

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Tumorbiologie

Prof. Dr. med. Klaus Pantel

## **Vergleichende Analyse genomischer Aberrationen in Primärtumoren und Hirnmetastasen von Karzinompatienten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Niclas Detels

aus Hamburg

Hamburg, 2014

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.08.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. K. Pantel**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. M Glatzel**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. W. Fiedler**

## Inhalt

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
1.1 Darstellung der zugrunde liegenden Tumorarten.....	3
1.1.1 Bronchialkarzinom .....	4
1.1.2 Mammakarzinom.....	10
1.1.3 Kolorektales Karzinom.....	18
1.2 Allgemeine Metastasierungskaskade .....	25
1.3 Hirnmetastasierung und Bluthirnschranke .....	26
1.4 Chromosomale Veränderungen in Primärtumoren.....	28
1.5 Arbeitshypothese und Fragestellung .....	32
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
2.1 Material .....	35
2.1.1 Untersuchungsmaterial .....	35
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.2.1 Chemikalien.....	36
2.1.2.2 Erworbene Systeme .....	36
2.1.2.3 Puffer .....	37
2.1.3 Geräte.....	38
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Bestimmung des Tumoranteils im Gewebe.....	38
2.2.2 Färbemethoden des Gewebes und Gewinnung der DNA .....	39
2.2.2.1 Hämatoxilin/Eosin Färbung (HE-Färbung) .....	39
2.2.2.2 Toluidin-Blau / Methylen-Blau Färbung.....	39
2.2.2.3 Färbung mit Cresyl-Violet-Acetat .....	40
2.2.3 Makrodissektion von Gewebe .....	40
2.2.4 Isolierung der DNA .....	40
2.2.5 Quantität und Qualifizierung .....	41

2.2.6 CGH-Array .....	42
2.2.6.1 Fluoreszenzmarkierung doppelsträngiger DNA .....	42
2.2.6.2 Reinigung der doppelsträngigen fluoreszenzmarkierten DNA .....	43
2.2.6.3 Herstellung des CGH Array Hybridisierungsansatzes .....	44
2.2.6.4 Blockierung der Slides.....	44
2.2.6.5 Hybridisierung .....	45
2.2.7 Auswertung der CGH-Array Daten .....	46
2.2.7.1 Scannen der Objektträger .....	46
2.2.7.2 BLUEFUSE® .....	46
2.2.7.3 Qualitätskontrolle .....	46
2.2.7.4 Roh-Daten Log 2 Werte.....	47
2.2.7.5 Qualitätsstandard .....	47
2.2.7.6 Normalisierung/ modifiziertes Z-Scoring.....	48
2.2.7.7 Multiarray .....	49
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
3.1 Auswertung der Amplifikations- und Deletionsprofile der einzelnen Hirnmetastasen-gruppen.....	52
3.2 Vergleich der Amplifikationen und Deletionen der einzelnen Hirnmetastasengruppen mit ihren Primärtumoren .....	56
3.2.1 Amplifikationen und Deletionen in Hirnmetastasen des Bronchialkarzinoms.....	56
3.2.2 Amplifikationen und Deletionen in Hirnmetastasen des Mammakarzinoms .....	59
3.2.3 Amplifikationen und Deletionen in Hirnmetastasen des Kolonkarzinoms .....	62
3.3 Statistische Auswertung und signifikante Unterschiede zwischen Hirnmetastasen und Primärtumoren.....	64
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
4.1 Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen (NSCLC) .....	70
4.1.1 Bekannte chromosomale Aberrationsmuster in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen.....	71
4.1.2 Signifikante Regionen in Hirnmetastasen der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzino- me mit DNA-Veränderungen im Vergleich mit ihren Primärtumoren .....	71
4.1.3 Signifikante Regionen mit hirnmetastasenspezifischen DNA-Veränderungen .....	73

4.2 Hirnmetastasen beim Mammakarzinom.....	73
4.2.1 Bekannte chromosomale Aberrationsmuster in Mammakarzinom-Hirnmetastasen.....	73
4.2.2 Signifikante Regionen mit hirnmetastasenspezifischen DNA Veränderungen.....	75
4.2.3 Signifikante Regionen mit DNA Veränderungen, die sich ausschließlich in Hirnmetastasen des Mammakarzinoms ermitteln ließen.....	75
4.3 Hirnmetastasen beim kolorektale Karzinom .....	76
4.3.1 Bekannte chromosomale Aberrationsmuster in kolorektalen Karzinomhirn- metastasen .....	76
4.3.2 Signifikante Regionen mit hirnmetastasenspezifischen DNA Veränderungen.....	77
4.3.3 Signifikante Regionen mit DNA Veränderungen, die sich ausschließlich in spezifischen Hirnmetastasenentitäten des kolorektalen Karzinoms ermitteln ließen .....	78
4.3.4 Vergleich der analysierten kolorektalen Karzinom-Hirnmetastasen mit Leber- und Lungenmetastasen des kolorektalen Karzinoms .....	78
4.4 Tumorübergreifender Vergleich zwischen Hirnmetastasen und Primärtumoren.....	79
4.5 Literaturvergleich .....	80
<b>5. AUSBLICK.....</b>	<b>83</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>97</b>
<b>8. TABELLEN - &amp; FORMELVERZEICHNIS .....</b>	<b>98</b>
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>99</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>115</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampère
Ampl.	Amplifikationen
BAC	Bacterial Artificial Chromosomes
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BQS	Bundesinstitut für Qualität und Patientensicherheit
Chr.	Chromosom
CGH	Komparative genomische Hybridisierung ( <i>Comparative Genomic Hybridization</i> )
CT	Computer Tomographie
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>complementary DNA</i> )
Del.	Deletionen
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
Er	Östrogenrezeptor
FAB	Familiäre adenomatöse Polyposis
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
G	Differenzierungsgrad ( <i>grading</i> )
HE	Hämatoxylin Eosin Färbung
Hirnm.	Hirnmetastasen
HNPPC	Hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes Kolonkarzinom
i.v.	Intra venös

k.A.	Keine Angabe
Kb	Kilobasen
LCLC	Großzelliges Bronchialkarzinom ( <i>Large Cell Lung Cancer</i> )
Nm	Nanometer
M	Auftreten von Fernmetastasen
MAD	Median absolute deviation
MB	Megabasen
Mbp	Megabasenpaare
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
Mw	Mittelwert
Min	Minute
N	Status der regionalen Lymphknoten
NSCLC	Bronchialkarzinom ( <i>Non Small Cell Lung Cancer</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaktion</i> )
Pet-CT	Positronen-Emissions-Tomographie kombiniert mit Computertomographie
Prp	Progesteronrezeptor
PT	Primärtumor
RKI	Robert Koch Institut
Sek	Sekunde
SLN	Wächterlymphknoten ( <i>Sentinelnode</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfat</i> )

Size	Größe in Megabasen
SSC	Saline Sodium Citrat Puffer
T	Tumorausdehnung
t-RNA	Transfer Ribonukleinsäure
TNM	Tumorstadieneinteilung ( <i>Tumor nodi and distant metastase</i> )
UICC	Internationale Union gegen Krebs ( <i>International Union Against Cancer</i> )
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VUMC	Freie Universität Amsterdam Medical Center
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )
ZNS	Zentrales Nervensystem



## **Zusammenfassung**

Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, das Mammakarzinom und das kolorektale Karzinom sind sehr häufige Krebserkrankungen, die im Jahr 2010 für 1/3 aller krebsbedingten Todesfälle in Deutschland verantwortlich waren (1). Nach der Entstehung von Primärtumoren kommt es häufig zu einer Ausbreitung der Krebszellen und zu einer Metastasierung in verschiedene Organe. Für die Prognose des Patienten ist das Auftreten einer Hirnmetastasierung bzw. das Abschätzen eines Metastasierungsrisikos von besonderer Bedeutung, da dieses mit einer kurzen Überlebenszeit und einer stark eingeschränkten Lebensqualität einhergeht. Die Grundlagen der Hirnmetastasierung sind bis zum heutigen Tage noch nicht ausreichend erforscht (2). In diesem Zusammenhang ist es von außerordentlicher Wichtigkeit genetische Grundlagen der Hirnmetastasierung und somit neue Ansatzpunkte für kurative Therapieansätze zu entwickeln.

Der dieser Arbeit zu Grunde liegende Vergleich von Primärtumoren mit Hirnmetastasen, welche nicht dem gleichen Primärtumor entstammen, aber die gleiche Tumorentität aufwiesen, soll ein erster Ansatz zur Entwicklung spezifischer Tumorprofile, basierend auf der Comparativen Genomischen Hybridisierung mittels Arrays sein (CGH – Array). Diese spezifischen Tumorprofile ließen sich z.B. in der Diagnostik von Primärtumoren bezüglich des individuellen Hirnmetastasenrisikos verwenden.

Es wurden zur Durchführung dieser Analysen 23 Hirnmetastasen gemäß ihrer Entität eingeteilt und separat mit ihren Primärtumoren auf DNA- Ebene mittels der CGH-Array Methode verglichen. Diese erlaubt es, gegenüber einer „klassischen CGH“, kleinere DNA-Abschnitte von unter 100 MB zu detektieren. Anschließend wurden die Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Untersuchungen abgeglichen, um so mögliche ähnliche Grundschemata in Hirnmetastasen und in den jeweiligen Primärtumorentitäten ermitteln zu können.

Die Vergleiche zeigten ein überwiegend gleiches quantitatives Muster der Amplifikationen und Deletionen in den Hirnmetastasen im Vergleich zu den korrespondierenden Primärtumoren. Der Unterschied lag jedoch in einer überwiegend höheren Frequenz dieser Mutationen in den Hirnmetastasen.

Im Weiteren wurden signifikant unterschiedliche Regionen zwischen den Hirnmetastasen und ihren Primärtumoren verglichen, um mögliche prognostische und diagnostische Marker zu finden, welche hinweisend auf spezifische Metastasierungsvorgänge einzelner Hirnmetastasenentitäten wären. Diese prognostischen, wie diagnostischen Marker könnten

zur Differenzierung von Patientengruppen gemäß ihrem Hirnmetastasierungsrisiko dienen. Es bestünde die Möglichkeit, Patienten gemäß ihrem CGH-Primärtumorprofil in entsprechende Risikogruppen einzuteilen. In der vorliegenden Arbeit konnten in jeder Primärtumorentität entsprechende Regionen ermittelt werden, welche sich als Marker eignen könnten.

Neben der Ermittlung potentieller diagnostischer, wie prognostischer Marker, gelang es ebenfalls DNA-Regionen zu finden, welche einzig in Hirnmetastasen, nicht aber in Primärtumoren verändert waren. In den Hirnmetastasen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms war dieses die Deletionsregion 4p15.2-15.2, welche für das Auftreten einer spezifischen Hirnmetastasierung von Bedeutung sein könnte. In den Hirnmetastasen des Mammakarzinoms fand sich die signifikant veränderte Deletionsregion 10q22.2-26.3. Gene in dieser Region könnten für eine Hirnmetastasierung des Mammakarzinoms verantwortlich sein und wurden in diesem Zusammenhang erstmals in dieser Arbeit beschrieben. Diese Region könnte ebenfalls charakteristisch für einen besonderen Mammakarzinom-Subtyp sein, welcher bevorzugt in das Gehirn metastasiert (3).

Im Gegensatz zu den zwei oben beschriebenen Deletionsregionen fanden sich in den Hirnmetastasen des kolorektalen Karzinoms, sechs Amplifikationsregionen, welche sich nicht in den Primärtumoren ermitteln ließen. Die festgestellten Amplifikationsregionen 1p35.2-35.1, 3p26.3-14.3, 15q11.2-15.1, 19p13.3-13.3, 19q12-13.2 und 22q12.3-12.3 könnten ein spezifisches, in der Diagnostik verwendbares CGH-Profil von Hirnmetastasen des kolorektalen Karzinoms sein. Die hier aufgeführten Regionen wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben und könnten für die im Vergleich seltene Hirnmetastasierung der kolorektalen Karzinome verantwortlich sein.

Die Arbeit stellt somit den Beginn der Erstellung von tumorspezifischen CGH-Profilen, welche zukünftig zu einer besseren Diagnostik und begleitend individuelleren Therapien führen könnten, dar.

## 1. Einleitung

### 1.1 Darstellung der zugrunde liegenden Tumorarten

Als Grundlage dieser Arbeit dienen Hirnmetastasen von Bronchialkarzinomen, hier speziell nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC – *Non Small Cell Lung Cancer*), Mammakarzinomen und kolorektalen Karzinomen. Unter dem Begriff „kolorektales Karzinom“ werden die Krebserkrankungen des Kolon und des Rektum zusammengefasst. Da das Rektumkarzinom selten vorkommt, beziehen sich die folgenden Ausführungen hauptsächlich auf das Kolonkarzinom.

Das Bronchialkarzinom, das Kolonkarzinom und das Mammakarzinom waren im Jahre 2010 für ~33% aller krebisbedingten Todesfälle bei den Männern verantwortlich, wohingegen bei den Frauen das Bronchialkarzinom, das Kolonkarzinom und das Mammakarzinom für ~39% aller krebisbedingten Todesfälle verantwortlich waren. Beim Mann lag das Bronchialkarzinom 2010 mit ~25% an erster Stelle der zum Tode führenden Tumorentitäten, gefolgt vom Kolonkarzinom mit ~8%. Bei der Frau hingegen lag das Mammakarzinom mit ~17% an erster Stelle, gefolgt vom Bronchialkarzinom mit ~14%. An dritter Stelle stand das Kolonkarzinom mit ~9% aller Sterbefälle in Deutschland (4).

Zur Einstufung der Therapie und Prognose werden Tumore in verschiedene Stadien nach der TNM Klassifikation (Staging) und des Differenzierungsgrades (Grading) (G1 [hoch] bis G3 [niedrig]) eingeteilt (5; 6). Das Grading beinhaltet die Einstufung des Malignitätsgrades aufgrund histologischer und zytologischer Kriterien, wie Kernatypien, Mitosezahl und Differenzierung. Die TNM-Klassifizierung beinhaltet nach der *International Union Against Cancer* (IUCC) die Tumorausdehnung (T), den regionalen Lymphknotenstatus (N) und das Vorkommen von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnose (Vgl. ANHANG I – III). Mittels des Stagings und des Gratings können vier Tumorstadien (I – IV) und jeweilige Untergruppen (a, b) festgelegt werden, mittels denen sich die jeweilige Therapie und Prognose ermitteln lässt (7).

Im Folgenden werden die Ätiologie, Histopathologie, Symptome und Diagnose sowie die Therapie, Prognose und Metastasierung der drei Tumorarten näher beschrieben.

### 1.1.1 Bronchialkarzinom

Das Bronchialkarzinom ist die am häufigsten auftretende Krebsform in Europa. In Deutschland ist das Bronchialkarzinom nach Studien des Robert Koch Institut (RKI), bei beiden Geschlechtern die dritthäufigste Krebserkrankung (8). Im Jahr 2009 erkrankten in Deutschland ca. 49.000 Personen an Lungenkrebs. Dieses entspricht einem Anteil von ~13% aller Krebserkrankungen beim Mann und ~7% bei der Frau (1). Betrachtet man die Gesamtzahl aller krebsbedingten Todesfälle so ist das Bronchialkarzinom im Jahr 2010 für ~20% aller an bösartigen Neubildungen verstorbenen Männern und Frauen verantwortlich. Hierbei steht das Bronchialkarzinom bei Männern mit ~25% an erster Stelle und bei Frauen an dritter Stelle mit ~14% (4). Das mittlere Erkrankungsalter bei beiden Geschlechtern liegt bei ~ 69 Jahren. Die Inzidenz beim Mann ist bei ca. 80/100.000 und bei der Frau bei ca. 25/100.000 zu verzeichnen (9). Während die Erkrankungs- und Sterberaten der Männer an Lungenkrebs seit Beginn der 1990er Jahre insgesamt um etwa ein Viertel zurückgingen, stiegen bei Frauen hingegen die Inzidenz (um 200%) sowie auch die Mortalität (um mehr als 100%) an. Diese Trendentwicklung wird auf die unterschiedlichen Rauchgewohnheiten und eine Zunahme der weiblichen Raucherinnen zurückgeführt (10; 11).

#### *Ätiologie*

Der Großteil von Lungenkrebserkrankungen (90%) steht in einem unmittelbaren Zusammenhang mit dem direkten Gebrauch von Tabakprodukten (12; 13). Das Risiko an einem Bronchialkarzinom zu erkranken ist bei einem Raucher deutlich höher als bei einem Nichtraucher. Es steigt generell mit der Dauer und der entsprechenden Dosis Nikotin pro Tag pro Jahr stetig an (14). Ebenfalls belegen Studien, dass sich das relative Risiko an einem Bronchialkarzinom zu erkranken durch das Passivrauchen maßgeblich erhöht (15; 16). Im Weiteren werden berufsbedingte Schadstoffe, wie Arsen, Radon, Asbest, Nickel, Kadmium, Chrom, Silikate und radioaktive Stäube sowie Kokereirohrgase für die Entstehung von Lungenkrebs verantwortlich gemacht (9).

In einer vom Umweltbundesamt in Berlin im Jahre 2003 in Auftrag gegebenen Studie über Dieselmotorenemissionen und ihre Folgen konnte ebenfalls ein deutlicher Zusammenhang zwischen den Emissionen und einem erhöhten Lungenkrebsrisiko festgestellt werden (17). Die Luftverschmutzung soll ebenso eine Ursache der Lungenkrebserkrankung sein (18). Ferner können genetische Faktoren das Risiko für eine Lungenkrebserkrankung erhöhen (19). Das Bronchialkarzinom weist mit einer Hirnmetastasenrate von ~40-60%, die höchste Hirnmetastasierung der drei beschriebenen Karzinome auf (20). Die Inzidenz steigt mit



Im Weiteren wird noch in das adenosquamöse Karzinom, das sarkomatoide Karzinom, das karzinoide Karzinom und das Bronchialdrüsenkarzinom vom Speicheldrüsentyp und einige nicht spezifische Lungenkarzinome unterschieden, welche aber nicht Grundlage dieser Arbeit sind (9).

Das kleinzellige Bronchialkarzinom, welches zu ~20% vorkommt, ist neben dem Plattenepithelkarzinom, das Bronchialkarzinom, welches eine starke Korrelation mit dem Rauchen aufweist (26). Es kommt vermehrt bei starken Rauchern mit frühem Beginn des Nikotinabusus und Beschäftigten im Uranabbau vor. Das kleinzellige Bronchialkarzinom wird in die Gruppe der neuroendokrinen Tumoren eingeteilt (28). Histologisch setzt sich das kleinzellige Bronchialkarzinom aus kleinen Zellen mit wenig Zytoplasma zusammen, die Lage ist häufig zentral und perihilär. Eine frühe Metastasierung in das Gehirn, die Leber und die Nebenniere sind charakteristisch für das kleinzellige Bronchialkarzinom (10) (vgl. Tabelle 1). Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom der Lunge gibt es beim kleinzellige Bronchialkarzinom keine Übergangsphasen, wie z.B. das *Carcinoma in situ*.

Das Adenokarzinom der Lunge tritt am häufigsten bei Rauchern, gelegentlich aber auch bei Nichtrauchern, im Besonderen bei Frauen auf. Im Weiteren sind Berufsgruppen wie Zimmerer, Möbelhersteller und Maler u.a. aufgrund ihrer beruflichen Exposition mit besonderen Gefahrenstoffen außerordentlich gefährdet (28). Etwa 75% der Adenokarzinometreten bevorzugt in der Peripherie der Lunge auf. Makroskopisch zeigt sich ein grau-weißlicher, zentral fibrosierender Tumor. Histologisch sind ~80% der resezierten und somit pathologisch untersuchten Adenokarzinome folgenden Subtypen zuzuordnen: azinärer Typ, papillärer Typ, bronchioalveolärer Typ und solides Adenokarzinom mit Muzin Bildung. Die meisten Adenokarzinome entsprechen aber einem Mischtyp aus den vier Subtypen (28). Charakteristisch ist eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung in das Gehirn, in die Leber und in die Nebennierenrinde (29) (vgl. Tabelle 1).

Das Adenokarzinom steht heute an erster Stelle aller Bronchialkarzinome, es hat in der Häufigkeit seines Vorkommens, das Plattenepithelkarzinom überholt. Eine deutliche Zunahme der Erkrankung ist bei Frauen zu verzeichnen. Als Erklärung für das vermehrte Vorkommen des Adenokarzinoms könnte das veränderte Rauchverhalten der Bevölkerung dienen, im Besonderen der vermehrte Gebrauch von Filterzigaretten und Zigaretten mit geringerem Nikotinanteil bei Frauen könnte hierfür verantwortlich sein. Zigaretten mit einem

geringeren Anteil an Nikotin werden im Gegensatz zu gewöhnlichen Zigaretten, tiefer in die Bronchien inhaliert. (30; 31).

Das Plattenepithelkarzinom der Lunge stellt ~30% aller nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome dar und tritt zu über 90% bei Rauchern auf (26). Es ist der vorherrschende histologische Typ bei Männern. Insgesamt ist jedoch ein rückläufiger Trend zu beobachten (31). Das Plattenepithelkarzinom (SCC) ist ein maligner, epithelialer Tumor mit den charakteristischen Merkmalen der Verhornung und/oder der Ausbildung von Interzellularbrücken, welche laut World Health Organisation (WHO) das SCC histologisch definieren. Etwa 90% der Plattenepithelkarzinome sind zentral in Lappen-, Segment-, oder Subsegmentbronchien lokalisiert. Das hoch-differenzierte Plattenepithelkarzinom neigt zur lokalen Ausbreitung im Brustraum mit direkter Infiltration der benachbarten Organe. Das niedrig-differenzierte Plattenepithelkarzinom neigt eher zur Fernmetastasierung (28) (Vgl. Tabelle 1).

Großzellige Bronchialkarzinome machen ~10% aller Bronchialkarzinome aus und zeigen histologisch keine besonderen Auffälligkeiten (26). Die Diagnose des großzelligen Bronchialkarzinoms ist eine Ausschlussdiagnose der anderen Karzinomtypen. Es handelt sich also um keine einheitliche Tumorkategorie sondern um eine histologische Sammelbezeichnung. Viele großzellige Karzinome entsprechen wahrscheinlich gering differenzierten Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen. Die großzelligen Bronchialkarzinome metastasieren bevorzugt hämatogen in die Leber, das Gehirn und in die Knochen (Vgl. Tabelle 1).

**Tabelle 1 Metastasierungsmuster der Bronchialkarzinome in Abhängigkeit vom histologischen Typ (nach Berger et. al. 2010)**

Lokalisation	Metastasierungshäufigkeit nach histologischem Typ			
	SCC	LCLC	AC	SCLC
Mediastinale LK	30 %	40 %	40 %	95 %
Leber	30 %	30 %	45 %	50%
Gehirn	20 %	30 %	30 %	40 %
Knochen/Knochenmark	30 %	40 %	40 %	30-35 %

### *Symptome und Diagnose*

Die Diagnose von heilbaren Bronchialkarzinomen gestaltet sich schwierig, da die meisten Bronchialkarzinome lange Zeit asymptomatisch bleiben. Die ersten allgemeinen Symptome treten erst in einem fortgeschrittenen Stadium auf. Dazu zählen Husten, Dyspnoe, Brustschmerzen, Auswurf sowie Gewichtsverlust mehr als 10% des Körpergewichts in den letzten sechs Monaten. Ebenso Heiserkeit, Hämoptysen, Knochenschmerzen, supraklavikuläre Lymphknoten Schwellung, tiefe Beinvenenthrombosen ohne andere klinische Ursache und Schluckbeschwerden (32; 33).

Besteht aufgrund der klinischen Symptomatik eine Verdachtsdiagnose, so wird, als Basisdiagnostik, eine Thorax-Übersichtsaufnahme in zwei Ebenen angefertigt. Bei Verdacht auf ein Bronchialkarzinom muss zur Kontrolle des radiologischen Befundes eine Computertomographie des Thorax angefertigt werden, da eine unauffällige Thorax-Übersichtsaufnahme einen Tumor nicht definitiv ausschließen kann. Alternativ kann auch eine Thoraxsonographie durchgeführt werden (9; 32).

Die Positronen Emissions Computertomographie (PET/CT), die mit Hilfe von radioaktiv markierter Glucose, welche sich im Tumorgewebe anreichert, arbeitet, verbindet zwei radiologische Verfahren miteinander und erhöht somit die Sensitivität und Spezifität des Diagnoseverfahrens. Mit Hilfe der PET/CT Technik lässt sich eine genau anatomische Lokalisation des Tumors und eine mögliche Lymphknotenmetastasierung nachweisen (9; 34). Eine weitere nicht invasive diagnostische Methode ist die Sputumzytologie. Es werden mindestens drei Sputumproben gewonnen und auf Tumorzellen untersucht (32).

Bei unklarem Befund wird zur Gewinnung von Probematerial die flexible Bronchoskopie eingesetzt. Sie erlaubt es, aus einem optisch und radiologisch tumorverdächtigen Bereich Gewebeproben zu entnehmen, die anschließend histologisch untersucht werden können (32; 34). Im Falle eines unklaren radiologischen, wie bronchoskopischen Befundes ist es möglich, mit Hilfe von Pleurapunktionen oder einer videoassistierten Thorakoskopie eine direkte Punktion oder Inspektion mit möglicher Gewebeentnahme durchzuführen (32).

### *Therapie*

Die Prognose und die jeweilige Therapie des Bronchialkarzinoms hängen vom histologischen Typ sowie vom Tumorstadium ab (vgl. ANHANG I). Zunächst muss der histologische Typ, es wird hierbei in kleinzellige und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom unterschieden ermittelt werden. Beide Bronchialkarzinomtypen benötigen im Anschluss einer



unterschiedlichen Therapie. Bei der Therapie des Bronchialkarzinoms wird eine kurative (~15-30% der Fälle) und eine palliative Form (~70% der Fälle) unterschieden (19). Die Basistherapie des frühen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist primär chirurgischer Art. Dabei werden der komplette Tumor und seine zugehörigen Lymphknoten entfernt (34). Eine adjuvante Chemotherapie im Anschluss an die operative Entfernung des Tumors sollte in den TNM Stadien (vgl.1.1) IIa N0, IIb N0 und IIIa N0 erfolgen (9). Ab dem Stadium IIIb N0 und IIIa N2 ist in den meisten Fällen eine kurative Therapie nicht mehr indiziert. In diesem Stadium sollte eine palliative, kombinierte Strahlen- und Chemotherapie die Überlebenszeit des einzelnen Patienten verlängern (9; 35). Eine Inoperabilität besteht bei gesicherten Fernmetastasen, gesicherten Pleurametastasen, gesichertem Tumorbefall der Hauptcarina (Tumor Entfernung unter 1 cm), Infiltration von großen Gefäßen oder einem Herzvorhof, Tumor bedingter Recurrensparese, supraklavikulärer, kontralateraler hilärer oder mediastinaler Lymphknotenmetastasen und Tumor bedingter Phrenicus-Parese (36). Die Basistherapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms besteht aus einer Kombination aus Chemo- und Radiotherapie und ist vornehmlich palliativ.

### *Prognose*

Die Prognose für alle Lungenkrebsformen ist, bedingt durch die frühe Metastasierung und die lange, symptomlos verlaufende Erkrankung, im Allgemeinen sehr schlecht. Die relative 5-Jahresüberlebensrate für Personen, die an einem Bronchialkarzinom erkrankt sind beträgt ~15% bei Männern und ~18% bei Frauen. Wie bei allen Krebslokalisationen richten sich die Überlebensraten nach dem jeweiligen Stadium der Erkrankung. Im lokalen Stadium beträgt die 5-Jahresüberlebensrate ~50%. Diese sinkt bei dem Vorhandensein von multiplen Lymphknotenmetastasen jedoch bis auf 3% ab (35). Die schlechteste Prognose aller Bronchialkarzinome weist das kleinzellige Bronchialkarzinom auf, da es zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei ~70% der Fälle metastasiert ist (34; 37). Seine 5-Jahresüberlebensrate liegt bei lediglich 6-12%, abhängig vom Stadium der Erkrankung (38). Die mittlere Überlebensrate von Patienten mit kleinzellige Bronchialkarzinom liegt bei ~12-16 Monaten. Hingegen weist das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom eine relativ gute Prognose auf. Die Stadien I, II und III a weisen die längsten, rezidiv freien Intervalle und somit die höchste Überlebensquote auf.(34; 36) Zum Beispiel beträgt die 5-Jahresüberlebensrate eines komplett resezierten Stadiums I NSCLC~ 70% (36; 39). Dennoch tritt bei ~30% der sich im frühen Stadium I befindlichen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome, nach einem tumorfreien Intervall, ein Rezidiv auf. Dieses geschieht, obwohl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose kein histologischer

Nachweis für eine lymphogene, wie hämatogene Metastasierung vorlag und der Tumor komplett reseziert werden konnte (Stadium R0). Die Ursache für die Rezidive ist wahrscheinlich auf okkulte Mikrometastasen zurückzuführen, welche von herkömmlichen histopathologischen Methoden nicht erkannt wurden und zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in die regionalen Lymphknoten und das Knochenmark metastasiert waren (39; 40). Im Gegensatz zu den frühen Stadien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom weisen die fortgeschritteneren Stadien eine deutlich schlechtere Prognosen auf, wie z.B. das Stadium III B mit einer 5-Jahresüberlebensquote von nur noch ~3-7% (36). Die schlechteste Prognose mit unter 1% 5-Jahresüberlebensrate hat das Stadium IV, mit jedem T, jedem N aber M1. Verantwortlich für die sehr schlechte Prognose ist die bereits erfolgte Fernmetastasierung (5).

### **1.1.2 Mammakarzinom**

Europaweit erkrankten nach Schätzungen der WHO im Jahr 2000 ~350.000 Frauen am Mammakarzinom. Gleichzeitig ging man von ca. 130.000 Sterbefällen aus (41). In Deutschland erkrankten im Jahr 2009 etwa 72.000 Frauen an Brustkrebs. Dieses entspricht einem Anteil von ~32% aller Krebserkrankungen bei der Frau (1).

Die Zahl der brustkrebsbedingten Sterbefälle im Jahr 2010 betrug ca. 18.000 Personen. Das Mammakarzinom belegt damit mit ~17% den ersten Rang bezüglich der krebsbedingten Sterblichkeit bei der Frau (4). Vor allem bei Frauen im Alter zwischen 35 und 60 Jahren ist Brustkrebs für jeden zweiten Todesfall verantwortlich (42). Eine Schätzung der Dachdokumentation Krebs des RKI erwartet in Deutschland jährlich ~60.000 Brustkrebsneuerkrankungen. Damit ist das Mammakarzinom die am häufigsten vorkommende Krebsart bei Frauen (42; 43).

Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit fortschreitendem Lebensalter zu. Die Neuerkrankungsrate ist besonders zwischen dem 30. und 50. Lebensalter auffällig, nimmt jedoch mit Beginn der Menopause wieder ab (44). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ~64 Jahren (43). In Deutschland beträgt das mittlere Lebenszeitrisko von Frauen an Brustkrebs zu erkranken ~12% (42). Männer hingegen erkranken sehr viel seltener an Brustkrebs. Statistisch kommt eine Erkrankung bei Mann auf etwa hundert Frauen (2).

Die Zahl der Neuerkrankungen am Mammakarzinom ist seit den 80er Jahren bis etwa ins Jahr 2000 stetig angestiegen und bleibt nun in etwa gleichbleibend. Im Gegensatz hierzu sinkt aber

seit etwa Mitte der 90er Jahre die Sterblichkeit leicht ab. Der Begründung hierfür wird in einer sich stetig verbessernden Therapie sowie der Einführung des standardisierten Mammographie-screenings gesehen, welche es erlaubt, vermehrt auch frühere Brustkrebsstadien mit günstigeren Prognosen zu erkennen und zu therapieren (42; 43).

### *Ätiologie*

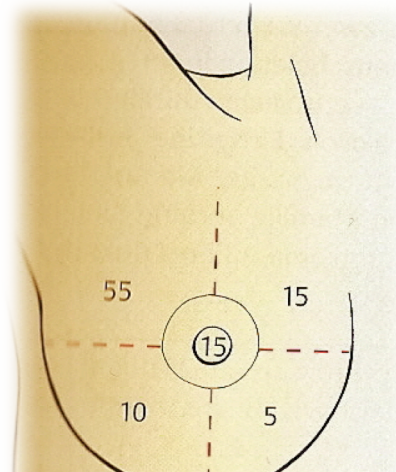
Das Mammakarzinom lässt sich in eine sporadische (nicht familiär bedingte) und eine hereditäre (familiär gehäufte) Form unterteilen. Die hereditäre Form ist für ca. 10-20% aller Mammakarzinome verantwortlich (45; 46). Bei Mammakarzinom Patientinnen, welche unter 35 Jahre alt sind, haben jedoch ~25-40% der Karzinome eine hereditäre Ursache (45). Dieses ist vor allem begründet durch bekannte Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *BRCA-1* und 2 deren Mutationen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko führen. Zwischen ~5-10% aller Mammakarzinome sind auf eine Mutation in den beiden *BRCA* Genen zurück zu führen (45; 46). Das *BRCA-1* Gen liegt auf Chromosom 17q21 während das *BRCA-2* Gen auf Chromosom 13q12 lokalisiert ist. Beide Gene codieren für das DNA-Reparatursystem der Zelle. Keimbahnmutation in diesen beiden Genen sind assoziiert mit 60-90% höherem Lebenszeitrisiko an einem Mammakarzinom zu erkranken (41; 47).

Als additional Risikofaktoren an Brustkrebs zu erkranken sind Faktoren des Lebensstils (z.B. Überernährung, Alkoholkonsum, Rauchen, geringe körperliche Aktivität), der hormonelle Status sowie die genetische Disposition bekannt (43). Eine früh einsetzende Menarche, eine späte Menopause, eine späte Schwangerschaft oder eine nulli para sowie kurzes bzw. kein Stillen des Kindes, können ebenfalls zu einer Entwicklung eines Mammakarzinoms führen.(48) Ebenfalls wurde bei Frauen, die im Rahmen einer Hormontherapie über mehrere Jahre Östrogene, Östrogen-Gestagen-Kombinationen oder Tibolon zu sich genommen haben, ein erhöhtes Brustkrebsrisiko festgestellt (49; 50). Zudem werden untypische lobuläre und duktale Hyperplasien und benigne gutartige Brusterkrankungen sowie radioaktive ionisierende Strahlung als Risikofaktoren genannt.

Das Vorhandensein von Gehirnmetastasen bei Mammakarzinom Patienten ist ebenfalls mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet, tritt aber nur bei~5-20% der Patientinnen auf (vgl. Tab 2). Im Falle der Erkrankung hingegen beträgt die mittlere Überlebenszeit mit einer Radiotherapie 3-6 Monate und unbehandelt einen Monat. (2; 51). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hirnmetastasen von invasiven, lobulären und dukталen Mammakarzinomen gearbeitet.

### Histopathologie

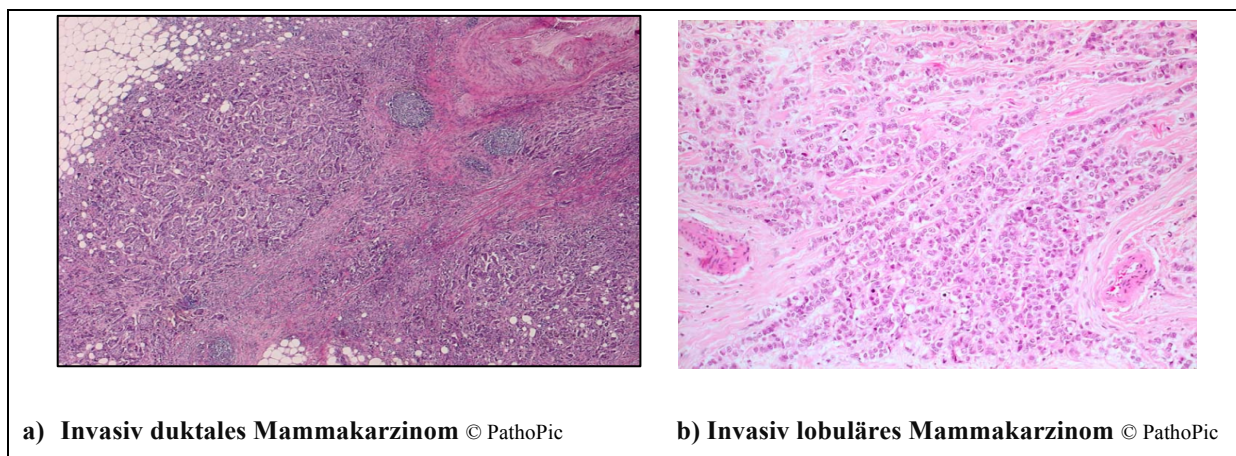
Die Mammakarzinome werden in benigne und maligne Tumore unterteilt. Die meisten Brusttumore sind benigne. Es handelt sich dann überwiegend um Fibroadenome, Zysten oder Lipome. Der Großteil der malignen Mamakarzinome, welche meistens im oberen äußeren Quadranten der Brust (50%) auswachsen, werden in eine präinvasive Form (*Carcinomain situ*) und eine, sich meist daraus entwickelnde, invasive Form unterschieden (Vgl. Abb. 2) (52).



**Abbildung 2** Prozentuale Häufigkeit des Mamakarzinoms in den einzelnen Quadranten der Brust. (126) (Stauber n.d.)

Die histologische Einteilung in präinvasives oder invasives Karzinom richtet sich danach, ob der Tumor bereits die Basalmembran durchbrochen hat oder nicht.

Das präinvasive *Carcinoma in situ* überschreitet definitionsgemäß nicht die Basalmembran. Zu diesen nicht invasiven Frühformen gehören sowohl das duktales (~95%) als auch das lobuläre in-situ-Karzinom (~5%) (vgl. Abb. 3).



**Abbildung 3** Histologische Beispiele für ein a) invasiv duktales und b) invasiv lobuläres Mammakarzinom. © PathoPic, Universität Basel Aus: <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/intro.htm> (Pic n.d.) (27)

Die invasiven Mammakarzinome werden nach WHO in invasive duktales Mammakarzinome mit ~60-70% und invasive lobuläre Mammakarzinome mit ~10-20% aller Fälle eingeteilt (2). Sie sind für ~70-80% aller Mammakarzinome verantwortlich (52). Zu den Sonderformen der invasiven duktales Karzinome zählen das tubuläre- (~2-7%), das muzinöse- (~2%), das medulläre- (~1-7%) und das papilläre Karzinom (~1-2%) (52). Das invasive lobuläre Karzinom wächst vom Epithel der Lobuli aus. Die kleinen Tumorzellen wachsen dissoziiert

und liegen einzeln in typischen Reihen (Gänsemarschmuster) oder im Kreis um einen Ausführungsgang herum (Schießscheibenmuster) angeordnet. Das invasive duktales Karzinom ist ein histologischer Überbegriff für verschiedene Formen von Karzinomen. Es existieren keine speziellen histologischen Merkmale für diese Karzinomformen. Deshalb ist die Diagnose invasives lobuläres Karzinom eine Ausschlussdiagnose der anderen Karzinome. Sie entstehen aus dem Epithel der *ducti* (Milchgänge) oder der terminalen *ducti*. Von ihrem Ursprung her handelt es sich um Adenokarzinome mit tubulärem, trabekulärem und solidem Zellverbänden. Kernatypien und Mitosehäufigkeit sind je nach Karzinom sehr unterschiedlich (52). Das Mammakarzinom metastasiert frühzeitig lymphogen und hämatogen in das Skelettsystem, die Lunge, Pleura, Leber und ZNS u.a (vgl. Tab. 2) (2).

**Tabelle 2 Metastasierungsmuster des Mammakarzinoms (Modifiziert nach Berger et. al. 2010)**

Ort	Gehirn	Knochen	Lunge	Pleura	Lymphknoten	Leber	Ovar
Metastasierungshäufigkeit in %	5%	25%	15%	12%	10%	8%	3%

Die Einteilung der Mammakarzinome geschieht ebenfalls wie in Punkt 1.1.2 beschrieben nach der von der WHO veröffentlichten TNM-Klassifikation (vgl. ANHANG II).

Das Grading des Mammakarzinoms erfolgt mittels des Atypiengrades. Dieser wird anhand des Grades von Kernatypien, der Mitosefrequenz und der Ausbildung der Tubuli in zehn größenmäßig definierten Gesichtsfeldern beschrieben. Jedem der drei Merkmale wird mit Hilfe einer Scala ein Punktwert von 1-3 zugeordnet. Eine Gesamtpunktzahl unter sechs entspricht einem geringen, 6-7 einem mittleren und über 7 einem hohen Malignitätsgrad (52).

### *Symptome und Diagnose*

Eine wesentliche Bedeutung bezüglich einer positiven Prognose ist die Früherkennung. Die Verdachtsdiagnose des Mammakarzinoms wird in den meisten Fällen von den Patientinnen durch Selbstpalpation gestellt. Bei einem tumorverdächtigen Befund bzw. einem Knoten in der Brust wird dieser durch den Gynäkologen palpatorisch untersucht und gegebenenfalls mit Unterstützung von bildgebenden Verfahren, wie der Mammographie abgeklärt. Dieses mit Röntgenstrahlung arbeitende Diagnoseinstrument erlaubt es, die meisten Mammakarzinome

in einem sehr frühen Stadium zu diagnostizieren (42; 53). Die Tumoren haben im Schnitt erst einen Durchmesser von unter 2 cm und sind meist noch nicht metastasiert. Die Mammographie ist das bislang einzige Früherkennungsverfahren, für das eine ausreichende Grundlage (Senkung der Mortalität) auf der Basis wissenschaftlicher Studien für die Altersgruppe der 50- bis 70-Jährigen vorliegt (53; 54).

Die Sonographie kann ebenfalls zur Diagnose des Mammakarzinoms eingesetzt werden, sie erreicht aber nicht die diagnostischen Werte einer Mammographie und ist deshalb nicht der „Goldstandard“

Eine Magnetresonanztomographie (MRT) kann ebenfalls Aufschluss über die Tumorlage und -größe liefern. Sie eignet sich zur Operations- sowie zur adjuvanten Radiotherapieplanung (42). Ein klinisches Staging sollte bei einem lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom und möglicher Metastasierung durchgeführt werden. Zu diesem gehört ein Thoraxröntgen in zwei Ebenen, eine Leber-sonographie und eine Skelettszintigrafie sowie eine Blutbilduntersuchung (42).

Bestätigen diese Verfahren die Verdachtsdiagnose, so kann zur Sicherung dieser und zur weiteren Therapieplanung eine Biopsie entnommen werden, mittels derer tumorverdächtiges Gewebe gewonnen und anschließend mikroskopisch und histologisch auf Malignitätskriterien untersucht werden kann.

Um eine mögliche Skelettmetastasierung zu detektieren wird mit Hilfe einer radioaktiv markierten Substanz eine Skelettszintigrafie durchgeführt. Hierbei wird die radioaktiv markierte Substanz in stoffwechselaktiven Metastasen oder Tumoren angereichert und somit im anschließenden Röntgenbild sichtbar. Alternativ lassen sich mit Hilfe der PET-CT Technik (Positronen Emissions Tomographie mit Computer Tomographie) ebenfalls Tumore und ihre Metastasen mit Hilfe einer radioaktiv markierten Glucose, welche im Stoffwechsel des Tumor oder der Metastase angereichert wird, darstellen.

### *Therapie*

Zur Therapie von Brustkrebs stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, welche sich nach dem jeweiligen histologischen Tumorstadiums und der entsprechenden TNM-Klassifizierung richten. Zum einen basieren die Therapiekonzepte auf lokalen, an der Brust vorgenommenen

Verfahren wie Operationen und Strahlentherapie sowie zum anderen auf systemisch wirksame, medikamentöse Verfahren wie Chemo- und Hormontherapie.

Heutzutage ist die gebräuchlichste Therapieform des nicht-metastasierten, frühen Mammakarzinoms T1, N0, M0 die brusterhaltende chirurgische Therapie. Der BQS-Qualitätsreport 2003 gibt hier beispielsweise an, dass bei einem Tumorstadium pT1« (Tumorgröße 2 cm oder weniger) in ~70-80 % der Fälle in Deutschland brusterhaltend operiert wird (44). Dabei wird der Primärtumor chirurgisch entfernt und mit ihm die regionären Lymphknoten, diese werden histologisch auf Tumorerkrankung untersucht und anschließend die weitere Therapieplanung festgelegt. (55) Ein neueres Verfahren „Sentinal-Node-Biopsie“ erlaubt es, bei einem primär Tumor unter 3cm Größe, einem fehlenden axillären Lymphknotenbefall, fehlender inflammatorischer Tumorausbreitung und nicht voroperierte Axilla, den ersten Lymphknoten im Lymphabflussgebiet des Tumors (*sentinelnode* SLN = Wächterlymphknoten) operativ zu entnehmen. Dieser wird anschließend histologisch auf Tumorerkrankung untersucht. Bei Tumorerkrankungsfreiheit des SLN wird auf eine umfangreiche axilläre Lymphonodektomie verzichtet (55; 56). Im Anschluss an die Operation wird bei einem invasiven Tumor eine adjuvante Bestrahlung empfohlen. Diese dauert in der Regel sechs Wochen und bestrahlt gezielt aber fraktioniert das Brustgewebe mit 55 Gray, um mögliche noch vorhandene Tumorzellen zu vernichten (42; 54).

Bei sehr kleinen Tumoren im Stadium T1, N0, M0, welche Er negativ sind, reicht nach, derzeitigem Stand die alleinige chirurgische Therapie aus (57). Ein niedriges Rezidivrisiko ist bei Frauen über 35 Jahren mit hormonrezeptorpositiven Tumoren von weniger als 2 cm Durchmesser, niedrigem Grading (G1) und tumorfreien Lymphknoten gegeben. Nur wenn alle diese Kriterien erfüllt sind, kann nach derzeitiger Einschätzung auf eine adjuvante Therapie verzichtet werden.

Als weitere Therapieoption besteht die Möglichkeit einer totalen Mastektomie. Bei dieser Operationsform wird der gesamte Brustkörper, einschließlich des Drüsengewebes und der regionalen Lymphknoten, komplett entfernt. Anschließend kann gegebenenfalls eine Nachbestrahlung erfolgen. Die Langzeitüberlebensraten gleichen denen bei brusterhaltender Therapie (55).

Die systemische Therapie des einzelnen Tumors ist abhängig von seinem Hormonrezeptor, sowie dem Wachstumsrezeptorstatus u.a. bei ca. 20-30% der invasive Mammakarzinom wird der humane epidermale Wachstumsfaktor HER2 überexprimiert (58). Diese Überexpression

führt zu einem schnellen, aggressiven Wachstum des Tumors. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin), welcher spezifisch HER2 bindet und somit das aggressive Wachstum des Tumors verlangsamt oder stoppt, ist es gelungen die krankheitsfreie Überlebenszeit in 50% der Frauen mit HER2 Überexpression zu verlängern (55; 59).

Seit der Einführung von Trastuzumab stieg die Inzidenz von Patientinnen mit Hirnmetastasen an (51). Für diesen Anstieg gibt es mehrere Erklärungsansätze. Eine Hypothese besagt, dass die Überlebenszeit der Patientinnen sich durch die Behandlung mit Trastuzumab so verlängert habe, dass sich das volle Krankheitsbild mit der Bildung von Hirnmetastasen ausbilden könne. Patientinnen welche dem Zeitraum vor der Entwicklung, der Trastuzumab Therapie erkrankt waren, hätten dieses Stadium der Erkrankung nicht erreicht, weil sie vorher verstorben wären. Einem anderen Ansatz zu Folge, könne Trastuzumab aufgrund seiner Molekülgröße nicht die Bluthirnschranke passieren, wo durch Hirnmetastasen unbehandelt wachsen könnten (51).

Im Regelfall bekommen Patientinnen mit HER2 positivem Tumor gleichzeitig oder im Anschluss an die Immuntherapie eine Chemotherapie um Rezidiven vorzubeugen (57). Weitere therapeutische Ansatzpunkte sind der Östrogenrezeptor (Er) und der Progesteronrezeptor (PrP), welche bei bis zu 60 % der Mammakarzinome vorkommen (60). Hormonrezeptor - positive Tumore sprechen sehr gut auf eine Therapie mit dem Antiöstrogen Tamoxifen im Anschluss an eine Chemotherapie an. Es konnte gezeigt werden, dass die 15-Jahresüberlebensrate bei Patientinnen, welche mit Tamoxifen behandelt wurden um ca. 30% stieg (55; 59). Im Gegensatz hierzu hatten Patientinnen mit negativem Hormonrezeptor keinen Benefit von der Behandlung mit Tamoxifen. Vor allem prämenopausale Patientinnen profitieren eher von einer chemotherapeutischen Behandlung (55; 59). Die adjuvante, chemotherapeutische Behandlung wird auch bei Patienten mit sogenannter triple-negativer Erkrankung (Prp negativ, Er negativ und HER2 negativ) angewendet, da diese eine hohe Rezidivneigung aufweisen (57).

In Fällen, in denen der Primärtumor zu groß ist oder sich in einer ungünstigen Position für eine Operation befindet, um ihn *in toto* zu entfernen, wird eine sogenannte neoadjuvanten Chemotherapie angewandt, welche den Tumor verkleinern soll, um diesen im Anschluss chirurgisch entfernen zu können.



Die Strahlentherapie gehört zu den lokal wirksamen adjuvanten, operativen Therapieformen (s.o.) und wird ebenfalls bei postmenopausalen Frauen (über 60 Jahren) im fortgeschrittenen Tumorstadium palliativ, zur Verbesserung der Lebensqualität, angewandt (57).

Eine chemotherapeutische Behandlung kommt bei Brustkrebs, je nach Tumorstadium und Grading, als adjuvante oder neoadjuvante Maßnahme in Frage. Die Chemotherapie als Monotherapie bei hauptsächlich hormonrezeptor-negativen Tumoren oder in Kombination mit einer endokrinen Therapie, bei positivem Hormonrezeptorstatus, kann sowohl das rezidivfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben in allen Altersgruppen bis zum 70 Jahre verbessern, wobei Frauen unter 50 Jahren am meisten profitieren (44; 57).

Eine Sonderform der Therapie wird beim *BRAC1* und *BRAC2* assoziiertem Mammakarzinom präventiv angewendet. Sie besteht in einer beidseitigen Mastektomie und Ovariectomie nach Abschluss der Familienplanung, da diese Mutationen ebenfalls mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Ovarialkarzinome vergesellschaftet sind. Beide Verfahren konnten das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken um bis zu ca. ~60-90% senken (42; 47).

### *Prognose*

Die Prognose ist im Vergleich zum oben erwähnten Bronchialkarzinom verhältnismäßig gut und liegt bei einer Überlebensrate von 83% bis 87%. (43) Bei einem Stadium T1, N0, M0 Mammakarzinom ohne Lymphknoteninfiltration besteht eine 5-Jahresüberlebensrate von ~90-100% (2). Demgegenüber hat eine Patientin mit einem Stadium IV eine 5-Jahresüberlebensrate von ~10-20% (2; 61).

Eine entscheidende prognostische Rolle spielt das Erkrankungsalter der Patientin. Postmenopausale Frauen haben eine deutlich bessere Prognose als Prämenopausale.

Es ist prognostisch entscheidend, ob der Tumor ER positiv oder negativ, Prp positiv oder negativ und Her2 positiv oder negativ ist. Tumoren deren Hormonrezeptor und/oder Wachstumsrezeptor positiv sind, haben durch ihr schnell fortschreitendes aggressives Wachstum an sich eine sehr schlechte Prognose und sind kombiniert mit einer sehr kurzen Überlebenszeit der Patientin. Durch die Behandlung mit Trastuzumab oder Tamoxifen ist es jedoch gelungen die partielle und komplette Remissionsdauer und die gesamt Überlebenszeit der Patientinnen zu verlängern (51).

Ein sehr wichtiger Faktor für die Prognose ist die Größe des Primärtumors. Tumoren mit einem Durchmesser unter 1 cm bei Erstdiagnose haben eine sehr gute Prognose. Im Gegensatz hierzu weisen Tumoren welche einen Durchmesser grösser 4 cm bei Erstdiagnose haben eine deutlich schlechtere Prognose auf (52). Dieses liegt wahrscheinlich darin begründet, dass kleine Tumoren in diesem frühen Stadium sehr selten metastasiert sind. Das Vorhandensein von Fernmetastasen und vor allem das Fehlen oder Vorhandensein von axillären Lymphknotenmetastasen ist der wohl zuverlässigste prognostische Marker (52). Beim Fehlen von Lymphknotenmetastasen beträgt die 5-Jahresüberlebensrate der Patientinnen ca. 80%. Im Gegensatz dazu sinkt die 5-Jahresüberlebensrate beim Befall von mehr als vier Lymphknoten auf ca. 20% ab. Es versterben ca. 20% der Patientinnen, welche zum Zeitpunkt der Diagnose mit tumorfreien Lymphknoten beurteilt werden an einem Rezidiv (52). In diesem Zusammenhang könnte der Nachweis von disseminierten einzelnen Tumorzellen in Lymphknoten und dem Knochenmark, welche für eine frühe Metastasierung sprechen, von Bedeutung sein. Diese Zellen wären zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors mit einer histologischen Routinediagnostik nicht detektierbar, könnten aber für eine spätere Metastasierung des bereits entfernten Primärtumors verantwortlich sein. (62; 63). Auch molekulare Veränderungen, wie eine Überexpression von Er oder HER2 oder eine Mutation in p53 spielen für die Prognose eine Rolle. Die histologische Einteilung erlaubt ebenfalls eine Aussage über die Prognose zu stellen. Gut differenzierte Tumoren (G1) neigen seltener zu metastatischem Verhalten als schlecht differenzierte (G3). Höhere Malignitätsgrade sind mit höheren Metastasenraten und somit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert. (52). Eine infauste Prognose besteht bei einer Metastasierung des Mammakarzinoms in das Gehirn. Diese geschieht bei ~5-20% der Patientinnen (Vgl. TAB. 2) (20; 2).

### **1.1.3 Kolorektales Karzinom**

Das kolorektale Karzinom ist, nach der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID), im Jahr 2009 in Deutschland für ca. 64.000 Neuerkrankungen verantwortlich gewesen. Dieses entspricht einem Anteil von ~14% aller Krebserkrankungen beim Mann und ~13% bei der Frau (1). Mit ca. 17.000 Todesfällen im Jahr 2010 (~7-8% aller Sterbefälle durch bösartige Neubildungen) stellt das kolorektale Karzinom derzeit, die zweithäufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Krebstodesursache in Deutschland dar

(4). In Europa beträgt die Inzidenz ~ 15-35/100.000. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern zu erkennen (2; 64).

Das mittlere Erkrankungsalter für Männer in Deutschland liegt bei 69 Jahren, wohingegen Frauen im Mittel sechs Jahre später erkranken (mit 75 Jahren). Die Erklärung für die spätere Erkrankung von Frauen könnte in der Hormonreplacement Therapie postmenopausaler Frauen liegen. Diese kann jedoch aufgrund von einem erhöhten Risikos für Thrombosen, wie eines Mamma- oder Ovarialkarzinoms nicht zur Prophylaxe empfohlen werden (65). Überdies konnte festgestellt werden, dass Frauen die mit einer Progestin und Östrogen Kombination behandelt wurden, zum Diagnosezeitpunkt ein deutlich weiter fortgeschrittenes Stadium aufwiesen als Frauen, die mit Placebo behandelt wurden (66).

Seit den achtziger Jahren bis Ende der neunziger Jahre konnte eine deutliche Zunahme der Erkrankungen registriert werden (bei Männern um ~34%, bei Frauen um ~26%). Seit ca. zehn Jahren lässt sich jedoch bei beiden Geschlechtern ein konstantes Niveau an Neuerkrankungen verzeichnen. Im Unterschied zu der Entwicklung der Inzidenz, nehmen die Sterberaten jedoch bei beiden Geschlechtern in allen Altersbereichen beständig ab, welches mit einer verbesserten Früherkennung der Erkrankung und einer früheren Therapie begründet wird (64). Es werden heutzutage pro Jahr doppelt so viele Erkrankungen entdeckt, wie noch zu Beginn der 1980er-Jahre. Bei Frauen konnte sogar ein absoluter Rückgang der Sterbefälle verzeichnet werden. Dieser Rückgang wurde bei Männern nur durch eine noch stärkere Zunahme über 65-jähriger verhindert (43).

### *Ätiologie*

Kolonkarzinome mit Ausnahme der Rektumkarzinome lassen sich in hereditäre und sporadisch entstandene Tumoren unterteilen. Etwa ~5-20% aller Kolonkarzinome sind auf familiäre, genetische Dispositionen zurückzuführen (67). Für etwa ~5-10% aller Kolonkarzinome ist das hereditäre, nicht- polyposis assoziierte Kolonkarzinom (HNPCC) verantwortlich. Dieses tritt meist im 4.-5. Lebensjahrzehnt auf und ist zu 60-70% im proximalen Kolon, bis zur linken Kolonflexur lokalisiert (52; 67). Das kumulative Lebenszeitrisiko von HNPCC- Anlageträgern an einem Kolonkarzinom zu erkranken liegt bei ~60-80% (65). Phänotypisch ist das HNPCC unauffällig, daher wird seine Diagnose anhand von Kriterien gestellt, welche sich auf das vermehrte Vorkommen von Kolonkarzinomen bei näheren Verwandten und deren frühes Erkrankungsalter stützen (Amsterdam Kriterien) (65). Die Ursache für das HNPCC liegt in Mutationen von Genen (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1*

und *PMS2*), welche für DNA-Reparaturenzyme kodieren. Bei Mutationen in den beschriebenen Genen entstehen durch die nicht funktionsfähigen DNA-Reparaturenzyme Basenfehlpaarungen und folglich Replikationsfehler. Diese Replikationsfehler treten vor allem in repetitiven Sequenzen auf und lassen sich als sogenannte Mikrosatelliteninstabilität nachweisen. In der Entstehung von Kolonkarzinomen scheinen diese nicht korrigierten Replikationsfehler wahrscheinlich eine entscheidende Rolle zu spielen (52).

Eine weitere hereditäre Form ist die familiäre, adenomatöse Polyposis (FAP) sie ist für ~ 1% der Kolonkarzinome verantwortlich. Die Ursache ist eine Mutation im *APC*-Tumorsuppressorgen. Klinisch manifestiert sich die FAP durch das Auftreten von multiplen Kolon-Polypen in der zweiten Lebensdekade, welche als Präkanzerosen anzusehen sind. Unbehandelt entwickeln die Patienten im Durchschnitt im vierten Lebensjahrzehnt ein Kolonkarzinom (67). Aufgrund des multiplen Auftretens der Polypen liegt das Karzinom Lebenszeitrisiko bei Patienten mit FAP bei ~90-100% (2).

Die sporadischen Kolonkarzinome lassen sich in zwei Untergruppen einteilen. Zum einen die Mikrosatelliteninstabilen (MSI) Kolonkarzinome (~ 10-15%) und zum anderen in die Chromosomal instabilen Kolonkarzinome (~80-85%) (52; 68). Die sporadischen MSI Karzinome sind meist auf einen epigenetischen Defekt in Form eines Expressionsverlustes (durch Promoter-hypermethylierung) des DNA-Mismatch-Reparatur-Proteins MLH1 zurück zu führen (52). Im Gegensatz hierzu finden sich bei den chromosomal instabilen sporadischen Karzinomen Deletionen, Amplifikationen, Translokationen und DNA-Aneuploidie in den Tumorsuppressorgen, wie *APC*, *TP53* und *DCC/SMAD4*, sowie im Onkogen *KRAS* (52; 68). Die Inzidenz sporadischer Kolonkarzinome nimmt mit dem 50. Lebensjahr deutlich zu (65). Die meisten Erkrankungen treten zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auf (2; 64). Eine entscheidende Rolle in der Ätiologie des sporadischen Kolonkarzinoms spielt die körperliche Bewegung. Personen mit höherer körperlicher Aktivität weisen im Gegensatz zu Personen mit niedriger körperlicher Aktivität, weniger Kolonpolypen und ein niedrigeres Karzinomrisiko auf. Ein ebenfalls erhöhtes Risiko besteht bei übergewichtigen Personen, vor allem bei Männern (65; 69). Die genaue Ursache, für das erhöhte Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken, bleibt jedoch unklar, da sich nicht genau unterscheiden lässt ob das Übergewicht, die fehlenden körperliche Aktivität oder das Essverhalten die Hauptursache ist (65). Das Rauchen und ein übermäßiger Alkoholkonsum erhöhen ebenfalls das Risiko zu erkranken (70). Eine ballaststoffarme-, gemüsearme und fettreiche Ernährung sowie der tägliche Verzehr von verarbeitetem rotem Fleisch, sind ebenso mit einem erhöhten Risiko für die

Entstehung von Kolonkarzinomen assoziiert (65; 71). Patienten, welche an einer Colitis ulcerosa erkranken haben ferner ein gesteigertes Risiko im Laufe ihres Lebens zu erkranken (65).

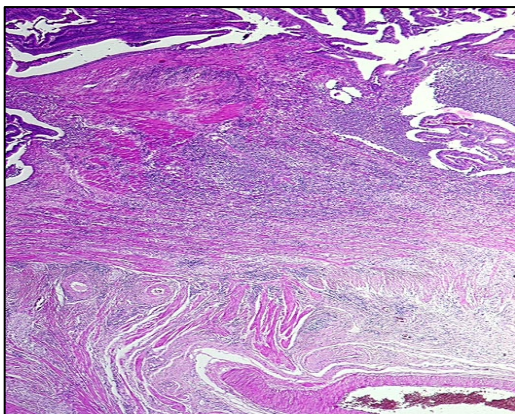
Eine Hirnmetastasierung des kolorektalen Karzinoms ist, im Vergleich mit den bereits beschriebenen Bronchial- und Mammakarzinomen, mit ~5% ein seltener Prozess (vgl. Tab. 3) (72). Im Falle des Auftretens ist die Erkrankung jedoch mit einer infausten Prognose verbunden.

Ort	Gehirn	Knochen	Leber	Lunge
Metastasierungshäufigkeit in %	5%	5%	75%	15%

**Tabelle 3 Metastasierungsmuster des Kolonkarzinoms, nach DKFZ Heidelberg( DKFZ Heidelberg 1999)**

### *Histopathologie*

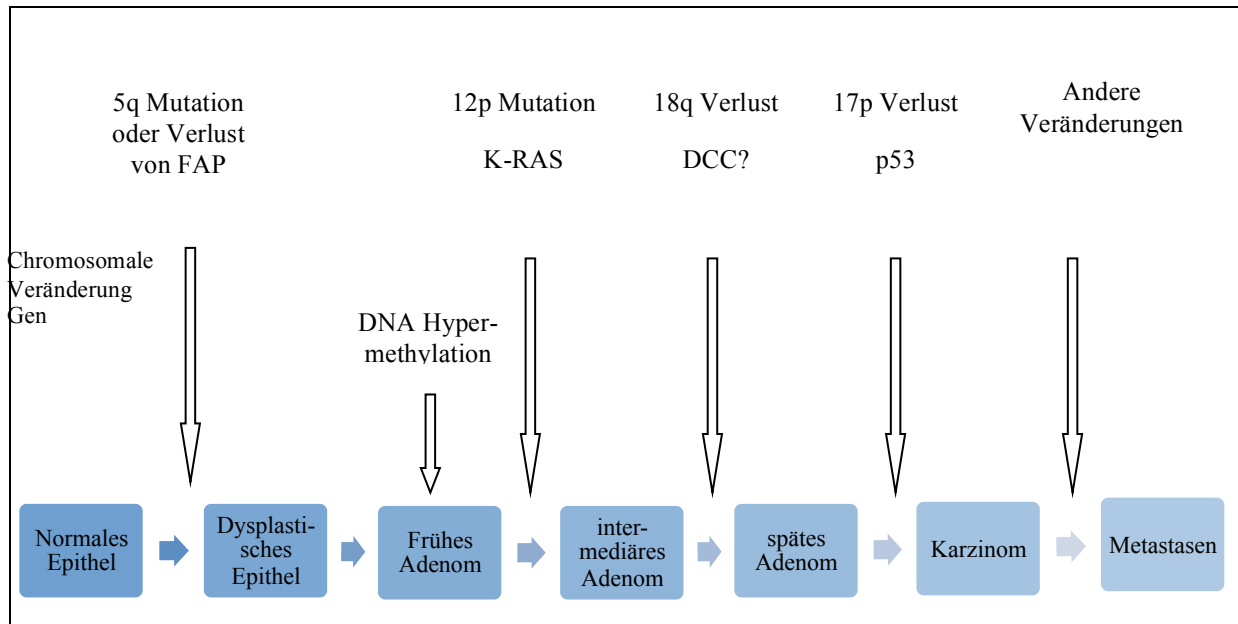
Bei den Kolonkarzinomen handelt es sich um maligne, epitheliale Tumoren der Mukosa, die sich durch ein infiltratives Wachstums durch die Submukosa sowie die tieferen Wandschichten und in die umliegenden Organe auszeichnen (Vgl. Abb. 4) (52).



**Abbildung 4 Adenokarzinom pT2 ©PathoPic, Universität Basel (Pic n.d.) (27)**

Histologisch gesehen sind ~90-95% aller Kolonkarzinome Adenokarzinome. ~2-7% sind Karzinoide und ca. ~1% sind andere Tumore wie z.B. Sarkome und hämatologische Neoplasien, die hier nicht weiter erläutert werden sollen (2; 68).

Über 90% aller Kolonkarzinome entwickeln sich aus einem Adenom (Adenom-Karzinom-Sequenz). Dabei wird aus normalem Mukosagewebe über die Bildung eines benignen Adenoms, ein dysplastisches Gewebe, aus dem anschließend ein Karzinom entstehen kann.



**Abbildung 5** In Anlehnung an das genetische Modell der kolorektalen Tumorgenese nach VOGELSTEIN 1990 (Fearon and Vogelstein 1990) (73)

Die Adenom-Karzinom-Sequenz ist wahrscheinlich auf verschiedene Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen zurück zu führen. Diese Gene haben spezifische Überwachungsfunktion im Zellzyklus und werden durch Mutationen funktionsunfähig. Daraus resultiert, dass diese Zellen nicht in die Apoptose gehen, sondern sich ohne zelleigene Kontrollmechanismen weiterentwickeln und wachsen (Vgl. Abb. 5). Dabei ist von Bedeutung das 90% aller Adenome sich nicht in ein Karzinom umwandeln (71).

Kolonkarzinome sind zu ~50% im Sigma und zu jeweils ~25% im Coecum und Kolon ascendens / Kolon transversum lokalisiert (2). Makroskopisch zeigen sich polyplioide (exophytisch) oder ulzerierende (endophytisch) oder diffus infiltrierend wachsende Tumoren. Mikroskopisch handelt es sich um Drüsenverbände, welche von Nekrosen durchsetzt sind. Das Stroma ist desmoplastisch verändert (52).

Im Gegensatz zum Kolonkarzinom sind die Rektumkarzinome zu ~70-80% Plattenepithelkarzinome (52). Das Rektumkarzinom wird dadurch definiert, dass sein Abstand zur Anorektallinie, gemessen mit einem starren Rektoskop, nicht mehr als 16 cm betragen darf. Alle darüber liegenden Karzinome sind Kolonkarzinome (65).

Das histologische Grading des Kolonkarzinoms wird in vier Stadien eingeteilt. Stadium G1 beinhaltet die gut differenzierten Tumore, Stadium G2 die mäßig differenzierten Tumore, Stadium G3 die schlecht differenzierten Tumore und Stadium G4 die undifferenzierten Tumore. Das Grading dient einer Einteilung in „Low-risk“ Kolonkarzinom im Stadium G1, G2 ohne Lymphgefäßeinbrüche und „High-risk“ im Stadium G3, G4 mit Lymphgefäßeinbrüchen (65). Auch hier erfolgt die histologische Einteilung nach der internationalen TNM-Klassifizierung (Vgl. Anhang III).

Ein weiterer histologischer Untersuchungspunkt ist die Invasionstiefe der Submukosa am Operations- bzw. Polypektomiepräparat. Tumore, welche eine Invasionstiefe unter 1000µm aufweisen, haben eine deutlich reduzierte Lymphknotenmetastasierungsrate (~0-6%) im Vergleich zu Tumoren, die eine Invasionstiefe grösser 1000µm aufweisen. (~20%) (65).

### *Symptome und Diagnose*

Das kolorektale Karzinom verursacht erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium Symptome. Dieses äußern sich in einem Gewichtsverlust von über 10% des Körpergewichts in sechs Monaten, Blut oder Schleim Auflage auf dem Stuhl, veränderte Stuhlgewohnheiten z.B. Obstipation abgewechselt mit Diarrhö oder Flatulenz (64).

Die Diagnose des kolorektalen Karzinoms erfolgt zum einen durch Screening Tests, wie dem Hämokulttest, welcher es ermöglicht im Stuhl okkultes Blut nach zu weisen. Zum anderen mit technischen Methoden, wie der Koloskopie(70). Mit Hilfe des Hämokulttestes konnte eine Senkung der durch das kolorektale Karzinom verursachten Mortalität von ~15-30% erreicht werden (65). Der Screening Goldstandard in Deutschland bei asymptomatischen Personen ab dem 50. Lebensjahr ist die Koloskopie. Sie zeichnet sich durch die höchste Spezifität, und Sensitivität für das Diagnostizieren eines kolorektalen Karzinoms aus und ist Diagnose und Operationsinstrument zugleich. Die Inzidenz, wie auch die Mortalität konnte durch frühzeitige Polypektomie um ~60-90% gesenkt werden (65; 70). Das Ziel einer Koloskopie sollte ein Polypen-freier Darm sein, da Polypen als Präkanzerose einzustufen sind. So weisen Polypen von über 1 cm Größe zu ~ 1% ein invasives Karzinom auf (65). Mit Hilfe der Koloskopie können 0,5-1% der Kolonkarzinome und 5-10% fortgeschrittene Neoplasien aufgefunden und entfernt werden. Im Weiteren wird die Diagnose durch den Arzt in Form von regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen (Digitalrektalenuntersuchung) gestellt. Diese ermöglicht die Detektion von weit distal liegenden tastbaren Polypen oder blutenden Ulzerationen (Tumoren) im Darm (70).

### *Therapie*

Die primäre Therapieform des Kolonkarzinoms besteht in der chirurgischen Entfernung des betroffenen Darmabschnittes und seiner zugehörigen Lymphknoten, sowie versorgenden Gefäßen (Hemikolektomie), welche in 90% der Fälle angewandt wird. Bei einem R0 resezierten Tumor im UICC Stadium 1 (T1/T2, N0, M0 /G1-G2) ist die alleinige, chirurgische Therapie ohne Nachbehandlung ausreichend (64; 65). Im Stadium 2 mit einem kurativem Therapieziel kann nach der total Resektion des Tumors eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden: Anhand der Datenlage verschiedener Studien konnte jedoch keinen signifikanten Vorteil im Überleben der Patienten nach adjuvanter Therapie festgestellt werden (65). Im Stadium UICC 3 mit R0 reseziertem Primärtumor ist eine adjuvante Chemotherapie mit Oxaliplatin, 5 Fluoropyrimidin und Folsäure indiziert, dies soll mögliche Rezidive verhindern. (65). Ein Befall von Nachbarorganen durch ein kolorektales Karzinom schließt eine kurative Operation des Patienten nicht aus. Die Überlebensraten einer Enblock-Operation mit Entfernung aller tumorinfiltrierten Strukturen gleichen denen von einer alleinigen Hemikolektomie (64).

Etwa 30-40% der Patienten mit kolorektalen Karzinomen werden zum Diagnosezeitpunkt als primär irresektabel eingestuft. Mit Hilfe einer neoadjuvanten Chemotherapie gelang es irresektabel große Lebermetastasen so zu verkleinern, dass die Patienten anschließend R0 reseziert werden konnten. Die Patienten wiesen im Anschluss eine 5-Jahresüberlebensquote von ~50% auf (65). Patienten mit einem irresektablen Kolonkarzinom im Stadium 4 oder mit multiplen Fernmetastasen sollten mit einer alleinigen, systemischen Chemotherapie behandelt werden (65). Eine Bestrahlung des Kolons ist ebenfalls als palliative Maßnahme möglich (64).

Die Therapie des Rektumkarzinoms ist im T1/2 N0, M0 Stadium primär eine alleinige chirurgische Therapie. Die anderen Stadien werden vor allem mit Hilfe der Strahlentherapie behandelt (64).

### *Prognose*

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms lässt sich anhand der Fernmetastasierung des Tumorstadiums, der Differenzierung, der Infiltration von venösen Gefäßen und der Tumorlokalisation ermitteln (64). Eine besondere prognostische Bedeutung nimmt hier die Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose ein, welche bei ~30-40 % der Patienten vorliegt. Sie ist verbunden mit einer besonders schlechten Prognose (64).



Patienten mit einem distalen Rektumkarzinom weisen im Gegensatz zu Patienten mit einem Kolonascendenskarzinom eine deutlich schlechtere Prognose auf. Diese lässt sich anhand der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms erklären, welche sich nach ihrer arteriellen Versorgung sowie nach ihrem lymphogenen bzw. venösen Abflussgebiet richtet. Das Blut fließt aus dem distalen Rektum über den paravertebralen Venenplexus ab und gelangt somit direkt über die *V. iliaca communis* in die untere Hohlvene. Dabei werden der Portale-Kreislauf und damit die Leber umgangen. Auf diese Weise können disseminierte Tumorzellen direkt in die Lunge oder andere Organe metastasieren. Im Gegensatz hierzu metastasieren die Kolonkarzinome alle primär in die Leber, da das venöse Blut aus dem gesamten Kolon in die *V. Portae* und von dort in die Leber fließt. Das zweite nachgeschaltete Organ im venösen Kreislauf ist die Lunge, welche ebenfalls eine hohe Metastasierungsrate aufweist (vgl. Tab 3).

Die durchschnittliche 5-Jahresüberlebensraten bei einem Kolonkarzinom liegen in Deutschland für beide Geschlechter momentan bei ~60% (43). Die 5-Jahresüberlebensrate bei einem Kolonkarzinom im UICC Stadium 1 (T1/T2 N0, M0) liegt bei ~90-100%. Im Stadium 2 T3/T4 N0,M0 bei ~60-80%. Im Gegensatz hierzu liegt die 5-Jahresüberlebenskurve bei einem UICC Stadium IV Darmkrebs bei unter 10 % (2; 64). Im Gegensatz hierzuliegt die 5-Jahresüberlebensrate bei einem Rektumkarzinom im UICC Stadium IV bei begrenzter hepatischer Metastasierung nach kurativer Operation bei 20 - 40% (2).

## 1.2 Allgemeine Metastasierungskaskade

Die Metastasierung von Primärtumoren in sekundäre Organe ist ein mehrstufiger, komplexer Prozess, welcher sowohl lymphogen wie hämatogen erfolgen kann. Zu Beginn der Metastasierung lösen sich einzelne Tumorzellen aus dem Gewebeverband des Primärtumors (74; 62). Dieses geschieht durch die Bildung von proteolytischen Enzymen, wie Matrixmetalloproteasen und dem Verlust von Zelladhäsionsmolekülen wie z.B. E-Cadherin (75; 76). Nach Invasion und Penetration des Bindegewebes und mit Hilfe der Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) gelangen die Tumorzellen in die Lymph- bzw. Blutbahn. (Intravasation) (vgl. Abb. 6) (76). Hier sind sie starken Scherkräften und dem humorem Immunsystem sowie der tumoriziden Wirkung des Blutes ausgesetzt. Um sich vor diesen letalen Faktoren zu schützen, umgeben sich die Tumorzellen mit einem Tumorzellembolus bestehend aus Fibrin und Thrombozyten (52). Des Weiteren müssen die Tumorzellen die Fähigkeit besitzen die Apoptose zu umgehen ohne dabei in Kontakt mit anderen Zellen zu

stehen (77). Mit Hilfe von Adhäsionsproteinen wie z.B. Selektinen und Integrinen finden sie Anbindung an das Kapillarbett anderer sekundärer Organe (78). Eine solide Metastase kann sich erst nach dem Durchwandern der einzelnen Tumorzellen des Endothels, der Basalmembran (Extravation), des Bindegewebe (Invasion) und der Aktivierung der Proliferation bilden (Vgl. Abb.6).

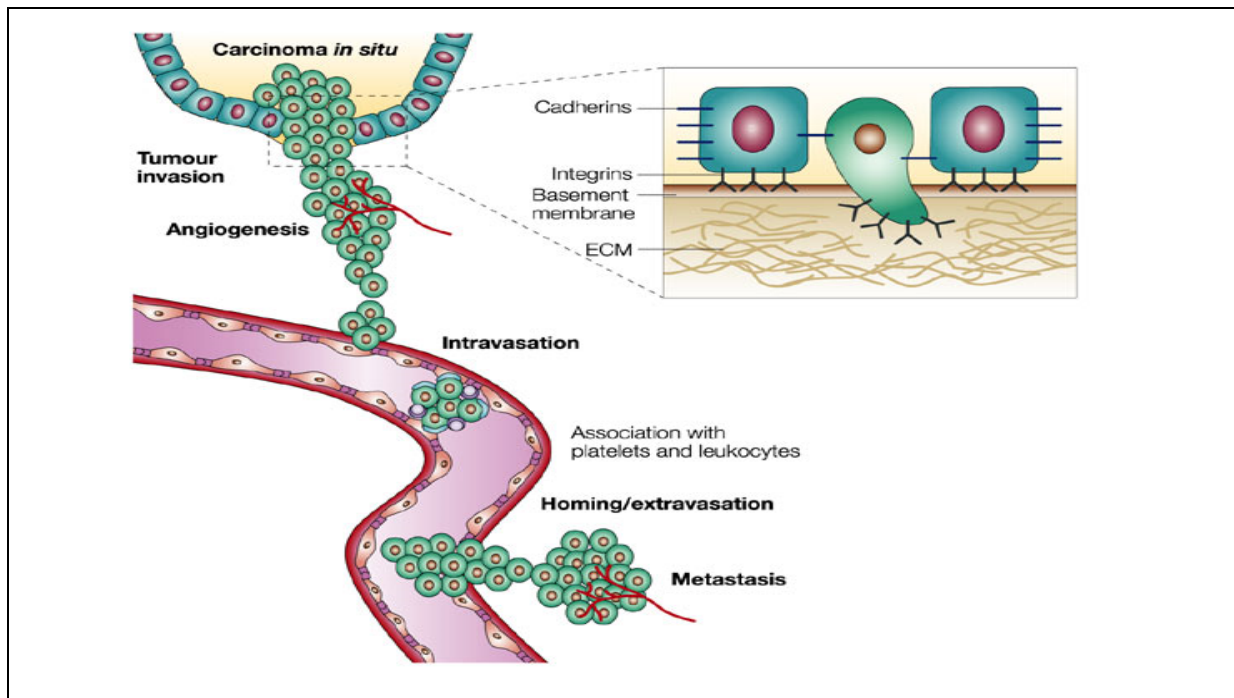


Abbildung 6 Metastasierungskaskade. Aus: Guo, Wenjun und Giancotti, Filippo G. Integrin signalling during tumour progression, Nature Reviews. Molecular Cell Biology 5: 816-826 (Oktober 2004) (79)

Die Bildung einer soliden Metastase kann direkt nach der Extravation geschehen oder aber erst nach einer Latenzzeit. In dieser Latenzzeit (Dormancy) durchlaufen die Zellen weder eine Proliferation noch eine Apoptose (80; 81). Die Faktoren, welche für die Dormancy und ihre Aufrechterhaltung oder Beendigung und die Wiederaktivierung der Tumorzelle und Bildung einer soliden Fernmetastase verantwortlich sind, sind bis heute unklar.

### 1.3 Hirnmetastasierung und Bluthirnschranke

Hirnmetastasen stellen Absiedelungen solider extrazerebraler Tumoren in das Zentralnervensystem und dessen Häute dar. Sie können solitär, rein intrakraniell oder auch singular, oder zusätzlich extrakraniell und multipel auftreten. Bei der Mehrheit der Patienten mit Hirnmetastasen liegt eine disseminierte Erkrankung vor. In der Hälfte der Fälle liegt gleichzeitig ein lokal nicht mehr kontrollierbarer Primärtumor vor (20).

Eine wichtige Bedeutung im Zusammenhang mit der Hirnmetastasierung hat die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Sie stellt eine selektive Transportbarriere zwischen dem vaskulären System und dem zentralen Nervensystem dar (51). Die BHS ist für hydrophile Substanzen undurchlässig. Gase passieren sie unselektiv. Die Aufgabe der BHS ist es, zu verhindern, dass Wirkstoffe, wie z.B. die Hormone Adrenalin oder Noradrenalin, welche physiologisch im Blutkreislauf zirkulieren, in das feinabgestimmte System der synaptischen Übertragung des Zentralnervensystems gelangen. Die BHS verhindert durch ihr „Filterfunktion“ das viele Chemotherapeutika und Medikamente, wie z.B. Herceptin in das Gehirn gelangen können. Anatomisch besteht die Bluthirnschranke aus dem Kapillarendothel, der Basallaminae von Kapillaren und Gliagrenzmembranen (meist miteinander verschmolzen) sowie der Gliagrenzmembran aus Astrozytenendfüßchen. Die eigentliche Diffusionsbarriere stellt das Kapillarendothel dar, dessen Endothelzellen durch tight junctions miteinander verbunden sind, welche das Endothel abdichten. Der Transport von lebenswichtigen Stoffen in das zentrale Nervensystem (ZNS) gelingt durch spezifische Transportsysteme, welche das Endothel passieren können. Ein transzellulärer Transport durch die BHS existiert nicht (82). Bis heute ist nicht bekannt, wie es einzelnen Tumorzellen gelingt, die BHS zu überwinden.

### *Ätiologie*

Die Inzidenz von Hirnmetastasen ist 10mal höher als die von primären Hirntumoren. Bei etwa 20-40% aller Patienten mit einer systemischen Krebserkrankung treten im Verlauf Hirnmetastasen auf (20; 83). Etwa 20-30% aller Patienten mit peripheren Karzinomen entwickeln zerebrale Metastasen (20). Am häufigsten mit ~40-60% metastasiert das Bronchialkarzinom in das Gehirn, gefolgt vom Mamakarzinom mit ~5% (84; 85). An dritter Stelle mit ~10-20% folgen Primärtumoren, deren histologische Herkunft nicht geklärt ist (unknown primary tumor) (20). Sie stellen eine besondere Anforderung an die Diagnostik dar. Des Weiteren metastasieren das maligne Melanom (~10%) und Tumoren des Gastrointestinaltraktes (~5%) in das Gehirn.

### *Symptome und Diagnose*

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen bereits 50% der Patienten multiple Hirnmetastasen auf. Als Initialsymptome manifestieren sich hauptsächlich Kopfschmerzen, Hemiparesen und organische Psychosyndrome. Ebenfalls wird von epileptischen Anfällen, Hirnnervenparesen und Hirndruckzeichen berichtet. Bei Auftreten von klinisch neurologischen Symptomen im Rahmen eines bekannten Tumorleidens sollte als bildgebende Maßnahme eine Magnetresonanztomographie des Schädels mit und ohne intravenöse Kontrastmittel

durchgeführt werden. Alternativ kann auch eine Computertomographie wertvolle Informationen liefern (20; 86). Die Entscheidung über eine Therapieform ist abhängig vom Alter, Allgemeinzustand und dem Metastasierungsstatus des Patienten. Bei einer schlechten Prognose verbleibt meistens die alleinige symptomatisch medikamentöse Therapie. Bei einem Patienten mit gutem Allgemeinzustand und stabilem Metastasierungsstatus stehen zusätzliche Therapieformen in Form von Operation, Radiochirurgie, Radiotherapie oder Chemotherapie zur Verfügung (20).

Eine operative Therapie der Hirnmetastasen wird meist bei Eintreten von Symptomen, wie Epilepsie oder starken Kopfschmerzen durchgeführt. Die meisten Chemotherapien bleiben wirkungslos da sie nicht über die Bluthirnschranke gelangen (87).

### *Prognose*

Das mittlere Überleben nach Diagnosestellung beträgt einen Monat ohne Therapie und zwei Monate bei alleiniger symptomatische Steroidbehandlung. Eine Ganzhirnbestrahlung führt bei ~70% der Patienten zu einer Verbesserung des Neurostatus und verlängert das mediane Überleben auf 3-6 Monate. Bei einer Kombination von radiochirurgischer Resektion und Ganzhirnbestrahlung bei singulären Metastasen verbessert sich das Überleben um weitere 6-9 Monate.

## **1.4 Chromosomale Veränderungen in Primärtumoren**

Chromosomale Mutationen lassen sich in intra- und interchromosomale Mutationen unterteilen. Erstere zeichnen sich durch einen Umbau innerhalb eines Chromosomen aus, letztere durch Umbauvorgänge zwischen verschiedenen Chromosomen. Zu den strukturellen Chromosomenmutationen gehören die Translokationen, Inversionen, Ringchromosomen, Isochromosomen, Insertionen, Amplifikationen und die Deletionen. Amplifikationen und Deletionen stellen eine Veränderung der DNA-Kopienzahl dar. Durch diese kann es zu einer Aktivierung von Onkogenen oder zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommen (22; 88).

### *Nachweis von Kopienzahlveränderungen mittels der CGH*

Der Nachweis von DNA Kopienzahlveränderungen wird mit Hilfe der Comperativen Genetischen Hybridisierung (CGH-Array) erbracht. Diese Methode, die Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts entwickelt wurde, basiert auf der Hybridisierung von

Methaphasechromosomen (7). Grundlage der Methode ist die gleichzeitige Hybridisierung von einer Test DNA (Tumor DNA) und einer Referenz DNA (tumorfremde, normale DNA), welche mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Diese Hybridisierung lässt sich, wie beschrieben, auf Metaphasechromosomen oder auf Mikroarrays mit cDNA-, BAC-Klone oder Oligonukleotiden durchführen. Im Anschluss an die Hybridisierung werden die Arrays gescannt und die Intensität der Fluoreszenz gemessen. Anhand des Fluoreszenzintensitätsverhältnisses aus Tumor DNA zur Referenz DNA lassen sich mögliche chromosomale Imbalancen erkennen. Der beschriebene Vorgang der Metaphasechromosomen Hybridisierung entspricht dem klassischen CGH-Array, welcher jedoch eine geringe Auflösung aufweist. Chromosomale Veränderungen, welche bis zu 5-10 Mb (Megabasen) groß oder kleiner sind, können von der klassischen CGH nicht detektiert werden (88). Eine Weiterentwicklung der klassischen CGH-Array stellt die Microarray-CGH dar. Sie deckt mit mehreren zehntausenden bis hundertausenden Oligonukleotiden, das gesamte menschliche Genom ab (84). Für spezifische Tumorentitäten existieren charakteristische Amplifikationen (high level amplifications). Diese Amplifikationen führen zu einer Aktivierung spezifischer Onkogene wie z.B. bei Brustkrebs *Myc* (8q24), *HER2* (17q12) und *Cyclin D1* (11q13), Lungenkrebs *EGFR* (7p12), *Myc* (8q24) und *cMet* (7q31), *CDK4* (12q14) (7; 88) Spezifische Deletionen in Tumorsuppressorgenen wie z.B. *RASSF1A*, *FUS1* (3p21, 3), *FHIT* (3p14, 2), *P16* (9p21) und *P53*(17p13) treten ebenfalls auf (22; 88).

Anhand einer auf chromosomaler CGH beruhenden Datenbank der Universität Zürich ([www.progenetix.com](http://www.progenetix.com)), werden die Frequenzen der Amplifikationen (gelb, rechts) und Deletionen (blau, links) in den drei Tumorentitäten Kolon, Brust, und Lunge folgend in drei Abbildungen dargestellt (vgl. Abb.7; 8; 9). Anhand der Daten, soll ein späterer Vergleich mit den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Hirnmetastasen ermöglicht werden.

Die Abbildung 7 beschreibt Amplifikationen und Deletionen von 1333 Mammakarzinom-Primärtumoren während Abbildung 8 Amplifikationen und Deletionen von 449 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom Primärtumoren darstellt. Die Abbildung 9 bezieht sich auf 735 Kolonprimärtumoren.

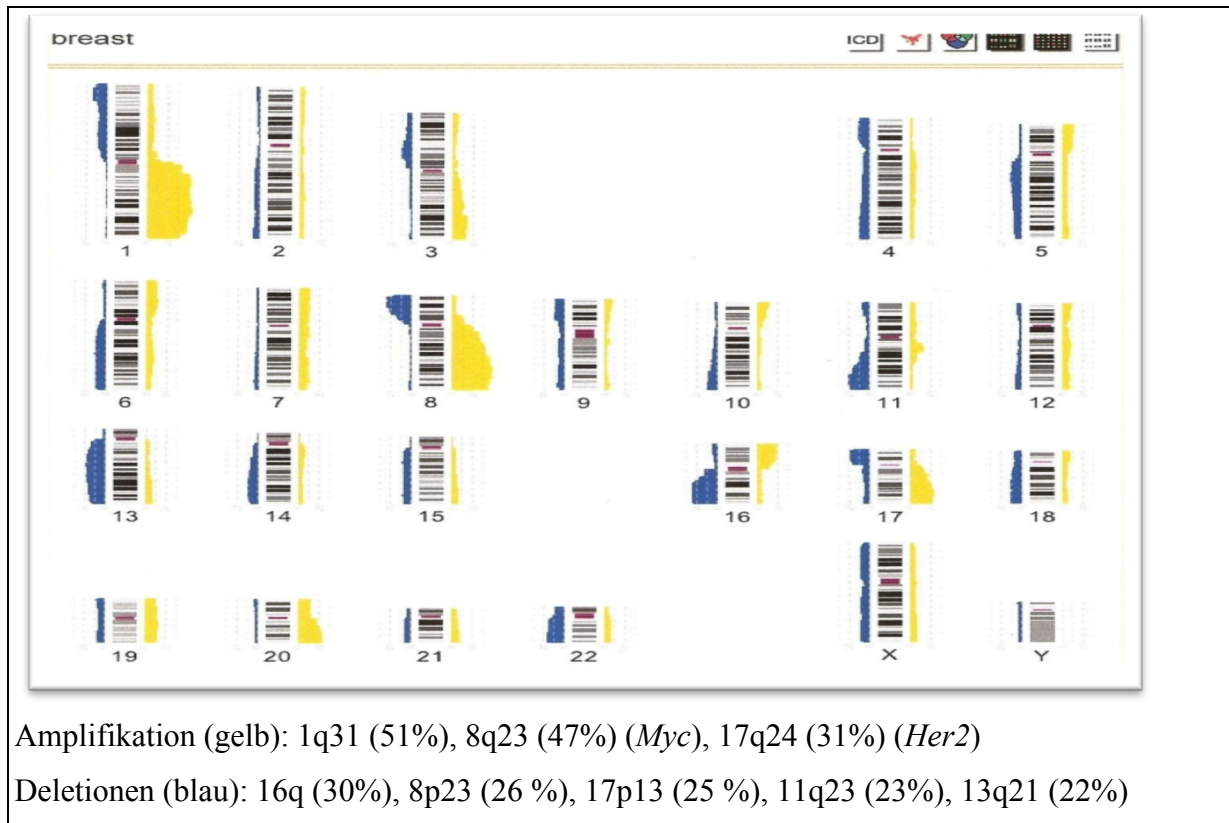


Abbildung 7 Amplifikations- und Deletionsmuster in 1333 Mammakarzinomen, Quelle: www.progenetix.com (Uni Zürich) (89)

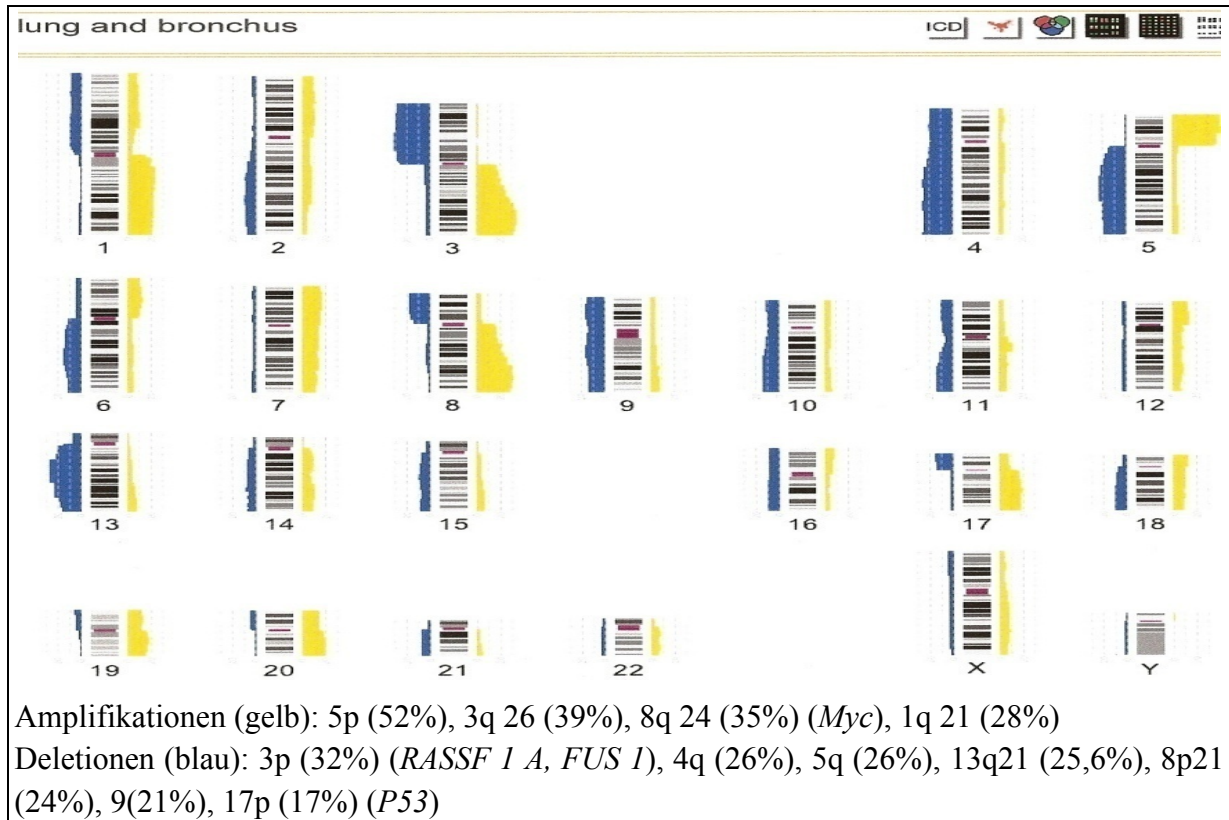
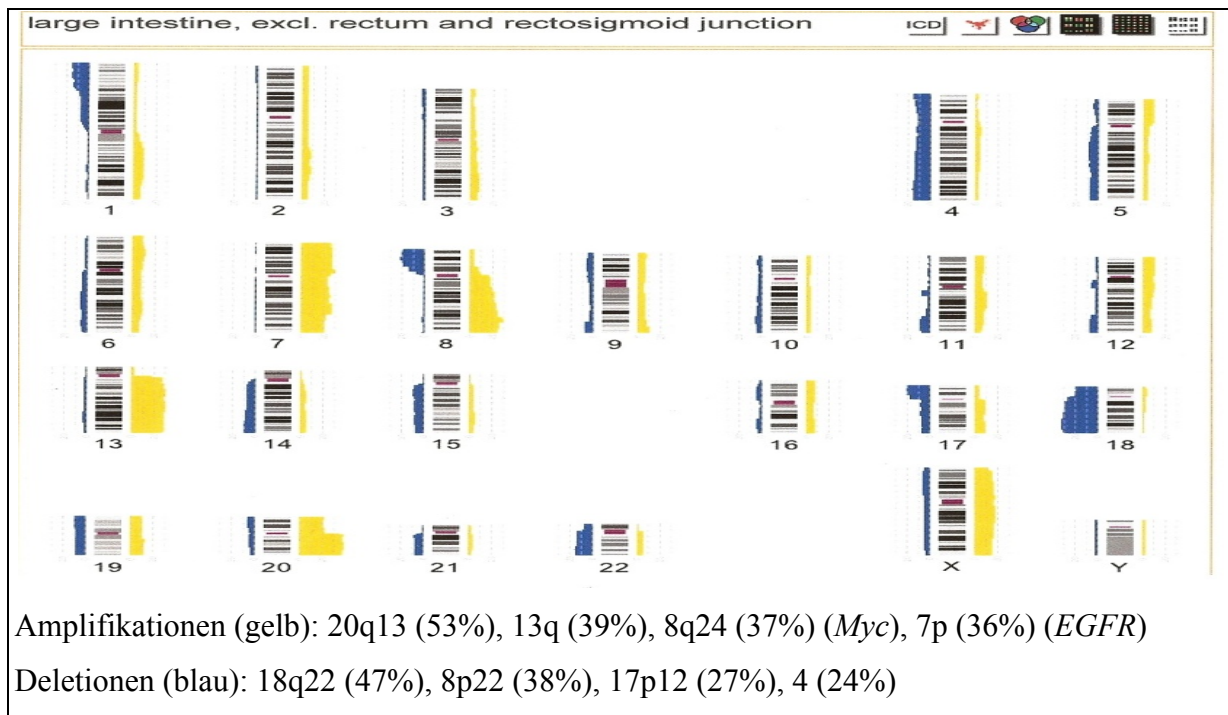


Abbildung 8 Amplifikations- und Deletionsmuster von 449 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Quelle: www.progenetix.com (89)



**Abbildung 9** Amplifikations- und Deletionsmuster in primären 735 Kolontumoren, Quelle: ([www.progenetix.com](http://www.progenetix.com)) (89)

Es wurden bis zum heutigen Tage viele Untersuchungen an Primärtumoren mittels der klassischen CGH-Array Methode durchgeführt und entsprechende DNA-Zugewinne und DNA-Verluste in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen wie oben beschrieben gefunden (90). Dennoch sind viele spezifische Regionen und ihr entsprechenden Funktionen weiterhin unbekannt. Für Hirnmetastasen existieren bis heute nur wenige vergleichbare Analysen, welche meist mit einer klassischen CGH-Array Methode durchgeführt wurden.

## 1.5 Arbeitshypothese und Fragestellung

Krebserkrankungen sind heutzutage, nach den Herz-Kreislaufkrankungen, für die meisten Todesfälle in der westlichen Welt verantwortlich. Im Jahr 2010 wurden über 25% aller Todesfälle in Deutschland (218.889 Personen) durch ein Krebsleiden verursacht. Die drei in dieser Arbeit verwendeten Tumorentitäten, Mamma-, Kolorektal-, und Bronchialkarzinom, nehmen hier einen besonderen Stellenwert ein. Sie waren im Jahre 2010 für ca. 1/3 aller Krebs bedingten Todesfälle in Deutschland verantwortlich (4).

In der jüngeren Vergangenheit konnten auf dem Gebiet der kurativen Primärtumorthherapie große Fortschritte erzielt werden. Ein großer Teil der durch Krebs verursachten Todesfälle ist jedoch nicht durch den Primärtumor selbst, sondern durch seine Metastasierung bedingt. Die Metastasen sind der häufigste Grund für krebssbedingte Todesfälle in der westlichen Welt (91). In der Behandlung von einzelnen Metastasen werden zunehmend speziell auf sie abgestimmte, wirkungsvolle Therapieansätze entwickelt (86). Die Behandlung von Hirnmetastasen stellt in diesem Kontext eine besondere medizinische Herausforderung dar. Hirnmetastasen sind mit Abstand die häufigsten intrakraniellen Tumore, welche mit einer infausten Prognose, hoher Mortalität und kurzer Überlebenszeit assoziiert sind. Die Behandlungsmöglichkeiten sind bis zum heutigen Tag stark begrenzt und meist palliativ (91; 92). Es ist bis zum heutigen Tag nicht gelungen, einen effektiven, kurativen Therapieansatz zu entwickeln. Die Remissionsdauer ist zudem meist sehr kurz. Viele chemotherapeutische Ansätze verfehlen ihre Wirkung, da das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke, welche für bestimmte Moleküle nur bedingt durchlässig ist, vom restlichen Korpus getrennt ist (82; 51). Radiochirurgische sowie radiotherapeutische Maßnahmen sind lediglich palliativ und verbessern die mittlere Überlebenszeit nicht, sie vermindern jedoch die lokale Rezidivrate im Gehirn (93).

Die molekularen Grundlagen der Metastasierung im Allgemeinen wie auch der Hirnmetastasierung im Speziellen sind bis zum heutigen Tag nicht geklärt (94; 95). Die Forschung an Frischgewebe von Hirnmetastasen, welche nötig wäre, um neue therapeutische Ansätze zu finden, ist auf Grund von mangelndem Probenmaterial erschwert. Es existieren nur wenige Patienten, welche sich bei einer infausten Prognose für einen chirurgischen, nicht lebensverlängernden Eingriff entscheiden.

Um den grundlegenden Prozess der Hirnmetastasierung nachvollziehen zu können und daraus therapeutische Ansätze zu entwickeln, ist es von besonderer Bedeutung, auf diesem Gebiet neue Forschungsschwerpunkte zu entwickeln. Gelänge es, diagnostische und prognostische



Marker zu finden, welche frühzeitig auf eine mögliche Hirnmetastasierung hinweisen würden, so könnten Patienten mit diesem Risikoprofil gezielt zu einem frühen Zeitpunkt diagnostisch kontrolliert und im Frühstadium therapiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es signifikante, genetische Veränderungen zwischen Hirnmetastasengruppen und ihren nicht korrespondierenden Primärtumoren zu finden, welche sich in der Diagnostik als prognostischer Marker in Primärtumoren oder als tumorspezifische, genetische Aberrations-Profile anwenden lassen. Diese tumorspezifischen Aberrations-Profile könnten bei der Suche nach unbekanntem Primärtumoren bei manifester Metastase in der Diagnostik verwendet werden. Fänden sich einzelne genetischen Veränderungen in allen Hirnmetastasenentitäten, so könnten diese auf einen allgemeinen Grundprozess der Hirnmetastasierung hinweisen.

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit diente die isolierte DNA von 23 Hirnmetastasen von Lungen-, Brust- und Kolonkarzinomen. Diese wurden mit Hilfe von Comparativen Genomischen Hybridisierungs-Arrays (CGH-Array) mit nicht korrespondierenden, nicht metastasierten Primärtumoren gleicher Entität verglichen. Die Methode der CGH-Array, welche in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der Hirnmetastasen und ihren nicht korrespondierenden Primärtumoren verwendet wurde, ist soweit dieses in der Literatur beschrieben ist, erstmalig in diesem Umfang angewendet worden.

Die gewonnenen Daten wurden unter den folgenden Fragestellungen analysiert:

1. Inwiefern weisen Hirnmetastasen vom Lungen-, Brust- und kolorektalem Karzinom, verglichen mit sich im Frühstadium befindlichen, nicht metastasierten, Primärtumoren den gleichen genetischen Grundbauplan auf?
2. Existieren unterschiedliche genetische Grundpläne mit signifikanten Veränderungen die spezifisch für einzelne Metastasengruppen sind, welches auf einen eigenen, gesonderten Metastasierungsweg hinweisen könnte.
3. Lassen sich in Hirnmetastasen, wie Primärtumoren gemeinsame Regionen ermitteln, welche in den Hirnmetastasen gegenüber den Primärtumoren signifikant häufiger verändert sind? Könnten diese sich als negative prognostische Marker in Primärtumoren eignen?

4. Existieren signifikante Regionen in einzelnen Hirnmetastasenentitäten, welche sich nicht in den Primärtumoren finden lassen und eignen sich diese Regionen um hirnmetastasen-spezifische CGH-Profile für einzelne Tumoren entwickeln zu können?
5. Lassen sich in allen Hirnmetastasenentitäten gemeinsame signifikante Regionen ermitteln, welche nicht in den Primärtumoren vorkommen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsgut dienten 23 Hirnmetastasen (Frischgewebe), welche dem Archiv der Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE Fr. Prof. Dr. Katrin Lambszus) entstammten. Diese wurden primär chirurgisch im Zeitraum zwischen 1985 und 2005 in der Neurochirurgischen Klinik des UKE, ohne vorherige Bestrahlung, entfernt. Im Anschluss an die operative Entfernung wurden sie in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert und entsprechend ihrer Primärtumorentität eingeteilt (Vgl. Tabelle 4). Im Folgenden wurde die DNA der Hirnmetastasen im Institut für Tumorbiologie des UKE isoliert.

**Tabelle 4 Anzahl der Hirnmetastasen eingeteilt nach Primärtumorentität (N = 23)**

Tumorarten	Anzahl	Männliche Patienten	Weibliche Patienten	Mittleres Alter
Bronchialkarzinom	10	5	5	59,5
Kolonkarzinom	6	4	2	65,5
Mamakarzinom	7	0	7	57

Um einen Vergleich der Hirnmetastasen-DNA mit Primärtumor-DNA gleicher Entität zu ermöglichen wurde die bereits isolierte DNA von 81 nicht korrespondierenden Primärtumoren verwandt. Die Primärtumoren der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome und kolorektalen Karzinome wurden von der chirurgischen Klinik des UKE zur Verfügung gestellt. Wohingegen die Mammakarzinomprimärtumore aus der Gynäkologie des UKE stammten.

Die Primärtumore wurden entsprechend ihrer Entität und dem Geschlecht spezifisch zugeordnet (vgl. Tab. 5). Sie befanden sich alle im Frühstadium T1N0M0, mit Ausnahme der Bronchialkarzinome, welche sich zum Teil im Stadium T1N1M0 befanden.

Die Primärtumor-DNA wurde im Institut für Tumorbiologie des UKE isoliert.

**Tabelle 5 Einteilung der nicht korrespondierenden Primärtumoren**

Primärtumor	Anzahl	Männliche Patienten	Weibliche Patienten	Mittleres Alter
Bronchialkarzinom	30	17	13	62,9
Kolonkarzinom	16	10	6	67,7
Mamakarzinom	35	0	35	63,3

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

### 2.1.2.1 Chemikalien

Die jeweiligen Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt.

**Tabelle 6 Verwendete Chemikalien**

Bezeichnung	Hersteller
Cot-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Cresyl-Violett-Acetat	Sigma-Aldrich, Deishofen
Eosin G-Lösung 0,5%	Merck Eurolab, Darmstadt
Entellan	Sigma-Aldrich, Deishofen
Ethanol, Isopropanol	Merck Eurolab, Darmstadt
Hämalaun	Merck Eurolab, Darmstadt
Hefe t-RNA	Invitrogen, Karlsruhe
Methylblau	Fluka, Buchs
Nukleasefreies Wasser	Promega GmbH, Mannheim
Proteinase K-Lösung	Serva, Heidelberg
Sodiudodecylsulfat (SDS)	Amersham Pharmacia Biotch GmbH, Freiburg
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, Deishofen

### 2.1.2.2 Erworbene Systeme

**Tabelle 7 Verwendete erworbene Systeme**

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
BioPrime DNA Labeling System	DNA Labeling	Invitrogen, Karlsruhe
QIAmp® DNA Micro Kit	DNA Isolation	Qiagen, Hilden

### 2.1.2.3 Puffer

Die angegebenen Puffer der Firma Qiagen, Hilden stammen aus dem QIAamp® DNA Micro Kit (50) [Katalognummer 56304]. Die genauen Bestandteile sind einzig dem Hersteller bekannt. Die weiteren Puffer wurden gemäß des Protokolls der VUmc Microarray Facility, Amsterdam angesetzt.

**Tabelle 8 Puffer aus dem QIAamp® DNA Micro Kit, Quiagen, Hilden**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Buffer AL*	Qiagen, Hilden
Buffer AW1* (Konzentrat)	Qiagen, Hilden
Buffer AW2†(Konzentrat)	Qiagen, Hilden
Buffer ATL	Qiagen, Hilden
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden

\* Enthält Guanidinsalz. Nicht kompatibel mit Desinfektionsmitteln, die Bleichmittel enthalten.

† Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel

**Tabelle 9 Puffer gemäß des Protokolls der VUmc Microarray Facility**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Waschpuffer Formamit/ SSC	50% Formamit 2x SSC PH 7,0
PN Puffer	0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0 0,1 % (v/v) Igepal CA630 (Sigma, 17771)

### 2.1.3 Geräte

**Tabelle 10** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Analysewaage, Satorius BP6100	MS Laborgeräte, Heidelberg
Analysewaage, Satorius CP2245	MS Laborgeräte, Heidelberg
Durchlichtmikroskop	Wilovert S Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg
Hybridisierungsstation Hyberarray12hybstation	Perkin Elmer, Waltham, USA
Microarray Scanner G250B	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Kryotom	Leica, Wetzlar, Germany
Nanodrop ND-1000 Spectrometer	PeqLab, Erlangen
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Thermocycler	Flexigene Techne, Staffordshire, UK
Tischzentrifuge, Heraeus B12	Kendro, Langselbold
Wasserbad, GFL-1003	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
Vortex-Genie 2	Scientific Industries

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bestimmung des Tumoranteils im Gewebe

Aus jedem gefrorenen Gewebeblock wurde mit Hilfe des Kryotoms (Leica, Wetzlar) ein 5µm dicker Probeschnitt angefertigt und mit Hämatoxylin/Eosin Färbung (HE-Färbung) (Vgl. 2.2.2.1) angefärbt. Mit Hilfe des Probeschnittes kann die Qualität des Tumorgewebes unter dem Mikroskop (Wilovert S Helmut Hund GmbH, Wetzlar) beurteilen zu können.

Je nach Qualität des Probeschnittes wurden unterschiedliche Verfahrenswege angewandt:

➤ *Gute Qualität des Tumorgewebes ( $\geq 75\%$  reine Tumorzellen):*

Es wurden ca. 15 Schnitte (10µm) mit Hilfe des Kryotoms angefertigt. Aufgrund der guten Tumorgewebequalität war eine weitere Färbung nicht notwendig. Die Schnitte, konnten direkt in eine Reaktionsgefäß, welches mit 180µl RLT-Puffern (Qiagen, Hilden) gefüllt worden war, überführt und weiter isoliert werden (Vgl. 2.2.4).

➤ *Mangelnde Qualität des Tumorgewebes ( $\leq 75\%$  reine Tumorzellen)*

Bei mangelnder Qualität des Tumorgewebes wurde eine Färbung zur besseren Differenzierung erforderlich um eine Makrodissektion durchführen zu können (vgl. 2.2.2.2 und 2.2.2.3). Die Schnitte wurden zur Färbung vorbereitet indem sie zunächst auf Objektträger gezogen und dann für 5-10 Minuten an der Luft getrocknet und auf Eis gelegt wurden.

Die übriggebliebenen Gewebelöcke wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, um gegebenenfalls erneut Gewebeschnitte erstellen zu können.

## **2.2.2 Färbemethoden des Gewebes und Gewinnung der DNA**

### **2.2.2.1 Hämatoxylin/Eosin Färbung (HE-Färbung)**

Die Hämatoxylin/Eosin Färbung (HE-Färbung) entspricht einer Kern- und Plasmafärbung, welche die Zellkerne bläulich und das Zellplasma rötlich darstellt. Die Gefriergewebeschnitte wurden ein bis zwei Minuten in Aceton fixiert und im Folgenden kurz mit Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden sie eine Minute in Hämatoxylin gefärbt. Danach wurde sie kurz mit 0,1% Salzsäure in Ethanol gespült und schließlich für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Folgend wurden die Schnitte für 5 Sekunden in Eosin gefärbt und dann mit Hilfe der aufsteigenden Ethanolreihe (80% Ethanol kurz; 2 mal 5 Sekunden 96% Ethanol; 2 mal 5 Sekunden 100% Ethanol) dehydriert. Danach wurden sie für 2 mal 10 Sekunden in Xylol eingelegt und mit Entellan eingedeckelt.

### **2.2.2.2 Toluidin-Blau / Methylen-Blau Färbung**

Mit Hilfe der Toluidin-Blau (Sigma Aldrich) / Methylen-Blau (Fluka) Färbung gelingt es Tumorzellen farblich vom Stroma abzugrenzen. Hierbei erscheinen die Tumorzellen blau und die Stromazellen rosa.

Die Gefriergewebeschnitte wurden für zwei Minuten in 75% Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Danach wurden sie mit Aqua dest. abgespült und folgend für 30 Sekunden in einer zuvor filtrierten 1% (w/v) Toluidine-Blau (Sigma-Aldrich) und 0,2% (w/v) Methylen-Blau (Fluka) Lösung gefärbt. Später wurde der Gewebeschnitt für eine Minute mit Aqua dest. gewaschen

und schließlich mit 75% Ethanol kurz und danach 30 Sekunden mit 100% Ethanol dehydriert. Die Gewebeschnitte konnten folgend direkt weiter verwertet werden (Vgl. 2.2.1.).

### **2.2.2.3 Färbung mit Cresyl-Violet-Acetat**

Cresyl-Violet-Acetat (Sigma-Aldrich) eignet sich ebenfalls zur farblichen Abgrenzung von Tumorzellen und Stroma. Die Tumorzellen färben sich dunkelviolet, wohingegen sich das Stroma rosa färbt.

Die Gefriergewebeschnitte wurden für zwei Minuten in 75% Ethanol bei -20°C fixiert und folgend für 20 Sekunden in einer zuvor filtrierten 1% (w/v) Cresyl-Violet-Acetat Lösung (Sigma-Aldrich) in 100% Ethanol gefärbt. Anschließend wurde der Gewebeschnitt kurz mit 75% Ethanol und danach 30 Sekunden mit 100% Ethanol dehydriert. Die Gewebeschnitte konnten folgend direkt weiter verwertet werden (Vgl. 2.2.1.).

### **2.2.3 Makrodissektion von Gewebe**

Die zuvor mit Cresyl-Violet-Acetat (Sigma-Aldrich) oder Toluidin-Blau (Sigma-Aldrich) / Methylen-Blau (Fluka) angefärbten Tumorgewebe (Vgl. 2.2.1). konnten nun leichter vom Bindegewebe und z.B. Lymphozyten unterschieden werden. Bei makroskopisch gut zusammenhängendem Tumorgewebe konnte das sich auf dem Objektträger befindliche Gewebe an der Luft getrocknet und im Anschluss auf einem Leuchtbrett mit Hilfe einer Kanülenspitze (27G) makrodissektiert werden. Weniger gut unterscheidbares Gewebe konnte mittels Mikroskop mit einer Kanülenspitze (27G) aus dem Gewebeschnitt makrodissektiert werden. Die makrodissektierten Tumoranteile wurden im Folgenden zur weiteren Isolierung in ein Eppendorftube überführt, welches mit 180µl RLT-Puffern (Quiagen, Hilden) gefüllt war.

### **2.2.4 Isolierung der DNA**

Die jeweiligen Ansätze aus direkt gewonnenem, qualitativ hochwertigen Tumorgewebe und RLT Puffer (Vgl.2.2.1) sowie aus angefärbtem, makrodissektierten Tumorgewebe und RLT Puffer (Vgl.2.2.3) wurden mit jeweils 20 µl Proteinase K (20mg/ml) (Serva, Heidelberg)



vermischt und im Folgenden für 15 Sekunden mittels Vortex (Scientific Industrie) geschüttelt. Die Proteinase K lysiert Proteine (wie z.B. Enzyme) und Zelldetritus. Durch die Inkubation mit Proteinase K gelingt es die DNA aus den lysierten Zellen zu gewinnen. Um eine möglichst vollständige Lyse des Gewebes und somit eine möglichst hohe DNA Ausbeute zu erlangen, wurden die Ansätze, über die Herstellerempfehlung von 12 Stunden hinaus, für 48 Stunden bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die DNA nach dem Protokoll „Isolation of Genomic DNA from Tissues“ von Qiagen, Hilden, isoliert (Vgl. ANHANG IV). Die Isolierung erfolgte in mehreren Schritten. Die jeweiligen Suspensionen (s.o.) wurden in ein Eppendorf-tube pipetiert und mit 200µl AL1-Puffer (Lysepuffer) mittels Vortex (Scientific Industrie) 15 Sek. gemischt. Im verwendeten Eppendorftube befand sich eine Säule mit einer semipermeablen Membran (QIAmpMinEluteColum aus: QIAmp® DNA Micro Kit, Qiagen, Hilden). Im Folgenden wurde der Suspension 200µl Ethanol (96-100%) hinzugefügt und diese im Anschluss abermals für 15 Sekunden mittels Vortex (Scientific Industrie) gemischt und für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachstehend wurde das Eppendorftube 3-4 Sek. zentrifugiert, wobei sich die im Lysat befindliche DNA an die Säule band. Im Gegensatz hierzu gelangten einzelne lysierte Proteine und Zelldetritus ohne zu binden in das Eluat im Eppendorftube und konnten mit diesem verworfen werden. Im Anschluss wurde die an die Säule gebundene DNA durch zwei Waschschrte mit zwei Waschpuffern (AW1-Puffer und AW2-Puffer) gereinigt sowie folgend jeweils 1 Minute bei 8000rpm zentrifugiert und dadurch von weiteren unspezifischen Stoffen befreit. Folgend wurde die Säule (QIAmpMinEluteColum aus: QIAmp® DNA Micro Kit, Qiagen, Hilden) zum Trocknen für 3 Min bei 14000rpm zentrifugiert. Für die Eluation der DNA von der Säule wurde 25µl DNase freies Wasser verwendet und das Eppendorf-tube für weiter 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abermals für eine Minute bei 14000rpm zentrifugiert. Es konnten jeweils 25µl isolierte DNA einer jeden Probe gewonnen werden. Folgend bezeichnet als Gesamtprobe (vgl. ANHANG IV)

### **2.2.5 Quantität und Qualifizierung**

Mit Hilfe des Nanodrop Spektrophotometer® (PeqLab) Gerätes wurde jeweils 1 µl jeder Probe aus Punkt 2.2.4 auf ihre entsprechende Qualität und Quantität getestet. Betrag der Absorptionsquotient  $A_{260nm}/A_{280nm}$  oder einen geringeren Wert als 1,8 war die DNA als rein zu betrachten. Die gemessenen Proben wurden bei -20°C in der Tiefkühltruhe verwahrt.

Bei mangelnder DNA Qualität und Quantität wurden vom jeweiligen Tumorgewebe erneut Gefriergewebeschnitte angefertigt und die DNA wie oben beschrieben (siehe 2.2.1 bis 2.2.3) nochmals isoliert (Vgl. Abb. 10).

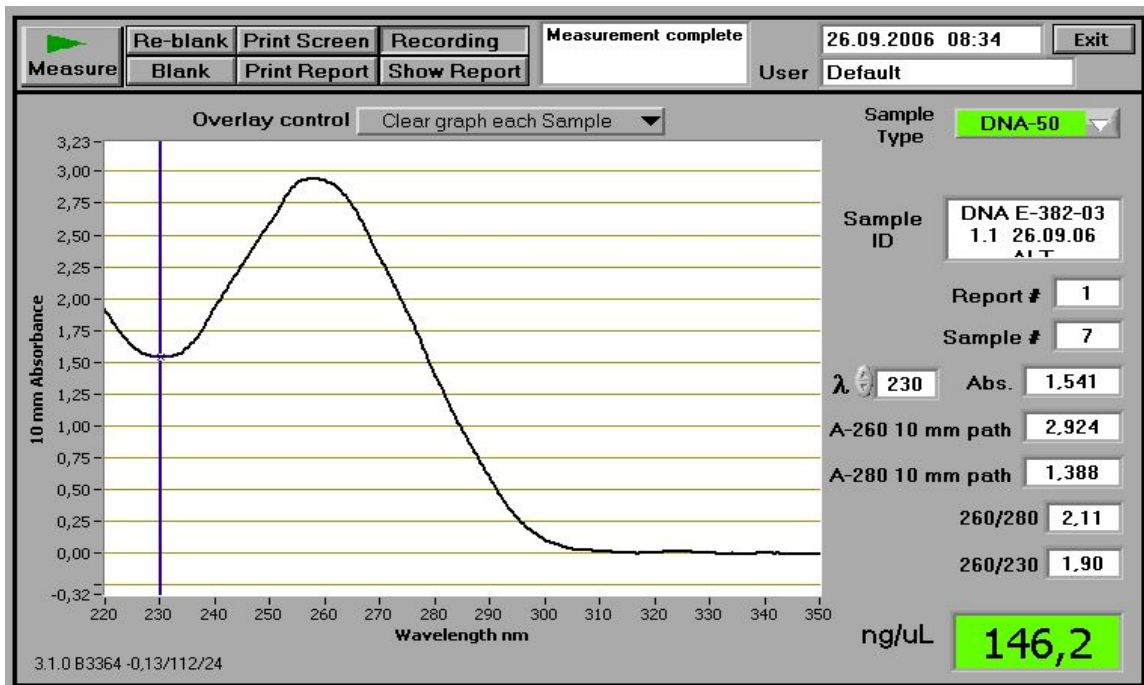


Abbildung 10 Isolierte DNA im Nano Drop Bild

## 2.2.6 CGH-Array

Der Ablauf der CGH-Array Methode erstreckt sich über einen Zeitraum von 72 Stunden und gliedert sich in die Herstellung von fluoreszenzmarkierter, doppelsträngiger DNA, die Herstellung einzelsträngiger, fluoreszenzmarkierter DNA und die eigentliche Hybridisierung von Proben- (Tumor) und Referenz DNA (Tumorfremie DNA).

### 2.2.6.1 Fluoreszenzmarkierung doppelsträngiger DNA

Die Fluoreszenzmarkierung der DNA wurde gemäß einer Modifizierung des Protokolls von Ijssel et al. 2005 und dem Protokoll des VUMC Amsterdam mit Hilfe des Bio Prime DNA – Labeling Systems (Invitrogen, Germany) durchgeführt (96)(vgl. Anhang V).

Die benötigte Referenz DNA wurde aus einem Pool des VUMC Amsterdam aus Leukozyten von gesunden, männlichen und weiblichen Probanden generiert. Es wurde aus den bekannten Nanodrop - Daten von jeder Patientenprobe errechnet, wie viel  $\mu\text{l}$  Probe benötigt wurde, um

jeweils 450 ng Tumor DNA zu erhalten. Im Anschluss wurden diese mit 20µl 2,5x Random Primer (Invitrogen, Germany) und X µl Aqua dest. zu einem Gesamtvolumen von 42µl pipettiert und für 10 Minuten bei 100°C in einer PCR Maschine zuerst denaturiert und folgend amplifiziert. In einem Parallelansatz wurden ebenfalls 450ng Referenz DNA (tumorfrei) nach gleichem Vorgehen angesetzt und anschließend denaturiert und amplifiziert. Die aus der Denaturierung und Amplifizierung gewonnene, einzelsträngige DNA wurde danach für fünf Minuten auf Eis gelegt.

Nach der Inkubation wurde der Proben-DNA 5µl eines dNTP Mixes (Invitrogen, Germany) bestehend aus jeweils vier µl dATP,dGTP,dTTP, 1µl dCTP , 2µl 1M Tris (PH7,6), 0,4µl 0,5 M EDTA (ph8) und 184,6µl hinzugefügt. Der dNTP Mix bestand aus den vier ungefärbten DNA-Basen Guanin, Adenin, Cytosin und Thyrosin. Zu der Proben-DNA und dem dNTP Mix wurden 2µl einer fluoreszenzmakierten Cytosinbase Cy3 (rot leuchtend) (Amersham Biosciences) und 1µl Klenow DNA-Polymerase (40U/µl) (Invitrogen, Germany) hinzu gefügt. Derselbe Vorgang wurde mit der Referenz-DNA durchgeführt, mit dem Unterschied, dass anstelle der 2µl Cy3 ein anderer Cytosin gebundener Fluoreszenzfarbstoff Cy 5 (grün leuchtend) (Amersham Biosciences) verwendet wurde. Im Anschluss wurden beide Ansätze für 14 Stunden bei 37°C inkubiert.

### **2.2.6.2 Reinigung der doppelsträngigen fluoreszenzmakierten DNA**

Das Ergebnis der vierzehnstündigen Inkubation war eine fluoreszenzmakierte, doppelsträngige Tumor-, wie Referenz DNA. Diese wurde im Anschluss mit Hilfe einer ProbeQuant G- 50 Micro columns (Amersham Biosciences) Säule von einzelnen, verbliebenen DNA-Bausteinen gereinigt. Hierzu wurde die DNA-Suspension in ein Eppendorf-tube, in welchem sich die ProbeQuant G- 50 Micro columns (Amersham Biosciences) Säule befand, überführt und anschließend bei 750g für eine Minute zentrifugiert. Beim Zentrifugieren gelangte die doppelsträngige DNA ohne zu binden über die Säule und befand sich später im Eppendorf Tube. Im Gegensatz hierzu banden die einzelnen verbliebenen DNA- Basen an die Säule und konnten mit dieser verworfen werden. Als Eluat blieb eine reine, doppelsträngige, fluoreszenzmakierte DNA übrig. Diese wurde bei -20°C und in Dunkelheit gelagert (vgl. Anhang V).

### 2.2.6.3 Herstellung des CGH Array Hybridisierungsansatzes

Um aus der doppelsträngigen Tumor-, wie Referenz DNA einen Gesamthybridisierungsansatz mit einzelsträngiger DNA herstellen zu können, wurden jeweils 50µl der Tumor DNA (Cy3) und 50µl der Referenz DNA(Cy5) mit 10µl Cot-1 DNA (Invitrogen, Germany) zusammenpipettiert. Die Cot-1 DNA (Invitrogen, Germany) bindet an hoch-repetitive Sequenzen, womit verhindert wird, dass weder Tumor- noch Referenz DNA an diese Sequenzen binden können. Zu dem Ansatz wurde 11µl 3 M Natrium-Acetat (Ph 5.2) und 300 µl Ethanol (100%) absolut eiskalt pipettiert und der Ansatz bei 14.000 rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert und das gewonnene Pellet für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet mit Hilfe von 13 µl Hefe tRNA (Invitrogen, Germany) und 26µl 20% SDS resuspendiert und für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Die Hefe tRNA bindet unspezifische Stoffe, die das Ergebnis der CGH-Array verfälschen könnten. Die Zugabe des 20% SDS erfolgt, um die Bildung von Luftblasen auf dem Array zu verhindern. Im Folgenden wurde dem Ansatz 91 µl Mastermix 2 bestehend aus 1g Dextran sulphate (USB), 3.5 ml Formamide 100% (Invitrogen, Germany), 2,5 ml Aqua dest., 1ml 20x SSC hinzugegeben. Die Hybridisierungslösung wurde anschließend für 10 Minuten bei 73°C denaturiert und im Folgenden für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Denaturierung wird durchgeführt, um aus der doppelsträngigen DNA wieder eine einzelsträngige DNA zu gewinnen. Die sich anschließende Inkubation wird benötigt, damit die Cot-1 DNA die repetitiven Sequenzen komplementär binden kann.

### 2.2.6.4 Blockierung der Slides

Zur Durchführung der CGH-Array wurden Glasobjekträger (CodeLinkTMSlides, Amersham Biosciences) verwandt. Auf diesen befinden sich 60ger Oligonucleotide gespottet, die 28.830 verschiedene Gene aus dem gesamten menschlichen Genom repräsentieren (96). Im Anschluss an die Hybridisierung konnte jedem Oligonucleotid ein spezifisches Gen oder aber eine spezifische Region auf einem Chromosom zugeordnet werden. Die Objekträger (CodeLinkTMSlides, Amersham Biosciences) wurden vor der Hybridisierung mit einer Blockierungslösung bestehend aus 0,1 M Tris, 50mM Ethanolamin (Ph 9,0) bei 50°C für 15-30 Minuten inkubiert, im Anschluss mit einer 4x SSC/0,1%SDS Lösung bei 50°C für 15-60 Minuten gewaschen und danach zum Trocknen für 3 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Die

Blockierung der Objektträger (CodeLinkTMSlides, Amersham Biosciences) wurde durchgeführt, um unspezifische Bindungen von sich auf dem Objektträger befindlichen Stoffen mit den Proben sowie Referenz DNA zu verhindern (Vgl. Protokoll Blocking Codelink Activate Slides, Seite 1 und 2 Vumc Micro Array Facility, November 2005 in ANHANG VI).

#### **2.2.6.5 Hybridisierung**

Die Hybridisierung wurde mit Hilfe der Gen TAC/Hybarray12Hybstation (Perkin Elmer) durchgeführt. Sie dauerte insgesamt 38 Stunden und wurde bei 37°C durchgeführt. Die einzelnen Hybridisierungsschritte gliederten sich in die eigentliche Hybridisierungszeit gefolgt von sechs Waschschritten. Im Einzelnen wurde das Verfahren, wie im Protokoll von van der Ijssel et al. 2005 beschrieben, durchgeführt (96).

Zunächst wurden jeweils acht Objektträger (CodeLinkTMSlides, Amersham Biosciences) in die Gen TAC/Hybarray12Hybstation (Perkin Elmer) gelegt und anschließend zu jedem Objektträger ~125µl des im Punkt 2.2.6.3 beschriebenen Hybridisierungsansatzes dazu gegeben. Im Anschluss wurde mit der Hybridisierung gestartet.

Hierbei konkurrieren die Proben und die Referenz DNA Bruchstücke um entsprechende komplementäre Bindungsstellen (Oligonukleotide) auf dem Objektträger (CodeLinkTMSlides, Amersham Biosciences).

Ausschlaggebend für die Bindung ist allein die vorhandene Menge der jeweiligen Tumor- und der Referenz - DNA. Hierbei ist es von Bedeutung, wie viel Tumor DNA in der Probe vorhanden ist. Tumoren weisen durch Mutationen zum Teil mehrerer DNA-Bruchstücke für spezifische Gene (Gains/Zugewinne) auf. Durch diesen Vorgang können triploide oder poliploide Chromosomensätze entstehen. Es kann aber auch zu Verlusten (Losses/Deletionen) von DNA-Bruchstücken kommen. Da die Proben- und die Referenz DNA unterschiedlich angefärbt sind, lässt sich anhand der unterschiedlichen Farbtintensität feststellen, welche DNA an den entsprechenden Spot gebunden hat und demzufolge mengenmäßig im Ansatz überwiegt. Eine genaue Beschreibung des Hybridisierungsvorganges kann dem Protokoll "Hybridization of labeled DNA to oligo CodeLink slides using the Hybstation" S©Vumc Micro Array Facility, November 2005, entnommen werden (Vgl. ANHANG VI). Nach der

Hybridisierung werden die Objektträger mit 1x 0,01 SSC gewaschen und anschließend zum Trocknen für drei Minuten bei 1000rpm und 20°C zentrifugiert.

## **2.2.7 Auswertung der CGH-Array Daten**

### **2.2.7.1 Scannen der Objektträger**

Mit Hilfe des Microarray Scanners G250 (Agilent Technologie) werden die einzelnen CGH-Array Objektträger nacheinander gescannt. Durch das vorherige Blocken (s.o.) wird erreicht, dass der Hintergrund des Objektträgers möglichst wenig eigene Signale sendet. Die Spots welche nicht gebunden haben, werden vom Scanner herausgefiltert und nicht in das Ergebnis eingerechnet. Der Microarray Scanner G250 (Agilent Technologie) scannt jedes Oligonukleotid auf dem Objektträger zweimal mit unterschiedlichen Wellenlängen. Der erste Kanal scannt mit 532nm, welches der Fluoreszenz von Cy3 entspricht. Der zweite Kanal scannt mit der Wellenlänge von 633nm, welches der Wellenlänge von Cy5 entspricht.

### **2.2.7.2 BLUEFUSE®**

Anhand des Programms BLUEFUSE 3,3 ® (BlueGenom, Cambridge, UK) wurden die gescannten Bilddateien gemäß ihrer entsprechenden Wellenlänge Cy3 532nm und Cy5 633nm basierend auf einem Baye'schen Modell in Signalintensitäten umgerechnet(96). Signale, welche einen Schwellenwert von  $\leq 0,1$  aufwiesen, wurden aus der weiteren Analyse aufgrund von mangelnder Signalintensität und somit mangelnder Glaubwürdigkeit ausgeschlossen. Jedem Spot auf dem CGH-Array Objektträger wurde mit Hilfe des Programmes Bluefuse 3,3 ein entsprechendes Gen oder eine spezifische chromosomale Region im menschlichen Genom zugeordnet.

### **2.2.7.3 Qualitätskontrolle**

Als Qualitätskontrolle der CGH-Array dienten die beiden menschlichen Geschlechtschromosomen (*Sexmismatch*). Jeder Probe (Tumor-DNA) wurde eine entsprechende geschlechtskonträre Referenz-DNA zugeordnet. Anhand des Amplifikationsmusters z.B. bei einer weiblichen Proben-DNA und einer männlichen Referenz-DNA mit einem deutlichen

Überwiegen der weiblichen Proben-DNA durch den Genotyp XX, lässt sich anhand der Amplifikation im X Chromosom erkennen, ob die Hybridisierung erfolgreich war. Die Gonosomen wurden anschließend aus der Analyse der CGH-Array Daten ausgeschlossen.

#### 2.2.7.4 Roh-Daten Log 2 Werte

Das Fluoreszenz-Verhältnis von Tumor- (Cy3) zu Referenz-DNA (Cy5) für jedes gescannte Oligonukleotid auf dem Objektträger wird mit der Basis 2 logarithmiert. Ein vermehrtes Vorkommen von Tumor DNA (Cy3) und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit der Hybridisierung von dieser an ein spezifisches Oligonukleotid auf dem Objektträger führt zu einem Überwiegen der Fluoreszenz von Proben (Tumor)DNA (Cy3) und somit zu einem positiven Log 2 Wert für dieses Oligonukleotid. Im Gegensatz hierzu bewirkt eine Verminderung von Proben (Tumor)-DNA und somit ein Überwiegen der Referenz DNA eine stärkere Hybridisierung dieser und somit ein Überwiegen des Fluoreszenzmerkmals der Referenz-DNA (Cy5). Der Log2 Wert wird demzufolge negativ. Bei einer äquivalenten Menge an Tumor- wie Referenz-DNA überwiegt keines der Fluoreszenzsignale und der Log 2 Wert ist somit weder negativ noch positiv also gleich Null.

#### Formel 1 Ermittlung der Log 2 Ratio

$$\text{Log 2 Ratio} = \text{Log 2} \frac{\text{Signal Cy3 (Tumor)}}{\text{Signal Cy5 (Referenz)}}$$

#### 2.2.7.5 Qualitätsstandard

Um einen einheitlichen Qualitätsstandard für jeden Array zu finden, wird ein funktioneller (MAD-Wert) errechnet. Aus allen positiven Spots eines Arrays wird der Median ermittelt. Die Qualitätsgrenze wird bei einem MAD-Wert von 2,0 gesetzt. Werte die über diesem liegen, haben zu viele „Hintergrundgeräusche“ und werden ausgeschlossen. Ein hoher MAD-Wert wird durch unspezifische Substanzen oder eine kaputte DNA-Struktur verursacht, diese binden anstelle von Referenz- oder Tumor DNA an die entsprechenden Spots und führen somit zu den vielen „Hintergrundgeräuschen“ (vgl. Anhang VII).

### 2.2.7.6 Normalisierung/ modifiziertes Z-Scoring

Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen CGH-Arrays zu ermöglichen, wird mit Hilfe des modifizierten Z-Scorings eine sogenannte Normalisierung geschaffen. Mit Hilfe des modifizierten Z-Scorings wird eine bestimmte Varianz errechnet, welche für alle Arrays gleich gesetzt wird. Die Varianz lässt sich errechnen, indem der ermittelte Log2Ratio Wert eines Spottes mit dem errechneten Mittelwert des gesamten Arrays subtrahiert wird und anschließend das Ergebnis durch die Standardabweichung der 22 Autosomen geteilt wird. Die Standardabweichung errechnet sich, indem 80% der positiven Klone um den Mittelwert herum zusammen gerechnet werden. Die höchsten und die niedrigsten 10% der Klone werden als Ausreißer nicht mit in die Wertung genommen.

Durch dieses Gleichsetzen der Varianz wurde es möglich, alle Arrays miteinander zu vergleichen. Die Normalisierung wurde nur mit den 22 Autosomen durchgeführt. X und Y Chromosom dienen, wie beschrieben, als Kontrolle, ob der Hybridisierungsvorgang erfolgreich durchgeführt wurde. Sie wurden im Folgenden weggelassen.

#### Formel 2 Modifiziertes Z-Scoring

$$\text{Modifiziertes Z - Scoring} = \frac{\text{Log2 Ratio} - \text{Mittelwert}}{\text{Standardabweichung (80\% von Chromosom 1-22)}}$$

#### *Definierung der Grundlinie sowie Zugewinne und Verluste*

Im Anschluss an die Normalisierung der Arrays ist eine Glättung der Daten, eine Definition von DNA-Zugewinnen sowie DNA-Verlusten und eine Definition der Grundlinie durchzuführen. Dieses geschieht mit Hilfe von statistischen Algorithmen, wie z.B. CGH-Smooth. CGH-Smooth ist ein häufig verwendeter heuristischer Algorithmus mit dessen Hilfe es gelingt, aus den ermittelten Rohdaten entsprechende spezifische Bruchpunkte, wie DNA-Gewinne und Verluste, zu ermitteln (97).

CGH-Smooth verhindert mittels Glättung der Daten Verfälschungen durch Hintergrundgeräusche, welche einer Gaußschen Normalverteilung folgen.

Die von CGH-Smooth ermittelten positiven Daten wurden als DNA-Zugewinn definiert, wohingegen die negativen als DNA-Verluste bezeichnet wurden. Werte um Null herum entsprachen einem unveränderten Chromosomensatz.



**Tabelle 11 Definierung von DNA- Zugewinnen (Gains) und Verlusten (Losses) entsprechend ihrer Smoothwerte.**

Smooth value	DNA Zugewinn oder Verlust
> 0,2	DNA-Zugewinn
0	0
<-0,2	DNA-Verlust

*Definierung der Nulllinie*

Die von CGH-Smooth ermittelte Nulllinie wurde anschließend einer optischen Kontrolle unterzogen, um den möglichen Fehler einer falsch berechneten Nulllinien zu vermeiden. Die Ursache für diesen Fehler liegt darin, dass es Tumoren mit vielen Aberrationen gibt in denen z.B., die DNA-Zugewinne deutlich gegenüber den DNA-Verlusten überwiegen. Im umgekehrten Falle des Überwiegens von Deletionen kann ebenfalls eine falsch berechnete Grundlinie herauskommen. Zu optischen Kontrolle der ermittelten Grundlinie werden Chromosomen, wie z.B. 2 und 10 herangezogen, die bekanntermaßen kaum Aberrationen aufweisen. Als weiter Kontrollmöglichkeit ließen sich das X und Y-Chromosom (Sexmismatch) verwenden. Divergierte die erste Nulllinie, wurde sie optisch angepasst.

In weiterhin unklaren Fällen wurde mit Hilfe einer statistischen Analyse die Korrelation zwischen den CGH-Array Ergebnissen und dem Expressionsprofil der einzelnen Metastasen ermittelt. Diese Korrelationsanalysen wurden im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ, durch Dr. Mark Zapatka) durchgeführt. Es wurden zwei mögliche Nulllinienansätze jeweils mit dem Expressionsprofil verglichen und diejenige Nulllinie, welche mit dem Expressionsprofil besser korrelierte, als Nulllinie festgelegt.

**2.2.7.7 Multiarray**

Es existieren unterschiedliche statistische Algorithmen um signifikante Regionen im Vergleich spezifischer, chromosomaler Regionen zwischen z.B. Hirnmetastasen des Bronchialkarzinoms und seinen entsprechenden Primärtumoren zu ermitteln. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Algorithmus CGH-Multiarray ist spezifisch für die CGH entwickelt worden. Andere klassische statistische Algorithmen, wie z.B. der T-Test eignen sich nicht für CGH Daten, da diese Daten voneinander abhängig sind (98). Anhand des statistischen Algorithmus CGH-Multiarray der technischen Universität Eindhoven wurden jeweils die einzelnen Metastasengruppen mit ihren jeweiligen nicht korrespondierenden

Primärtumoren verglichen und spezifische chromosomale Regionen auf signifikante Unterschiede untersucht (99). Um diesen Vergleich durchführen zu können, wurden die Ergebnisse nach Chromosomen und Klonen geordnet. Anschließend wurden jeweils die DNA Verluste, die unveränderte DNA und die DNA Zugewinne der Hirnmetastasen, wie der nicht korrespondierenden Primärtumoren, entsprechend ihrer Anzahl, den jeweiligen Gruppen zugeordnet. Mit Hilfe des Algorithmus können signifikante Amplifikations- wie Deletionsunterschiede zwischen den Hirnmetastasengruppen und den nichtkorrespondierenden Primärtumoren nachgewiesen werden (99). Diese Unterschiede zeigten sich in sogenannten P-Werten, welche signifikante Unterschiede angeben, die mit einer Wahrscheinlichkeit von ~95% zutreffen. Eine Abweichung von ~5% wird toleriert. Anhand der signifikanten P-Werte lassen sich Regionen finden, welche über ihre entsprechenden Oligonukleotide (Klone) zugeordnet werden können. Die Klone ihrerseits wurden mit Hilfe der Genom Datenbank [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu) spezifischen, signifikanten Regionen auf den 22 Autosomen zugeordnet (100).

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte die DNA von insgesamt 24 Hirnmetastasen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, des Mammakarzinoms und des kolorektalen Karzinoms erfolgreich isoliert werden. Eine der Hirnmetastasenproben E626-94 wurde aufgrund von störenden Hintergrundgeräuschen, mit einem zu hohen MAD-Wert von weiteren Analysen ausgeschlossen. Insgesamt konnte die DNA von sieben Mammakarzinomhirnmetastasen, sechs kolorektale Karzinomhirnmetastasen und zehn Bronchialkarzinomhirnmetastasen erfolgreich isoliert und weiter ausgewertet werden. Diese 23 Hirnmetastasen wurden mit den CGH-Profilen von 81 bereits isolierten nicht korrespondierenden Primärtumoren gleicher Tumorentität verglichen (Vgl. 2.1.1). Ein Überblick über die Arrays und ihre jeweils gebundenen Spotts und MAD-Werte sind in der Tabelle im (ANHANG VII) zu sehen.

#### *Definierung von DNA Zugewinnen und Verlusten anhand von CGH-Smooth*

Die Definierung der Nulllinie, anhand derer die DNA-Zugewinne und -Verluste festgelegt wurden, konnte in einigen Fällen nicht klar bestimmt werden. Die beiden folgenden Abbildungen zeigen zwei mögliche Nulllinien. In Abbildung 11 ist eine von CGH-Smooth ermittelte Nulllinie dargestellt. Die Abbildung 12 hingegen zeigt eine von CGH-Smooth ermittelte Grundlinie, die anschließend einer optischen Korrektur unterzogen wurde.

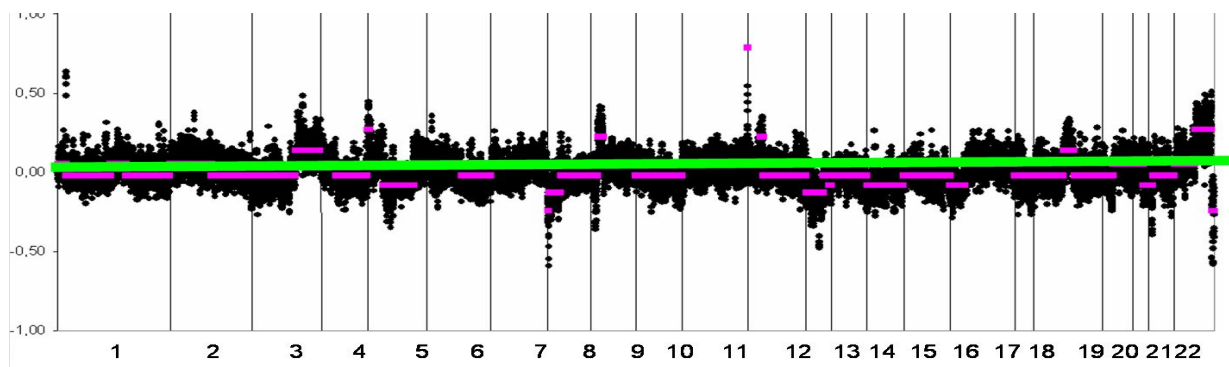


Abbildung 11 Alternative 1 zum Setzen der Nulllinie

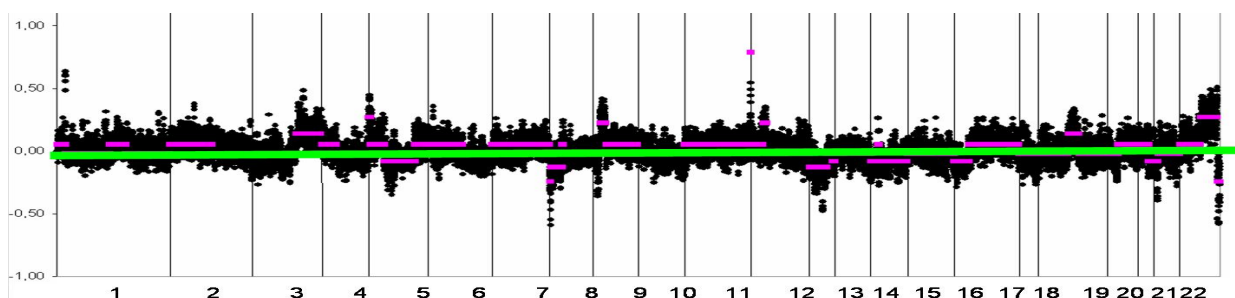


Abbildung 12 Alternative 2 zum Setzen der Nulllinie

Die Abbildung 11 weist nach Definierung der Grundlinie (grüne Linie) zuerst eine normale DNA auf wohingegen Abbildung 12 mit einem Zugewinn an DNA beginnt. Anhand der beiden gezeigten Beispiele lässt sich erahnen, wie wichtig es ist, die geeignete Nulllinie zu finden und wie großen Einfluss diese auf die Ergebnisse hat.

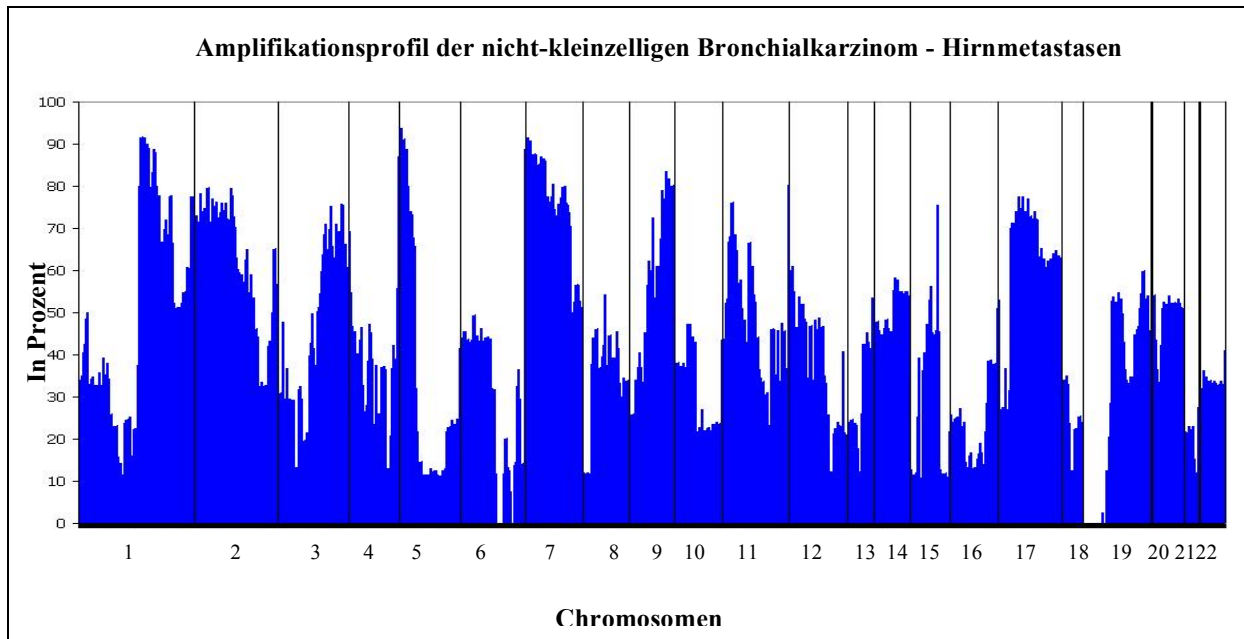
Bei nicht eindeutig zu definierender Nulllinie wurde das Expressionsprofil zur endgültigen Definition herangezogen (vgl. Tabelle 12). Die Tabelle zeigt als Beispiel das Expressionsprofil von 3 Proben mit jeweils zwei möglichen unterschiedlichen Nulllinien, hier mit A und B gekennzeichnet. Die grau markierten Werte wurden als Nulllinienwerte übernommen, weil sie die höhere Korrelation mit dem entsprechenden Expressionsprofil aufwiesen.

**Tabelle 12 Nulllinienkorrektur anhand von Expressionsprofilen**

Genexpression	CGH					
	1		2		3	
	A	B	A	B	A	B
1/ E 275.03	-0.001	<b>0.065</b>				
2/ E 664.03			0.024	<b>0.095</b>		
3/ E308.05					<b>0.070</b>	-0.059

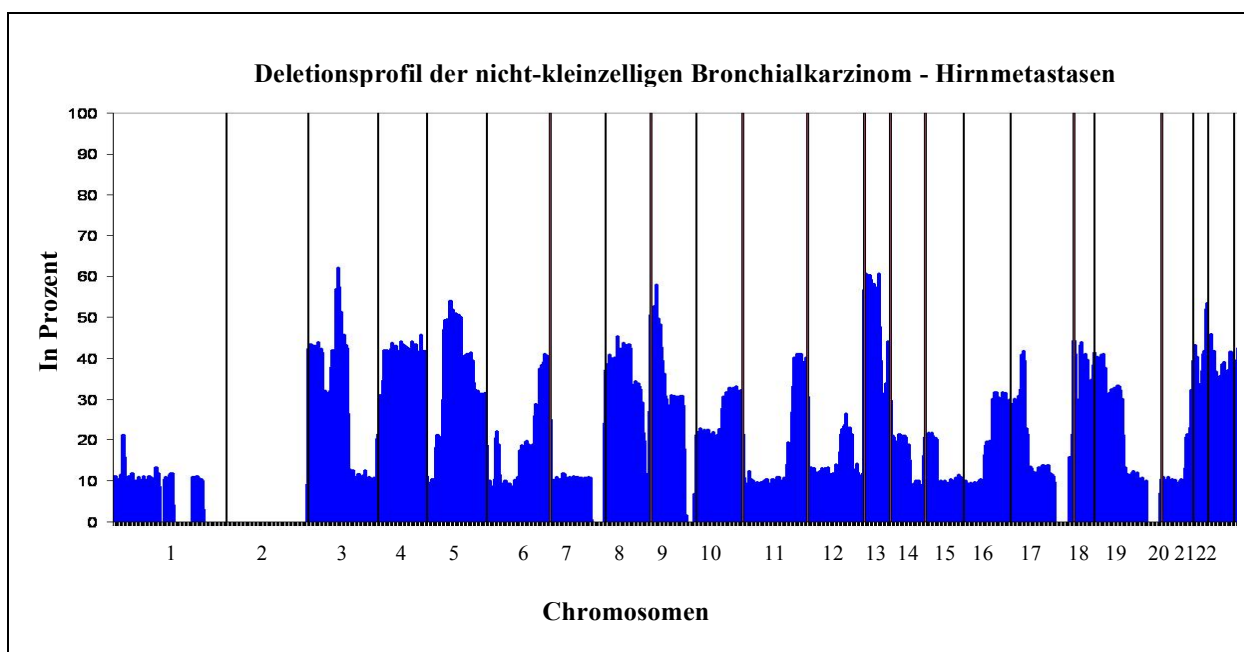
### 3.1 Auswertung der Amplifikations- und Deletionsprofile der einzelnen Hirnmetastasen- gruppen

Die graphische Auswertung der Ergebnisse erfolgte aus den im Punkt 2.2.7 beschriebenen Grunddaten. Aus diesen wurden die Amplifikationsfrequenzen, wie die Deletionsfrequenzen in Prozent ermittelt. Für jede Hirnmetastasenentität wurde je ein Graph mit den Amplifikationsfrequenzen und den Deletionsfrequenzen, welche über 30% lagen, erstellt. Die Achsenbeschriftung zeigt auf der X-Achse die 22 Autosomen des menschlichen Genoms und auf der Y-Achse die entsprechenden Amplifikations- oder Deletionsfrequenzen in Prozent.



**Abbildung 13 Amplifikationsprofil der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom – Hirnmetastasen**

Von den aufgetragenen Frequenzen in Abbildung 13 zeigten die Amplifikationen auf den Chromosomen 1q, 5p, 7p-q und 9q die höchsten Werte. Der Höchstwert lag auf dem Chromosom 5p gefolgt von 7p-q und 9q. Die Amplifikationsfrequenzen auf den Chromosomen 2p, 3q, 11p und 17p-q wiesen aber ebenfalls Werte von über 30% auf.



**Abbildung 14 Deletionsprofil der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom –Hirnmetastasen**

Das Deletionsschema der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen wies deutlich niedrigere Prozentsätze auf als das Amplifikationsmuster (Vgl. Abb. 14). Die

höchsten Deletionsfrequenzen in Prozent fanden sich auf den Chromosom 3p, 4p-q, 5p-q, 9p und 13p-q. Hierbei war die Deletionsregion 3p am höchsten von allen gefolgt von 9p und 13p-q.

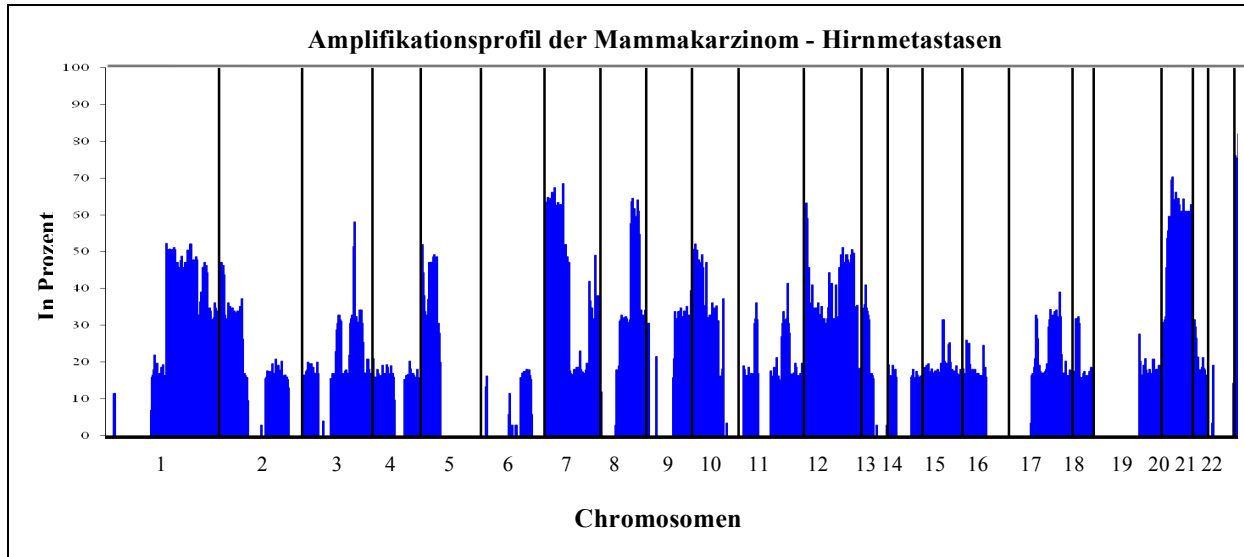


Abbildung 15 Amplifikationsprofil der Mammakarzinom-Hirnmetastasen

Die höchsten Prozentsätze der Amplifikationsfrequenzen der Mammakarzinom-Hirnmetastasen lagen auf Chromosom 1q, 5p, 7p, 8q, 10p, 12p-q. Die höchste Amplifikationsrate mit 70% wies Chromosom 20 p-q auf (vgl. Abb.15).

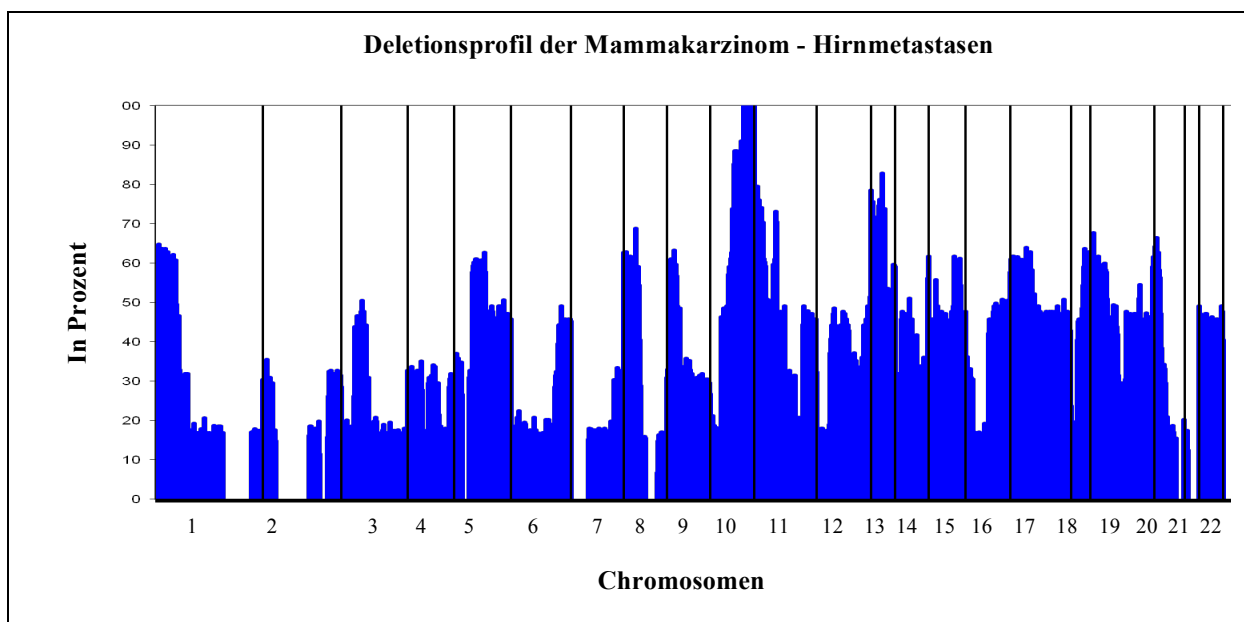
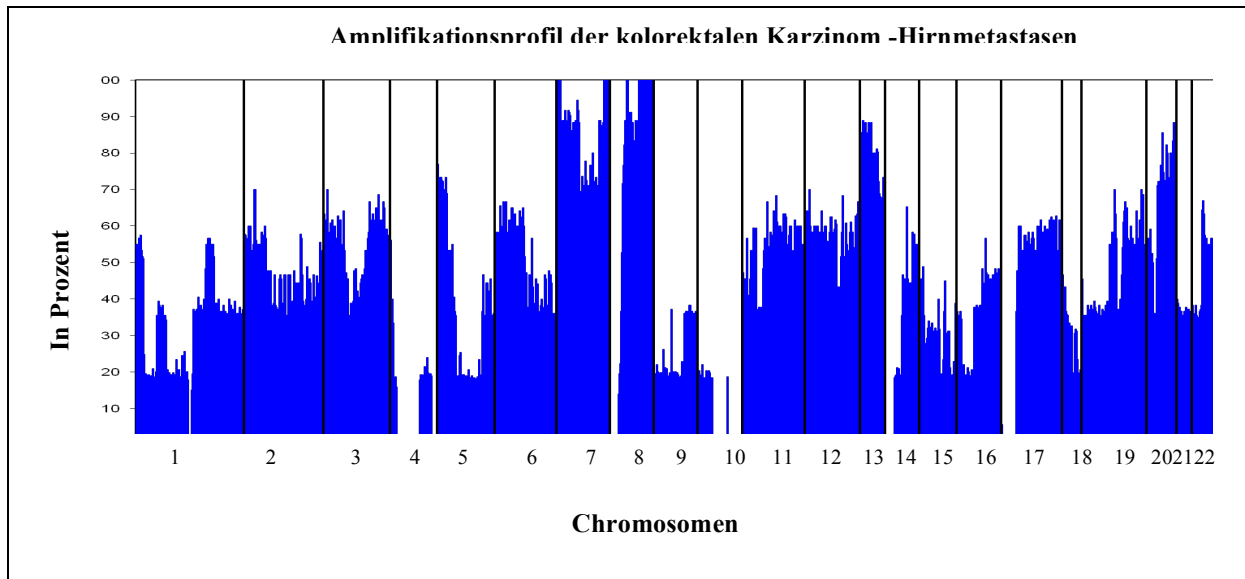


Abbildung 16 Deletionsprofil der Mammakarzinom-Hirnmetastasen

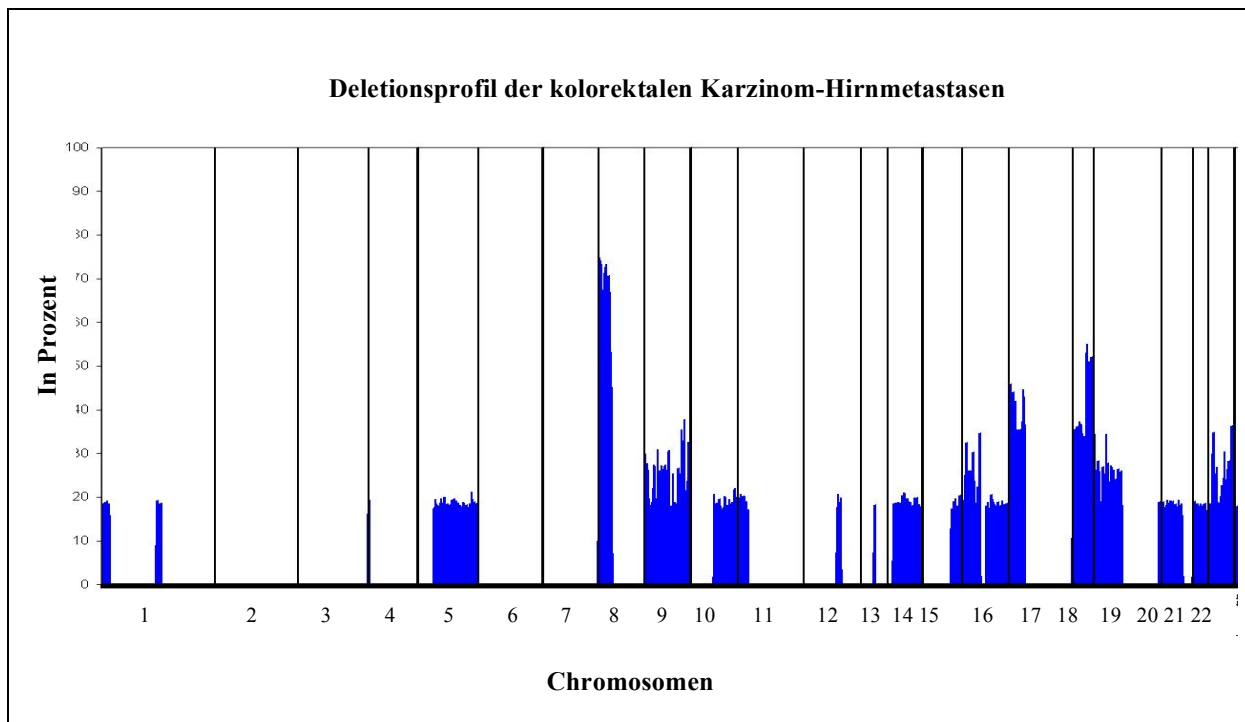
Im Deletionsfrequenzprofil der Hirnmetastasen des Mammakarzinoms konnte die Deletionsfrequenz auf dem Chromosom 10q als die höchste ermittelt werden. Es fanden sich jedoch auf

den Chromosomen 1p, 5p-q, 8p, 9p11p, 13p-q, 15p-q, 17p, 19p und 20 ebenfalls Frequenzen welche über 30% lagen (Vgl. Abb.16).



**Abbildung 17 Amplifikationsprofil von kolorektalen Karzinom-Hirnetastasen**

Im Amplifikationsfrequenzschema der kolorektalen Karzinom-Hirnetastasen zeigten die Chromosomen 7p-q und 8q die höchsten Amplifikationsfrequenzen. Weitere Amplifikationsfrequenzen, welche über 30% lagen befanden sich auf den Chromosom 2p,3p-q, 5p, 6p, 7p-q, 8q, 11p-q, 12p-q, 13p, 19q und 20q (Vgl. Abb.17).



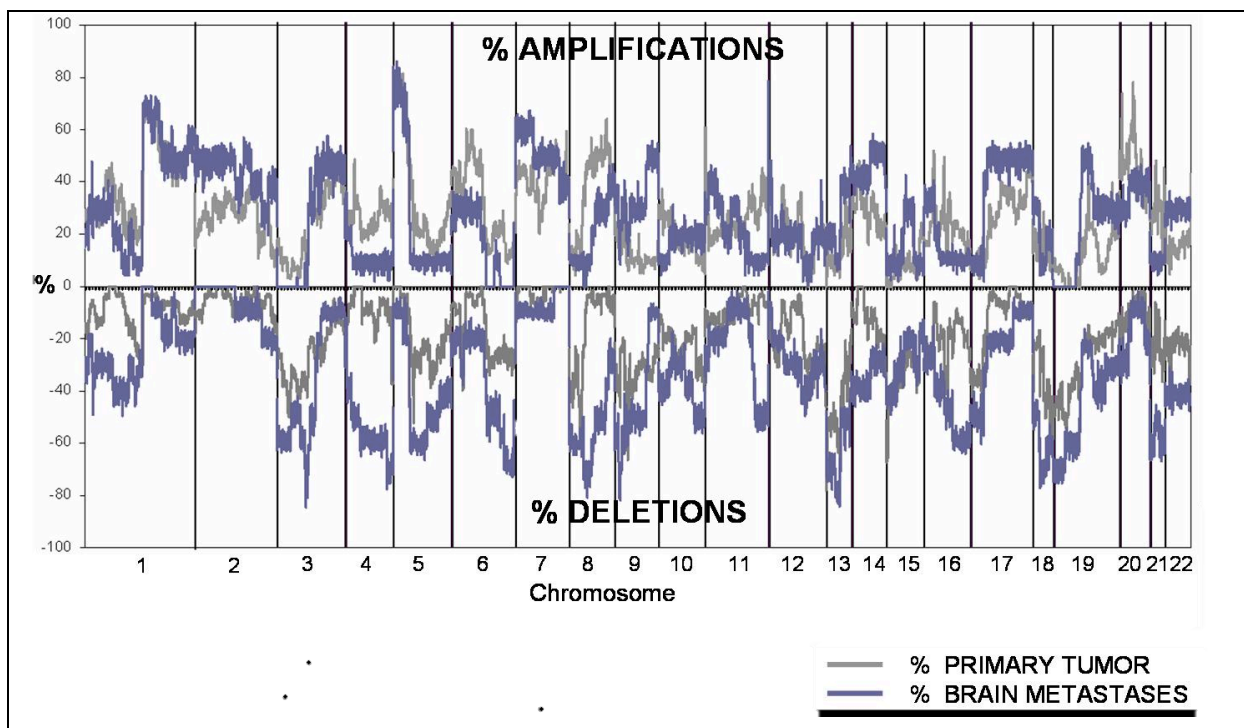
**Abbildung 18 Deletionsprofil von kolorektalen Karzinom-Hirnetastasen**

Das Deletionsschema der kolorektalen Karzinom-Hirnetastasen zeigte im Verhältnis zum Amplifikationsschema nur drei Deletionsfrequenzen, welche über 30% lagen. Die höchste Deletionsfrequenz befand sich auf Chromosom 8p gefolgt von 18p-q und 17p.

### 3.2 Vergleich der Amplifikationen und Deletionen der einzelnen Hirnmetastasengruppen mit ihren Primärtumoren

Zum Vergleich der Hirnmetastasen und ihrer nicht-korrespondierenden Primärtumoren wurden jeweils für jeden beschriebener Tumorentität eine Grafik angefertigt, welche alle Amplifikationen und Deletionen der Hirnmetastasen in dunkelgrau, sowie der Primärtumoren in hellgrau darstellen.

#### 3.2.1 Amplifikationen und Deletionen in Hirnmetastasen des Bronchialkarzinoms



**Abbildung 19** Amplifikationen und Deletionen von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnetastasen im Vergleich mit ihren Primärtumoren

In Abbildung 19 wird deutlich, dass es ein allgemeines übereinstimmendes Grundschema von Amplifikationen und Deletionen zwischen den Hirnmetastasen und den Primärtumoren gibt. Der Unterschied besteht einzig in der prozentualen höheren Frequenz der Amplifikationen,



wie Deletionen der Hirnmetastasen. Anhand der Abbildung 19 lassen sich z.B. auf den Chromosomen 3, 7 und 17 deutlich höhere Amplifikationsprozensätze und auf den Chromosomen 6, 8, 13, und 16 deutlich höhere Deletionsprozensätze als in den nicht korrespondierenden Primärtumoren feststellen. Mit Ausnahme der Amplifikationen auf den Chromosomen 4, 6 und 20 überwiegen die Hirnmetastasen deutlich in ihren Amplifikations- wie Deletionsprozensätze gegenüber den Primärtumoren.

Um einen Vergleich zwischen Hirnmetastasen und den Primärtumoren zu ermöglichen wurden jeweils zwei Tabellen je Hirnmetastasenentität erstellt. In den folgenden Tabellen (Tab. 13 – 18) wurden neben den auffälligen Mittelwerten der Amplifikationen, welche über 30% lagen, ebenfalls die zugehörigen Mittelwerte der Deletionen der gleichen Region aufgeführt. Das gleiche Verfahren wurde für die Deletionen mit den entsprechenden Amplifikationen durchgeführt. Die Ermittlung der Regionen wurde anhand der entsprechenden Oligonukleotide (Klone) und mit Hilfe der in Punkt 2.2.7.8. erwähnten Genomdatenbank (genome ucsc) ermittelt.

Um die Hirnmetastasengruppen mit den Primärtumoren vergleichbar machen zu können, wurden die ermittelten Regionen ebenfalls aus einer bestehenden Primärtumortabelle des Instituts für Tumorbiologie des UKE herausgesucht und die entsprechenden Mittelwerte für die Amplifikationen-, wie Deletionsregionen errechnet.

**Tabelle 13 Amplifikationen (über 30 %) nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen versus Primärtumoren**

<b>Chr.</b>	<b>Region</b>	<b>Größe [Mbp]</b>	<b>Mw Hirnmet. Amp. %</b>	<b>Mw Hirnmet. Del. %</b>	<b>Pt Amp. %</b>	<b>Pt Del %.</b>
<b>1</b>	p36.33-34.2	42	<b>30</b>	10	<b>32</b>	9
	p13.1-q44	129	<b>64</b>	2	<b>53</b>	8
<b>2</b>	p25.3-q37.3	243	<b>55</b>	0	<b>27</b>	6
<b>3</b>	q11.2-q29	101	<b>48</b>	17	<b>35</b>	18
<b>4</b>	p16.3-p12	49	<b>37</b>	34	<b>29</b>	6
<b>5</b>	p15.33-q11.2	54	<b>71</b>	12	<b>71</b>	3
<b>6</b>	p25.3-p12.1	57	<b>37</b>	9	<b>44</b>	9
<b>7</b>	p22.3-q36.3	158	<b>70</b>	7	<b>40</b>	2
<b>8</b>	q21.2-q24.21	42	<b>31</b>	31	<b>51</b>	5
	q24.3-q24.3	5	<b>30</b>	10	<b>44</b>	5
<b>9</b>	q13-q34.3	70	<b>57</b>	18	<b>10</b>	33
<b>10</b>	q11.21-q22.1	30	<b>33</b>	19	<b>23</b>	22
<b>11</b>	p15.5-q13.4	73	<b>45</b>	9	<b>24</b>	11

	q13.5-q14.1	7	<b>30</b>	8	<b>27</b>	4
<b>12</b>	p13.33-q15	69	<b>38</b>	10	<b>23</b>	14
<b>13</b>	q21.32-q34	48	<b>38</b>	33	<b>19</b>	36
<b>14</b>	q11.2-q32.33	86	<b>44</b>	14	<b>29</b>	11
<b>15</b>	q15.1-q15.2	1	<b>31</b>	11	<b>8</b>	35
	q22.1-q25.1	20	<b>40</b>	9	<b>9</b>	30
<b>17</b>	p11.2-q25.3	62	<b>63</b>	9	<b>31</b>	7
<b>19</b>	p12-q13.43	41	<b>40</b>	7	<b>17</b>	20
<b>20</b>	p13-q13.33	62	<b>43</b>	11	<b>46</b>	10

Wie der Tabelle 13 zu entnehmen ist, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit, in einem Vergleich der Hirnmetastasen mit ihren Primärtumoren, 22 Amplifikations-Regionen ermittelt werden, welche eine höhere Frequenz als 30% aufwiesen.

**Tabelle 14 Deletionen (über 30 %) nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen versus Primärtumoren**

<b>Chr.</b>	<b>Region</b>	<b>Größe [Mbp]</b>	<b>Mw Hirnmet. Amp. %</b>	<b>Mw Hirnmet. Del. %</b>	<b>Pt Amp. %</b>	<b>Pt Del. %</b>
<b>3</b>	p26.3-q13.33	122	18	<b>40</b>	14	<b>34</b>
<b>4</b>	p16.3-q35.2	190	25	<b>39</b>	26	<b>9</b>
<b>5</b>	q11.1-q35.2	131	13	<b>40</b>	23	<b>25</b>
<b>6</b>	q22.33-q27	41	9	<b>34</b>	16	<b>27</b>
<b>8</b>	p23.3-q24.13	126	22	<b>36</b>	35	<b>19</b>
<b>9</b>	p24.3-q33.3	125	38	<b>36</b>	13	<b>34</b>
<b>10</b>	q23.2-q26.3	46	19	<b>30</b>	14	<b>24</b>
<b>11</b>	q22.3-q25	30	32	<b>37</b>	32	<b>6</b>
<b>13</b>	q11-q34	95	25	<b>47</b>	13	<b>48</b>
<b>16</b>	q13-q24.3	33	18	<b>30</b>	19	<b>18</b>
<b>17</b>	p13.3-p11.2	16	22	<b>30</b>	9	<b>35</b>
<b>18</b>	p11.32-p23	76	30	<b>34</b>	14	<b>35</b>
<b>19</b>	p13.3-p12	22	17	<b>34</b>	3	<b>43</b>
<b>21</b>	p11.1-q22.3	37	16	<b>37</b>	28	<b>22</b>
<b>22</b>	q11.1-q13.33	34	29	<b>35</b>	15	<b>15</b>

Die Amplifikationsmuster der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen stimmt weitestgehend mit den Amplifikationsmustern ihrer Primärtumore über ein. Einzig in der Höhe der Frequenz liegt der Unterschied. Die Frequenz der Hirnmetastasen übersteigt die der Primärtumoren mit einigen Ausnahmen deutlich. Diese Ausnahmen sind: Chromosomen 5p15.33-q11,2, welche eine identische Frequenzhöhe wie die Hirnmetastasen aufweist und die

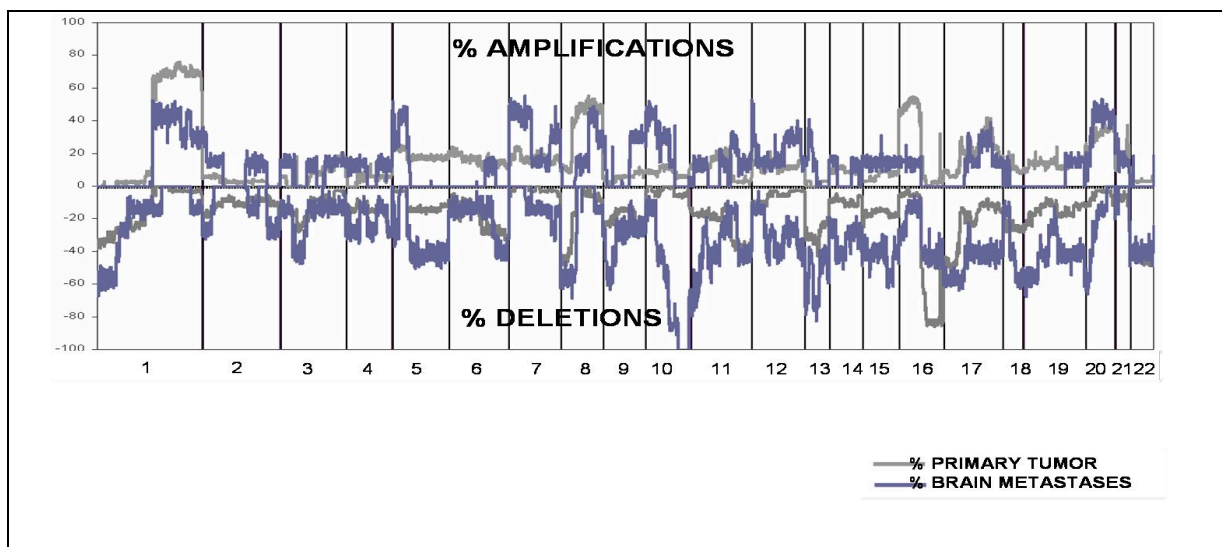
Chromosomen 6p25,3-p12,1 ; Chromosom 8 q21.2-q24.21; Chromosom 8 q24.3-q24.3 und Chromosom 20p13-q13.33, welche eine höhere Frequenz als die Hirnmetastasen aufweisen. Die höchste Frequenz in denen die Hirnmetastasen überwiegen liegt auf dem Chromosom 7p22-q36.

Wie in Tabelle 14 zu sehen ist, konnten in der vorliegenden Arbeit im Vergleich der Hirnmetastasen mit ihren Primärtumoren 15 Deletionsregionen ermittelt werden, welche eine höhere Frequenz als 30% aufwiesen.

Die Tabelle 14 zeigt, wie bereits in Tabelle 13 beschrieben, eine deutlich höhere Deletionsfrequenz in den Hirnmetastasen, bei grundsätzlich gleichem Deletionsschema.

Die Regionen 3p26-q13 und 5q11-q35 weisen die höchsten Deletionsfrequenzen auf, in denen die Hirnmetastasen gegenüber den Primärtumoren überwiegen. Im Gegensatz hierzu überwiegen die Primärtumoren in ihrer Deletionsfrequenz gegenüber den Hirnmetastasen auf den Chromosomen 13 q11-q34; 17 p13-p11; 18 p11.-p23 und 19p13-p12.

### 3.2.2 Amplifikationen und Deletionen in Hirnmetastasen des Mammakarzinoms



**Abbildung 20** Amplifikationen und Deletionen von Mammakarzinomhirnmetastasen im Vergleich mit ihren Primärtumoren

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, gleichen sich die Grundmuster der Mammakarzinom-Hirnmetastasen und ihrer Primärtumoren. Der einzige Unterschied besteht in der Höhe der Amplifikations-, wie Deletionsfrequenz, in denen die Hirnmetastasen überwiegen. Eine Sonderstellung nehmen die Chromosomen 1 und 16 in den Primärtumoren ein. Diese

Amplifikationen sind etablierte positive, prognostische Marker in Mammakarzinom-Primärtumoren und mit einer guten Prognose vergesellschaftet.

**Tabelle 15 Amplifikationen (über 30 %) Mammakarzinom-Hirnmetastasen versus Primärtumoren**

<b>Chr.</b>	<b>Region</b>	<b>Größe [Mbp]</b>	<b>Mw Hirnet. Amp. %</b>	<b>Mw Hirnet. Del. %</b>	<b>Pt Amp. %</b>	<b>Pt Del. %</b>
<b>1</b>	q21.1-32.1	55	42	5	68	1
	q32.2-41	13	44	0	69	3
<b>2</b>	p25.3-24.1	20	43	27	6	17
<b>5</b>	p15.33-15.31	6	42	1	23	3
	p15.2-12	32	43	0	22	3
<b>7</b>	p22.3-q21.11	77	54	3	18	2
<b>8</b>	q22.3-24.23	35	56	5	50	6
<b>10</b>	p15.3-11.21	38	42	13	9	3
<b>12</b>	p13.1-13.31	7	52	14	15	11
	q13.13-13.13	1	43	28	15	3
	q15	1	43	26	8	4
	q21.3-24.311	38	43	27	11	4
<b>20</b>	p12.3-q13.33	54	43	14	33	5

Wie in Tabelle 15 zu sehen ist konnten in der vorliegenden Arbeit im Vergleich der Hirnmetastasen mit ihren Primärtumoren 13 Amplifikationsregionen ermittelt werden, welche eine höhere Frequenz als 30% aufwiesen. In Tabelle 15 lässt sich, wie bereits in Tabelle 13 beschrieben ein grundsätzliches, übereinstimmendes Amplifikationsschema zwischen Hirnmetastasen und den Primärtumoren feststellen. Die Frequenzen der Hirnmetastasen liegen jedoch mit Ausnahme des Chromosoms 1 q21.1-32.1 und 1 q32.2-41 deutlich über derjenigen der Primärtumoren. Die höchste Amplifikationsfrequenz in denen die Hirnmetastasen gegenüber den Primärtumoren überwiegen liegt in der Region 8q22-24.

Tabelle 16 Deletionen (über 30 %) Mammakarzinom-Hirnmetastasen versus Primärtumoren

Chr.	Region	Größe [Mbp]	Mw Hirnmet.	Mw Hirnmet.	Pt	Pt
			Amp. %	Del. %	Amp. %	Del. %
<b>1</b>	p36.33-34.3	34	0	<b>54</b>	1	<b>31</b>
<b>3</b>	p22.1-22.1	0	0	<b>43</b>	0	<b>17</b>
	p21.31-14.3	12	0	<b>41</b>	1	<b>23</b>
<b>5</b>	q12.3-35.3	116	0	<b>46</b>	17	<b>14</b>
<b>6</b>	q23.2-27	37	0	<b>40</b>	13	<b>29</b>
<b>8</b>	p23.3-q11.23	53	1	<b>53</b>	18	<b>36</b>
<b>9</b>	p23-11.2	58	1	<b>51</b>	3	<b>20</b>
<b>10</b>	q11.21-11.22	8	29	<b>43</b>	7	<b>4</b>
	q11.23-26.3	85	12	<b>78</b>	9	<b>3</b>
	p15.5-14.2	26	9	<b>58</b>	13	<b>16</b>
<b>11</b>	p11.2-q13.1	24	1	<b>47</b>	16	<b>18</b>
	q22.3-25	27	14	<b>42</b>	3	<b>37</b>
<b>12</b>	q12-13.12	7	29	<b>41</b>	16	<b>7</b>
	q13.13-	0	29	<b>43</b>	15	<b>3</b>
	q13.2-15	13	28	<b>43</b>	10	<b>6</b>
	q15-21.1	6	27	<b>39</b>	11	<b>7</b>
	q24.31-24.33	13	22	<b>40</b>	15	<b>3</b>
<b>13</b>	q11-34	96	10	<b>54</b>	2	<b>28</b>
<b>14</b>	q12-24.1	37	3	<b>42</b>	11	<b>9</b>
	q32.33-32.33	1	0	<b>55</b>	11	<b>6</b>
<b>15</b>	q11.2-26.3	81	15	<b>43</b>	7	<b>17</b>
<b>16</b>	q11.2-24.3	44	0	<b>42</b>	3	<b>79</b>
<b>17</b>	p13.3-q12	35	2	<b>53</b>	13	<b>36</b>
	q21.1-25.3	43	20	<b>43</b>	27	<b>15</b>
<b>18</b>	q11.2-23	54	14	<b>49</b>	10	<b>25</b>
<b>19</b>	p13.3-12	33	0	<b>49</b>	13	<b>17</b>
	q13.2-13.43	19	10	<b>42</b>	14	<b>16</b>
<b>20</b>	p13-12.1	16	32	<b>53</b>	24	<b>11</b>
<b>22</b>	q11.1-13.33	34	0	<b>43</b>	3	<b>43</b>

Wie in Tabelle 16 zu sehen ist konnten in der vorliegenden Arbeit in einem Vergleich der Hirnmetastasen mit ihren Primärtumoren 28 Deletionsregionen ermittelt werden, welche eine höhere Frequenz als 30% aufwiesen.

In Tabelle 16 zeigt sich, mit Ausnahme von Chromosom 16 q11.2-24.3 und Chromosom 22 q11.1-13.33 eine deutlich höhere Frequenz in den Hirnmetastasen gegenüber den Primärtumoren, bei gleichzeitig übereinstimmendem Grundschema.

Die höchste Deletionsfrequenz, in welche die Frequenz der Hirnmetastasen über denen, Primärtumoren überwiegt ist die Region 10q11-26.

### 3.2.3 Amplifikationen und Deletionen in Hirnmetastasen des Kolonkarzinoms

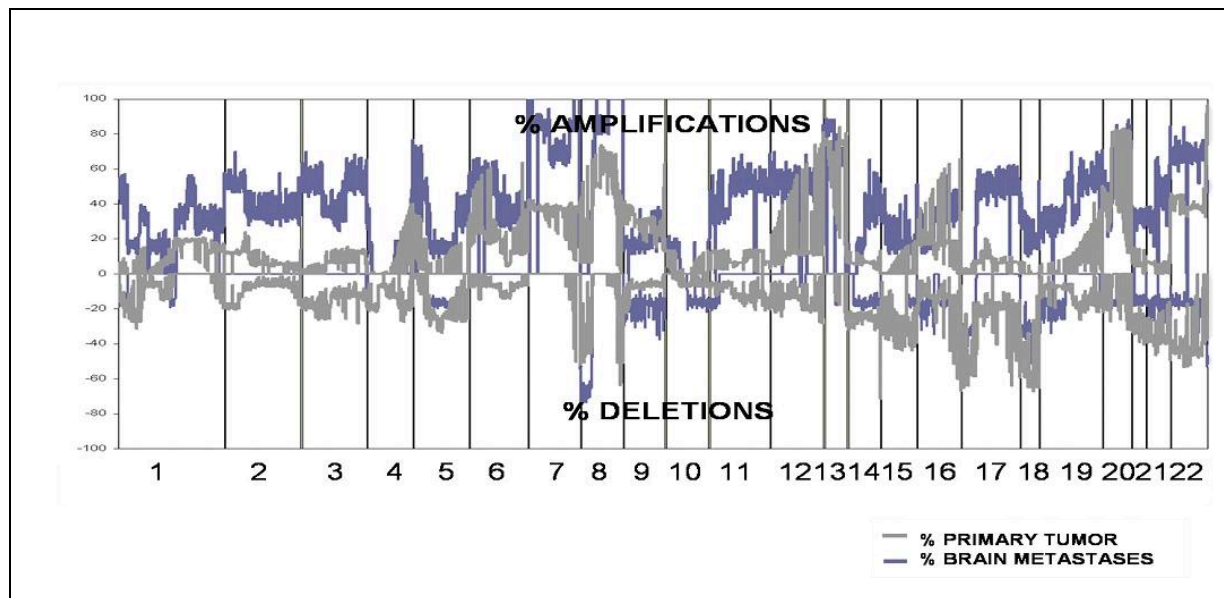


Abbildung 21 Amplifikationen und Deletionen von kolonrektalen Karzinom-Hirnmetastasen im Vergleich mit ihren Primärtumoren

Der Vergleich zwischen Hirnmetastasen vom Kolonkarzinom und ihren Primärtumoren zeigt sich ein zum Teil deutlich divergierendes Amplifikations- wie Deletionsschema.

Tabelle 17 Amplifikationen (über 30 %) kolonrektalen Karzinom-Hirnmetastasen versus Primärtumoren

Chr.	Region	Größe [Mbp]	Mw Hirnmet. Amp. %	Mw Hirnmet. Del. %	Pt Amp. %	Pt Del. %
1	p36.33-36.22	11	49	17	5	15
	p35.2-34.1	13	34	0	0	13
	p12-q44	125	35	0	17	0
2	p25.3-37.3	243	40	0	9	9
3	p26.3-q29	199	47	0	8	16
4	p16.3-16.2	3	39	8	4	18
5	p15.33-q12.3	63	53	3	23	3
	q 33.1-35.3	31	34	16	0	25
6	p25.3-q27	171	42	0	18	8
7	p22.3-q36.3	158	81	0	38	0
8	p12-q24.3	115	88	3	55	4
9	q33.2-34.3	15	32	20	26	6
11	p15.5-q25	133	47	3	11	10
12	p13.33-q24.33	132	50	1	10	17
13	q11-34	96	74	1	73	0
14	q24.1-32.33	37	38	17	0	32
15	q11.2-15.1	19	36	0	0	32
16	p13.3-24.3	89	30	15	18	12

<b>17</b>	p11.2-25.3	59	50	0	8	19
<b>18</b>	p11.32-11.2	192	34	34	5	51
<b>19</b>	p13.3-13.43	64	42	9	2	11
<b>20</b>	p13-q13.33	62	61	13	65	7
<b>21</b>	p11.1-q22.3	37	33	15	6	27
<b>22</b>	q11.2-q13.33	34	42	19	5	38

Wie in Tabelle 17 zu sehen ist konnten in der vorliegenden Arbeit, in einem Vergleich der Hirnmetastasen des kolorektalen Karzinoms mit ihren Primärtumoren, 24 Amplifikationsregionen ermittelt werden, welche eine höhere Frequenz als 30% aufwiesen.

Die Amplifikationsregionen der Hirnmetastasen kolorektalen Ursprungs, in einem Vergleich zu ihren Primärtumoren, zeigen eine eindeutig höhere Frequenz im gesamten Schema, mit Ausnahme der Region 20p13, in welcher die Primärtumoren in ihrer Frequenz überwogen. Die höchste Amplifikationsregion in der die Hirnmetastasen über wogen, war die Region 8p12-24.

**Tabelle 18 Deletionen (über 30 %) Kolorektalkarzinom-Hirnmetastasen versus Primärtumoren**

<b>Chr.</b>	<b>Region</b>	<b>Größe [Mbp]</b>	<b>Mw Hirnmet. Amp. %</b>	<b>Mw Hirnmet. Del. %</b>	<b>Pt Amp. %</b>	<b>Pt Del. %</b>
<b>8</b>	p 23.3-12	38	8	64	26	6
<b>17</b>	p13.3-11.2	18	0	35	0	59
<b>18</b>	p11.32-q11.2	17	34	34	6	50
	q11.2-23	57	18	41	0	61

Wie in Tabelle 18 zu sehen ist konnten im Vergleich der kolorektalen Karzinom-Hirnmetastasen mit ihren Primärtumoren vier Deletionsregionen ermittelt werden, welche eine höhere Frequenz als 30% aufwiesen. Ebenfalls präsentierte sich ein frequenzielles Überwiegen der Primärtumoren. Einzig auf Chromosom 8 p 23,3-12 übersteigt die Deletionsfrequenz der Hirnmetastasen, die der Primärtumoren.

### 3.3 Statistische Auswertung und signifikante Unterschiede zwischen Hirnmetastasen und Primärtumoren

Zur Detektion generell signifikanter Regionen im Vergleich zwischen Hirnmetastasen und den Primärtumoren wurde der Algorithmus Multi Array (vgl. Punkt 2.2.7.8), verwendet. Anhand dieses Algorithmus konnten signifikant unterschiedliche Amplifikations-, wie Deletionsregionen in den Hirnmetastasenentitäten, wie den Primärtumoren ermittelt werden.

**Tabelle 19 Signifikante P-Werte nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen versus nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinom-Primärtumoren**

Chr.	Region Start	Region Ende	Kb Start	Kb Ende	Größe [Mbp]	Hirn met.		Pt		p-Wert
						Del. %	Amp %	Del. %	Amp. %	
<b>1</b>	p12	q32.1	119287698	141512074	22	0	<b>44</b>	36	14	0.02
<b>2</b>	p35.3	p16.2	29114	54004153	54	0	<b>70</b>	9	27	0.04
	q12.3	q14.2	106905143	118656992	12	0	<b>70</b>	10	30	0.04
	q37.2	q37.3	236815262	242663633	6	0	<b>50</b>	10	13	0.04
<b>4</b>	p15.2	p15.2	23557413	26112382	3	<b>44</b>	22	0	44	0.02
	q31.1	q32.1	140692891	159987242	19	<b>44</b>	11	7	33	0.03
<b>5</b>	q11.2	q11.2	56512924	57843191	1	<b>50</b>	10	17	50	0.02
<b>7</b>	p22.3	p22.3	249767	1380563	1	11	<b>78</b>	12	31	0.04
	p14.1	p13	38116777	44915186	7	10	<b>80</b>	0	37	0.04
	q11.23	q21.3	76912601	93273174	16	13	<b>75</b>	7	24	0.03
<b>8</b>	q11.23	q21.2	54301134	86564813	32	<b>44</b>	11	11	44	0.03
	q24.21	q24.22	129028091	133642330	5	20	20	3	<b>62</b>	0.02
<b>9</b>	q33.2	q34.3	124101252	138292262	14	22	<b>67</b>	32	7	0.02
<b>11</b>	p15.4	p15.1	6342626	19034191	13	0	<b>56</b>	10	14	0.04
<b>15</b>	q11.2	q13.2	19130357	30694304	12	20	10	<b>77</b>	7	0.001
	q22.2	q24.2	60322955	73979485	14	0	<b>33</b>	38	10	0.02
<b>17</b>	p11.2	q11.2	16465312	23959264	7	11	<b>67</b>	27	10	0.01
	q11.2	q21.2	25599775	36066186	10	10	<b>70</b>	3	28	0.05
<b>19</b>	q13.11	q13.12	38817153	40899691	2	10	<b>50</b>	25	14	0.04
	q13.33	q13.33	55004796	56646714	2	0	<b>38</b>	21	7	0.04

Beim Vergleich der Hirnmetastasen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms mit ihren Primärtumoren lässt sich ein ähnliches Grundschema der Metastasierung in Hirnmetastasen



wie Primärtumoren feststellen. Die Hirnmetastasen weisen abermals eine signifikant höhere Frequenz an Amplifikationen, wie Deletionen im Vergleich mit ihren Primärtumoren auf.

Aus Tabelle 19 ist ersichtlich, dass es 14 signifikante Amplifikationsregionen und 5 signifikante Deletionsregion gibt. Die Deletionsregion 4p15.2 [p-Werte < 0,02] lässt sich zu ~40% in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen nachweisen, in den Primärtumoren hingegen konnte sie nicht ermittelt werden. Die höchsten Amplifikationsprozentätze in den Hirnmetastasen mit ~80% konnten in der Region 7p14-13 [p-Werte < 0,04] ermittelt werden. In den nicht korrespondierenden Primärtumoren ließ sich diese Region zu ~40% nachweisen. In den Amplifikationsregionen 9q33.2-34.3 [p-Werte < 0,02] und 17p11.2 [p-Werte < 0,01] überwogen ebenfalls die Hirnmetastasen mit ~70% gegenüber den Primärtumoren mit ~0-10%. Die Amplifikationen überwiegen in dieser Hirnmetastasengruppe deutlich.

**Tabelle 20 Signifikante P-Werte Mammakarzinom-Hirnmetastasen versus Mammakarzinom Primärtumoren**

Chr.	Region Start	Region Ende	Kb Start	Kb Ende	Größe [Mbp]	Hirn	Hirn	Pt	Pt	p-Wert
						met. Del. %	met. Amp %	Del. %	Amp. %	
5	q12.3	q23.1	64592185	120050426	55	57	0	15	18	0.03
7	p22.3	p22.1	249767	5288897	5	0	57	6	13	0.04
8	p12	p12.1	35649506	55784153	20	57	0	21	32	0.05
10	q22.2	q26.3	76881430	202827436	126	71	29	0	13	0.03
11	p15.5	p15.4	183776	4056187	4	100	0	20	12	0.001
	p11.2	q12.1	44909386	57169609	12	57	0	15	12	0.05
17	q11.2	q12	23418927	28364825	5	57	0	18	27	0.04
19	p13.2	p13.13	10322277	12858907	3	67	0	18	15	0.04
	q13.43	q13.43	63067896	63784575	1	57	0	13	17	0.03

Wie in Tabelle 20 zu sehen ist, konnten acht signifikante Deletionsregionen und eine Amplifikationsregion in den Hirnmetastasen ermittelt werden. Eine signifikante Region, in der die Primärtumoren in ihrer Frequenz überwiegen, konnte nicht gefunden werden. Die einzige signifikante Amplifikationsregion in den Hirnmetastasen liegt auf Chromosom 7 in der Region p22.3-p22.1 [p-Werte < 0,04].

Die Deletionsregion 10q22.2-26.3 [p-Werte < 0,03] ließ sich zu ~70% in den Mammakarzinom-Hirnetastasen ermitteln nicht aber in den nicht korrespondierenden Primärtumoren. Im Weiteren konnte die Amplifikationsregionen 11p15.5-15.4 [p-Werte < 0,001] in den Hirnetastasen gefunden werden, welche zu ~100% amplifiziert war. In den Mammakarzinom-Primärtumoren ließ sich die Region im Vergleich zu ~20% nachweisen. Eine dritte Amplifikationsregion in der die Hirnetastasen gegenüber den Primärtumoren überwogen war die Region 19p13.2-13.33 [p-Werte < 0,04]. Sie konnte zu ~70% in Hirnetastasen und zu ~15% in den Primärtumoren ermittelt werden.

**Tabelle 21 Signifikante P-Werte in Hirnetastasen des kolorektalen Karzinoms versus der kolorektalen Primärtumoren**

Chr.	Region Start	Region Ende	Kb Start	Kb Ende	Größe [Mbp]	Hirn met.		Pt		p-Wert
						Del. %	Amp %	Del. %	Amp. %	
<b>1</b>	p35.2	p35.1	31925297	33630936	2	0	<b>33</b>	25	0	0.05
<b>3</b>	p26.3	p14.3	399253	58483301	58	0	<b>60</b>	20	0	0.03
<b>7</b>	p22.3	p21.3	249767	8910363	9	0	<b>100</b>	0	33	0.02
	q36.1	q36.3	148146944	158320392	10	0	<b>100</b>	0	38	0.02
<b>8</b>	q24.3	q24.3	144496776	146195898	2	0	<b>100</b>	14	36	0.02
<b>15</b>	q11.2	q15.1	19427662	38326780	19	0	<b>33</b>	33	0	0.04
<b>17</b>	p11.2	q11.2	19227792	23679678	4	0	<b>33</b>	44	6	0.05
<b>19</b>	p13.3	p13.3	239096	531696	0.29	0	<b>50</b>	14	0	0.02
	q12	q13.2	34995717	43435395	8	0	<b>50</b>	6	0	0.02
	q13.31	q13.32	48943436	50542025	2	0	<b>75</b>	13	7	0.03
<b>22</b>	q12.3	q12.3	30654267	35284919	5	17	<b>67</b>	44	0	0.02

Im Vergleich zwischen Hirnetastasen des kolorektalen Karzinoms und ihren Primärtumoren konnte im Gegensatz zu den anderen beiden Hirnetastasengruppen kein einheitliches Grundschema zwischen den Hirnetastasen und ihren Primärtumoren festgestellt werden. Es wurden elf signifikante Amplifikationsregionen ermittelt in denen die Hirnetastasen in der Frequenz gegenüber den Primärtumoren überwogen. Eine signifikante Deletionsregion konnte nicht ermittelt werden. Es fanden sich die sechs Amplifikationsregionen 1p35.2-35.1 [p-Werte

< 0,05], 3p26.3-14.3[p-Werte < 0,03], 15q11.2-15.1[p-Werte < 0,04], 19p13.3-13.3[p-Werte < 0,02], 19q12-13.2[p-Werte < 0,02] sowie 22q12.3-12.3[p-Werte < 0,02], welche alleinig in Hirnmetastasen ermitteln werden konnten, nicht aber in den nicht korrespondierenden Primärtumoren. Die höchsten Amplifikationsprozentsätze mit ~100% ließen sich in den Regionen 7p22.3-21.3 [p-Werte < 0,02], 7q36.1-36.3 [p-Werte < 0,02] und 8q24.3-24.3[p-Werte < 0,02] feststellen. In den Primärtumoren waren diese Regionen zu ~30-40% amplifiziert. Eine weitere signifikante Amplifikationsregion konnte in der Region 19q13.31-13.32 [p-Werte < 0,03] mit ~70-80% ermittelt werden. Sie ließ sich ebenfalls zu ~7% in den Primärtumoren feststellen.

#### *Vergleich aller Hirnmetastasen Entitäten mit allen Primärtumoren*

Im Vergleich zwischen allen Hirnmetastasen mit allen Primärtumoren konnte eine generelle deutlich höhere Amplifikations-, wie Deletionsfrequenz der Hirnmetastasen gegenüber den Primärtumoren festgestellt werden (vgl. Tabelle 22). Die einzige Ausnahme bestand in Chromosom 15q11.2-13.2 hier überwog der Primärtumor mit einer Deletionsprozentzahl von 49% Deletionen gegenüber den Hirnmetastasen mit 22% Deletionen. In beiden Gruppen ließ sich ein ähnliches Grundschemata im Amplifikations-, wie Deletionsmuster feststellen. Insgesamt konnten neun signifikante Unterschiede im Amplifikationsmuster und drei im Deletionsschema gefunden werden, wobei die signifikanten Amplifikationen überwogen. Der höchste Amplifikationsprozentsatz konnte auf Chromosom 12p13.33-p12.1 ermittelt werden. Die höchste Deletion befand sich auf Chromosom 5 in Region q14.1-14.3. Signifikante Regionen, welche sich ausschließlich in Hirnmetastasen nicht aber Primärtumore finden ließen, konnten nicht ermittelt werden.

Tabelle 22 Signifikante P-Werte aller Hirnmetastasen versus aller nicht korrespondierende Primärtumore

Chr.	Region Start	Region Ende	Kb Start	Kb Ende	Größe (Mbp)	p-Wert	Gesamt Hirnm. Del.	Hirnm. Del. %	Hirnm. Amp.	Hirnm. Amp. %	Pt total Del.	Pt Del.%	Pt Amp.	Pt. Amp. %
2	p25,3	q31,1	29114	172673740	172,64	0,00	22	1	12	55	71	11	11	15
	q33,1	q33,3	201561585	206818106	5,26	0,03	23	0	7	30	79	5	9	11
3	q22,3	q26,1	137932338	164226894	26,29	0,02	23	2	11	48	79	11	14	20
5	q14,1	q14,3	78783666	85952243	7,17	0,01	19	10	2	11	67	12	12	18
7	7p22,3	q21,3	249767	93180721	92,93	0,00	22	1	17	77	73	5	7	23
9	q34,11	q34,3	127807013	138292262	10,49	0,00	23	3	11	48	73	17	23	9
10	10q23,3	q26,3	88810448	135257737	46,45	0,01	23	10	3	13	80	9	9	11
12	p13,33	p12,1	119729	25468728	25,35	0,00	21	1	16	76	77	9	12	29
15	q11,2	q13,2	18848246	30694304	11,85	0,03	23	5	4	17	68	33	49	9
16	p13,3	p13,13	4689055	10628974	5,94	0,05	23	3	4	17	78	7	9	33
19	q13,11	q13,12	39579050	41049756	1,47	0,04	22	3	8	36	78	11	14	9
	q13,33	q13,33	55125857	57140701	2,01	0,04	23	3	8	35	77	13	17	7

Mit Hilfe des Programms Multiaray wurden ebenfalls alle Metastengruppen gemeinsam mit allen Primärtumoren verglichen.

## 4. DISKUSSION

Die Hirnmetastasierung eines Primärtumors ist mit einer infausten Prognose und einer mittleren Überlebensdauer von unter einem Jahr verbunden. Zur Verbesserung der Diagnostik und Therapie wäre eine genaue Kenntnis der Grundlagen des Hirnmetastasierungsprozesses von großer Wichtigkeit. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, den grundlegenden molekularen Prozess der Metastasierung zu entschlüsseln (101). Die Hirnmetastasierung stellt in diesem Zusammenhang einen gesonderten Fall der Metastasierung dar, da das Gehirn vom übrigen Körper durch die Bluthirnschranke getrennt ist.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist es, veränderte chromosomale Regionen zu ermitteln, welche sich ausschließlich in Hirnmetastasen, nicht aber in den jeweiligen Primärtumoren finden lassen. Auf diesen Regionen könnten Mutationen codiert sein, die den Hirnmetastasen eine bessere Adaptation an ihre Umgebung ermöglichen würden. Gelänge es, diese Regionen und die auf ihnen codierten Gene zu ermitteln, könnte dieses zu einem verbesserten Grundverständnis des Hirnmetastasierungsprozesses beitragen.

Ein weiteres Ziel ist es, gemeinsame chromosomale Regionen in Hirnmetastasen und Primärtumoren zu ermitteln, die bei Hirnmetastasen in deutlich höherer Frequenz gegenüber ihren nichtkorrespondierenden Primärtumoren betroffen sind. Diese Regionen könnten als negative prognostische Marker in Primärtumoren fungieren. Anhand dieser Marker könnte es gelingen Patienten entsprechend ihrer Primärtumorprofile in unterschiedliche Risikogruppen bezüglich einer möglichen späteren Hirnmetastasierung zu unterteilen. Risikopatienten könnten demzufolge einer frühzeitigen, engmaschigen und individuell angepassten diagnostischen Kontrolle zugeführt werden. Im Falle einer Erkrankung, könnten sie von einer Therapie im Frühstadium profitieren. Dieses könnte zu einer Verbesserung der individuellen Überlebenszeit und Lebensqualität des einzelnen Patienten führen.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die DNA aus Hirnmetastasenfrischgewebe zu gewinnen und mittels der CGH-Array Methode zu analysieren.

Der Einsatz dieser analytischen Methode zur Untersuchung vergleichbarer Lungen-, Brust und kolorektalen Karzinom-Hirnmetastasen wurde bislang erst einmal von Petersen et al. (2000) mit einer nicht auf einer Array basierenden chromosomalen CGH Methode durchgeführt (102).

Folglich versteht sich die Arbeit als Beginn der Erstellung von Gehirnmetastasenspezifischen, chromosomalen Aberrationsprofilen. Diese könnten beispielsweise in der Diagnostik, bei der Suche nach unbekanntem Primärtumoren bei manifester Hirnmetastase, eine Anwendung

finden. Ließe sich zum Beispiel die Hirnmetastase eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms einem spezifischen CGH Profil zuordnen, wäre dies bei der gezielten klinischen Primärtumorsuche von Nutzen.

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen zu ermitteln, wurden zu nächst alle Amplifikationen und Deletionen, die in den Hirnmetastasen eine höhere Frequenz als 30% aufwiesen, mit bereits in der Literatur beschriebenen spezifischen Amplifikationen wie Deletionen in Primärtumoren verglichen (vgl. 4.1.1, 4.2.1,4.3.1). Im Anschluss wurden signifikant unterschiedliche Regionen zwischen Hirnmetastasen und ihren Primärtumoren mit vorliegenden Untersuchungen abgeglichen (Vgl. 4.1.2, 4.2.2, 4.3.2). Im Besonderen war es hier möglich, Hirnmetastasen des kolorektalen Karzinoms mit Fernmetastasen anderer Lokalität mit bereits vorhandenen Untersuchungen gegenüberzustellen (103; 104). Da das kolorektale Karzinom bei singulären Fernmetastasen nach chirurgischer Entfernung eine relativ gute Prognose aufweist, werden diese häufig operiert. Folglich existiert von diesem Material vergleichsweise viel Frischgewebe. Im Gegensatz hierzu weisen Lungenkarzinome und Mammakarzinom bei vorhandenen Fernmetastasen schlechtere Prognosen auf und werden aus diesem Grund im metastasierten Tumorstadium grundsätzlich selten operiert. Dies hat zur Folge, dass es von diesen Fernmetastasen anderer Lokalität (zum Beispiel Lebermetastasen) nur wenig Frischgewebe und somit auch kaum Vergleichsmöglichkeiten mit Hirnmetastasen gibt.

Eine mögliche Ursache für den generellen Mangel an Vergleichsanalysen zwischen Hirnmetastasen und ihren Primärtumoren könnte ebenfalls auf einem Mangel an Hirnmetastasenfrischgewebe beruhen, da sich viele Patienten, aufgrund ihrer infausten Prognose und der relativ kurzen Überlebenszeit, nicht operieren lassen(vgl. Punkt 1). Dieses zeigt den wichtigen Stellenwert dieser Arbeit, welcher ein erster Ansatz ist, um spezifische CGH Profile von unterschiedlichen Tumorentitäten diagnostisch nutzbar zu machen.

#### **4.1 Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen (NSCLC)**

In der vorliegenden Arbeit wurden 37 veränderte DNA-Regionen mit einer Frequenz von über 30% in den Hirnmetastasen des Bronchialkarzinoms ermittelt. Es handelt sich dabei um 22 Amplifikations- und 15 Deletionsregionen. Auf jedem Chromosom, mit Ausnahme der Chromosomen 16, 18, 21, 22 konnten Amplifikationsfrequenzen über 30% nachgewiesen werden. Aus der Analyse der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen mit den Primärtumoren ergab sich eine grundlegende Übereinstimmung der Aberrationsprofile. Es

bestand jedoch wie beschrieben in 3.1 NSCLC ein Unterschied in der höheren Frequenz, die die Hirnmetastasen gegenüber den Primärtumoren aufwiesen (vgl. 3.2.1).

Die ermittelten CGH-Profile der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Primärtumoren stimmten mit den bereits in der Literatur veröffentlichten Profilen überein. (105; 106)

#### **4.1.1 Bekannte chromosomale Aberrationsmuster in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen.**

Die höchste Amplifikationsfrequenz in den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen befand sich auf dem Chromosom 5p15–q11 mit ~70%. Die gleiche Frequenzhöhe fand sich jedoch ebenfalls in den Primärtumoren, daher war diese Region nicht signifikant und demzufolge auch nicht spezifisch für Hirnmetastasen. Im Weiteren fanden sich die Amplifikationsregionen 1p13-q44 und 7p22.3-q36, welche alle eine höhere Frequenz als 60% in den Hirnmetastasen aufwiesen. Da sich jedoch ähnlich hohe Frequenzen in den Primärtumoren zeigten, waren diese Regionen alle nicht signifikant und somit nichtspezifisch für Hirnmetastasen, noch ein diagnostischer Marker in Primärtumoren.

Auf jedem Chromosom, mit Ausnahme der Chromosomen 1, 2, 7, 12, 14, 15 und 20 konnten Deletionsfrequenzen über 30% nachgewiesen werden. Die höchste Deletionsfrequenzen der Hirnmetastasen lag auf Chromosom 13q11-34. Diese Region fand sich jedoch in gleich hoher Frequenz in den Primärtumoren und war somit nicht signifikant. Es fanden sich im Weiteren drei Deletionsregionen 3p26-q13, 11q22-q25 und 21p11-q22, welche alle eine höhere Frequenz als 37% aufwiesen, sich jedoch in ähnlich hoher Frequenz in den Primärtumoren fanden und somit nicht signifikant waren und daher nicht spezifisch für Hirnmetastasen.

#### **4.1.2 Signifikante Regionen in Hirnmetastasen der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome mit DNA-Veränderungen im Vergleich mit ihren Primärtumoren**

Im Vergleich der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen mit ihren nichtkorrespondierenden Primärtumoren wurden 15 signifikant unterschiedliche Amplifikationsregionen festgestellt. Im Gegensatz hierzu fanden sich lediglich 5 signifikant unterschiedliche Deletionsregionen. Die Amplifikationsregion 8q24 war die einzige signifikante Amplifikationsregion, in der Primärtumore gegenüber Hirnmetastasen überwogen. In der Fachliteratur wird die Amplifikationsregion 8q24, auf der das Onkogen *c-*

*Myc* liegt, als die häufigste chromosomale Veränderung in 5918 analysierten Primärtumoren unterschiedlicher Entität beschrieben (105). Diese Region scheint daher eine Bedeutung in der Primärtumorgenese unterschiedlicher Tumorentitäten zu haben. Sie dürfte aber kaum Hirnmetastasenspezifisch sein. Die einzige Deletion, in der die Primärtumore in der Anzahl gegenüber den Hirnmetastasen signifikant überwogen, stellte Region 15q11.2-q13.2 (77%) dar (vgl. Tabelle 19). Für diese Region und ihre mögliche Funktion konnte in der Fachliteratur keine Korrelation zwischen den auf ihnen liegenden Gene und einer möglichen Hirnmetastasierung gefunden werden. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Regionen fanden sich ebenfalls Regionen die, verglichen mit ihren Primärtumoren eine signifikant höhere Frequenz in Hirnmetastasen aufwiesen. Die höchsten ermittelten signifikanten Unterschiede in den Amplifikationsfrequenzen in nicht- kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen wiesen die Amplifikationsregionen 7p22.3, 7p14-p13, 7q11.23-q21.3 (~80%), 2p35.3-16.2, 2q12.3-14.2 (~70%), 9q33.2-q34.3 (~70%) und 17p12.2-q21.2 (~70%) [alle p-Werte < 0,05] auf. Die gleichen Regionen ließen sich ebenfalls zu 10-40% in den Primärtumoren ermitteln, weshalb diese Regionen nicht allein spezifisch für nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen zu sein scheinen. Eine besondere Bedeutung könnten diese Regionen aber in der Prognose von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Primärtumoren haben. Primärtumore, die eine oder mehrere der beschriebenen Regionen aufweisen, könnten mit einem erhöhten Risiko für eine Hirnmetastasierung einhergehen. Diese Regionen wären demzufolge negative prognostische Marker in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Primärtumoren und für das diagnostische, wie therapeutische Prozedere von außerordentlicher Wichtigkeit (vgl. Tab 19).

Die oben erwähnten signifikanten Amplifikationsregionen 7q11.2 und 9q34 wurden bereits in anderen Analysen von metastasierten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Primärtumoren und Hirnmetastasen beschrieben (107). Dagegen fanden sich für nicht metastasierte Primärtumoren keine Analysen. Das gleichzeitige Vorkommen dieser Regionen in metastasierten nicht- kleinzelligen Bronchialkarzinom-Primärtumoren und in Hirnmetastasen, könnte ein Hinweis darauf sein, dass beide Regionen möglicherweise Gene enthalten, deren verstärkte Expression mit dafür verantwortlich sein könnten die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung eines Primärtumors zu erhöhen. Eine spezifische Funktion in der Hirnmetastasierung scheinen diese Regionen jedoch nicht zu besitzen, da sie sich ebenfalls in metastasierten Primärtumoren ermitteln ließen, welche in andere Organe als das Gehirn metastasiert waren.



Im Weiteren konnten in der vorliegenden Arbeit die signifikanten Deletionen 4q31.1-32.1, 5q11.2-11.2 und 8q11.23-q21.2 [alle p-Werte < 0,03] ermittelt werden. Sie wiesen ebenfalls eine deutlich höhere Frequenz in den analysierten Hirnmetastasen als in den Primärtumoren auf. Aus diesem Grund könnten sie ebenso negative prognostische Marker in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Primärtumoren sein und mit einem höheren Risiko für eine Hirnmetastasierung einhergehen (vgl. Tabelle 19).

#### **4.1.3 Signifikante Regionen mit hirnmetastasenspezifischen DNA-Veränderungen**

Im Vergleich der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen mit ihren Primärtumoren ließen sich keine signifikanten, ausschließlich in Hirnmetastasen auffindbaren Amplifikationsregionen ermitteln. Im Gegensatz hierzu fand sich die Deletionsregion 4p15.2-15.2 [p=0,02] nur in Hirnmetastasen. Sie war zu ~40% in den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen deletiert, in Primärtumoren kam sie nicht vor. In der Literatur wurde diese Deletion bereits als signifikant in Hirnmetastasen des kolorektalen Karzinoms beschrieben, welches in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden konnte (102). Das Vorkommen dieser Region in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen fand in der Literatur bisher keine Erwähnung, sie scheint jedoch von außerordentlicher Bedeutung für die Hirnmetastasierung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms zu sein. Als Neumutation in den Hirnmetastasen könnte sie für das Überleben und Auswachsen der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen verantwortlich sein. Diese chromosomale Region könnte ein diagnostischer Marker für nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen sein und somit in der Diagnostik von unbekanntem Primärtumoren bei manifester Metastase zur Anwendung kommen.

## **4.2 Hirnmetastasen beim Mammakarzinom**

### **4.2.1 Bekannte chromosomale Aberrationsmuster in Mammakarzinom-Hirnmetastasen**

Im Vergleich zwischen den Mammakarzinom-Hirnmetastasen und ihren Primärtumoren konnten insgesamt 42 Regionen mit einer Frequenz von über 30% ermittelt werden. Diese unterteilten sich in 13 Amplifikations- und 29 Deletionsregionen.

Die Amplifikationsregionen, welche über 30% lagen konnten auf den Chromosomen 1, 2, 5, 7, 8, 10, 12 und 20 nachgewiesen werden. Die höchste Amplifikationsfrequenz in den

Mammakarzinom-Hirnmetastasen mit ~60%, befand sich auf dem Chromosom 8q22-24. Die gleiche Frequenzhöhe fand sich jedoch ebenfalls in den Primärtumoren, daher war diese Region nicht signifikant und demzufolge auch nicht hirnmetastasenspezifisch. Im Weiteren fanden sich die Amplifikationsregionen 1q32-41 und 12p13, welche in den Hirnmetastasen eine Frequenz von über 40% aufwiesen. Sie waren aufgrund der ähnlich hohen Frequenzen in den Primärtumoren jedoch, weder signifikant und somit nicht hirnmetastasenspezifisch, noch ein diagnostischer Marker in Primärtumoren.

Im Schema der Mammakarzinom-Hirnmetastasen konnten auf jedem Chromosom mit Ausnahme der Chromosomen 2, 4, 7 und 21 Deletionsfrequenzregionen, welche über 30% lagen nachgewiesen werden. Die höchste Deletionsfrequenz, der Hirnmetastasen lag auf Chromosom 10q11-26. Diese Region fand sich ausschliesslich in den Hirnmetastasen und war somit signifikant. Im Weiteren fanden sich drei Deletionsregionen 1p36-34, 10p15-14 und 13q11-34, welche alle eine höhere Frequenz als 50% aufwiesen. Diese Regionen waren jedoch alle nicht signifikant und somit nicht hirnmetastasenspezifisch.

Wie bereits in Punkt 4.1.1 beschrieben, ergab die Analyse der Mammakarzinom-Hirnmetastasen mit ihren Primärtumoren ein grundsätzlich gleiches Aberrationsprofil. Die Hirnmetastasen überwogen jedoch ebenfalls in ihrer Frequenz gegenüber den Primärtumoren (Vgl. 3.1).

Wie zuvor im Punkt 4.1.1 beschrieben, wichen die CGH-Profile der Mammakarzinom-Primärtumore nicht von den bereits in der Literatur beschriebenen ab (105; 108). Eine Ausnahme bei den Deletionen bildete die chromosomale Region 16q11.2-24.3, die eine höhere Frequenz in den Primärtumoren aufwies. Diese Deletion der chromosomalen Region 16q ist als prognostischer Marker für eine gute Prognose beim Mammakarzinom-Primärtumoren bereits beschrieben und charakteristisch mit der Amplifikationsregion 1p für den luminalen Mammakarzinom-Subtyp A nach Perou et al. (2000) (109; 110). Es existieren fünf verschiedene Mammakarzinom-Subtypen, die sich in ihrer klinischen Prognose deutlich voneinander unterscheiden. Sie werden nach dem Expressionsprofil des vorherrschenden histologischen Zelltyps eingeteilt. Der luminale Subtyp A ist Hormonrezeptor positiv und Her2/neu negativ und weist die beste Prognose von allen Subtypen auf (111). Die in dieser Arbeit verwandten Primärtumore entsprachen in ihrem CGH Profil diesem Subtyp und wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose weder Lymphknotenmetastasen noch andere Fernmetastasen auf. Im Gegensatz dazu hat der luminale Subtyp B und die drei Er negativen Typen basaler -, Her2/neu positiver- und der normale Brusttyp eine deutlich schlechtere Prognose (112; 113).

In den Mammakarzinom-Hirnmetastasen ließen sich im Gegensatz zu den Primärtumoren folgende drei Amplifikationsregionen ermitteln: 7q22-q36, 10p und 12q24. Ebenfalls konnten auch zwei Deletionsregionen gefunden werden: 3p und 14q 22-23. (Vgl.3.2.2). Diese werden als charakteristisch für den basalen und den Her2/neu Brustkrebssubtyp beschrieben (114; 113). Wie Kenneck et al. (2008) zeigten, sind diese beiden Subtypen vor allem für die Hirnmetastasierung des Mammakarzinom verantwortlich (115; 116).

#### **4.2.2 Signifikante Regionen mit hirnmetastasenspezifischen DNA Veränderungen**

Im Vergleich der Mammakarzinom-Hirnmetastasen mit ihren Primärtumoren zeigten sich insgesamt 9 signifikant unterschiedliche Regionen, davon 8 Deletionen und eine Amplifikation. Die Hirnmetastasen überwogen in ihrer Frequenz ausnahmslos gegenüber den Primärtumoren. Die einzige Deletionsregion 11p15.5 – 15.4 [p=0,001] war zu 100% in den Hirnmetastase deletiert, wohingegen sich die gleiche Region nur zu (20%) in den Primärtumoren nach weisen ließ. In der Literatur wurde diese Deletion bereits in metastasierten, intraduktalen Mammakarzinom und sporadisch vorkommenden Mammakarzinom als niedrigfrequent beschrieben (113; 117). Dieses könnte auf eine besondere Bedeutung der Deletionsregion hindeuten. Sie scheint ein negativer prognostischer Marker für eine mögliche Metastasierung eines Mammakarzinoms zu sein. Das Vorkommen dieser Deletionsregion zu 100% in Mammakarzinom-Hirnmetastasen spricht ebenfalls für eine bedeutende prognostische Funktion dieser Region bezogen auf eine mögliche Hirnmetastasierung des Mammakarzinoms.

Im Weiteren konnten in der vorliegenden Arbeit die Deletionsregionen 5q12.3-q23.1, 8p12-p12.1, 11p11.2-q12.1, 17q11.2-q12, 19p13.2-p13.33 und 19q12.43 sowie die Amplifikationsregion 7p22.3-p22.1 [alle p-Werte < 0,05] ermittelt werden. In den beschriebenen Regionen überwogen die Mammakarzinom-Hirnmetastasen in ihrer Frequenz (~60-70%) gegenüber den Primärtumoren (~10-30%) (Vgl. 3.3, Tab.20). Diese Regionen könnten ebenfalls negative prognostische Marker in Primärtumoren des Mammakarzinoms darstellen, da sie mit einem erhöhten Hirnmetastasierungsrisiko und somit einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden zu sein scheinen.

#### **4.2.3 Signifikante Regionen mit DNA Veränderungen, die sich ausschließlich in Hirnmetastasen des Mammakarzinoms ermitteln ließen.**

Im Vergleich der Mammakarzinom-Hirnmetastasen mit nichtkorrespondierenden Primärtumoren fand sich keine signifikante Amplifikationsregion, die nur in Hirnmetastasen zu finden war. Im Gegensatz hierzu konnte die Deletionsregion 10q22.2-26.3 [ $p=0,03$ ](~70%) ermittelt werden, die nur in Hirnmetastasen vorkam. In der Literatur fand sich die Deletionsregion 10q in Mammakarzinomen bei Höglund et al. (2002) (118). Die spezifische Region 10q22.2-26.3 wurde dort jedoch nicht beschrieben und könnte somit in der spezifischen Hirnmetastasierung des Mammakarzinom eine bedeutende Rolle spielen. Des Weiteren könnte die Region charakteristisch für einen besonderen Mammakarzinom-Subtyp sein, welcher bevorzugt in das Gehirn metastasiert. Bedeutungsvoll wäre diese Region möglicherweise für die Entwicklung von hirnmetastasenspezifischen CGH-Profilen. Gelänge es in nachfolgenden Untersuchungen, weitere spezifische Regionen für die Hirnmetastasierung des Mammakarzinoms zu ermitteln, könnten diese als spezifische Profile zur Primärtumorsuche bei unbekanntem Primärtumor genutzt werden.

### **4.3 Hirnmetastasen beim kolorektale Karzinom**

#### **4.3.1 Bekannte chromosomale Aberrationsmuster in kolorektalen Karzinomhirnmetastasen**

In der Analyse der kolorektalen Karzinom-Hirnmetastasen mit ihren nicht korrespondierenden Primärtumoren zeigte sich im Unterschied zu den Mammakarzinom- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen ein deutlich divergierendes Amplifikations- wie Deletionsschema. Es konnten insgesamt 28 Regionen mit einer Frequenz von über 30% ermittelt werden. Hiervon waren 24 Amplifikationsregionen und 4 Deletionsregionen.

Auf jedem Chromosom, mit Ausnahme der Chromosomen 1, 10, 21 und 22 konnten Amplifikationsfrequenzen in den Hirnmetastasen, welche über 30% lagen, nachgewiesen werden. Die höchste Amplifikationsfrequenz in den kolorektalen Hirnmetastasen befand sich auf dem Chromosom 8p12-q24 mit ~90%. Die Region 8q24 war signifikant, fand sich jedoch ebenfalls in den Primärtumoren und ist auch als Primärtumor spezifisch beschrieben in der Literatur (105).

Im Weiteren fanden sich die Amplifikationsregionen 5p15-q12 und 13q11-34, welche alle eine höhere Frequenz als 50% in den Hirnmetastasen aufwiesen. Da sie sich jedoch in ähnlich hohe Frequenzen in den Primärtumoren ermitteln ließen, waren diese Regionen alle nicht signifikant und somit nicht hirnmetastasenspezifisch.

Es fanden sich vier Deletionen, im gesamten Deletionsschema, welche eine Frequenz von über 30% aufwiesen. Sie lagen auf den Chromosomen 8, 17 und 18. Die höchste und einzige Deletionsfrequenz, in welcher die Hirnmetastasen gegenüber den Primärtumoren überwogen lag auf Chromosom 8p23-12 und war nicht signifikant (vgl..3.1).

In den Amplifikationen überwogen die Hirnmetastasen in ihrer Frequenz über die Primärtumore (Vgl. 3.2.3). Die einzige Ausnahme stellt die Region 20p13-q13.33 dar. Hier überwogen die Primärtumore gegenüber den Hirnmetastasen. Beschrieben ist die Amplifikationsregion 20q in metastasierten Primärtumoren. Sie ist mit einer schlechten Prognose und einem aggressiven Phänotyp vergesellschaftet (119; 120). Im Gegensatz zu den Amplifikationen überwogen die Primärtumore im Deletionsschema in ihrer Frequenz gegenüber den Hirnmetastasen. Einzig in der Deletionsregion 8p überwogen die Hirnmetastasen in ihrer Frequenz gegenüber den Primärtumoren. Die CGH-Profile der Primärtumoren des kolorektalen Karzinoms wiesen im Vergleich mit den bereits in der Literatur beschriebenen CGH-Profilen keine Unterschiede auf (105).

#### **4.3.2 Signifikante Regionen mit hirnmetastasenspezifischen DNA Veränderungen**

Im Vergleich der kolorektalen Karzinom-Hirnmetastasen mit ihren Primärtumoren fanden sich 11 signifikante Amplifikationsregionen aber keine signifikante Deletionsregion. Die Hirnmetastasen überwogen in ihrer Frequenz ausnahmslos über die Primärtumoren.

Es fanden sich die Amplifikationsregionen 7p22.3-21.3 [ $p=0,02$ ] und 7q36.1-36.3 [ $p=0,02$ ], die zu 100% in den Hirnmetastasen und lediglich zu ~40% in den nichtkorrespondierenden Primärtumoren nachweisbar waren. In der Literatur wurden Amplifikationen in Primärtumoren in der chromosomalen Region 7p ebenfalls zu ~40% beschrieben (105). Die Region ließ sich ebenfalls in Hirnmetastasen von Melanomen als signifikant im Unterschied zu ihren Primärtumoren ermitteln (102). Dieses könnte für eine grundlegende Beteiligung der Region in der Hirnmetastasierung von Primärtumoren sprechen. Primärtumore, die diese Amplifikation aufweisen könnten mit einem erhöhten Hirnmetastasierungsrisiko und somit einer schlechten Prognose vergesellschaftet sein, womit diese Region als diagnostischer Marker in Primärtumoren von besonderem Interesse wäre.

Dagegen wurde die Amplifikationsregion 7q36.1-36.3 [ $p=0,02$ ] bisher nicht beschrieben. Es wäre zu klären, inwiefern diese Amplifikation in der Hirnmetastasierung des kolorektalen Karzinoms von Bedeutung wäre. Ihr Vorkommen in Primärtumoren wie auch in

Hirnmastasen spricht gegen eine spezifische Funktion in der Entstehung und Adaptation von Hirnmastasen des kolorektalen Karzinoms. Sie könnte jedoch ebenfalls ein negativer prognostischer Marker sein und mit einer erhöhten Hirnmastasierung des kolorektalen Karzinoms einhergehen.

Die Amplifikationsregionen 17p11.2-q11.2 [ $p=0,05$ ] und 19q13.31-q13.32 [ $p=0,03$ ] konnten sowohl in Hirnmastasen als auch in Primärtumoren gefunden werden. Die Hirnmastasen wiesen dabei mit ~30-80% deutlich höhere Frequenzen auf als die Primärtumoren mit ~0-1%. Auch diese Regionen könnten als negative prognostische Marker für eine mögliche Hirnmastasierung von kolorektalen Karzinom-Primärtumoren fungieren.

#### **4.3.3 Signifikante Regionen mit DNA Veränderungen, die sich ausschließlich in spezifischen Hirnmastasenentitäten des kolorektalen Karzinoms ermitteln ließen**

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs signifikante Amplifikationen in den Hirnmastasen ermittelt. Im Gegensatz hierzu konnte keine Deletionen ermittelt werden, die sich nicht in den Primärtumoren finden ließen. Die festgestellten Amplifikationsregionen 1p35.2– 35.1, 3p26.3-14.3, 15q11.2 – 15.1, 19p13.3-13.3, 19q12-13.2 und 22q12.3-12.3 [alle  $p$ -Werte  $< 0,03$ ] könnten ein spezifisches, in der Diagnostik verwendbares, CGH-Profil von kolorektalen Hirnmastasen sein. Die hier aufgeführten Regionen wurden bisher nicht beschrieben. Sie stellen in diesem Zusammenhang ein besonderes Amplifikationsschema dar.

Die Amplifikationen könnten bereits im Primärtumor entstanden sein und für die Disseminierung der einzelnen Tumorzelle und der Metastasierung in das Gehirn verantwortlich sein. Da diese Zellen jedoch in einer sehr geringen Anzahl im Primärtumor vorkämen, würden sie in der Primärtumoranalyse nicht auffallen. Ihre Existenz in den Hirnmastasen könnte darin begründet sein, dass nur diese Primärtumorzellen die Fähigkeit besäßen, ins Gehirn zu gelangen. Ebenfalls könnte es sich bei jeder dieser Regionen um eine Neumutation handeln, die im Laufe der Dissemination einer einzelnen Primärtumorzelle unter dem Selektionsdruck des umliegenden Hirngewebes entstanden ist. Diese Neumutationen könnten es der disseminierten Tumorzelle ermöglichen, sich an eine neue Umgebung (das Gehirn) zu adaptieren.

#### **4.3.4 Vergleich der analysierten kolorektalen Karzinom-Hirnmastasen mit Leber- und Lungenmetastasen des kolorektalen Karzinoms**

Mittels eines Vergleichs der kolorektalen Karzinom-Hirnmastasen mit kolorektalen Leber- und Lungenmetastasen aus bereits vorhandenen Studien (103; 104) wurden gemeinsame Regionen ermittelt, die in Hirnmastasen wie in Leber- und in Lungenmetastasen vorkamen. Im Ergebnis zeigten sich die gemeinsamen Amplifikationsregionen 1q, 6p21, 7p13-21, 7q11-31, 8q23-24.3, 11, 12q21, 13q12-14, 17q12, 17q24-25, 19, 20q12, 20p und 22q sowie die Deletionen 8p23, 17p12-13.3, 18q11-21, 18p11 als gemeinsame Regionen in Hirn- und Lebermetastasen (103). Durch das gemeinsame Vorkommen dieser Regionen in kolorektalen Lebermetastasen sowie Hirnmastasen scheinen sie eine Rolle in der generellen Metastasierung des kolorektalen Karzinoms zu spielen. Im Vergleich der kolorektalen Karzinom-Hirnmastasen mit pulmonalen kolorektalen Karzinom Metastasen konnten die gemeinsamen Amplifikationsregionen 7q, 8q, 13q, 20q sowie die Deletionen 8p, 18p und 18q festgestellt werden (104). Diese Regionen scheinen, im Gegensatz zu den weiteren, möglicherweise hirnmastasenspezifischen Amplifikationsregionen aus Tabelle 21 nicht spezifisch für die Hirnmastasierung des kolorektalen Karzinoms zu sein, da sie sich ebenfalls in pulmonalen Metastasen und Hirnmastasen nachweisen ließen. In der allgemeinen Metastasierung des kolorektalen Karzinoms dagegen scheinen sie eine Rolle zu spielen.

Die Deletionsregion 8p konnte in den analysierten kolorektalen Karzinom-Hirnmastasen, den kolorektalen Karzinom-Lebermetastasen sowie den kolorektalen Karzinom-Lungenmetastasen, nicht aber in kolorektalen Karzinomprimärtumoren nachgewiesen werden (104; 121). Dieses unterstreicht die Bedeutung der Region in der grundlegenden Fernmetastasierung des kolorektalen Karzinoms. Der Einfluss dieser Region wäre in weiteren Untersuchungen zu klären. Dagegen ließ sich die Amplifikationsregion 7q in Hirnmastasen sowie in pulmonalen kolorektalen Karzinommetastasen nachweisen (104). Eine genauere Lokalisierung konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Sie scheint ebenfalls nicht hirnmastasenspezifisch zu sein. Da sie sich aber ausschließlich in Hirnmastasen und pulmonalen Metastasen zeigte, nicht aber in Primärtumoren, scheint diese Region ebenfalls bei der Metastasierung von kolorektalen Karzinomen eine Rolle zu spielen.

#### **4.4 Tumorübergreifender Vergleich zwischen Hirnmastasen und Primärtumoren**

Im Vergleich aller Hirnmastasen mit allen Primärtumoren fanden sich acht signifikante Amplifikationsregionen und drei signifikante Deletionsregionen (vgl. Tabelle 22). In der

Amplifikationsregion 16p13.3-p13.33[p=0,05] sowie in der Deletionsregion 15q11.2-q13.2 [p=0,03] überwogen die Primärtumoren in ihrer Frequenz. Die Amplifikation 16p ist im Mammakarzinom Primärtumoren bereits in der Literatur beschrieben und mit einer guten Prognose vergesellschaftet (105). Die Deletionsregion 15q wird dagegen im Zusammenhang mit kolorektalen Primärtumore erwähnt (122).

In den gesamten Deletionsschemata aller Hirnmetasten sowie der nichtkorrespondierenden Primärtumoren fand sich keine Region, die nur in Hirnmetastasen oder Primärtumoren alleinig vorkam. Dieses Ergebnis widerspricht der Annahme, dass es Deletionsregionen gibt, die in allen Hirnmetastasenentitäten gemeinsam vorkommen und in den Primärtumoren nicht zu finden sind.

Die höchsten Amplifikationen wiesen die Hirnmetastasen in den Regionen 7p22.3-q21.3 und 12p13.33 – p12.1 [beide p-Wert< 0,001] mit ~70-80% auf. In den Primärtumoren konnten lediglich Amplifikationen von ~20-30% nachgewiesen werden. Die Amplifikationsregion 7p ist ein häufiges Ereignis in Astrocytomen (123). Sie ließ sich ebenfalls in Hirnmetastasen von Melanomen, welche häufig in das Gehirn metastasieren nachweisen (102). Die Signifikanz der Region in allen drei Hirnmetastasenentitäten im Vergleich mit ihren nichtkorrespondierenden Primärtumoren, weist darauf hin, dass diese Region eine Funktion in der Hirnmetastasierung oder im Auswachsen und in der Adaptation von Hirnmetastasen von Karzinomen zu haben scheint. Die Region 12p13.33 – p12.1[p=0,00] wurde in der bisherigen Literatur nicht im Zusammenhang mit Hirnmetastasen erwähnt. Es wäre zu prüfen, inwiefern sie eine Rolle in der Hirnmetastasierung anderer Tumoren spielt.

Die Amplifikationsregionen 2p25.3-q31.1, 2q33.1-q33.3, 3q22.3-q26.1, 9q34.11-q34.3, 19q13.11 – q13.12 und 19q13.33-q13.33 [alle p-Werte< 0,04] sowie die Deletionsregionen 5q14.1 – q14.3 und 10q23.3 – q26.3 [beide p-Werte< 0,01] wiesen deutlich höhere Frequenzen in allen Hirnmetastasen auf als in ihren nichtkorrespondierenden Primärtumoren. Diese Regionen könnten in einem grundlegenden Hirnmetastasierungsprozess eine Rolle spielen.

#### 4.5 Literaturvergleich



Aufgrund der Seltenheit an verfügbaren Hirnmetastasenfrischgewebe lassen sich in der bisherigen Literatur, außer in der Arbeit von Petersen et al. (2000), keine weiteren Referenzquellen heranziehen, die mit der vorliegenden Analyse vergleichbar wären.

Es ist zusätzlich zu bemerken, dass Petersen et al. (2000) ihre Untersuchungen lediglich mit einer nicht auf Array basierenden CGH-Methode durchführte. Mit dieser ist es zwar möglich, amplifizierte wie deletierte Regionen in einer Größe von etwa 5-10 Megabasenpaaren zu ermitteln, sie zeigt jedoch ein deutlich geringeres Auflösungsvermögen im Vergleich zu der hier angewandten CGH-Array-Methode (124). Die hier verwendete CGH-Array-Methode erreicht Auflösungen von etwa 100kb und ermöglicht somit eine wesentlich genauere Detektion von spezifischen Regionen als die klassische CGH. Dieses könnte die Erklärung dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit mehr Regionen und vor allem kleinere Regionen ermittelt werden konnten, als in der von Petersen et al. (2000). Des Weiteren unterscheiden Petersen et al. (2000) ihre analysierten Lungenhirnmetastasen nicht, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, in nicht-kleinzellige und kleinzellige Bronchialkarzinome (vgl. 1.2.1). Daher ist ein Vergleich der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen mit allgemein beschriebenen Lungenhirnmetastasen nur ansatzweise möglich. Es ist jedoch aufgrund fehlenden Referenzmaterials ein erster Versuch gemeinsame spezifische Regionen aufzudecken.

Im Vergleich der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomhirnmetastasen mit den Lungenkrebshirnmetastasen von Petersen et al. ließen sich die gemeinsamen Amplifikationsregionen 7p21-22, 17q25 und die Deletionsregion 4q32-33,4q26 und 5q21 in beiden Analysen ermitteln. Diese Regionen scheinen kennzeichnend für Hirnmetastasen des Bronchialkarzinoms zu sein.

In den nicht korrespondierenden nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Primärtumoren konnten die gleichen Regionen ermittelt werden, jedoch in deutlich geringerer Frequenz als in den Hirnmetastasen. Dieses könnte dafür sprechen, dass Primärtumoren, welche diese Regionen aufwiesen mit einer schlechten Prognose bezüglich der Hirnmetastasierung verbunden wären. Die Amplifikationen und Deletionen könnten demzufolge negative prognostische Marker in Primärtumoren darstellen.

Wie in Tabelle 19 dieser Arbeit zu sehen, konnten weitere signifikante Amplifikations- sowie Deletionsregionen festgestellt werden, die bei Petersen et al. (2000) nicht zu finden sind. Dieses könnte, wie im Punkt 4.5 beschrieben, mit der Verwendung von unterschiedlichen CGH-Methoden und ihren entsprechenden Auflösungen in Verbindung stehen oder spezifisch für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome sein.

Im Vergleich der Brustkrebs-Hirnmastasen konnten die gemeinsamen Deletionsregionen 5q12.3-q23.18p12-p12.1 und 10q22.2-q24.3 in der vorliegenden Arbeit, wie der Analyse von Petersen et al. (2000) ermittelt werden. Die Regionen konnten in einer deutlich höheren Frequenz in den Hirnmastasen als den nicht korrespondierenden Primärtumoren nachgewiesen werden. Somit könnten diese Regionen prognostische Marker in Primärtumoren darstellen, da sie sich in einer hohen Frequenz in Hirnmastasen und in einer niedrigen Frequenz in Primärtumoren ermitteln ließen. Die Primärtumore, die diese signifikanten Deletionen aufwiesen, könnten mit einer schlechten Prognose bezüglich der Mammakarzinom- Hirnmastasierung verbunden sein (102).

Die hier analysierten kolorektalen Karzinom-Hirnmastasen wiesen im Vergleich mit den kolorektalen Karzinom-Hirnmastasen, welche von Petersen et al. (2000) untersucht wurden, signifikante Amplifikationsunterschiede in der Region 8q21.3- 24.3. auf. Sie fanden sich, wie alle anderen Regionen, ebenfalls in den Primärtumoren, jedoch in einer deutlich geringeren Frequenz. Es wäre zu klären, ob diese Regionen einen möglichen prognostischen Marker für eine negative Prognose in kolorektalen Primärtumoren darstellen könnten.

## 5. Ausblick

Im Vergleich der Hirnmetastasenentität mit den Primärtumoren gingen in der vorliegenden Arbeit signifikante, unterschiedliche Amplifikations- und Deletionsmuster hervor. Die überwiegend höheren Amplifikations- wie Deletionsfrequenzen fanden sich in den Hirnmetastasen. Es wäre in weiteren Untersuchungen zu klären, ob diese Regionen als prognostische Marker für eine häufigere Hirnmetastasierung von spezifischen Primärtumoren in Frage kämen und in diesem Sinne von Bedeutung in der Primärtumordiagnostik sein könnten.

Die in dieser Arbeit ermittelten Regionen müssten mit Hilfe von Methoden wie beispielsweise der Fluoreszenzinsituhybridisierung (FISH) verifiziert und weiter untersucht werden. In Weiteren Untersuchungen wären größere Probenzahlen von Nöten.

Die signifikante Region 10q in Mammakarzinomhirnmetastasen wurde bereits in weiteren Analysen untersucht und es konnte das mögliche Target Gen *PTEN* ermittelt werden. In einer Studie mit einer größeren Anzahl an Gewebeproben von Mammakarzinom-Hirnmetastasen konnte demonstriert werden, dass ein Verlust von 10q oder *PTEN* einzig in Hirnmetastasen des Mammakarzinoms vorkommt, jedoch nicht in anderen Metastasen. Ebenfalls zeigte sich das diejenigen Primärtumore, welche später ins Gehirn metastasierten bereits diese Deletion aufwiesen. *PTEN* scheint daher ein negativer prognostischer Marker in Primärtumoren des Mammakarzinoms für eine spätere Hirnmetastasierung zu sein (3).

Die in dieser Arbeit beschriebene Deletion 11p in Mammakarzinom-Hirnmetastasen konnte in weiterführenden Analysen ebenfalls als negativer prognostischer Marker in Primärtumoren des Mammakarzinoms für eine spätere Hirnmetastasierung ermittelt werden (125).

Es wäre zu prüfen, welche Bedeutung die Deletionsregionen 4p15.2-15.2 haben, welche sich ausschließlich in Hirnmetastasen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms ermitteln ließ. In weiteren Untersuchungen wäre zu klären, welche Korrelation zwischen den auf den spezifischen Regionen liegenden Genen bestehen und welche Funktionen sie in der spezifischen Hirnmetastasierung des Bronchialkarzinoms haben.

Weiterhin wäre zu klären, ob die Hirnmetastasen des kolorektalen Karzinoms eine gesonderte Hirnmetastasierung aufweisen. In diesem Zusammenhang wären Analysen der sechs signifikanten Amplifikationsregionen, die sich exklusiv in kolorektalen Karzinomhirn-

metastasen finden ließen, von Wichtigkeit. Des Weiteren wäre die spezifische Funktion dieser signifikanten Regionen zu prüfen und ob sie alleine oder nur in Kombination für eine Hirnmetastasierung verantwortlich sind. Zudem müssten weitere vergleichende Analysen mit einer größeren Anzahl an Proben zwischen Hirnmetastasen und ihren korrespondierenden Primärtumoren verifizieren, ob es sich bei den ermittelten Mutationen um neu auftauchende Phänomene handelt oder ob die Mutationen bereits im Primärtumor vorhanden waren.

Ebenfalls sollte untersucht werden, ob spezifische CGH-Array Profile für einzelne Tumorentitäten existieren und inwiefern sich diese bei manifester Hirnmetastase in der Diagnostik von unbekanntem Primärtumoren (CUP) einsetzen ließen. Bei einer spezifischen Hirnmetastasierung einzelner Tumorentitäten stellt sich die Frage, ob es parallel zu der histologischen Subtypeneinteilung des Mammakarzinom und der sich hieraus ergebenden häufigen Hirnmetastasierung einzelner Subtypen ähnlich histologische Subtypeneinteilungen auch bei den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und den kolorektalen Karzinomen gibt. Gäbe es sie, wäre das für die Diagnostik und die weitere Therapieplanung von Primärtumoren von besonderer Bedeutung. Von besonderem Interesse wäre es auch zu wissen, ob sich gemeinsame signifikante Regionen in allen Mammakarzinomsubtypen finden ließen.

Die Entwicklung von Tumor-spezifischen CGH Profilen und somit die Möglichkeit der Unterscheidung der einzelnen Risikoprofile eines jeden Patienten, könnte ein weitere Schritt zur Individualisierung der Tumortherapie sein.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Deutschland, Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregisters. <http://www.gekid.de/>. [Online] April 2012. <http://www.gekid.de/>.
2. Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R. *Das Rote Buch Hämatologie und internistische Onkologie*. s.l. : Ecomed, 2010. 4. Überarbeitete Auflage.
3. Wikman H, Lamszus K, Detels N, Uslar L, Wrage M, Benner C, Hohensee I, Ylstra B, Eyselmann K, Zapatka M, Sauter G, Kemmling D, Glatzel M, Müller V, Westphal M, Pantel K. Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2012, Bd. 14:.
4. Deutschland, Statistisches Bundesamt. D STATIS Statistisches Bundesamt. [Online] [Zitat vom: 12. April 2012.] <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>.
5. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging of Lung Cancer. *Chest.* 1997, 111:1710-1717.
6. Mountain CF, Dressler CM. Regional lymphnode classification or lung cancer staging. *chest.* 1997, (111)1718 - 1723.
7. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. *Repititorium Pathologie*. München : Urban und Fischer Verlag, 2004.
8. Robert Koch Institut & Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland 2007 / 2008. Saarbrücken : Bundesrepublik Deutschland, 2012. 8.
9. Tumorzentrum Freiburg. *Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinom*. [Hrsg.] Freiburg Tumorzentrum. Freiburg : s.n., 2006. Bd. 3.
10. Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *Lancet.* 2000, 355: 479-85.
11. Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, Luchini F, Negri E, Vecchia L. Cancer mortality in the European Union, 1970 – 2003, with a joinpoint analysis. *Annals of Oncology.* 2008, 19:631 – 640.
12. Stupp R. About: Lung Cancer Principles and Practice. *New England Journal of Medicine.* 2001, 344 (17).

13. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003, 3:, S. 733-44.
14. Kohlhäufl M, Häussinger K. *Tumoren der Lunge und des Mediastinums*. München : Broschüre des Tumorzentrum München. B W. Zuckschwerdt Verlag, 2006.
15. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R und Doll R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst*. 2004, 96:99-106.
16. Vineis P, Airodi L, Veglia P, Olgiati L, Pastorelli R, Autrup R, Dunning A, Garte S, Gormally E, Hainaut P, Malaveille C, Matullo G, Peluso M, Overvad K, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, Boeing H, Krogh V, Palli D, Panico S, Tumino R, B.-De-Mesquita B, Peeters P, Berglund G, Hallmans G, Saracci R, Riboli E. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *British medical journal*. 2005, 330:277 – 280.
17. Wichmann E. *Abschätzung positiver gesundheitlicher Auswirkungen durch den Einsatz von Partikelfiltern bei Dieselfahrzeugen in Deutschland. Gutachten im Auftrag des Umweltbundesamtes*. Berlin : s.n., 2003.
18. Pesch B, Joeckel KH, Wichmann HE. Luftverunreinigung und Lungenkrebs. *Informatik, Biometrie und Epidemiologie in Medizin und Biologie*. 1995, 26:, S. 134-153.
19. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Molecular origins of Cancer, Lung cancer. *New England journal of Medicin*. 2008, 359:13 Sep 25.
20. Schackert G, Mennel HD, Böcker, et al. Leitlinienpapier zur Diagnostik und Therapie zerebraler Metastasen. Heidelberg : Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft in der Deutschen Krebsgesellschaft, 10/2004.
21. Hauptmann H. Palliative Therapie. *Broschüre des Tumorzentrum München*. B W. Zuckschwerdt Verlag. 2006.
22. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. *Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. [Hrsg.] World Health Organization (WHO). Lyon : IARC Press, 2004.

23. Zöchbauer – Müller S, Gazdar AF, Minna JD. Molecular Pathogenesis of Lungcancer. *Annual Revue Physiologie*. 2002, 64:681 – 708.
24. El-Torky M, El-Zeky F, Hall C. Significant changes in the distribution of histological types of lung cancer. A review of 4928 cases. *Cancer*. 1990, 65 :2361 – 2367.
25. Panan AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer letters*. 2006, 239: 1 – 9.
26. Mina JD. Lungentumore. [Hrsg.] Zeitz M. Dietel M. In: *Harrisons Innere Medizin Suttrop N*. Berlin : ABW Wissenschaftsverlag, 2005. Bd. 1, 16 (536-553).
27. Pathologie, Universität Basel. <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/intro.htm> (Pic n.d.). *PathoPic*. [Online] [Zitat vom: 20. 05 2011.]
28. Bittmann I, Müller- Höcker J. *Pathomorphologie der Lungenkarzinome. Manuelle Tumoren der Lunge und des Mediastinums*. [Hrsg.] Tumorzentrum München. s.l. : W. Zuckschwerdt Verlag München, 2006. Bd. 7.
29. Mertelsmann R, Engelhard R, Berger D. Das Bronchialkarzinom. *Das Rote Buch- Hämatologie und internistische Onkologie*. s.l. : Ecomed medicin, 2006, Bd. 2, S. 588-597.
30. Shields PG. Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene*. 2002, 21:, S. 6870-6876.
31. Franceschi S, Bidol E.,. The epidemiology of Lung cancer. *Annual Oncology*. 1999, 10 Suppl 5 :3-6.
32. Behr J, Benedikter J, Hauck RW, Häussinger KE, Huber RM, Mueller-Lisse UG. Diagnostik des Lungenkarzinoms. *Pathomorphologie der Lungenkarzinome. Manuelle Tumoren der Lunge und des Mediastinums*. München : Tumorzentrum München, 2006.
33. Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH. *Lung Cancer: Princibles and Practice*. s.l. : Lippincott and Williams, 2000.
34. Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary Managment of lung cancer. *New England Journal of Medicin*. 2004, 350:, S. 379-92.
35. Senan S, Lagerwaard FJ.,. The role of radiotherapy in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*. 2005, 16:223-228.

36. Präuer HW, Hatz R, Thetter O. *Chirurgische Behandlung des Lungenkarzinoms: Pathomorphologie der Lungenkarzinome. Manuelle Tumoren der Lunge und des Mediastinums*. [Hrsg.] Tumorzentrum München. 7. Auflage. 2006.
37. Schalhorn A. Chemotherapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms. *Broschüre des Tumorzentrum München. B W. Zuckschwerdt Verlag*. 2006.
38. Drings P. *Der Lungenkrebs- das Bronchialkarzinom; Statement zum 26. Deutschen Krebskongress Berlin*. Berlin : Deutsche Krebsgesellschaft E.V, 2004.
39. Gu CD, Osaki T, Oyama T, Inoue M, Kondate M, Dobashi K, Oka T, Yasumoto K. Detection of Micrometastatic Tumor Cells in pN0 Lymph Nodes of patients With Completely Resected Non Small Cell Lung Cancer. *Annals of Surgery*. 2002, 235:133-139.
40. Effenberger EK, Siemel W, Pantel K. Lymph Node Micrometastases in Lung Cancer. [Buchverf.] Lelong SP. *Cancer Metastasis And The Lymphovascular System: Basis For Rational Therapy*. s.l. : Springer US, 2007, S. 167-175.
41. Tyczynski JE. [www.encl.com](http://www.encl.com). *Breast Cancer in Europe.Fact Sheet, European Network of Cancer Registries ENCR*. [Online] 2002. <http://www.encl.com.fr/breast-factsheets.pdf>.
42. Kreienberg R, Kopp I, Albert U, Bartsch HH, Beckmann MW, Berg D, Bick U, du Bois A, Budach W, Dunst J, Engel J, Ernst B, Geraedts M, Henschler U, Hölzel D, Jackisch C, König K, Kreipe H, Kühn T, Lebeau A, Leinung S, Link H, Lück HJ, Madjar H, Maiwald A. Interdisziplinäre S - 3 Leitlinien für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. München : W. Zuckschwerdt Verlag, 2008.
43. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2005 – 2006. Häufigkeiten und Trends. [Hrsg.] Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010, 6. überarbeitete Auflage.
44. Giersiepen K, Heitmann C, Janhsen K, Lange C. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Brustkrebs*. [Hrsg.] Robert Koch Institut. Heft 25. Berlin : s.n.
45. Lux MP, Fasching PA, Beckmann MW. Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J Mol Med*. 2006, 84: 16-28.
46. Roukos DH, Briasoulis E. Individualized preventive and therapeutic management of hereditary breast ovarian cancer syndrome. *nature*. 2007, 4 : , S. 578-590.



47. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003, 348:2339-47.
48. Gabriel N, Hortobagyi. Treatment of Breast cancer. *New England Journal of medicin*. 1998, 339:974-984.
49. Chelbowski RT, Kuller LH, Prentice RL, Stefanick ML, Manson JA, Gass M, Aragaki AK, Ockene JK, Lane DS, Sarto G, Rajkovic A, Schenken R, Hendrix SL, Ravdin PM, Rohan TE, Yasmeeen S, Anderson G. Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. *New England Journal of Medicin*. 2009, 360:573-87.
50. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Woman Study. *The Lancet*. 2003, 362:419 - 427.
51. Duchnowska R, Szczylik C. Central nervous system metastases in breast cancer patient administered trastuzumab. warsaw : s.n., 2005. 31:312-318.
52. Böcker W, Denk H , Heitz PU, Moch H. *Pathologie*. München : Urban und Fischer Verlag, 2008.
53. Bundesministerium für Gesundheit. *Mammographie-Screening in Deutschland-Erfahrung und Perspektiven*. Berlin : s.n., 2008.
54. Punglia RS, Morrow M, Winer EP, Harris JR. Local therapy and survival in Breast cancer. *New England Journal of medicin*. 2007, 356:2399-405.
55. EJSO. Surgical guidlines for management of breast cancer. 2009, 35:, S. 1-22.
56. Janni W, Gerber B, Sommer H, et al. The managment of primary invasive breast cancer. *Deutsches Ärzteblatt*. 2005, 102 (41):A-2795/B-2360/C-2226.
57. Goldhirsch AJ, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann, Senn HJ, Panal member. Thresholds for therapies: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Annals of Oncology*. 2009, Juni 2009.
58. Hudis CA. Trastuzumab-mechanism of Action and use in clinical practice. *New England Journal of medicin*. 2007, 357: 39-51.
59. Moore A. Breast-cancer therapie- looking back to the futur. *New England Journal of medicin*. 2007, 357: 1547-1549.

60. Brundred NJ. Prognostic and predictiv factors in breast cancer. *Cancer Treatment reviews*. 2001, 27:137-142.
61. Lippman ME. Mammacarcinom. [Hrsg.] Suttorp N., Zeitz M. Dietel M. In: *Harrisons Innere Medizin*. 16. Auflage. Berlin : ABW Wissenschaftsverlag, 2005.
62. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nature*. 2004, 4:, S. 448-456.
63. Pantel K, Woelfle U. Cancer Micrometastasis: Detection clinical relevance, and molecular description. *American society of clinical oncology*. 2004, S. 701-708.
64. Ruf G. *Empfehlung zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge Kolorektales Karzinom*. Freiburg : Tumorzentrum Freiburg, 2005.
65. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rödel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Kopp I, Pox C. *S3 Leitlinie "Kolorektales Karzinom", Gastroenterologie*. 2008.
66. Chelbowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbach C, Hubbell FA, Ascensao J, Rodabough RJ, Rosenberg CA, Taylor VM, Harris R, Chen C, Adams-Campbell LL, White E,. Estrogen plus Progestin and colorektal cancer in postmenopausal women. *New England Journal of Medicin*. 2004, 350:991-1004.
67. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *New England Journal of medicin*. 2003, 348:, S. 919-32.
68. Piard F, Chapusot C, Ecartot-Laubriet A, Ponnelle T, Martin L. Molecular markers of heterogeneity in colorektal cancers and adenomas. *European Journal of Cancer Prevention*. 2002, 11:, S. 85-97.
69. Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: A meta-analysis of cohort studies. *World Journal of Gastroenterology*. 2007, 1331:4199-4206.
70. Lieberman DA. Screening for Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicin*. 2009, 361:1179-87.
71. Levin JS, Ahnen DJ. Adenomatous Polyps of the colon. *New England Journal of Medicin*. 2006, 355:2551-7.

72. Schouten LJ, Rutten J, Huvneers HAM, Twinstra A. Incidence of Brain Metastases in a Cohort of Patients with Carcinoma of the Breast, Colon, Kidney and Lung and Melanoma. *Cancer*. 2002, 94:2698-2705.
73. Fearon E.R, Vogelstein Bert. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*. 1990, 61:759-767.
74. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumor cells. *Nature Reviews*. 2008, 8: 329-340.
75. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulations. *Science*. 2002, 295:2387-2392.
76. Chiang AC, Massague J. Molecular Basis of Metastasis. *New England Journal of Medicin*. 2008, 359: 2814-23.
77. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biology*. 1994, 124:619-626.
78. Gassman P, Enns A, Haier J. Role of tumor cell adhesion and migration in organ-specific metastasis formation. *Onkologie*. 2004, 27: 577-582.
79. Guo W, Giancotti FG,. Integrin signalling during tumour progression. *Molecular Cell Biology Natur revies*. 2004, 5: 816-826.
80. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews*. 2002, 08: 563-72.
81. Wikman H, Vessella R, Pantel K. Cancer micrometastasis and Tumor domancy. 2008, 116: 754-770.
82. Lüllmann-Rauch R. Histologie. Verstehen-Lernen-Nachschlagen. 3 Stuttgart : Thieme Verlag, 2003.
83. Nigam AK, Pignatelli M, Boulos B. Current concepts in metastasis. *Gut*. 1994, 35: 996 - 1000.
84. Petersen I, Schwendel A, Bockmühl U, Dietel M. Die komparative genomische Hybridisierung. *Pathologie*. 1996, 17:, S. 333-341.

85. Eichler AF, Loeffler JS. Multidisciplinary Management of Brainmetastases. *The Oncologist*. 2007, 12:884 - 898.
86. Weller M, Schackert G, et al. www.dgn.org. *Solide Hirnmetastasen. Leitlinien der DGN 2008*. [Online] 2008. [Zitat vom: 25. September 2012.] [http://www.dgn.org/images/stories/dgn/leitlinien/LL2008/ll08kap\\_082.pdf](http://www.dgn.org/images/stories/dgn/leitlinien/LL2008/ll08kap_082.pdf).
87. Schmid UD, Honegger HP, Pescia R. Chirurgie der Hirnmetastasen. *Schweizer Med Forum*. 2002, S. 1187-1194.
88. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutoviz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization: a powerful new method for cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992, 258: 818-821.
89. Baudis M. progenetix. [Online] Institut of Molecular Life science Universität Zürich, 2000-2013. [Zitat vom: 11. 05 2010.] <http://www.progenetix.org/cgi-bin/pgHome.cgi>.
90. Myllykangas S, Tikka J, Böhling T, Knuutila S, Hollmen J. Classification of human cancers based on DNA copy number amplification modeling. *Onkogens*. 2006, 25:, S. 7324-32.
91. Nathoo N, Chahlavi A, Barnett GH, Toms SA. Pathologie of brain metastases. *J. Clin. Pathol*. 2005, 58, S. 237-242.
92. Suh JH. Stereotactic Radiosurgery for the Management of Brain Metastases. *New England Journal of Medizin*. 2010, 03/10:1119 - 1127.
93. Aoyama H, Shirato H, Tago M, Nakagawa K, Toyoda T, Hatano K, Kenjyo M, Oya N, Hirota S, Shioura H, Kunieda M, Inomata T, Hayakawa K, Katoh N, Kobashi G. Stereotactic radiosurgery plus whole-brain radiation therapy vs stereotactic radiosurgery alone for treatment of brainmetastases: a randomised controlled trial. *J Am Med Ass*. 2006, 295:2483-2491.
94. Bos DP, Zhang XHF, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massague J. Genes that mediate breastcancer metastasis to the brain. *Nature*. 2009, 459:1005-1009.
95. Takahashi K, Kohno T, Matsumoto S, Nakanishi Y, Arai Y, Yamamoto S, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J. Clonal and Parallel Evolution of Primary Lung Cancers and Their

- Metastasis Revealed by Molecular Dissection of Cancer Cells. *Clin. Cancer Research*. 2007, 13 (1):111-120.
96. Van der Ijssel P, Tijssen M, Chin SF, et al. Human and mouse oligonucleotide-based array CGH. *Nucleic Acids Research*. 2005, 33.
97. Jong K, Marchiori E, Meijer G, et al. Breakpoint identification and smoothing of array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics*. 2004, vol.20 no.18.
98. Van de Wiel MA, Smeets RJ, Brakenhoff RH, Ylstra B. CGHMultiArray: Exact P-values for multi-array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics*. 2005, 21:3193-3194.
99. Van de Wiel M. Technische Universiteit Eindhoven. <http://w3.win.tue.nl>. [Online] [Zitat vom: 20. März 2009.] [www.win.tue.nl/~markvdw/CGHMultiArray.html](http://www.win.tue.nl/~markvdw/CGHMultiArray.html).
100. UCSC Genome Bioinformatics. <http://genome.ucsc.edu/>. [Online]
101. Ramaswamy Sridhar, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *nature genetics*. 2003, 33, S. 49-54.
102. Petersen I, Hidalgo A, Petersen S, Schlüns K, Schewe C, Pacyna-Gengelbach M, Goeze A, Krebber B, Knösel T, Kaufmann O, Szymas J, von Deimling A. Chromosomal Imbalances in Brain Metastases of Solid Tumors. *Brain Pathologie*. 2000, 10: 395-401, S. 395-401.
103. Diep CB, Parada LA, Teixeira MR, Eknaes M, Nesland JM, Johansson B, Lothe RA. Genetic Profiling of Colorectal Cancer Liver Metastases by Combined Comparative Genomic Hybridization and G-Banding Analysis. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2003, 36:189-197.
104. Jiang JK, Chen YJ, Lin CH, YU IT, Lin JK. Genetic Changes and Clonality Relationship between Primary Colorectal Cancers and Their Pulmonary Metastases - An Analysis by Comparative Genomic Hybridization. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2005, 43:25-36.
105. Baudis M. Genomic imbalances in 5918 malignant epithelial tumors: an explorative meta-analysis of chromosomal CGH data. *BMC Cancer*. 2007, 7:226.
106. Balsara BR, Testa JR. Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene*. 2002, 21:6877-6883.

107. Goeze A, Schlüns K, Wolf G, Thäsler Z, Petersen S, Petersen I. Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Journal of Pathologie*. 2002, 196:8-16.
108. Torres L, Ribeiro FR, Pandis N, Andersen JA, Heim S, Teixeira MR. Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2007, Bde. 102: 143-155.
109. Perou CM, Soerlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Boerresen-Dale AL, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000, 406:, S. 747-752.
110. Norgard S, Johansen F, Alnaes GI, Bucher E, Synvånen AC, Naume B, Boerresen-Dale AL, Kristinsen VN. Genome-Wide Analysis Identifies 16q Deletion Associated With Survival, Molecular Subtypes, mRNA Expression, and Germline Haplotypes in Breast Cancer Patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2008, 47 :680-696.
111. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Boerresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*. 2001, 98:, S. 10869-10874.
112. Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Soerlie T, Hernandez-Boussard T, Lønning PE, Tibshirani R, Boerresen-Dale AL, Pollack JR. Distinct Patterns of DNA Copy Number Alteration Are Associated with Different Clinicopathological Features and Gene-Expression Subtypes of Breast Cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2006, 45:1033-1040.
113. Fridlyand J, Snijder A, Ylstra B, Li H, Olshen A, Segraves R, Dairkee S, Tokuyasu T, Ljung BM, Jain AN, McLenna J, Ziegler J, Chin K, Devries S, Feiler H, Gray JW, Waldman F, Pinkel D, Albertson DG. Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *MBC Cancer*. 2006, 6:96.
114. Chin K, De Vries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, Lapuk A, Neve RM, Qian Z, Ryder T, Chen F, Feiler H, Tokuyasu T, Kingsley C, Dairkee S, Meng Z, Chew K, Pinkel D, Jain A, Ljung BM, Esserman L, Albertson DG, Waldman FM, Gray JW.

Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*. 2006, 10:529-541.

115. Schmid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Kijn JG, Foekens JA, Martens JW. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Research*. 2008, 68:(9) 3108-3114.

116. Kenecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic Behaviour of Breast Cancer Subtypes. *J clin Oncol*. 2010.

117. Wang C, Iakovlev VV, Wong V, Leung S, Warren K, Iakovleva G, Arneson NC, Pintilie M, Miller N, Youngson B, McCreedy DR, Done SJ. Genomic Alternations in Primary Breast Cancer Compared with their Sentinel and More Distal Lymph Node Metastases : An aCGH Study. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2009, 48 :1091-1101.

118. Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Säll T, Miteman F. Multivariate Analysis of Chromosomal Imbalances in Breast Cancer Delineates Cytogenetic Pathways and Reveals Complex Relationships among Imbalances. *Cancer Research*. 2002, 62 : 2675-2680.

119. Hidaka S, Yasutake T, Takeshita H, Kondo M, Tsuji T, Nanashima A, Sawai T, Yamaguchi H, Nakagoe T, Ayabe H, Tagawa Y. Differences in 20q13.2 Copy Number between Colorectal Cancers with and without Liver Metastasis. *Clinical Cancer Research*. 2000, 6:2712-2717.

120. Knösel T, Petersen S, Schwabe H, Schlüns K, Stein U, Schlag PM, Petersen I. Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch*. 2002, 440:187-194.

121. Al-Mulla F, Keith WN, Pickford IR, Going JJ, Birnie GD. Comparative Genomic Hybridization Analysis of Primary Colorectal Carcinomas and their Synchronous Metastases. *Genes, Chromosomen and Cancer*. 1999, 24:306-314.

122. De Angelis PM, Clausen OP, Schoelberg A, Stokke T. Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *British Journal of Cancer*. 1999, 80 :526-535.

123. Schlegel J, Scherthan H, Arens N, Stumm G, Kiessling M. Detection of complex genetic alterations in human glioblastom multiforme using comparative genomic hybridization. 1996, 55: 81-87.

124. Carvalho B, Weiss MM, Ylstra B, et al. Microarrays- Detecting DNA Copy-Number Changes. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and proteomics*. 2005, 10.
125. Wikman H, Sielaff-Frimpong B, Kropidlowski J, Witzel I, Milde-Langosch K, Sauter G, Westphal M, Lamszus K, Pantel K. Clinical relevance of loss of 11p15 in primary and metastatic breast cancer: association with loss of PRKCDBP expression in brain metastases. *PLoS One*. 2012, Bd. 7 (10)e47537.
126. Stauber. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart : s.n., 2. aktualisierte Auflage. (2005).



## 7. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Typen des NSCLC a) Adenokarzinom der Lunge (AC), b) verhorntes Plattenepithelkarzinom (SCC) c) großzelliges Lungenkarzinom (LCLC) © PathoPic, Universität Basel.....</i>	
<i>5Abbildung 2 Prozentuale Häufigkeit des Mamakarzinoms in den einzelnen Quadranten der Brust. (126) (Stauber n.d.) .....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 3 Histologische Beispiele für ein a) invasiv duktales und b) invasiv lobuläres Mammakarzinom. © PathoPic, Universität Basel Aus: <a href="http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/intro.htm">http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/intro.htm</a> (Pic n.d.) (27) .....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 4 Adenokarzinom pT2 ©PathoPic, Universität Basel (Pic n.d.) (27).....</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 5 In Anlehnung an das genetische Modell der kolorektalen Tumorgenese nach VOGELSTEIN 1990 (Fearon and Vogelstein 1990) (73).....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 6 Metastasierungskaskade. Aus: Guo, Wenjun und Giancotti, Filippo G. Integrin signalling during tumour progression, Nature Reviews. Molecular Cell Biology 5: 816-826 (Oktober 2004) (79).....</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 7 Amplifikations- und Deletionsmuster in 1333 Mammakarzinomen, Quelle: <a href="http://www.progenetix.com">www.progenetix.com</a> (Uni Zürich) (89) .....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 8 Amplifikations- und Deletionsmuster von 449 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Quelle: <a href="http://www.progenetix.com">www.progenetix.com</a> (89).....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 9 Amplifikations- und Deletionsmuster in primären 735 Kolontumoren, Quelle: (<a href="http://www.progenetix.com">www.progenetix.com</a>) (89) .....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 10 Isolierte DNA im Nano Drop Bild .....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 11 Alternative 1 zum Setzen der Nulllinie.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 12 Alternative 2 zum Setzen der Nulllinie.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 13 Amplifikationsprofil der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom – Hirnmetastasen .....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 14 Deletionsprofil der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom –Hirnmetastasen .....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 15 Amplifikationsprofil der Mammakarzinom-Hirnmetastasen.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 16 Deletionsprofil der Mammakarzinom-Hirnmetastasen .....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 17 Amplifikationsprofil von kolorektalen Karzinom-Hirnmetastasen .....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 18 Deletionsprofil von kolorektalen Karzinom-Hirnmetastasen.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 19 Amplifikationen und Deletionen von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Hirnmetastasen im Vergleich mit ihren Primärtumoren.....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 20 Amplifikationen und Deletionen von Mammakarzinomhirnmetastasen im Vergleich mit ihren Primärtumoren.....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 21 Amplifikationen und Deletionen von kolorektalen Karzinom-Hirnmetastasen im Vergleich mit ihren Primärtumoren .....</i>	<i>62</i>

## 8. Tabellen - & Formelverzeichnis

### Tabellen:

<i>Tabelle 1 Metastasierungsmuster der Bronchialkarzinome in Abhängigkeit vom histologischen Typ.</i>	7
<i>Tabelle 2 Metastasierungsmuster des Mamakarzinoms</i> .....	13
<i>Tabelle 3 Metastasierungsmuster des Kolonkarzino</i> .....	21
<i>Tabelle 4 Anzahl der Hirnmetastasen eingeteilt nach Primärtumorentität (N = 23)</i> .....	35
<i>Tabelle 5 Einteilung der nicht korrespondierenden Primärtumoren</i> ... ..	36
<i>Tabelle 6 Verwendete Chemikalien</i> .....	36
<i>Tabelle 7 Verwendete erworbene Systeme</i> .....	36
<i>Tabelle 8 Puffer aus dem QIAamp® DNA Micro Kit, Quiagen, Hilden</i> .....	37
<i>Tabelle 9 Puffer gemäß des Protokolls der VUmc Microarray Facility</i> .....	37
<i>Tabelle 10 Verwendete Geräte</i> .....	38
<i>Tabelle 11 Definierung von DNA- Zugewinnen und Verlusten entsprechend ihrer Smoothwerte</i> .....	49
<i>Tabelle 12 Nulllinienkorrektur anhand von Expressionsprofilen</i> .....	52
<i>Tabelle 13 Amplifikationen (über 30 %) nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom Hirnmetastasen versus Primärtumoren</i> .....	57
<i>Tabelle 14 Deletionen (über 30 %) nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinom Hirnmetastasen versus Primärtumoren</i> .....	58
<i>Tabelle 15 Amplifikationen (über 30 %) Mammakarzinomhirnmetastasen versus Primärtumoren</i> .....	60
<i>Tabelle 16 Deletionen (über 30 %) Mammakarzinomhirnmetastasen versus Primärtumoren</i> .....	61
<i>Tabelle 17 Amplifikationen (über 30 %) Kolonkarzinomhirnmetastasen versus Primärtumoren</i> .....	62
<i>Tabelle 18 Deletionen (über 30 %) Kolonrektalekarzinom-Hirnmetastasen versus Primärtumoren</i> .....	63
<i>Tabelle 19 Signifikante P-Werte NSCLC-Hirnmetastasen versus NSCLC-Primärtumoren</i> .....	64
<i>Tabelle 20 Signifikante P-Werte Mammakarzinom-Hirnmetastasen versus Mammakarzinom-Primärtumoren</i> .....	65
<i>Tabelle 21 Signifikante P-Werte in Hirnmetastasen des kolorektalen Karzinoms versus kolorektalen Primärtumoren</i> .....	66
<i>Tabelle 22 Signifikante P-Werte aller Hirnmetastasen versus aller Primärtumoren</i>	- 66-

### Formeln:

<i>Formel 1 Ermittlung der Log 2 Ratio</i> .....	- 47
<i>Formel 2 Modifiziertes Z-Scoring</i> .....	48

## 9. ANHANG

## Anhang I pTNM Klassifizierung des Bronchialkarzinoms /Staging nach IASLC Lung Cancer Staging Project, 2009 in Anlehnung an Berger et al. (2)

Primärtumor (pT)	
<b>pTX</b>	Primärtumor nicht beurteilbar oder positives Sputum, oder BAL-Zytologie, aber weder rad. noch bronchoskopischer Nachweis eines Primärtumors
<b>pT0</b>	kein Nachweis für einen Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor $\leq 3$ cm, von Lungengewebe oder viszeraler Pleura umgeben, keine bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration prox. eines Lappenbronchus, (keine Beteiligung der Hauptbronchien)
<b>T1a</b>	Größter Tumordurchmesser $< 2$ cm
<b>T1b</b>	Größter Tumordurchmesser $> 2$ cm und $< 3$ cm
<b>T2</b>	Tumor mit einer der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Größter Tumordurchmesser <math>&gt; 3</math> cm und <math>&gt; 7</math> cm</li> <li>- Invasion eines Hauptbronchus</li> <li>- Abstand zur Karina <math>\geq 2</math> cm</li> <li>- Einbeziehung der Pleura visceralis</li> <li>- Sekundäre Pneumonie oder Artelektase, nicht die ganze Lunge betreffend</li> </ul>
<b>T2a</b>	Größter Tumordurchmesser $> 3$ und $< 5$ cm oder Größe nicht zu bestimmen
<b>T2b</b>	Größter Tumordurchmesser $> 5$ und $< 7$ cm oder Größe nicht zu bestimmen
<b>T3</b>	Größter Tumordurchmesser $> 7$ cm oder Tumor jeder Größe mit Tumorbefall einer der folgenden Strukturen: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Thoraxwand</li> <li>- Zwerchfell</li> <li>- Nervus phrenicus</li> <li>- Mediastinale Pleura</li> <li>- Parietales Perikard</li> <li>- Des Hauptbronchus mit Distanz zur Carina <math>&lt; 2</math> cm ohne Befall der Carina</li> <li>- Totalartelektase oder Retentions-Pneumonie einer Lunge</li> <li>- Obstruktive Entzündung der gesamten Lunge oder separate Tumorknoten im selben Lappen wie der Primärtumor</li> </ul>

<b>T4</b>	Tumor jeder Größe mit Tumordinfiltration		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- des Mediastinums</li> <li>- des Herzens</li> <li>- der großen Gefäße</li> <li>- der Trachea</li> <li>- des Ösophagus</li> <li>- der Wirbelkörper</li> <li>- der Hauptkarina</li> <li>- Nervus laryngeus recurrens</li> <li>- Vom Primärtumor getrennte Tumorknoten in einem anderen Lungenlappen derselben Seite</li> </ul>		
	Tumordinvasion der anderen Lunge per continuitatem		
<b>Lymphknotenmetastasen (pN)</b>			
<b>pNX</b>	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar		
<b>N0</b>	Keine reg. Lymphknotenmetastasen		
<b>pN0</b>	Regionäre Lymphadenektomie und hist. Untersuchung von mind. 6 Lymphknoten ohne Befall ( 3 mediastinal/subkarinale und 3 von N1-Lymphknotenstation		
<b>N1</b>	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und /oder in ipsilateralen Hilus-oder intrapulmonalen Lymphknoten ( ink. Befall durch direkte Ausbreitung des Primärtumors)		
<b>N2</b>	Ipsilaterale Metastasen in mediastinalen und/oder subkarinale Lymphknoten		
<b>N3</b>	Kontralaterale, mediastinale oder hiläre Lymphknotenmetastasen, Befall subklavikulärer oder skalenus Lymphknoten		
<b>Fernmetastasen (pM)</b>			
<b>MX</b>	Fernmetastasen nicht beurteilbar		
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen		
<b>M1</b>	Fernmetastasen		
<b>M1a</b>	Vom Primärtumor getrennte Tumorherde in einem kontralateralen Lungenlappen, Pleurametastasen oder mal. Pleura oder Perikarderguss		
<b>M1b</b>	Andere Metastasen		
<b>Stadieneinteilung</b>			
<b>Okkultes Karzinom</b>	Tx	N0	M0
<b>Stadium 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadium 1A</b>	T1a, T1b	N0	M0

<b>Stadium 1B</b>	T2a	N0	M0
<b>Stadium 2A</b>	T2b, T1a, T1b, T2a	N0 N1	M0
<b>Stadium 2B</b>	T2b T3	N1 N0	M0
<b>Stadium 3A</b>	T1a,b, T2a,b T3 T4	N2 N1, N2 N0	M0
	T1-3	N2	M0
<b>Stadium 3B</b>	Jedes T T4	N3 N2	M0
	T1-4	N3	M0
<b>Stadium 4</b>	Jedes T	Jedes N	M1

T = Größe und die Ausbreitung des Primärtumors zum Diagnosezeitpunkt

N = für Infiltration von regionären Lymphknoten

M = Fernmetastasen

TIS = Karzinoma in situ

## Anhang II pTNM Klassifizierung des Mammakarzinoms /Staging

In Anlehnung an: Berger et al (2)

Primärtumor (pT)	
<b>pTX</b>	Primärtumor nicht beurteilbar
<b>pT0</b>	kein Nachweis für einen Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor $\leq 2$ cm
<b>T2</b>	Tumor $> 2$ cm aber $< 5$ cm
<b>T3</b>	Tumor $> 5$ cm
<b>T4</b>	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, Entzündungen, Ulcerationen, Satellitenläsionen
Lymphknotenmetastasen (pN)	
<b>pNX</b>	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
<b>pN0</b>	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
<b>pN1</b>	Metastasen in 4 oder weniger ipsilateralen, axillären Lymphknoten, keine mehr als 3cm im größten Durchmesser
<b>pN2</b>	Metastasen in 5 oder mehr ipsilateralen, axillären Lymphknoten, größer als 3cm im Durchmesser, oder in ipsilateralen

		Lymphknoten der <i>A. thoraccica interna</i> , verwachsene oder fixierte Lymphknotenmetastasen
<b>pN3</b>		Metastasen in ipsilateralen, infraclaviculären und axillären Lymphknoten,
<b>Fernmetastasen (pM)</b>		
<b>MX</b>		Fernmetastasen nicht beurteilbar
<b>M0</b>		Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>		Fernmetastasen einschließlich Befall ipsilateraler, supraclaviculärer Lymphknoten
<b>Stadieneinteilung</b>		
<b>Stadium 0</b>	TIS	N0 M0
<b>Stadium 1</b>	T1	N0 M0
<b>Stadium 2a</b>	T0	N1 M0
	T1	N1 M0
	T2	N0 M0
<b>Stadium 2b</b>	T2	N1 M0
	T3	N0 M0
<b>Stadium 3a</b>	T0	N2 M0
	T1	N2 M0
	T2	N2 M0
<b>Stadium 3b</b>	T3	N1.N2 M0
	T4	N0-2 M0
<b>Stadium 3c</b>	Jedes T	N3 M0
<b>Stadium 4</b>	Jedes T	Jedes N M1

T = Größe und die Ausbreitung des Primärtumors zum Diagnosezeitpunkt

N = für Infiltration von regionären Lymphknoten, v. a. in der Axilla

M = Fernmetastasen

TIS = Karzinoma in situ

**Anhang III pTNM Klassifizierung des Kolonkarzinoms /Staging**

In Anlehnung an BÖCKER et al. (2008) (52)

<b>Primärtumor (pT)</b>			
<b>pTX</b>			Primärtumor nicht beurteilbar
<b>pT0</b>			kein Anhalt für einen Primärtumor
<b>Tis</b>			Carcinoma in situ
<b>T1</b>			Infiltration der Submucosa
<b>T2</b>			Infiltration der Muscularis propria
<b>T3</b>			Infiltration der Subserosa bzw. des nicht peritonealisierten perikolischen oder perirektalen Gewebes
<b>T4</b>			Infiltration direkt in andere Organe / Strukturen oder Tumorperforation des visceralen Peritoneums
<b>Lymphknotenmetastasen (pN)</b>			
<b>pNX</b>			Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
<b>pN0</b>			Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
<b>pN1</b>			Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
<b>pN2</b>			Metastasen in mehr als 3 regionären Lymphknoten
<b>Fernmetastasen (pM)</b>			
<b>MX</b>			Fernmetastasen nicht beurteilbar
<b>M0</b>			Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>			Fernmetastasen vorhanden z.B. in Leber oder Lunge
<b>Stadieneinteilung</b>			
<b>Stadium 1</b>	T1	N0	M0
<b>Stadium 1</b>	T2	N0	M0
<b>Stadium 2</b>	T3	N0	M0
<b>Stadium 3</b>	TX	N1	M0
<b>Stadium 4</b>	TX	NX	M1

T = Größe und die Ausbreitung des Primärtumors zum Diagnosezeitpunkt

N = für Infiltration von regionären Lymphknoten

NX = Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar

M = Fernmetastasen

TIS = Karzinoma in situ

TX = Primärtumor nicht beurteilbar

**Anhang IV Protokoll: Protocol: Isolation of Genomic DNA from Tissues**

AUS: QIAamp DNA Micro Handbook 08/2003

This protocol is for isolation of genomic DNA from less than 10 mg tissue.

**Important points before starting**

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If isolating DNA from very small amounts of tissue, carrier RNA is required (see pages 12 and 14).
- Prepare tissue samples on a cold surface (e.g., a glass, steel, or aluminum plate placed on top of a block of dry ice).
- If using frozen tissue, ensure that the sample does not thaw out before addition of Buffer ATL in step 2.

**Things to do before starting**

- Equilibrate Buffer AE or distilled water for elution to room temperature.
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 4. If a thermomixer or heated orbital incubator is not available, a heating block or water bath can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 13.

**Procedure**

- 1. Transfer a tissue sample of less than 10 mg in weight to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**
- 2. Immediately add 180 µl Buffer ATL, and equilibrate to room temperature (15–25°C).**
- 3. Add 20 µl Proteinase K and mix by pulse-vortexing for 15 s.**
- 4. Place the 1.5 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C overnight or until the sample is completely lysed.** For small amounts of tissue, lysis is complete in 4–6 h, but best results are achieved after overnight lysis.



**5. Add 200 µl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

**Note:** If carrier RNA is required (see page 12), add 1 µg dissolved carrier RNA to 200 µl Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer AE and then added to Buffer AL.

**6. Add 200 µl ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulsevortexing for 15 s. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C).**

**Note:** If room temperature exceeds 25°C, cool the ethanol on ice before adding to the tube.

**7. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.****8. Carefully transfer the entire lysate from step 7 to the QIAamp MinElute Column without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

**9. Carefully open the QIAamp MinElute Column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.****10. Carefully open the QIAamp MinElute Column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute Column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute Column. Take care when

removing the QIAamp MinElute Column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute Column.

**11. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

**12. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute Column and apply 20–100 µl Buffer AE or distilled water to the center of the membrane.**

If high pH or EDTA affects sensitive downstream applications, use water for elution (see page 11).

**Important:** Ensure that Buffer AE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). If using small elution volumes (<50 µl), dispense Buffer AE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute Columns provide flexibility in the choice of elution volume.

Choose a volume according to the requirements of the downstream application.

Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

**13. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute Column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

**Anhang V : Modifizierung des Protokolls von Ijssel et al. 2005 und dem Protokoll des VUMC Amsterdam mit Hilfe des Bio Prime DNA – Labeling Systems (Invitrogen, Germany)**

**Preperation of labeled genomic DNA for array CGH**

<b>Materials:</b>	<p>BioPrime DNA labelling system (Invitrogen, 18094-011) containing:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2.5 x Random Primers solution</li> <li>• Klenow Fragment of DNA Polymerase I (40 U/ul, high concentration) Keep on ice at all time!</li> <li>• Cy 3 labeled dCTP (Amersham Biosciences, Cy 3 dCTP, PA53021, 25 nmol)</li> <li>• Cy 5 labeled dCTP (Amersham Biosciences, Cy 5 dCTP, PA53021, 25 nmol)</li> <li>• ProbeQuant G-50 Micro Columbs (Amersham Biosciences, 27-5335-01)</li> <li>• purified water (MilliQ grade, Millipore)</li> </ul>																
<b>Preperations:</b>	<p>dNTP mixture (Invitrogen, 10297-018, store -20 °C)</p> <table style="margin-left: 40px;"> <tr><td>• dATP (100mM)</td><td>4 ul</td></tr> <tr><td>• dGTP (100mM)</td><td>4 ul</td></tr> <tr><td>• dTTP (100mM)</td><td>4 ul</td></tr> <tr><td>• dCTP (100mM)</td><td>4 ul</td></tr> <tr><td>• 1M Tris (ph 7,6)</td><td>2 ul</td></tr> <tr><td>• 0,5 M EDTA(Ph 8,0)</td><td>0.4 ul</td></tr> <tr><td>• <u>MilliQ water</u></td><td><u>184,6 ul</u></td></tr> <tr><td><u>Total volumen</u></td><td><u>200ul</u></td></tr> </table>	• dATP (100mM)	4 ul	• dGTP (100mM)	4 ul	• dTTP (100mM)	4 ul	• dCTP (100mM)	4 ul	• 1M Tris (ph 7,6)	2 ul	• 0,5 M EDTA(Ph 8,0)	0.4 ul	• <u>MilliQ water</u>	<u>184,6 ul</u>	<u>Total volumen</u>	<u>200ul</u>
• dATP (100mM)	4 ul																
• dGTP (100mM)	4 ul																
• dTTP (100mM)	4 ul																
• dCTP (100mM)	4 ul																
• 1M Tris (ph 7,6)	2 ul																
• 0,5 M EDTA(Ph 8,0)	0.4 ul																
• <u>MilliQ water</u>	<u>184,6 ul</u>																
<u>Total volumen</u>	<u>200ul</u>																
<b>Methods:</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mix together in PCR tube: x ul Genomic DNA (ungefähr 300ng) 20 ul 2.5 x Radom primer (from Kit) <u>x ul MilliQ water</u> 42 ul total volumen</li> <li>2. Denature the DNA mixture in a PCR machine at 100° for 10 min and immediately transfer to an ice/water bath for 2-5 min. Briefly spin the tube and put back on ice.</li> <li>3. Add to the mixture while keeping on ice: 5 ul of dNTP mixture 2 ul of Cy 3(Test) or Cy5 (reference) labeled dCTP <u>1 ul Klenow DNA polymerase (40 U/ul, from Kit)</u> 50 ul total Volumen</li> <li>4. Mix well and incubate at 37°C (in PCR machine) for 14h, then keep at 4°C</li> </ol>																

	<p>Removal of uncoupled dye material ( purification)</p> <p><b>5.</b> Preparation of the Probe- Quant G-50 columns:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>a. resuspend the resin in the column by vortexing</li><li>b. loosen the cap one- fourth utrn and snap off the bottom closure</li><li>c. place the column in a 1.5 ml microcentrifuge tube</li><li>d. pre-spin the column for 1 minute at 735x g ( i.e. set centrifuge at 800 RCF) . Start timer and microcentrifuge simultaneously, so total spinning time should not exceed 1 minute</li></ol> <p><b>6.</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>a. Place the column in a fresh 1.5 ml tube and slowly apply 50 ul of the sample to the top center of resin, being careful not disturb the resin bed</li><li>b. Spin the column at 735x g for 2 minutes. The purified sample is collected at the bottom of the support tube.</li></ol> <p><b>7.</b> Discard the column and store the purified and labeled sample in the dark until use on the same day</p> <p>- optionally store at -20°C for a maximum of 10 days</p>
--	--

**Anhang VI: Hybridization of labeled DNA to oligo CodeLink slides using the Hybstation“  
S©Vumc Micro Array Facility, November 2005**

**Hybridization of labeled DNA to oligo DNA codeLinks slides using the hybstation**

<b>Materials:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• labeled DNA samples (Cy 3 and Cy5)</li> <li>• oligonucleotide spotted, crosslinked and blocked Codelink Activated Slides (Amersham Biosciences, 300011)</li> <li>• Human Cot DNA (Invitrogen 1,0 ug/ul)</li> <li>• Yeast t-RNA ( Invitrogen, 100 ug/ul)</li> <li>• 3 M Sodium Acetat, ph 5.2 ( Sigma, S-7899)</li> <li>• ethanol ( absolute, Merck, 1.00983.2500)</li> <li>• 20x SSC (Sigma, S-6639)</li> <li>• purified water (MilliQ grade, Millipore)</li> </ul>
<b>Preparations:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SDS 20% solution: for preparation of 100 ml dissolve 20 g of Sodium dodecyl sulfate (Sigma, L6026) in 90 ml MilliQ water. Bring final volum to 100 ml)</li> </ul> <p>Mastermix 2 (for oligo array):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 g dextra sulphate (USB: US 70796)</li> <li>• 3.5 ml formamide 100% (Invitrogen, 15515-026)</li> <li>• 2.5 ml MilliQ water</li> <li>• 1 ml 20x SSC</li> <li>• - ph 7.0</li> </ul> <p>Washing buffer (formamide/SCC)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 50 % formamide (Fluka, 47670)</li> <li>○ 2x SCC</li> <li>○ ph 7.0</li> </ul> <p>PN buffer:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0</li> <li>○ 0.1% ( v/v) Igepal CA630 (Sigma, 17771)</li> <li>○ pH 8.0</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• -0.2x SSC: dilute from 20x SSC</li> <li>• -0.1x SSC: dilute from 20x SSC</li> <li>• -0,01x SSC: dilute from 20x SSC</li> </ul>
<b>Methods:</b>	<p><b>Blocking</b></p> <p>Before applying (pre) hybridization mix block slides according to the</p>

**Blocking Codelink**

Activated Slides protocol. Make sure to skip step 7 (boiling)

**Preparation of hybridization solution:**

1. mix together in 1.5 ml tube:

- 50 ul of test probe (Cy3)
- 50 ul of ref probe (Cy5)
- 10 ug Human Cot-1 DNA

(Note: The concentration for the Cot DNA stock can differ between batch's check before starting the precipitation)

2. then add:

- 11ul of 3M NaAc ph 5.2 (0.1 Vol.)
- 300 ul of ethanol absolute, ice-cold

3. mix the solution by inversion and collect DNA by centrifugation, 14.000 rpm, 30 min, 4°C

4. remove the supernatant with a pipet and air-dry the pellet for approx. 5-10 minute until no ethanol visible

5. carefully dissolve the pellet (prevent foam formation due to SDS) in :

- 13 ul Yeast tRNA (100ug/ul)
- 26 ul 20%SDS

6. leave at room temperature for at least 15 minute

7. add 91 ul of Mastermix 2, mix gently

8. denature the hybridization solution at 73°C for 10 min, and incubate at 37°C for 60 min to allow the Cot-1 DNA to block repetitive sequences

**Hybridization on the hybstation**

9. Choose your hybridization unit (1 to 6, two slides per unit, as specified on the website)

10. assemble the hybridization unit:

- a. insert rubber O-rings in the cover
- b. black bottom plate: put the slide in the proper direction! Make sure you can read the Code- Link text. Also this text must be loaded on the upper side of the unit.

11. introduce the unit in the hybstation, press unit down with one hand while tightening the screw with the other

12. insert plugs

	<p><b>13.</b> insert tubes in corresponding wash botteles</p> <p><b>14.</b> press:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. start a run</li> <li>b. from floppy</li> <li>c. pr CGHo. Hyb</li> <li>d. load</li> <li>e. the position of the slides you want use</li> <li>f. start</li> <li>g. continue ( the hybstation starts to warm up the slides)</li> </ul> <p><b>15.</b> when the hyb-station is ready (visible on screen by indication of the module you have to start) apply hyb mix:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. press Probe to add the hyb mix for the selected slide</li> <li>b. check if a mark on the screen appears</li> <li>c. take the plug out and inject the hyb mix by pipetting it slowly into the port using a 200 ul pipet</li> <li>d. press the Finished control (check mark) and insert the plug</li> <li>e. repeat this for the next slide</li> <li>f. press the Finished controll for the selected slide</li> <li>g. press the Finishing control for the module</li> </ul> <p><b>16.</b> repeat this for the selected module(s)</p> <p><b>17 .</b> take the slides after 38 hours and put them in 0.01x SSC</p> <p><b>18.</b> centrifuge slides for 3 minutes, 1000 rpm, 20°C ( in 50 ml tube)</p> <p><b>19.</b> immediately scan slides (storage comprises the signal and influences ratio's!)</p> <p><b>Programming the hybstation:</b></p> <p>Step 1 . introduce hybridization solution Temperature 37°C</p> <p>Step 2. Set slide Temperature</p> <p>Temp: 37°C Time: 38 h</p> <p>Step 3. Wash slides ( 50% formamid/2x SCC)</p> <p>6 Cycles, Source 1, Waste 2 at 36°C, Flow for 10s, hold for 20s</p> <p>Step 4. Wash slides (PN buffer)</p> <p>2 Cycles, Source 2, Waste 1 at 25°C, Flow for 10s, hold for 20s</p> <p>Step 5, Wash slides (0,2x SSC)</p> <p>2 Cycles, Source 3, Waste 1 at 25°C, Flow for 10s, hold for 20s</p> <p>Step 6 wash slides (0,1x SSC)</p> <p>2 Cycles, Source 4, Waste 1 at 25°C, Flow for 10s, hold for 20s</p>
--	--

**Blocking Codelink Activated Slides (Amersham Biosciences 300011)**

<b>Materials:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizma Base ( Sigma, T-6791)</li> <li>• Trizma HCl ( Sigma, T-6666)</li> <li>• Ethanolamine (Sigma, E-9508)</li> <li>• 20x SSC (Sigma, S-6639)</li> <li>• 10% SDS (Sigma, L4522)</li> <li>• Purified water (MiliQ grade Millipore)</li> </ul>
<b>Preparations:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crosslinked slides: after priting Codelink slides should be crosslinked by overnight incubation at 75% humidity, then stored dessicated</li> <li>• Blocking Solution: 0,1 M Tris, 50 mM ethanolamine, pH 9,0: dissolve 6.055g Trizma Base and 7.88g Trizma HCl in 900ml MilliQ water. Stir in 3.05 g ( 3 ml) ethanolamine and mix thoroughly. Adjust ph to 9.0 using 6NHCl. Bring final volum to 1 L with MilliQ water.</li> <li>• Wash Solution 4x SSC/ 0.1%SDS: 200ml 20x SSC, 10ml 10%SDS, bring to 1 L with MilliQ water.</li> </ul>
<b>Method:</b>	<p><b>Do not allow slides to dry prior to centrifugation</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Add SDS to Blocking Solution to a final concentration of 0.1% prior to warming</li> <li>2. Pre-warm Blocking Solution at 50°C</li> <li>3. place the slides in a slide rack and block residual reactive groups using pre-warmed Blocking Solution at 50°C for 15 minutes, extend to 30 minutes if not warm, do not exceed one hour!</li> <li>4. rise the slides twice with MilliQ water</li> <li>5. wash slide with Wash Solution (4x SSC/0.1%SDS, pre-warmed to 50°C) for 15 to 60 minutes, use at least 10 ml per slide</li> <li>6. rise briefly with MilliQ water</li> <li>7. for single stranded DNA arrays such as oligo arrays, proceed with step 9 for double-stranded DNA arrays, place slides into a boiling water bath (MilliQ water) for 2 minutes</li> <li>8. rise the slides twice with MilliQ water</li> <li>9. place slides in 50 ml tube and centrifuge at 1.000 rpm for 3 minutes</li> <li>10. use slides for hybridization within one week</li> </ol>



## Anhang VII MAD-Werte der Proben

Nr.	Patienten Nr.	Datum	Totale Spots	Spots inklusiv	Spots exklusiv	Spots inklusiv in %	SD of Log2 Ratio	Median SD zwischen Replikation	Mw Chr. 1 Spot	Mw Chr. 2 Spot	MAD-Wert	Nr. Ampl.	Nr. Del
1	E275-03	07.12.06	30.000	27.937	2.063	93,1	0,38	0,16	161	239	0,18	43	9
2	E470-99	07.12.06	30.000	22.951	7.049	76,5	0,36	0,16	181	274	0,19	35	5
3	E325-04	07.12.06	30.000	23.885	6.115	79,6	0,39	0,15	178	274	0,17	41	9
4	E382-03	07.12.06	30.000	23.444	6.556	78,2	0,37	0,15	192	261	0,18	35	10
5	E1030-04	07.12.06	30.000	24.984	5.016	83,3	0,43	0,20	115	249	0,21	79	6
6	E122-05	07.12.06	30.000	24.543	5.457	81,8	0,40	0,15	150	285	0,17	48	7
7	E279-88	07.12.06	30.000	26.194	3.806	87,3	0,46	0,24	128	224	0,25	77	9
8	E308-05	07.12.06	30.000	25.779	4.221	85,9	0,37	0,18	202	415	0,20	48	4
9	E389-03	02.02.07	30.000	25.987	4.013	86,6	0,50	0,22	154	308	0,23	34	23
10	E013-06	11.01.07	30.000	26.877	3.123	89,6	0,33	0,16	203	254	0,18	43	3
11	E391-04	11.01.07	30.000	27.163	2.837	90,5	0,37	0,19	200	273	0,21	42	18
12	E415-05	11.01.07	30.000	27.463	2.537	91,5	0,32	0,15	197	257	0,19	41	1
13	E466-98	11.01.07	30.000	25.611	4.389	85,4	0,41	0,19	160	259	0,21	69	23
14	E591-03	11.01.07	30.000	26.448	3.552	88,2	0,43	0,21	189	251	0,23	70	4
15	E648-05	11.01.07	30.000	26.797	3.203	89,3	0,47	0,21	148	282	0,25	68	14
16	E907-03	11.01.07	30.000	27.376	2.624	91,3	0,37	0,16	182	189	0,20	31	8
17	E664-03	17.01.07	30.000	28.093	1.907	93,6	0,36	0,17	172	328	0,19	64	6
18	E778-03	17.01.07	30.000	25.858	4.142	86,2	0,36	0,16	159	312	0,18	53	8
19	E913-04	17.01.07	30.000	27.506	2.494	91,7	0,35	0,18	144	298	0,17	66	8
20	E47-85	22.12.06	30.000	27.630	2.370	92,1	0,30	0,13	224	374	0,13	41	10
21	E598-03	22.12.06	30.000	27.179	2.821	90,6	0,37	0,17	188	390	0,19	65	10
22	E626-94	21.12.06	30.000	26.381	3.619	87,9	0,57	0,27	106	364	0,30	98	15
23	E697-05	21.12.06	30.000	26.336	3.664	87,8	0,43	0,19	120	238	0,22	77	9
24	E925-04	22.12.06	30.000	27.686	2.314	92,3	0,41	0,19	154	315	0,20	69	5
Mw				<b>26.255</b>	<b>3.746</b>	<b>87,5</b>	<b>0,40</b>	<b>0,18</b>	<b>167</b>	<b>288</b>	<b>0,20</b>	<b>56</b>	<b>9</b>

## Anhang IIX

Breast Cancer Res. 2012 Mar 19;14(2):R49. Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients. Wikman H., Lamszus K., Detels N.\* , Uslar L.\* , Wrage M., Benner C., Hohensee I., Ylstra B., Eylmann K., Zapatka M., Sauter G., Kemming D., Glatzel M., Müller V., Westphal M., Pantel K.

\*= gleichbeteiligte Verfasser

## **DANKSAGUNG**

Zum Abschluss möchte ich mich ganz herzlich bei all den Menschen bedanken, die mich beim Schreiben meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel und Fr. PD Harriet Wikman für die intensive Betreuung und die Möglichkeit dieses interessante Thema bearbeiten zu dürfen.

Prof. Dr. Katrin Lamzus, Prof. Gerhard Westphal und Prof. Dr. Glatzel danke ich für die Bereitstellung des Probenmaterials und die Unterstützung.

Dr. Bauke Ylstra, sowie Paul Eijk vom Medical Center der Freien Universität Amsterdam danke ich für ihre Hilfe beim Erlernen der CGH-Array.

Ein besonderer Dank gilt auch dem gesamten Team des Instituts für Tumorbilogie, welche mich stets mit Rat und Tat begleitet haben. Im Besonderen danke ich Jolanthe Kropidlowski, Kathi Eyselmann und Sabine Winkler für ihre Bemühungen. Meiner Kollegin Dr. rer. nat. Michaela Wrage danke ich für ihre hilfreichen Ratschläge.

Ein großer Dank geht an meine Familie, im Besonderen meiner Ehefrau, die mir stets den Rücken frei hielt.

Der größte Dank jedoch gebührt den Patienten, welche mir diese Arbeit durch ihre Gewebespende überhaupt erst ermöglichten.