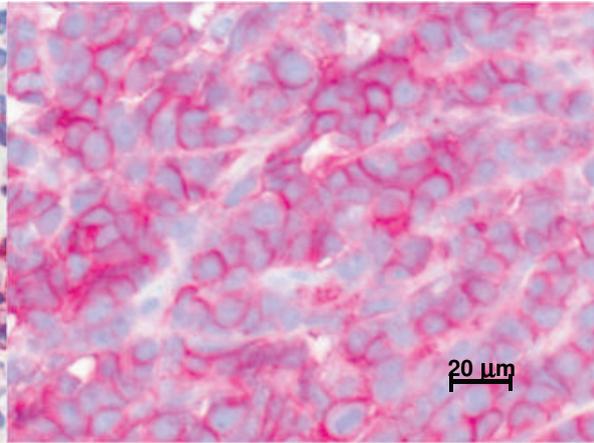
NCAM ist ein Glykoprotein, das unter anderem auf der Oberfläche humaner Tumorzellen der Zelllinie OH-1 und H69 exprimiert wird. Der histologische Nachweis von NCAM wurde sowohl auf einem Zellpellet der OH-1 Zellen, als auch auf einem Primärtumor (höchste Zellzahl laut Alu-PCR) durchgeführt. Die Auswertung zeigt eine höhere Anzahl angefärbter Zellen in dem Primärtumor verglichen mit dem Zellpellet.

In Abb.10 a – c sind die Ergebnisse der NCAM Färbung abgebildet.

10 a)



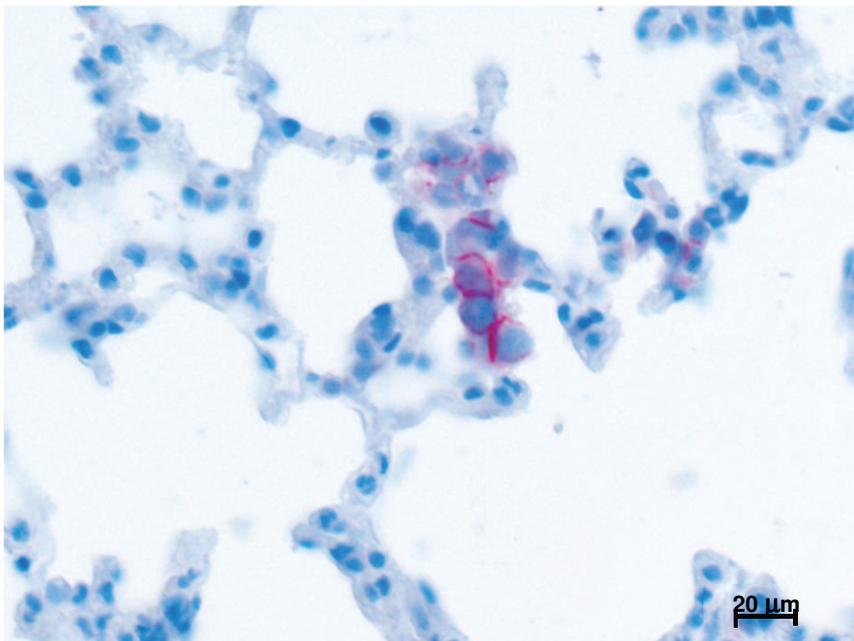
10 b)



**Abb. 10 a und b** Darstellung der NCAM-Markierung eines Zellpellets (a) und eines Primärtumors aus der OH-1 Gruppe (b).

In situ sind praktisch alle Zellen NCAM positiv, während in vitro deutlich weniger Zellen markiert sind.

Des Weiteren wurde eine OH-1 Lunge mit NCAM gefärbt. Die histologische Darstellung einer Lungenmetastase dient der Bestätigung der Alu-PCR Ergebnisse. Diese ist in Abb. 10 c dargestellt.



**Abb. 10c** Darstellung einer OH-1 Lungenmetastase.

Die humanen Tumorzellen stellen sich in der NCAM-Färbung rot dar.

## 4 Diskussion

Obwohl Chemo- und Strahlentherapie eine breite Anwendung bei der Behandlung von Krebspatienten finden, sind in den letzten Jahren tierexperimentelle Befunde erhoben worden, die zeigen, dass durch Chemo- und Strahlentherapie die Metastasierung bösartiger Tumoren gefördert wird (Camphausen et al., 2001, Sofia Vala et al., 2010). Würden diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sein, hätte dieser Befund fatale Folgen für die Anwendung gängiger Krebstherapien. Aus diesem Grund wurde ein Mausmodell gewählt, welches möglichst genau die Situation in der Klinik widerspiegelt, um die Hypothese zu untersuchen, ob eine Bestrahlung des Primärtumors wirklich die Anzahl der Metastasen erhöht. Es wurden humane Tumorzellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms in immunsupprimierte SCID Mäuse injiziert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit sind bei beiden gewählten Bronchialkarzinomzelllinien OH-1 und H69 sehr ähnlich und zeigen ein gutes Anwachsen der Zellen im Implantationsgebiet der SCID Mäuse und einen signifikanten Rückgang der CTCs im Blut und auch der DTCs in der Lunge und der Leber nach Bestrahlung der Primärtumore. Vergleicht man die Bestrahlungsgruppe mit der Endkontrollgruppe, konnte ein Rückgang der CTCs und DTCs in Lunge und Leber um >99% (OH-1) und > 97% (H69) gezeigt werden.

Diese Erkenntnisse stellen einen deutlichen Gegensatz zu den Ergebnissen einer Arbeitsgruppe um Camphausen et al., (2001) dar, die eine enorme Zunahme der Lungenmetastasen in Mäusen nach Bestrahlung des Primärtumors zeigten. Die offensichtlichste Vermutung für die kontroversen Ergebnisse besteht darin, dass in beiden Experimenten unterschiedliche Zelllinien verwendet wurden. Während Camphausen et al. (2001) Zellen des murinen Lewis Lungenkarzinom verwendeten, wurden hier zwei humane SCLC Zelllinien verwendet. Der Primärtumor eines Lewis Lungenkarzinoms übt eine

stark anti-angiogene Wirkung auf die Metastasen aus (Camphausen et al., 2001). Solch eine Wirkung ist bei den hier verwendeten Zelllinien in der Literatur nicht beschrieben worden. Hier konnte eine enorm gesteigerte Gefäßeinsprossung im vitalen Tumorgewebe der Tumoren gezeigt werden, die unbehandelt blieben (OH-1: 17%, H69: 11%), im Vergleich zu den bestrahlten Tumoren (OH-1: 2,4%, H69: 3,2%). Dies ist vermutlich eine Ursache, warum eine signifikant höhere Anzahl an CTCs und DTCs in diesen Tumoren, im Vergleich zur Kontrollgruppe zu finden ist. Durch die vermehrte Anzahl an Blutgefäßen haben es die Tumorzellen leichter, in die Blutbahn und somit zu tumorfernem Gewebe zu gelangen (Dhakal et al., 2008). Auch in den hier vorgestellten Ergebnissen gab es keinen Anhaltspunkt, dass der Primärtumor das Metastasenwachstum negativ beeinflusst. Im Gegenteil: die Zerstörung des Primärknotens durch Bestrahlung hatte eine deutliche Reduzierung der Anzahl der Metastasen zur Folge (OH-1: 99% weniger CTCs und DTCs in Lunge und Leber in der bestrahlten Gruppe im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe und H69: 97% weniger).

Meine Untersuchungen zeigen, dass keine verallgemeinernde Aussage darüber zu treffen ist, welches Mausmodell sich besser für die Metastasenforschung eignet, es muss darauf geachtet werden welche Eigenschaften der jeweilige Primärtumor aufweist.

Die Arbeitsgruppe um Sofia Vala (2010) fand heraus, dass es zu einer gesteigerten endothelialen Zellmigration in das benachbarte Gewebe um das Bestrahlungsgebiet kommt, die wiederum das Tumorwachstum und die Metastasierung förderte. Dies geschah, wenn die Strahlendosis in dem gesunden Gewebe um den Primärtumor  $\leq 0,8$  Gy betrug (Sofia Vala et al., 2010). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde eine tumorfokussierte Teilkörperbestrahlung durchgeführt. Mit Hilfe eines Rasters wurde die Strahlung auf ein genau begrenztes Feld eingestellt und die Streustrahlung auf gesundes umliegendes Gewebe konnte auf  $<2\%$  ( $\leq 0,2$  Gy) beschränkt werden (Frenzel et al., 2014). Zwar war die Untersuchung des benachbarten Tumorgewebes auf endotheliale Zellmigration nicht Hauptaugenmerk der Arbeit, da aber

die Metastasierung durch eine Bestrahlung nicht gefördert wurde, ist davon auszugehen, dass es entweder zu keiner endothelialen Zellmigration in benachbartes Gewebe gekommen ist oder diese keinen Einfluss auf die Metastasierung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms hat.

Madani et al. (2008) zeigten, dass eine Bestrahlung des Primärtumors bestimmte Tumor-assoziierte Wirtszellen wie Endothelzellen, Leukozyten und Makrophagen, Myofibroblasten, Osteoblasten und –klasten sowie Nervenzellen durch die Heraufregulation bestimmter Moleküle aktiviert werden und es somit zu einer vermehrten Invasion und einer gesteigerten Metastasierung kommt (Madani et al., 2008). Es ist zu erwähnen, dass die Arbeitsgruppe ausschließlich an Zellen in Kultur und mit Tiertumoren forschte und nicht, wie in den hier gezeigten Versuchen, mit humanen Tumorzellen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Aspekte nicht fokussiert untersucht, allerdings konnten keine der oben genannten Zelltypen in den ausgewerteten Schnitten gefunden und keine Zunahme der Metastasierung gezeigt werden.

Besonders interessant an den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist, dass die Anzahl der DTCs in Lunge und Leber durch die Bestrahlung des Primärtumors oder der Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie sogar unter das Niveau der Tiere gesenkt werden konnte, die am Anfang des Experiments euthanasiert wurden (K) (in der OH-1 Zelllinie um >97% und in der H69 Zelllinie um >80%). Das bedeutet, dass es auch zu einem Tumorzelluntergang in Geweben kommt, welches nicht bestrahlt wird, da hier eine Teilkörperbestrahlung durchgeführt wurde. Newton et al. (2013) zeigten in einem mathematischen Modell, dass es drei unterschiedliche Wege der Metastasierung gibt:

- 1) Tumorzellen gelangen aus dem Primärtumor in die Blutbahn, kehren aber dann in den Primärknoten zurück (self-seeding),
- 2) CTCs, die aus einer Metastase in den Blutkreislauf gelangen, kehren in den Primärtumor zurück) (reseeding of the primary tumor) oder

- 3) CTCs lösen sich aus einer Metastase, gelangen ins Blut und siedeln sich dann aber wieder in der Metastase an (reseeding of metastatic tumors).

Eine Möglichkeit zu erklären, warum weniger DTCs in tumorfernem Gewebe nach der Tumorbestrahlung zu finden sind, ist, dass es bei den hier verwendeten Tumorentitäten vermehrt zu einem *reseeding of the primary tumor* kommt. Somit würden die Tumorzellen mit der Zeit zurück in den Primärtumor gelangen und somit doch mit bestrahlt werden.

Da, wie in der Literatur beschrieben, eine Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors und der Anzahl zirkulierender Tumorzellen im Blut besteht (Liao et al., 2014), ist die logische Konsequenz, dass es, wie hier gezeigt, zu einer drastischen Reduzierung der CTCs kommt, da der Tumor durch die Bestrahlung signifikant an Masse verliert (Anzahl der CTCs im Blut nach der Bestrahlung um 99% (OH-1) bzw. um 97% (H69) reduziert).

Es ist bereits aus der Literatur bekannt, dass sich Tumorzellen nur wenige Stunden in der Zirkulation befinden (Newton et al., 2013), sodass sich die Auswirkungen der Bestrahlung auf den Tumor und die damit verbundene geringere Auswanderung neuer Tumorzellen ins Blut innerhalb kürzester Zeit bemerkbar macht.

Noch ungeklärt ist, welche Auswirkungen die Bestrahlung des Primärtumors auf Metastasen in anderen Organen hat. Um zu untersuchen, was genau im Körper passiert und ob Tumorzellen weit ab des Bestrahlungsgebietes durch die Radiatio beeinflusst werden, sind weitere Versuche notwendig. Es wäre z.B. interessant zu untersuchen, wie sich eine operative Entfernung des Primärtumors auf die Anzahl disseminierter Tumorzellen in der Lunge und Leber auswirkt. Bethge et al. (2012) modellierten mit Hilfe eines Computermodells verschiedene Szenarien der Metastasierung und untersuchten, wie sich eine Resektion des Tumors auf die Metastasen auswirken könnte. Wurde der Primärtumor zwei Tage nach der Diagnose operativ entfernt und angenommen, dass auch die Metastasen metastasieren, konnte gezeigt werden,

dass es zwar zu einer kurzen Pause der Metastasierung kommt, nach einiger Zeit wurde aber eine erneute Zunahme der Anzahl an Metastasen beobachtet. Wurde davon ausgegangen, dass ausschließlich der Primärtumor metastasiert, blieb dieser Anstieg aus. Das zweite Szenario in diesem Computermodell war, dass der Tumor operativ entfernt wird, wenn er die kleinste detektierbare Größe von 1g hat. Auch in diesem Fall zeigten die Ergebnisse ein Aussetzen der Metastasierung, wenn davon ausgegangen wurde, dass auch die Metastasen metastasieren. Ein erneuter Anstieg der Anzahl der Metastasen blieb aus, wenn vorausgesetzt wurde, dass nur der Primärtumor metastasiert. Diese Resultate beziehen sich allerdings auf das hepatozelluläre Karzinom, sodass nicht gesagt ist, dass es sich mit dem SCLC genauso verhält. Weitere Versuche in dieser Richtung mit Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, aber auch Versuche an Mausmodellen wären erforderlich, um die Fragestellung zu klären, ob es wirklich die Bestrahlung ist, die sich auf tumorfernes Gewebe auswirkt oder ob derselbe Effekt gezeigt werden kann, wenn der Tumor operativ entfernt wird. Verringert sich die Anzahl der CTCs durch eine Resektion des Tumors nicht, kann davon ausgegangen werden, dass es tatsächlich die Bestrahlung ist, die sich auch auf tumorfernes Gewebe auswirkt. Dann wäre es sehr interessant zu untersuchen, welche Abläufe im Körper z. B. auf molekularer Ebene zu diesem Rückgang führen.

Ein weiteres Ergebnis unserer Untersuchungen ist, dass die Chemotherapie allein keine signifikante Reduzierung der CTCs im Blut und DTCs in Lunge und Leber bewirkt. Dies könnte darin begründet sein, dass den Mäusen eine nicht ausreichende Dosis Cisplatin appliziert wurde oder aber dadurch, dass ausschließlich Cisplatin und nicht die in der Klinik häufig eingesetzte Kombination aus Cisplatin und Etoposid verwendet wurde (Kondo et al., 1994, Hubaux et al., 2010). In der Humanmedizin ist die Chemotherapie erstes Mittel der Wahl bei der Behandlung des SCLC, weil es meist im Stadium der Metastasierung diagnostiziert wird. Das SCLC ist dabei zuerst einmal sehr sensibel gegenüber Chemotherapeutika. Der Tumor lässt sich deutlich verkleinern oder verschwindet sogar komplett, doch kommt es fast immer zu

Rezidiven und diese sind dann chemoresistent (Hurwitza et al., 2009). Somit zielt eine Chemotherapie auf die Lebensverlängerung und die Verbesserung der Lebensqualität ab (Pharmazeutische Zeitung (Internetquelle Nr. 6)). In Vorversuchen wurde die Dosis der Chemotherapeutika ermittelt, die die Tiere tolerierten. Die Kombination aus Cisplatin und Etoposid überlebten die Mäuse nicht, sodass sich auf eine relativ geringe Dosis Cisplatin beschränkt werden musste.

Interessant ist außerdem, dass es in den hier durchgeführten Experimenten zu keiner Verminderung der DTCs im Knochenmark und Gehirn kommt. Da die Anzahl der humanen OH-1- Zellen im Knochenmark sogar ohne Therapie bei längerem Überleben rückläufig ist (in K mehr Zellen als in E), ist davon auszugehen, dass es sich beim Knochenmark lediglich um ein vorübergehendes Reservoir der disseminierten Tumorzellen handelt.

Das Gehirn gilt beim Menschen als einer der bevorzugten Metastasierungsorte des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Deutsches Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst (Internetquelle Nr. 7)). Heutzutage ist schon eine prophylaktische Bestrahlung des Gehirns oft Teil der Therapie (Zhang et al., 2014). Dass in dem durchgeführten Experiment wesentlich weniger disseminierte Tumorzellen im Gehirn zu finden waren als in der Lunge und der Leber, könnte daran liegen, dass die Tiere 10 Tage nach Ende der Therapie euthanasiert wurden und somit nicht genug Zeit war, Metastasen im Gehirn zu bilden. Alternativ könnte aber im Maus-Tumormodell das Gehirn kein bevorzugter Metastasierungsort des SCLCs sein.

Die Kontrollgruppe, die eine hohe Anzahl an CTCs und DTCs aufweist, zeigt, dass der Metastasierungsprozess bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung beginnt. Diese Erkenntnis wurde bereits anhand eines mathematischen Modells in der Literatur beschrieben (Newton et al., 2013) und konnte hier tierexperimentell bestätigt werden. Deshalb ist eine Diagnose im Frühstadium der Erkrankung von großer Bedeutung für das Überleben der Patienten. Slotman et al. (2015) konnte zeigen, dass sich die Bestrahlung des Tumors positiv auf das Langzeit-Überleben der SCLC-Patienten auswirkt

(die zwei-Jahres-Überlebensrate wuchs nach Bestrahlung auf 13% im Gegensatz zu der unbestrahlten Kontrollgruppe mit lediglich 3%).

In dem hier vorgestellten Experiment mussten insgesamt 28 Tierverluste verzeichnet werden, davon verstarben 27 Mäuse spontan ohne äußerlich erkennbaren Grund oder mussten aufgrund eines verschlechterten Allgemeinbefindens (Scoreliste: s. Anhang) aus dem Versuch genommen werden. Die Tiere, die anschließend auf ihre Todesursache untersucht wurden, zeigten bei der Sektion ein deutliches mediastinales Lymphom. Da auch Mäuse verwendeten, die noch keine Tumorzellen injiziert bekommen hatten, muss davon ausgegangen werden, dass es sich um mauseigene Lymphome handelt. Diese Beobachtung gibt Anlass erneut zu überdenken, ob SCID- Mäuse für diese Art Tierversuche geeignet sind oder ob sie aufgrund ihres Gendefektes zu anfällig für murine Erkrankungen sind. In der Literatur ist beschrieben, dass 15% der SCID Mäuse zu spontanen Lymphomen neigen (The CB17/Icr-Prkdc<sup>SCID</sup>/IcrIcoCrl Mouse, Charles River). Auf der anderen Seite haben SCID Mäuse durch ihren Gendefekt den Vorteil, dass humane Zellen überhaupt anwachsen. Aus diesem Grund werden sie nach wie vor in der Tumorforschung verwendet.

Martin et al. (2014) führten eine klinische Studie durch, in der die Anzahl zirkulierender Tumorzellen bei Patienten mit non-small-cell-lung-cancer unter Bestrahlung analysiert wurden. Sie fassten zusammen, dass die Radiation zu einem vermehrten Auswaschen von Tumorzellen ins Blut führte. Sie nahmen Proben unmittelbar vor Therapiebeginn, 24 Stunden nach der ersten Bestrahlung und zwei weitere während der Therapie. Im Unterschied dazu konnten in dem hier vorgestellten Experiment nur am Ende bei der Sektion der Tiere Proben genommen werden und diese zeigten eine verminderte Anzahl an CTCs (OH-1: K: 4,34; RT: 0,14 und H69: K: 272; RT: 20,9). Es wäre interessant durch Blutentnahme zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie zu analysieren, wann erstmals eine Abnahme der auswandernden Tumorzellen sichtbar ist, wie sich die Anzahl dieser über die Dauer der Therapie verändert, ob die Abnahme konstant ist oder proportional zur Zerstörung des

Tumorgewebes. Letzteres ist zu erwarten, da die Anzahl der CTCs mit der Größe des Primärtumors korreliert (Liao et al., 2014).

Die durchgeführten immunhistochemischen Markierungen verdeutlichen die morphologische Veränderung der Primärtumore durch die Bestrahlung. Es kommt zu vermehrter Nekrose und Apoptose und zu einer verringerten Proliferation und Gefäßsprossung. Dies zeigt, dass der Tumor durch die Bestrahlung zugrunde geht und somit weniger neue Tumorzellen in die Zirkulation gelangen können. Auch diese Ergebnisse unterstützen die der Alu-PCR, die einen Rückgang der zirkulierenden Tumorzellen nach Bestrahlung zeigen.

Da es sich bei den verwendeten Zelllinien OH-1 und H69 um Neuralleistenabkömmlinge handelt, die das Glycoprotein NCAM exprimieren (Lange et al., 2011), konnten mit Hilfe eines human-spezifischen Antikörpers Lungenmetastasen sichtbar gemacht werden. Vergleicht man das histologische Bild eines mit NCAM markierten Zellpellets mit dem eines NCAM markierten Primärtumors, fällt auf, dass vermehrt in situ NCAM exprimiert wird. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich die Expression der Zelladhäsionsmoleküle verändert, wenn die Zellen nicht mehr als Monolayer auf einem Plastiksubstrat wachsen, sondern in einem 3D Verband im Stroma der Mäuse (Schwankhaus et al., 2014).

Des Weiteren wurde die Entzündungsreaktion in den bestrahlten Tumoren untersucht und mit denen der unbehandelten verglichen. Hierfür wurden verschiedene Marker verwendet, um unterschiedliche Entzündungszellen sichtbar zu machen (CD45 als Pan-Leukozytenmarker, CD11b als Makrophagen- und NK-Zellen-Marker und BSA-I als Marker für dendritische Zellen). Es zeigte sich allerdings ein sehr inhomogenes Bild. Während manche bestrahlten OH-1 Tumoren z.B. eine hohe Anzahl Leukozyten im vitalen Tumorgewebe aufwiesen, konnten im nächsten bestrahlten OH-1 Tumor fast gar keine Leukozyten gefunden werden oder aber vermehrt in einem anderen Bereich des Tumors, wie z.B. im Tumorrand. Diese Heterogenität zeigte sich durchweg in allen ausgewerteten Schnitten, sodass keine Aussage getroffen werden kann, ob die Bestrahlung eines Tumors eine Entzündungsreaktion

fördert oder nicht. Viele Tumore wurden durch die Bestrahlung komplett zerstört, sodass nur eine kleine Anzahl bestrahlter Tumoren zur Auswertung zur Verfügung stand. Es wäre sicherlich interessant in einem weiteren Versuch mit mehr zur Verfügung stehenden Tumoren diese Untersuchung zu wiederholen.

Die Arbeitsgruppe um Horny et al. untersuchte sowohl Primärtumore des invasiven Mammakarzinoms als auch metastatisch veränderten Lymphknoten auf den Ort und die Anzahl infiltrierender lymphoretikulärer Zellen (Horny et al., 1986). Dazu wurden unterschiedliche immunhistochemische Markierungen durchgeführt. Makrophagen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen, NK-Zellen, Mastzellen und eosinophile Granulozyten wurden dargestellt (Horny et al., 1986). Sie konnten zeigen, dass die Entzündungszellen vor allem in das Tumorstroma infiltrieren, deutlich weniger hingegen in das Tumorzentrum (Horny et al., 1986). Makrophagen machten den Großteil der infiltrierten Zellen aus, gefolgt von T-Lymphozyten. B-Lymphozyten und NK-Zellen waren in geringen Mengen vorhanden. Plasmazellen, Mastzellen sowie eosinophile Granulozyten konnten im invasiven Mammakarzinom nicht detektiert werden (Horny et al., 1986).

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Markierungen mit dem Primärantikörper CD45, CD11b und dem Lektin BSA-I durchgeführt. Eine Unterteilung in die einzelnen Zelltypen der Leukozyten war nicht möglich, da hier ein Panleukozytenmarker (CD45) verwendet wurde. Lediglich die Makrophagen und NK-Zellen wurden separat durch CD11b dargestellt und dendritische Zellen durch das Lektin BSA-I. Vergleicht man nun die Ergebnisse der unbehandelten Tumore in der hier vorgestellten Arbeit mit denen der Arbeitsgruppe um Horny, fällt auf, dass keine eindeutige Korrelation zwischen den Befunden besteht. Zwar konnte auch hier gezeigt werden, dass im Verhältnis zu den anderen ausgewerteten Tumorgebieten, in allen Zelltypen eine ähnliche oder größere Anzahl infiltrierter Zellen im Stroma zu finden sind, aber auch im Tumorrand, in nekrotischen Arealen und im vitalen Tumorgewebe konnte eine deutliche Anzahl dieser Zellen detektiert werden. Es

sollte erwähnt werden, dass nicht nur die Ergebnisse dieser Arbeit, sondern auch die der Arbeitsgruppe um Horny nicht einheitlich in Bezug auf die Menge und die Verteilung der infiltrierten Zellen waren. Wie bereits beschrieben, war in dieser Arbeit weder ein homogenes Bild der Verteilung der infiltrierten Zellen innerhalb der ausgewerteten Tumorbereiche, noch in den Tumoren einer Zelllinie und einer Therapiegruppe zu erkennen.

Die Hypothese dieser Arbeit besagt, dass sich die Bestrahlung des Primärtumors negativ auf die Anzahl der Metastasen auswirkt, d.h. dass es zu einem Anstieg der Metastasen kommt. Obwohl auch diese Untersuchungen, genau wie die der Arbeitsgruppe um Camphausen et al. (2001) an einem Mausmodell durchgeführt wurden und die Ergebnisse somit nicht exakt in die Humanmedizin übertragbar sind, sind die hier gezeigten Ergebnisse durchaus als positiv zu bewerten und zeigen, dass die gängig angewandte Krebstherapie sowohl zur Zerstörung des Primärtumors als auch zur deutlichen Reduzierung der Metastasen bei den hier untersuchten Tumoren führt.

## 5 Zusammenfassung

Bösartige Tumore der Lunge stellen die häufigste Krebstodesursache beim Mann (23,6%) und die zweithäufigste (13,8%) bei der Frau dar. Das kleinzellige Bronchialkarzinom macht dabei einen Anteil von rund 13% aus. Die meisten Patienten sterben jedoch nicht an dem Primärtumor, sondern an den Metastasen. Das kleinzellige Bronchialkarzinom neigt zu einer sehr frühen Disseminierung, ist zudem aber hoch sensitiv gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie. Aus diesen Gründen wurde bei den hier vorgestellten Untersuchungen diese Tumorentität verwendet.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Bestrahlung und/oder Chemotherapie auf die Metastasierung zu untersuchen. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden heraus, dass eine Bestrahlung des Primärtumors die Metastasierung fördert. Diese Ergebnisse stellen die gängige Krebstherapie infrage und sind Auslöser für die vorgestellte Studie.

Eine Million Tumorzellen der Zelllinie OH-1 bzw. H69 wurden jeder SCID Maus subkutan in die rechte Flanke injiziert. Nach Anwachsen eines palpierbaren Tumorknotens wurden die Tiere in fünf Versuchsarme eingeteilt: die Anfangskontrollgruppe (keine Therapie, Tötung an Tag zwei), eine Bestrahlungsgruppe (Bestrahlung mit je 10 Gy an fünf konsekutiven Tagen), eine Chemotherapiegruppe (Applikation von Cisplatin i.p. an Tag 1), eine Kombinationsgruppe (Bestrahlung+Chemotherapie) und die Endkontrollgruppe (keine Therapie). Euthanasiert wurden alle Mäuse der letzten vier Gruppen an Tag 15. Für die weiteren Analysen wurde das Blut und Knochenmark, die Lunge, Leber und das Gehirn entnommen. Die DNA wurde aus den Geweben isoliert und mittels Alu-PCR quantifiziert.

Der quantitative Nachweis humaner Zellen in murinem Gewebe zeigt, dass die Bestrahlung und die Kombinationstherapie die Anzahl zirkulierender bzw. disseminierender Tumorzellen im Blut (Anfangskontrollgruppe (K): 4,34 (OH-1)/ 272 (H69), Endkontrollgruppe (E): 316/ 1087, Bestrahlungs-

gruppe (RT): 0,14/ 20,9 und Radio-und Chemotherapiegruppe (RChT): 0,12/ 16,2) und der Lunge (K: 8,71/ 1525, E: 1635/ 16425, RT: 0,01/ 277, RChT: 0,01/ 306) und Leber (K: 31,9/18,2, E: 56,5/ 89,2, RT: 0,01/ 2,93, RChT: 0,01/ 0,45) signifikant reduziert. Die Chemotherapie allein wirkt sich nicht auf die Metastasierungsrate aus (Chemotherapiegruppe (ChT): Blut: 403/ 313, Lunge: 1504/1421, Leber: 33,9/ 63,2). Im Knochenmark und im Gehirn nimmt die Zahl der Tumorzellen über die Zeit des Tierüberlebens nicht zu (Knochenmark K: 34,3/ 1,02 E: 2,51/ 1,59, Gehirn K: 3,13/ 0,02, E: 2,62/ 12,1)). Die unterschiedlichen Therapien zeigten darüber hinaus keinen signifikanten Einfluss. Diese Ergebnisse konnten für beide Zelllinien gezeigt werden.

Eine Lungenmetastase wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Markierung (neural cell adhesion molecule (NCAM)) dargestellt, um den histologischen Nachweis zur Alu-PCR zu bringen.

Des Weiteren wurde die Fragestellung bearbeitet, wie sich die Bestrahlung auf den Primärtumor auswirkt. Dafür wurden die Tumore zu Anfang der Therapie palpirt und das Volumen geschätzt. Bei der Sektion wurden diese gewogen und miteinander verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme des Gewichtes nach der Radiatio.

Um morphologische Unterschiede zu betrachten, wurden verschiedene Färbungen der Tumoren angefertigt. Die HE-Färbung und die Feulgenfärbung zeigten einen signifikant höheren Anteil an Nekrose und Apoptose (46%/ 55% in RT zu 17%/ 20% in E) im Tumor nach der Bestrahlung, während die Proliferation der Tumorzellen (Ki67-Färbung) und die Anzahl der Gefäße (S1P1-Rezeptor-Färbung) deutlich reduziert waren (2,3%/ 0,9% Proliferation in RT zu 24%/ 4,6% in E und 2,4%/ 3,2% Gefäße in RT zu 17%/ 11% in E). Die Markierung mit verschiedenen Entzündungsmarkern (CD45, CD11b und BSA-I) zeigte eine große Schwankungsbreite sowohl innerhalb der einzelnen Gruppen (in manchen bestrahlten OH-1 Tumoren waren viele Leukozyten, in anderen kaum), als auch im Vergleich der Gruppen untereinander (in den bestrahlten OH-1 Tumoren waren z. B. vermehrt Leukozyten, während in der

H69 Gruppe eine höhere Anzahl Leukozyten in den unbehandelten Tumoren war). Diese Ergebnisse lassen keine konkrete Aussage über die Beeinflussung einer Entzündungsreaktion durch die Bestrahlung zu.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich gängige Krebstherapien nicht nur positiv auf den Primärtumor, sondern auch auf die Anzahl der Metastasen auswirken (s. Alu-PCR Ergebnisse). Aufgrund der zu geringen Anzahl der auszuwertenden immunhistochemischen Markierungen und der großen Schwankungsbreite, ist es jedoch nicht möglich eine Aussage über eine verstärkte Entzündungsreaktion im Primärtumor durch die Bestrahlung zu treffen.



## 6 Summary

### **Effects of radio- and radiochemotherapy on primary tumours and spontaneous distant metastases in xenograft models of human small cell lung cancer.**

Lung cancer is the most common cause of death in male cancer patients (23,6%) and the second most common in female patients (13,8%). From all of the histological types of lung cancer, 13% are classified as small cell lung cancers (SCLC). As in most other cancers, the majority of lung cancer patients die from distant metastases and not from the primary tumor. SCLC is characterized by an early dissemination of the cancer cells so that the first line therapy is predominantly a combined radio- and chemotherapy, to which SCLC is generally initially very sensitive. SCLC is therefore an obvious candidate to investigate the effects of radiochemotherapy on cancer metastasis. Two different human SCLC cell lines (OH-1 and H69) were used to investigate whether metastatic progression might be influenced by radiotherapy and/or chemotherapy as it has been proposed in the literature. As many cancer patients are treated with radiotherapy, these results challenge the common therapy and have catalyzed my investigation into a clinically relevant xenograft model of spontaneous metastasis.

One million SCLC cells were injected (subcutan) into the right lower flank of the SCID mice. After tumors had developed, tumor bearing animals were grouped into five arms according to different therapies:

- 1) K = first control group. Mice of the control group did not receive any therapy. They were sacrificed one day after the other animals were treated the first time.
- 2) RT = radiation therapy. These mice were given radiation therapy on five consecutive days, each day a dose of 10 Gy.

- 3) RChT = These mice received a combination of radio- and chemotherapy consisting of 6 mg/kg Cisplatin on day one.
- 4) ChT = chemotherapy. Mice belonging to this group were only treated with chemotherapy (Cisplatin on day one).
- 5) E = second control group. These animals did not receive any therapy. They were sacrificed together with treated mice (day 15).

DNA from blood, bone marrow, lung, liver and brain was isolated and Alu-PCR (using human specific sequences) was performed to quantify human tumor cells.

The results show that radiotherapy and the combination of radio- and chemotherapy decreased the number of circulating tumor cells (CTC) in the blood. In addition disseminated tumor cells (DTC) were also reduced in lung and liver. The numbers of DTCs in bone marrow and brain were not decreased. However, the numbers of cells in these tissues were not increased during the time without any therapy. Chemotherapy alone neither decreased CTC nor DTC numbers.

The influence of radiotherapy on the primary tumor was also investigated. Therefore the tumor volume at the beginning of the therapy has been estimated and was compared to the tumor weight at the end of the experiments. It could be shown that the tumor weight decreased due to radiotherapy.

The primary tumors treated with radiotherapy showed an increased part of necrosis (HE) and apoptosis as determined in the Feulgen stain. The number of microvessels (S1P1) and proliferative tumor cells (Ki67) were decreased in these tumors compared with primary tumors of the untreated animals.

The number of immune cells that infiltrated the tumor through radiotherapy is detected by immunohistochemistry using staining for pan-leucocytes (CD45), macrophages, natural killer cells (CD11b) and dendritic cells (BSA-1). A various infiltration of immune cells could be shown. In some primary tumors the number of these cells was increased by radiotherapy whereas in

other primary tumors (of the same group) showed no difference to the control tumors. Therefore the results do not give a clear indication whether radiotherapy increases inflammatory process.

The results confirm the clinical observation that radiotherapy destroys primary tumors as well as decreases the number of spontaneous metastases.



---

## Literaturverzeichnis

- Bazhin, A.V., Savchenko, M. S., Shifrina, O. N., Demoura, S. A., Chikina, S. Y., Jaques, G., Kogan, E.A., Chuchalin, A.G., Philippov, P. P. (2004). Recoverin as a paraneoplastic antigen in lung cancer: the occurrence of anti-recoverin autoantibodies in sera and recoverin in tumors. *Lung Cancer*, 44, 193-198. doi: 10.1016/j.lungcan.2003.10.006
- Bethge, A., Schumacher, U., Wree, A., & Wedemann, G. (2012). Are metastases from metastases clinical relevant? Computer modelling of cancer spread in a case of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 7(4), e35689.
- Bosma, M. J., & Carroll, A. M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol*, 9, 323-350.
- Bülzebruck, H. (1998) Metastasierung und Prognose des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. *Onkologe*. 4:1039-49
- Byers, L.A., Rudin, C.M. Small cell lung cancer: where do we go from here? *Cancer* 2015;121:664-72.
- Camphausen, K., Moses, M. A., Beecken, W. D., Khan, M. K., Folkman, J., & O'Reilly, M. S. (2001). Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res*, 61, 2207-2211.
- Carney, D. N., Gazdar, A. F., Bepler, G., Guccion, J. G., Marangos, P. J., Moody, T. W., Zweig, M.H., Minna, J. D. (1985). Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res*, 45, 2913-2923.
- Christodoulou, C., & Skarlos, D. V. (2005). Treatment of small cell lung cancer. *Semin Respir Crit Care Med*, 26, 333-341.
- Cooper, S., & Spiro, S. G. (2006). Small cell lung cancer: treatment review. *Respirology*, 11, 241-248.

- Dhakal, H.P., Naume, B., Synnestvedt, M., Borgen, E., Kaaresen, R., Schlichting, E., Wiedswang, G., Bassarova, A., Giercksky, K.-E., Nestland, J. M. (2008). Vascularization in Primary Breast Carcinomas: Its Prognostic Significance and Relationship with Tumor Cell Dissemination. *Clin Cancer Res*, 14(8):2341-50
- Denoix, P. (1964). The present trends in cancer therapy. *Neoplasma*; 11:299-306
- Frenzel, T., Grohmann, C., Schumacher, U., & Krull, A. (2014). Partial body irradiation of small laboratory animals with an industrial X-ray tube. *Z Med Phys*, 24, 352-362. doi: 10.1016/j.zemedi.2014.02.002
- Frenzel, T., Grohmann C., Schumacher U, Krüll, A. (2015) Monitoring of small laboratory animal experiments by a designated web-based database. *Lab Anim* 2015; 49:327-335.
- Fried, D. B., Morris, D. E., Poole, C., Rosenman, J. G., Halle, J. S., Detterbeck, F. C., . . . Socinski, M. A. (2004). Systematic review evaluating the timing of thoracic radiation therapy in combined modality therapy for limited-stage small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 22, 4837-4845. doi: 10.1200/JCO.2004.01.178
- Gazdar, A. F., Carney, D. N., & Minna, J. D. (1981). In vitro study of the biology of small cell carcinoma of the lung. *Yale J Biol Med*, 54, 187-193.
- Gazdar, A. F., Carney, D. N., Nau, M. M., & Minna, J. D. (1985). Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res*, 45, 2924-2930.
- Gazdar, A. F., Carney, D. N., Russell, E. K., Sims, H. L., Baylin, S. B., Bunn, P. A., Jr., Guiccon, J.G., Minna, J. D. (1980). Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res*, 40, 3502-3507.
- Gazdar, A. F., Minna, J. D. (1996). NCI series of cell lines: an historical perspective. *J Cell Biochem Suppl*, 24, 1-11.

- Gerdes, J., Pileri, S., Bartels, H., & Stein, H. (1986). Proliferation marker Ki-67: correlation with histological diagnosis, neoplasm grading and clinical course. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 70, 152-158.
- Gregor, A., Drings, P., Burghouts, J., Postmus, P. E., Morgan, D., Sahmoud, T., Kirkpatrick, A., Dalesio, O., Giaccone, G. (1997). Randomized trial of alternating versus sequential radiotherapy/chemotherapy in limited-disease patients with small-cell lung cancer: a European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group Study. *J Clin Oncol*, 15, 2840-2849.
- Griffin, C. A., & Baylin, S. B. (1985). Expression of the c-myc oncogene in human small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, 45, 272-275.
- Guo, N., Templeton, N. S., Al-Barazi, H., Cashel, J. A., Sipes, J. M., Krutzsch, H. C., & Roberts, D. D. (2000). Thrombospondin-1 promotes alpha3beta1 integrin-mediated adhesion and neurite-like outgrowth and inhibits proliferation of small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res*, 60, 457-466.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Horny, H.-P., Horst, H.-A. (1986). Lymphoreticular infiltrates in invasive ductal breast cancer. A histological and immunohistological study. *Virchows Archiv A*; 409:275-286.
- Hubaux, R., Vandermeers, F., Crisanti, M. C., Kapoor, V., Burny, A., Mascoux, C., . . . Willems, L. (2010). Preclinical evidence for a beneficial impact of valproate on the response of small cell lung cancer to first-line chemotherapy. *Eur J Cancer*, 46, 1724-1734.
- Hurwitz, J.L.B., McCoy, F., Scullin, P., Fennell, D.A. (2009). New advances in the second-line treatment of small cell lung cancer. *The Oncologist*;14:986-994.
- Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Bertz, J., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wolf, U. (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2010

- Jojovic, M., Adam, E., Zangemeister-Wittke, U., & Schumacher, U. (1998). Epithelial glycoprotein-2 expression is subject to regulatory processes in epithelial-mesenchymal transitions during metastases: an investigation of human cancers transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Histochem J*, 30, 723-729.
- Kaiser, F., Engelhardt, M., Rawluk, J., Mertelsmann, R., Passlick, B., Wäsch, R. (2011). Aktuelle Therapiekonzepte des Lungenkarzinoms. *Dtsch Med Wochenschriften*; 136:1901-1906
- Kaufmann, S. H., Mabry, M., Jasti, R., & Shaper, J. H. (1991). Differential expression of nuclear envelope lamins A and C in human lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 51, 581-586.
- Kondo, H., Kanzawa, F., Nishio, K., Saito, S., & Saijo, N. (1994). In vitro and in vivo effects of cisplatin and etoposide in combination on small cell lung cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res*, 85, 1050-1056.
- Lai, L., Alaverdi, N., Maltais, L., Morse, H.C. (1998). Mouse cell surface antigens: Nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol*; 160:3861-3868.
- Lange, A., Gustke, H., Glassmeier, G., Heine, M., Zangenmeister-Wittke, U., Schwarz, J.R., Schumacher, U., Lange, T. (2011). Neuronal differentiation by indomethacin and IBMX inhibits proliferation of small cell lung cancer cells in vitro. *Lung Cancer*; 74:178-87.
- Liao, Y., Wang, S.Y., Meng, X.Y., Yang, J., Shi, M.J., Liu, H.L., Chen, F.F., Xiong, B. (2014). Circulating tumor cells in breast cancer and its association with tumor clinicopathological characteristics: a meta-analysis. *Medical Oncology*; 12:343.
- Little, C. D., Nau, M. M., Carney, D. N., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (1983). Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature*, 306(5939), 194-196.
- Luk, G. D., Goodwin, G., Marton, L. J., & Baylin, S. B. (1981). Polyamines are necessary for the survival of human small-cell lung carcinoma in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 2355-2358.

- Mabry, M., Nakagawa, T., Nelkin, B. D., McDowell, E., Gesell, M., Eggleston, J. C., . . . Baylin, S. B. (1988). v-Ha-ras oncogene insertion: a model for tumor progression of human small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6523-6527.
- Madani, I., De Neve, W., & Mareel, M. (2008). Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis? *Bull Cancer*, 95, 292-300.
- Martin, O.A., Anderson, R.L., Russell, P.A., Cox, R.A., Ivashkevich, A., Swierczak, A., Doherty, J.P., Jacobs, D.H., Smith, J., Siva, S., Daly, P.E., Ball, D.L., Martin, R.F., MacManus, M.P. (2014). Mobilization of viable tumor cells into the circulation during radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics* 2014;88:395-403
- Mountain, C. F. (1997). Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*, 11, 1710-1717.
- Nagel, E. (2008). Die Wirkung von Statinen und Ionenkanalblockern auf kleinzellige Bronchialkarzinomzellen in vitro. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.
- Nau, M. M., Brooks, B. J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A. F., Kirsch, I. R., McBride, O.W., Bertness, V., Hollis, G.F., Minna, J. D. (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature*, 318 (6041), 69-73.
- Newton, P. K., Mason, J., Bethel, K., Bazhenova, L., Nieva, J., Norton, L., & Kuhn, P. (2013). Spreaders and sponges define metastasis in lung cancer: a Markov chain Monte Carlo mathematical model. *Cancer Res*, 73, 2760-2769.
- Onganer, P. U., Seckl, M. J., & Djamgoz, M. B. (2005). Neuronal characteristics of small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 93, 1197-1201.
- Osterlind, K., Hansen, H. H., Hansen, H. S., Dombernowsky, P., Hansen, M., & Rorth, M. (1986). Chemotherapy versus chemotherapy plus irradiation in limited small cell lung cancer. Results of a controlled trial with 5 years follow-up. *Br J Cancer*, 54, 7-17.

- Payne, D. G., Murray, N., & Warde, P. (1994). Small cell lung carcinoma: role of thoracic irradiation and its timing in relation to chemotherapy. *Bull Cancer*, 81, 119-128.
- Pillai, R.N., Owonikoko, T.K. (2014). Small cell lung cancer:therapies and targets. *Semin Oncol* 2014;41:133-42.
- Plummer, H. K., 3rd, Dhar, M., & Schuller, H. M. (2005). Expression of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in human lung cells. *Respir Res*, 6, 29.
- Rein, A., Schultz, A. M., Bader, J. P., & Bassin, R. H. (1982). Inhibitors of glycosylation reverse retroviral interference. *Virology*, 119, 185-192.
- Saracci, R., Boffetta, P. (1994). Interaction of tabacco smoking with other causes of lung cancer. In: Samet J (Ed). *Epidemiology of lung cancer*. New York: Marcel Dekler Inc; 465-493.
- Schwankhaus, N., Gathmann, C., Wicklein, D., Riecken, K., Schumacher, U., Valentiner, U., (2014). Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models. *Clin Exp Metastasis*, 31(4):483-96.
- Sharma, R., Adam, E., Schumacher, U. (1997). The action of 5-fluorouracil on human HT29 colon cancer cells grown in SCID mice: mitosis, apoptosis and cell differentiation. *British journal of cancer*;76:1011-1016.
- Simon, G. R., Wagner, H., & American College of Chest, P. (2003). Small cell lung cancer. *Chest*, 123(1 Suppl), 259S-271S.
- Slotman, B. J., van Tinteren, H., Praag, J. O., Knegjens, J. L., El Sharouni, S. Y., Hatton, M., Keijser, A., Faivre-Finn, C., Senan, S. (2015). Use of thoracic radiotherapy for extensive stage small-cell lung cancer: a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 385 (9962), 36-42.
- Sodeur, S., Ullrich, S., Gustke, H., Zangemeister-Wittke, U., & Schumacher, U. (2009). Increased numbers of spontaneous SCLC metastasis in absence of NK cells after subcutaneous inoculation of different SCLC cell lines into pfp/rag2 double knock out mice. *Cancer Lett*, 282, 146-151.

- Sofia Vala, I., Martins, L. R., Imaizumi, N., Nunes, R. J., Rino, J., Kuonen, F., Carvalho, L.M., Rüegg, C., Grillo, I.M., Barata, J.T., Mareel, M., Santos, S. C. (2010). Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS One*, 5, e11222. doi: 10.1371/journal.pone.0011222
- Souhami, R. L., Geddes, D. M., Spiro, S. G., Harper, P. G., Tobias, J. S., Mantell, B. S., Fearon, F., Bradbury, I. (1984). Radiotherapy in small cell cancer of the lung treated with combination chemotherapy: a controlled trial. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 288 (6431), 1643-1646.
- Stuschke, M., & Pottgen, C. (2004). Localized small-cell lung cancer: which type of thoracic radiotherapy and which time schedule. *Lung Cancer*, 45 Suppl 2, S133-137
- Travis, W.D., Travis, L.B., Devesa S.S. (1995). Lung cancer. *Cancer*. 1995; 75: 191-202.
- Travis, W.D., Colby, T.V., Corrin, B., Shimosato, Y., Brambilla, E.: World Health Organization. International Histological Classification of Tumors: Histological Typing of Lung and Pleural Histological Classification of Tumors: Histological Typing of Lung and Pleural Tumors. 3. Aufl. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1999.
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-292.
- Wolf, M. (1998) Kleinzellige Bronchialkarzinome – Klinische Präsentation, Diagnostik und prognostische Faktoren. *Onkologie* 4:1005-1018
- Wunder, T. (2011). Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Expression des Coxsackie Adenovirus Rezeptors in verschiedenen Tumorentitäten und seine Heraufregulierung im Hinblick auf eine onkolytische Therapie. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.
- Zangemeister-Wittke, U., Schenker, T., Luedke, G. H., & Stahel, R. A. (1998). Synergistic cytotoxicity of bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer*, 78, 1035-1042.

Zhang, W., Jiang, W., Luan, L., Wang, L., Zheng, X., & Wang, G. (2014). Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *BMC Cancer*, 14, 793.

### Internetquellen

- 1) Statistisches Bundesamt  
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> (Stand: 14.07.2016, 14:05 Uhr)
- 2) DrED  
<https://www.dred.com/de/blog/wochenrueckblick-gesundheit-07-02-2014.html> (Stand: 14.07.2016, 14:03 Uhr)
- 3) Deutsches Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst  
<https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/lungenkrebs/risikofaktoren.php> (Stand: 14.07.2016, 14:02 Uhr)
- 4) Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft  
[http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tierschutz/Versuchstierdaten2015.pdf;jsessionid=AB70D748415A7DC788901F75B015F52D.2\\_cid385?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tierschutz/Versuchstierdaten2015.pdf;jsessionid=AB70D748415A7DC788901F75B015F52D.2_cid385?__blob=publicationFile) (Stand: 23.08.2016, 14.14 Uhr)
- 5) Charles River  
[http://www.criver.com/files/pdfs/rms/scid/rm\\_rm\\_r\\_fox\\_chase\\_scid\\_mouse.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/scid/rm_rm_r_fox_chase_scid_mouse.aspx) (Stand: 14.07.2016, 13:56 Uhr)
- 6) Pharmazeutische Zeitung  
<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=1589> (Stand: 23.08.2016, 15:36 Uhr)
- 7) Deutsches Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst  
<https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsentstehung.php> (Stand: 23.08.2016, 15.57 Uhr)

# Anhang

## Scoringliste Antrag

<b>Abbruchkriterien zu Antrag: Der Einfluss von Bestrahlung, Chemotherapie und simultaner Radiochemotherapie auf die Metastasierung in Xenograftmausmodellen</b>	
<b>Beobachtungsintervalle: Nach Implantation der Tumorzellen 1x täglich; postinterventionell 2x</b>	
<b>Belastungsscore/Abbruchkriterien</b>	<b>Punktwertung<sup>2,3</sup></b>
<b>I Körpergewicht</b>	
bezogen auf Ausgangsgewicht [ ]	
bezogen auf Kontrollgruppe [X]	
unbeeinflusst oder Anstieg	0
Reduktion > 10 %	10
Reduktion > 20 %	20
<b>II Allgemeinzustand</b>	
Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber	0
Fell stumpf, gesträubt; Augen trüb	5
verklebte oder feuchte Körperöffnungen; unnormale Haltung; hoher Muskeltonus; Dehydratation	10
Krämpfe; Lähmungen; Atemgeräusche; Tier fühlt sich kalt an	20
<b>III Spontanverhalten</b>	
normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0
ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	5
Isolation; Schmerzäußerungen; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypien; Koordinationsstörungen	10
Automutilation	20
<b>IV Versuchsspezifische Kriterien</b>	
<b>Primärtumor an Injektionsstelle</b>	
kein Tumor sonografisch nachweisbar	0
Tumolvolumen bis 1 ml	5
Tumolvolumen ab 1 ml	10
Exulceration des Tumors	20
<b>Bewertung, Maßnahmen</b>	<b>Punktsumme</b>
keine Belastung	0
geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter)	5-9
mittelgradige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum) längerandauernd als 72 h gilt als hochgradige Belastung	10-19
hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	20 oder höher
<b>Bemerkungen:</b>	
<sup>1</sup> Diese Punkte müssen von dem Antragsteller ergänzt werden.	
<sup>2</sup> Punktzahl (0/5/10/20) wird pro Zeile 1x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist. Auch bei mehreren positiven Befunden pro Zeile kommt es zu keiner Addition der Punkte pro Zeile.	
<sup>3</sup> Punkthöhe bei I-III nicht verändern	



## Publikationsverzeichnis

Vorstellung erster Ergebnisse der ALU-PCRs, dargestellt als Boxplots, auf einer UKE internen Veranstaltung in Wilsede im April 2014 (Vortrag)

Vortrag der Ergebnisse der ALU-PCRs, dargestellt als Boxplots, auf einer UKE internen Veranstaltung (UCCH Retreat in Jesteburg) im August 2014.

Vortrag der Ergebnisse aller ALU-PCRs und Ergebnisse der S1P1-, Ki67-Markierungen sowie der HE- und Feulgenfärbung auf dem UKE internen UCCH Retreat im August 2016.



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Schumacher für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und seine Anregungen und Ideen zur Umsetzung. Er hatte stets ein offenes Ohr und stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Verfügung.

Ich danke Herrn Dr. Dr. Frenzel für die Betreuung der durchgeführten Versuche und seine Unterstützung während der Zeit meiner Dissertation.

Frau Prof. Dr. vet. med. Plendl möchte ich für die freundliche und komplikationsfreie Betreuung danken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und experimenteller Morphologie möchte ich mich ganz herzlich für ihre Unterstützung, ihre Ratschläge und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Frau Ann-Kristin Brauns und Herrn Volker Meidl danke ich für die schöne Zeit, die vielen Anregungen, die aufbauenden Gespräche und die Motivation, die sie mir stets zurückbrachten.

Bedanken möchte ich mich bei all meinen Freunden, die mir in dieser Zeit zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir die Möglichkeit gaben Veterinärmedizin zu studieren und mich mit ihrer Liebe, ihrem Vertrauen, ihrer Unterstützung und ihrer Geduld durch die Ausbildung und mein ganzes Leben begleiten.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ferner versichere ich, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Hamburg, 30.06.2017

Jordana Siekmann