
Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression von Hitzeschockproteinen
in der Bronchoalveolarlavage unter Radio- und
Chemotherapie bei Patienten mit
Bronchialkarzinom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Sefer Abdija
aus Sipkovica/Mazedonien

Datum der Promotion: 09.12.2016

Meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Klassifikation und Stadieneinteilung des Bronchialkarzinoms	3
1.2 Therapie des Bronchialkarzinoms	7
1.2.1 Stadienadaptierte Therapie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms	8
1.3 Stadiengerechte Therapie des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms	12
2. Hintergrund	15
2.1 Hitzeschockproteine (HSP)	15
2.2 Expression der HSP in der Lunge	17
2.3 Hitzeschockprotein 32 Kda (Hämoxxygenase -1, HSP 32)	18
2.4 Hitzeschockprotein 47 Kda (HSP 47)	20
2.5 Hitzeschockprotein 60 Kda (HSP 60)	21
2.6 Hitzeschockproteine 70 Kda (HSP 70).....	21
2.7 Hitzeschockproteine 90 Kda (HSP 90).....	23
3. Zielsetzung der Arbeit.....	25
4. Material und Methoden	26
4.1 Patientenkollektiv	26
4.1.1 Unterteilung in die Therapiegruppen.....	26
4.1.2 Tumorhistologie.....	28
4.2 Brochoalveoläre Lavage (BAL)	29
4.2.1 Durchführung der BAL	30
4.2.2 Aufbereitung der Proben	30
4.3 Fixation.....	30
4.4 Permeabilisation und Inkubation mit Antikörpern	31
4.5 Die durchflusszytometrische Analyse	32
4.6 Statistik.....	33
5. Ergebnisse	34
5.1 Patienten-Charakteristika	34
5.2 Explorative Datenanalyse.....	42
5.3 Nichtparametrische Tests: Man- Whitnay-Test.....	45
6. Diskussion.....	47
7. Zusammenfassung	58
8. Literatur.....	60

Abstrakt

Expression von Hitzeschockproteinen in der BAL (Bronchoalveolarlavage) unter Radiatio und Chemotherapie bei Patienten mit Bronchialkarzinom

Einleitung: Hitzeschockproteine (HSP) sind kleine Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht, die in den gestressten Zellen vermehrt exprimiert werden. Ihnen werden unterschiedliche Funktionen zugesprochen, sowohl der Protektion und Immunstimulation als auch der anti-apoptischen Wirkung in den entarteten Zellen. Sowohl nach Strahlentherapie, als auch nach systemischer Chemotherapie, ist eine erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen auch in der Lunge beobachtet worden. Durch das Expressionsverhalten in der BAL der HSP 32, HSP 47, HSP 62, HSP 70 und HSP 90 soll die Funktion dieser Proteine näher geklärt werden.

Methodik: Mittels FITC (Fluorescein isothiocyanate) konjugierten Antikörper gegen HSP soll die Expression in der BAL von Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom durchflusszytometrisch untersucht werden. Insgesamt wurden 95 Lavageproben untersucht, die vor, unter oder nach einer zytoreduktiven Therapie standen, wobei 30 Proben unter Chemotherapie (CT) und 22 Proben unter oder nach Radio- und/oder Chemotherapie (RCT) gewonnen wurden. 43 Proben stammten von Patienten, die zum Teil lungenreseziert waren und sich in kompletter Remission (CR) befanden. Die Messungen wurden zwischen allen Gruppen verglichen und statistisch ausgewertet.

Ergebnisse: Es konnten 74% der HSP 32-, 99% der HSP 42-, 97% der HSP 60-, 99% der HSP 70- und 100% der HSP 90-Proben durchflusszytometrisch aufgearbeitet werden. In der BAL von allen Tumorpatienten konnte eine erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen gefunden werden. Die MCP-Mittelwerte (Mean peak channel of fluorescence intensity) für alle Gruppen betragen: HSP 32 (54 MCP), HSP 47 (65 MCP), HSP 60 (61 MCP), HSP 70 (55 MCP) und HSP 90 (88 MCP). Es zeigte sich tendentiell eine höhere Expression von HSP 90 in der Chemotherapie-Gruppe. Es konnten lediglich qualitative aber keine quantitative Unterschiede in dem Expressionsverhalten der HSP festgestellt werden.

Schlussfolgerung: Insgesamt weisen die vorliegenden Ergebnisse auch in der BAL von Patienten mit Bronchialkarzinom auf eine Expression der Hitzeschockproteine hin. Durchflusszytometrisch ließ sich aber kein gerichteter Zusammenhang zwischen der HSP-Expression in unserem Patientenkollektiv nachweisen. Diese Arbeit zeigt das BAL unter differenzierten Bedingungen, obwohl weniger sensitiv, genauso wie Serum und andere Materialien zur Untersuchung von Hitzeschockproteinen genutzt werden kann. Weitere vergleichende Untersuchungen mittels PCR oder Immunhistochemie wären hilfreich.

Abstract

Expression of heat shock proteins in the BAL (bronchoalveolar lavage) under radiotherapy and chemotherapy in patients with lung cancer

Introduction: Heat shock proteins (HSP) are small proteins with different molecular weights, which are upregulated in the stressed cells. They have different functions, both the protection and immune stimulation as well as the anti-apoptotic effect in the degenerated cells. After radiation therapy and systemic chemotherapy, an increased expression of heat shock proteins has also been observed in the lung. By the expression behavior in the BAL of HSP 32, HSP 47, HSP 62, HSP 70 and HSP 90, the function of these proteins is to be further clarified.

Methods: Based FITC (Fluorescein isothiocyanate) conjugated antibodies against HSP is the expression in the BAL of patients with advanced lung cancer examined by flow cytometry. 95 lavage were studied, which were before, under or after cytoreductive therapy, wherein 30 samples were obtained under chemotherapy (CT) and 22 samples or by radio and / or chemotherapy (RCT). 43 samples were from patients who had lungenreseziert partly and were in complete remission (CR). The measurements were compared between all groups and statistically evaluated.

Results: There were 74% of HSP 32, 99% of HSP 47, 97% of HSP 60, 99% of HSP 70 and 100% of HSP-90 samples are processed by flow cytometry. In the BAL of all cancer patients an increased expression of heat shock proteins could be found. The MCP-averages (mean peak channel of fluorescence intensity) for all groups were as follows: HSP 32 (54 MCP), HSP 47 (65 MCP), HSP 60 (61 MCP), HSP 70 (55 MCP) and HSP 90 (88 MCP). It showed a tends higher expression of HSP 90 in the chemotherapy group. Only qualitative but not quantitative differences in the expression pattern of HSP could be found.

Conclusion: Overall, the present results in the BAL of patients with Brochialkarzinom indicate an expression of heat shock proteins. But could be detected by flow cytometry in our collective no forward relationship between the HSP expression. This work shows the BAL under differentiated conditions, although less sensitive, as serum and other materials it can be used for the investigation of heat shock proteins. More comparative studies by PCR or Immunshistochemie would be helpful.

1 Einleitung

Das Bronchialkarzinom ist in Deutschland, Europa aber auch in den USA weiterhin einer der häufigsten malignen Tumoren, sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Nach den Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts erkrankten 2014 ca. 36.000 Männer und 19.600 Frauen an einem Bronchialkarzinom. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei etwa 16% bei Männern und 21% bei Frauen (RKI, Stand 25.03.2015). Zu den wichtigsten prädisponierenden Faktoren für das Bronchialkarzinom zählen vor allem das Tabakrauchen, Passivrauchen, Luftverschmutzung (Feinstäube), die Inhalation von überwiegend berufsbedingten Karzinogenen (Asbest, Arsen, Nickel, radonhaltigen Gase). Wichtigster Risikofaktor für ein Lungenkarzinom ist das Rauchen. Rund 90 Prozent der Männer und mindestens 60 Prozent der Frauen, die an diesem Krebs erkrankt sind, haben aktiv geraucht (nach Krebsregisterdaten des RKI). Im Sommer 2012 stufte die Internationale Krebsforschungsagentur (IARC) Dieselabgase zwar als sicher krebserregend ein, wie hoch der Beitrag zum Krebsrisiko durch den Straßenverkehr im normalen Alltag ist, bleibt weiter offen (Presseinformationen des Umweltbundesamtes 2012).

Außerdem wird eine familiäre bzw. genetische Prädisposition vermutet. Diese Neigung an Lungenkrebs zu erkranken, wird einerseits auf Onkogene zurückgeführt, die die frühe Phase des Karzinommetabolismus steuern, andererseits auf genetisch vermittelte gestörte DNA-Reparaturmechanismen (Lahm, Fischer, Drings 2003).

Problematisch bei der Diagnosestellung des Bronchialkarzinoms ist, dass klinische Symptome meist sehr spät bzw. in einem weit fortgeschrittenen Stadium auftreten. In frühen Stadien werden nur 15 % aller diagnostizierten Bronchialkarzinome entdeckt (Manegold 2000). Serumentumormarker spielen für das Screening kaum eine Rolle, können aber zusätzlich zu der morphologischen Diagnostik ein Informationsgewinn bringen. Das gilt insbesondere für

Zytokeratin 21-Fragment (CYFRA 21-1)(Stieber 1993), karzinoembryonales Antigen (CEA), neuro-spezifische Enolase (NSE) und Pro-Gastrin-Releasing-Peptide (ProGRP) (Lamy 2000).

Erster möglicher Hinweis ist ein persistierender Husten über 6 Wochen, vor allem bei bekanntem Nikotinmissbrauch. Bei Auftreten von Hämoptysen oder einer Rekurrensparese liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei 0-1%. Wird ein Rundherd ohne entsprechende klinische Symptomatik entdeckt, beträgt sie 50- 60% (Macha 2003). Häufig wird der Primärtumor über eine eingetretene Frühmetastasierung auffällig (Krampfanfall nach cerebralem Befall, Schmerzen im Bewegungsapparat bei ossärem Befall). Da die Gesamtmortalität durch jährlichen Röntgenthorax im Rahmen eines Früherkennungsprogramms in größeren Studien nicht verbessert werden konnte, hat die American Cancer Society das Screening des Bronchialkarzinoms nicht mehr empfohlen (West 2009). Heute stehen neue Screeningsmethoden zur Verfügung (Low-dose-Spiralcomputertomografie, Sputumzytologie, Autofluoreszenzbiopsie und –bronchoskopie. Auch immunhistochemische Methoden der Zytometrie oder die Polymerasekettenreaktion (PCR) könnten dazu beigetragen, Sensitivität und Spezifität in der Diagnostik für Adenokarzinome auf 85 respektive 90% zu steigern (Alt- Epping 2009). Spezielle Verfahren wie Fluoro-L-Thymidin-PET (FLT-PET), Fluorodesoxyglucose-PET (FDG-PET) und dynamische kontrastmittelverstärkte MRT (DCE-MRT) werden nicht für das Screening, sondern eher für das Tumor-Staging eingesetzt (Scheffler, Wolf 2009). Der Stellenwert der Low-dose-Computertomographie als Screeningsverfahren wurde durch große Studien in Europa und Amerika geprüft. In kürzlich publizierten National Lung Screening Trial (NLST) konnte durch CT-Screening die Mortalität bei Rauchern um 20% und die Gesamtmortalität um 7% reduziert werden. Aufgrund der hohen Kosten und der Gefahr falsch positiver Befunde, haben sich die amerikanischen Fachgesellschaften bisher davon abgehalten, das Screening vorbehaltlos zu empfehlen. Die Mutationsanalytik, insbesondere des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und die Bestimmung der EML-ALK-Translokation („echinoderm microtubule-associated protein-like 4 gene“), haben Eingang in die Diagnostik zur Therapieprädiktion des Adenokarzinoms mit spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren gefunden (Weiss 2010).

1.1 Klassifikation und Stadieneinteilung des Bronchialkarzinoms

Die Stadieneinteilung erfolgt beim nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom an Hand der TNM-Klassifikation. (Tabelle 1 und 2, gem. Unio internationalis contra Cancrum, UICC 2009)

Ausdehnung des Primärtumors (Tumor=T)	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder Zytologie positiv
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carzinoma in situ
T1	Größter Tumordurchmesser < 3cm, Tumor umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus und Pleura viszeralis frei)
-T1a	o.g. Eigenschaften und größter Tumordurchmesser < 2cm
-T1b	o.g. Eigenschaften und größter Tumordurchmesser >2 und < 3cm
T2	Tumor > 3cm <7cm und wenigstens eine der folgenden Kennzeichen ist erfüllt: -Befall des Hauptbronchus > 2cm distal der Carina -Infiltration der viszeralen Pleura -assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis hin zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
T2a	o.g. Eigenschaften und größter Tumordurchmesser >3 und < 5cm
T2b	o.g. Eigenschaften und größter Tumordurchmesser >3 und < 7cm
T3	Größter Tumordurchmesser >7cm oder Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration mindestens einer der folgenden Strukturen:

	<p>Brustwand, Zwerchfell, Nervus Phrenicus, parietales Perikard, mediastinale Pleura oder Befall des Hauptbronchus <2cm distal der Carina, aber Carina selber nicht befallen oder Tumor mit Atelektase oder obstruktive Entzündung der ganzen Lunge oder separate (r) Tumorknoten im selben Lappen wie der Primärtumor</p>
T4	<p>Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Nervus laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina oder vom primärtumor getrennte® Tumorknoten in einem anderen Lungenlappen derselben Seite</p>

Lymphknotenbefall (Nodi=N, Metastasen=M)	
NX	Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Lymphknotenmetastasen ipsilateral hilär und peribronchial
N2	Lymphknotenmetastasen ipsilateral mediastinal, Lymphknotenmetastasen subkarinal
N3	Lymphknotenmetastasen kontralateral mediastinal, Lymphknoten ipsi- und kontralateral Supraklavikulär
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen und Metastasen in einem anderen Lungenlappen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms gemäß Union internationalis contra Cancrum; UICC, 2009

Union for International Cancer Control (UICC)-Stadium (2009):			
Okkultes Karzinom	TX	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1a, T1b	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T2b	N0	M0
	T1a, T1b, T2a	N1	M0
Stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1a, b, T2 a, b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stadium IIIB	Jedes T	N3	M0
	T4	N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Bronchialkarzinoms (UICC, nach Wittekind und Sobin, 2009)

Die Einteilung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms erfolgt nach der Marburger Klassifizierung.

Very limited disease	Primärtumor von Lungengewebe oder visz. Pleura umgeben, nur partielle Atelektase, ein Pleuraerguß ohne maligne Zellen, LK Befall hilär ipsilateral (z. B. isoliert, relativ peripherer Rundherd ohne mediastinalen Befall)
Limited disease	Primärtumor infiltriert Thoraxwand, parietale Pleura oder Diaphragma, Totalatelektase einer Lunge, Lymphknoten bis N3 (kontralat. hilär)
Extensive disease I	Primärtumor infiltriert Herz, Ösophagus, Perikard, maligner Pleura- oder Perikarderguß, Phrenikus- oder Recurrensparese, obere Einflußstauung (V. cava sup. Syndrom), LK's supraklavikulär

Extensive disease IIa	Hämatogene Fernmetastasen in einem Organ, kontralaterale Lunge befallen
Extensive disease IIb	Hämatogene Fernmetastasen in mehreren Organen

Tabelle 3: Stadieneinteilung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (nach Wolf und Havemann, 1995)

1. Plattenepithelkarzinom <ul style="list-style-type: none"> - Papillär, - Kleinzellig, - Klarzellig - Basaloid
2. Kleinzelliges Karzinom
3. Kombiniertes kleinzelliges Karzinom
4. Adenokarzinom <ul style="list-style-type: none"> - Gemischter Subtyp - Azinäres - Papilläres - Bronchioalveolär - Solides Adenokarzinom mit Schleimbildung
5. Adenosquamöses Karzinom
6. Großzelliges Karzinom <ul style="list-style-type: none"> - Großzellig neuroendokrin - Kombiniert Großzellig neuroendokrin - Basaloid - Lymphoepithelial - Klarzellig - Großzellig mit rhabdoidem Phänotyp
7. Adenosquamöses Karzinom
8. Sarkomatoide Karzinome

9. Karzinoid Tumoren -Typisch und Atypisch
10. Bronchialdrüsenkarzinom vom Speicheldrüsentyp <ul style="list-style-type: none"> - Adenoidzystisch - Mukoepidermoide - Epithelial-myoepithelial

Tabelle 4: Histologische Klassifikation epithelialer Tumoren der Lunge nach WHO (Travis et al. 2004)

Histologisch-zytologisches Grading des Bronchialkarzinoms
Gx Grading nicht beurteilbar
G1 hochdifferenzierte Tumoren, imitiert das Herkunftsgewebe stark, lichtmikroskopisch eindeutig
G2 mäßig differenziert
G3 schlecht differenziert, Ausgangsgewebe kaum erkennbar, ultrastrukturelle Untersuchungen notwendig
G4 entdifferenzierte Tumor, Herkunft nicht nachweisbar

Tabelle 5: Histologisch-zytologisches Grading des Bronchialkarzinoms nach WHO (Travis et al. 2004)

1.2 Therapie des Bronchialkarzinoms

Die moderne Therapie umfasst in der Regel die Kombination verschiedener Therapiemodalitäten wie Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie im Sinne einer multimodalen Behandlung.

1.2.1 Stadienadaptierte Therapie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms

1.2.2 Stadium IA und IB

Die Operation ist die Therapie der Wahl. Die postoperativen 5-Jahresüberlebensraten liegen für das Stadium IA bei 75-80% für IB bei 55-60%. Eine adjuvante Chemotherapie verbessert die 5-Jahresüberlebensrate bei IA nicht, bei IB um absolut 1,8%. In der postoperativen Situation nach R0 Resektion hat die Strahlentherapie einen negativen Einfluss auf die Prognose und ist nicht indiziert. Als individuelles Konzept kann Patienten im Stadium IB mit einer TumorgroÙe > 4cm eine adjuvante und als alternative eine neoadjuvante Chemotherapie angeboten werden. Die Strahlentherapie ist eine Alternative als primäre TherapiemaÙnahme bei funktionell inoperablen Patienten (Rami-Porta et al, 2011, Reckt et al., 2014)

1.2.3 Stadium IIA und IIB

Die Operation ist die Therapie der Wahl. Die postoperativen 5-Jahresüberlebensraten liegen für das Stadium IIA zwischen 45 und 55%, für das Stadium IIB zwischen 35 und 45%. Nach einer R0 Resektion wird eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Sie führte in einer Metaanalyse von 34 Studien mit unterschiedlichen Chemotherapie-Protokollen zu einer Verbesserung der 5-Jahresüberlebensrate um 5% absolut. In der Langzeit-Metaanalyse von mit Cisplatin / Vinorelbin behandelten Patienten der LACE Studie lag die 5-Jahresüberlebensrate um 11,6% höher als in der Kontrollgruppe. Die Strahlentherapie ist eine Alternative als primäre TherapiemaÙnahme bei inoperablen Patienten (Goldstraw et al., 2011, Douillard et al., 2010).

1.2.4 Operable Stadien IIIA: Stadium IIIA (T3 N1, T4N0, T4 N1)

Die Operation ist die Therapie der Wahl und diese Patienten sollten in der interdisziplinären Konferenz besprochen werden. Nach einer R0 Resektion wird eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Eine Alternative zur adjuvanten ist die neoadjuvante oder Induktionschemotherapie.

1.2.5 Operable Stadien IIIA: Stadien IIIA₁, IIIA₂ und IIIA₃ unilevel (IIIA_{3u})

Bei Patienten in den Stadien IIIA₁ und IIIA₂ ist das Stadium N2 definitionsgemäß erst intraoperativ bzw. in der histologischen Aufarbeitung diagnostiziert worden. Bei diesen Patienten ist postoperativ eine adjuvante Chemotherapie indiziert. Sie führt in der Metaanalyse von unterschiedlich behandelten Patienten im Stadium IIIA zu einer Verbesserung der 5-Jahresüberlebensrate um 5% absolut, in der Langzeit-Analyse von mit Cisplatin / Vinorelbin adjuvant behandelten Patienten um 14,7% absolut. In diese Gruppe gehören auch Patienten mit einem Stadium IIIA₃ N2 unilevel, d. h. Lymphknotenbefall an einer ipsilateral mediastinalen Lokalisation. Nach einer R0 Resektion wird eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Nach einer R1-Resektion kann die Strahlentherapie auch als primäre adjuvante Therapie indiziert sein. Die Strahlenchemotherapie ist eine Alternative als primäre Therapiemaßnahme bei inoperablen Patienten (Dullard et al., 2010).

1.2.6 Stadium IIIA₃ multilevel (IIIA_{3m})

Die Therapie wird in diesem Stadium kontrovers diskutiert. Entscheidend ist die Frage, ob beim individuellen Patienten ein kurativer Therapieanspruch besteht. Als Standard wird die Strahlenchemotherapie angesehen. Weitere Optionen sind: primäre (neoadjuvante) Chemotherapie, gefolgt von Operation oder Bestrahlung. Die präoperative Chemotherapie führte in der Metaanalyse von 7 Studien zu einer Steigerung der 5-Jahresüberlebensrate um 6-7 % absolut gegenüber einer alleinigen Operation (Burdett et al., 2007, Reck et al., 2014).

1.2.7 Stadium IIIA₄, Stadium IIIB (alle T N3)

Empfohlen wird eine kombinierte Strahlenchemotherapie. Sie führte in der Metaanalyse von 9 Studien zu einer Steigerung der 2-Jahresüberlebensrate um 8% absolut gegenüber einer alleinigen Strahlentherapie (O'Rourke et al., 2010). Bei der Strahlenchemotherapie ist die kombinierte Behandlung einer sequenziellen Applikation überlegen. In Metaanalysen steigert sie die 2-Jahresüberlebensrate um 10% , die 5-Jahresüberlebensrate um 4,5%. Die Chemotherapie zur Strahlentherapie kann niedrig dosiert, z.B. Cisplatin 30 mg/m² wöchentlich bzw. 6 mg/m² täglich, oder volldosiert appliziert werden. Die Entscheidung sollte vom Allgemeinzustand sowie von der Größe des Strahlenfeldes abhängig gemacht werden (Auperin et al., 2010).

1.2.8 Pancoast-Tumor

Pancoast-Tumore (engl. Synonym: Superior Sulcus Tumor) sind eine distinkte Entität. Charakteristisches Merkmal sind die Folgen des lokalen Wachstums, ausgehend von der Lungenspitze, mit Infiltration neuraler (Plexus brachialis, Ganglion stellatum) und / oder ossärer Strukturen (Rippen, Wirbelkörper). Entscheidend für die Therapieplanung ist die optimale lokale Bildgebung mittels MRT Thorax. Prospektiv randomisierte Studien zur Therapie von Pancoast-Tumoren fehlen. Die besten Ergebnisse werden durch eine primäre Induktionschemo- und Strahlentherapie erzielt, gefolgt von einer Operation in kurativer Intention. Die Prognose wird wesentlich vom primären Lymphknotenstatus und vom Erreichen einer R0 Resektion bestimmt. Die Strahlentherapie wird mit 40 – 50 Gy, konventionell dosiert oder hyperfraktioniert akzeleriert, durchgeführt. Die Chemotherapie enthält Cisplatin plus Etoposid (Rusch et al., 2006).

1.2.9 Stadium IV

35 – 40 % der Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom werden im Stadium IV diagnostiziert. Bei der Mehrzahl der Patienten ist der Therapieanspruch palliativ. Ausnahme sind Patienten mit solitären Nebennieren-, ZNS- oder Lungenmetastasen, bei denen ein kurativer Therapieansatz in Frage kommt (Reck et al., 2014, Azzoli et al., 2011).

1.2.10 Stadium IV mit solitären Nebennieren-, ZNS- oder pulmonalen Metastasen

Patienten mit einer solitären Nebennierenmetastase oder bis zu 3 solitären ZNS Metastasen, kann ein Therapiekonzept mit einem kurativen Ansatz angeboten werden. Bei solitärer Nebennierenmetastase Operation, bei solitärer ZNS Metastasen Operation + Ganzhirnbestrahlung oder Radiochirurgie + Ganzhirnbestrahlung und Operation des Primärtumors. Empfehlenswert ist hier die Gabe einer systemischen Therapie und ggf. eines Kinaseinhibitors vor Operation des Lungentumors. Bei isolierter pulmonaler (kontralateraler) Metastasierung sollte eine histologische Sicherung zum Ausschluss eines Zweitkarzinoms erfolgen. In dieser Situation ist gegebenenfalls ein kuratives Konzept möglich. Inwieweit isolierte Knochenmetastasen eine ähnliche Biologie aufweisen wie isolierte Nebennieren- oder ZNS-Metastasen, ist derzeit durch größere Fallserien nicht gesichert (Ettinger et al., 2015).

1.2.11 Stadium IV mit multiplen Metastasen

Bei diesen Patienten ist das Therapieziel palliativ. Die mediane Überlebenszeit liegt zwischen 8 und 12 Monaten. Bei Patienten mit aktivierenden Exon 19- oder Exon 21- sowie sog. „seltenen (uncommon)“ *EGFR* Mutationen (Epidermal Growth Factor Receptor) sowie mit *ALK*- (Anaplastic Lymphoma Kinase) und *ROS1*-Translokationen (Receptor Tyrosin Kinase) unter gezielter Therapie ist sie mit >30 Monaten deutlich länger. Die Auswahl der Substanzen wird bestimmt durch die histologische Klassifikation des Tumors sowie durch molekularpathologische Alterationen (molekular-stratifizierte Therapie). Die Erhebung des *EGFR*-Mutationsstatus, des *ALK*- und des *ROS1*-Translokationsstatus soll möglichst bei allen Patienten mit Nicht-Plattenepithelkarzinom unabhängig vom Raucherstatus sowie bei Nie- oder Leichtrauchern (<10 Packyear und >15 Jahre Rauchstopp) mit Plattenepithelkarzinom vor Beginn der medikamentösen Erstlinientherapie erfolgen (Reck et al., 2014).

1.2.12 Erstlinientherapie

Wegen der geringeren Nebenwirkungen, der besseren Symptomkontrolle, der höheren Ansprechrate, des längeren progressionsfreien Überlebens und der verbesserten Lebensqualität wird die molekular-stratifizierte Therapie mit Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase (Afatinib, Erlotinib, Gefitinib) bei Patienten mit einer EGFR-aktivierenden Mutation empfohlen. In den LUX-Lung 3- und LUX-Lung 6- Studien wurde ein Überlebensvorteil von etwa 12 Monaten für Afatinib im Vergleich zu einer Chemotherapie (Pemetrexed und Cisplatin in der LUX-Lung 3, Gemcitabin und Cisplatin in der LUX-Lung 6) in der Subgruppe der Patienten mit aktivierenden Exon 19 Deletionen erreicht. Ergebnisse direkt vergleichender Studien mit Afatinib vs Erlotinib oder Gefitinib stehen aus. Bei Patienten mit einer *ALK*- und *ROS1*-Translokation ist eine Therapie mit Crizotinib indiziert. Bei Patienten mit Nicht-Plattenepithelkarzinomen führt die Kombination von Bevacizumab mit Cisplatin / Pemetrexed, Cisplatin / Gemcitabin oder einer anderen platinhaltigen Zweierkombination im Vergleich mit der alleinigen Chemotherapie zu einer Steigerung der Remissionsraten, einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und in einigen Studien zu einer geringen, statistisch signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit. Pemetrexed hat eine besonders hohe Aktivität bei Patienten mit einer *ALK*-Translokation und ist das bevorzugte Zytostatikum für diese Patienten, wenn ein TKI nicht eingesetzt wird oder eingesetzt werden kann (z. B. Erstlinientherapie). Bei einer

Erstlinientherapie mit Bevacizumab kann dieser Antikörper bis zum Progress weitergeführt werden (Eberhard et al., 2014).

1.2.13 Zweitlinientherapie

Bei Patienten in gutem Allgemeinzustand kann eine Zweitlinientherapie zur Symptomlinderung und zur Verlängerung der Überlebenszeit führen. Bei Patienten mit Nicht-Plattenepithelkarzinom wurde für Docetaxel, Erlotinib, sowie Pemetrexed in randomisierten Studien eine Verlängerung der Überlebenszeit gezeigt. Kombinationschemotherapien steigern die Remissionsraten, verlängern aber die Überlebenszeit nicht. Bei Patienten mit Adenokarzinom hat die Kombination von Docetaxel und dem Angiokinase-Inhibitor Nintedanib gegenüber einer Monotherapie mit Docetaxel zu einer signifikanten Verbesserung der Ansprechrate, des progressionsfreien Überlebens und der Gesamtüberlebenszeit geführt. Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom führte der PD1-Inhibitor Nivolumab gegenüber Docetaxel zu einer statistisch signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit. Patienten mit aktivierenden EGFR-Mutationen sollten bei Resistenz gegen TKI rebiopsiert werden. Bei Vorliegen einer EGFR T790M Resistenzmutation sollte der Einschluss in eine Studie mit einem T790M-spezifischen Drittgenerationsinhibitor angestrebt werden. Bei Patienten mit *ALK* Mutationen führt die Zweitlinientherapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Crizotinib zu einer signifikanten Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, verglichen mit Docetaxel oder Pemetrexed. Bei Einleitung einer Chemotherapie wird eine Pemetrexed-haltige Kombination empfohlen (Brunelli et al., 2009, O'Rourke et al., 2010, Reck et al., 2014).

1.3 Stadiengerechte Therapie des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Die wirksamste Behandlungsform beim kleinzelligen Lungenkarzinom ist die medikamentöse Tumorthherapie (Chemotherapie). In Kombination mit Operation oder Bestrahlung besteht bei Limited Disease ein kurativer, bei Extensive Disease ein palliativer Anspruch [Sorensen et al., 2010).

1.3.1 Very Limited Disease

Als Therapieoptionen stehen die kombinierte Strahlenchemotherapie oder die primäre chirurgische Resektion gefolgt von adjuvanter Chemotherapie zur Verfügung. Bei Einsatz einer

kombinierten Chemostrahlentherapie wird eine 4-6 Zyklen Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid und eine möglichst frühzeitig beginnende simultane Strahlentherapie mit zumindest 50 Gy empfohlen. Bei primärer Operation sollten adjuvant 4 Zyklen Cisplatin und Etoposid appliziert werden. Für Patienten im Stadium N0 liegen die 5-Jahres-Überlebensraten bei 50-70%, für Patienten im Stadium N1 zwischen 35-40%. Die Schädelbestrahlung wird prophylaktisch durchgeführt (Interdisziplinäre S3-Leitlinie 2010, Sorensen 2010).

1.3.2 Limited Disease

Standard ist hier die kombinierte Strahlenchemotherapie. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen zwischen 20 und 25%. Wirksamste Chemotherapie ist die Kombination von Cisplatin und Etoposid über 4-6 Zyklen. Eine sequentielle konsolidierende Strahlentherapie erhöht die 5-Jahresüberlebensrate um ca. 5%, eine simultane Strahlentherapie um ca.10%. Eine Prophylaktische Bestrahlung des Schädels reduziert das Risiko für das Auftreten von Hirnmetastasen von 40 % bei nichtbestrahlten Patienten auf unter 10% bei schädelbestrahlten Patienten und verbessert die 5-Jahresüberlebensrate um absolut 3%. Für Patienten in höherem Alter über 75 Jahre oder bei deutlich eingeschränktem Allgemeinzustand kann eine primäre Chemotherapie mit Carboplatin und Etoposid und ggf. eine nachfolgende konsolidierende Strahlentherapie eine Therapieoption sein (Amarasena et al., 2008, Rossi et al., 2010).

1.3.3 Extensive Disease

Hier ist Standard die medikamentöse Tumortherapie. Sie wird in palliativer Intention durchgeführt und vermag neben einer Symptomkontrolle und damit einer Lebensqualitätsverbesserung eine deutliche Verlängerung des Überlebens zu erreichen. Die mediane Überlebenszeit der ED Patienten beträgt ca. 9-12 Monate, die 2 Jahresüberlebensrate 5-10%, ein 5 Jahresüberleben wird nur in Ausnahmefällen erreicht. Die prophylaktische Bestrahlung des Schädels bei Patienten, die auf die Chemotherapie ansprechen, reduziert das Risiko für das Auftreten von Hirnmetastasen und verlängert die mittlere Überlebenszeit um 1,3 Monate (Interdisziplinäre S3-Leitlinie 2010, Pelayo et al., 2009, Brunnelli et al., 2009).

1.3.4 Erstlinientherapie

Aktuell ist in den Stadien VLD und LD ist bei adjuvanter Therapie nach Operation sowie bei einer simultanen Chemo-Radiotherapie die Verwendung von Cisplatin und Etoposid weltweiter Standard [Amarasena et al, 2008). Cisplatin/ Etoposid kann ohne Dosiseinschränkung parallel zur Radiotherapie mit tolerablem Nebenwirkungsprofil eingesetzt werden. Cisplatin besitzt im Gegensatz zu Carboplatin eine gut belegte strahlensensibilisierende Wirkung. Im Stadium ED erreichen platinhaltige Therapieschemata signifikant höhere komplette Remissionsraten als nicht-platinhaltige Kombinationstherapien. Hier können beide Substanzen Cisplatin und Carboplatin gleichwertig eingesetzt werden. Die Kombination von Cisplatin / Etoposid erreicht Remissionsraten von 60-70% bei Patienten mit Extensive Disease. Alternative zur platinhaltigen Kombination ist eine anthrazyklinhaltige Therapie, z. B. mit Doxorubicin oder Epirubicin plus Cyclophosphamid / Vincristin oder Etoposid. Aufgrund der Anthrazyklin-assoziierten Kardiotoxizität, evtl. verstärkt durch eine zusätzliche Strahlentherapie, werden diese Protokolle heute jedoch deutlich seltener in der Primärtherapie eingesetzt. Erhaltungstherapie mit Zytostatika oder anderen Substanzen verlängert die Überlebenszeit nicht (Rossi et al., 2010).

1.3.5 Zweitlinientherapie

Bei Patienten in gutem Allgemeinzustand kann eine Zweitlinientherapie zur Symptomlinderung und zur Verlängerung der Überlebenszeit führen. Topotecan führte im Vergleich mit Best Supportive Care zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit. Weitere wirksame Substanzen in der Zweitlinientherapie sind Irinotecan und Paclitaxel. Die Auswahl des Therapieprotokolls richtet sich nach der Vortherapie und dem Allgemeinzustand. Einsetzbar sind Monotherapien der genannten Substanzen oder auch die Kombination von Medikamenten, die nicht in der Erstlinientherapie eingesetzt wurde. Bei einem Intervall >3 Monate zwischen dem Ende der Erstlinientherapie und dem Rezidiv kann auch ein erneuter Einsatz von Platin und Etoposid erwogen werden (Pelayo et al., 2009)

2 Hintergrund

2.1 Hitzeschockproteine (HSP)

Hitzeschockproteine sind kleine Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten, die in den Körperzellen, im Zytosol sowie in den Zellorganellen vorkommen und bei erhöhten Temperaturen und Organ- bzw. Gewebeschädigungen vermehrt gebildet werden (Alexandrov-Via 1994). Schon in den 60er Jahren wurde entdeckt, dass Larven der Fruchtfliege *Drosophila* einen neuartigen Satz von Proteinen synthetisieren, wenn sie bei supraphysiologischen Temperaturen gehalten werden (Rittosa 1962). Später zeigte es sich, dass diese Hitzeschock-Proteine in homologer Form in pro- und eukaryoten Zellen vorkommen und dass ihre Synthese nicht nur durch Hitzeschock, sondern durch eine Reihe anderer Schädigungen ausgelöst werden kann (Donald, Forsdyke, 1999). Allen genannten Zuständen ist gemeinsam, dass die Zahl nicht oder fehlerhaft gefalteter Proteine in einer Zelle zunimmt und dass dies auf noch nicht gekläarterweise die Synthese dieser Hitzeschock-Proteine auslöst. Dieser Befund hat zur Hypothese geführt, dass Hitzeschock-Proteine, die ja auch unter normalen Bedingungen synthetisiert werden, physiologischerweise die Funktion haben, die Erreichung des nativen, korrekt gefalteten Zustands von Proteinen zu beschleunigen: Sie hemmen die Aggregation während der Faltung eines Proteins, sie beeinflussen die Ausbeute und Kinetik während der Proteinfaltung (Robin 1998).

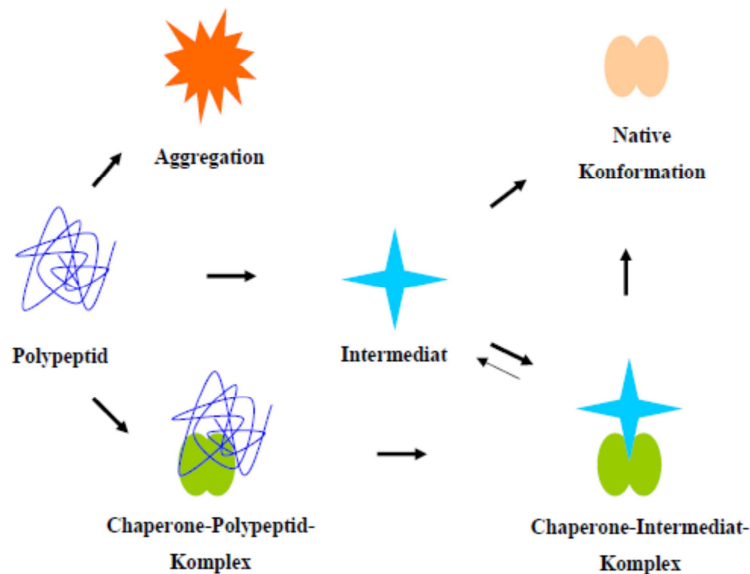


Abb.1: Schematische Darstellung der Chaperone- bzw. HSP-vermittelten Proteinfaltung in einer Zelle. Ungefaltete Polypeptide oder partiell gefaltete, höher organisierte intermediäre Polypeptide (Intermediate), die im Rahmen der Proteinbiosynthese oder unter dem Einfluss verschiedener Stressfaktoren entstehen, neigen zur Aggregation. Diese resultiert aus freiliegenden hydrophoben Aminosäureresten an der Moleküloberfläche. Chaperone können an diese hydrophoben Oberflächenstrukturen der Polypeptide binden (Chaperone-Polypeptid-Komplex, Chaperon-Intermediat-Komplex) und vermindern somit die Tendenz der Polypeptide und Intermediate untereinander zu aggregieren. So wird mithilfe von Chaperonen die Ausbildung der nativen, biologisch aktiven Konformation von Polypeptiden unterstützt (Schema modifiziert nach Fink, 1999).

Eine ihrer Hauptfunktionen ist damit also die Verhinderung unerwünschter, zur Aggregation führender Wechselbeziehungen zwischen Proteinen. Aus diesem Grunde werden sie auch als molekulare Chaperone (engl. Chaperon: Anstandsdame) bezeichnet. Diese molekularen Chaperone gehören zur Familie der Hitzeschock-Proteine, da sie in deutlich gesteigerten Mengen synthetisiert würden, wenn die Zellen erhöhten Temperaturen (etwa 42 °C für mindestens 30 Minuten) ausgesetzt waren. Hier scheint eine Rückkopplungs-Regulierung aktiviert zu werden, die auf jeden Anstieg von falsch gefalteten Proteinen mit Ankerbelung der Synthese von Chaperonen, die bei der Protein-Rückfaltung helfen, reagiert (Robin, Anerson, 1998). Auch die normale Proteinbildung wird von Chaperonen begleitet, sie können beispielsweise Falschfaltungen der Polypeptidkette und damit die Bildung unlöslicher Einschlusskörper bei der Expression von Proteinen verhindern (Loones, 1998). Diskutiert werden auch weitere Funktionen der HSP wie z.B.: Apoptoseunterdrückung unter physiologischen Bedingungen durch Verhinderung der Aktivierung von Procaspasen und

Verhinderung der Bildung von Apoptosomen (Lang 2002) und Induktion von Immunsuppression durch Inhibition von proinflammatorischen Non- Stressproteinen (Woo 1998).

Entsprechend der evolutionären Konservierung werden sie in Familien eingeteilt, deren Namen vom Molekulargewicht der jeweiligen Hauptvertreter abgeleitet wird. HSPs sind im Cytosol, in Mitochondrien, im ER und im Nukleus vorhanden. Sie haben typischerweise eine relativ lange Halbwertszeit (48 Stunden in menschlichen epidermoiden Zellen). HSP 78, 75, 60, 10 sind hauptsächlich in den Organellen vorhanden, während HSP 110, 90, 73, 72, 20 im Cytosol und im Nukleus nachgewiesen werden (Blake, Gershorn, 1990)

Die am besten untersuchten HSPs sind solche mit den Molekulargewichten 60, 70, 90 und 110 kDa. Diese HSPs werden bei 37° C ohne Hitzeschock exprimiert. HSP 70 und 90 werden in allen Organismen beobachtet, während HSP 110 hauptsächlich in Zellen von Säugetieren vorhanden sind (Botzler, 1996). Eine zweite Gruppe von HSPs werden unter der Voraussetzung des Glukoseentzugs induziert und enthalten glukoseregulierende Proteine (GRP) 34, 47, 94, 174 kDa (Sciandra und Subject, 1983).

2.2 Expression der HSP in der Lunge

Die am besten untersuchten Hitzeschockproteine in der Lunge sind die HSP mittleren Molekulargewichtes, wie HSP 47, 70 und 90. Hamilton, Polla und andere untersuchten deren Expression in den alveolären und interstitiellen Makrophagen bei verschiedenen Lungenerkrankungen, wie z.B.: Asthma bronchiale, ARDS, Lungenfibrose und Einflüsse von ionisierenden Strahlen (Hamilton 1997, Polla 1993). Die Mehrheit der alveolären und interstitiellen Makrophagen exprimiert bereits unter basalen Bedingungen HSP 60, 72, 90 (Bonay 1996). Unter Einfluss von Ozon (Hamilton 1996) sowie bei Patienten, die unter Asthma bronchiale und ARDS litten (Vignola 95), wiesen die alveolären Makrophagen eine signifikant gesteigerte HSP – Expression auf. Sowohl nach pulmonaler Strahlentherapie, als auch nach systemischer Chemotherapie, ist auch eine erhöhte Expression von HSP in der Lunge beobachtet worden, die die Zellen von den letalen Folgen der konsekutiven Stresseinwirkung schützen und die Faltung nativer und denaturierter Proteine unterstützen (Hettinga 1996).

HSPs findet man nicht nur in normalen Zellen des menschlichen Körpers, sondern auch in verschiedenen Tumoren. So weisen bis zu 50 % der Biopsien von Brust-, Endometrium-, Lungen- und Prostatakarzinomen und vieler anderer eine erhöhte intrazelluläre Expression von HSP auf (Ciocca 2005, Calderwood 2006). Die meisten Hitzeschockproteine werden auch bei Rauchern und in den Tumorzellen der Lunge abhängig vom Differenzierungsgrad unterschiedlich exprimiert (Bonay 1994). Bei Zelllysaten von resektablen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen wurden gleichfalls eine verstärkte Expression von HSP 70 festgestellt (West 2009). In humanen Bronchialtumor-Zelllinie LX ließen sich HSP 70 an der Zelloberfläche nachweisen, auch ohne dass eine Hyperthermiebehandlung erforderlich wäre (Betzler 1996). Es gibt aber wenig Arbeiten, die sich mit dem Nachweis von HSP in bronchoalveolären Lavagen beschäftigten. In einer Arbeit von Lee et al. (2012) konnte eine vermehrte Expression von HSP 47, 60 und 90 in der BAL von Patienten mit ARDS nachgewiesen werden. Wood et al. fanden vermehrt Anti-HSP 27-Antikörper in der BAL von Patienten mit Bronchiolitis obliterans nach Lungentransplantation (2010). In einer Arbeit von Vignola korrelierte die vermehrte HSP 70-Expression der BAL mit dem Schweregrad von Asthma (1995). Bisherige Untersuchungen an bronchoalveolären Lavagen bei Tumorpatienten beschäftigten sich vorrangig mit den Folgen der Strahlentherapie und weniger der Chemotherapie. Solit und Rosen fanden tendenziell eine vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen unter der Chemotherapie. Ebenfalls konnte einer Untersuchung über oxidative Lungenbelastung eine tendenziell erhöhte HSP-90-Expression in der BAL von Patienten unter der Chemotherapie (Beinert 2000).

2.3 Hitzeschockprotein 32 Kda (Hämoxygenase -1, HSP 32)

Die Hämoxygenase gehört zur Familie der Monooxygenasen. Das Enzym katalysiert mit Hilfe von NADPH und Sauerstoff die oxidative Spaltung des Protoporphyrins Häm. Bis jetzt wurden drei Isoformen, Produkte unterschiedlicher Gene, der Hämoxygenase identifiziert. Die Hämoxygenase Typ 2 (HO-2, 36 kDa) wird konstitutiv exprimiert und ist vor allem im zentralen Nervensystem zu finden. Die Hämoxygenase Typ 3 (HO-3, 33 kDa) besitzt geringe katalytische Aktivität. Ihre physiologische Funktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber eine Beteiligung an der Bindung von Häm wird vermutet. Die induzierbare Hämoxygenase Typ 1 (HO-1, 32 kDa) kommt ubiquitär im Organismus vor und zählt zu den Hitzeschockproteinen

(Otterbein 2000, Morita 2005). Die funktionale Bedeutung von Hämoxigenase-1-Induktion, konnte bisher nicht näher geklärt werden. Trotz alledem haben neuerliche Ergebnisse verschiedener Laboratorien die Hypothese unterstützt, dass die HO-1-Induktion eine bedeutende Rolle beim Zellschutz gegen beide, sowohl Häm- wie auch Nicht-Häm- verursachte oxidative Schäden, spielt.

Ansteigende Expression der HO-1-m RNA wurde auch in einer Anzahl primär kultivierte Zellen, die *in vitro* einer Hyperoxie ausgesetzt wurden, beobachtet. Sie beinhalteten Lungen-Fibroblasten, pulmonale Epithelialzellen, Peritoneal- und Alveolar-Makrophagen und glatte Muskelzellen der Aorta. Die Induktion von HO-1-m RNA in kultivierten Zellen, in Abwesenheit eines *in vivo*-Milieus und entzündlicher Antwort, lässt vermuten, dass Hyperoxie direkt oder indirekt intrazelluläre Signale weiterleiten kann, um die HO-1 Genexpression zu induzieren (Bauer, Rensing, 1997). Die HO-1 wird nicht nur durch das natürliche Substrat Häm induziert, sondern auch durch eine Vielzahl strukturell stark unterschiedlicher Agenzien. Neben Hitzeschock und oxidativem Stress zählen UV-Licht, Schwermetalle, Endotoxine, Prostaglandine und inflammatorische Cytokine zu den wichtigsten Induktoren. Die HO-1 scheint daher ein Enzym zu sein, das Zellen vor oxidativem Stress schützt. Aufgrund der unterschiedlichen Art der Induktoren wird spekuliert, dass die HO-1 auch eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase spielt. Sie stellt daher ein hochkonserviertes Enzym dar. Diese Befunde unterstreichen die Wichtigkeit der Hämoxigenase dahingehend, kritische Zellprozesse zu regulieren (Keyse et al. 1989; Choi et al. 1996; Otterbein et al. 2000). Eine Stimulierung der HO-1 kann ebenfalls zusätzliche therapeutische Effekte von verschiedenen Arzneistoffen wie z.B. Acetylsalicylsäure (ASS), Protonenpumpenhemmern (PPIs), NO-Donoren und Statinen vermitteln oder verstärken (Grosser et al. 2003). Die induzierbare Hämoxigenase zählt aufgrund ihrer antiinflammatorischen, antiapoptotischen, antioxidativen und antiproliferativen Eigenschaften zu den wichtigsten protektiven Proteinen des Organismus. Der Schutz vor prooxidativen Agenzien durch Induktion oder Überexpression der HO-1 konnte in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden (Choi et al. 1996). Eine wichtige Rolle wird diesem Protein insbesondere bei der zellprotektiven und modulierenden Wirkung auf entzündliche Prozesse zugeschrieben (Willis et al. 1996). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass das Enzym ebenfalls eine Rolle bei Entstehung und Verlauf von malignen Tumorerkrankungen spielt. Der Einfluss scheint dabei tumorspezifisch zu sein; Abhängig vom

Erkrankungstyp können tumorprotektive aber auch -supportive Eigenschaften vorliegen (Doi 1999, Fang 2004). Eine erhöhte Expression wurde in eine ganze Reihe verschiedener Tumoren, wie Bronchialkarzinome, Nierenzellkarzinom, Prostatakarzinom und Sarkome gefunden. Dagese et al. fanden 2012 dass, 96% der Proben eines Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms positiv für Hämoxygenase waren und dass die erhöhte Expression mit dem Fortschreiten der Erkrankung und Lymphknotenmetastasierung korreliert. Außerdem beobachteten sie eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisierung der Hämoxygenase zwischen Tumor- und tumorfreiem Gewebe. Eine erhöhte Expression kommt auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen vor. Barrera et al fanden 2012, dass Bortezomib eine erhöhte HSP-32-Expression bei Multiplen Myelom induzierte und damit eine Resistenzentwicklung gegen diese Chemotherapie in Verbindung brachten. Dabei scheint die Überexpression die Tumorprogression und Überleben von Tumorzellen zu fördern. Obwohl sich die Hämoxygenase im Endoplasmatischen Retikulum befindet, gelangt sie durch eine proteolytische Spaltung in den Zellkern, wo sie unabhängig von enzymatischen Aktivitäten die Tumorprogression und-invasion fördert. Außerdem induziert die Hämoxygenase auch die Angiogenese durch die Modulation der Expression von angiogenen Faktoren (Lee-Youn Chau 2015).

2.4 Hitzeschockprotein 47 Kda (HSP 47)

HSP 47 gehört zu den kleinmolekularen Stressproteinen und ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Es ist ein spezifischer Chaperon für Prokollagen und wird während Hyperthermie und Stresssituationen der Zelle verstärkt exprimiert. (Razzaque 98, Nagate 1996). Verschiedene Experimente kombiniert mit Kreuzversuchen und Immunpräzipitationsanalysen haben herausgefunden, dass HSP 47 wie ein kollagenspezifisches Molekularchaperon während der Bildung und Sekretion von Prokollagen im Endoplasmatischen Retikulum wirkt (Nakai 1992; Satoh 1996). Es wird vermutet, dass HSP 47 eine wichtige Rolle bei der Bildung von Kollagenfibrillen während der Entstehung der Fibrose in der Lunge spielt (Tomoyuki 2014). Bei selektiver Hemmung der HSP 47-Expression konnte gezeigt werden, dass auch die Kollagensynthese zurückgeht (Sunamoto 98). Es konnte gezeigt werden, dass HSP 47 auch ein intrazellulärer Mediator ist, der die Zytotoxizität durch Verhinderung der Aggregation und der fehlerhaften Faltung des Prokollagens, reduziert. Außerdem wird die Chemotaxis der Embryonalzellen durch Hochregulation der Chemokin-Rezeptoren, auch ohne exogene

Stimulation, beeinflusst (Wong 2014) und die Adhäsion von Tumorzellen an Fibronectin, Kollagen und Stromazellen unterstützt und dadurch die Tumoren (kleinzelliges Lungenkarzinom) resistenter gegen Chemotherapie macht (Hartmann 2005). Sowohl beim Kleinzelligen als auch Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom finden sich erhöhte Hitzeschockptoteinspiegel, insbesondere eine cytoplasmatische Überexpression von HSP 47 im Vergleich zu normalem Lungengewebe (Tanguy 2005). Neben der Überexpression konnten Oka et al 2001 auch noch Autoantikörper gegen HSP-40 im Serum nachweisen. Auch bei metastasierenden malignen Erkrankungen konnten höhere Spiegel von HSP 47 gefunden werden (Morino 1997). Eine Rolle als prognostischer Marker für die Metastasierung wurde hier vermutet.

2.5 Hitzeschockprotein 60 Kda (HSP 60)

HSP 60 ist ein mitochondriales Matrixprotein, das auch in der Faltung und korrekten Montage der Polypeptide im Komplex der mitochondrialen Enzyme beteiligt ist. Insbesondere ist es am Import der mitochondrialen Enzyme beteiligt. Eine mögliche Ursache an Mangel vieler Enzyme ist ein Defekt in der mitochondrialen Biogenese. Huckriede und Angsteribe (1994) beschrieben, dass ein partieller Mangel an HSP 60, die meiste Ursache der neonatalen mitochondrialen Myopathien und Enzymakkumulation, während ein kompletter Mangel an HSP 60 letal ist. Eine erhöhte Expression dieser Proteinfamilie wurde auch bei normalen bronchial Epithelien und Alveolarmakrophagen aber auch in verschiedenen histologischen Typen des Bronchialkarzinoms beobachtet und könnte ein Anzeichen als direkte Immunantwort gegen Tumorzellen darstellen (Ferm, Soderstrom, 1992). HSP 60 scheint die Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Zelle bei chronischen Lungenerkrankungen zu aktivieren. Cappelo et al bringen den Verlust von HSP 60 und HSP 10 mit Tumorentwicklung und -progression bei COPD-Patienten (Cappelo 2007). Neure Studien zeigen das HSP 60 auch im Zytosol, in intrazellulären Vesikeln und Oberflächen der normalen und Tumorzellen sowie im Blut vorkommen (Capello, 2014). Die extrazelluläre Form dient der Kommunikation zwischen den Tumorzellen und dem Immunsystem und von diesem als Alarmsignal gedeutet (Merendino, 2010). Die vermehrte Expression durch Tumorzellen scheint aber auch die Tumorentwicklung und Progression zu unterstützen (Rappa, 2012, Pace 2013). In einer ähnlichen Arbeit korrelierte die erhöhte Expression von HSP 60 mit dem TNM-Stadium bei Adenokarzinomen der Lunge (Xu 2011),

während Li und Zhang durch die Apoptose-Inhibition auch ein erniedrigtes HSP 60-Spiegel beobachteten (Li 2011).

2.6 Hitzeschockproteine 70 Kda (HSP 70)

HSP-70 findet sich in nahezu allen Organismen, in allen zellulären Kompartimenten und selbst im extrazellulären Raum (Feige und Polla 1994). Die wichtigste Funktion der HSP 70 ist als molekulares Chaperons. In einer normalen, nicht gestressten Zelle sind die HSP 70 an zwei verschiedenen Chaperonfunktionen beteiligt. Die erste Funktion dient der Proteinfaltung, die zweite Funktion dient der Translokation von Proteinen in verschiedene Zellkompartimente. Darüber hinaus ist HSP70 ebenfalls an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Helmbrecht et al., 2000). Durch Bindung an Monozyten führt zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren TNF Alpha, IL-6 und IL-1 Beta (Asea und Calderwood, 2000). Es dient also nicht nur zur Schutzfunktion, sondern auch als Signal zur Alarmierung des Immunsystems. Die Expression von HSP 70 ist auch substantiell erhöht in den Epithelien der Luftwege und Alveolarmakrophagen von Patienten mit Asthma. Die Höhe der Expression korreliert mit der Schwere der Krankheit und mit dem Prozentsatz der eosinophilen Zellen in der Bronchialflüssigkeit (Inflammation) (Ribero 1994). Einige andere Studien konnten eine Beteiligung von HSP 70 auch an verschiedenen Aspekten des Immunsystems nachweisen (Kaufmann und Schoel, 1994). Bei gesunden Nichtrauchern konnten HSP 72 und HSP 90 in Zylinderepithelien der oberen Atemwege in relativ großen Mengen nachgewiesen werden (Bonay 94). Die Beteiligung von Hsp70 an apoptotischen Prozessen ist vielfältig und betrifft sowohl AIF (apoptosis inducing factor)-unabhängige, als auch abhängige Prozesse und verschiedene Zeitpunkte innerhalb der apoptotischen Signalwege (Ravagnan et al., 2001). In Mauszellen konnte gezeigt werden, dass erhöhtes Hsp70 zu einer Abnahme von strahleninduzierten Schäden führte. Die Apoptoserate war erniedrigt und der durch die Bestrahlung induzierte Arrest in der G2/M-Phase wurde reduziert (Lee 2001). Neben den bereits unter physiologischen Bedingungen wichtigen Funktionen sind die Hauptaufgaben vor allem die Unterstützung von Vorgängen, die dem Schutz der Zelle oder der Reparatur von Schädigungen nach Stress dienen. HSP 70 wird nicht nur unter physiologischen Bedingungen exprimiert, sondern auch bei verschiedenen Tumorerkrankungen. Hierbei korreliert die erhöhte

Konzentration von HSP 70 mit Tumorproliferation, Metastasierung und schlechter Prognose (Ciocca 2006). Ein prominentes Beispiel ist die Fähigkeit von Tumorzellen, durch eine erhöhte Hsp70-Expression einen Schutz vor Apoptose zu induzieren. Die Expression der HSP 70 an der Zelloberfläche bei Tumorzellen ist abhängig von der zytoplasmatischen Menge. In vitro-Untersuchungen haben ergeben, dass die HSP 70 die Monozyten und andere Zellen vor Hydrogenperoxidase, Apoptose und letalen Temperaturen schützt (Kiang et al., 1998). Andererseits verringert die Inhibierung der Expression von HSP 70 das Überleben der Zellen. Die Mikroinjektion von Anti - HSP 70 - Antikörpern in die Fibroblasten zur Neutralisierung der HSP 70 ließ die Verletzbarkeit der Zellen gegenüber subletalen Temperaturen ansteigen (Riabowol et al., 1988). Eine erhöhte Expression von HSP 70 wurde auch bei den meisten NSCLC-Patienten festgestellt. Unter platinbasierter adjuvanter Chemotherapie hatten resezierte HSP-70-positive Patienten ein besseres Outcome als die Patienten, die nicht exprimierten. HSP 70 könnte hier als prädiktiver positiver Faktor gelten (Tai Sun, 2014). Unter Ibuprofen konnte bei Adeno-Ca-Patienten die Expression von HSP 70 unterreguliert und damit durch die fehlende Schutzfunktion des Proteins die Wirksamkeit von Cisplatin gesteigert und die Dosis inklusive Nebenwirkungen reduziert werden (Endo, H., 2014). Da könnten auch die anti-apoptischen Eigenschaften des HSP 70 eine Rolle spielen (Carter, Murphy, 2014). Bei metastasiertem kleinzelligem Bronchialkarzinom war die Expression von HSP 72 bei Patienten mit dem Genotyp GG im Vergleich zu Allel A-Trägern niedriger und damit auch mit einem kürzeren Überleben bei Genotyp GG-Patienten assoziiert (Szondy 2012).

2.7 Hitzeschockproteine 90 Kda (HSP 90)

Diese Proteinfamilie gehört zu den allgegenwärtigen molekularen Chaperone, die in der Stresstoleranz und in der Proteinfaltung eine essentielle Rolle spielen. HSP 90 ist ein ubiquitär und gut konserviertes Protein, dessen Synthese als Antwort auf zellulären Stress erhöht ist (Parsel, Schlessinger 90, 93) und in Tumorzellen verschiedener histologischer Typen des Bronchialkarzinoms erhöht ist. HSP 90 bindet zusammen mit einigen akzessorischen Proteinen ATP-abhängig neu synthetisierte Rezeptoren der Steroidhormongrossfamilie und hält sie in einer Konformation, die ihren Transport in den Zellkern verhindert. Erst nach Bindung des zugehörigen Hormons kommt es zur Entfernung der Hitzeschock-Proteine und der Hormon-Rezeptor-Komplex kann nun in den Kern transloziert werden und dort seine Funktion erfüllen.

Die wichtigste Funktion für HSP 90 besteht wahrscheinlich darin, dass es Bestandteil einer Chaperon-Maschinerie in der Chaperone der Gruppe HSP 90, HSP 70, HSP 60 und andere Proteine eine übergeordnete Struktur bilden, an der neu synthetisierte oder durch unterschiedliche Schädigungen in ihrer Konformation beeinträchtigte Proteine gebunden werden. Sie erlangen dadurch die Möglichkeit, sich in die native, biologisch aktive Form zu falten (McDonald, Workmann, 2006). HSP 90 kann in vitro die Proteinaggregation verhindern und die Faltung befördern (Weich et al., 1992), aber in vivo ist es funktionell angebunden an einen Multiproteinkomplex mit einer Anzahl assoziierter Proteine (Hwang, Moreti, 2009). In einer aktuellen Studie zeigten sich signifikant erhöhte Plasmawerte von HSP 90 bei Patienten mit Bronchialkarzinom unter der Chemotherapie als bei Patienten mit partieller Remission. Somit konnte HSP 90 als diagnostischer Biomarker für die Beurteilung der Effektivität der Chemotherapie (Shi, Liu, 2014) genutzt werden. Während in einer anderen Arbeit die Hochregulierung der HSP-90-Expression zusammen mit Annexin A1 mit schlechterem postoperativen Überleben und lymphogener Metastasierung assoziiert war (Rong Biao xue 2012). HSP 90-Inhibitoren (Ganetespib) führten zu Wachstumshemmung und Tumorregression in NSCLC-Zelllinien und Tumor-Xenotransplantatmodellen sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Medikamenten (Docetaxel). HSP 90-Hemmung hat besondere Wirksamkeit in der molekularen Subtypen von NSCLC, wie EGFR-mutierten und ALK (anaplastic-lymphoma-Kinase)-positiven Patienten (Pillai 2014).

3 Zielsetzung der Arbeit

Die Exposition von Tumorzellen mit Chemotherapeutika und Bestrahlung bedeutet für diese Zellen toxischen/oxidativen Streß, den sie nur durch Aktivierung entsprechender Abwehrmechanismen überleben können. Dabei werden durch die Stresseinwirkung verschiedene Hitzeschockproteine in der Zelle exprimiert. Die oben beschriebenen Proteine (HSP 32, HSP 47, HSP, HSP70 und HSP90) stellen aufgrund der vorliegenden Daten zentrale Regulatoren im Zellzyklus oder in der Immunantwort auf maligne Zellen dar. Durch die veränderte Pathophysiologie im Rahmen der Tumorerkrankung in der Lunge tritt ein Teil der Zellen aus dem Lungeninterstitium in den Alveolarraum über, so dass über die Analyse der BAL-Flüssigkeit Rückschlüsse auf die interstitiellen Prozesse in der Lunge gezogen werden. Konkret konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf diese Fragen: Können durch das HSP-Expressionsverhalten in der Bronchiallavage von Tumorpatienten Rückschlüsse auf die Effektivität der Chemo- und Strahlentherapie bzw. Resistenzentwicklung durch die in der Literatur beschriebene Unterdrückung der Apoptose und damit Assoziation mit Tumorprogression gezogen werden und gibt es einen Einfluss auf den Verlauf der Tumorerkrankung durch parallelen Schutz der gesunden Zellen von konsekutiven Folgen der oxidativen Belastung während der Chemo- und Strahlentherapie? Hierzu wurden Bronchoalveolarlavagen von 95 konsekutiven Patienten mit Bronchialkarzinom unter oder nach zytorreduktiver Therapie untersucht. Mittels durchflusszytometrischer Methoden wurde dabei die Expression von o.g. HSPs in der Bronchoalveolarlavage bestimmt.

4 Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

4.1.1 Unterteilung in die Therapiegruppen

Für unsere Arbeit konnten insgesamt 95 bronchoalveolar Lavagen von Patienten mit fortgeschrittenem, nicht operablem Bronchialkarzinom gewonnen werden. Die Bronchoskopie erfolgte zur Diagnostik im Rahmen des Tumorstagings und zur Remissionskontrolle unter oder nach Chemo- und Radiotherapie. Die Weiterverarbeitung erfolgte in dem Molekularbiologischen Labor der Universitätsklinik in der Charité in Berlin.

Die Patienten wurden in folgenden 3 Gruppen unterteilt

Gruppe 1 Patienten in kompletter Remission (CR)

Gruppe 2 Patienten unter laufender Chemotherapie (CT)

Gruppe 3 Patienten unter laufender Radio-Chemotherapie (RCT)

Gruppe 1

Patienten, die im Rahmen einer Kontrolluntersuchung nach operativer Tumorentfernung zur einer Kontrolluntersuchung kamen und in der aktuellen Untersuchung kein Verdacht auf erneutes Tumorwachstum zeigten, wurden in diese Gruppe eingeschlossen.

Gruppe 2

Dieser Gruppe wurden Patienten zugeordnet, die unter einer laufenden Chemotherapie bei überwiegend metastasiertem Tumorwachstum zur Remissionskontrolle untersucht wurden. Hierbei waren mindestens 2 Zytostatika-Gaben verabreicht worden. Bei den meisten Patienten erfolgte eine kombinierte Chemotherapie. Hierbei wurden zur Therapie des Bronchialkarzinoms (NSCLC und SCLC) die folgenden Üblichen Zytostatikakombinationen eingesetzt:

Tabelle 6: Verwendete Chemotherapiekombinationen zur Behandlung des Bronchialkarzinoms

Platinbasierte Kombinations-Chemotherapien:

Gemcitabin / Cisplatin

Paclitaxel / Carboplatin

Etoposid / Vinorelbin / Carboplatin

Mitomycin C / Ifosfamid / Cisplatin

Adriamycin / Vinblastin / Carboplatin

Ifosfamid / Etoposid / Carboplatin

Ifosfamid / Carboplatin

Nicht platinbasierte Kombinations-Chemotherapien

Gemcitabin / Vindesin

Vindesin / Mitomycin

Cyclophosphamid / Etoposid

Ifosfamid / Etoposid

Gruppe 3

In dieser Gruppe wurden Patienten eingeschlossen, die entweder nach erfolgreicher vorangegangener Chemotherapie mit partieller oder kompletter Remission, oder bei unter Chemotherapie progredientem Tumorwachstum strahlentherapiert wurden. Die Strahlentherapie erfolgte konventionell fraktioniert mit bis zu einer thorakalen Gesamtdosis bis zu 45 Gy.

4.1.2 Tumorhistologie

78 Proben, entsprechend 74%, stammten von Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom, 17 Proben, entsprechend 26%, von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom.

Die Gruppe der nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome umfasste folgende histomorphologische Diagnosen: Plattenepithelkarzinom: 25 Fälle, entsprechend 19,5%, Adenokarzinom: 34 Fälle, entsprechend 26,5%, großzellige Karzinome: 10 Fälle, entsprechend 7,8% der Proben. Der Rest waren Mischtumoren oder Karzinoide.

Gruppe	Patienten	Prozent	m/w	SCLC/NSCLC
1	43	45,3	39/4	5/38
2	30	31,6	28/2	8/22
3	22	23,2	21/1	4/18

Tabelle 7: Charakteristika der Patienten bezogen auf die Gruppen der analysierten Proben

Remissionskriterien

Die Beurteilung der Tumorremission unter chemotherapie Therapie erfolgt gemäß den gültigen WHO-Kriterien (1979):

Komplette Remission (CR): Verschwinden des vorhandenen Tumors, Bestätigung anhand einer Kontrolluntersuchung im Abstand von mindestens 4 Wochen.

Partielle Remission (PR): Mindestens 50%ige Verkleinerung der geometrischen Gesamttumorgröße des Tumors für mindestens 4 Wochen. Weiterhin dürfen keine neuen

Gewebeveränderungen entstanden und keine Anzeichen für eine Progression bereits bestehender Gewebeveränderungen vorhanden sein.

Stable Disease (SD): Es ist weder eine 50%ige Verkleinerung der geometrischen Gesamttumorgröße noch eine 25%ige Größenzunahme einer oder mehrerer meßbarer Gewebeläsionen nachweisbar, und es besteht kein Anzeichen für das Auftreten einer neuen Läsion.

Progression (PD): Zunahme der Größe mindestens einer meßbaren Gewebeläsion um mindestens 25% oder Entstehung neuer Gewebeläsionen.

Die Dauer der partiellen Remission ist definiert als der Zeitraum ab der ersten Gabe der Chemotherapie bis zum Zeitpunkt des dokumentierten Beginns der Progression. Die Dauer der kompletten Remission ist definiert als Zeitraum ab dokumentiertem Beginn der kompletten Remission bis zum Zeitpunkt, an dem die Krankheitsprogression erstmalig beobachtet wird.

4.2 Brochoalveoläre Lavage (BAL)

Durch die bronchoalveoläre Lavage werden Zellen des Alveolarraums durch Verdünnung und Auswaschung des alveolären epithelialen Flüssigkeitsfilms (epithelial lining fluid, ELF) mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnen. Die zelluläre Differenzierung zeigt beim Lungengesunden mit 85% zum größten Teil Alveolarmakrophagen, gefolgt von Lymphozyten (15%) und neutrophilen Granulozyten (3%). Daneben finden sich vereinzelt Mastzellen und eosinophile Granulozyten. Ein Teil dieser Zellen tritt aus dem Lungeninterstitium in den Alveolarraum über, so daß die BAL-Flüssigkeit (BALF) Rückschlüsse auf die zellulären Bestandteile des Interstitiums erlaubt bzw. interstitielle Prozesse in der Lavageflüssigkeit gleichsam gespiegelt werden (Hunninghake et al.,1979; Weiland et al.,1989). Da die Makrophagen den größten Anteil der BAL-Zellen ausmachen erfolgte eine durchflusszytometrische Zelldifferenzierung zwischen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen nicht. Die aktivierten Alveolarmakrophagen in der BAL dienten uns als Zielgruppe für die Untersuchung der HSP-Expression.

Die bronchoalveoläre Lavage wird durch Einspülen und anschließendes Absaugen von Flüssigkeit über ein flexibles Fieberglas-Bronchoskop gewonnen. Diese Flüssigkeit ist ein Gemisch aus dem Flüssigkeitsfilm der peripheren Bronchien und Alveolen (epithelial lining fluid) und dem zurückgewonnenen Anteil des eingespülten Mediums (NaCl 0,9%).

Den Anfang einer Analyse der bronchoalveolären Lavage bilden die Bestimmung der Zellzahl und der Zelldifferenzierung in der gewonnenen Probe. Sie sind die am häufigsten durchgeführten Untersuchungen und im Vergleich zu andere Untersuchungen am weitesten standardisiert.

4.2.1 Durchführung der BAL

Nach entsprechender Aufklärung und Vorbereitung des Patienten und unter Kontrolle der Vitalparameter sowie O₂-Gabe über eine Nasenonde erfolgte in Lokalanästhesie die bronchoskopische Untersuchung. Dabei wurden nach Inspektion des Lokalbefundes 100ml einer isotonen Kochsalzlösung fraktioniert instilliert. Die rückgewonnenen Proben wurden innerhalb von 4 Stunden in unser Labor verbracht. Alle broncho-alveolären Lavagen wurden in der Lungenklinik in Treuenbritzen, Lehrkrankenhaus der Charité, Chefärztin Frau Dr.med. C. Oehm, durchgeführt.

4.2.2 Aufbereitung der Proben

Die Zellen wurden während einer bronchoskopischen Spülung mit etwa 10 bis 20 ml isotoner Kochsalzlösung gewonnen. Zunächst wurden die Proben durch eine zweilagige Kompresse zweimal filtriert, um die Schleimflocken aus der Probe zu entfernen und damit eine unnötige Verstopfung der Geräte zu vermeiden und für 10 Minuten bei 900 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Probenüberstand wurde dann dekantiert bzw. verworfen und die Zellpallets mit 1ml bis 2 ml einer 2% BSA verdünnten PBS- Lösung gelöst. Anschließend wurde mit einem Coulter Counter (Fa Coulter Immunotech, D-Krefeld) in einer 5 µl-Probe die Zellzahl bestimmt.

4.3 Fixation

Es erfolgte dann noch eine sanfte Zentrifugation der Proben bei 1400 Umdrehungen/Minute für 15 Minuten, um die Zellen ($1-2 \times 10^6$) dann in 100µ einer 1% Paraformaldehydlösug für

10 Min in Raumtemperatur zu fixieren. (Die Fixierungslösung wurde frisch aus 0,3 g Paraformaldehyd in 10 ml PBS bei 70°C aufgelöst und anschließend auf Raumtemperatur gekühlt). Die fixierten Zellen wurden mit 1ml PBS bei einer Zentrifugation von 1200 Umdrehungen/Minute gewaschen.

4.4 Permeabilisation und Inkubation mit Antikörpern

Die Permeabilisation und Inkubation der Zellen mit Antikörpern erfolgte simultan. Nach der Fixierungsstufe wurden die Zellen in 50 µl einer 0,6 % Saponinlösung (Aufbewahrung bei – 20°C) und 50µl der in PBS-BSA 1:100 verdünnten Anti - HSP - Antikörper (Stressgen, Sigma und Dako) für 10 Minuten in Raumtemperatur inkubiert und bei einer Zentrifugation von 1200 Umdrehungen/Minute in 1ml PBS gewaschen. Danach wurde den Zellen noch mal 50µl der Saponinlösung hinzugefügt, um sie dann mit 50µl der sekundären Antikörpern (FITC-konjugierte Fab-Fragmente der Anti-Maus IgG, verdünnt 1:30 in PBS-BSA von Stressgen und Dako) für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur zu inkubieren. Bei der letzten Zentrifugation 1200 Umdrehungen/Minute wurden die Zellen nochmals mit 1ml PBS-BSA gewaschen und als letzter Schritt die Zellpellets in 500µl PBS verdünnt und dann unter dem Durchflusszytomer analysiert.

Die Negativkontrolle erfolgte mit dem jeweiligen Isotyp des Primärantikörpers (IgG 1, IgG 2a) in analogen Arbeitsschritten.

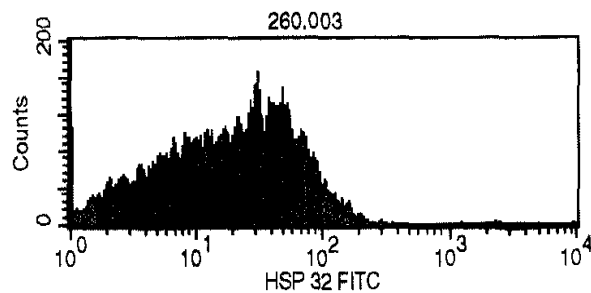
Verwendet wurden folgende Isotyp-Kontroll-Antikörper und HSP-Antikörper:

IgG 1, IgG 2a	(DAKO Diagnostika GmbH, D Hamburg)
HSP 32, 47, 60 und 70	(DAKO Diagnostika GmbH, D Hamburg)
HSP 90	(Sigma, D Deisenhofen)

4.7 Die durchflusszytometrische Analyse

Die multiparametrische Durchflusszytometrie (Becton Dickinson) beruht auf der simultanen Analyse von Fluoreszenzsignalen, Vorwärtsstreulicht (Zellgröße), Seitwärtsstreulicht (Zellgranularität) und bis zu vier verschiedenen Fluoreszenzsignalen hydrodynamisch fokussierter Zellen in Einzelzellsuspensionen, die sequentiell an einem Messpunkt vorbeigeführt werden. Die FITC konjugierten Antikörper wurden durch einen 488 nm Argon Laser analysiert. Die Verstärkungsstufe und -art erfolgte logarrhythmisch.

Die Auswertung erfolgte auf der Grundlage der Messdateien nach dem derzeit gültigen und herstellunabhängigen „FCS 2,0“ (Data File Standards Committee of the Society for Analytical Cytologie, 1990). Die durch Verunreinigung verursachten Störsignale konnten anhand der grafischen Darstellung in Form eines Dot Plots oder Histogramms diskriminiert werden. Die exprimierten HSP Mengen wurden in MPC (Mean peak channel of fluorescence intensity), dem durchschnittlichen Fluoreszenzwert angegeben.



File: 260.003 Sample ID: 260
Tube: HSP 32 Acquisition Date: 29-Jul-99
Total Events: 10000 X Parameter: FL1-H HSP 32 FITC (Log)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Peak Ch
All	10000	100.00	100.00	31.79	16.37	325.39	19.11	224	1

Abb.2: Darstellung der HSP-Expression als Histogramm nach durchflußzytometrischer Messung.

4.8 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SPSS, Version 8, auf einem IBM-kompatiblen Personalcomputer. Die Auswertung wurde auch durch das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie in Berlin unterstützt. Alle angegebenen Mittelwerte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert, die Abweichungen wurden als Standardabweichungen angegeben.

Zum Vergleich von unverbundenen Stichproben wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test herangezogen.

Zur graphischen Darstellung der Werteverteilung über die Gruppen wurden Box-Plots gewählt. Bei numerischen Datenformat erfolgte der Vergleich der Testvariablen über die Gruppenvariable unter der Hypothese nicht normal verteilter Daten parameterfrei mit dem Kruskal-Wallis-Test.

Zur Beschreibung numerischer Variablen mit nicht normal verteilten Werten wurden folgende Parameter tabellarisch angegeben: Median, Minimum, Maximum, 24. Perzentil, 75. Perzentil. Für alle angewendeten Testverfahren wurde als Irrtumswahrscheinlichkeit ein Alpha-Fehler von 0,05 angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Patienten-Charakteristika

Es konnten insgesamt 95 Lavageproben von Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom weiter verarbeitet, untersucht und analysiert werden.

Die folgende Tabelle fasst die Charakteristika der Patienten, der malignen Erkrankung und Metastasierung zusammen:

	Anzahl der Patienten	Anteil in Prozent
Geschlecht		
-männlich	88	92,6
-weiblich	7	7,4
Alter		
-Minimum	27	
-Maximum	80	
-Mittelwert	69	
Nikotinmißbrauch		
-Raucher	68	71,6
-Ex-Raucher	-	
-Nichtraucher	18	18,9
-unbekannt	9	9,5
Tumorhistologie		
-SLC	17	17,9

-NSCLC, davon	78	82,1
-PlattenepithelKarzinome	29	37,2
-Adenokarzinome	24	30,7
-Großzellige Karzinome	15	19,3
-Andere	10	12,8
Metastasen		
-Knochen-Leber	5	5,3
-cerebral	6	6,3
-Pulmonal	6	6,3
-Lymphknoten	78	82
Gesamtzellzahl in der BAL x 10³/µl		
-Minimum	1,7	
-Maxium	24	
-Mittelwert	7,4	

Tabelle 8: Gesamtcharakteristika der Patienten

Die Proben wurden in folgenden Gruppen eingeteilt:

CR: Gruppe der Patienten in Kompletter Remission (Gr.1)

CT: Gruppe der Patienten unter Chemotherapie (Gr.2)

RCT: Gruppe der Patienten unter Chemo- und Radiotherapie (Gr.3)

Der folgenden Tabelle kann die Patientenzahl und die Prozente der jeweiligen Gruppe entnommen werden.

Patientengruppen	Patientenzahl	Prozent
Komplette Remission (CR)	43	45,3
Chemotherapie (CT)	30	31,6
Radio-Chemotherapie (RCT)	22	23,2
Gesamt	95	100

Tabelle 9: Gruppeneinteilung und Patientenzahl

Wie den obigen Tabellen mit unterschiedlichen Charakteristika zu entnehmen ist, war eine Einteilung nur anhand der erfolgten Therapie und des erreichten Therapieeffektes möglich. Hauptziel war eine breite Kontrollgruppe mit relativ identischen Eigenschaften zu rekrutieren und weitere Gruppen, bei denen eine relevante Expression der HSP stattfinden kann. Letztendlich erfolgte folgende Einteilung: Patienten, die im Rahmen einer Kontrolluntersuchung nach operativer Tumorentfernung zur einer Kontrolluntersuchung kamen und in der aktuellen Untersuchung kein Verdacht auf erneutes Tumorwachstum zeigten, wurden in die erste Gruppe eingeschlossen und wurden als Kontrollgruppe zum weiteren Vergleich vorgesehen. Bei den meisten Patienten war eine Lungenlappenresektion erfolgt. 39 Patienten waren männlichen und 4 Patienten weiblichen Geschlechts. 38 Proben, stammten von Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom, 5 Proben von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom.

Der zweiten Gruppe wurden Patienten zugeordnet, die unter einer laufenden Chemotherapie bei überwiegend metastasiertem Tumorwachstum zur Remissionskontrolle untersucht wurden. Hierbei waren mindestens 2 Zytostatika-Gaben verabreicht worden.

Bei den meisten Patienten erfolgte eine kombinierte Chemotherapie, die bereits im Kapitel Material und Methoden angegeben wurde. 28 Patienten waren männlichen und 2 weiblichen Geschlechts. 22 Proben, stammten von Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom, 8 Proben, von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom.

In der dritten Gruppe wurden Patienten eingeschlossen, die entweder konsolidierend nach erfolgreicher vorangegangener Chemotherapie mit partieller oder kompletter Remission, oder bei unter Chemotherapie progredientem Tumorwachstum strahlentherapiert wurden. Die Strahlentherapie erfolgte fraktioniert von 14 bis zu einer thorakalen Gesamtdosis von 45Gy. Eine Patientin war weiblichen Geschlechts, 21 Patienten waren männlichen Geschlechts. 18 Proben stammten von Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom, 4 Proben von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom.

Vor der Fixierung wurde die Zellzahl mit einem Coulter Counter (Fa Coulter Immunotech, D-Krefeld) in einer 5 µl-Probe bestimmt. Es fand sich eine Streubreite von 1,7 bis 24×10^3 Zellen pro µl, im Durchschnitt $7,4 \times 10^3$ Zellen pro µl in allen Proben. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden.

Die Vitalitätsprüfung der durch bronchoalveolären Lavage gewonnenen Zellen wird in der Literatur mit der Trypan-Blau-Methode beschrieben. In einer ähnlichen Arbeit lag im Mittel der Anteil der hiermit gefärbten avitalen Zellen in der BALF zwischen 25% und 35%. Das Verteilungsmuster innerhalb der Subgruppen der Proben in verschiedenen Therapiestudien erbrachte im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede (Beinert, 2001). Bei einem auszugehenen vitalen Zellanteil zwischen 65% und 75% erfolgte in meiner Arbeit keine Vitalitätsprüfung.

In den Gruppen wurden die folgende Anzahl von Proben systematisch durchflusszytometrisch aufgearbeitet:

HSP (kDa)	Patientenproben	Prozent	Ausgeschlossen	Prozent
HSP 32	70	73,7	25	26,3
HSP 47	93	97,9	2	2,1

HSP 60	92	96,8	3	3,2
HSP 70	94	98,9	1	1,1
HSP 90	95	100	0	0

Tabelle 10: Gesamtzahl der Proben der jeweiligen HSP-Familie

In folgenden Tabellen werden die HSP-Expressionen einzeln für alle Patientengruppen dargestellt:

HSP 32	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
CR	47,7037	34,5400	4,31	156,36
CT	62,5845	38,9350	6,23	289,01
RCT	57,5117	42,9700	4,83	189,65
Insgesamt	54,4774	36,0100	4,31	289,01

Tabelle 11: Expression von HSP-32

HSP 47	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
CR	67,3564	35,8650	3,75	251,70
CT	66,0248	41,0100	1,36	321,72
RCT	57,8982	37,9000	0,83	189,58
Insgesamt	64,7038	36,3600	0,83	321,72

Tabelle 12: Expression von HSP 47

HSP 60	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
CR	60,9900	30,0700	3,56	369,51
CT	68,4259	31,0900	7,76	358,72
RCT	51,6305	28,9850	2,83	185,98
Insgesamt	61,0958	30,5650	2,83	369,51

Tabelle 13: Expression von HSP 60

HSP 70	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
CR	61,0274	50,0650	5,53	180,63
CT	52,0637	49,2900	7,20	161,46
RCT	47,1382	46,0500	2,45	94,09
Insgesamt	54,9160	47,0050	2,45	180,63

Tabelle 14: Expression von HSP 70

HSP 90	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
CR	83,8088	48,9100	1,52	565,53
CT	101,3757	67,2200	6,74	360,02
RCT	79,6523	76,1950	4,05	192,15
Insgesamt	88,3937	64,8700	1,52	565,53

Tabelle 15: Expression von HSP 90

Zusammenfassend werden in der Tabelle 16 alle drei Patientengruppen mit den Expressionen von sechs HSP-Familien sowie ihren Mittelwerten dargestellt. Wie in dem Beispiel HSP 32 verdeutlicht, hatte das HSP 32 einen Mittelwert von 47 in der CR-Gruppe, einen Mittelwert von 62 in der CT-Gruppe und 57 in der RCT-Gruppe. Der niedrigste Wert lag bei 4,3 und der höchste Wert bei 283. Der Medianwert lag bei 34. Wie zu erwarten, war der Mittelwert und der Medianwert in der CR-Gruppe kleiner als in den anderen beiden Gruppen.

So verhielten sich aber nicht die anderen Hitzeschockproteine, wie z.B. das HSP 47 oder das HSP 70. Der kleinste Mittelwert der HSP 47 lag nicht in der CR- Gruppe, sondern in der RCT-Gruppe. Die Mittelwerte in der CR und CT- Gruppe waren fast identisch 67 und 66.

Identisch war auch die Expression von HSP 60 und 70. Der kleinste Mittelwert der HSP 90 lag in der RCT- Gruppe mit 79 und der höchste Mittelwert mit 101 lag in der CT- Gruppe. In der CR- Gruppe lag er bei 79.

Gruppen		HSP32	HSP47	HSP60	HSP70	HSP90
1 CR	N	32	42	41	42	43
	Mittelwert	47,7037	67,3564	60,9900	61,0274	83,8088
	Median	34,5400	35,8650	30,0700	50,0650	48,9100
	Minimum	4,31	3,75	3,56	5,53	1,52
	Maximum	156,36	251,70	369,51	180,63	565,53
2 CT	N	20	29	29	30	30
	Mittelwert	62,5845	66,0248	68,4259	52,0637	101,3757
	Median	38,9350	41,0100	31,0900	49,2900	67,2200
	Minimum	6,23	1,36	7,76	7,20	6,74
	Maximum	289,01	321,72	358,72	161,46	360,02
3 RCT	N	18	22	22	22	22
	Mittelwert	57,5117	57,8982	51,6305	47,1382	79,6523
	Median	42,9700	37,9000	28,9850	46,0500	76,1950
	Minimum	4,83	0,83	2,83	2,45	4,05
	Maximum	189,65	189,58	185,98	94,09	192,15
Insgesamt	N	70	93	92	94	95
	Mittelwert	54,4774	64,7038	61,0958	54,9160	88,3937
	Median	36,0100	36,3600	30,5650	47,0050	64,8700
	Minimum	4,31	0,83	2,83	2,45	1,52
	Maximum	289,01	321,72	369,51	180,63	565,53

Tabelle 16: Übersicht über die Expression von Hitzeschockproteinen in allen Patientengruppen.

In der Tabelle 17 wurde für einen direkten Vergleich der HSP- Expressionen eine andere Darstellung genommen. Neben den Medianwert wurden zusätzlich die 25 und 75 Perzentile Angegeben, damit die Verteilung der HSP in verschiedenen Gruppen besser beurteilt und sie in Form von Dot Plots dargestellt werden kann.

		Anzahl N	25.Perzentil	75.Perzentil
Gruppen 1 CR	HSP32	43	17,68	63,47
	HSP47	43	16,62	104,43
	HSP60	43	16,91	93,14
	HSP70	43	29,51	90,04
	HSP90	43	28,46	96,92
Gruppen 2 CT	HSP32	30	11,76	63,62
	HSP47	30	13,52	68,32
	HSP60	30	14,98	73,53
	HSP70	30	26,69	62,87
	HSP90	30	19,44	138,41
Gruppen 3 RCT	HSP32	22	11,22	99,93
	HSP47	22	12,97	102,08
	HSP60	22	10,95	63,61
	HSP70	22	31,49	63,86
	HSP90	22	36,33	104,36

Tabelle 17: Expression der HSP mit Darstellung der 25 und 75 Perzentile

5.2 Explorative Datenanalyse

Durch die explorative Datenanalyse wird die Verteilung der Expressionen in allen drei untersuchten Gruppen wie folgt dargestellt:

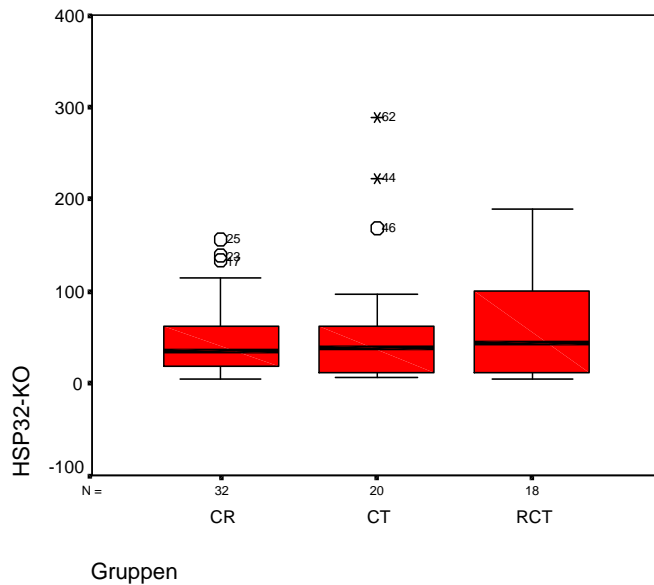


Abb. 3: Expression der HSP-32

Die Expression der HSP-32 war in allen Gruppen insgesamt niedrig, wobei die größte Streubreite der gemessenen Werte in der dritten Gruppe der Patienten lag, die kombiniert mit Chemotherapie und Radiatio behandelt wurden. Tendenziell war eine niedrigere Expression in der ersten Gruppe der Patienten, die sich in kompletter Remission befanden und der akute zelluläre Stress fehlte. Höhere Werte wurden in der CT- und RCT-Gruppe gemessen, wo zellulärer Stress noch vorhanden war und die Krankheit weiter fortschritt.

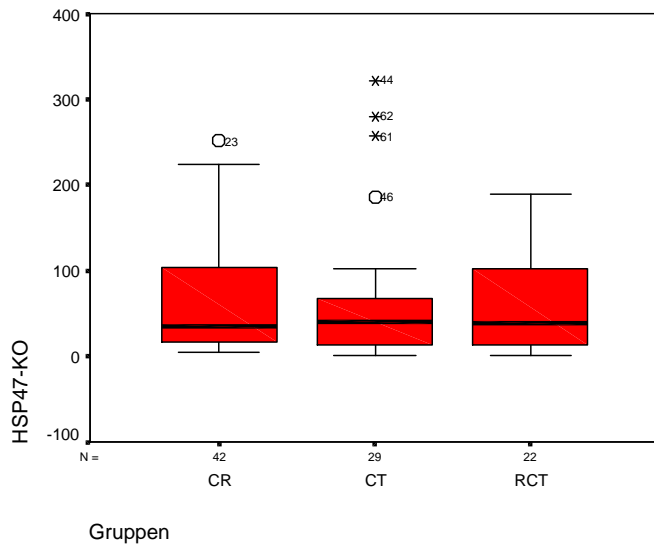


Abb. 4: Expression der HSP-47

Die größte Streubreite fand sich hier in der Kontrollgruppe, während die Mittelwerte der exprimeirten HSP 47 ziemlich identisch in allen drei Gruppen und statistisch nicht signifikant waren.

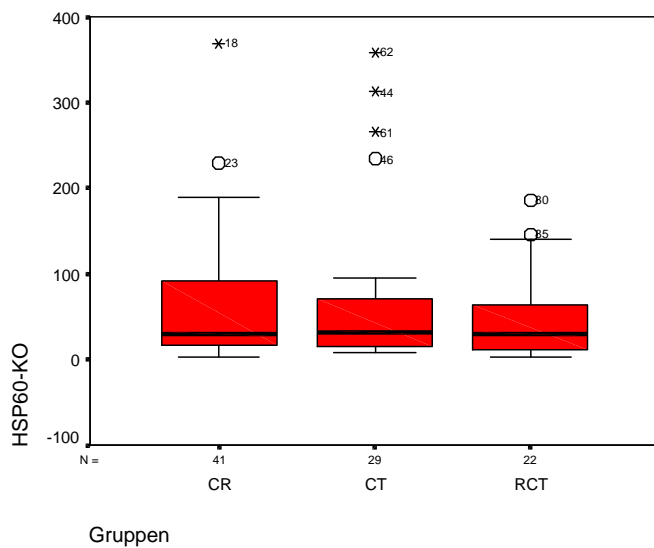


Abb. 5: Expression von HSP 60

In der HSP-60-Expression fand sich tendentiell eine niedrigere Expression in der Gruppe der Radiochemotherapie (CRT). Die größte Streubreite wurde in der CR-Gruppe festgestellt. Auch hier verzeichnete sich nach Man-Whitney-Test keine statistische Signifikanz zwischen allen drei Gruppen.

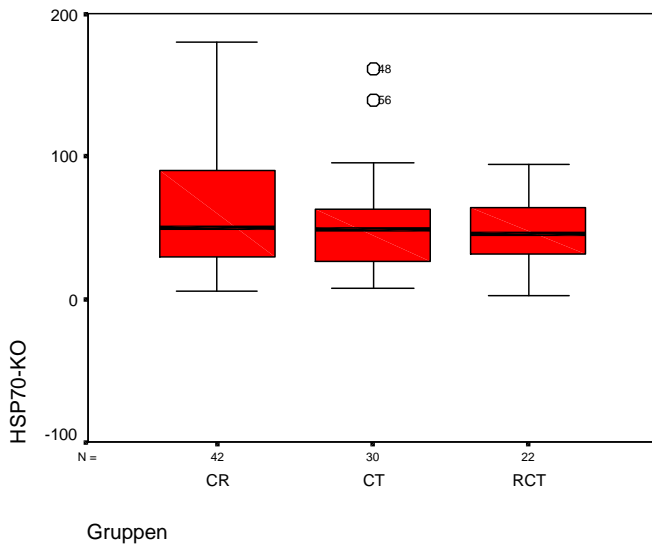


Abb. 6: Expression von HSP 70

Die Expression von HSP 70 nahm tendentiell über die Gruppen ab und war am niedrigsten in der Radiochemotherapie-Gruppe (CRT), statistisch signifikant war es aber nicht (Man-Whitney-Test, asymptotische Signifikanz: $p=0,36$). Hier lag die größte Streubreite in der Gruppe in kompletter Remission (CR-Gruppe).

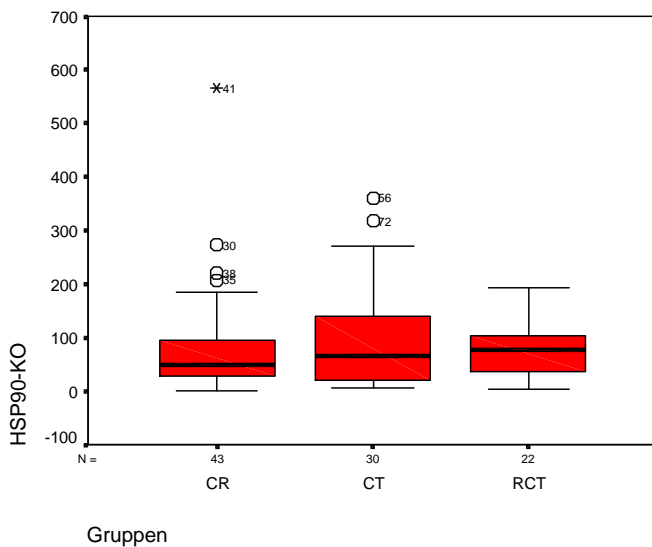


Abb. 7: Expression von HSP-90

Die höchste HSP-90 Expression und die größte Streubreite fand sich bei den Patienten unter der Chemotherapie, während in beiden anderen Gruppen die Werte relativ identisch und ohne statistische Signifikanz waren.

5.3 Nichtparametrische Tests: Man-Whitney-Test

Zur Beurteilung von Expressionsunterschieden zwischen den untersuchten Patienten Gruppen wurden nicht-parametrische Tests, wie Man-Whitney-Test, herangezogen. Die Expression der Hitzeschockproteinewurde zwischen allen drei Gruppen miteinander verglichen. Erstens wurde zwischen den Patienten in kompletter Remission (CR) und unter Chemotherapie(CT) verglichen (siehe Tabelle 18).

	HSP32	HSP47	HSP70	HSP90	HSP60
Mann-Whitney-U	316,000	550,000	550,000	573,000	570,000
Wilcoxon-W	526,000	985,000	1015,000	1519,000	1005,000
Z	0,075	0,690	0,914	0,807	0,292
Asymptotische Signifikanz	0,940	0,490	0,361	0,420	0,770
(2-seitig)					

Tabelle 18: Gruppenvariablen Komplette Remission und Chemotherapie (CR und CT)

Auch in den beiden anderen Vergleichen zwischen den Patientengruppen in kompletter Remission und unter Chemo- und Radiotherapie, bzw. zwischen Strahlen- und Chemotherapeutisch behandelten Patienten, zeigte sich, wie in den Tabellen 19 und 20, kein signifikanter Unterschied in der HSP- Expression (die asymptotische Signifikanz lag zwischen 0,2 und 0,9).

	HSP32	HSP47	HSP70	HSP90	HSP60
Mann-Whitney-U	287,000	416,000	388,000	407,000	410,000
Wilcoxon-W	815,000	669,000	641,000	1353,000	663,000
Z	0,020	0,650	1,046	0,915	0,591

Asymptotische	0,984	0,516	0,296	0,360	0,554
Signifikanz					
(2-seitig)					

Tabelle 19: Gruppenvariablen Komplette Remission und Radio-Chemotherapie (CR und RCT)

	HSP32	HSP47	HSP70	HSP90	HSP60
Mann-Whitney-U	177,000	313,000	324,000	324,000	300,000
Wilcoxon-W	387,000	748,000	577,000	577,000	553,000
Z	0,88	0,114	0,111	0,111	0,361
Asymptotische					
Signifikanz	0,930	0,909	0,912	0,912	0,718
(2-seitig)					

Tabelle 20: Gruppenvariablen Chemotherapie und Radio-Chemotherapie (CT und RCT)

Für HSP-47 und HSP-90 schien sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Expression in den Proben unter Chemotherapie (Gruppe 2) anzudeuten.

Zusammenfassend konnte an den vorliegenden Ergebnissen zur HSP-70 und HSP-90 Expression an BALF-Zellen lediglich tendenziell eine vermehrte HSP-47 und HSP-90 Expression unter Chemotherapie abgelesen werden. Im Mann-Whitney-Test konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der untersuchten HSP- Familien in den verschiedenen Patientengruppen ermittelt werden.

6. Diskussion

Das Bronchialkarzinom ist weltweit einer der häufigsten malignen Tumoren. Die 5-Jahre-Überlebensrate hat sich in den letzten Jahren nicht wesentlich erhöht. Dies liegt nicht selten an der Effektivität der Strahlen- und Chemotherapie, die oft aufgrund von Nebenwirkungen eingeschränkt ist. Unter dieser Therapie sind reaktive Sauerstoffspezies die entscheidenden Faktoren der pulmonalen Toxizität. Dabei werden Entzündungskaskaden, wie die Zytokinkaskade, die auch nach längerer Zeit nach Chemotherapie oder Strahlentherapie, nachweisbar sind. Neben den Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Bindegewebsproteinen werden dabei auch die sog. Hitzeschockproteine exprimiert (Beinert 2000). Sowohl nach pulmonaler Strahlentherapie als auch nach systemischer Chemotherapie ist auch eine erhöhte Expression von HSP in der Lunge beobachtet worden, die die Zellen von letalen Folgen der konsekutiven Stresseinwirkung schützen und die Faltung nativer und denaturierter Proteine unterstützen (Hettinga 1996). Karzinomzellen sind naturgemäß durch die schnelle Zellproliferation, Hypoxie und räumliche Einschränkung in einer potentiell gefährlichen Umgebung mit Angriffen der Immunabwehr gestresst. Ein wesentliches Charakteristikum von Tumorzellen ist jedoch ihre Resistenz gegenüber dem sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose). Deshalb macht die Fähigkeit der Hitzeschockproteine, Zellen vor Apoptose zu schützen, sie im Rahmen der Karzinomforschung erneut interessant (Nylandsted et al. 2000). Bisher ist es jedoch noch nicht ganz geklärt, welche dominierende Rolle die Hitzeschockproteine vor allem bei Tumorzellen spielen. Ziel dieser Arbeit war das Verhalten der Hitzeschockproteine in der Funktion des Zellschutzes im Rahmen der Stresseinwirkung aber auch in der Unterdrückung der Apoptose in den Tumorzellen unter der Chemo- und Strahlentherapie bei Bronchialkarzinom zu untersuchen. Das Verständnis über die Rolle der dabei in der Literatur beschriebenen exprimierten Hitzeschockproteine könnte zur Verbesserung der Diagnostik und Modulierung der Therapie bei

Bronchialkarzinomen beitragen. Die vorliegende Arbeit beinhaltet die systematische Analyse von bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom. Insgesamt wurden 95 Lavageproben untersucht, die vor, unter oder nach einer zytoreduktiven Therapie standen, wobei 30 Proben unter Chemotherapie und 22 Proben unter oder nach Radio- und/oder Chemotherapie gewonnen wurden. 43 Proben stammten von Patienten, die zum Teil lungenreseziert waren und sich in kompletter Remission befanden.

6.1 HSP-32 (Hämoxxygenase-1)

Bisher existieren kaum Untersuchungen über die Expression von HSP-32 in der Bronchiallavage. Eving et al. konnten histochemisch eine erhöhte HSP-32 Expression nachweisen, in dem sie bei den Mäusen durch Hyperoxie und Endotoxine einen Lungenschaden induzierten. In einer ähnlichen Arbeit konnten Bauer und Rensing 1997 durch Hyperoxie einer HO-1-Genexpression induzieren. Sie postulierten, dass HSP-32 eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase spielt. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass das Enzym ebenfalls eine Rolle bei Entstehung und Verlauf von malignen Tumorerkrankungen spielt. Der Einfluss scheint dabei tumorspezifisch zu sein; Abhängig vom Erkrankungstyp können tumorprotektive aber auch -supportive Eigenschaften vorliegen (Doi 1999, Fang 2004). In der vorliegenden Arbeit konnten 70 BAL-Proben auf HSP-32 untersucht werden. Dabei zeigten sich entsprechend der Literatur leicht erhöhte Expression bei allen Patienten. Insbesondere unter der Chemotherapie zeigten sich tendentiell höhere Werte als in beiden anderen Gruppen. Dies liegt daran, dass initial die meisten Patienten mit einer Chemotherapie behandelt wurden und möglicherweise die oxidative Belastung dann am höchsten ist. Unter weiteren Therapiezyklen kommt es zur Toleranzentwicklung und Abnahme des Häm-Katabolismus. Hier besteht auch die Möglichkeit mehrerer hintereinander geschalteter Regulationsmechanismen, abhängig vom Zelltyp und Agens die HO-1-Induktion unterschiedlich zu beeinflussen (Terry et al 1998). In einer experimentellen Arbeit konnte Zhang 2011 bei NSCLC Zelllinien (A549) durch in-vitro Radiation eine Überexpression von HO-1 feststellen und durch deren Hemmung mittels Zink-Protoporphyrin IX (Znpp) die Radiosensitivität erhöht werden kann. Entgegen dieser Behauptung hatte die Strahlentherapie in unserer Arbeit keinen höheren Einfluss auf die Expression. Im Laufe der Zeit scheint sich hier auch eine Thermotoleranz zu entwickeln, die an die Synthese von mRNA und an ein umschriebens Konditionierungsfenster gebunden ist. Außerdem spielt hier eine zeitliche und

quantitative Korrelation zwischen Zellstress und HSP-Expression (Maytin et al, 1995) eine Rolle. Unsere Patienten fanden sich in unterschiedlichen Behandlungsphasen und die meisten hatten bereits eine vor einigen Wochen oder Monate durchgeführte Chemotherapie hinter sich, wo die HSP-Expression nachgelassen hatte. Der zusätzliche Zellstress unter Strahlenbehandlung kann aufgrund der Toleranzentwicklung gegenüber Hitzestress aber auch gegenüber andere Reize (Kampinga et al, 1993) zu keiner weiteren Expression von HSP 32 führen. In der Remissionphase scheint eine stady-state bzw. ein Gleichgewicht zwischen den tumorprotektiven und supportiven Eigenschaften dieser HSP, entsprechend der Arbeit von Dou und Fang 2004, erreicht zu sein. In einer ähnlichen Arbeit mit NSCLC und hohen HSP-Konzentrationen wurde eine schlechtere Prognose und höhere Metastasierungsrate postuliert und diese mit der vermehrten Expression von EGFR, CD 147 und MMP-9 (Matrix-Metallo-Proteinase) positiv korrelierte und bei Down-Regulation von HSP 32 diese wieder abnahmen (Tsai 2012). Wenn man diese Up- und Down-Regulation der HSP-32-Expression vor Augen hält, dann ist es auch in unserem Patientenkollektiv davon auszugehen, dass es zum einen durch die Gruppeneinteilung (z.B. metastasierte Patienten fanden sich in allen Gruppen) und im weiteren Krankheitsverlauf (Toleranzentwicklung) zum Verlust dieser Korrelation kommt und die HSP-Konzentrationen angleichen. Die fehlende Signifikanz zwischen allen drei Patientengruppen unterstreicht auch in unserer Arbeit die Postulierung, dass bei der HSP-32 Expression nicht um eine akute Stressreaktion, sondern eher um eine länger anhaltende Stressantwort handelt (Takahashi et al. 1997). Dabei scheint die Art der Stressnoxen und die Zeit der Exposition der Zellen eine Rolle zu spielen. Takahashi et al. konnten nachweisen, dass nach acht stündiger Ozonexposition die HSP-32 Expression am höchsten war und dass sich die Werte nach 24 Stunden normalisierten. Im Gegensatz zu den oben genannten Beobachtungen stellten Cosma und Mitarbeiter bei Ratten, die 6h Ozon ausgesetzt waren, keine Veränderung der HSP 32 mRNA Expression im nicht-lavagierten Gesamtlungengewebe fest (Cosma et al. 1992). Diese ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass hier niedrigere Ozonkonzentrationen und kürzere Expositionsdauer angewendet wurden. Fang et al. konnten bei HO-1-defizienten Mäusen eine signifikante Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber Gewebeverletzung nachweisen. Nach Induktion von HO-1 Expression war das Gewebswachstum langsamer. Die zytoprotektive Wirkung der HO-1 scheint hauptsächlich eine Funktion der antiapoptotischen Wirkung des Enzyms zu sein. In dieser Studie wird angenommen, dass die antiapoptotischen Wirkung der HO-1 durch mehrere Mechanismen: (a) verringerte intrazelluläre prooxidative Ebenen, (b)

erhöhte Bilirubin, und (c) erhöhte CO-Produktion zu erklären ist. CO kann eine anti-apoptotische Wirkung durch Hemmung sowohl der Expression von p53 als auch der Freisetzung von mitochondrialen Cytochrom C erzielen (Fang et al. 2004). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass das Enzym ebenfalls eine Rolle bei Entstehung und Verlauf von malignen Tumorerkrankungen spielt. Doi und Mitarbeiter fanden in einer Studie, wo sie experimentell solide Tumoren durch Nitric-Oxid und Ischämie stressten, dass HO-1 Expression nur in den Tumorzellen erhöht, aber nicht in den Makrophagen (Doi et al 1999). Es ist auch hier zu vermuten, dass die fehlende HSP-32 Expression in den Makrophagen möglicherweise nicht die korrekte Konzentration in der Bronchiallavage widerspiegelt. In einer anderen Arbeit untersuchten Boschetto et al 2008 die Expression von Hämoxigenase immunhistochemisch in Tumormakrophagen, tumorfreenzellen und Tumorzellen bei NCSLC-Patienten. Im Gegensatz zu o.g. Arbeit fanden sie, dass die Expression in Tumorzellen niedriger war als in den tumorfreen Zellen und dass es kein Zusammenhang zwischen der klinisch-pathologischen Merkmalen und des Gesamtüberlebens gab. Möglicherweise beeinträchtigen hier die Makrophagen die HO-induzierten oxidativen Abwehrmechanismen. Ähnlich mit diesen Ergebnissen fanden Amir Bar-Shai et al 2012 niedrige HO-Spiegel und eine negative Korrelation zwischen Tumorstadium und HO-Aktivität. Sie gehen hier von einer defekten Zytoprotektion aus. Also es spielen dabei mehrere Faktoren eine Rolle. Verschiedene Antioxidantien und chemische und physikalische Agenten modulieren die HO-1-Expression. Mehrere Signalmoleküle (zB Mitogen-aktivierte Proteinkinasen), Transkriptionsregulatoren (Aktivatorprotein-1, NF-E2-verwandten Faktor-2, Hypoxia-inducible factor-1, Bach-1), sowie HO-1 5'-Region, beteiligen sich an der Regulation der HO-1-Gens (Ryter und Choi, 2005). Mittels durchflusszytometrischer Messungen der Bronchiallavage scheint HSP-32 nicht zur Untersuchung der Therapieeffektivität und Krankheitsverlaufes geeignet zu sein. Mittels PCR und histochemischer Methoden bleibt es trotzdem als ein wichtiger vielversprechender Marker und vor allem ein Anti-Apoptose-Marker in der Entwicklung neuer Krebstherapie, aus deren Inhibierung, sich eine potente antikarzinogen Strategie entwickeln könnte.

6.2 HSP 47

HSP 47 spielt als Chaperon eine wichtige Rolle in den intrazellulären Prozessen der prokollagen Moleküle in verschiedenen Organen und ist sehr gut als Kollagen-bindendes Stressprotein in verschiedenen Geweben untersucht worden, insbesondere bei inflammatorischen Lungenerkrankungen, die mit fibrotischen Veränderungen einhergehen. Das konnten Razzaque et al 1998 immunhistochemisch im Lungengewebe von autopsierten Patienten mit Lungenfibrose bestätigen. In einer anderen Studie untersuchte Kakugawa 2014 die HSP 47-Konzentrationen im Serum von Patienten mit akuter interstieller Pneumonie, organisierter Pneumonie und idiopathischer Lungenfibrose. Er fand im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikante Erhöhung von HSP 47-Konzentrationen nur im Serum von Patienten mit akuter interstieller Pneumonie. Ähnliche Ergebnisse erzielte auch in einer ähnlichen Arbeit 2013 bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose. Er fand eine signifikant höhere Expression im Serum von Patienten mit akut exazerbierten als in der Gruppe der Patienten mit stabiler Lungenfibrose (Kagugawa 2013). Dies unterstreicht die Hypothese, dass unter verschiedenen Bedingungen in der akuten und in der chronischen Phase der Erkrankung verschiedene Fibrosemechanismen stattfinden. Über die Expression der HSP 47 in verschiedenen Lungentumoren ist wenig bekannt. Michils et al untersuchten 2001 47 Resektate von Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen immunhistochemisch und konnten nur eine erhöhte Expression von HSP 60 und 70 aber keine signifikante Erhöhung der Expression von kleingewichtigen HSP finden. In einer japanischen Arbeit von Oka et al von 2001 wurde Gewebe von Lungentumoren auch immunhistochemisch und mittels ELISA untersucht. Dort konnte im Gegensatz zu der o.g. Arbeit eine vermehrte Expression von HSP 40 im Vergleich zu normalem Lungengewebe gefunden werden. Gleichzeitig wurde im Serum dieser Patienten auch eine hohe Konzentration von Autoantikörpern gegen diese HSP gefunden. Über die Expression von HSP-47 in der Bronchiallavage ist noch weniger bekannt. Wir fanden eine Studie über ARDS-Patienten, bei denen eine erhöhte HSP-47 Expression sowohl in der BAL als auch im Plasma im Vergleich zu Patienten ohne ARDS gefunden wurde. Ein Unterschied in der 90 Tages-Mortalität im Gegensatz zu anderen Hitzeschockproteinen (HSP 60, HSP 90) fand sich dort nicht (Lee et al. 2012). In unserer Arbeit konnten 93 Lavageproben auf HSP-47 untersucht werden. Entsprechend der beschriebenen Literatur konnte zwar auch in der Lavage eine Expression dieses Proteins gefunden werden, eine Signifikanz zwischen den Proben der Patienten in kompletter Remission

und Patienten unter der Therapie fand sich nicht. Das ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass das HSP-47 ein Akut-Phase-Protein ist und im Krankheitsverlauf der Kollagenisierungsprozess bereits stattgefunden hat. Es gibt kaum Untersuchungen über die Expression von HSP 47 direkt in der Bronchiallavage. Die meisten Untersuchungen erfolgten immunhistochemisch in vitro, RT-PCR oder an Tierversuchen (Razzaque 1998, Morino 1997, Shii 2003, Hisatomi 2012). Kagugawa et al untersuchten das HSP47 im Patientenserum (2013), während andere Autoren es direkt im resezierten Tumorgewebe quantitativ histochemisch untersuchten (Michils 2001). Selbst zur Anregung der HSP-47-Expression nutzte Hisatomi TGF-B1 als Stimulation, damit er später diese Aktivität mittels Pirfenidone inhibieren zu können und damit das Fibrosierungsprozess zu blockieren. Sie stellten fest, dass HSP 47 insbesondere in Fibroblasten und Pneumozyten Typ II vermehrt gebildet wird. Wie viele dieser Zellen bei malignen Erkrankungen den Ventilationsraum erreichen und damit ausreichend Material für die Bronchoalveolarlavage gewonnen werden kann, bleibt offen. Hier ist definitiv die BAL den immunhisto-chemischen Methoden und der RT-PCR, was die Sensitivität betrifft, deutlich unterlegen. Es ist hier nicht nur die Strecke, die die Fibroblasten und Pneumozyten vom Interstitium bis zum Alveolarraum hinterlegen müssen, sondern auch der zeitliche Zusammenhang. Die Inkubation der Fibroblasten mit TGF-B1 (transforming growth factor) erfolgte über 72 Stunden. Die höchste Expression von HSP 47 fand zwischen 48-72 Stunden statt. Danach konnte keine weitere Stimulation festgestellt werden. Die intrazelluläre Proteinmodulation und die Prokollagensynthese ist damit aktiviert und die mesenchimale Transition des Alveolarepithels hat bereits begonnen (Kimm 2006). Die Bestimmung des HSP 47 in der Bronchiallavage von Tumorpatienten eignet sich unseren Ergebnissen nach, möglicherweise nur in der akuten Phase des initiierten Kollagenisierungsprozesses. Aber im Rahmen der fortgeschrittenen malignen Erkrankung mit schon morphologisch imponierender Fibrosierung, scheint HSP 47 keine wichtige Rolle mehr zu spielen. Mittels anderer sensitiverer Methoden bleibt HSP 47 trotzdem als ein sehr wichtiger prognostischer und Fibrosemarker, dessen Inhibierung zur Verzögerung und Rückbildung des fibrotischen Prozesses durch neue antifibrotische Substanzen führen kann.

6.3 HSP 60

Eine erhöhte Expression dieser Proteinfamilie wurde bei normalen bronchial Epithelien und Alveolarmakrophagen aber auch in verschiedenen histologischen Typen des Bronchialkarzinoms beobachtet (Ferm, Soderstrom, 1992). Auch Michils et al fanden, dass HSP 60 und großgewichtigen Hitzeschockproteine beim NSCLCI vermehrt gebildet, während die kleingewichtigen HSP, wie HSP 27, nicht überexprimierten. In einer ähnlichen Arbeit mit Proben eines Adenokarzinoms korrelierte die HSP-Expression als unabhängiger prognostischer Faktor mit dem krankheitsfreien Überleben (Xu 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte eine HSP-60 Expression in allen Patientengruppen nachgewiesen werden. Unter stärkerem Stresseinfluss, wie unter Strahlen- und Chemotherapie zeigte sich tendentiell eine niedrigere Konzentrationen in der Bronchiallavage von Patienten unter Radio- und Chemotherapie. Das entspricht auch den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Capello. Sie verglichen Bronchialbiopsien zwischen rauchenden COPD- und Bronchialkarzinom-Patienten und stellten fest, dass bei Karzinom-Patienten niedrigere Konzentrationen von HSP 60 als bei COPD –Patienten ohne Tumor zu finden sind. Während in der meisten Literatur die Überexpression mit einem besseren Patienten outcome verbunden wurde, erklären sie hier, dass der Verlust von HSP 60 möglicherweise mit der reduzierten anti-tumoralen Immunantwort gegen neoplastische Zellen zu erklären ist. Außerdem könnte es sowohl eine pro- als auch eine antiapoptische Funktion haben, die der genetischen Kontrolle untersteht (Capello et al 2006). Wu et al. beschäftigten sich auch mit der HSP-60-Expression nach Ozonexposition und stellten fest, dass abhängig von der Dosis und der Expositionszeit zu einer signifikanten Verminderung der HSP-60 Expression in der Lunge kam. Eine mögliche Ursache des verminderten HSP 60 Nachweises könnte in einer verminderten Detektion durch Komplexbildung oder durch einen Verbrauch des HSP 60 in einer Stressreaktion liegen. Wood und Mitarbeiter untersuchten die HSP-60 bei Patienten nach bronchiolitis obliterans nach Lungentransplantation. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass in der Literatur kaum Messungen dieses Proteins in der BALF von Bronchialkarzinom-Patienten vorliegen. In den von uns untersuchten Patientengruppen ließ sich kein gerichteter Zusammenhang zwischen HSP-60- Konzentrationen unter Radio und zytoreduktiver Therapie nachweisen. Möglicherweise ist das auch in unserer Arbeit dadurch zu erklären, dass es initial zu einer Überexpression kommt und im Verlauf zur zellulären Modulierung und Anpassung der

HSP-Spiegel kommt. Die Tumorhistologie, das Tumorstadium sowie der Zeitpunkt der durchgeführten Therapie sollten differenzierter betrachtet werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in der Arbeit von Michils. Sie untersuchten Zelllysate von reseziertem Lungenkarzinom mittels ELISA und Streptavidin-Biotin-Technologie und konnten keine Korrelation zwischen erhöhter HSP 60-Expression und Prognose der Erkrankung finden (Michils 2001). Die o.g. Hypothesen bedürfen der Bestätigung weiterer Studien. Trotzdem bleibt HSP 60 ein wichtiger Biomarker für die Diagnose, Prognose und Management des Bronchialkarzinoms. Ein besseres Verständnis von HSP 60 auf molekularer Ebene während der bronchialen Karzinogenese würde zukünftig auch unsere therapeutischen Möglichkeiten erweitern.

6.4 HSP 70

Aufgrund der leichten Induzierbarkeit ist HSP 70 eine häufig untersuchte HSP-Familie. Durch die Regulierung der Proteinfaltung und Hemmung der Proteindenaturierung schützt sie als Chaperon die Zellen von oxidativen Stress und anderweitigen Noxenexpositionen. Durch die Apoptoseunterdrückung spielt sie aber auch eine große Rolle für das Überleben von Tumorzellen und Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung. Durch die Migration der Zellen in den extrazellulären Raum und dadurch leichteren Gewinnung der Zellen mittels Bronchiallavage, ist die Bestimmung der HSP-Expression dort eine sehr praktische und hilfsreiche diagnostische Möglichkeit. Durch das Verhalten der Hitzeschockproteine könnten möglicherweise Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf und auf die Prognose gezogen werden. Die meisten Untersuchungen über HSP 70 sind histochemisch erfolgt. Es liegen kaum Arbeiten vor, die die Expression von HSP 70 in der Bronchiallavage von Tumorpatienten untersuchten. In unserer Arbeit konnten wir eine Expression von HSP 70 in der Bronchiallavagen aller drei Gruppen nachweisen. Tendentiell war hier eine niedrigere Expression in der Radio-Chemotherapie Gruppe zu verzeichnen, eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht abgelesen werden. Die Erklärung ist möglicherweise darin zu suchen, dass neben dem Zeitpunkt der Zellexposition auch die Expositionsdauer eine Rolle spielen. Nach Hamilton handelt es sich bei der HSP-Expression hier um eine schnell verfügbare und kurzfristige Stressantwort. Eine kurzzeitige Ozonexpositionen löste eine HSP 70 Erhöhung sowohl in lavagiertem Gesamtlungengewebe und der BALF der Meerschweinchens als auch in humanen Alveolarmakrophagen (Hamilton et al 1998) aus. Dort handelte es sich um eine Expositionszeit von bis zu zwölf Stunden. Wu et al. beobachteten bei der in vivo Exposition von Affen (0,98ppm

Ozon für 1d) einen Abfall dieses Stressproteins. Mittels Immun-histochemischer Färbung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern wiesen sie nach 24stündiger Exposition eine deutliche Verminderung des HSP 70 nach (Wu et al. 1999). Die Erklärungen hier können in einem vermehrten Proteinverbrauch während des akuten zellulären Stresses und durch die Bindung der geschädigten und entfalteten Proteine (Wong 1998) sowie den Verlust der exprimierenden Makrophagen mit dem Sekret und im Rahmen der rezidivierenden Lavagierung der Bronchien liegen (Wu 1999). Die Arbeitsgruppe um Lee untersuchte neben Cytokinen und Antioxidanten die HSP-Expression in Plasma und BAL von ARDS- und Nicht-ARDS-Patienten. Sie stellten fest, dass es zwischen BALF und Plasma, unterschiedliche Expressionen gibt. Sie fanden signifikante Unterschiede in der Expression dieser akuten inflammatorischen Materialien nur im Plasma aber nicht in der BALF (Lee et al 2012). Der Verlust der Zellen durch das Sekret und im Rahmen der Lavagierungen beeinflusst möglicherweise auch unsere Ergebnisse. Ebenso ruft auch die Y-Strahlung der Tumorzellen gegenteilige Effekte bezüglich der Expression beider HSP-70-Formen hervor (Gehrmann 2005). In unserer Arbeit war untersuchungstechnisch nicht möglich zwischen der membrangebundenen und intrazellulären HSP-Form zu unterscheiden. Da es eine Permeabilisation der Zellmembran mittels Saponinlösung stattfand, handelt es sich in unseren Proben überwiegend um intrazelluläres HSP. Es muss auch erwähnt werden, dass die Expression auch vom Tumortyp und Tumorstadium abhängig sein kann. Durch Differenzierung von Subpopulationen mit strenger Kategorisierung des Tumorstadiums, Tumortyps und der Chemotherapie wäre möglicherweise ein Unterschied festzustellen. Es ist auch zu berücksichtigen, dass durch die unterschiedlichen Angriffspunkte der Zytostatika auch unterschiedliche Reaktionen hervorgerufen werden. Durch z.B. Vincristin oder Paclitaxel wird nicht nur die Menge an zytoplasmatischen, sondern auch die an Membran-gebundenem Hsp70 erhöht. Im Gegensatz dazu beeinflussen DNA-interagierende Zytostatika (Ifosfamid, Cytarabin) weder die Menge an zytoplasmatischem noch Membran-gebundenem Hsp70 (Gehrmann 2005). Eine Überexpression von HSP 70 konnte bei der Behandlung von humanen Leukämiezelllinien nur durch Vincristin und Paclitaxel nachgewiesen werden, während die anderen Chemotherapeutika wie Carboplatin, Citarabin, Doxorubicin und Ifosfamid die HSP 70-Expression nicht beeinflussten (Botzler 1997, Multhoff 2002). In einer japanischen Studie war die HSP-70 Expression bei vielen aber nicht bei allen NSCLC-Patienten erhöht. Unter platinbasierter adjuvanter Chemotherapie hatten resezierte HSP-70-positive Patienten sogar ein besseres Outcome als die Patienten, die nicht exprimierten (Tai Sun, 2014). Die HSP-70

Expression ist auch in unserer Arbeit entsprechen der meisten Literatur erhöht, aber ein gerichteter Zusammenhang zwischen HSP-70- Konzentrationen unter Radio und zytoreduktiver Therapie ließ sich aufgrund der o.g. Aussagen nicht nachweisen. HSP 70 bleibt weiterhin ein wichtiger Biomarker, der eine wichtige Rolle vor allem in der Zellproliferation des NSCLC spielt und deren Inhibierung zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen wird (Wenn et al 2014).

6.5 HSP 90

Eine besondere Rolle wird diesem Protein bei der Tumorproliferation, Apoptoseunterdrückung und Metastasierung insbesondere bei NSCLC zugeschrieben. Die Blockade dieses Proteins durch HSP-90-Inhibitoren als Monotherapie oder in Kombination mit Ganatespib führte zu einer deutlichen Tumorregression (Pillai 2014). Hashida et al konnten bei den NSCLC-Tumoren mit erworbener Resistenz gegen EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren nachweisen, dass die Sensitivität der Strahlentherapie in Kombination mit dem neuen HSP-90-Inhibitor (NVP-AUY 922) erhöht werden kann (Hashida et al 2015). In unserem Patientenkollektiv konnte eine erhöhte HSP-90-Expression in der BALF aller Tumorpatienten gefunden werden. Tendentiell war auch hier eine höhere Expression in der Chemotherapiegruppe festzustellen, wie in einer Arbeit von Beinert et al 2000 vorbeschrieben. Entsprechend der kleinen Fallzahlen ließen sich im Gegensatz zu der Arbeit von Shi und Liu keine signifikanten Zusammenhänge feststellen. Sie konnten höhere Plasmawerte von HSP 90 bei Patienten mit Bronchialkarzinom unter der Chemotherapie als bei Patienten in partieller Remission feststellen. Dies entspricht auch der gegenwärtigen Literatur, in der erhöhte Expressionen dieses Proteins mit schlechterer Prognose verbunden sind. Darauf zielen auch die neuen Therapieansätze, die Expression dieses Proteins zu hemmen (Shi 20014, Liu 2014, Rong 2012, Biaoxu 2012, Pillai 2014 und Hashida 2015). Einige wichtige Punkte sind hier zu berücksichtigen: Zum einen handelt es sich um einen unterschiedlichen Untersuchungsmedium und es wird vermutet, dass in BALF im Gegensatz zu Plasma zu vermehrtem Verlust von HSP-90 exprimierenden Makrophagen durch Sekret und Bronchiallavagen kommt (Wu 1999). Lee et al fanden eine erhöhte HSP 90-Expression nur im Plasma der ARDS-Patienten, aber nicht in der BALF. Bei einer relativ kleinen Fallzahl und gerade in der Radio- und Chemotherapiegruppe mit 22 Proben ist möglicherweise nur ein Trend aber keine Signifikanz zu sehen. Außerdem muss noch berücksichtigt werden, dass die

Kontrollgruppe aus einem Patientenkollektiv bestand, bei denen die Operation und die Strahlentherapie Monate bis Jahre zurücklag und die Patienten entweder nur zur Routinekontrolle oder wie damals noch üblich war zur Planung einer postoperativen Radiatio erschienen. Es muss hier, obwohl es klinisch und lungenfunktionanalytisch keine Verschlechterung vorlag, von weiterer Krankheitsprogression auf zellulärer Ebene ausgegangen werden, so dass eine strenge Differenzierung zwischen Patientengruppen schwierig bleibt. Durch nicht bekannte Pathomechanismen kommt es auch zu einer möglichen Beeinflussung selbst der Expression, die zu unterschiedlich messbaren Ergebnissen führen. Auch die Resistenzentwicklung gegenüber der zytostatischen Therapie hängt zum Teil selbst von der Substanz ab, wie sie die HSP-Expression beeinflusst (Ciocca 2005). Unter der multimodalen und Polychemotherapie kommt es durch die Zusammenwirkungen auf zellulärer Ebene möglicherweise auf einer Seite zur Aktivierung, auf der anderen Seite zur Hemmung der HSP-Expression. Es ist nicht klar, ob andere sekundäre Erkrankungen, wie Hypertonus, koronare Herzerkrankung, Leber- und fibrosierende Erkrankungen und Wundheilungsstörungen eine Rolle spielen. Ein weiterer zu erörternder Punkt ist es, dass gezielt nach dem Zeitpunkt der Tumorausbreitung und nach histologischem Tumortyp differenziert werden sollte, um die spezifische Rolle der Hitzeschockproteine nachzuweisen. Diese wird zusätzlich auch durch die Expression auch zum Teil bei Gesunden und im normalem Lungengewebe erschwert. Andererseits besteht eine hohe Sensibilität und eine niedrige Spezifität der Expression dieser zum Teil ubiquitär vorkommenden Proteine. Eine erhöhte Expression wurde oft mit septischen und inflammatorischen Konstellationen in Verbindung gebracht, wobei die HSP die Immunantwort stärken und die verschiedenen Zellen in Schutz nehmen. Bei Tumorerkrankungen sind die Literaturangaben über die HSP unterschiedlich und zum Teil widersprüchlich. Heute wissen wir, dass die erhöhte Expression von HSP-90 mit schlechterem Patienten outcome korreliert (Solit 2006, Rong 2012) und präklinische Studien laufen, die die Wirksamkeit der HSP-90 Inhibitoren untersuchen (Pillai 2014, Hashida 2015). Insgesamt weisen die vorliegenden Ergebnisse auch in der BALF von Patienten mit Bronchialkarzinom auf eine Expression der Hitzeschockproteine hin. Diese Arbeit zeigt das BALF unter differenzierten Bedingungen, obwohl weniger sensitiv, genauso wie Serum und andere Materialien zur Untersuchung von Hitzeschockproteinen genutzt werden kann.

7 Zusammenfassung

Hitzeschockproteine sind kleine konservierte Proteine, die unter zellulärem Stress vermehrt exprimiert werden. Sowohl nach pulmonaler Strahlentherapie, als auch nach systemischer Chemotherapie, ist eine erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen auch in der Lunge beobachtet worden. Ihnen werden unterschiedliche Funktionen zugesprochen, sowohl der Protektion und Immunstimulation als auch der anti-apoptischen Wirkung in den entarteten Zellen. Durch durchflusszytometrische Messungen der BAL-Zellen sollten die Fragen geklärt werden, ob durch das HSP-Expressionsverhalten in der Bronchiallavage von Tumorpatienten Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf durch Schutz der gesunden Zellen von oxidativen Lungenschäden und durch Unterdrückung der Apoptose in den maligne Zellen gezogen werden können? Im Rahmen dieser Arbeit wurden systematisch 95 bronchoalveolär Lavagen bei Patienten mit Bronchialkarzinom analysiert und dabei die Expression der Hitzeschockproteine durchflusszytometrisch gemessen. Es wurden insgesamt fünf Proteinfamilien untersucht: HSP 32, HSP 47, HSP 60, HSP 70 und HSP 90. Die Patienten wurden entsprechend der zellulären Belastung in 3 Gruppen unterteilt. Der ersten Gruppe, die als Kontrollgruppe fungieren sollte, wurden Patienten, die erfolgreich therapiert waren und sich in kompletter Remission befanden zugeordnet. Die zweite Gruppe fasste die Patienten zusammen, die sich in aktiver Therapie befanden und zwar in verschiedenen Zyklen der Chemotherapie. Der dritten Gruppe wurden Patienten zugeordnet, die kombiniert mit Chemo- und Strahlentherapie behandelt wurden. Zu Beginn dieser Arbeit waren wenig über Untersuchungen der HSP in der Bronchiallavage bekannt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Bronchiallavage zur Untersuchung von HSP geeignet ist. In der Bronchiallavage von Tumorpatienten konnten HSP-Expression von HSP-32, HSP-47, HSP-60, HSP-70 und HSP-90 gefunden werden. Zwar ist die Zytokinkaskade mit Beteiligung der HSP noch Monate nach erfolgter Therapie aktiviert, ihre größere Rolle scheinen sie

eher am Anfang dieser Kaskade zu spielen. In unserem Patientenkollektiv konnten lediglich qualitative aber keine quantitativen Unterschiede in der HSP-Expression beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit zeigt das BAL ein gutes Untersuchungsmedium ist und sollte als Basis zur weiteren Untersuchungen über HSP unter differenzierteren Bedingungen, z.B. Zeitpunkt der BAL-Entnahmen, einheitliche Tumorhistologie und zytoreduktive Therapie, Strahlungs-dosis, etc. angesehen. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass durchflusszytometrisch kein gerichteter Zusammenhang zwischen der HSP-Expression in unserem Patientenkollektiv nachweisen lässt. Für qualitative und quantitative Analysen sind Untersuchungen durch amplifizierbare mRNA-Isolierung in der BAL möglicherweise sensitiver. Es ist definitiv sinnvoll, bei einem größeren Patientenkollektiv und durch zwei vergleichende Methoden wie PCR und Durchflusszytometrie, weitere Untersuchungen durchzuführen. Ein besonderer Augenmerk sollte auf die Expression von HSP 90, HSP-70 und HSP-32 geworfen werden, deren Blockade möglicherweise die Prognose des Bronchialkarzinoms verbessern wird.

8 Literatur

1. Aleksandrov-Via; Kisliuk-IM: The cellular reaction to heat shock: The physiological aspect. *Psitologia*.1994;36(1):5-59
2. Alt-Epping, B, Alt-Epping, S., Quintel, M., Nauck, F: Entwicklungen der moderenen Onkologie, Auswirkungen auf Anästhesie und Intensivmedizin. *Anaesthesist* 2009;58:821-826
3. Amarasena IU, Walters JAE, Wood-Baker R et al.: Platinum versus non-platinum chemotherapy regimens for small cell lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2008
4. Antonio M. Vignola, Pascal Chanez, Barbara S. Polla, Patrice Vic, Philippe Godard, and Jean Bousquet: Increased Expression of Heat Shock Protein 70 on Airway Cells in Asthma and Chronic Bronchitis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. 13. Pp. 683-691, 1995.
5. Antunes-Neto,-J-M, Toyama,-M-H.: Circulating leukocyte heat shock protein 70 and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. *Stress*. 2006 Jun; (2): 107-15
6. Arrigo AP, Firdaus WJ, Mellier G et al. 2005. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by HSP27 expression. *Methods* 35: 126-38
7. Asea A. 2003. Chaperonike-induced signal transduction pathways. *Exerc Immunol Rev* 9: 25-33

-
8. O'Rourke N, Roqué i Figuls M, Farré Bernadó N et al.: Concomitant chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010, Issue 6.
 9. Azzoli CG, Temin S, Aliff T et al.: 2011 Focused update of 2009 American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 29:3825-3831, 2011
 10. Bala S. Upadrashta, Patricia A. Adams, William C. Kopp, Hal B. Richerson.: Bronchoalveolar Lavage T-Cell and Ia Antigen Quantitation by Flow Cytometry in Acute and Chronic Experimental Hypersensitivity Pneumonitis. *Experimental lung Research* 15:359-373 (1989).
 11. Bao Endong, Karim R. Sultan, Bernhard Nowak, Jörg Hartung: Expression of heat shock proteins in tissues from young pigs exposed to transport stress: *Dtsch Tierärztl Wochenschrift* 2009,116: 321-325
 12. Bauer M, H. Rensing, C. Bauer, R. Larsen: Organ-spezifisches Expressionsmuster eines Kohlenmonoxid-generierenden Streßproteins (Hämoxxygenase-1/Hitzeschockprotein 32) nach hämorrhagischem shock. Organ-specific expression pattern of a carbon monoxide-generating stress protein (haeme oxygenase-1) after heamorrhagic shock and resuscitation. *Abstract Volume 46 Issue 4 (1997) pp 339-342.*
 13. Becerril-C, Pardo-A, Montano-M, Ramos-C, Ramirez-R, Selman-M: Acidic fibroblast growth factor induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am-J-Respir-Cell-Mol-Biol.* 1999 May; 20 (5) : 1020-7
 14. Beinert T, D. Binder, M. Stuschke, R. A. Jörres, C. Oehm, M. Fleischhacker, O. Sezer, H.-G. Mergenthaler, T. Werner, K. Possinger.: Oxidant- Induced Lung Injury In Anticancer Therapy. *Eur J Med Res* (1999) 4: 43-53.
 15. Beinert, T : Untersuchungen zur oxidativen Lungenbelastung unter Radio-Chemotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom. *Habilitationsschrift* 2000
 16. Bellyei, S. et al. (2002): Inhibition of cell death by a novel 16.2 kD heat shock protein predominantly via Hsp90 mediated lipid rafts stabilization and Akt activation pathway. In: *Apoptosis.* 2007 (12), 97-112.

-
17. Bhardwaj, Steven, Ali Adnan, Ovseneck, Nick .: Multiple Components of the HSP 90 Chaperone Complex Function in regulation of Heat Shock Factor 1 in Vivo. *Molecular and cellular Biology*, dec 1999, p. 8033-8041
 18. Binder, R.J., Vatner, R., Srivastava, P.: The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 64 (2004) 442-451
 19. Bonay-M, Soler-P, Riquet-M, Battesti-JP, Hance-AJ, Tazi-A: Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers. *Am-J-Respir-Cell-Mol-Biol*. 1994 Apr, 10 (4) : 453.61
 20. Brian J. Pak, Dennis A. Wigle, John D. Watson, George A. Cates, Anne M. Brickenden, Eric H. Ball, Stephen C. Pang.: Developmental expression of the collagen binding heat – shock protein GP46 Collagen types I and IV in rat tissues.
 21. Burdett S, Stewart L, Rydzewska L: Chemotherapy and surgery versus surgery alone in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2007, Issue 3.
 22. Cappello, F., Czarnecka AM., La Rocca, G., Di Stefano, A., Zummo, G., Macario, AJ: Hsp 60 and HSp 10 as antitumor molecular agents. *Cancer Biol Ther*. 2007 Apr, 6 (4): 487-9
 23. Cappello F, Marino Gammazza A, Palumbo, Piccionello A, Campanella C, Pace A, Conway de Macario E, Macario AJ Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2014,18(2):185-208.
 24. Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B., Ciocca, D.R.: Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci*. 31 (2006)164-172
 25. Chang,-Y-S; Lee,-L-C; sun,-F-C; Chao,-C-C. Involvement of calcium in the differential induction of heat shock protein 70 by heat shock protein 90 inhibitors, geldanamycin and radicicol, in human non-small cell lung cancer H460 cells. *J-Cell-Biochem*.2006 Jan.1; 97(1): 156-65
 26. Chmiel-Urban, R., Puchalski, a., Wernicki, A., Dec, M., Pauluch, E.: Characterisation of Hsp 70 proteins in bovine leukocytes induced by the temperature 41 degrees C. *Pol J Vet Sci*.2009; 12 (3): 323-8

-
27. Choi AM and Alam J (1996). Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(1): 9-19
 28. Ciocca, D.R., Calderwood, S.K.: Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10 (2005) 86-103
 29. Claus Botzler, Rolf Issels, Gabriele Multhoff.: Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. *Cancer immunol immunother* (1996) 43: 226-230.
 30. Concannon CG, Gorman AM, Samali A. 2003. On the role of HSP27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8: 61-70
 31. Dagese MS, Mendizabal JE, Gandini NA: Expression of heme oxygenase-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinical data. *Lung Cancer*. 2012 Jul;77(1):168-75. doi: 10.1016/j.lungcan.2012.02.016. Epub 2012 Mar 13
 32. Dienemann H: Chirurgische Therapie des Bronchialkarzinoms. *Kliniker* 2005; 34 (7) 206-210
 33. Douillard JY, Tribodet H, Aubert D et al.: Cisplatin and vinorelbine for completely resected non-small cell lung cancer. Subgroup analysis of the lung adjuvant cisplatin evaluation. *J Thorac Oncol* 5:220-228, 2010.
 34. Drings P, Dienemann H, Wannemacher M.. Management des Lungenkarzinoms. Berli, New York, Tokio: Springer, 2003, 45-55 und *Kliniker* 2005; 34 (7): 217-223.
 35. Eberl-T, Amberger-A, Herold-M, Hengster-P, Steurer-W, Hochleitner-BW, Gnaiger-E, Margreiter-R: Expression of stress proteins, adhesion molecules, and interleukin-8 in endothelial cells after preservation and reoxygenation. *Cryobiology*. 1999 Mar, 38 (2) : 106-18
 36. Eberhardt W, S. Bildat, H. Song : Neue Substanzen zur Therapie des Bronchialkarzinoms. *Onkologie* 2000. 6:420-432 Springer - Verlag 2000.

-
37. H Endo, M Yano, Y Okumura and H Kido; Ibuprofen enhances the anticancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. *Cell Death and Disease* (2014) 5, e1027
 38. Fang, F.M., Liu, Y.T., Tang, Y., Wang, C.J., Ko, S.F.: Quality of life as a survival predictor for patients with advanced head and neck carcinoma treated with radiotherapy. *Cancer* 100 (2004) 425-432
 39. Fang, J., T. Akaike, and H. Maeda, Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis*, 2004.9(1): p. 27-35.
 40. Fink AL. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79(2):425-449.
 41. Gastpar, R., Gehrmann, M., Bausero, M.A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J.A., Multhoff, G.: Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 65 (2005) 5238-5247
 42. Ganter,-M-T; Ware,-L-B; Howard,-M; Rox,-J: Extracellular heta shock protein 72 ia a marker of the stress protein response in acute lung injury. *Am-J-Physiol-lung-cell-Mol-Physiol*. 2006 Sept; 291(3): L354-61
 43. Gehrmann, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jaattela,M., Zilch, T., Multhoff, G.: Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death Differ* 12 (2005a) 38-51
 44. Goeckenjan G et al.: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge ders Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deustchen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie* 2010, 64 (Suppl 2): e1-e164
 45. Goldstraw P, Ball D, Jett JR et al.: Non-small-cell lung cancer. *Lancet* 378:1727-1740, 2011
 46. Graner. M.W., Raynes d. A., Bigner D.D., Guerriero, V.: Heat shock proteins 70-binding protein 1 is highly expressed in high-grade gliomas, interacts with multiple heat shock

-
- protein 70 family members, and specifically binds brain tumor cell surfaces. *Cancer Sci.* 2009 Oct, 100 (10): 1870-9
47. Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, Erdmann K, Hinkelmann U, Schurgerc S, Wijayanti N, Immenschuh S and Schröder H (2004). The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 37(12): 2064-71
48. Gutschmann-Conrad -Astrid, Ahmad R.- Heydari, Shenghong-Jou, Richardson-Arlan: The Expression of Heat Shock Protein 70 Decreases with Cellular Senescence in Vitro and in Cells Derived from Young and Old Human Subjects. *Experimental cell research* 241, 404-413 (1998) article No. EX984069
49. Hadaschick, B.A., Melchior, S.W., Sowery. A.I., Gleave, M.E.: Stressproteine bei der pathogenese des Prostatakarzinoms; *Urologe* 2007, 46: 516-520
50. Hamilton jr.-Raymond F., Li Li, Eschenbacher-William L., Szweda-Luke, Holian-Andrij: Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone. Received 8 October 1996, accepted in final form 12 September 1997
51. Hamilton-RF Jr., Ji-L, Felder-TD, Holian-A: Bleomycin induces apoptosis in human alveolar macrophages. *Am-J-Physiol.* 1995 Sep, 269 (3 Pt 1) : L318-25
52. Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M: CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene.* 2005 Jun 23; 24(27):4462-71
53. Hashida S, Yamamoto H, Shien K, Ohtusaka T, Suzawa K, Maki Y, Furukawa M: Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 enhances the radiation sensitivity of lung cancer cell lines with acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Onkol Rep.* 2015 Mar; 33(3):1449-504.
54. Haslbeck M. 2002. Hsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* 59(10):1649-1657.

-
55. Haslbeck M, Buchner J. 2002. Chaperone function of sHsps. *Prog Mol Subcell Biol* 28:37-59.
56. Hauser,-P; Hanzely,-Z; Jakab,-Z; Olah,-L; Szabo,-E: Expression and prognostic examination of heat shock proteins (HSP 27, HSP 70, and HSP 90) in medulloblastoma. *J-Pediatr-Hematol-Oncol*.2006 Jul; 28(7): 461-6
57. Herth FJF, *Therapie des Bronchialkarzinoms, Klinikarzt* 2005; 34 (7): 202-205
58. Hettinga-JV, Lemstra-W, Meijer-C, Los-G, de-Vries-EG, Konings-AW, Kampinga-HH: Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and resistant human tumor cells. *Int-J-Cancer*. 1996 Sep 17, 67 (6) : 800-7
59. Hjelstuen M. H , C. de L.Davies.: Flow cytometric measurements of heat shock proteins. *INT. J.Hyperthermia*, 1994, vol. 10, No. 2, 283-295
60. Hunninghake, G.W., Gadek, J.E., Kawanami, O., Ferrans, V.J. and Crystal, R.G . "Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: Evaluation by bronchoalveolar lavage." *Am. J. Pathol* . 97 :149-206 , 1979
61. Hurst,-D-R; Mehta,-A; Moore,-B-P; Phadke,-P-A: Breast cancer metastasis suppressor 1 is stabilized by the Hsp90 chaperone.*Biochem-Biophys-Res-Commun*. 2006 Oct 6;348(4):1429-35
62. Hwang, M., Moretti, L., Lu, B: HSP 90 inhibitors: Multi-targeted antitumor effects and novel combinatorial therapeutic approaches in cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2009; 16 (24): 3081-92
63. Interdisziplinäre S3-Leitlinie: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, 020-007, 2010
64. Jack Carter and Suzanne K. Murphy "Heat shock transcription factor-1 and heat shock protein60 are important for lung carcinoma anoikis resistance" *Proceedings of the American Association for Cancer Research*,2014

-
65. Johnson BE, et al: ATLAS: Randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIIB trial comparing bevacizumab therapy with or without erlotinib, after completion of chemotherapy, with bevacizumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3926–34
66. Junker, K., Petersen, I., Kleinzelliges Lungenkarzinom, Pathologie und Molekularpathologie. *Pathologie* 2009; 30: 131-140aa
67. Kakugawa T, Yokota S, Ischimatsu Y: Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Stress Chaperones*. 2013 Sep;18(5):581-90
68. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(35):13180–13185. doi: 10.1073/pnas.0605669103
69. Kim W.Y., Oh, S.H., Hong W.K., Lee H.Y.: Targeting heat shock protein 90 overrides the resistance of lung cancer cells by blocking radiation-induced factor-1alpha: *Cancer Res*. 2009 Feb, 15; 60 (4): 1624-32
70. Kohlhäufl, M., Kimmich, M., Aktuelle Therapiestrategien beim nichtkleinzellige Bronchialkarzinom; *Pneumo-News* 2009/4
71. Kovalchin,-J-T;Wang, -R, Sanders,-M: In vivo delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. *Wound Repair- Regen*.2006 Mar-Apr; 1(2): 129-37
72. Krause, S.W., Gastpar, R., Andreesen, R., Gross, C., Ullrich, H., Thonigs, G.,Pfister, K., Multhoff, G.: Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin. Cancer Res*. 10 (2004) 3699-3707
73. Krämer A., Gattenlöhner S., Neben K.,CUP Syndrom, Molekulare Pathogenese und Biologie. *Pathologie* 2009 Feb, 30: 117-124

-
74. Lawrence Barrera, Stuart Rushworth, Bortezomib induce heme oxygenase 1-expression in multiple myeloma: *Cell Cycle* 11:12, 2248-2252, June 15, 2012
75. Lee EJ, LIM JY, Lee SY, In KH, Yoo SH, Sul D, Park S. The expression of HSPs, anti-oxidants, and cytokines in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *Clin Biochem.* 2012 Apr;45(6):493-8
76. Lee, S.J., S.A.Choi, K.H.Lee, H.Y.Chung, T.H.Kim, C.K.Cho, and Y.S.Lee. 2001. Role of inducible heat shock protein 70 in radiation-induced cell death. *Cell Stress.Chaperones.* 6:273-281
77. Lee Youn Chau, 2015 Heme oxygenase-1: Emerging target of cancer therapy. *Journal of Biomedical Science* 2015, 22:22
78. Li Y, Zhang B, Wang X, Yan H, Chen G, Zhang X. Proteomic analysis of apoptosis induction in human lung cancer cells by recombinant MVL. *Amino Acids.* 2011 Oct;41(4):923-32. doi: 10.1007/s00726-010-0791-0. Epub 2010 Nov 11
79. Macario AJ, Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Clin Lab Res.* 1995;25(2):59-70
80. Malusecka, E., Krzyzowska-Gruca, S., Krawczyk, Z.: Stress proteins HSP 27 and HSP 70i predict survival in non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res.* 2008 Jan-Feb; 28 (1B): 501-6
81. Manegold C, P Drings: Second-line-Chemotherapie mit Docetaxel (Taxotere) beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC). *Onkologe* 2000.6:1098-1106 Springer-Verlag 2000.
82. Masuda-H, Hosokawa-N, Nagata-K: Expression and localization of collagen-binding stress protein Hsp47 in mouse embryo development: comparison with types I and II collagen. *Cell-Stress-Chaperones.* 1998 Dec, 3 (4) :256-64
83. McDonald,-E; Workmann,-P; Jones,-K: Inhibitors of the HSP90 molecule chaperone: Attacking the master regulator in cancer. *Curr-Top-Med-chem.*2006; 6(11): 1091-107

-
84. Mendillo ML et. al. HSF1 Drives a Transcriptional Program Distinct from Heat Shock to Support Highly Malignant Human Cancers. *Cell*, 2012; 150 (3): 549
 85. Merendino AM, Bucchieri F, Campanella C, Marcianò V, Ribbene A, David S, Zummo G, Burgio G, Corona DF, Conway de Macario E, Macario AJ, Cappello F (2010) Hsp60 is actively secreted by human tumor cells. *PLoS One*. 5(2):e9247.
 86. Moore-SA, Lopez-A, Richardson-A, Pahlavani-MA: Effect of age and dietary restriction on expression of heat shock protein 70 in rat alveolar macrophages. *Mech-Ageing-Dev*. 1998 Aug 1, 104 (1) : 59-73
 87. Morino-M, Tsuzuki-T, Ishikawa-Y, Shirakami-T, Yoshimura-M, Kiyosuke-Y, Matsunaga K, Yoshikumi-C, Saijo-N: Specific expression of HSP47 in human tumor cell lines in vitro. 1997 Mar-Apr, 11 (2) :179-84
 88. Multhoff, G.: Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. *Methods* 43 (2007) 229-237
 89. Münter, M.W.: Radioonkologische Therapiekonzepte zur Behandlung des Bronchialkarzinoms. *Klinikerzt* 2005;4(7):211-216
 90. Nagata-K: Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix-Biol*. 1998 Feb, 16 (7) : 379-86
 91. Neckers, L., Ivy, S.P.: Heat shock protein 90. *Curr. Opin. Oncol*. 15 (2003) 419-424
 92. Novoselova,-E-G; Glushkova,-O-V; Cherenkov,-D-A: production of heat shock proteins, cytokines and nitric oxide in toxic stress. *Biochemistry* 2006 April 4:375-383
 93. Nylandsted, J., Brand, K. & Jaettela, M.: Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 926 (2000) 122-125
 94. Oka, M, Sato, S.: Autoantibody to heat shock protein Hsp40 in sera of lung cancer patients. *J Cancer Res*. 2001 Mar; 92(3):316-20.

-
95. Orosz,-A; Szabo,-A; Szeman,-G; Janaki,-T: novel nontoxic heat shock protein inhibitor having selective antiproliferative effect. *Int-J-Biochem-Cell-biol.* 2006; 38(8): 1352-62
 96. O'Rourke N, Roqué i Figuls M, Farré Bernadó N et al.: Concomitant chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010, Issue 6.
 97. Otterbein LE and Choi AM (2000). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(6): L1029-37
 98. Pace A, Barone G, Lauria A, Martorana A, Piccionello AP, Pierro P, Terenzi A, Almerico AM, Buscemi S, Campanella C, Angileri F, Carini F, Zummo G, de Macario EC, Cappello F, Macario AJ Hsp60, a novel target for antitumor therapy: structure-function features and prospective drugs design. *Curr. Pharm.* 2013 Dec. 19(15):2757-64.
 99. Pelayo Alvarez M, Gallego Rubio Ó, Bonfill Cosp X et al.: Chemotherapy versus best supportive care for extensive small cell lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2009
 100. Peters S, Adjei AA, Gridelli C et al.: Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 23:S7:vii56-vii64, 2012.
 101. Pijls-Johannesma M, De Ruyscher DKM, Lambin P et al.: Early versus late chest radiotherapy in patients with limited-stage small cell lung cancer. *Cochrane Database of Systemic Reviews*, 2010
 102. Pillai, RN, Ramalingam, SS: Heat shock protein 90 inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 2014 Mar; 26(2):159-64
 103. Pisters KMW et al.: Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non small-cell lung cancer guideline. *J Clin Oncol* 2007; 25(34): 5506-5518

-
- 104.Polla-BS, Kantengwa-S, Gleich-GJ, Kondo-M, Reimert-CM, Junod-AF: Spontaneous heat shock protein synthesis by alveolar macrophages in interstitial lung disease associated with phagocytosis of eosinophils. *Eur-Respir-J.* 1993 Apr, 6 (4) : 483-8
- 105.Polla B. S. , S. Kantengwa, G.J. Gleich, M. Kondo, C. M. Reimert, A. F. Junod: Spontaneous heat shock protein synthesis by alveolar macrophages in interstitial lung disease associated with phagocytosis of eosinophils. *Eur Respir J*, 1993, 6, 483-488.
- 106.Rappa F, Farina F, Zummo G, David S, Campanella C, Carini F, Tomasello G, Damiani P, Cappello F, DE Macario EC, Macario AJ. Rappa F (2012) HSPmolecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: an overview. *Anticancer Res.* 32(12):5139-50.
- 107.Ravagnan, L., S.Gurbuxani, S.A.Susin, C.Maisse, E.Daugas, N.Zamzami, T.Mak,M.Jaattela, J.M.Penninger, C.Garrido, and G.Kroemer. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 3:839-843.
- 108.Razzaque-MS, Hossain-MA, Kohno-S, Taguchi-T: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat is associated with increased expression of collagen-binding heat shock protein (HSP) 47. *Virchows-Arch.* 1998 May, 432 (5) : 455-60
- 109.Razzaque-MS, Nazneen-A Taguchi-T: Immunolocalization of collagen and collagen-binding heat shock protein 47 in fibrotic lung diseases. *Mod-Pathol.* 1998 Dec, 11 (12) : 1183-8
- 110.Razzaque-MS, Kumatori-A, Harada-T, Taguchi-T: Coexpression of collagens and collagen-binding heat shock protein 47 in human diabetic nephropathy and IgA nephropathy. *Nephron.* 1998 Dec, 80 (4) : 434-43
- 111.Rami-Porta R, Bolejack V, Goldstraw P: The new tumor, node and metastasis staging system. *Semin Respir Crit Care Med* 32:44-51, 2011.
- 112.Reck M, Popat S, Reinmuth N et al.: Metastatic non-small-cell lung cancer NSCLC: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 25 Suppl3:27-39, 2014

-
113. Ren, F., Mao, L., Ding, Z., Zhang, X.: Heat shock protein 110 improves the anti-tumor effects of the cytotoxic T-Lymphocyte epitope E7 in mice. *Cancer Biol Ther* 2010 Jan 21: 9 (2)
114. Rong Biao, Xue, Jiang Xiling, Yang Shuanying, Zhang Wei, Cai Xiguang, Wang Jinsu Min: Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2012, 31-70
115. Rossi A, Garassino MC, Cinquini M et al.: Maintenance or consolidation therapy in small-cell lung cancer: review and meta-analysis. *Lung Cancer* 70:119-128, 2010
116. Ryan MT, Naylor-Dj, Hoj-PB, Clark-MS, Hoogenraad-NJ: The role of molecular chaperones in mitochondrial protein import and folding. *Inter-Rev-Cytol.* 1997;1997;174:127-93
117. Rytter SW, Choi AM: Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox Signal*, 2005 Jan-Feb; 7(1-2):80-91
118. Segal, B-H; Wang, X-Y; Dennis, C-G: Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discov Today*. 2006 Jun; 11(11-11): 534-40
119. Shaw AT, Kim DW, Mehra R, et al. Ceritinib in ALK rearranged non-small cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014; 370(13):1189-1197
120. Scheffler, M., Wolf, J.: Aktuelle Entwicklungen in der Bildgebung beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom. *Onkologe* 2009; 15: 496-501
121. Sherman, M., Multhoff, G.: Heat shock proteins in cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1113 (2007) 192-201
122. Schiebe-Becker, M., Hoffmann, W.: Strahlentherapie des Bronchialkarzinoms. *Z Herz-Thorax-Gefäßchir* 2009, 23: 305-310

-
- 123.Schmitt, E., Gehrman, M., Brunte, M., Multhoff, G., Garrido, C.: Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *JLeukoc Biol* 81 (2007)15-27
- 124.Shi Y1, Liu X2, Lou J3, Han X4, Zhang L5, Wang Q6, Li B7, Dong M8, Zhang Y9: Plasma levels of heat shock protein 90 alpha associated with lung cancer development and treatment responses; *Clin Cancer Res.* 2014 Dec 1;20(23):6016-22
- 125.Shimamura, T., Shapiro, G.I.: Heat shock protein 90 inhibition in lung cancer; *J Thorac Oncol.* 2008 jun; 3 (6 Suppl 2): S 152-9
- 126.Soares MP, Usheva A, Brouard S, Berberat PO, Gunther L, Tobiasch E and Bach FH (2002). Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 4(2): 321-9
- 127.Solit,-D-B; Rosen,-N: Hsp 90: a novel target for cancer therapy. *Curr-Top-Med-Chem.*2006; 6(11):1205-14
- 128.Sorensen M, Pijls-Johannesma M, Felip E: Small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practical Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 S5:v120-v125, 2010.
- 129.Sunamoto M, Kuze K, Ohishi N: Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress collagenaccumulation in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest.* 1998 Aug;78(8):967-72
- 130.Stinchcombe TE, Gore E: Limited-stage small cell lung cancer: Current chemoradiotherapy treatment paradigms. *The Oncologist* 15:187-195, 2010
- 131.Szondy K, Rusai K, Szabó AJ, Nagy A, Gal K, Fekete A, Kovats Z, Losonczy G, Lukacsovits J, Müller V; Tumor Cell Expression of Heat Shock Protein (HSP) 72 is Influenced by HSP72 [HSPA1B A(1267)G] Polymorphism and Predicts Survival in Small Cell Lung Cancer (SCLC) Patients. *Cancer Investigation* (Apr 2012)

-
132. Tai Sun Park, Hye Ryouon Kim, Heat shock protein 70 as a predictive marker for platinum-based adjuvant chemotherapy in patients with resected non-small cell lung cancer. *Lungcancer*, November 2014 Volume 86, Issue 2, Pages 262–267
133. Takahashi, Y., S. Takahashi, T. Yoshimi, T. Miura, K. Mochitate, T. Kobayashi (1997). “Increases in the mRNA levels of gamma-glutamyltransferase and hemeoxygenase-1 in the rat lung after ozone exposure.” *Biochem Pharmacol* **53**(7): 1061-4.
134. Tanguy Seiwert, Maria Tretiakova, Patric C. Ma: Heat shock protein (HSP) overexpression in lung cancer and potential as a therapeutic target. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, Volume 46, 2005.
135. Thériault JR, Mambula SS, Sawamura T et al. 2005. Extracellular hsp70 binding to surfacereceptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Letters* 579:1951-1960.
136. Tsai JR, Wang HM, Liu PR: High expression of heme oxygenase-1 is associated with tumor invasiveness and poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients. *Cell Onkol.* 2012 Dec 35(6): 461-471
137. Trougakos I.P., Gonos E.S.: Oxidative stress in malignant progression: The role of clusterin, a cellular biosensor of free radicals. *Adv Cancer Res.* 2009; 104: 171-210
138. Tomoyuki Kakugawa, Shin-Ichi Yokota et al. Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute interstitial pneumonia, *BMC Pulm Med.* 2014; 14-48
139. UICC (2009) In: Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind CH (eds) *TNM classification of malignant tumours* 7th edn. Wiley-Blackwell, Oxford
140. Ulrich Costabel, Helmut Teschler, Josune Guzman, Claus Kroegel: Bronchoalveoläre Lavage: Zwischenbilanz nach zehn Jahren Klinischer Anwendung. *Med. Klin*, 85(1990), 376-387 (Nr.6)
141. Van Meerbeeck JP, Fennell DA, de Ruyscher DKM: Small-cell lung cancer. *Lancet* 378:1741-1755, 2011

-
142. Vignola-AM, Chanez-P, Polla-BS, Vic-P, Godard-P, Bousquet-J: Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis. *Am-J Respir-Cell-Mol-Biol.* 1995 Dec, 13 (6) : 683-91
143. Volm-M, Mattern-J, Stammler-G: Up-regulation of heat shock protein 70 in adenocarcinomas of the lung in smokers. *Anticancer Res* 1995 Nov-Dec, 15 (6B) : 2607-9
144. Volm-M, Koomagi-R, Mattern-J, Stammler-G: Heat shock (hsp70) and resistance proteins in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Lett* 1995 Aug 16, 95 (1-2) : 195-200
145. Wahl, H.G.: Tumormarker thorakaler Neoplasien. *Pneumologe* 2009; 6: 224-232
146. Weiland, J.E., Dorinsky, P.M., Davis, W.B., Lucas, J.G. and Gadek, J.E. "Validity of bronchoalveolar lavage in acute lung injury: recovered cells accurately reflect changes in the lung parenchyma" . *Pathology* 21 :59-62 , 1989 .
147. Weiss-J, Sos-ML, Seidel-D et al: Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2010; 2:62ra93
148. Wenn W, Liu W, Shao Y, Chen L.: VER-155008, a small molecule inhibitor of HSP 70 with potent anticancer activity on lung cancer cell lines. *Exp Biol. Med* 2014 May; 239(5): 638-45
149. West, H.J.: Novel target agents for lung cancer. *Clic Lung Cancer* 2009 Mar, 10 Suppl 1: S41-6
150. Willis D, Moore AR, Frederick R and Willoughby DA (1996). Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2(1): 87-90
151. Whitehead B. F, C. Stoehr, C. Finkle, G. Patterson, J. Theodore, C. Clayberger, V. A. Starnes.: Analysis of bronchoalveolar lavage from human lung transplant recipients by flow cytometry. *Respiratory Medicine* (1995) 89, 27-34.
152. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(10):761-772.

-
153. Wolf M, Kleinzellige Bronchialkarzinome Klinische Präsentation , Diagnostik und prognostische Faktoren. *Onkologie* 4 (1998) 1005-1018
154. Wolff-AP, Glover-JF, Tata-JR: Culture shock. Synthesis of heat-shock-like proteins in fresh primary cell cultures. *Exp-Cell-Res.* 1984 Oct, 154 (2) : 581-90
155. Wong-CG, Bonakdar-M, Mautz-WJ, Kleinmann- MT: Chronic inhalation exposure to ozone and nitric acid elevates stress-inducible heat shock protein 70 in the rat lung. *Toxicology.* 1996 Feb 22, 107 (2) : 111-9
156. Woo-J, Iyer-S, Cornejo-MC, Mori-N, Gao-L, Sipos-I, Maines-M, Buelow-R: Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (Hsp 32). *Transpl-Immunol.* 1998 Jun, 6 (2) : 84-93
157. Wood, Karen, David Nunley, Susan Bruce: The Role of Heat Shock Protein 27 in Bronchiolitis Obliterans Syndrome after Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant,* 2010 Jul: 29 (7): 786-791.
158. Wu, R., Y. H. Zhao, C. G. Plopper, M. M. Chang, K. Chimiel, J. J. Cross, A. Weir, J. A. Last, B. Tarkington (1999). "Differential expression of stress proteins in nonhuman primate lung and conducting airway after ozone exposure." *Am J Physiol* 277(3 Pt 1): L511-22.
159. Xu X, Wang W, Shao W.: Heat shock protein-60 expression was significantly correlated with the prognosis of lung adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 2011 Nov. 1;104(6):598-603
160. Yang, I, Han, S., Parsa A.T.: Heat shock protein vaccines as active immunotherapy against human gliomas. *Expert Rev Clin Oncol.* 2009 Nov; 9 (11): 1577-82
161. Zhang, -H; Huang, -W: Fusion proteins of HSP 70 with tumor-associated antigen acting as a potent tumor vaccine and the c-terminal peptide-binding domain of HSP 70 being essential in inducing antigen-independent anti-tumor response in vivo. *Cell-Stress-Chaperones.* 2006 Autumn; 11(3): 216-26

162.Zhang Venyi, Tiankui Qiao, Lin Zha: Inhibition of Heme Oxygenase-1 Enhances the Radiosensitivity in Human Nonsmall Cell Lung Cancer A549 Cells; *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. October 2011, 26(5): 639-645

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Schematische Darstellung der Chaperone,

Abb.2: Darstellung der HSP-Expression als Histogramm nach durchflusszytometrischer Messung

Abb.3: Explorative Analyse von HSP 32

Abb.4: Explorative Analyse von HSP 47

Abb.5: Explorative Analyse von HSP 60

Abb.6: Explorative Analyse von HSP 70

Abb.7: Explorative Analyse von HSP 90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms gemäß Unio internationalis contra Cancrum; UICC, 2009

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Bronchialkarzinoms (UICC, 2009)

Tabelle 3: Marburger Klassifizierung - Stadieneinteilung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Tabelle 4: Histologische Klassifikation maligner epithelialer Tumoren der Lunge [WHO 2004],

Tabelle 5: Histologisch-zytologisches Grading des Bronchialkarzinoms nach WHO

Tabelle 6: Verwendete Chemotherapiekombinationen zur Behandlung des Bronchialkarzinoms

Tabelle 7: Charakteristika der Patienten bezogen auf die Gruppen der analysierten Proben

Tabelle 8: Gesamtcharakteristika der Patienten

Tabelle 9: Gruppeneinteilung und Patientenzahl

Tabelle 10: Gesamtzahl der Proben der jeweiligen HSP-Familie

Tabelle 11: Expression von HSP 32

Tabelle 12: Expression von HSP 47

Tabelle 13: Expression von HSP 60

Tabelle 14: Expression von HSP 70

Tabelle 15: Expression von HSP 90

Tabelle 16: Übersicht über die Expression von Hitzeschockproteinen in allen Patientengruppen.

Tabelle 17: Expression der HSP mit Darstellung der 25 und 75 Perzentile

Tabelle 18: Man-Whitney-Test: Gruppenvariablen Komplette Remission und Chemotherapie (CR und CT)

Tabelle 19: Man-Whitney-Test: Gruppenvariablen komplette Remission und Radio-Chemotherapie (CR und RCT)

Tabelle 20: Man-Whitney-Test: Gruppenvariablen Chemotherapie und Radio-Chemotherapie (CT und RCT)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Possinger, ehemals Direktor der Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, für die Überlassung des Themas sowie die Entwicklung und Umsetzung der vorliegenden Arbeit.

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Thomas Beinert, der gleichzeitig sehr fürsorglich meinen Vater behandelte, für die intensive Betreuung während des praktischen und schriftlichen Teils der Doktorarbeit. Er gewährte jederzeit schnellste Unterstützung bei Literaturrecherchen und bei der Durchführung und Auswertung der Untersuchungen. Durch ihn lernte ich den Umgang mit Literatur und Wissenschaft kennen.

Frau Dr. C. Oehm, Chefarztin der Abteilung für Onkologie und Pneumologie am Johanniterkrankenhaus in Treuenbritzen habe ich die ungewöhnlich große Zahl von Brochoalveolarlavagen von Bronchialkarzinom-Patienten.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. M. Fleischhacker, der zu allen methodischen und praktischen Fragen zahlreiche Hilfestellungen und Anregungen gab. Meiner Kollegin Laila Khubnazar, der Informatikerin Diellina Seferi sowie Frau Heike Schmitz, möchte ich für die Unterstützung bei der Übersetzung der englischsprachigen Texte, technischen Fragen und oft nützlichen und klärenden Gesprächen danken.

Das herzlichste Dankeschön geht an meine liebe Frau Dzemile, die mir den kleinen Sohn Oldion und die kleine Amalia schenkte, die mir immer Kraft gab und eine Motivation für den Abschluss meiner Arbeit war.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sefer Abdija, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Expression von Hitzeschockproteinen in der Bronchoalveolarlavage unter Radio- und Chemotherapie bei Patienten mit Bronchialkarzinom** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 09.12.2016

Unterschrift:

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.