



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Etablierung von ELISA Tests für mögliche
Lungenadenokarzinom-Antigene identifiziert IL-18 als
potentiellen prognostischen Serummarker“

verfasst von

Mag. Verena Stöger-Heinisser

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 190 445 299

Studienrichtung lt. Studienblatt: Lehramtsstudium UF Biologie und UF Psychologie/Philosophie

Betreut von: Univ. Prof. Mag. Dr. Georg Krupitza

1. Zusammenfassung

Die Identifizierung von tumorspezifischen antigenen Biomarkern könnte eine effektive Strategie für ein Screening von Lungenadenokarzinomen darstellen. In Vorarbeiten von wissenschaftlichen Teams wurde auf Basis einer proteomischen Analyse von chirurgisch reseziertem Gewebe von Lungenadenokarzinomen eine Reihe von potentiellen tumorspezifischen Proteinen identifiziert. Eine darauffolgende „in silico“ Analyse schränkte die Anzahl möglicher, im Serum zu findender Tumormarker auf vier Kandidaten ein. Ziel der Studie meiner ersten Diplomarbeit [1] war es, einen robusten Test-ELISA für jedes dieser Antigene zu etablieren und damit Blutproben von Patienten zu analysieren. Wir konnten einen Kandidaten (Interleukin 18) als potentiellen Marker identifizieren, der in den Blutsera von Krebspatienten signifikant erhöht war. In dieser Arbeit soll IL-18 in seiner Bedeutung als möglicher Tumormarker in unseren Ergebnissen eingehender beschrieben werden.

Zusätzlich soll ein Bogen zum Konnex „Rauchen und Lungenkrebs“ gespannt werden, wie er im Biologieunterricht thematisch gut vermittelt werden kann. Beispiele zur Stundenplanung sollen hier dargestellt werden.

2. Abstract

The identification of antigenic biomarkers that are tumor-specific could be an effective strategy for lung adenocarcinoma screening in human sera. In preliminary works by teams of scientists, proposed novel cancer biomarkers were identified on the basis of a comprehensive proteome analysis of surgical lung tumor versus healthy tissue resections. A subsequent “in silico” search restricted the number of potential soluble lung tumor markers to four candidates. The aim of my first diploma thesis [1] was to establish serum ELISA tests for these antigens and to determine whether they were specific markers in blood samples of lung adenocarcinoma patients. We were able to identify one candidate (Interleukin 18) as a potential biomarker, whose amount was significant higher in the cancer patient sera. In this thesis, the IL-18 findings and results will be specified in more detail.

Additionally, the connection of “smoking and lung cancer” will be illustrated in the context of lecture organization in Biology school teaching. A few examples for lecture holding and presentation will be given.

DANKSAGUNG

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Frau Ass.-Prof. Dr. Brigitte Hantusch aussprechen, die mir zum zweiten Mal sehr hilfsbereit und tatkräftig zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich weiters ganz herzlich bei Univ. Prof. Dr. Georg Krupitza, der mir diese Arbeit überhaupt ermöglicht hat.

Last but not least gilt auch mein besonderer Dank an meine Familie, die immer zu mir steht und mir stets Mut und Kraft gibt. Vielen Dank an Martin Stöger-Heinisser, Monika und Ernst Stöger.

„Wünsche Dir nicht glänzende Schüler,
sondern strahlende Kinder,
und sei dankbar für jeden Einzelnen,
der den Weg mit Dir teilt. [...]“

(Erwin Mann)

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	2
2. Abstract.....	3
3. Wissenschaftlicher Hintergrund	7
3.1. Bronchial-Karzinome	7
3.2 Biomarker: Forschung mit Zukunft	9
3.3 Interleukin-18 (IL-18).....	10
4. Zielsetzung	13
5. Material und Methoden	14
5.1 Verwendete Reagenzien	14
5.2 Methoden	17
5.2.3 Statistische Datenauswertung.....	24
6. Ergebnisse.....	24
6.1 Patientenübersichtstabelle	24
6.2 Interleukin 18 Versuchsreihen.....	26
7. Zusammenfassung und Fazit	30
7.1 Tumormarker im Serum	31
7.2 ELISA Verfahren mittels <i>Bender MedSystems®</i> IL-18 Modul Set.....	31
7.3 Bewertung der Ergebnisse	32
8. Lehramtsspezifischer Hintergrund zum Thema Rauchen und Suchtprävention ...	35
8.1 Lehrpläne für das Unterrichtsfach Biologie und Umweltkunde mit Schwerpunkt Rauchen und Suchverhalten	42
8.2 Didaktische Vorschläge zu Stundengestaltungen	43
9. Abkürzungsverzeichnis.....	55
10. Literaturverzeichnis.....	57
11. Curriculum Vitae	66

3. Wissenschaftlicher Hintergrund

3.1. Bronchial-Karzinome

Lungenkrebs (Bronchial-Karzinom oder Bronchus-Karzinom) ist eine weit verbreitete Krankheit und eine der Haupttodesursachen in der heutigen Gesellschaft [2]. Speziell beim Lungenkrebs gibt es einige Hinweise wo ein erhöhtes Risiko für Menschen gegeben sein kann.

Richard Stöger nennt hier einige folgende Faktoren [3]:

- Personen, die viele Jahre täglich 20 Zigaretten und mehr geraucht haben.
- Berufe mit erhöhter Staub- und Abgasexposition (z.B.: Kohlen- und Bergarbeiter, Chemiarbeiter, Garagenarbeiter und Verkehrspolizisten).
- Chronische Bronchitis oder chronische Lungentuberkulose.
- Vitamin-A-Mangel (möglicherweise einseitige Kost).

Starke RaucherInnen erkranken im Vergleich zu NichtraucherInnen neunmal häufiger an Lungenkrebs. Des weiteren ist das Passivrauchen bekanntermaßen zweifelsohne ebenfalls schädigend [3]. Ein Vergleich von RaucherInnen und NichtraucherInnen zeigt einen deutlichen Zusammenhang: 10 von 11 Lungenkrebskranken waren RaucherInnen [4]. Außerdem fördert Rauchen die Entstehung von Speiseröhren- Lippen- Mundhöhlen- und Kehlkopfkrebs. Der Tabakkonsum steht auch durch die im Mundschleim gelösten und verschluckten Teerstoffe, mit Bauchspeicheldrüsen- und Harnblasenkrebs sowie Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren in Zusammenhang. Frühgeburten sind bei Raucherinnen sehr häufig. Die Kinder von Raucherinnen sind

bei der Geburt durchschnittlich leichter im Vergleich zu Nichtraucherinnen-Kindern und haben auch ein erhöhtes Geburtsrisiko [4].

Bronchialkarzinome können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden:

1. Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC- engl.: „non-small cell lung cancers“)
2. Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC- engl.: “small cell lung cancers”).

In den letzten Jahren wurden etliche Entdeckungen und Leistungen in der Tumorforschung erzielt. Relevante Protoonkogene, Tumorsuppressorgene, sowie DNA-Reparaturgene, welche – typisch für (Lungen)-Krebs -- abnorm exprimiert werden, konnten identifiziert werden [5-7].

Unglücklicherweise werden Bronchialkarzinome häufig in einem eher fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, da diese Krebsart über einen längeren Zeitraum meist symptomlos verläuft. Da man mittels Röntgen und Biopsien das tumoröse Gewebe erst in einem mehr oder weniger deutlich sichtbaren Stadium entdeckt, versucht man mit einfachen Blutabnahmen, spezielle Marker zu finden, welche das Tumorstadium frühzeitig andeuten und dadurch eine schnellere Hilfeleistung geboten werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass hier noch reichlich Bedarf an Grundlagenforschung gegeben ist, habe ich in einer zuvor durchgeführten Arbeit versucht, für vier versprechende Tumormarker wirksame ELISAs zu etablieren. Basierend auf den Ergebnissen aus meiner ersten Arbeit [1], scheint nur das IL-18 als prognostischer Marker für genauere Analysen in Frage zu kommen.

3.2 Biomarker: Forschung mit Zukunft

Genetische bzw. proteomische Auffälligkeiten in Korrelation mit zyto-histologischen Befunden sind das Kernthema in der Biomarker-Forschung. Die Anforderungen an potentielle Tumormarker sollten neben einer hohen Sensitivität und Spezifität, auch eine sehr frühzeitige Diagnose zulassen, um rasche medizinische Interventionen gewährleisten zu können. Ein optimaler Tumormarker sollte in Körperflüssigkeiten zu finden sein, welche durch eine einfache nicht-invasive Methode entnehmbar sind [5, 8]. Gut eignet sich hierbei beispielsweise Blut oder Speichel.

Zustimmend kann man zu Hanash et al. sagen, dass ein einziger Biomarker wohl kaum ausreichende Informationen über den jeweiligen Krebstypus und dessen Verlaufsform geben kann [8]. Es ist vielmehr ein Zusammenspiel vieler Marker, die eine Tumorpräsenz anzeigen, wenn sie im untersuchten Medium signifikant erhöht sind.

Aufgrund unserer IL-18 Ergebnisse ist ein vielversprechender Ansatz zum Auffinden eines Tumormarkers geleistet, welcher für weitere Studien als möglicher Bronchialkarzinom-Marker untersucht werden sollte.

Versuche mit Biomarkern basieren auf den immunologischen Interaktionen zwischen Antikörper und Antigenen. Die Auswahl eines geeigneten Immunoassays ist allerdings keine einfache Angelegenheit. Einen guten Überblick zu den verschiedensten Assay-Methoden kann aus dem Buch „Immunoassays“ von A. Raem und P. Rauch entnommen werden [9].

Für unsere Versuchsdesigns schien uns allerdings der ELISA (engl.: „enzyme-linked immunosorbent assay“) sehr geeignet. Seine relativ einfache, kostengünstige und effiziente Anwendung stellt einen attraktiven nicht-invasiven Test dar, der im klinischen Alltag gut verwendet werden kann. Der enzymatische Substratumsatz von Antikörper- und Antigen-Koppelung, kann entweder kolorimetrisch, fluorimetrisch oder

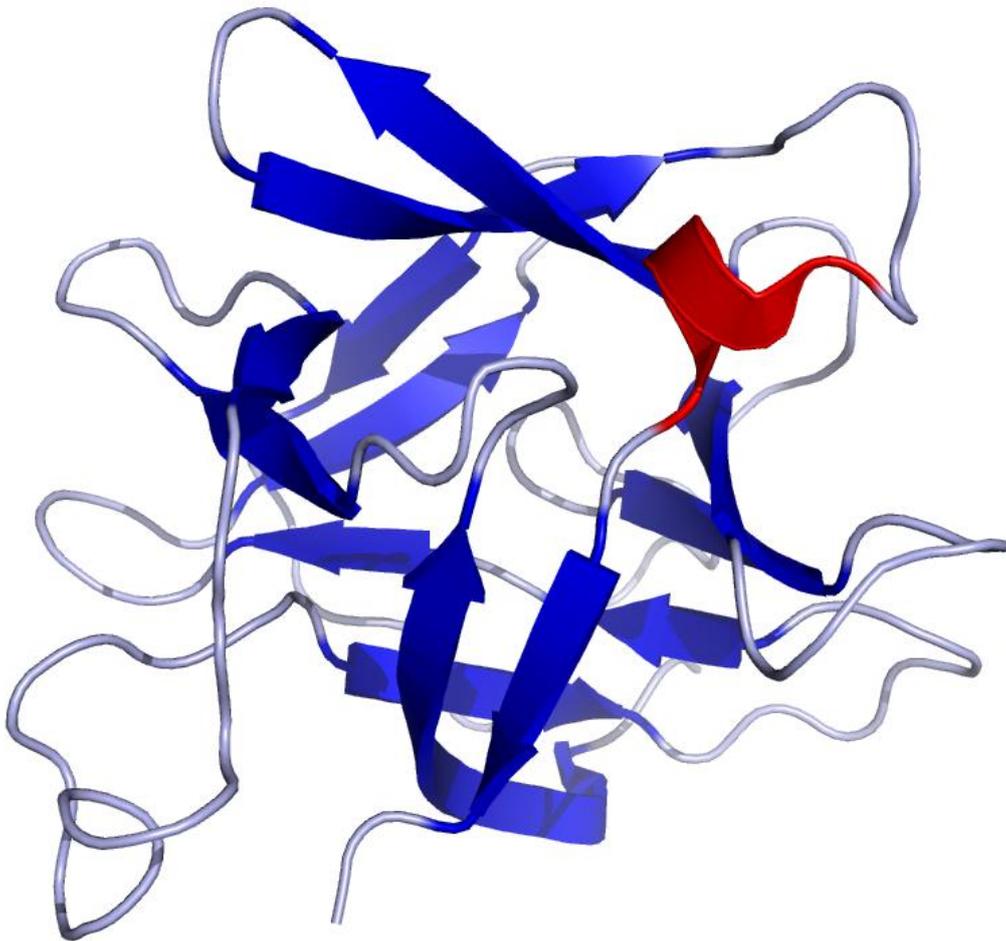
luminometrisch nachgewiesen detektiert werden. Besonders beliebt ist der ELISA in der Diagnostik, weil es möglich ist, in relativ kurzer Zeit viele Proben unter zeitgleichen Bedingungen parallel und mit geringen Mengen an Verbrauchsmittel zu analysieren [9].

Die Antikörper-Antigen-Bindung findet auf der Mikrotiterplatte statt. Direkte ELISAs bezeichnet man als solche, die nur eine einfache Antikörper-Antigen-Bindung eingehen. Als Sandwich-ELISA wird das Format bezeichnet, bei dem die unterste Schicht bereits mit einem Antikörper (Primärer Antikörper) pipettiert wurde, dann das Antigen (Analyt) aufgetragen wird und anschließend noch einen Antikörper (Sekundärer Antikörper) darübergeschichtet wird. In unseren Ergebnissen kam klar heraus, dass der Sandwich-ELISA die bessere Wahl war, nachdem hier höhere OD-Werte erzielt werden konnten. Eine nähere Beschreibung folgt im **Kapitel 5** „Material und Methoden“.

3.3 Interleukin-18 (IL-18)

Interleukin 18 ist als ein vorentzündliches Cytokin bekannt, welches essentiell für die eigene Immunabwehr gegen intrazelluläre Infektionen ist [10]. Es wird von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet und zeigt eine wirksame Interferon IFN- γ induzierte Aktivität [11], [12], [13]. Die biologische Aufgabe von IL-18 ist die Aktivitätsförderung von zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen [11], [14]. IL-18 induziert auch die Genexpression und Synthese von TNF, IL-1 und einige Chemokine [10]. IL-18 hat Ähnlichkeiten mit der IL-1 Proteinfamilie [10] in ihrer Struktur, sowie Funktion und teilt biologische Aktivitäten mit IL-12 [12], [15]. Farjadfar et al. entdeckten in ihrer Studie, den Zusammenhang zwischen IL-18 Polymorphie und Lungenkrebs. Es deutete darauf hin, dass IL-18 Polymorphismen bei Lungenkrebs

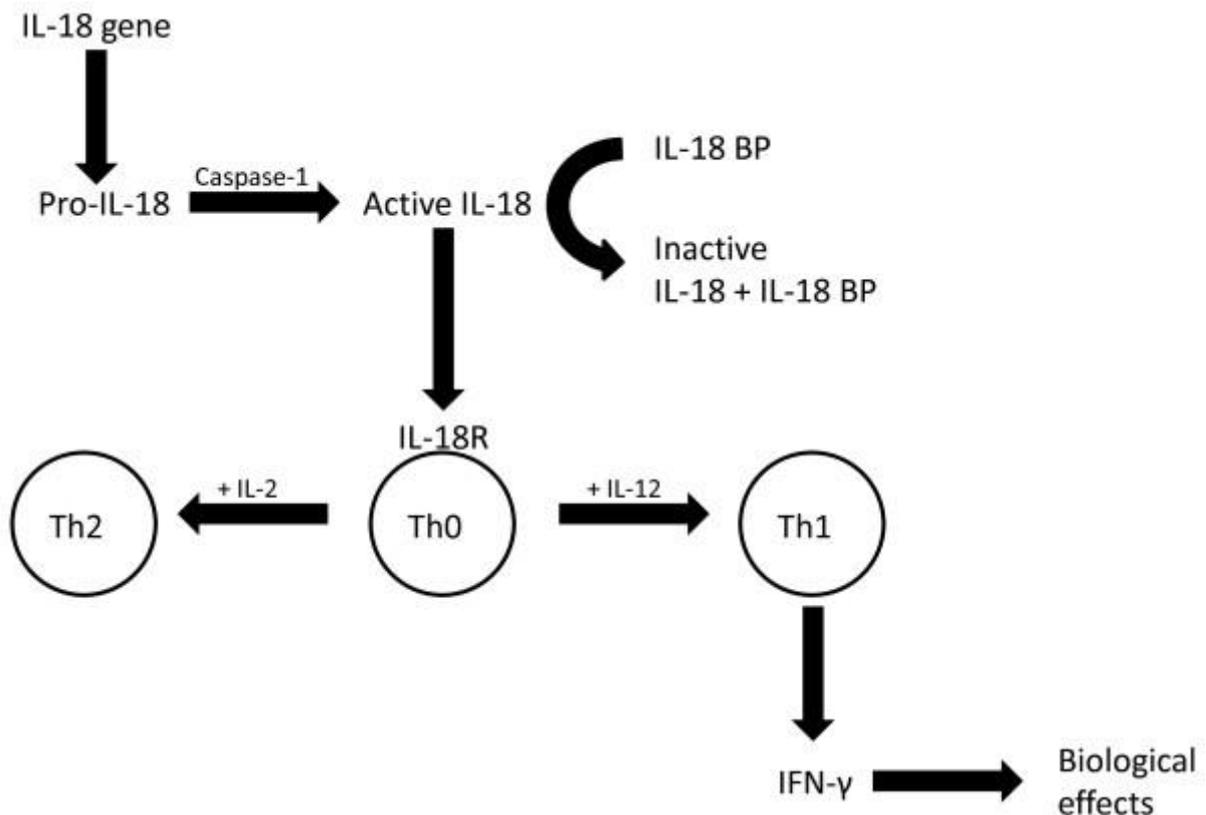
mitwirken, insbesondere unter Patientinnen und Patienten mit Plattenepithelkarzinom. Farjadfar et al. beschrieben signifikante Unterschiede im IL-18-607 Allel und Genotypaufteilung zwischen 73 Lungenkrebspatientinnen und -patienten und Kontrollgruppe. Weitere Studien mit einer größeren Kohorte an Patientinnen und Patienten sind notwendig, um einen möglichen Zusammenhang zwischen IL-18 Polymorphismen und verschiedenen histologischen Lungenkrebstypen zu bestätigen [16].



Grafik 1: Computeranimierte molekularbiologische Struktur des humanen Interleukin 18 [17].

Kato et al. reproduzierten die biochemische Struktur des humanen IL-18. Es faltet sich in eine β -Kleeblatt Struktur, welches dem IL-1 sehr ähnlich ist. Die Struktur gibt Aufschluss über Rezeptoraktivierungsvorgänge auf molekularbiologischer Ebene im Körper.

Troseid, Seljeflot und Arnesen zeigten in ihrer Studie eine Grafik (siehe **Grafik 2**), welche die Regulation und biologischen Wirkung von IL-18 repräsentieren soll [18].



Grafik 2: Regulation und biologische Wirkung von IL-18 [18].

Die Grafik beschreibt den Wirkungsmechanismus von IL-18, beginnend beim IL-18 Gen bis hin zu seiner biologischen Wirkungsweise.

Der Wirkungsmechanismus zeigt zuerst das Cytokin, welches als ein Vorläufer (Pro-IL-18) ausgedrückt ist. Es ist inaktiviert bis es von dem Enzym Caspase-1 gespalten wird. Das ausgeschüttete IL-18 ist gebunden und wird vom IL-18 BP (binding protein) inaktiviert. Nur das freie Bruchstück kann eine Signaltransduktion mittels β -Kette des IL-18 Rezeptors (IL-18R) hervorrufen. Der biologische Einfluss ist abhängig vom Milieu des Cytokins. IL-18 könnte in Kombination mit IL-2 eine Th2 Antwort und ge-

meinsam mit IL-12 eine Th1 Antwort bewirken. Daraus folgt eine IFN- γ Produktion, die z.B.: eine zentrale Eigenschaft von arteriosklerotische Gefäßerkrankungen ist [18].

4. Zielsetzung

Aus den Vorarbeiten meiner ersten Diplomarbeit, konnten mit vier Antigenen (CYGB, IL-18, MSLN und MUC5B) verschiedene ELISA Etablierungsversuche durchgeführt werden. Aus den entnommenen Blutproben von LungenkrebspatientInnen mit Adenokarzinomen, konnten wir die Test-Etablierungen zunächst mit kommerziell erworbenen Antigenen und Antikörpern durchführen um dann schließlich zu den Blutsera überzugehen.

Aus den genannten vier Antigenen konnten wir nur mit IL-18 ein signifikantes Ergebnis erzielen, welches in dieser Arbeit näher beschrieben werden soll. Die anderen Etablierungs- versuche,- schemata und Ergebnisse sind in meiner ersten Arbeit [1] ausführlich einzusehen. Desweiteren soll ein Bogen als Überleitung zu einer Unterrichtseinheit im Schulfach „Biologie- und Umweltkunde“ zum Thema „Rauchen und Lungenkrebs“ gespannt werden. In dieser Arbeit sind Grundlagenforschung sowie ein fachdidaktischer Schwerpunkt miteinander verknüpft.

5. Material und Methoden

5.1 Verwendete Reagenzien

Folgende Puffer sowie Lösungen wurden in den IL-18 Etablierungsvorarbeiten (Test-ELISAs) und ELISA-Versuchen mit den Sera verwendet [1]:

- 1 Liter **10 * Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**

5.244 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

28.83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Destilliertes Wasser wurde auf 1 Liter aufgefüllt und auf einen pH von 7.4 abgestimmt.

- 1 Liter **1 * Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**

100 ml 10 * PBS

Destilliertes Wasser wurde auf 1 Liter aufgefüllt.

- 1 Liter **0.2 % Phosphatgepufferte Salzlösung + Tween 20 (PBST)**

100 ml 10 * PBS

2 ml Tween 20

Destilliertes Wasser wurde auf 1 Liter aufgefüllt.

- 1 Liter **Karbonatpuffer**

1.59 g Na₂CO₃

2.93 g NaHCO₃

0.20 g NaN₃

Destilliertes Wasser wurde auf 1 Liter aufgefüllt und auf einen pH von 9.0-9.6 abgestimmt.

- 1 Liter **Waschpuffer**

1000 ml 1 * PBS

0.5 ml Tween 20

- 1 Liter **10 * Tris gepufferte Saline (TBS)**

24.5 g Tris

80.0 g NaCl

Destilliertes Wasser wurde auf 1 Liter aufgefüllt und auf einen pH von 7.6 abgestimmt.

- ½ Liter **Blockierpuffer**

5 g (1%) Rinderalbumin (BSA)

0.5 ml Tween 20

1 * PBS wurde auf 500 ml adjustiert.

- 1 Liter **Assaypuffer**

5 g (0.5%) Rinderalbumin (BSA)

0.5 ml Tween 20

1 * PBS wurde auf 1000 ml adjustiert.

- **3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) – Substratlösung**
50 µl der Lösung wurden in jedes Nöpfchen übertragen um die Farbreaktion hervorzurufen.
- **3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) – Stopplösung**
50 µl der Lösung wurden in jedes Nöpfchen übertragen um die Farbreaktion zu stoppen.
- **1 Liter ELISA-Farbpuffer**
5.1 g $C_6 H_8 O_7 \cdot H_2O$
9.15 g $Na_2 HPO_4 \cdot 2H_2O$
Destilliertes Wasser wurde auf 1 Liter aufgefüllt.
- **Für eine Platte: ELISA Reaktionspuffer mit Phenylendiamin**
6 mg Phenylendiamin
15 ml Farbpuffer
6 µl (30%) H_2O_2 kurz vor dem Pipettieren hinzufügen
100 µl in jedes Nöpfchen pipettieren
- **Stopplösung für Reaktionspuffer**
50 µl 8N $H_2 SO_4$ wurden schnellstmöglich in jedes Nöpfchen pipettiert, um die Reaktion zu stoppen.

Während der Etablierungsphasen wurde ein IL-18 Kit von der Firma Bender MedSystems® bestellt, welches folgende Reagenzien beinhaltete (siehe erste Diplomarbeit [1]):

- Für 10 Assays: **Standard Protein (S)**: BMS267/2MSTS
- **Primärer Antikörper (CA)**: BMS267/2MSTCA
- **Verdünnungslösung (SD)**: BMS267/2MSTSD
- **Biotin-Konjugat (BK)**: BMS267/2MSTBK
- **Streptavidin-HRP (PK)**: BMS267/2MSTPK

Die ELISA-Platten wurden über Synergy HT BIO-TEC® ausgewertet und die OD-Werte mittels Microsoft Excel statistisch ausgewertet.

5.2 Methoden

5.2.1 Etablierungsversuche von IL-18 ELISAs

In den Etablierungsversuchen wurden kommerziell erwerbliche Antigene und Antikörper bestellt um zunächst mit den Direkten ELISAs und in weiterer Folge mit Sandwich ELISAs zu arbeiten. Ein IL-18 ELISA Kit wurde ebenfalls verwendet. Folgende Tabellen (**Tabelle 1** und **2**) zeigen die verwendeten Produkte und Firmen [1]:

Rekombinantes Protein (Everest Biotech) IL-18	Anti-IL-18 (Everest Biotech) Polyklonaler Antikörper (Ziege)	IL-18 Modul Set (<i>Bender MedSystems®</i>) siehe Tabelle 2
Katalognummer EBP09393	Katalognummer EB09393	
Konzentration 100 µg trockenes Peptid	Konzentration 0.5 µg/µl	
Aminosäuresequenz C-NPPDNIKDTKSDI	Aminosäuresequenz C-NPPDNIKDTKSDI	

Tabelle 1: Übersicht zu den verwendeten IL-18 Antigenen und Antikörpern

Da die Versuche mit dem Direkten ELISA bei IL-18 zu nicht besonders signifikanten Ergebnissen führten, bestellten wir einen fertigen Kit von der Firma *Bender MedSystems®* welches folgende Reagenzien beinhaltet:

Standard Protein (S) IL-18	Primärer Antikörper (CA) Monoklonaler Antikörper (Mensch)	Biotin-Konjugat (BK) Monoklonaler Antikörper (Mensch)	Streptavidin-HRP (PK)
Konzentration 100 ng/ml Gefriergetrocknetes Protein	Konzentration Fläschchen (1.1 ml) 100 µg/ml	Konzentration Fläschchen 55 µl	Konzentration 22 µl

Tabelle 2: Übersicht zum IL-18 ELISA Kit (Modul Set) von der Firma *Bender MedSystems®*

Nachfolgend ist die Liste mit den verwendeten Reagenzien zur IL-18 ELISA Versuchsreihe [1]:

- a) Rekombinantes Protein (siehe Katalognummer: EBP09393)
- b) IL-18 Antikörper Ziege (siehe Katalognummer: EB09393)
- c) IL-18 Standard Protein (siehe Kit)
- d) Primärer Antikörper (siehe Kit)
- e) Anti-pyruvat Oxidase (POX) Antikörper Ziege
- f) Biotin Konjugat (siehe Kit)
- g) Streptavidin-HRP (siehe Kit)
- h) Blutserum Verdünnungen
- i) Assaypuffer
- j) Blockierpuffer
- k) Karbonatpuffer
- l) 1 * Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- m) 0.2% Phosphatgepufferte Salzlösung + Tween 20 (PBST)
- n) Waschpuffer
- o) ELISA Reaktionspuffer mit Phenylendiamin
- p) 8N H₂ SO₄
- q) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) – Substratlösung
- r) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) – Stoplösung

Das folgende Testprotokoll beschreibt die Versuchsanordnung für die Etablierungen von Direkten IL-18 ELISAs sowie auch Beschreibungen zum Modul Set (Kit) von *Bender MedSystems®*.

- Nachdem das rekombinante IL-18 Protein geliefert wurde, teilten wir es in kleinere Röhrchen zur Portionierung auf und frierten diese bei -80 °C ein um ein unnötiges Auftauen großer Mengen zu vermeiden.

Um eine optimale Standardverdünnungsreihe zu erzielen, verdünnten wir die Stammlösung. Die Verdünnungsreihe des Proteins lag zwischen 250 ng/ml und 0.07 ng/ml.

Bevor wir die geometrische Verdünnungsreihe etablierten, wurde das IL-18 meist in Karbonatpuffer oder 1 * PBS gemischt. Pro Näpfchen wurden 100 µl pipettiert. Als Negativkontrolle wurden die betreffenden Näpfchen nur mit jeweils Assaypuffer bzw. 1 * PBS gefüllt.

- Um mit den Ergebnissen sensitiver zu werden, wurde auf das Sandwich ELISA System umgestellt. Hierbei wurde ein Modul Set (Kit) von *Bender MedSystems®* bestellt und angewandt. Nachdem die Lieferung eintraf, wurden die Reagenzien wieder in Fläschchen aliquotiert und bei -20 °C gefroren aufbewahrt. Die meisten Reagenzien die für diese ELISA Versuche nötig waren wurden in dem Kit beigelegt. Ein paar Puffer konnten wir unabhängig herstellen.
- Üblicherweise wurde der Primäre Antikörper (CA) 1:250 in 1 * PBS verdünnt. 100 µl wurden in jedes Näpfchen pipettiert. Anschließend wurde eine Klebefolie über die ELISA Platten gezogen und über Nacht bei 2 °C belassen.

- Am nächsten Tag wurden die Platten mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Um Reste des Waschpuffers zu entfernen, wurden die Platten leicht mehrmals auf ein Papiertuch geklopft. In jedes Nöpfchen wurde 250 µl Blockierpuffer pipettiert und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Weitere 2 Mal wurden die Waschgänge durchgeführt.

- Als die humanen Serumproben zum Einsatz kamen, wurde eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:500 als Optimum befunden. Die Sera wurden in der Verdünnungslösung (SD) von *Bender MedSystems®* verdünnt. 100 µl der Lösung mit Sera wurden in jedes Nöpfchen gefüllt und über Nacht bei 2 °C belassen. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten wieder 4 Mal gewaschen. 250 µl Blockierpuffer wurden in die Nöpfchen übertragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur belassen.

- Das Biotin Konjugat (BK) von *Bender MedSystems®* wurde in Assaypuffer verdünnt. Die Verdünnung reichte von 1:500 bis 1:32000. Weiters wurden 50 µl in jedes Nöpfchen pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur belassen. 6 Waschdurchgänge wurden durchgeführt.

- Anti-pyruvat Oxidase (POX) Antikörper Ziege bzw. Streptavidin-HRP wurde in Assaypuffer vorbereitet. Der Verdünnungsfaktor war 1:4000 oder 1:5000. 100 µl wurden davon in jedes Nöpfchen pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur belassen. 6 Waschdurchgänge wurden durchgeführt.

Es wurden folgende zwei unterschiedliche Methoden zur Visualisierung der Enzymreaktion verwendet:

- 1) Ein ELISA Reaktionspuffer mit Phenylendiamin (siehe *Material und Methoden – verwendete Reagenzien*) wurde vorbereitet. 100 µl der Lösung wurden rasch in jedes Nöpfchen pipettiert und bei Raumtemperatur für ca. 10 min belassen. Danach wurden 50 µl 8N H₂ SO₄ beigemischt um die Farbreaktion zu beenden. Mit dem ELISA plate reader konnte die Farbintensität bei 490 nm und 630 nm abgelesen werden.

- 2) Alternativ zur vorherigen Vorgehensweise wurde auch TMB Substrat verwendet. 6 Waschdurchgänge folgten und 50 µl TMB-Substratlösung wurden rasch in jedes Nöpfchen pipettiert und bei Raumtemperatur für ca. 10 min belassen. Direkte Lichteinstrahlung wurde vermieden um die Reaktion nicht fälschlich zu beeinflussen. Danach wurden 50 µl TMB-Stopplösung beigemischt um die Enzymreaktion zu beenden. Mit dem ELISA plate reader konnte die Farbintensität bei 450 nm abgelesen werden.

5.2.2 Blutproben

Da bei einer Resektion von Adenokarzinomen viel Gewebematerial anfällt, können Chirurgen, Biochemiker, Molekularbiologen etc. aus dem Material verschiedenste Informationen erhalten und eventuell neue Krebsmarker identifizieren. Aufgrund der reichlich vorhandenen Gewebeproben wurde diese Studie gestartet.

Die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission unter der Nummer (Proposal EK no. 395/2005) genehmigt. Durch die Kooperation mit unserem klinischen Partner wurden 20 Blutproben aus PatientInnen, die unter einem Lungenadenokarzinom litten, abgenommen. Die Proben wurden frisch zu uns geliefert und umgehend bearbeitet. Zuvor wurden die Proben durch die Kliniker nummeriert und dokumentiert bevor sie bei uns eintrafen. Vor der Blutabnahme erhielt kein/e PatientIn eine pharmakologische Behandlung, Anästhesie oder operativen Eingriff.

20 Blutproben wurden von einer gesunden Kontrollgruppe entnommen um potentielle Unterschiede zu den PatientInnen zu erforschen. Die PatientInnen, welche zur Blutgewinnung teilnahmen, gaben vorher eine schriftliche Einverständniserklärung ab um den ethischen Anforderungen gerecht zu werden. Es wurde ca. 5-10 ml venöses Blut entnommen und sofort mit **1:10** mit dem Proteaseinhibitor Trasylol verdünnt, um die Fibrinolyse zu hemmen. Die Röhrrchen wurden durch den klinischen Partner nummeriert. Zusatzinformationen über Alter, Geschlecht und Tumorstadium können in **Tabelle 3** eingesehen werden. Im Labor wurden die Blutproben koaguliert und für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das reine Serum wurde in frische Röhrrchen transferiert und bei 4 °C gelagert.

5.2.3 Statistische Datenauswertung

Die optische Dichte (OD-value) wurde mittels Microsoft Excel Version 2003 ausgewertet. Der Mittelwert und Standardabweichung wurden errechnet. Die Signifikanz zwischen den beiden Gruppenunterschieden wurde mit dem t-Test ermittelt. Ein P-Wert von < 0.05 gilt als biologisch signifikant.

6. Ergebnisse

6.1 Patientenübersichtstabelle

In nachfolgender Tabelle (**Tabelle 3**) können jene Personen eingesehen werden, die in unseren ELISA Versuchen verwendet wurden. Bei den Krebspatienten waren 14 weiblich und 4 männlich. Nachträglich wurden allerdings 2 Personen aus der Liste entfernt, da **P8** später als ein Plattenepithelkarzinom identifiziert wurde. **P 14** wurde exkludiert, da die Pathologen doch kein Lungenadenokarzinom feststellen konnten. Das Durchschnittsalter der PatientInnen betrug **60.3** Jahre. Die gesunde Kontrollgruppe bestand aus 15 Frauen und 5 Männern. Das Durchschnittsalter dieser betrug **33.45** Jahre. In der Patiententabelle ist das Tumorstadium angegeben.

3 Parameter (T,N,G) wurden aufgelistet [1]:

- **T:** Ist die Größe des ursprünglichen Tumors und gibt an, ob umliegendes Gewebe ebenfalls betroffen wurde. Die Einteilung erfolgt in **T0-T4**. **TX** zeigt keinerlei Anzeichen für das Vorhandensein eines Primärtumors.

- **N**: Beschreibt den Grad (**N0-N3**) der Entfernung des Tumors zu regionalen Lymphknoten.
- **G**: Bezeichnet die Abgrenzung bzw. Ausdifferenzierung des tumorösen Gewebes. Unterschieden wird zwischen **G1-G4**. **G1** ist eine noch gute Abgrenzung. **G4** zeigt an, dass das Tumorgewebe pathologisch schon deutlich vom gesunden Gewebe zu unterscheiden ist.

Patienten Nr.	Geschlecht	Alter	Tumorgröße T *	Tumorstadium N #	Tumorgrad G §	Kontrollen Nr.	Geschlecht	Alter
P1	w	58	T2	N2	/	C1	w	22
P2	m	55	T2	N0	/	C2	m	28
P3	w	53	T1	N0	G1	C3	w	38
P4	w	70	T2	N0	G2	C4	w	27
P5	w	71	T1	N2	G1	C5	m	52
P6	w	65	T1	N2	G1	C6	m	31
P7	w	71	T3	N0	G1	C7	w	23
P8	m	72	T3	N0	/	C8	w	27
P9	w	67	T1	N1	G2-3	C9	w	23
P10	w	60	T2	N0	G2	C10	w	23
P11	w	35	TX	N2	G2	C11	w	23
P12	w	70	T4	N2	G1	C12	w	39
P13	w	64	T1	N2	G1	C13	w	42
P14	m	70	TX	N1	-	C14	w	59
P15	m	64	T1	N0	G1	C15	m	53
P16	w	57	T1	N0	G1	C16	w	55
P17	w	49	T2	N0	G3	C17	m	30
P18	m	51	T1	N0	/	C18	w	27
P19	m	51	T1	N0	/	C19	w	23
P20	w	54	T1	N2	/	C20	w	24

Tabelle 3: Tabelle der PatientInnen- und Kontrollgruppe [1]

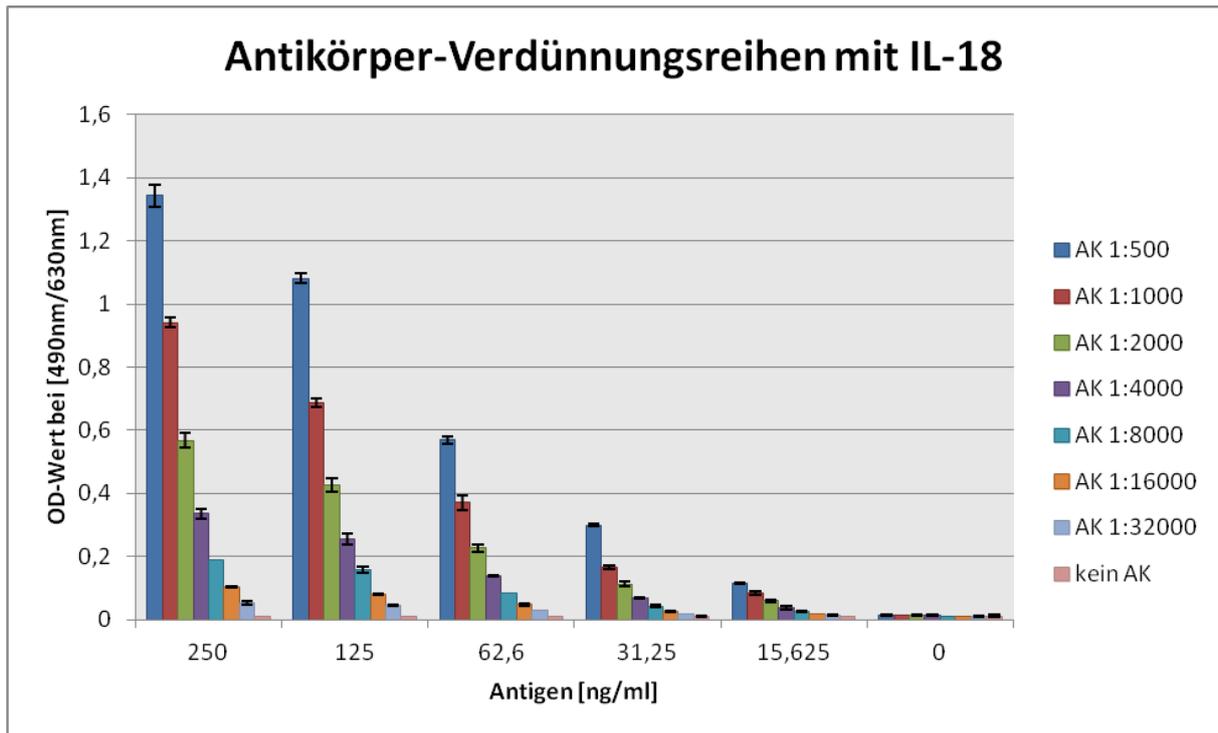
Die Nummerierung der Personen wurde auch so in meinen Experimenten eingesetzt. Stichtag der Alterserhebung war der 31.12.2010.

6.2 Interleukin 18 Versuchsreihen

6.2.1 Versuch mit Direktem ELISA – verschiedene Antikörperverdünnungen

Wir versuchten zu Beginn die optimale Konzentration von Antikörper und rekombinantem Protein für die weitere Verwendung zu ermitteln. Eine schachbrettartige Titrierung der Mengen eignet sich besonders gut um die Verdünnungsreihen in sinnvollerweise einsetzen zu können um ein signifikantes Signal in der quantitativen Analyse beim ELISA zu erzielen. Bei **250 ng/ml** wurde die Antigenverdünnung gestartet und bei **15.6 ng/ml** beendet. Der zunächst verwendete Antikörper von Everest Biotech (siehe Material und Methoden) startete bei einer Verdünnung von **1:500** und darauffolgende **1:1** Verdünnungen wurden hergestellt. Der Sekundäre Antikörper (POX) wurde **1:4000** verdünnt.

Aus der Grafik (siehe **Grafik 3**) kann abgelesen werden, dass eine optimale Antigenkonzentration zwischen **250 ng/ml** und **125 ng/ml**, bei einer Antikörperverdünnung von **1:500 – 1:1000**. Alle anderen Werte waren zu niedrig um sie für weitere Experimente anzuwenden. Die Negativkontrolle - welche nur Pufferlösung enthielt - zeigte deutlich, dass keine Störfaktoren den Bindungsprozess von Antigen oder Antikörper beeinflussten.

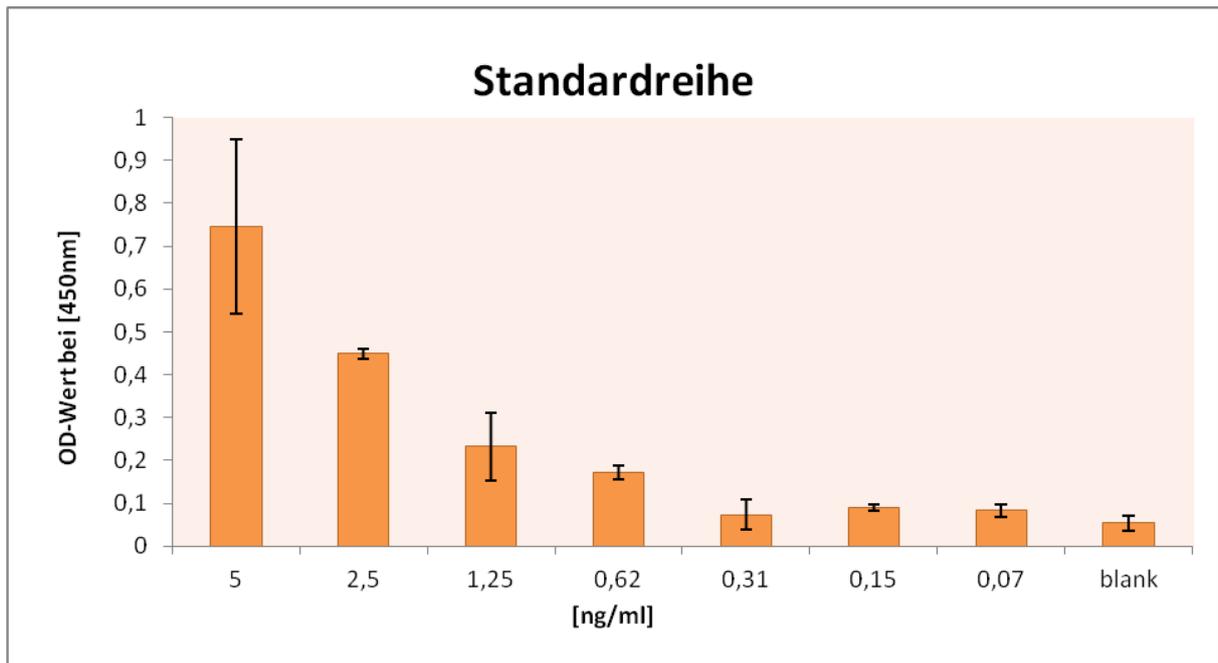


Grafik 3: Verdünnungsreihe der Antikörper mit IL-18 [1]

In der Grafik können die verschiedenen Antikörper- und Antigenverdünnungsreihen gut abgelesen werden, um die optimale Konzentration dieser im ELISA zu detektieren.

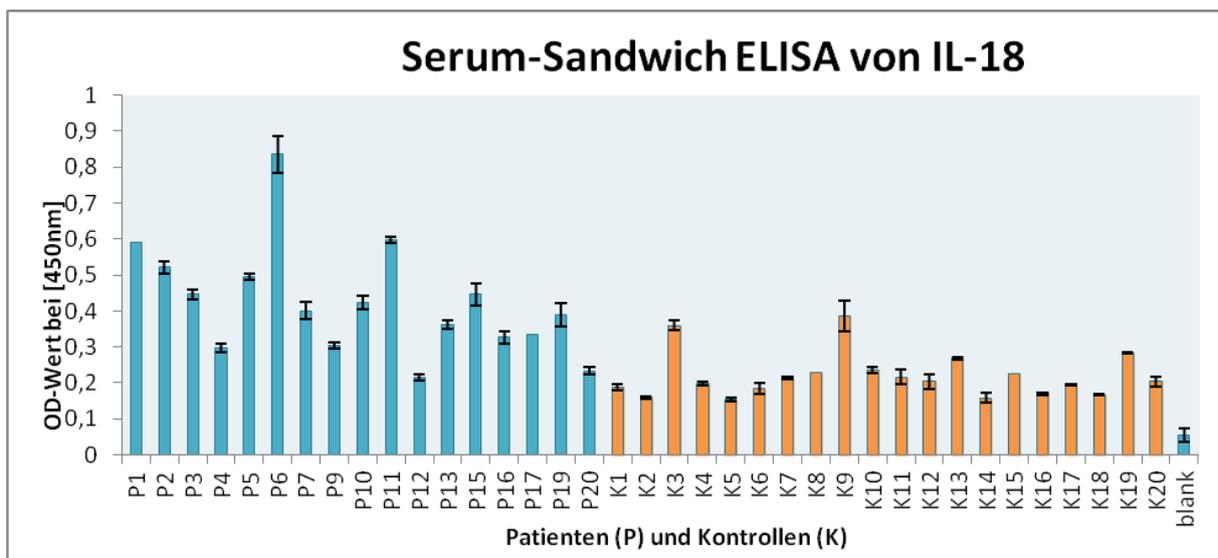
6.2.2 IL-18 Versuch mit *Bender MedSystems®* Modul Set und Serumproben [1]

Im konkreten Sandwich ELISA Versuch mit allen Serumproben hielten wir uns an das vom Hersteller vorgeschlagene Testregime und verwendeten alle Reagenzien des Modul Sets. Die Verdünnungsreihe der Standardkurve (siehe **Grafik 4**) startete bei **5 ng/ml** und endete bei **0.07 ng/ml**. Die Seraverdünnung von **1:2** erschien uns nach wie vor passend, nachdem hier die besten OD-Werte erzielt werden konnten. Die Positivkontrolle zeigte einen kontinuierlichen Verlauf und funktionierte somit tadellos. Die Negativkontrolle - welche nur Pufferlösung enthielt - zeigte deutlich, dass keine Störfaktoren den Ablauf beeinflussten.



Grafik 4: Standardreihe mit IL-18 [1]

Die Grafik zeigt einen optimalen Verlauf. Die Negativkontrolle enthielt nur Puffer. Die Standardreihen-Verdünnung wurde auf der selben ELISA Platte neben den Sera pipettiert.

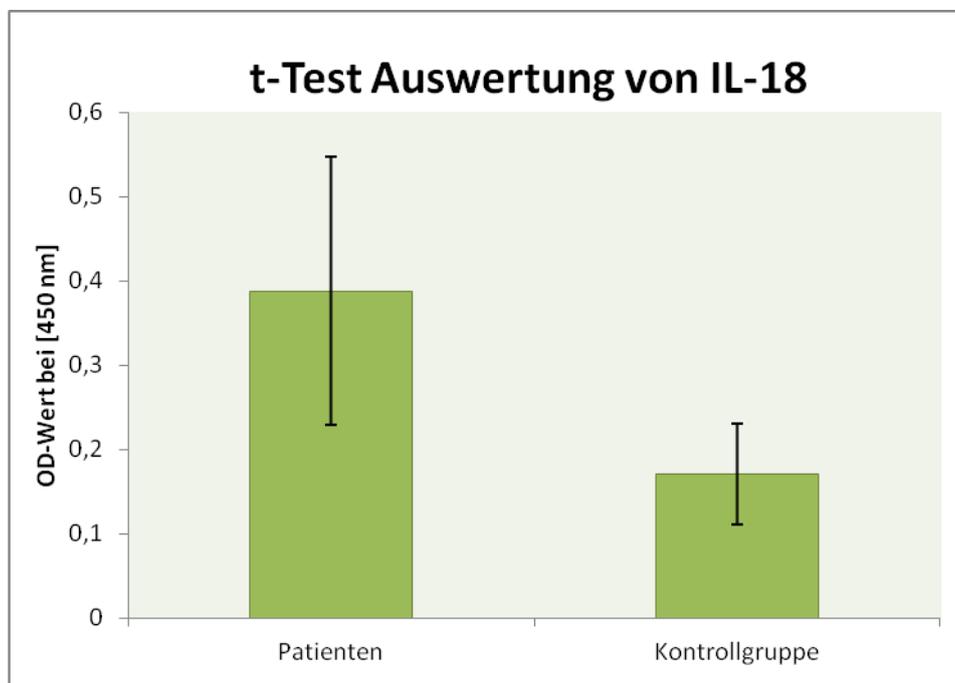


Grafik 5: Sandwich ELISA mit allen Serumproben [1]

Die Grafik zeigt die Patientensera (P) und die Kontrollgruppe (K) auf einer ELISA Platte. Der "blank" diente dabei als Negativkontrolle und enthielt nur Pufferlösung.

In der **Grafik 5** ersichtlich, zeigt es die Ergebnisse des Sandwich ELISA mit dem Modul Set von den Patienten und der Kontrollgruppe. Die Negativkontrolle funktionierte einwandfrei durch ihr niedriges Level.

Weiters, wurde eine t-Test Analyse durchgeführt, um die Statistik zwischen den Patienten und Kontrollen exakter darzustellen. **Grafik 6** zeigt den durchschnittlichen OD-Wert der beiden Gruppen. Der korrespondierende p-Wert lag bei **0.000047**. In der Abbildung ersichtlich, sind die IL-18 Werte bei den PatientInnen signifikant erhöht, im Gegensatz zu der gesunden Kontrollgruppe. Basierend auf dieser Tatsache, kann angenommen werden, dass IL-18 ein potentieller Kandidat für Biomarker sein könnte.



Grafik 6: t-Test Analyse mit Patienten und Kontrollen [1]

Die durchschnittlichen IL-18-Werte waren bei den Patientensera signifikant erhöht.

7. Zusammenfassung und Fazit

Bereits in der vorigen Diplomarbeit [1] wurden 4 potentielle Biomarker auf ihre mögliche Fähigkeit zur Früherkennung von Bronchialkarzinomen hin getestet. Jene Marker wurden aus vorangegangener chirurgischer Resektion ermittelt, da sie eine möglicherweise hohe Präsenz in humanem Serum haben könnten, wenn sie von PatientInnen mit Lungenkrebs stammten. In Analysen konnte nur das Interleukin 18 als signifikant erhöht identifiziert werden, daher wurden die Ergebnisse dieses Markers eingehender in der vorliegenden Arbeit dargestellt und präsentiert.

7.1 Tumormarker im Serum

Tatsache ist, dass eine Früherkennung und somit auch schnellere Behandlung bei Lungenadenokarzinomen die Todesrate stark reduziert werden könnte. Lungenröntgen, Screenings und Bronchialnadelbiopsien haben ihre praktischen Grenzen. Die Entwicklung von schnellen, zuverlässigen und nicht-invasiven Methoden zur Tumormarker-Früherkennung würde einen großen Fortschritt auf dem Gebiet bedeuten. Aus den Ergebnissen der ersten Diplomarbeit konnte nur IL-18 als möglicher prognostischer Marker identifiziert werden. Die Ergebnisse wurden hier zusammengefasst und eingehend dargestellt.

7.2 ELISA Verfahren mittels *Bender MedSystems®* IL-18 Modul Set

Der ELISA ist eine der bekanntesten und effizientesten Methoden Proteine in biologischen Fluiden für klinische Analysen zu verwenden. Die Methode beruht auf dem einfachen Prinzip der spezifischen Bindungsvorgänge zwischen dem Antigen und dem dazugehörigen Antikörper. Die anschließende kolorimetrische Erkennung zur Auswertung gibt Aufschluss über eine direkte Korrelation der OD-Werte in einem Spektralphotometer der Konzentration der gebundenen Antigene. Die Sensibilität dieser Methode kann sehr hoch sein. Der ELISA ist eine relativ günstige Methode, sowie schnell in der Durchführung. Weiters sind auch keine vorhergehenden Trennungsverfahren der biologischen Substanzen notwendig. Es können auch viele verschiedene Antigene in einem Ansatz detektiert werden, was sich als sehr praktisch für schnelle und diverseste Analysen im Laboralltag erweist. Um den möglicherweise raschen Abbau von Plasma- bzw. Serumproteinen entgegenzuwirken, fügten wir den

Proteasehemmer Trasylol hinzu, um den Prozess der Fibrinolyse und den Proteinabbau zu verhindern [19]. Während unserer Arbeitsphase bemerkten wir keinerlei Instabilität bei den Signalwerten, was darauf schließen lässt, dass keine Abschwächung unserer Ergebnisse auftrat. Auf Grund dessen kann angenommen werden, dass unser ELISA eine robuste Methode ist, wenn größere Mengen an Blutproben aus der täglichen Routine dafür verwendet werden.

Die Verwendung des Modul Sets von *Bender MedSystems®* war eine ausgesprochen hilfreiche Methode um schnell zuverlässige und positive Testergebnisse für IL-18 in den Patientensera zu detektieren. Wohlwissend, dass die Cytokinkonzentration in Körperflüssigkeiten eine relativ kurze Halbwertszeit haben, können Cytokinmessungen im Plasma bzw. Serum sehr sensibel sein. Besonders dann, wenn sie über einen längeren Zeitraum gelagert wurden. Bei unseren IL-18 ELISAs wurde keine Unbeständigkeit in den Signalen beobachtet. Alle Proben wurden gleich behandelt und über einen gleichen Zeitraum gelagert.

7.3 Bewertung der Ergebnisse

Anzumerken ist, dass es sich bei diesen Ergebnissen natürlich nur um eine Momentaufnahme der IL-18 Levels im humanen Serum handelt. Daraus kann nicht direkt auf die zelluläre Ebene geschlossen werden. Deshalb ist der Ausgangspunkt zur Bildung von IL-18 nicht ganz geklärt. Es könnte möglicherweise auf eine starke Entzündungsreaktion des Immunsystems auf den Tumor zurückzuführen sein, oder ein Entzündungsprozess vom Tumor selbst, wenn er versucht Krebszellen zu regulieren. Interessanterweise weist unsere IL-18 Studie einen signifikant erhöhten Level von IL-18 in Sera von Patientinnen und Patienten mit Lungenkrebs auf. Es muss in unserer

Untersuchung auch unbedingt hingewiesen werden, dass es größere Altersunterschiede zwischen den PatientInnensera und den Kontrollsera zum Zeitpunkt der Abnahme gegeben hat. Das Durchschnittsalter bei den PatientInnen lag bei 60.3 und bei der Kontrollgruppe bei 33.45 Jahren. Basierend auf aktueller Literatur zu IL-18 gibt es sehr wohl auch einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg von IL-18 im Blut und ansteigendem Alter [20], [21]. Es muss demnach die Möglichkeit diskutiert werden, dass sich bei unseren PatientInnen und Kontrollen aus diesem Grund signifikant höhere IL-18 Werte bei den PatientInnensera ergeben haben, da diese einer höheren Altersklasse angehörten. Ein weiterer Faktor sollte berücksichtigt werden, dass es potentiell auch Unterschiede zwischen Männern und Frauen gibt. Eine Erweiterung der Kontrollkohorte durch ältere Personen, sowie genauere Analysen betreffend Geschlechtsunterschiede, muss zukünftig noch untersucht werden. In einer aktuellen Studie von Harms et al. [22] wurde auch der Zusammenhang von Diabetes Typ 1 (Jugenddiabetes) mit höheren IL-18 Blutwerten beschrieben. Das Blutplasma von Jugendlichen wurde mit einer Kontrollkohorte verglichen. Es konnte herausgefunden werden, dass die IL-18 Werte von DiabetikerInnen signifikant erhöht waren. Zusätzlich fanden die Forscher heraus, dass IL-18 und IL-BP (binding protein) positiv mit den Glykohämoglobin HbA1c Werten der DiabetikerInnen korrelierte. Man folgert daraus, dass es eine potentielle Verbindung zwischen IL-18 und der Stoffwechseleinstellung von PatientInnen mit Diabetes Typ 1 gibt. Schließlich beobachteten Harms et al. eine signifikante Zunahme der IL-18 Proteinexpression der Typ 1 PatientInnen innerhalb der Langerhans'schen Inselzellen der Bauchspeicheldrüse. Diese Ergebnisse könnten weiter Aufschluss über die Rolle von IL-18 in Typ 1 sowie Typ 2 DiabetikerInnen geben [22]. Auch andere Studien belegen den Zusammenhang von erhöhten IL-18 Expressionen bei Vorliegen der Typ 2 Diabetes mellitus Erkrankung [23], [24], [25].

Weiters zu berücksichtigen sind Studien, die belegen dass bei Adenomyose (Unterform der Gebärmuttererkrankung Endometriose) [26], Hashimoto Thyreoiditis [27], sowie Alzheimer-Krankheit [28] ebenfalls eine Überexpression von IL-18 zu beobachten ist. Auch wird IL-18 mit Übergewicht [18], [29], [30], [31], [32], Insulinresistenz (siehe Diabetes) [23], [33], Bluthochdruck [34], Fettstoffwechselstörungen [29],[31], sowie dem metabolischen Syndrom [35] in Zusammenhang gebracht [18].

Zusätzlich versuchten wir einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen und den klinischen Parametern herzustellen und aufzuzeigen. Überraschenderweise entdeckten wir sehr hohe OD-Werte bei den Sera **P1**, **P6** und **P11**. Der Tumor selbst zeigte eine unterschiedliche Größenausprägung, aber alle 3 hatten einen **N2** Status. Eine vorsichtige Interpretation dieses Sachverhaltes wäre, dass die IL-18 Konzentrationen dann höher sind, wenn die Patientinnen und Patienten bereits eine fortgeschrittene Metastasierung in den Lymphknoten haben.

Selbstverständlich sollten noch weitere Testreihen durchgeführt werden, um zu klären ob diese beobachtete Erscheinung den Vermutungen entspricht oder nicht.

Es ist sinnvoll unser optimiertes Testprotokoll mit einer größeren Kohorte von PatientInnen durchzuführen, um noch signifikantere Resultate zu erlangen. Falls es möglich wird, den Tumorstatus mit der Menge an Tumormarker im Serum zu korrelieren, können die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit sowie der ersten Diplomarbeit [1] als Ausgangslage herangezogen werden. Es gibt eine ganze Reihe an Tumormarkern, die das Potential haben, eine geeignete Früherkennung bei Lungenkrebs zu zeigen. IL-18 ist eine gute Basis für weitere Studien in diesem Zusammenhang.

8. Lehramtsspezifischer Hintergrund zum Thema Rauchen und Suchtprävention

In diesem Abschnitt der Diplomarbeit soll nach dem 1. Teil über die Grundlagenforschung zu Lungenkrebs, noch zusätzlich auf schulische bzw. lehramtsspezifische Inhalte ausgeweitet und eingegangen werden. Wie bereits eingangs erwähnt, ist Lungenkrebs eine weit verbreitete Krankheit und eine der Haupttodesursachen in der heutigen Gesellschaft [2]. Die Prognosen einer italienischen Studie von Malvezzi et al. besagt, dass in ein paar Jahren der Lungenkrebs zumindest bei Frauen an erste Stelle der Todesursachen rücken wird. Sogar vor Brustkrebs [36]!

Tabakkonsum wird als weltweit größter Risikofaktor für Krebs angegeben. In „*Tobacco Control Country Profile (2nd Edition)*“ nachzulesen, ist in den USA der Konsum für 30% der 15 durch Krebs verursachten Todesfälle verantwortlich, bei Männern und Frauen gleichermaßen [38-39]. Studien, die Lungenkrebs und andere Krebsarten vergleichen, lassen vermuten, dass der Anteil an tabakassoziierten Karzinomen bei Männern in Österreich und Deutschland doppelt so hoch ist [40].

Der Hauptinhaltsstoff von Zigaretten ist Nikotin, welches durch Inhalation sehr schnell über die Lunge aufgenommen wird und einen Konzentrationsanstieg im Gehirn innerhalb weniger Sekunden bewirkt. Die Wirkung ist mit einer intravenösen Applikation vergleichbar. Das nun im Blutkreislauf befindliche Nikotin wirkt an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) im Gehirn und der Peripherie [41]. Nikotin bewirkt im Gehirn die Ausschüttung diverser Neurotransmitter wie z.B.: Glutamat, GABA, Acetylcholin, Noradrenalin und Dopamin [42], [41], [38].

Zigarettenkonsum ist allerdings nicht nur mit verschiedenen Lungenkrebsarten zu assoziieren, sondern stellt auch einen bedeutenden Einflussfaktor bei der Entste-

hung von anderen bösartigen Krebserkrankungen dar [43], [44]. (In **Tabelle 4** ersichtlich).

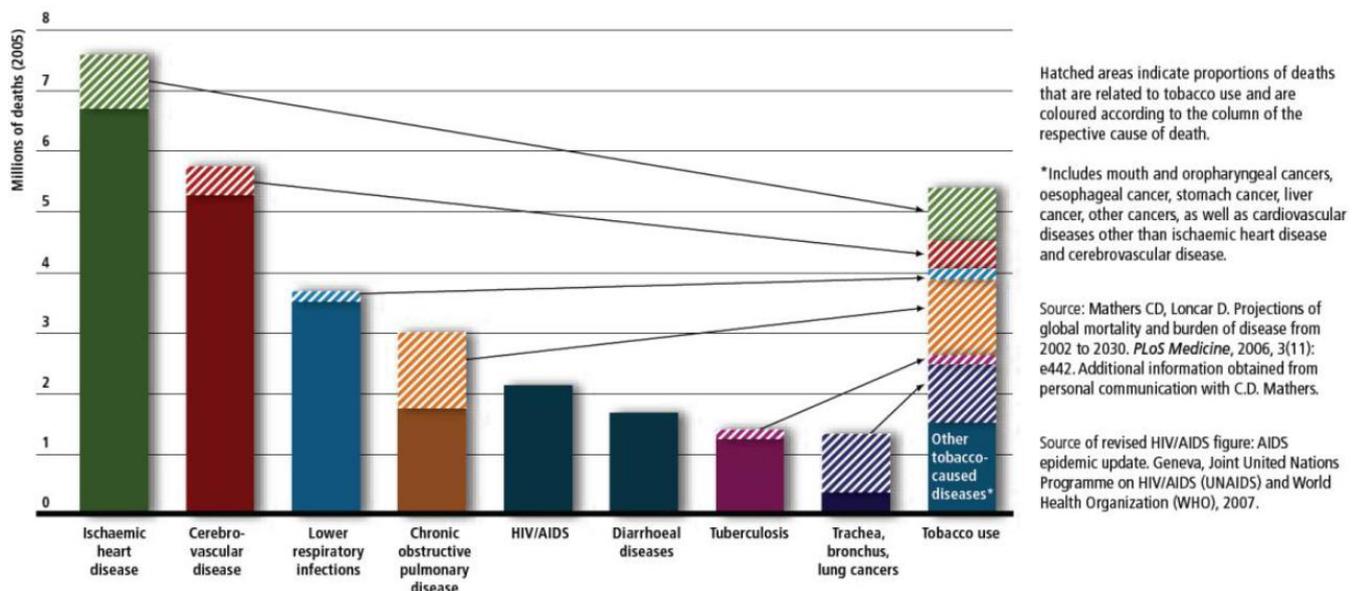
Zielorgan	Relatives Risiko (RR) bei Rauchern	Attributables Risiko	
		Männer	Frauen
Lunge	20 (Männer) 15 (Frauen)	85%	45%
Kehlkopf	10	65%	30%
Mundhöhle und Pharynx	5	40%	10%
Speiseröhre	5	45%	10%
Harnblase	3	35%	15%
Niere	2	40%	5%
Pankreas	2	30%	10%
Leber	2-3		
Magen	2-3		
Cervix uteri	2		
Nasenhaupt-, -nebenhöhle	2-3		

Tabelle 4: Tabelle mit assoziierten malignen Krebserkrankungen aufgrund von Tabakrauch [43], [44].

Die Tabelle zeigt das relative Risiko (RR) von RaucherInnen, an einem bösartigen Tumor zu erkranken.

Herold et al. haben den Zusammenhang von Dauer und Ausmaß des Zigarettenkonsums, welche maßgeblich das Lungenkrebsrisiko bestimmen folgendermaßen dargestellt: „Entscheidend für die Höhe des Krebsrisikos sind die Packungsjahre (= Zahl der täglich gerauchten Packungen * Raucherjahre) = „pack years“ (py). 40 py → 10-faches Krebsrisiko. Bis 30-faches Risiko bei Raucherbeginn im Jugendalter.“ [45].

Eine weitere Grafik (siehe **Grafik 7**) aus einem WHO Report von 2008 zeigt ebenfalls das zusätzliche Risiko für Krankheitsausprägungen aufgrund von Nikotinabusus [46]:



Grafik 7: Risikozuwachs verschiedener Krankheiten durch Tabakkonsum [38], [46].

In der Abbildung ersichtlich sind Balkendiagramme mit jeweils einer schraffierten Komponente. Diese Teile geben an, um welchen Teil sich das Risiko der jeweiligen Krankheit durch den Nikotinkonsum erhöht. Besonders hervorzuheben sind die Zunahmen von Trachea-, Bronchus- und Lungenkrebs sowie COPD.

Rauchen ist allerdings die häufigste vermeidbare Todesursache [47], [38].

Basierend auf der Tatsache, dass allein in Österreich 2011 2.577 Männer und 1.553 Frauen an bösartigen Lungentumoren erkrankten, ist laut Statistik Austria Lungenkrebs damit die zweithäufigste Krebserkrankung bei Männern und die dritthäufigste Krebserkrankung der Frauen [48]. Tabakwaren gehören zu den am häufigsten verwendeten Genussmitteln unserer Zeit und begegnen uns im Alltag, z.B.: Werbung etc. [4]. Besonders Jugendliche, welche sich noch leichter beeinflussen lassen und in ihrem Freundeskreis unter einem gewissen Gruppenzwang stehen, beginnen oft schon sehr früh mit der Konsumation der ersten Zigarette. Viele erwachsene Raucher haben schon eine Jahrzehnte lange Rauchergeschichte hinter sich.

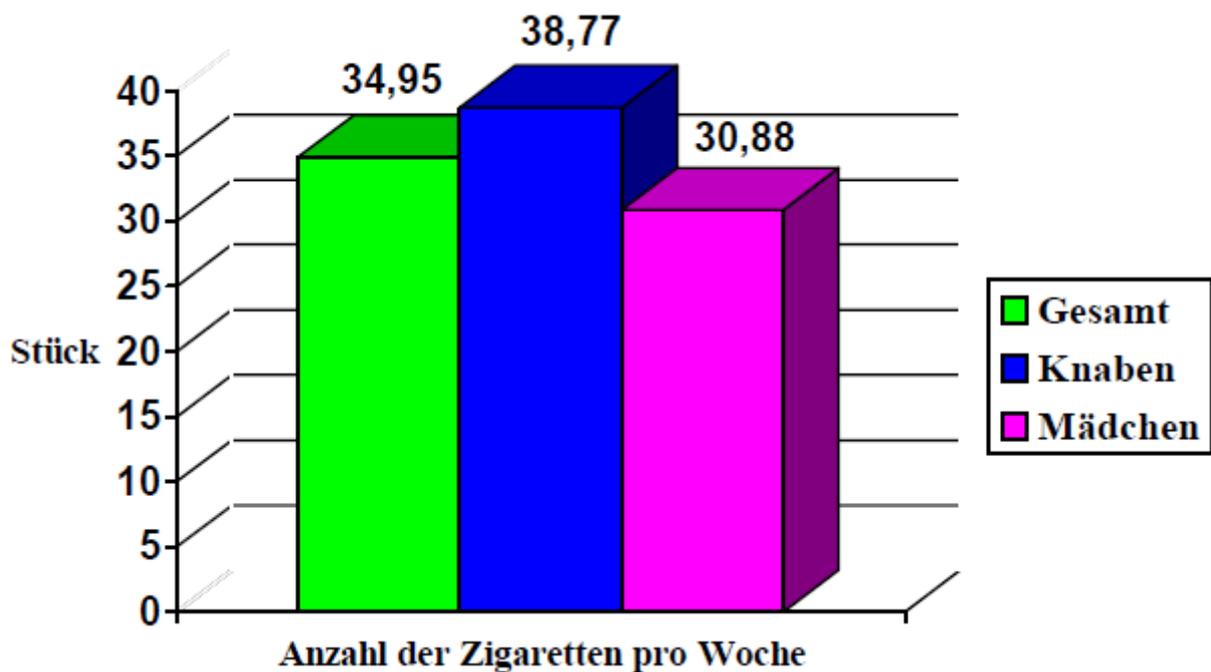
Manuela Hiller hat in ihrer Diplomarbeit [44] das Rauchverhalten sowie die Einstellung dazu von steirischen Jugendlichen unter Berücksichtigung ihres sozialen Umfeldes, Geschlechtszugehörigkeit und der Schulbildung eingehender untersucht.

Mittels Fragebogenanalyse erhob sie 2250 Daten von steirischen Jugendlichen im Alter von 10-17 Jahren zu ihrem Rauchverhalten, sowie allgemein zum Thema Rauchen. 15,6% der jeweils 1118 Probanden und 1118 Probandinnen gaben an, derzeit zu rauchen. Hillers Studie kam weiters zu dem Schluss, dass der erste Probierversuch durchschnittlich mit 10,77 +- 2,5 Jahren durchgeführt wird.

Jugendliche, die einen ersten Rauchversuch hinter sich hatten lagen bei 55,4%. 61,1% setzten daraufhin das Rauchen fort. Ein Probierversuch soll deshalb laut Hiller nicht unterschätzt werden. Auch das soziale Umfeld wurde eingehender auf den Zusammenhang mit dem Rauchverhalten untersucht. Insgesamt kann gesagt werden, dass etwa doppelt so viele SchülerInnen aus Raucherfamilien Zigaretten konsumieren.

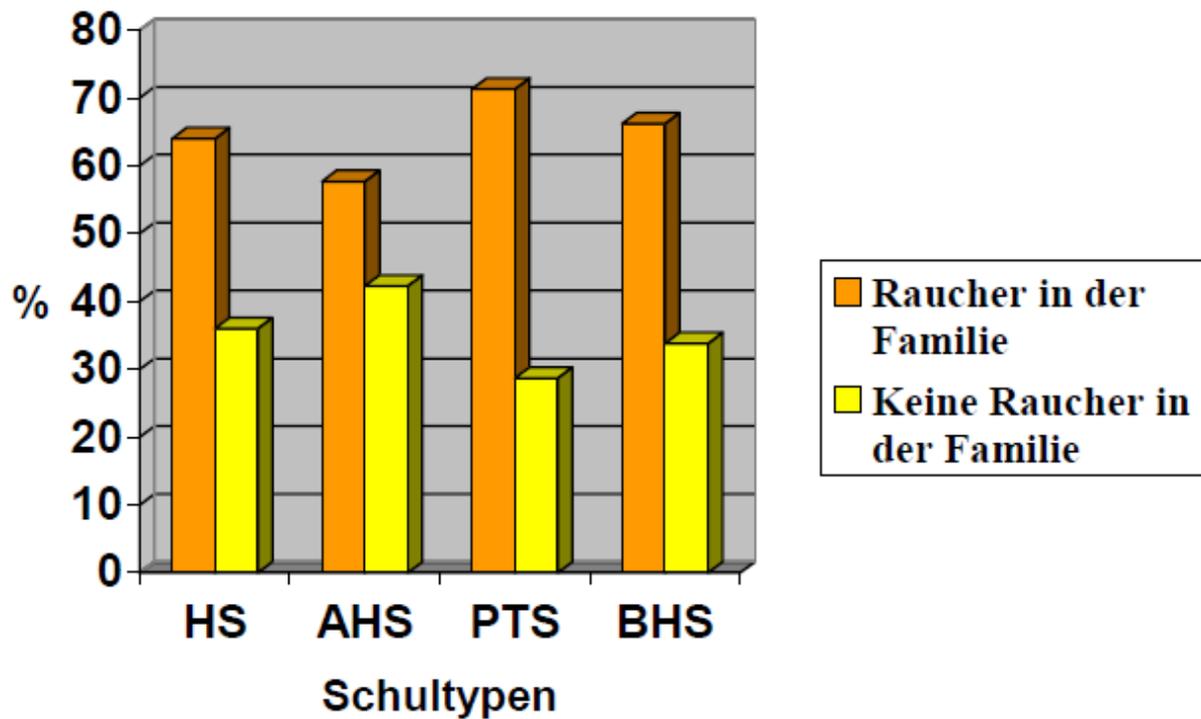
Eine besondere Stellung kommt auch neben dem familiären sozialen Umfeld (siehe **Grafik 9**), der besuchte Schultyp zu (siehe **Grafik 10**). Polytechnische Schulen (PTS)

mit 42,0% und Berufsbildende Hauptschulen (BHS) mit 57,4% weisen somit den größten Raucheranteil unter Jugendlichen auf. Die SchülerInnen dieser Schultypen beginnen am frühesten zu rauchen und weisen durchschnittlich den höchsten Konsum an Zigaretten pro Woche auf (siehe **Grafik 8**) [44].



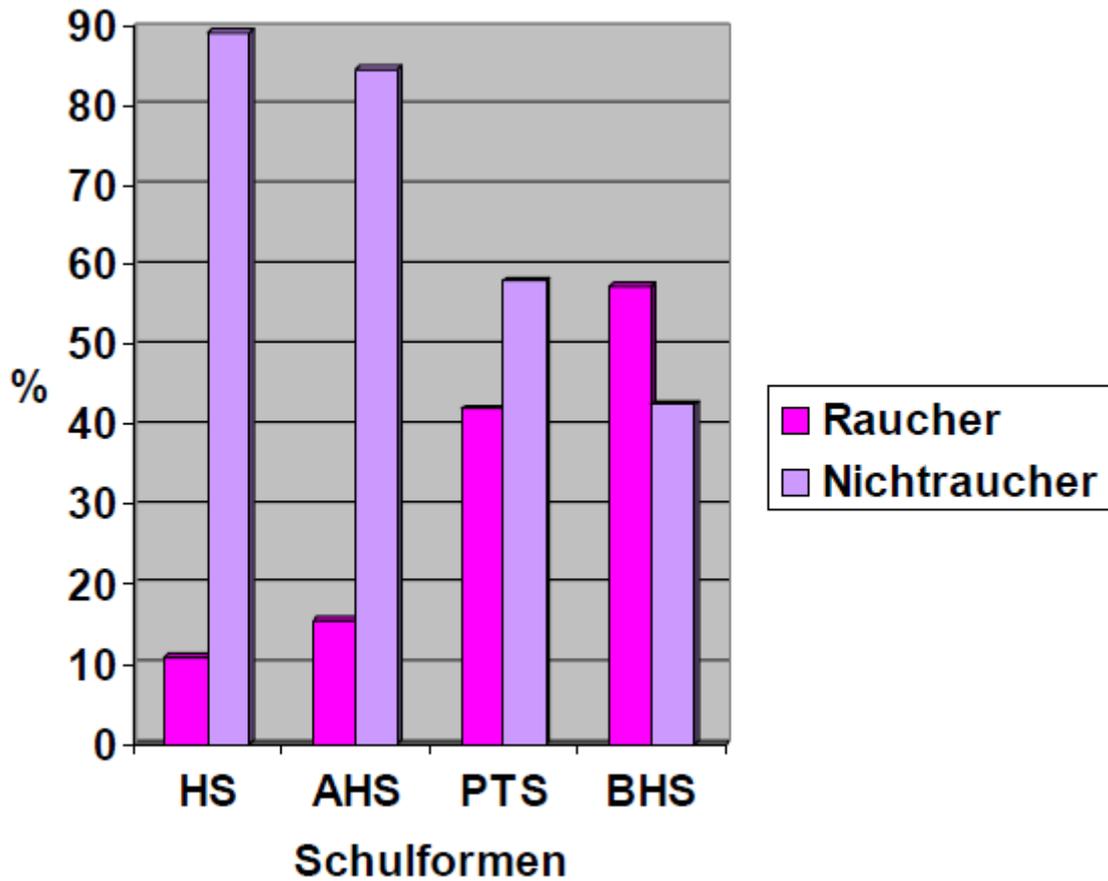
Grafik 8: Balkendiagramm zur Darstellung der Zigarettenanzahl pro Woche bei Mädchen, Knaben und Gesamtanteil [44].

Die gerauchte Menge an Zigaretten der Schülerinnen und Schüler beträgt im Durchschnitt 34,95 Stück. Laut Hillers Ergebnissen rauchen Knaben im Mittel 38,77 +- 44,3 Stück/Woche mehr Zigaretten als Mädchen mit einem Durchschnitt von 30,88 +- 51,12 Stück/Woche.



Grafik 9: Grafik zur Korrelation zwischen den verschiedenen Schultypen und RaucherInnen innerhalb der Familie [44].

71,3% aus der PTS bzw. 66,2% aus BHS sind wiederum Spitzenreiter im Vergleich mit SchülerInnen aus HS (64%) und AHS (57,7%). Hiller untersuchte hier welcher Schultyp die höchste Anzahl an SchülerInnen mit tabakkonsumierenden Familienmitgliedern aufwies, unabhängig davon ob die Jugendlichen selbst RaucherInnen waren.



Grafik 10: Grafik zur Korrelation zwischen den verschiedenen Schultypen und Raucheranteil [44].

Wie aus der Grafik ersichtlich, weisen SchülerInnen aus der PTS und BHS einen höheren Prozentsatz an RaucherInnen auf im Vergleich zur AHS und HS. AHS-SchülerInnen zeigen 15,4% und HS-SchülerInnen 10,8% Raucheranteil.

8.1 Lehrpläne für das Unterrichtsfach Biologie und Umweltkunde mit Schwerpunkt Rauchen und Suchverhalten

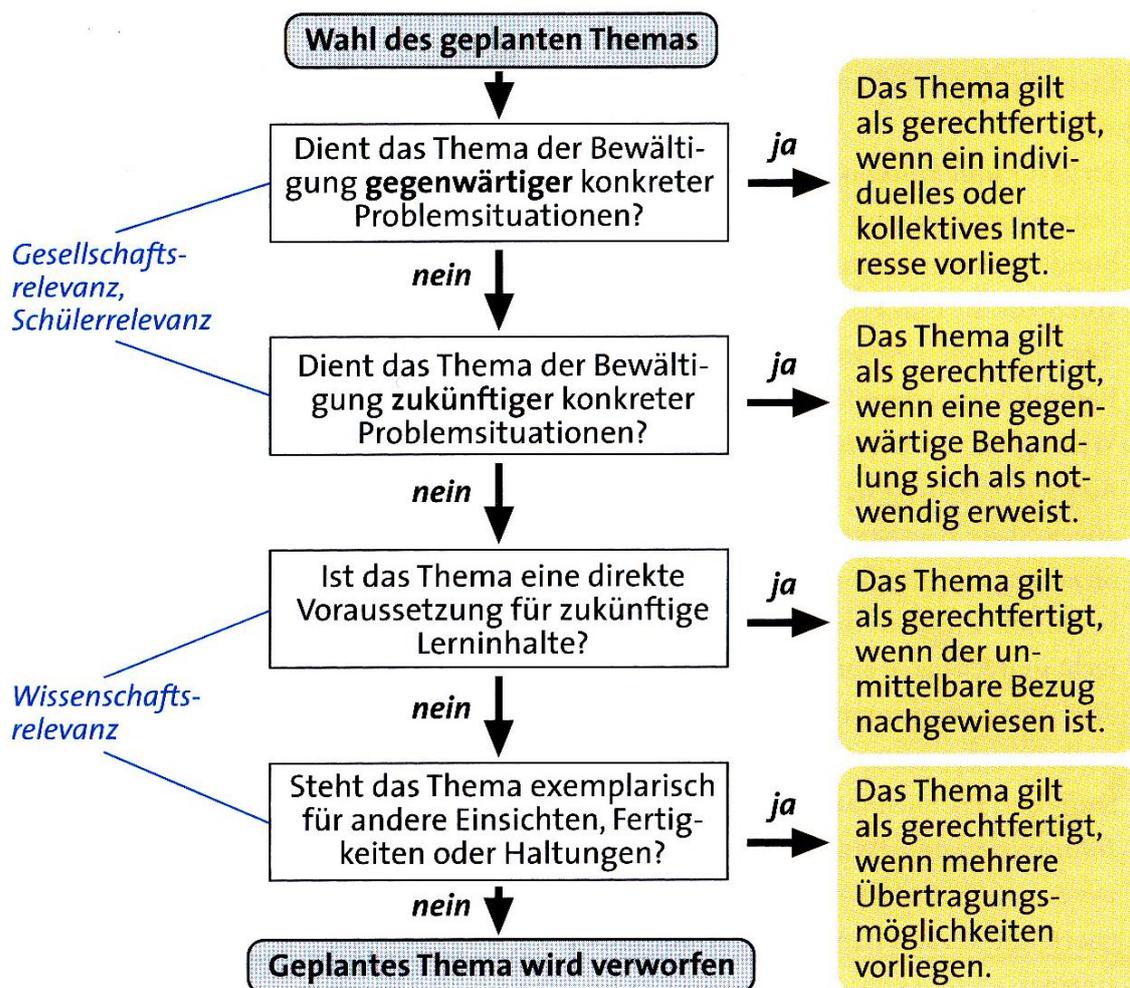
Die Bildungs- und Lehraufgaben für das Fach Biologie- und Umweltkunde sind in einer AHS (Allgemeinbildende höhere Schule) ausgesprochen vielfältig. Laut Bundesministerium für Bildung und Frauen unter dem Punkt "Unterricht und Schule" sind Kernthemen wie "Mensch und Gesundheit" festgelegt, welche den Schülerinnen und Schülern Fragen zu Gesundheit und Lebensstil sowie soziale und ethische Aspekte näher bringen sollen. Eine Förderung des Verständnisses für den eigenen Körper sowie eines umfassenden Gesundheitsbewusstseins soll zum Tragen kommen [49].

Rauchen und Suchtverhalten wird nicht in jeder Schulstufe thematisiert. In der 1. und 4. Klasse Unterstufe sowie 5. und 6. Klasse Oberstufe kommen in einigen Lehrbüchern Unterkapitel zum Thema Rauchen vor. Die Vertiefung und Informationsmenge variiert stark von Schulbuch zu Schulbuch. In der Unterstufe wird Rauchen tendenziell direkt an das Thema "Atmung und Lunge" angeknüpft. In der Oberstufe werden vermehrt Schwerpunkte so gesetzt, sodass sie Gründe für Suchtverhalten erfassen und verschiedene Möglichkeiten zur Suchtprophylaxe, vor allem im Hinblick auf aktuelle Jugenddrogen erarbeiten sollen [50]. Es sollte generell eine erzieherische Aufgabe der Lehrenden sein den Schülerinnen und Schülern nahezubringen, dass Rauchen nicht nur finanziell, sondern auch durch Einbußen an Leistungsfähigkeit und selbstverständlich die Gesundheit extrem belastet. In den Jahren, in denen Jugendliche noch sehr lernfähig und aufnahmebereit sind, könnten Pädagoginnen und Pädagogen als vorbildhafte Beispiele vorgehen und die negativen Auswirkungen auf die RaucherInnen selbst und ihre Umwelt verdeutlichen.

8.2 Didaktische Vorschläge zu Stundengestaltungen

In den nachfolgenden Unterkapiteln sollen zu ausgewählten Schulstufen ein paar Vorschläge zu didaktisch gut aufbereiteten Unterrichtseinheiten dargestellt werden, welche von Pädagoginnen und Pädagogen zum besseren Thematisieren bezüglich Tabakkonsum verwendet werden können. Die Biologiedidaktik ist die "Vermittlungswissenschaft", die sich mit dem Lernen und Lehren von Biologie befasst. Das Vermitteln und Nahebringen dieses Faches an die Lernenden, sowie das In-Beziehung-Bringen des Fachwissens unter Berücksichtigung deren Lebenswelt, all das Teil der Fachdidaktik Biologie [51]. Gropengießer et al. haben in **Grafik 11** eine Hilfestellung zur Themenwahl bereitgestellt, welche eine Rechtfertigung von Unterrichtsinhalten begründen kann. Nach diesem Schema kann es der Lehrperson vereinfacht werden, sich für oder gegen ein Thema zu entscheiden. Nach Berücksichtigung dieser Pfade, ist das Themenfeld "Rauchen und Suchtmittel" definitiv ein Bereich der unbedingt seinen Platz im Unterrichtsgeschehen beibehalten soll. Im Lehrplan ist es ebenfalls vorgesehen, aber es obliegt immer noch der Lehrperson wie detailreich es aufbereitet wird.

Rechtfertigung von Unterrichtsinhalten



Grafik 11: Entscheidungshilfe für Unterrichtsthemen von Gropengießer et al. [51]

Durch schrittweises Beantworten der Fragen, kann schnell geklärt werden, ob Themen für den Unterricht sinnvoll sind.

Wie bereits erwähnt, ist der thematische Schwerpunkt "Drogen und Sucht" im Lehrplan verankert. Fakt ist, dass der Konsum psychoaktiver Substanzen bei Jugendlichen einen relativ hohen Stellenwert hat. Alkohol an erster Stelle, gefolgt von Tabak und Marihuana bzw. Haschisch. Die Schule hat selbstverständlich den Auftrag zur Gesundheitserziehung. Obwohl die Biologie hier als Leitfach in dem Zusammenhang steht, gehen die Gesundheitsthemen allerdings über das Fach hinaus. Es sollte eine fächerverbindende Zusammenarbeit in der Schule zu Stande kommen [51].

8.2.1 Stundengestaltung - Vorschlag für die 1. Klasse Unterstufe

In der nachstehenden Tabelle kann das gesamte Design der 50-minütigen Unterrichtssequenz ("Stundenbild") eingesehen werden.

Zeit (min)	Thema/Inhalte	Materialien/Medien	Interaktionsform (Sozialform)
0 - 10	Organisatorisches, Anwesenheitskontrolle, Stundenwiederholung	PC, Mappe	L → S S → L
10 - 15	Brainstorming zur Themeneinführung Rauchen und seine Folgen	Powerpoint, Hefte bzw. Zettel, Stifte	S → S
15 - 20	Gemeinsames Auflösen des Brainstormings	PC, Tafel, Stifte	L → S S → L
20 - 40	Theoretischer Input, Text abschreiben, Arbeitsauftrag	PC, Powerpoint, Hefte, Stifte	L → S
40 - 50	Festigung des Gelernten, Gemeinsame Wiederholung	Mündliche Beteiligung, ev. Tafel	L → S S → L

Tabelle 5: Stundenbild: 1. Klasse Unterstufe zum Thema Rauchen und seine Folgen

In der Tabelle ersichtlich: zeitlicher Rahmen, Thema/Inhalte, Materialien/Medien und Sozialformen.

Als Einstieg und aufmerksam machen zum Thema Rauchen, Tabakkonsum usw. soll ein kleines Brainstorming die Schülerinnen und Schüler anregen. Gemeinsam mit

den Sitznachbarinnen und Sitznachbarn unterhalten sie sich was sie damit in Verbindung bringen. Darauffolgend werden die Ergebnisse gemeinsam mit der Lehrperson diskutiert und ggf. an die Tafel notiert um es auch visuell darzustellen und für alle sichtbar zu machen. Als nächster Schritt ist der Organvergleich vorgesehen. Die Schülerinnen und Schüler werden mit realen Bildern der beiden Lungen konfrontiert und sollen eine emotionale Empfindung hervorrufen, die eine abschreckende Wirkung nach sich ziehen soll. Aus der beruflichen Praxis kann man erfahrungsgemäß sagen, dass vielen Schülerinnen und Schülern gar nicht bewusst ist um welches Organ es sich genau handelt. Häufig sind großes Erstaunen bzw. Entsetzen zu vernehmen. Die Lehrperson erklärt die Gründe für die drastische optische Änderung der Raucherlungen. Für eine erste Klasse ist dieses Bild ansich ausreichend. Zu schockierende Bilder bzw. Bilder von Lungenkrebsfällen, sollten in dieser Altersgruppe besser noch nicht gezeigt werden. Als Abrundung soll noch ein Text ins Heft abgeschrieben werden, um auch auf das Passivrauchen einzugehen. Ein Textausschnitt für gewünschte rauchfreie Zonen in Lokalen usw. soll die Schülerinnen und Schüler zum Nachdenken anregen. Ein kurzer Arbeitsauftrag für Zuhause, soll sie noch weiter anregen sich mit dem Thema in ihrem Alltag zu beschäftigen.

Erfahrungsgemäß berichten die Schülerinnen und Schüler noch viel in der Stunde über Themen die sie persönlich in ihrem näheren Umfeld betreffen. Es kann dabei leicht eine angeregte Diskussion entstehen, wenn sie aus ihrem Familien- bzw. Bekanntenkreis Raucher kennen und ggf. Krebserkrankungen miterleben. Es ist sehr wichtig den Schülerinnen und Schülern hierfür Raum zum Nachdenken und Mitreden zu geben um sich dieses heikle Thema bewusst zu machen, welche schwerwiegenden Folgen es nach sich ziehen kann. Es ist bereits in der 1. Klasse Unterstufe sinnvoll eine eigene Themeneinheit zum Tabakkonsum zu gestalten, da sie in diesem Alter schon vermehrt damit in Kontakt kommen und der Gruppendruck im schuli-

schen Umfeld dahingehend auch stärker werden kann. Deshalb ist eine Aufklärung dazu unerlässlich und hilft der einen oder dem anderen in der Suchtprävention.

8.2.2 Stundengestaltung - Vorschlag für die 6. Klasse Oberstufe

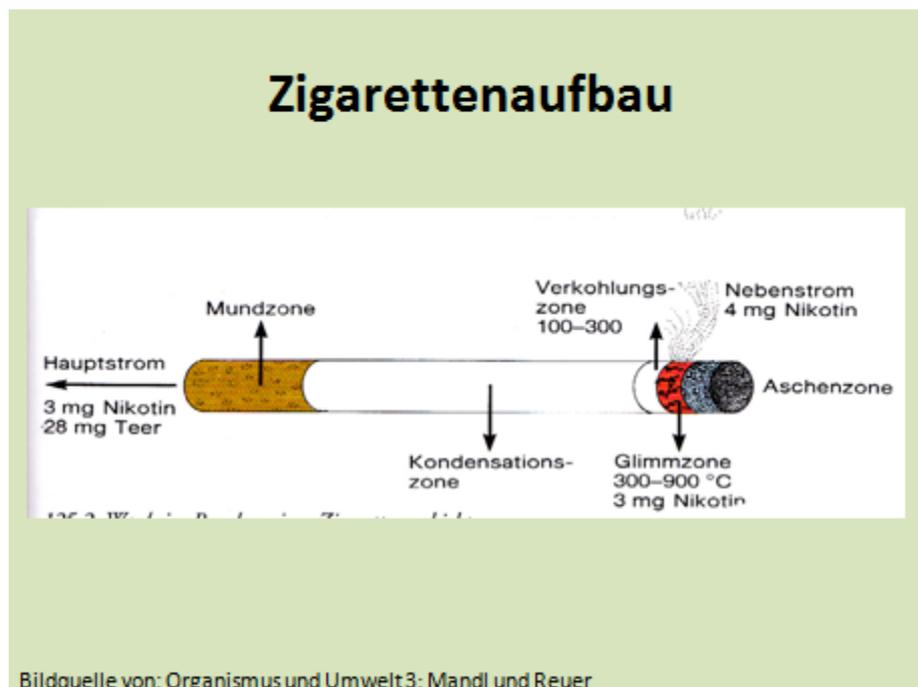
In der nachstehenden Tabelle kann das gesamte Design der 50-minütigen Unterrichtssequenz ("Stundenbild") eingesehen werden.

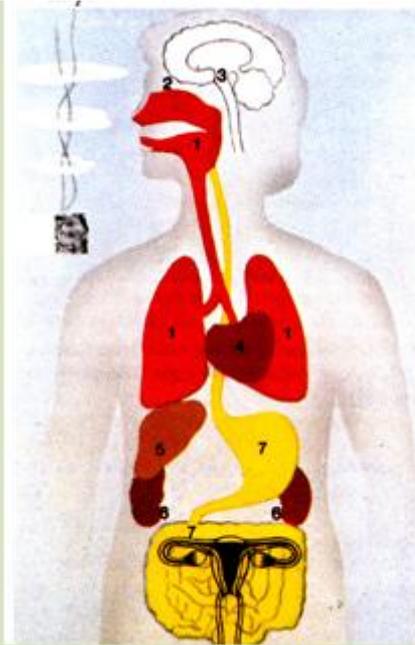
Zeit (min)	Thema/Inhalte	Materialien/Medien	Interaktionsform (Sozialform)
0 - 10	Organisatorisches, Anwesenheitskontrolle, Stundenwiederholung	PC, Mappe	L → S S → L
10 - 15	Powerpoint mit Hinführung zum Thema Sucht insbesondere Tabakkonsum, S. beantworten anonym Fragen von Folien	PC, Powerpoint, Zettel, Stifte	L → S Einzelarbeit
15 - 20	Lehrperson liest anonyme Antworten vor, kurze Nachbesprechung	Zettel	L → S
20 - 45	Theoretischer Input, Krankheiten durch Tabakrauch, Gründe für Suchtentstehung, etc.	PC, Powerpoint, Mappen, Stifte	L → S
45 - 50	Festigung des Gelernten, Gemeinsame Wiederholung	Mündliche Beteiligung, ev. Tafel	L → S S → L

Tabelle 6: Stundenbild: 6. Klasse Oberstufe zum Thema Suchtverhalten insbesondere Rauchen und seine Folgen

In der Tabelle ersichtlich: zeitlicher Rahmen, Thema/Inhalte, Materialien/Medien und Sozialformen.

Bildquellen und Texte entstammen aus folgenden Schulbüchern: "Organismus und Umwelt 3" von Mandl und Reuer, "Begegnungen mit der Natur 6" von Christine-Eva Biegl und "Natura 6" von Vera Kadlec und Kai Dördelmann [4], [53], [54].

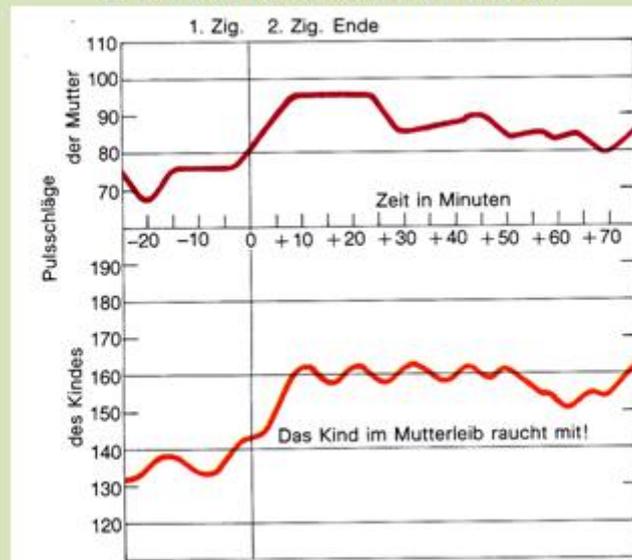




- 1 Teerstoffe und Ruß verschmutzen die Lungen, Krebsgefahr, Gefahr des Raucherhustens und Lungenerweiterung;
- 2 Nikotin beeinträchtigt das Sehvermögen, die Hauptnerven werden unempfindlich;
- 3 Nikotin reizt in kleinen Mengen und lähmt in größeren Mengen die Ganglienzellen des autonomen Nervensystems;
- 4 Nikotin schädigt Herz und Kreislauf, stört somit die Blutversorgung der Organe;
- 5 Nikotin wird vor allem durch die Leber abgebaut und entgiftet. Überbeanspruchung des Organs bei gleichzeitiger Störung der Blutversorgung;
- 6 Nikotin wird zum Teil unverändert durch die Nieren ausgeschieden;
- 7 Nikotin und andere Stoffe im Tabakrauch reizen den Magen-Darm-Kanal (Entzündung, Geschwüre);
- 8 Nikotin bewirkt bei starken Raucherinnen eine Störung des monatlichen Zyklus, Fehl- und Frühgeburten treten vermehrt auf.

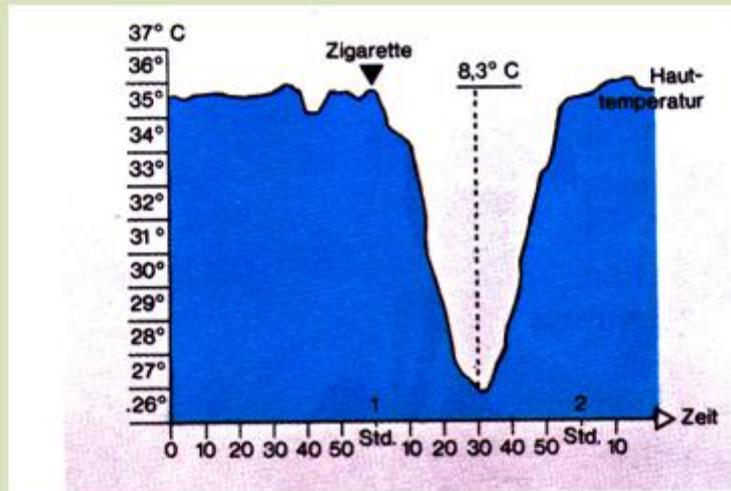
Bildquelle von: Organismus und Umwelt 3; Mandl und Reuer

Das Kind raucht mit ...

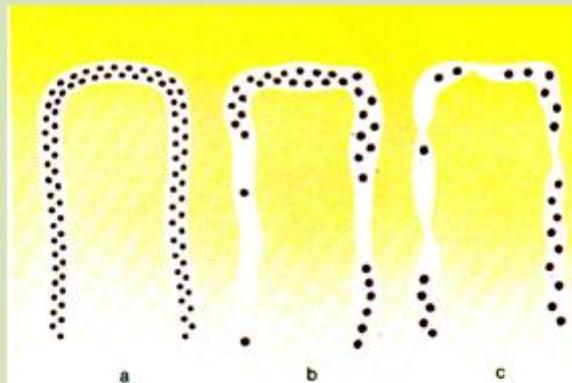


Bildquelle von: Organismus und Umwelt 3; Mandl und Reuer

Abfall der Hauttemperatur



Bildquelle von: Organismus und Umwelt 3; Mandl und Reuer



126.4 Kapillaren mit roten Blutkörperchen. a = normal, b = beginnende Kontraktion während des Rauchens einer Zigarette, c = stellenweise völlige Abschnürung nachher

Bildquelle von: Organismus und Umwelt 3; Mandl und Reuer



127.1 Blutzirkulation in der Hand, nachgewiesen mittels Thermokamera. Oben: gesunde Durchblutung, unten: gestörte Durchblutungslinien einer 22-jährigen Versuchsperson, aufgenommen 15 Minuten nach dem Genuss einer Zigarette

Bildquelle von: Organismus und Umwelt 3; Mandl und Reuer

Lungenvergleich: Nichtraucher/Raucher



Bildquelle von: Begegnungen mit der Natur 6; Biegl

Raucherbein



Bildquelle von: Begegnungen mit der Natur 6; Biegl

NACH DER LETZTEN ZIGARETTE

- Nach 20 Minuten ▶ Blutdruck und Puls sinken auf normale Höhe
- 8 Stunden ▶ Der Kohlenstoffmonoxidspiegel im Blut sinkt, der Sauerstoffspiegel steigt auf normale Höhe
- 24 Stunden ▶ Das Risiko eines Herzinfarktes sinkt
- 48 Stunden ▶ Regeneration der Nervenenden beginnt, Geschmacks- und Geruchsinn verbessern sich
- 2 Wochen ▶ Der Kreislauf stabilisiert sich
- 3 Monaten ▶ Die Lungenfunktion hat sich um ca. 30 Prozent verbessert
- 1 Jahr ▶ Das zusätzliche Risiko von Thrombosen verringert sich um die Hälfte
- 5 Jahren ▶ Das Risiko an Lungenkrebs zu sterben, hat sich fast halbiert
- 5 – 10 Jahren ▶ Das Risiko eines Herzinfarktes verringert sich auf das eines Nichtraucherers
- 10 Jahren ▶ Das Lungenkrebs-Risiko ist auf das eines Nichtraucherers gesunken
- 15 Jahren ▶ Das Risiko von Thrombosen in den Herzkranzgefäßen ist so hoch wie bei einem Nichtraucher



Bildquelle von: Natura 6; Kadlec und Dördelmann

Bereits in der Unterstufe wurde den Schülerinnen und Schülern das Thema Rauchen und seine Folgen näher gebracht. In der Oberstufe werden gewisse Bereiche wiederholt, allerdings nun vertiefter besprochen, da im Lehrplan der 6. Klasse besonders über Süchte und Suchtverhalten gesprochen wird. Als Schwerpunkt kann das Verhalten hinsichtlich Tabakkonsum als eigene Unterrichtssequenz fungieren. Viele Schülerinnen und Schüler haben bereits erste eigene Erfahrungen mit Zigarettenkonsum gemacht und haben eine klarere Vorstellung wie es zum Suchtverhalten und den Hintergründen kommen kann. Deshalb ist die Aufmachung anders als beispielsweise die Themenbehandlung in einer 1. Klasse Unterstufe.

Die OberstufenschülerInnen sollen sich bewusst werden, welche persönlichen Gründe sie damit verbinden. Es kann ihnen helfen sich klar zu werden warum sie eigentlich rauchen und ggf. dieses Verhalten wieder zu korrigieren. Das Beantworten der Fragen erfolgt anonym und wird auch anonym von der Lehrperson vorgelesen, damit keine Diskriminierung der betroffenen Personen stattfinden kann.

Weiters wird ein theoretischer Input den Schülerinnen und Schüler vorgestellt um sich gewissen Fakten bewusst zu werden. Organvergleich, Bilder von Erkrankungen durch Nikotinabusus, körperliche Veränderungen nach einem Zigarettenkonsum uvm., sollen diese Fakten eine emotionale Empfindung hervorrufen, die eine abschreckende Wirkung nach sich ziehen soll. Gropengießler et al. beschreiben in ihren "Konzepten der Gesundheitserziehung", dass beispielsweise durch schockierende Texte bzw. Bilder Affekte und emotionale Betroffenheit hervorrufen und z.B.: dann Rauchen abschrecken soll [51].

Im Vergleich zu der 1. Klasse Unterstufe kann man aus beruflicher Erfahrung sagen, dass auch weiterhin häufig Erstaunen bzw. Entsetzen bei den gezeigten Bildern vorkommt. Allerdings wissen die Schülerinnen und Schüler bereits viel mehr über die Folgen des Tabakkonsums im Vergleich zur Unterstufe. Die Lehrperson erklärt die

Gründe für die drastische optische Änderung der Raucherlungen. In der Oberstufe ist es möglich, schockierende Bilder bzw. Bilder von Lungenkrebsfällen zu zeigen. Sie können bereits damit umgehen und haben viele solcher Bilder meist schon privat gesehen. Ebenso wie in der Unterstufe, berichten die Schülerinnen und Schüler erfahrungsgemäß ebenfalls noch einiges in der Stunde über Themen die sie persönlich in ihrem näheren Umfeld betreffen. Es kann dabei ebenfalls leicht eine angeregte Diskussion entstehen, wenn sie aus ihrem Familien- bzw. Bekanntenkreis Raucher kennen und ggf. Krebserkrankungen miterleben. Für die Oberstufenschülerinnen und -schüler ist die Suchtentwicklung besonders vordergründig. Spezielles Augenmerk sollte daher auf ihre momentane Lebenswelt (Peer groups, Freunde, Familie, usw.) gelegt werden, wie sie in diesen Umkreisen mit dem Thema Rauchen umgehen und wie sie - sofern die Person raucht - Wege aus der Sucht finden können. Konkrete Vorschläge, wie man Hilfestellungen zur Suchtbekämpfung leisten kann, sollten die Unterrichtsstunde abrunden.

9. Abkürzungsverzeichnis

- AHS = Allgemein bildende höhere Schule
- BHS = Berufsbildende höhere Schule
- BSA = Rinderalbumin
- COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (englisch: Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
- CYGB = Cytoglobin
- ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay
- GABA = Gamma-amino-Buttersäure
- HS = Hauptschule
- IL- 18 = Interleukin 18
- K = Kontrollgruppe
- L = Lehrperson
- MSLN = Mesothelin
- MUC5B = Mucin 5B

- NSCLC = Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (englisch: Non Small Cell Lung Cancers)
- OD = Optische Dichte
- P = Patientengruppe
- PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung
- PBST = Phosphatgepufferte Salzlösung + Tween 20
- PTS = Polytechnische Schule
- S = Schülerinnen und Schüler
- SCLC = Kleinzellige Bronchialkarzinome (englisch: Small Cell Lung Cancers)
- TBS = Tris gepufferte Saline
- TMB = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

10. Literaturverzeichnis

1. Stöger, V. (2011) *Establishment of serum ELISA tests against putative lung adenocarcinoma antigens.* **1**, 102.
2. Spira, A. and D.S. Ettinger, *Multidisciplinary management of lung cancer.* N Engl J Med, 2004. **350**(4): p. 379-92.
3. Stöger, R., *Älter werden-aber ohne Krebs.* Vol. 2. 1993: Wilhelm Maudrich. 103.
4. Christian Mandl, E.R., *Organismus und Umwelt 3.* Vol. 3. 2002, Wien: öbv&hpt.
5. Paez, J.G., et al., *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy.* Science, 2004. **304**(5676): p. 1497-500.
6. Belinsky, S.A., et al., *Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11891-6.

7. Belinsky, S.A., et al., *Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers*. *Cancer Res*, 2002. **62**(8): p. 2370-7.
8. Hanash, S.M., S.J. Pitteri, and V.M. Faca, *Mining the plasma proteome for cancer biomarkers*. *Nature*, 2008. **452**(7187): p. 571-9.
9. Rauch, A.M.R.P., *Immunoassays*. Vol. 1. 2007: Munich:Elsevier. 11-13.
10. Dinarello, C.A., *IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **103**(1 Pt 1): p. 11-24.
11. Yang, Y.J., et al., *Cloning and characterization of a new isoform of mouse interleukin-18*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005. **37**(12): p. 826-34.
12. Shi, F.D., et al., *IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells*. *J Immunol*, 2000. **165**(6): p. 3099-104.
13. Okamura, H., et al., *Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells*. *Nature*, 1995. **378**(6552): p. 88-91.

14. Ushio, S., et al., *Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein.* J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4274-9.
15. Takeda, K., et al., *Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice.* Immunity, 1998. **8**(3): p. 383-90.
16. Farjadfar, A., et al., *Interleukin-18 promoter polymorphism is associated with lung cancer: a case-control study.* Acta Oncol, 2009. **48**(7): p. 971-6.
17. Kato, Z., et al., *The structure and binding mode of interleukin-18.* Nat Struct Biol, 2003. **10**(11): p. 966-71.
18. Troseid, M., I. Seljeflot, and H. Arnesen, *The role of interleukin-18 in the metabolic syndrome.* Cardiovasc Diabetol. **9**: p. 11.
19. Mannucci, P.M., *Hemostatic drugs.* N Engl J Med, 1998. **339**(4): p. 245-53.
20. Nogusa, S., D.M. Murasko, and E.M. Gardner, *Differential effects of stimulatory factors on natural killer cell activities of young and aged mice.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci. **67**(9): p. 947-54.

21. Dinarello, C.A., *Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(2): p. 447S-455S.
22. Harms, R.Z., et al., *Increased expression of IL-18 in the serum and islets of type 1 diabetics*. Mol Immunol. **64**(2): p. 306-12.
23. Fischer, C.P., et al., *Elevated plasma interleukin-18 is a marker of insulin-resistance in type 2 diabetic and non-diabetic humans*. Clin Immunol, 2005. **117**(2): p. 152-60.
24. Aso, Y., et al., *Relationships of plasma interleukin-18 concentrations to hyperhomocysteinemia and carotid intimal-media wall thickness in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(9): p. 2622-7.
25. Esposito, K., et al., *Cytokine milieu tends toward inflammation in type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(5): p. 1647.
26. Huang, H.Y., et al., *Eutopic endometrial interleukin-18 system mRNA and protein expression at the level of endometrial-myometrial interface in adenomyosis patients*. Fertil Steril. **94**(1): p. 33-9.

27. Liu, Z., et al., *Thyocyte interleukin-18 expression is up-regulated by interferon-gamma and may contribute to thyroid destruction in Hashimoto's thyroiditis*. *Int J Exp Pathol*. **91**(5): p. 420-5.
28. Sutinen, E.M., et al., *Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid-beta production in human neuron-like cells*. *J Neuroinflammation*. **9**: p. 199.
29. Hung, J., et al., *Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1268-73.
30. Bruun, J.M., et al., *Interleukin-18 in plasma and adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and weight loss*. *Eur J Endocrinol*, 2007. **157**(4): p. 465-71.
31. Evans, J., et al., *The association of interleukin-18 genotype and serum levels with metabolic risk factors for cardiovascular disease*. *Eur J Endocrinol*, 2007. **157**(5): p. 633-40.
32. Zirlik, A., et al., *Interleukin-18, the metabolic syndrome, and sub-clinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(9): p. 2043-9.

33. Straczkowski, M., et al., *Increased serum interleukin-18 concentration is associated with hypoadiponectinemia in obesity, independently of insulin resistance*. *Int J Obes (Lond)*, 2007. **31**(2): p. 221-5.
34. Rabkin, S.W., *The role of interleukin 18 in the pathogenesis of hypertension-induced vascular disease*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2009. **6**(3): p. 192-9.
35. Van Guilder, G.P., et al., *Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults*. *Obesity (Silver Spring)*, 2006. **14**(12): p. 2127-31.
36. Malvezzi, M., et al., *European cancer mortality predictions for the year 2013*. *Ann Oncol*. **24**(3): p. 792-800.
38. Kammerlander, C., *Rauchverhalten von Wiener MedizinstudentInnen - eine Fragebogenstudie mit 624 TeilnehmerInnen.*, in *Institut für Umwelthygiene 2011*, Medizinische Universität Wien: Wien.
39. Shafey O.D. S., G.G., *Tobacco Control Country Profiles 2003*. American Cancer Society, 2003.

40. Borsoi, L., B. Leistikow, and M. Neuberger, *Tobacco smoke load and non-lung cancer mortality associations in Austrian and German males*. *Wien Klin Wochenschr.* **122**(23-24): p. 698-703.
41. Benowitz, N.L., *Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2009. **49**: p. 57-71.
42. Perry, D.C., et al., *Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **289**(3): p. 1545-52.
43. Böcker, W.D., Helmut; Heitz, Philipp U., *Repetitorium Pathologie*. Vol. 1. 2004: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
44. Hiller, M., *Rauchverhalten und Einstellung zum Rauchen steirischer Jugendlicher unter Berücksichtigung ihres sozialen Umfeldes, der Geschlechtszugehörigkeit und der Schulbildung*, in *Klinische Abteilung für Thorax- und hyperbare Chirurgie*. 2008, Medizinische Universität Graz: Graz.
45. Herold, G., *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Vol. 6. 2007: Arzt + Information.
46. WHO (2008) *WHO Report on the global tobacco Epidemic 2008*

47. Bachinger, E., E. Urbas und M. Neuberger, *GESUNDHEITSVERHALTEN, LEBENSSTIL: RAUCHEN.* , in *Wiener Gesundheitsbericht.* 2008, Stadt Wien: Wien.
48. Austria, S. *Statistiken - Krebserkrankungen.* 2013; Available from: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/luftroehre_bronchien_lunge/index.html.
49. *Lehrpläne.* 2000 26.05.2014; Available from: https://www.bmbf.gv.at/schulen/unterricht/lp/lp_ahs_unterstufe.html.
50. *Lehrpläne.* 2004 26.05.2014; Available from: https://www.bmbf.gv.at/schulen/unterricht/lp/lp_neu_ahs_08_11860.pdf?4dzgm2.
51. Harald Gropengießer, U.K., Dirk Krüger, *Biologiedidaktik in Übersichten.* 2010: Aulis Verlag.
52. Schullerer P., B.J., *B&U Biologie und Umweltkunde.* Vol. 2. 2010, Linz: Veritas Verlag.
53. Biegl, C.-E., *Begegnungen mit der Natur 6* Vol. 1. 2005, Wien: öbv.
54. Kadlec Vera, D.K., *Natura 6.* Vol. 1. 2008, Wien: öbv.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

11. Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Verena Stöger-Heinisser

Ausbildung:

1994-1998: Volksschule Zieglergasse, 1070 Wien

1998-2006: Gymnasium Albertgasse, 1080 Wien

2006-2001: Studium der Anthropologie, Universität Wien

2011-2015: Lehramtsstudium Biologie und Psychologie/Philosophie, Uni Wien

Seit 2011: Doktoratsstudium der angewandten medizinischen Wissenschaft, Medizinische Universität Wien

Beruflicher Werdegang:

2004-2007: Private Tutorin in Englisch und Spanisch

Jänner 2007-September 2007: Veterinärassistentin, 1100 Wien

2007-2011: HNO-Praxis - Assistentin für Audiometrie, 1080 Wien

Mai 2010-Dezember 2010: Laborpraktikum und Datenanalyse zur Diplomarbeit "Establishment of Serum ELISA Tests against Putative Lung Adenocarcinoma Antigens", Medizinische Universität Wien

Seit 2013: Biologielehrerin am Wienerwaldgymnasium, 3013 Tullnerbach