

Genetische Determinanten der frühen Metastasierung des humanen Bronchialkarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
im Department Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Michaela Krämling
aus Hamburg

Hamburg 2008

Die vorliegende Dissertation wurde im Institut für Tumorbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in Hamburg in der Zeit von Juni 2004 bis Juni 2008 angefertigt.

1. Dissertationsgutachter:

Herr Prof. Dr. Klaus Pantel
Institut für Tumorbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistr. 52
20246 Hamburg

2. Dissertationsgutachter:

Frau Prof. Dr. Eva Liebau
Institut für molekulare Physiologie
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Hindenburgplatz 55
48143 Münster

Hamburg, den 6. Juni 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. K. PANTEL
Weiterer Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. E. LIEBAU
Tag der Disputation: 13. Juni 2008

Hamburg, den 26. Mai 2008



Jörg Ganzhorn
Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Für Petra, Heribert und alle anderen Krebspatienten

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Histologie, Stadieneinteilung und Prognose	1
1.2 Metastasierung epithelialer Tumore.....	3
1.2.1 Die metastatische Kaskade.....	4
1.2.2 Minimale residuelle Krebserkrankung.....	6
1.3 Genetische und epigenetische Veränderungen beim Bronchialkarzinom.....	9
1.3.1 Genetische Veränderungen.....	9
1.3.2 Epigenetische Veränderungen	11
1.3.3 Veränderungen in der Genexpression.....	13
1.4 Genomische und Expressions-Analysen mit Hilfe der Mikroarray-Technik	13
1.4.1 Nachweis von Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl	14
1.4.2 Untersuchungen von Methylierungsmustern	16
1.4.3 Verfahren zur Genexpressionsanalyse	17
1.4.4 <i>Tissue Microarray</i>	18
1.5 Fragestellung	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Patientenmaterial.....	20
2.1.2 Zelllinien.....	21
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3.1 Chemikalien	21
2.1.3.2 Antikörper.....	23
2.1.3.3 Oligonukleotide	23
2.1.3.4 Puffer und Lösungen	24
2.1.3.5 Zellkultur- und Nährmedien.....	24
2.1.3.6 Verwendete käufliche Systeme (Kits)	25
2.1.3.7 BAC-Klone und FISH-Sonden.....	25
2.1.4 Geräte	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Aufarbeitung und Nachweis von disseminierten Tumorzellen in Knochenmarkaspiraten	27
2.2.1.1 Isolierung disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark.....	27

2.2.1.2	Immunzytochemische Färbung zum Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark.....	27
2.2.2	Färbungen von Tumorgewebeschnitten	29
2.2.2.1	Hämaltoxylin-Eosin Färbung	29
2.2.2.2	Toluidinblau / Methylenblau-Färbung	29
2.2.2.3	Färbung mit Cresyl-Violet-Acetat	29
2.2.3	Dissektion des Tumorgewebes	30
2.2.3.1	Manuelle Dissektion	30
2.2.3.2	Mikrodissektion mittels <i>laser pressure catapulting</i>	30
2.2.4	Isolierung von Nukleinsäuren.....	31
2.2.4.1	Isolierung von genomischer DNA.....	31
2.2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA	32
2.2.5	Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
2.2.5.1	Nanodrop Spektrophotometer	32
2.2.5.2	Bioanalyzer	32
2.2.5.3	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.2.6	Aufreinigung von Nukleinsäuren	33
2.2.6.1	Ethanol-fällung	33
2.2.6.2	Bandenextraktion aus Agarose-Gelen.....	33
2.2.7	Erststrang cDNA-Synthese.....	33
2.2.8	Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA	34
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion.....	35
2.2.10	Light-Cycler™ semi-quantitative Real-Time-quantitative-PCR.....	35
2.2.11	Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten	37
2.2.11.1	Ligation und Transformation	37
2.2.11.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
2.2.11.3	Analyse der Klonierungsprodukte mittels <i>EcoR</i> 1-Verdau	38
2.2.11.4	DNA-Sequenzierung.....	38
2.2.12	Analysen zu Veränderungen der DNA Kopienanzahl mittels Array-CGH.....	38
2.2.12.1	Markierung der genomischen DNA mit Fluoreszenz-Farbstoffen.....	39
2.2.12.2	Hybridisierung der Array-CGH	39
2.2.12.4	Auswertung der Array-CGH	40
2.2.13	Erstellen von Expressionsprofilen von primären Bronchialkarzinomen mittels Oligo-Expressionsarrays	42
2.2.13.1	cRNA-Herstellung	43
2.2.13.2	Hybridisierung und Erfassung der Rohdaten	43
2.2.13.4	Auswertung der Expressionsarrays	44
2.2.14	Herstellung eines <i>Tissue Microarrays</i>	45
2.2.15	Präparation von Metaphasechromosomen	46

2.2.16	Giemsa-Färbung zur Chromosomentypisierung.....	47
2.2.17	Herstellung von DNA-Sonden.....	47
2.2.17.1	Isolation der BAC-Klone	47
2.2.17.2	Markierung der DNA-Sonden durch <i>Random Priming</i>	48
2.2.18	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	48
2.2.18.1	FISH an Metaphasechromosomen, Gefriergewebeschnitte und Zellen...	49
2.2.18.2	FISH an Paraffingewebe	49
2.2.18.3	Auswertung der FISH-Analysen	50
2.2.19	Zellkulturbedingungen	51
2.2.20	Re-Expression von hypermethylierten Genen in bronchialen Zelllinien.....	51
2.2.20.1	Optimierung der Behandlung von Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A.....	51
2.2.20.2	Behandlung der Zellen für Expressionsanalysen mit 5-Aza-2'- Deoxycytidin	52
2.2.20.3	Erstellen von Expressionsprofilen mittels der Arraytechnologie	53
2.2.20.4	Auswertung der Expressionsarrays	53
2.2.21	Allgemeine statistische Auswertungen	54
2.2.21.1	Chi-square und Fisher´s Exact Test	54
2.2.21.2	Multivariate Analyse.....	54
3.	Ergebnisse.....	55
3.1	Hämatogen disseminierte Tumorzellen bzw. Lymphknotenmetastasen in Korrelation zu klinischen und pathologischen Risikofaktoren.....	55
3.2	Qualität der aus Gewebeschnitten isolierten DNA und RNA	56
3.3	Genomische Analysen von primären Bronchialkarzinomgeweben mittels Array-CGH	60
3.3.1	Auswahl der geeigneten Mikroarray-Technik für CGH.....	60
3.3.2	Einfluss der DNA-Isolierungsmethode auf die Profile der Array-CGH.....	61
3.3.3	Allgemeine DNA-Aberrationsmuster in primären Bronchialkarzinomen.....	64
3.3.4	Genomische Aberrationsmuster in Assoziation mit der hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark	65
3.3.5	Genomische Aberrationsmuster in Assoziation mit der lymphogenen Metastasierung.....	68
3.4	Genexpressionsanalysen an primären Bronchialkarzinomgeweben	69
3.4.1	Qualität der Genexpressionsanalysen.....	69
3.4.2	Differenziell exprimierte Gene in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus.....	71
3.4.3	Differenziell exprimierte Gene in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus.....	75
3.5	Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl in den Chromosomenabschnitten 4q und 17q in Abhängigkeit zur hämatogenen Disseminierung ins Knochenmark.....	75

3.5.1	Etablierung und Validierung von DNA-Sonden für 4q und 17q	75
3.5.2	Korrelation der chromosomalen Aberrationen mit klinischen und pathologischen Faktoren.....	80
3.5.2.1	Korrelation von DNA-Verlusten in 4q21 mit klinischen und pathologischen Faktoren.....	80
3.5.2.2	Korrelation von DNA-Gewinnen in 17q21 mit klinischen und pathologischen Faktoren.....	82
3.5.2.3	Korrelation von Polyploidien mit klinischen und pathologischen Faktoren	83
3.6	Identifikation von Tumorsuppressorgen auf 4q mittels Methylierungsstudien an bronchialen Zelllinien	84
3.6.1	Genomische Charakterisierung der humanen Zelllinien	85
3.6.2	Etablierung der Methode zur Demethylierung von CpG-Inseln.....	88
3.6.2.1	Etablierung der Bedingungen für die Zellkultur	88
3.6.2.2	Nachweis der Demethylierung auf Expressionsebene.....	91
3.6.2.3	Nachweis der Demethylierung auf genomischer Ebene.....	94
3.6.3	Einfluss von Hypermethylierungen auf die Genexpression von Tumorzelllinien	96
3.6.3.1	Demethylierung von CpG-Inseln in Zelllinien.....	96
3.6.3.2	Auswertung der Mikroarray-Analysen.....	97
3.6.4	Hypermethylierte Gene auf 4q als potentielle Tumorsuppressorgene	100
4.	Diskussion	104
4.1	Methodische Aspekte	104
4.2	Allgemeine genomische Veränderungen in primären Bronchialkarzinomen	107
4.3	Für die hämatogene Disseminierung relevante genomische Aberrationen und ihr Einfluss auf die Genexpression	108
4.4	Für die lymphogene Disseminierung relevante genomische Aberrationen und ihr Einfluss auf die Genexpression	114
4.5	Potentielle Tumorsuppressorgene auf 4q	116
4.6	Ausblick.....	120
5.	Literaturverzeichnis.....	121
6.	Anhang	140
	Danksagung	149
	Lebenslauf	150

Abkürzungsverzeichnis

5-Aza-CdR	5-Aza-2-Deoxycytidin
AC	Adenokarzinom (<u>A</u> deno <u>c</u> arcinoma)
ACIS	<u>A</u> utomated <u>C</u> ellular <u>I</u> maging <u>S</u> ystem
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
BAC	<u>B</u> acterial <u>A</u> rtificial <u>C</u> hromosome
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Cen	Zentromersonde
cDNA	komplementäre DNA
CGH	komparative genomische Hybridisierung (<u>C</u> omparative <u>G</u> enomic <u>H</u> ybridization)
CK	Zytokeratin
CpG	palindromische Basenfolge von Cytosin und Guanin
cRNA	komplementäre RNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DFS	Rezidivfreies Überleben (<u>D</u> isease <u>F</u> ree <u>S</u> urvival)
DRF	<u>D</u> ifferential <u>R</u> egion <u>F</u> inding
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTZ	<u>d</u> isseminierte <u>T</u> umorz <u>e</u> lle
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Rinderserum
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
G	Differenzierungsstufen (<u>G</u> rad <u>i</u> ng)
h	Stunde
HE	Hämaltoxylin-Eosin
kb	Kilobasenpaar
KM	Knochenmark
LB	Luria-Bertani
LCLC	großzelliges Bronchialkarzinom (<u>L</u> arge <u>C</u> ell <u>L</u> ung <u>C</u> arcinoma)
LK	Lymphknoten
LOH	<u>L</u> oss of <u>H</u> eteroc <u>y</u> osity
LPC	<u>L</u> asure <u>P</u> ressure <u>C</u> atap <u>u</u> lting
M	Status der Fernmetastasen

min	Minute
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MSP	methylierungsspezifische PCR
N	Status der Lymphknoten-Metastasen
NS	nicht signifikant
NSCLC	nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>)
OD	optische Dichte
OS	Gesamtüberleben (<i>Overall Survival</i>)
P.A.L.M.	<i>Photo Activated Localization Microscopy</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
TNM	Stadieneinteilung
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RR	Rezidivrate (<i>Recurrence Rate</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RTQ-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCC	Plattenepithelkarzinom (<i>Squamous Cell Carcinoma</i>)
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>Small Cell Lung Cancer</i>)
sec	Sekunde
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSC	Natriumchlorid und Natriumcitrat
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
T	Tumorausdehnung
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	<i>Tris-EDTA</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TSA	Trichostatin A
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Units</i>
UICC	Internationale Union gegen Krebs (<i>International Union Against Cancer</i>)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
VDJ	<i>Variable, Diversity, Joining</i>
Vol.	Volumenanteil
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
w/v	Masse pro Volumen

Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom gehört zu den am häufigsten diagnostizierten Tumorarten in westlichen Industrieländern (1). Trotz vollständiger Resektion des Primärtumors kommt es bei vielen Patienten im weiteren Krankheitsverlauf zu einem Tumorrezidiv und in Folge dessen zum Tod. Dies ist wahrscheinlich auf eine frühzeitige Disseminierung von Tumorzellen in die regionalen Lymphknoten (lymphogen) oder in den Blutkreislauf (hämatogen) zurückzuführen, von wo aus diese zu Vorläufern von distanten Metastasen werden können. Das Knochenmark (KM) wird häufig von disseminierten Tumorzellen (DTZ) besiedelt. Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass neben dem Lymphknoten-Status (LK) das Vorhandensein von DTZ im KM ein unabhängiger Prädiktor für eine schlechte Prognose darstellt (2-4).

Unklar ist derzeit, ob es sich bei der Streuung von Zellen aus dem Primärtumor um einen selektiven Prozess oder um ein eher spontanes Ablösen von Tumorzellen aus dem Zellverband handelt. Während bei primären Mammakarzinomen die frühe hämatogene Disseminierung in das KM scheinbar auf ein spezifisches Expressionsmuster zurückzuführen ist (5, 6), sind für das Bronchialkarzinom bisher noch keine vergleichbaren Studien durchgeführt worden. Daher war es Ziel dieser Arbeit, spezifische genomische Veränderungen oder Genexpressionsmuster des primären Bronchialkarzinoms zu identifizieren, die für die frühe hämatogene Disseminierung ins KM oder die lymphogene Metastasierung in die regionalen LK verantwortlich sind. Unter Verwendung der Mikroarray-Technologie wurden von primären Bronchialkarzinomen mit bekanntem KM- bzw. LK-Status die DNA-Kopienanzahl mit Array-CGH bestimmt, sowie Genexpressionsprofile erstellt.

Veränderungen in der Genexpression spezifisch für die lymphogene Disseminierung scheinen überwiegend auf regulatorischen Veränderungen und nicht auf chromosomalen Imbalancen zu beruhen. In Abhängigkeit vom LK-Status konnten keine spezifischen chromosomalen Regionen gefunden werden, deren Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl zu einer differenziellen Genexpression zwischen LK-positiven und LK-negativen Patienten führte.

Dahingegen wiesen fünf chromosomale Regionen in Abhängigkeit von der hämatogenen Disseminierung in das KM signifikante Unterschiede sowohl in der DNA-Kopienanzahl als auch in der Genexpression zwischen der KM-positiven und der KM-negativen Gruppe auf (4q12-q32, 10p12-p11, 10q21-q22, 17q21 und 20q11-q13). Die häufigsten Ereignisse waren dabei DNA-Verluste in der KM-positiven und DNA-Gewinne in der KM-negativen Gruppe auf Chromosom 4q12-q32. Weitere FISH-Analysen an zusätzlichen Gewebeproben bestätigten, dass ein Verlust von 4q21 signifikant häufiger in KM-positiven als in KM-negativen Patienten zu finden ist (38% vs. 9%, $p=0,002$). Heterozygote DNA-Verluste von 4q21 wurden ebenfalls in 39% der Gehirnmastasen der Lunge nachgewiesen, was für eine bedeutende Rolle dieser Aberration nicht

nur für die frühen Schritte der metastatischen Kaskade, sondern auch für die Manifestation von distanten Metastasen spricht. 48 Gene auf 4q wiesen in der KM-positiven Gruppe eine verminderte Genexpression auf, wobei keines dieser Gene zuvor als Tumorsuppressorgen publiziert worden ist. Da es sich beim DNA-Verlust von 4q immer nur um den Verlust eines Allels handelte, muss nach der *Two Hit*-Hypothese von Knudson das zweite Allel eines potentiellen Tumorsuppressorgens durch z. B. Methylierung reprimiert vorliegen (7). Dieses Phänomen konnte genutzt werden, um im Rahmen dieser Arbeit potentielle Tumorsuppressorgene auf 4q nachzuweisen, deren Genexpressionen in bronchialen Tumorzelllinien zusätzlich zu einem heterozygoten DNA-Verlust durch Hypermethylierungen inhibiert werden. Diese Ergebnisse konnten durch den Vergleich von Genexpressionsprofilen vor und nach Behandlung mit dem Demethylierungs-Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) von einer nicht malignen epithelialen Lungenzelllinie (BEAS-2B) mit bronchialen Tumorzelllinien (H1395, H1993 und HTB-56) erzielt werden. Potentielle Targetgene mussten eine methylierungsunabhängige Genexpression in der Referenz-Zelllinie BEAS-2B aufweisen. Weiterhin mussten die Gene ebenfalls in normalen Lungengeweben exprimiert werden. Die durch 5-Aza-CdR hervorgerufene Demethylierung musste in mindestens zwei der drei Tumorzelllinien zu einer deutlichen Steigerung der Genexpression von Tumorsuppressorgen führen. Nach diesen Kriterien konnten auf 4q sieben Tumor-spezifische Gene nachgewiesen werden, die als potentielle Tumorsuppressorgene in Frage kamen. Für die drei Gene *HERC5*, *DAPP1* und *CHIC2* konnte zudem eine signifikante Korrelation zwischen der verminderten Expression und der frühen hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen in das KM von Patienten mit einem primären Bronchialkarzinom gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit dargestellten und diskutierten Ergebnisse weisen erstmals darauf hin, dass die frühe hämatogene Disseminierung von Tumorzellen in das KM ein spezifischer Prozess ist, der unter der Kontrolle verschiedener molekularer Veränderungen zu stehen scheint. Gene in den identifizierten chromosomalen Regionen könnten sowohl als prognostische Marker für eine frühe Disseminierung als auch als therapeutische „Targets“ zur Entwicklung neuer Medikamente für das Bronchialkarzinom bedeutend sein.

1. Einleitung

1.1 Das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Epitheliale Tumore sind in westlichen Industrieländern für die Mehrzahl aller Malignomerkrankungen verantwortlich und gehören neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Das Bronchialkarzinom zählt sowohl bei Männern (15%) als auch bei Frauen (6,1%) zu einer der häufigsten vorkommenden Krebsformen (8). Mit annähernd einer Million Todesfällen pro Jahr (9) und einer relativen Fünfjahres-Überlebensrate von 15% stellt es die Hauptursache aller malignombedingten Todesfälle dar (1, 10, 11).

In den letzten Jahrzehnten konnte in den westlichen Industrieländern eine relativ konstante, z. T. sogar leicht sinkende Inzidenz des Bronchialkarzinoms in der männlichen Bevölkerung verzeichnet werden (9). Dahingegen wird bei Frauen ein Anstieg der Erkrankungen und der Todesfälle beobachtet, was hauptsächlich auf Veränderungen des Tabakkonsums und des Rauchverhaltens ab Mitte des letzten Jahrhunderts zurückzuführen ist (12). Bei 80-90% der Männer und bei 50-80% der Frauen ist die Entwicklung von malignen Tumoren in der Lunge auf den Abusus von Tabakprodukten und dem Passivrauchen zurückzuführen (13-16). Als weiterer Risikofaktor (3-17%) gilt die Exposition gegenüber beruflichen Kanzerogenen wie Asbest, aber auch Arsen, Chromverbindungen, Nickel, Kadmium und Dieselmotoremissionen sowie Radon im Uranbergbau (17-20). Spezifische genetische Faktoren oder familiäre Prädispositionen erhöhen zusätzlich das Risiko für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms (21, 22).

Da die Symptome eines Bronchialkarzinoms spät auftreten und es sich meist um starke Raucher mit bereits gesundheitlichen Problemen handelt, wird das Auftreten oft im fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium diagnostiziert. Zu den häufigsten Symptomen gehören Reizhusten, Heiserkeit, Dyspnoe (Atemnot), Hämoptoe (Bluthusten) und Pleuraschmerz (12).

1.1.2 Histologie, Stadieneinteilung und Prognose

Die histologische Einteilung der Lungentumore wurde zuletzt 2004 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) festgelegt (23). Aufgrund therapeutischer Konsequenzen und biologischer Eigenschaften werden die Bronchialkarzinome in kleinzellige (SCLC – *Small Cell Lung Cancer*) und nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC – *Non Small Cell Lung Cancer*) unterteilt (s. Abbildung 1.1).

Zu den NSCLC (75-80%) werden, neben anderen, die Haupttypen Plattenepithel- (SCC – *Squamous Cell Carcinoma*), Adeno- (AC – *Adenocarcinoma*) und die großzelligen Karzinome (LCLC – *Large Cell Lung Cancer*) unterschieden (10). Das SCC (25-40%) weist eine starke Korrelation mit dem Rauchen auf und ist häufig an den Verzweigungen der Subsegmentbronchien lokalisiert (12).

Charakteristisch ist ein langsames Wachstum und eine frühe Metastasierung in die regionalen Lymphknoten (LK). Histologisch unterscheidet man den verhornenden und den nicht-verhornenden Typ. Letzterer bringt auf Grund seiner geringeren Differenzierung eine schlechtere Prognose mit sich. 25-40% der NSCLC gehören zu den Adenokarzinomen. AC treten bevorzugt in der Peripherie der Lunge auf und lassen sich in weitere histologische Untergruppen einteilen. Charakteristisch ist eine frühe Metastasierung sowohl über die Lymph- als auch über die Blutbahn ins Gehirn, in die Leber und in die Nebennierenrinde (24). Bei Nicht-Rauchern und Frauen stellt das AC die am häufigsten vorkommende Form des Bronchialkarzinoms dar (12). Aufgrund des veränderten Rauchverhaltens durch die Verwendung von Filter- und sogenannten *Light*-Zigaretten in der weiblichen Bevölkerung konnte in den letzten Jahren ein stetiger Anstieg des AC bei Frauen beobachtet werden (25). LCLC machen 10-15% der Bronchialkarzinome aus und sind histogenetisch unterschiedlicher Herkunft. Es handelt sich um keine einheitliche Tumorkategorie, sondern um eine histologische Sammelbezeichnung für entdifferenzierte AC und SCC. Die LCLC metastasieren bevorzugt hämatogen in die Leber, das Gehirn und in die Knochen.

Die SCLC machen 15-20% aller Lungenkarzinome aus und gehören zur Gruppe der neuroendokrinen Tumore. Sie entstehen bevorzugt in den zentralen Bronchien (12). Diese Art des Bronchialkarzinoms tritt häufiger bei Männern als bei Frauen auf und ist mit einer äußerst schlechten Prognose verbunden. Charakteristisch ist eine hohe Proliferationsrate der Zellen und Metastasierung zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung vorzugsweise ins Gehirn, in die Knochen, die Leber und in die Nebennierenrinde (12). SCLC werden selten operiert und daher nur mit einer Chemotherapie oder Bestrahlung therapiert.

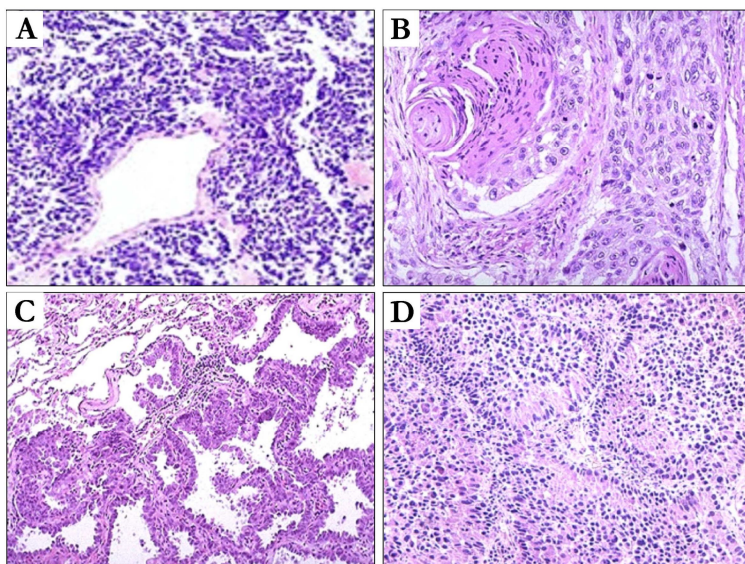


Abbildung 1.1. Histologische Einteilung der primären Bronchialkarzinome anhand HE gefärbter Gewebeschnitte. (A) SCLC mit „kleinen“ einzeln oder locker im Zellverband liegenden Tumorzellen; (B) verhornendes SCC mit charakteristischer Verhornung in Form von Hornperlen sowie Interzellularbrücken; (C) bronchoalveoläres AC mit Auskleidung der Alveolarräume unter Beibehaltung der vorbestehenden Lungenstruktur und (D) LCLC mit großen Nuklei und prominenten Nukleoli (26).

Die Einteilung der verschiedenen Stadien des Bronchialkarzinoms erfolgt nach der pathologischen TNM-Klassifikation (*Staging*) und Bestimmung des Differenzierungsgrades (G1 – G3: hoher – niedriger Differenzierungsgrad) (27). Die TNM-Klassifikation gibt gemäß der *International Union Against Cancer* (UICC) die Tumorausdehnung (T), den Status der regionalen LK (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnose an. Anhand der TNM-Klassifikation lassen sich die Tumorstadien I-IV definieren, welche die Therapiestrategien und Prognosen vorgeben. NSCLC im Stadium I und II sowie operable Tumore des Stadiums III sind aufgrund der operativen Resektion des Primärtumors mit einer besseren Prognose verbunden als Tumore, die operativ nicht zugänglich sind. Während die 5-Jahres-Überlebensrate bei Tumoren des Stadiums I bei 70%-80% liegt (28, 29), sinkt sie bei nicht-operablen Tumoren (Stadium III und IV) unter 5% (30). Der Krankheitsverlauf wird entscheidend von der Metastasierung geprägt. Das Auftreten von LK-Metastasen führt zu einer Verkürzung der Überlebenszeit und stellt daher einen wichtigen Prognosefaktor dar (30). Tabelle 1.1 zeigt das Metastasierungsmuster von Bronchialkarzinomen in Relation zum histologischen Typ.

Tabelle 1.1. Metastasierungsmuster der Bronchialkarzinome in Abhängigkeit vom histologischen Typ (modifiziert nach Berger et al. (31)).

Lokalisation	Metastasierungshäufigkeit nach histologischem Typ			
	SCC	AC	LCLC	SCLC
mediastinale LK	30%	40%	40%	95%
Leber	30%	30%	45%	50%
Gehirn	20%	30%	30%	40%
Knochen	25%	40%	40%	35%

1.2 Metastasierung epithelialer Tumore

Invasive Bronchialkarzinome entstehen meist graduell aus Vorstufen, die u. a. auf die Anhäufung von genetischen und epigenetischen Veränderungen in den Epithelzellen zurückzuführen ist.

Die Entwicklung eines SCC beginnt klassisch mit Veränderungen des Zelltyps der Zellen der Bronchialschleimhaut (Metaplasie), welche zu größeren Abnormalitäten in der Gewebestruktur (Dysplasien) führen können. Eine Zunahme von Dysplasien kann letztlich zu einem Übergang in ein zunächst auf die Bronchialschleimhaut begrenztes Karzinom führen (*Carcinoma in situ*), aus dem sich ein in die Lunge einwachsender maligner Tumor (invasives Karzinom) entwickeln kann. Während für SCC die Progressionsschritte bekannt und beschrieben sind, konnte für AC bisher als Vorstufe nur die Atypische Adenomatöse Hyperplasie (AHH) identifiziert werden (32).

Hat sich einmal ein maligner Tumor manifestiert, können sich im weiteren Verlauf der Tumorprogression einzelne Tumorzellen vom Primärtumor lösen, in die Blut- oder Lymphbahn gelangen und in distante Organe Metastasen bilden.

1.2.1 Die metastatische Kaskade

Die Metastasierung in sekundäre Organe stellt einen mehrstufigen, komplexen Prozess dar, wobei die Verbreitung von Tumorzellen sowohl über den lymphatischen als auch über den hämatogenen Weg möglich ist (s. Abbildung 1.2).

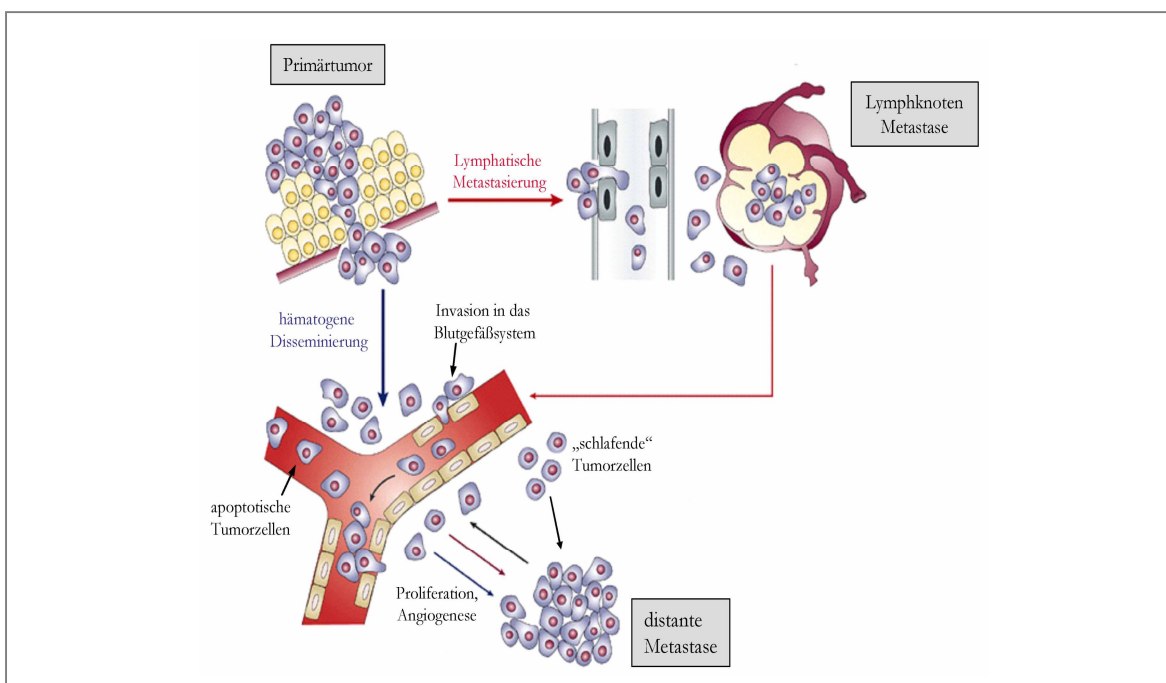


Abbildung 1.2. Schema der metastatischen Kaskade. Tumorzellen vom Primärtumor können sowohl über den lymphatischen (rote Pfeile) als auch über den hämatogenen Weg (blaue Pfeile) disseminieren. Lymphatisch disseminierende Tumorzellen wandern in die lokalen LK und proliferieren zu soliden Metastasen. Zu einem späteren Zeitpunkt können Tumorzellen aus der LK-Metastase in distante Organe disseminieren und sekundäre Metastasen bilden. Die hämatogene Disseminierung kann vom Primärtumor, von den LK-Metastasen oder von distanten Metastasen ausgehen (modifiziert nach Pantel & Brakenhoff, 2004 (33)).

Im ersten Schritt der Metastasierung lösen sich Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors. Durch die Produktion von proteolytischen Enzymen (z. B. Matrix-Metalloproteinasen), Verlust von Zelladhäsionsmolekülen (z. B. E-Cadherin) und Bildung von zusätzlichen Blutgefäßen (Angiogenese) gelangen sie nach Invasion und Penetration des stromalen Gewebes in die Lymph- bzw. Blutbahn (34-37). Die im Blut- oder Lymphsystem zirkulierenden Tumorzellen sind starken Scherkräften ausgesetzt und müssen sich vor Angriffen des humanen Immunsystems schützen können. Sie müssen im Gegensatz zu normalen adhären wachsenden Zellen nach Verlassen des Zellverbandes die Fähigkeit besitzen, Apoptose zu umgehen, auch

wenn sie keine Zell-Zell-Kontakte mehr besitzen (38). Über Adhäsionsproteine (z. B. Selektine, Integrine) können die Tumorzellen Kontaktstellen zum Kapillarbett anderer Organe ausbilden und in das Gewebe gelangen (39). Erst nach Durchdringen des Endothels und der endothelialen Basalmembran (Extravasation), Invasion des bindegewebshaltigen Stromas des betreffenden Organs und Aktivierung der Proliferation kann sich eine solide Metastase ausbilden. Die Proliferation kann direkt nach Extravasation der Tumorzellen oder nach einer Latenzzeit, in der die Tumorzellen „ruhen“ (*Dormancy*), aktiviert werden (40, 41). Es ist noch unklar, welche Faktoren diesen Latenzzustand über Jahre hinweg aufrechterhalten und welche Veränderungen die Tumorzellen durchlaufen müssen, damit sie dieses inaktive Stadium verlassen und zu einer progressiv wachsenden Metastase werden können.

Nach traditionellen Modellen der Metastasierung scheinen Tumorzellen mit metastatischem Potential selten bzw. zu einem späten Zeitpunkt der Tumorerkrankung aufzutreten (42). Expressionsstudien an humanen Tumoren haben jedoch gezeigt, dass die Mehrzahl der Tumorzellen eines Primärtumors einen „metastatischen Phänotyp“ besitzen und die Metastasierung einzelner Tumorzellen ein frühes Ereignis in der Tumorgenese zu sein scheint (33, 43). Obwohl nachweislich eine große Anzahl einzelner oder Aggregate von Tumorzellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Karzinogenese in das Gefäßsystem abgegeben werden (44), besitzen nur schätzungsweise <1% die Fähigkeit, Metastasen zu bilden (45, 46). Mausexperimente zeigten, dass nur ein kleiner Teil der injizierten Tumorzellen die Fähigkeit besaß, alle Schritte der Metastasierung erfolgreich zu durchlaufen. Zwar konnten in verschiedenen distanten Organen einzelne Tumorzellen und sogar Mikrometastasen nachgewiesen werden, aber nur ein kleiner Teil der Mikrometastasen entwickelte die Fähigkeit, zu vaskulieren und zu makroskopischen Metastasen heranzuwachsen (40).

Tumore epithelialen Ursprungs neigen dazu, vorwiegend in bestimmten Organen Metastasen zu bilden, während andere Gewebe nur selten befallen werden (47). Nach der *seed and soil*-Hypothese ist die Bildung von Metastasen hauptsächlich von den Wechselwirkungen der Tumorzellen (*seed*) mit dem jeweiligen sekundären Organmilieu (*soil*) abhängig (47). Mit dieser Theorie allein lässt sich allerdings das Metastasierungsverhalten nicht vollständig erklären. Unter Berücksichtigung der vaskulären Verbindungen zwischen Primärtumor und Metastase wurde gezeigt, dass sich Metastasen mit großer Wahrscheinlichkeit in anatomisch benachbarten Organen mit vaskulärer Verbindung zum Primärtumor bilden (48). So werden im frühen Stadium der Tumorausbreitung zunächst die lokalen LK befallen (48). Obwohl bekannt ist, dass das Auftreten von Metastasen in LK ein negativer prognostischer Faktor für verschiedene Tumore darstellt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt, ob die darauf folgende Metastasierung in entfernte Organe durch lymphatische Ausbreitung oder wie beim Mammakarzinom parallel über den hämatogenen Weg erfolgt (40).

1.2.2 Minimale residuelle Krebserkrankung

Nahezu 40% aller Patienten mit einem vollständig entfernten NSCLC, ohne Lymphknotenmetastasen (N0) oder Anzeichen von distanten Metastasen (M0) zum Zeitpunkt der Primäroperation, erkranken innerhalb von 24 Monaten an einem Lokalrezidiv oder an Fernmetastasen. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose können bereits einzelne oder kleine Aggregate von Tumorzellen in Sekundärorgane (z. B. ins Knochenmark oder in die Lymphknoten) eingewandert sein, ohne solide Metastasen gebildet zu haben (33, 49). In diesem Fall wird von einer minimalen residuellen Krebserkrankung (*Minimal Residual Disease*, MRD) gesprochen (50). Diese einzelnen Tumorzellen bzw. Tumorzell-Aggregate, deren Durchmesser definitionsgemäß nicht größer als 0,2 mm sein dürfen (UICC 2002), werden als „disseminierte Tumorzellen“ (DTZ) bezeichnet. Entlassen in die regionalen LK oder in den Blutkreislauf können DTZ zu Vorstufen von manifesten Metastasen im Knochenmark (KM) und anderen Organen werden.

Einzelne Tumorzellen konnten 1981 erstmals erfolgreich in KM-Aspiraten mit epithelialen Markern nachgewiesen werden (51). Da es sich bei dem KM um ein mesenchymales Organ handelt, sollten im Normalfall keine epithelialen Zellen detektiert werden können. Aufgrund der Korrelation zwischen dem Auftreten von epithelialen Zellen im KM und der Entstehung von Metastasen wurden diese Zellen daraufhin als DTZ klassifiziert (2, 52). Zu den mesenchymalen Kompartimenten gehören neben dem KM noch das Blut und die regionalen LK.

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene immunzytochemische und molekularbiologische Verfahren zur Detektion von einzelnen DTZ im Blut, in den LK und im KM entwickelt. Als bestes Nachweisverfahren für epitheliale Tumore hat sich die immunzytochemische Detektion von Tumor-assoziierten Proteinen herausgestellt. Unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern werden Proteine nachgewiesen, die spezifisch von epithelialen Zellen, in diesem Fall epitheliale Tumorzellen, und nicht von den umliegenden mesenchymalen Zellen exprimiert werden. Als spezifischer Marker zur Detektion von einzelnen DTZ in zytologischen Präparaten des KMs etablierte sich der Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen (CK⁺-Zellen) mit einem Pan-Antikörper, der sich gegen ein gemeinsames Epitop verschiedener Zytokeratinkomponenten richtet (53, 54). Zytokeratine stellen integrale Bestandteile des Zytoskeletts von epithelialen Zellen dar und werden von Tumorzellen stabil exprimiert. Da bei gesunden Probanden in ca. 1% der Fälle Zytokeratin-positive Zellen im KM nachgewiesen werden können, kann eine ektopische Expression in mesenchymalen Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden (49, 55).

Die Detektionsrate von DTZ im KM bei Patienten mit einem primären Bronchialkarzinom beträgt je nach Patientenkollektiv und Stelle der KM-Entnahme 22-60% (2-4, 49, 56-63). Tabelle 1.2 zeigt eine Übersicht von zwölf Studien mit Angaben zur Prognose der Patienten. In zwei unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Entnahmestelle des KMs das Vorhandensein von DTZ im KM entscheidend beeinflusst. KM-Aspirate aus der Rippe wiesen

sowohl bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom als auch bei Ösophagus- und Bronchialkarzinomen eine höhere DTZ-Detektionsrate auf als aus dem Beckenknochen entnommene Aspiate (64, 65). Dieses Phänomen trat ebenfalls bei zwei weiteren Studien an Bronchialkarzinomen auf (s. Tabelle 1.2). Während Pantel et al. in KM-Aspiraten aus dem Beckenkamm eine DTZ-Detektionsrate von 22% beschrieb, konnte Passlick et al. am gleichen Patientenkollektiv (mit weiteren 57 Patienten) unter zusätzlicher Verwendung von KM-Aspiraten aus den Rippen eine wesentlich höhere DTZ-Detektionsrate (60%) nachweisen (2, 3).

Unabhängig vom Ort der KM-Entnahme zeigten acht von zwölf Studien, dass das Vorhandensein von DTZ im KM ein unabhängiger Prädiktor für eine schlechte Prognose ist (2-4, 49, 57, 59, 60, 62). In einer Studie mit einem Patientenkollektiv von 139 Patienten und der längsten Nachbeobachtungszeit von Passlick et al. traf der prognostische Einfluss der DTZ im KM jedoch nur für nodal-negative Patienten mit ≥ 2 DTZ im KM zu (3).

Tabelle 1.2. Häufigkeit und klinische Relevanz von DTZ im KM von Patienten mit einem primären NSCLC.

Studie (Jahr)	Anzahl der Patienten	Stadium	KM Aspirat	Median Follow-up [Monate]	Antikörper	Anzahl mononuklearer Zellen	Häufigkeit von DTZ	Klinische Relevanz
Pantel et al. 1993 (2)	82 (pN0, n=42)	Stadium I-III	Beckenkamm	13,0	CK2	2*10 ⁶	22%	erhöhte RR (66,7% vs. 36,6%)
Cote et al. 1995 (4)	43	Stadium I-III	Rippe	13,6	CAM 5.2, AE1	1*10 ⁶	40%	schlechte DFS (p<0,001) erhöhte RR (p<0,001)
Pantel et al. 1996 (49)	139 (pN0, n=70)	Stadium I-III	Beckenkamm, Rippe	39,0	CK2	2*10 ⁶	(pN0) 54% (gesamt) 60%	pN0, frühere Rezidive (p=0,004)
Ohgami et al. 1997 (57)	39 (pN0, n=23)	Stadium I-III	Beckenkamm	4,6	CK2	2*10 ⁶	38%	frühere Rezidive (p=0,008)
Passlick et al. 1999 (3)	139 (pN0, n=66) *	Stadium I-III	Beckenkamm, Rippe	66,0	CK2	2*10 ⁶	(pN0) 52% (gesamt) 60%	schlechte OS (p=0,007) ‡ NS bei pN1→N2
Poncelet et al. 2001 (56)	99 (pN0, n=40)	Stadium I-IV (M1, n=3)	Beckenkamm	14,3	CAM 5.2, AE1	5*10 ⁶	22%	NS in OS (p=0,520) NS in DFS (p=0,970)
Sugio et al. 2002 (59)	58 (pN0, n=40)	Stadium I-III	Rippe	36,0	CK2	1*10 ⁶	47%	schlechte OS (p=0,044) Tendenz zur schlechteren DFS (p=0,064)
Osaki et al. 2002 (61)	115 (alle pN0)	Stadium I-II	Beckenkamm	35,8	CK2	1*10 ⁶	28%	NS in OS
Kasimir-Bauer et al. 2003 (60)	80 (pN0, n=15)	Stadium I-IV (M1, n=27)	Beckenkamm	12,0	A45-B/B3	1-2*10 ⁷	23%	schlechte OS (p=0,030) NS in DFS (p=0,146)
Yasumoto et al. 2003 (62)	351 (pN0, n=243)†	Stadium I-III	Beckenkamm	48,0	CK2	1*10 ⁶	32%	Tendenz zur schlechteren DFS (p=0,076) Stadium II-III, schlechte OS (p=0,047)
Hsu et al. 2004 (58)	96 (pN0, n=53)	Stadium I-IV (M1, n=10)	Beckenkamm	50,5	AE1/AE3, MNF 116, Ber-Ep4	6*10 ⁶	22%	NS in OS (p=0,940) NS in DFS (p=0,970)
Brunsvig et al. 2008 (63)	196	Stadium I-IV (M1, n=91)	Beckenkamm	8,0	MOC31	2*10 ⁷	55%	NS in DFS und OS

* einschließlich des Patientenkollektives von Pantel et al. Pantel (2), nachträgliche Untersuchung des aus der Rippe entnommenen KM zum Zeitpunkt der Primäroperation

† Multizenter-Studie mit Daten von 15 japanischen Instituten

‡ gilt für Patienten mit pN0 und ≥2 CK2-positiven Zellen im KM

Abkürzungen: CK: Zytokeratin; DFS: Rezidivfreies Überleben (*Disease Free Survival*); kA: kein Angaben; NS: nicht signifikant; OS: Gesamtüberleben (*Overall Survival*); RR: Rezidivrate (*Recurrence Rate*)

Antikörper: CK2: CK 18; CAM 5.2: CK 8, 18; AE1: CK 10, 14, 15, 16, 19; AE3: CK 1-8; A45-B/B3: CK 8, 18, 19, 8/19 Heterodimere; MNF 116: CK 5, 6, 8, 17; Ber-Ep4: EpCam; MOP31: EpCam

1.3 Genetische und epigenetische Veränderungen beim Bronchialkarzinom

Sowohl die Karzinogenese des Bronchialkarzinoms als auch seine Metastasierung ist ein mehrstufiger Prozess und erst durch die Addition mehrerer genetischer und epigenetischer Veränderungen entsteht ein manifestes Karzinom (66-68). Bereits im morphologisch normalen Bronchialgewebe von Rauchern sowie in präneoplastischen Veränderungen wie Hyperplasien, Dysplasien oder *Carcinoma in situ* lassen sich genetische Veränderungen wie Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) oder Veränderungen im Methylierungsmuster nachweisen (69, 70).

Durch den Nachweis der Beteiligung von mehreren Onko- und Tumorsuppressorgenen bei der Tumorentstehung zeigte sich, dass es sich bei Krebs vor allem um eine polygenetische Erkrankung handelt (71). Onkogene fördern die Tumorentstehung. Sie kodieren meist für Komponenten von Signaltransduktionswegen, die mit der Wechselwirkung zwischen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren auf der Zelloberfläche beginnen, schließlich im Zellkern genetische Programme abrufen und so den malignen Phänotyp aktiv beeinflussen. Onkogene wirken dominant und bereits eine Punktmutation, ein DNA-Gewinn oder eine Translokation eines Allels kann zu einer Steigerung der Aktivität oder der Expression einzelner Proteine führen (*gain of function*) (72). Unter normalen Umständen gehören Tumorsuppressorgene zu den DNA-Reparaturgenen oder kontrollieren den Zellzyklus und verhindern die unkontrollierte Zellteilung. Um die Genexpression dieser rezessiven Gene zu hemmen, müssen nach der Knudson *Two Hit*-Hypothese beide Allele durch einen zweistufigen Prozess inaktiviert werden (7). Durch Kombination von Mutationen, Deletionen oder DNA-Methylierungen können beide Allele des Gens inaktiviert und die Genexpression in Folge dessen unterdrückt werden (*loss of function*) (7, 73). Auf mögliche genetische und epigenetische Veränderungen, die zu einer Tumorentstehung bzw. zu der Tumorprogression beitragen können, soll in den folgenden Abschnitten eingegangen werden.

1.3.1 Genetische Veränderungen

Spontane oder induzierte Änderungen des Erbgutes werden als Mutationen bezeichnet und in drei Klassen eingeteilt: Genom-, Chromosomen- und Genmutation.

Genommutation

Unter Genommutationen werden numerische Veränderungen des Chromosomensatzes (Karyotyp) zusammengefasst. Sie betreffen entweder die Anzahl vollständiger Chromosomensätze (Euploidie) oder einzelner Chromosomen (Aneuploidie), die vermehrt (Hyperploidie) oder vermindert (Hypoploidie) sein können. Genommutationen entstehen durch Fehler innerhalb der Mitose, die zu genetischer und chromosomaler Instabilität führen können (74). Aneuploidie findet

man in alternden Zellen, sowie in einem hohen Prozentsatz präneoplastischer Gewebeveränderungen und maligner Tumore (75, 76). Numerische Veränderungen in den NSCLC können beträchtlich sein und führen häufig zu triploiden Karyotypen (77). In NSCLC sind häufig Verluste der Chromosomen 19 und 13 und Gewinne von Chromosom 7 zu finden. Trisomie 7 scheint ein sehr frühes Ereignis zu sein und kann bereits in benignem Lungengewebe gefunden werden (78).

Chromosomenmutation

Chromosomenmutationen sind strukturelle Anomalien, bei denen es sich entweder um intra- oder interchromosomale Umbauten handelt. Zu den wichtigsten strukturellen Veränderungen gehören die Ring- und Isochromosome, Translokationen, Inversionen und Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl (Verlust, Gewinn). Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl sind ein häufig auftretendes Ereignis in NSCLC und können zu einer erhöhten Expression von Onkogenen bzw. zu einer verminderten Expression von Tumorsuppressorgenen führen. Die häufigsten auftretende chromosomale Überrepräsentationen in den NSCLC sind 1q31 (~40%), 3q25-27 (~50%), 5p13-14 (~40%) und 8q23-24 (~50%) und Verlusten in 3p21 (~30%), 8p22 (~30%), 9p21-22 (~30%), 13q22 (~30%) und 17p12-13 (~20%) (79-82). Der Verlust einzelner Bereiche oder des gesamten p-Arms von Chromosom 3 ist mit 90% in SCLC und >80% in NSCLC das häufigste in Bronchialkarzinomen auftretende Ereignis und kann schon in frühen Stadien der Erkrankung nachgewiesen werden (72, 83, 84). Mehrere Tumorsuppressorgene wie u. a. *RASSF1*, *FHIT*, *RARβ* und das DNA-Reparaturgen *hOGG1* sind auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 lokalisiert (85-89). Kombinationen aus dem Verlust eines 3p-Allels mit Veränderungen im Methylierungsmuster, LOH oder Mutationen können zu einer Inhibierung der Expression dieser Gene führen. Weiterhin wurden DNA-Gewinne in Form von „*High Level*“ Amplifikationen und daraus resultierende Überexpressionen der Onkogene *c-MYC* (8q24), *MDM2* (12p13), *CDK4* (12q14), *HER2-neu* (17q12), *EGFR* (7p11) und *Cyclin D1* (11q13) in Bronchialkarzinomen beschrieben (90-92).

Genmutation

Genmutationen können durch Einfügen, Verlust oder Austausch von Basen (Transition, Transversion) verursacht werden. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes muss zwischen *silent*- (stillen), *missense*- (Fehlsinn-) und *nonsense*-Mutationen (Unsinn-) unterschieden werden. Während *silent*-Mutationen ohne Auswirkungen bleiben, führen *missense*-Mutationen zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz des Proteins und *nonsense*-Mutationen, durch Einführung eines zusätzlichen Stoppcodons, zu einem verfrühten Abbruch der Translation. Mutationen in Spleißerkennungssequenzen innerhalb der Exon-Intron-Grenzbereiche können zu einem fehlerhaften Spleißen und somit zu einer veränderten, einer verminderten Genexpression oder zum völligen Verlust des Genproduktes führen. Abhängig von den Auswirkungen auf

Genexpressionsebene unterscheidet man zwischen hypomorphen (Genfunktion abgeschwächt) und hypermorphen (Genfunktion verstärkt) Mutationen.

Die Gene der *RAS*-Familie und *TP53* gehören zu den prominentesten humanen Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgen und spielen beim Bronchialkarzinom eine entscheidende Rolle (93-96). Die Onkogene der *RAS*-Familie (*h-RAS*, *k-RAS*, *n-RAS*) kodieren für Guanosin-Triphosphat (GTP)-bindende Proteine und spielen eine entscheidende Rolle in Signaltransduktionswegen, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren. Punktmutationen findet man am häufigsten in *k-RAS* (12p12), wobei es sich meist um GT-Transversionen handelt (97). Der Verlust der GTPase-Aktivität von *k-RAS* führt zu einer Akkumulation von aktivem *k-RAS* und damit zu einem permanenten wachstumsstimulierenden Signal in der Zelle. Mutationen in *KRAS* werden überwiegend in AC (30-40%) gefunden (98-101). Sie sind deshalb von klinischer Bedeutung, da sie sowohl für frühe als auch für fortgeschrittene Stadien eine schlechte Prognose darstellen (93, 99, 102, 103).

Das Tumorsuppressorgen *TP53* (Chromosom 17p13) reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind (104). Neben häufig auftretenden LOH werden in 40-70% aller Bronchialkarzinome GT-Transversionen gefunden (105-107), die insbesondere nach Bildung von DNA-Addukten durch Kanzerogene wie Benzo(a)pyren im Tabakrauch induziert werden (108, 109). Der Funktionsverlust oder die Veränderung der Aktivität von *TP53* führt zu einer unkontrollierten Zellproliferation und einer Inhibierung der Apoptose. Mutationen in *TP53* sind frühe Ereignisse in der Karzinogenese und können z. T. bereits vor dem Auftreten eines Bronchialkarzinoms im Sputum von Risikogruppen (z. B. Rauchern) nachgewiesen werden (110, 111). Bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom sind die Prognosen mit einem mutierten *TP53* deutlich schlechter als mit einem nativen *TP53* (112).

1.3.2 Epigenetische Veränderung

Die Epigenetik beschäftigt sich mit Veränderungen in der Genregulation und -expression, die nicht auf Abweichungen innerhalb der DNA-Sequenz beruhen (113). Zu ihnen gehören die DNA-Methylierung, die Alkylierung von Histonen und die Inhibierung der Expression durch mikro-RNA (114). Im Rahmen dieser Arbeit soll nur auf die DNA-Methylierung eingegangen werden.

Ende der 70er Jahre wurde gezeigt, dass Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster, neben der Alkylierung von Histonen, zu den häufigsten in der Karzinogenese involvierten epigenetischen Modifikationen zählen (115, 116). Während nur 1-10 Gene pro Tumor mutiert vorgefunden werden, liegen einige hunderte Tumorgene im methyliertem Zustand vor. Dabei spielt sowohl eine

globale Verminderung der DNA-Methylierung (Hypomethylierung) als auch eine meist auf Promotorregionen bezogene Erhöhung der Methylierung (Hypermethylierung) eine entscheidende Rolle. Beide Prozesse können sowohl voneinander unabhängig als auch in Kombination ablaufen.

Bei der Methylierung handelt es sich um einen biochemischen Prozess, bei dem durch DNA-Methylase eine Methylgruppe an das 5.-Kohlenstoffatom der Base Cytosin angelagert und dadurch 5-Methylcytosin gebildet wird. Dabei wird die postreplikative Methylierung von hemi-methylierter DNA und die *de novo*-Methylierung von nicht-methylierter DNA unterschieden (117, 118). Generell ist die DNA-Methylierung ein ubiquitärer Prozess im menschlichen Genom und spielt u. a. bei der X-chromosomalen Inaktivierung, der genomischen Prägung (*Imprinting*), der genetischen Inaktivierung von repetitiven Elementen und der gewebespezifischen Regulation der Genexpression eine entscheidende Rolle (119-121). Im humanen Genom wird bevorzugt die palindromische Basenfolge von Cytosin und Guanin (CpG) methyliert, wobei Cytosin-Methylierungen auch außerhalb von CpG-Dinukleotiden auftreten können (122). Die genomischen Bereiche, in denen eine hohe CpG-Dichte vorliegt, werden als CpG-Inseln bezeichnet und befinden sich häufig in der 5'-Region eines Gens (Promotorregion, untranslatierte Region und Exon 1). CpG-Inseln haben eine Länge von 200 Bp bis hin zu wenigen Kb und kommen schätzungsweise in der Hälfte aller Promotorregionen vor (123, 124).

Von abweichenden Hypermethylierungen in malignen Tumoren sind vor allem Gene der DNA-Reparatur, der Detoxifizierung, der Zellzyklusregulation und der Apoptose betroffen (125-127). Für mehrere Tumorsuppressorgene wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Hemmung der Expression durch Hypermethylierung und der Tumorentstehung nachgewiesen (128). In Bronchialkarzinomen ist der Methylierungsstatus und dessen Einfluss auf die Entstehung von malignen Tumoren von weit über 40 Genen bekannt, wie z. B. *RASSF1A*, *hSRBC*, *GSTP1* und *RAR β* (129-131).

Weitaus weniger untersucht ist das Phänomen der Hypomethylierung, welches sowohl in alternden Zellen also auch in malignen Tumoren beobachtet werden kann. Bis zu 10 Millionen CpG-Inseln in einem haploiden Tumorgenom können gleichzeitig von Hypomethylierungen betroffen sein (132). Auch wenn die genauen Mechanismen der Hypomethylierung noch nicht ausreichend erforscht sind, werden drei Wirkungsweisen zur Tumorentstehung postuliert: die Aktivierung der Transkription von Onkogenen, der Verlust des genomischen *Imprintings* und die genomische Instabilität, welche durch den Verlust von Methylierungen innerhalb repetitiver Sequenzen entsteht (133, 134). Bislang gibt es nur wenige Studien, die eine Hypomethylierung in Bronchialtumoren untersucht haben. Im Vergleich zu Normalgeweben wurde allgemein eine verminderte DNA-Methylierung in Tumoren nachgewiesen (135, 136). So beruht die Expression des Onkogens *k-RAS* auf einer Kombination von Hypomethylierung der Promotorregion und Punktmutation in Bronchial- und Kolonkarzinomen (136).

Die Bedeutung der DNA-Methylierung für die Induktion von malignen Tumoren ist heute unumstritten und eröffnet somit neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten (137, 138). Mehrere Studien zeigen zudem, dass tumorspezifische Methylierungen als spezifische prognostische Marker verwendet werden können (139-141).

1.3.3 Veränderungen in der Genexpression

Die Regulation der Genexpression findet nicht nur auf genetischer und epigenetischer Ebene statt, sondern auch durch Veränderungen in der Transkription und Translation. Auch wenn nicht alle Mechanismen und Regulationswege bekannt sind, hat sich dennoch herauskristallisiert, dass die Transkription einer der wichtigsten genregulatorischen Mechanismen der Zelle darstellt. Dabei können einzelne sowie Kombinationen aus genetischen und epigenetischen Alterationen zu Veränderungen innerhalb des Genexpressionsmusters führen. Unter Verwendung von Mikroarrays lässt sich die Expression tausender Gene gleichzeitig bestimmen.

Untersuchungen der Genexpression führten zur Identifikation einer Reihe von Genen, die mit der Entstehung und Progression von malignen Tumoren in Zusammenhang gebracht werden können (142). Bronchiale AC und SCC besitzen sowohl gemeinsame als auch für ihre Histologie spezifische Expressionsmuster, die das Bestimmen des Histologietyps wesentlich vereinfachen (143-146). Die heterogenen Eigenschaften von AC lassen die Unterteilung in weitere Untergruppen mit signifikant unterschiedlichen Überlebensraten zu (147, 148). Viele Expressionsanalysen zielen auf das Aufspüren von spezifischen Genexpressionmustern hin, mit denen sich Bronchialtumore nach ihrer Aggressivität in verschiedene Gruppen einteilen lassen (149-151). So konnte Beer et al. anhand eines Expressionsclusters von 50 Genen Bronchialkarzinome des Stadiums I in aggressive und in weniger aggressive Tumore einteilen, die sich deutlich in ihrem Krankheitsverlauf unterscheiden und für die dementsprechend unterschiedliche Weiterbehandlungsformen angeboten werden können (149).

Spezifisch in Bronchialkarzinomen überexprimierte Gene können als Tumormarker in der Diagnostik, als Indiz für einen Therapieerfolg oder als Hilfe für die frühe Detektion von Metastasen verwendet werden (152, 153).

1.4 Genomische und Expressions-Analysen mit Hilfe der Mikroarray-Technik

Die Technologie der Mikroarrays wurde in den 90er Jahren etabliert und stellt heute einen unverzichtbaren Bestandteil der Forschung dar. Dabei werden Tumorstanzen, cDNA-, BAC-Klone oder Oligonukleotide in Form von tausenden *Spots* auf eine feste Phase fixiert, die i. d. R. aus Glas, Plastik oder Silikon besteht (Mikroarray). Dieses erlaubt die parallele Analyse von mehreren tausend Einzelnachweisen mit einer geringen Menge biologischen Probenmaterials.

Methoden, die auf der Mikroarray-Technik beruhen, wurden bereits in verschiedenen Bereichen der Krebsforschung eingesetzt. Durch Kombination der im folgenden Kapitel vorgestellten Techniken wurde es zudem möglich, den Zusammenhang zwischen genomischen Veränderungen und der Genexpression zu untersuchen und somit weitere Anhaltspunkte für das Entstehen und die Progression von malignen Tumoren zu bekommen.

1.4.1 Nachweis von Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl

Die moderne humane Zytogenetik wurde 1956 durch Tijo und Levan revolutioniert. Ihnen gelang erstmals der Nachweis, dass der humane diploide Chromosomensatz nicht – wie bis dahin angenommen – aus 48, sondern aus 46 Chromosomen bestand (154). Weitere Fortschritte in der zytogenetischen Technologie erlaubten schließlich die spezifische Färbung von Metaphasechromosomen und die Entdeckung ihrer chromosomenspezifischen Bandenmuster. Durch die Identifizierung und Charakterisierung jedes einzelnen Chromosoms konnte gezeigt werden, dass chromosomale Anomalien, wie Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl durch DNA-Gewinne oder Verluste, im engen Zusammenhang mit spezifischen genetischen Erkrankungen stehen (155, 156). Mit Methoden der molekularen Zytogenetik, wie der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und der komparativen genomischen Hybridisierung (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH) lassen sich Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl spezifisch nachweisen.

Anfang der neunziger Jahre wurde erstmals die CGH beruhend auf der Hybridisierung von Metaphasechromosomen als neue molekular-zytogenetische Methode vorgestellt (157). Die Methode beruht auf der gleichzeitigen Hybridisierung von unterschiedlicher Fluoreszenz-markierter Test- (Tumor-DNA) und Referenz-DNA (normale DNA) auf Metaphasechromosomen (klassische CGH) oder auf Mikroarrays mit cDNA-, BAC-Klone oder Oligonukleotiden (s. Abbildung 1.3). Die Mikroarrays werden anschließend gescannt und die Stärke der Fluoreszenz gemessen. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Test- und Referenz-DNA gibt Aufschluss über das Vorliegen von chromosomalen Imbalancen.

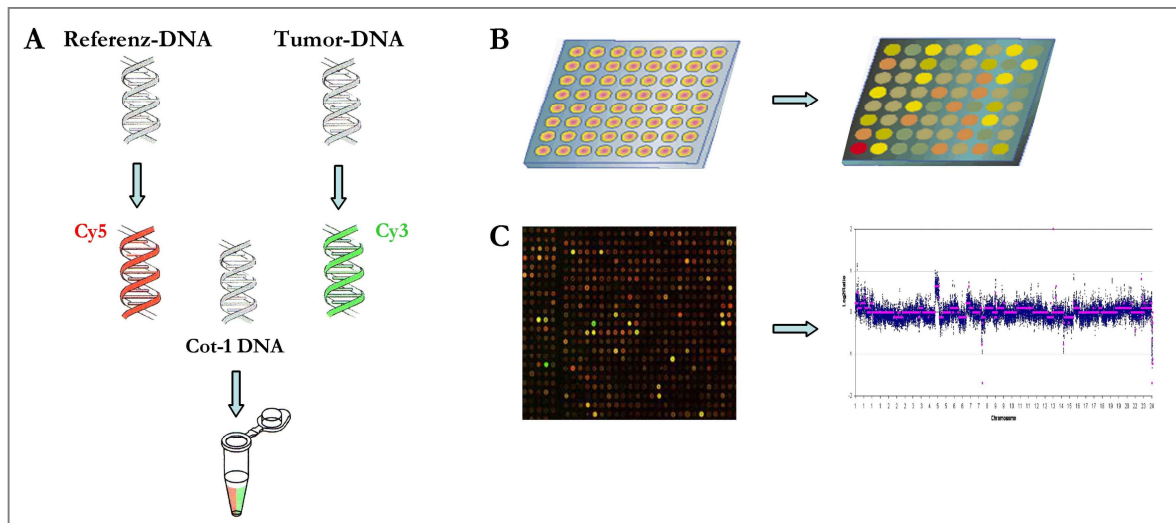


Abbildung 1.3. Übersicht zur Durchführung einer Array-CGH. (A) Tumor- und Referenz-DNA werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Cy5 bzw. Cy3), in gleichen Anteilen zusammengegeben und zur Absättigung von repetitiven Sequenzen mit Cot-1 DNA vermischt. (B) Bei der kompetitiven Hybridisierung konkurrieren die Tumor- und die Referenz-DNA um die homologen Bindungsstellen des Arrays. (C) Nach der Hybridisierung werden die Array-CGHs gewaschen und gescannt. Anhand des Verhältnisses aus den Fluoreszenzintensitäten der Tumor- und der Referenz-DNA können DNA-Überrepräsentationen bzw. DNA-Verluste der Tumor-DNA bestimmt werden.

Die klassische CGH besitzt mit 2 Mb für DNA-Gewinne und 10 Mb für DNA-Verluste, was in etwa einer chromosomalen Bande entspricht, ein verhältnismäßig geringes Auflösungsvermögen (158). Durch die spätere Verwendung von Mikroarray-CGHs wurde die Auflösung der CGH um mehr als eine Zehnerpotenz erhöht. Durch den Einsatz von cDNA-Klonen wurde es erstmals möglich, mit einer gemeinsamen Plattform sowohl Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl als auch der Expression zu untersuchen und diese in einem direkten Zusammenhang zu bringen (159). Mit einem wesentlich höheren Auflösungsvermögen von 267 kb zeigten cDNA-Mikroarrays aufgrund ihrer begrenzten Anzahl an Klonen und ihrer schwachen Signalintensität allerdings starke Schwächen. Kurze Zeit später erschien der erste Mikroarray mit DNA aus 2.600 BAC-Klonen und einer Auflösung von 1,2 Mb auf dem Markt (160). Die Verwendung eines 30.000 BAC-Arrays (161) erhöht zwar das Auflösungsvermögen um eine weitere Zehnerpotenz, ihre Herstellung ist allerdings sehr zeitaufwendig und kostspielig. Die Lösung stellen hier Mikroarray-CGHs dar, die mit mehr als 30.000 Oligonukleotiden das vollständige humane Genom abdecken und mit ~100 kb ein nahezu unbegrenztes Auflösungsvermögen besitzen. Darüber hinaus ist ihre Zusammenstellung flexibel und kostengünstiger (162, 163). Da die Auswertungen auf Genebene stattfinden, erlaubt die Verwendung des gleichen Arrays für CGH und Expressionsanalysen einen direkten Vergleich von mRNA-Expression und DNA-Kopienanzahl (164). In zahlreichen Studien wurden kommerzielle Array-CGHs mit gedruckten Oligonukleotiden erfolgreich verwendet (165, 166).

Eine weitere Mikroarray-Art zum Nachweis von Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl stellen SNP-Arrays dar. Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) sind die bei weitem häufigste Quelle genetischer Variation beim Menschen. Aufgrund ihrer hohen Dichte eignen sich SNPs als Marker zur Lokalisation von krebsassoziierten Genen, sie können aber auch selbst zur Tumorentstehung und dessen Progression beitragen. SNP-Arrays erlauben die gleichzeitige Bestimmung von LOH und DNA-Kopienanzahl. Obwohl sie mit bis zu 100.000 SNPs eine höhere Auflösung als CGH oder gängige Mikrosatellitenstudien aufweisen (167, 168), besitzen sie im Vergleich zu Mikroarrays basierend auf Oligonukleotiden eine wesentlich geringere Sensitivität (169).

1.4.2 Untersuchungen von Methylierungsmustern

Verschiedene auf Arrays basierende Methoden wurden in den letzten Jahrzehnten entwickelt, um Methylierungsmuster von CpG-Dinukleotiden in genomischer DNA nachzuweisen. Die Verwendung von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen, wie z. B. HpaII, führt zu einer spezifischen Restriktion von methylierter DNA und somit zu einer Fragmentierung der genomischen DNA. Die folgende Unterrepräsentation von methylierten DNA-Sequenzen in der hochmolekularen Fraktion der DNA kann mittels Hybridisierung auf Arrays nachgewiesen und daraus das Methylierungsmuster bestimmt werden (170, 171). Zahlreiche Abwandlungen dieser Methode wurden bereits publiziert (172-174).

Eine vollkommen andersartige Untersuchungsmethode beruht auf der Kombination einer Natriumsulfit-Behandlung der genomischen DNA mit der Verwendung von Oligonukleotid-Arrays (175). Unmethylierte Cytosine werden durch Behandlung der genomischen DNA mit Natriumsulfit deaminiert und zu Uracil desulfonyliert, während methylierte Cytosine unmodifiziert bleiben. In einer folgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird Uracil durch die DNA-Polymerase als Thymidin gelesen und es folgt die vollständige Konversion aller unmethylierten Cytosine in Thymidin. Während diese Basenaustausche mit Sequenzierung oder methylierungsspezifischen PCRs (MSP) (176, 177) nur zeit- und kostenaufwendig nachgewiesen werden können, wird durch die Verwendung eines Oligonukleotid-Arrays die parallele Analyse einer großen Anzahl von Genen und CpG-Dinukleotiden möglich (178). Diese Arrays enthalten für jedes CpG-Dinukleotid zwei Sequenz-Variationen: für den methylierten Status enthalten die Sonden die Sequenz CG und für den unmethylierten Status die Sequenz TG. Diese Art der Untersuchung des genomischen Methylierungsmusters besitzt zwei wesentliche Nachteile. Zum einen die Degeneration des genetischen Codes, welches zu einem hohen Verlust der Spezifität führt und somit zu einer begrenzten Anzahl an Oligonukleotiden, die für die Analysierung verwendet werden können. Zum anderen geben diese Arrays keine Hinweise auf den Einfluss der CpG-Methylierung auf die Genexpression.

Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression können Untersuchungen unter Verwendung des DNA-Methylase Inhibitors 5-Aza-2-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) liefern. 5-Aza-CdR ist ein Cytosinanalogen und wird während der Replikation in die genomische DNA eingebaut. Es inhibiert die Aktivität der DNA-Methylase, was eine genomweite Demethylierung zur Folge hat. Dies führt zur Re-Expression von Genen, die zuvor durch DNA-Methylierung des Promotors inaktiviert waren (179, 180). Durch Vergleich solcher Re-Expressionsprofile von normalen Lungenzelllinien mit Zelllinien von primären Bronchialkarzinomen wurden potentielle Tumorsuppressorgene identifiziert, deren Genexpression im Gegensatz zum normalen Gewebe in Bronchialkarzinomen durch Hypermethylierungen inhibiert wurden (181).

1.4.3 Verfahren zur Genexpressionsanalyse

Klassische Verfahren wie z. B. Northern Blot Analysen und Real Time-PCR eignen sich hervorragend für Expressionsanalysen bereits bekannter Gene in Einzelexperimenten. Aufgrund ihres zeitlichen Aufwands und ihrer hohen Kosten können sie allerdings nicht effektiv für Analysen des gesamten humanen Transkriptoms genutzt werden. Durch den Vergleich der Genexpression in verschiedenen Geweben, Zellpopulationen oder Entwicklungsstadien können differentiell exprimierte Genexpressionsmuster nachgewiesen werden, die einen Einblick in den molekularen Phänotyp geben (182). Daher wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Arten von Expressionsarrays entwickelt, die eine parallele Ausführung und weitgehend automatische Auswertung tausender Hybridisierungsexperimente ermöglichen (183, 184). Grundsätzlich werden zwei verschiedene Array-Arten unterschieden: cDNA- und Oligonukleotid-Arrays. Bei cDNA-Arrays werden ausgewählte cDNA-Fragmente, meist PCR-Produkte aus Klonen einer cDNA-Bank, mit einer Länge von 300-500 Basen auf speziell beschichtete Träger aufgebracht (185). Für die Oligonukleotid-Arrays werden genspezifische Oligonukleotide (25-60 Basen lang) verwendet, die komplementär zu einem bestimmten Sequenzbereich am 3'-Ende der mRNA der jeweiligen Gene oder der ESTs (*Expressed Sequence Tags*) sind.

Ähnlich der CGH wird die zu untersuchende mRNA in einer enzymatischen Reaktion zu cDNA oder cRNA umgeschrieben und z. B. mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Anschließend folgt die Hybridisierung mit einem Expressionsarray. Bei der kompetitiven Hybridisierung wird das zu untersuchende Material (cDNA oder cRNA) und die Referenz mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf einen gemeinsamen Array hybridisiert, wo sie um die freien Bindungsstellen konkurrieren. Wird eine nicht-kompetitive Hybridisierung durchgeführt, wird sowohl die Tumor- als auch die Referenzprobe auf einzelne Arrays hybridisiert und die Ergebnisse anschließend miteinander verglichen. Ein kritischer Punkt bei der Durchführung und Auswertung von Expressionsarrays stellt insbesondere die Wahl der Referenz dar, die z. B. aus

potentiell gesundem Gewebe oder aus Zelllinien gewonnen werden kann (186, 187). Damit die Auswertung der Expressionsarrays nicht durch umgrenzendes Gewebe beeinflusst wird, können die Tumorzellen durch Mikrodissektion aus ihrem Gewebeverband isoliert und die geringen Konzentrationen an mRNA nach Extraktion amplifiziert werden (188, 189). So wird der Erhalt von mRNA mit einer hohen und homogenen Qualität garantiert.

1.4.4 Tissue Microarray

Die Verwendung von Gewebearrays (*tissue microarray*, TMA) bietet die Möglichkeit bis zu 1.000 Gewebeproben von verschiedenen Patienten simultan zu untersuchen (190). Ein TMA besteht aus 100-1.000 zylindrischen Gewebebiopsien, die zusammen in einen neuen Paraffinblock eingebettet werden (s. Abbildung 1.4). Aufgrund der Heterogenität insbesondere von Bronchialkarzinomen sollte der TMA im optimalen Fall mehrere Replikate von jedem Tumor enthalten. TMA-Schnitte können ohne großen Gewebeverlust für *in situ* Techniken wie FISH und immunhistologische Färbungen verwendet werden. Dies hat zum Vorteil, dass zum einen alle Proben gleichzeitig unter den gleichen Bedingungen untersucht werden, und zum anderen der Materialverbrauch, wie DNA-Sonden oder Antikörper, gering gehalten werden kann. Nachteilig hingegen ist, dass der ausgestanzte Bereich des Tumorgewebes nicht unbedingt repräsentativ für das gesamte Gewebe ist.

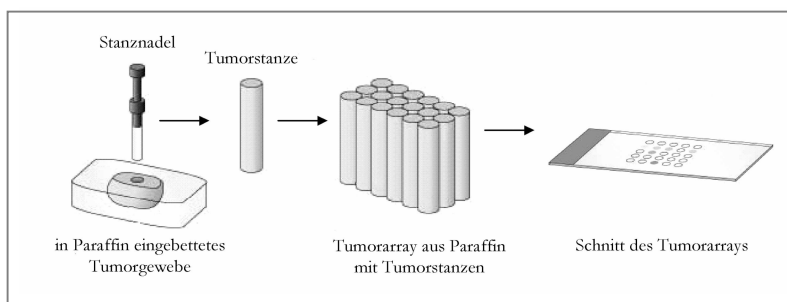


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung der Herstellung eines TMAs.

1.5 Aufgabenstellung

Viele Patienten mit einem primären Bronchialkarzinom erkranken trotz vollständiger Resektion des Primärtumors im weiteren Krankheitsverlauf an einem Tumorrezidiv, was vermutlich auf eine frühzeitige Disseminierung von Tumorzellen in die regionalen LK oder in das KM zurückzuführen ist. Unklar ist derzeit, ob es sich bei der Streuung von Zellen aus dem Primärtumor um einen selektiven Prozess oder um ein eher spontanes Ablösen von Tumorzellen aus dem Zellverband handelt. Die frühe hämatogene Disseminierung von Mammakarzinomen scheint auf ein spezifisches Expressionsmuster des Primärtumors zu beruhen und unter der

Kontrolle einer Reihe von verschiedenen Genen zu stehen (5, 6). Vergleichende Studien an primären Bronchialkarzinomen wurden noch nicht durchgeführt.

Basierend auf der prognostischen Relevanz mikrometastatischer Tumorzellen sollen in dieser Arbeit chromosomale Imbalancen des Primärtumors identifiziert werden, die zu Alterationen in der Genexpression führen und somit für die lymphogene und/oder hämatogene Disseminierung humaner Bronchialkarzinome von Bedeutung sind. Hierfür werden unter Verwendung der Mikroarray-Technologie von primären Bronchialkarzinomen mit bekanntem KM- bzw. LK-Status Profile der DNA-Kopienanzahl (Array-CGH) und der Genexpression erstellt und miteinander verglichen. Aufgrund der hohen Kosten der Mikroarray-Technologie werden diese zum Nachweis der DNA-Kopienanzahl und der Genexpression nur an einem kleinen Patientenkollektiv verwendet. Die Ergebnisse sollen anschließend an einem größeren Patientenkollektiv mit einem im Rahmen dieser Arbeit erstellten TMA mit Stanzen von primären Bronchialkarzinomen validiert werden.

Der Nachweis genomischer Aberrationen bzw. Marker, die zur Progression und Metastasierung von Tumoren führen, könnte äußerst hilfreich in der Diagnostik oder in der Wahl der Therapie sein (191, 192). Durch einfache Nachweisverfahren am Primärtumor könnten Hinweise auf das Vorhandensein von DTZ im KM gegeben und die Patienten dementsprechend in Risikogruppen eingestuft werden. Des Weiteren soll diese Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Biologie der Disseminierung leisten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenmaterial

Das Material und die Patientendaten wurden entweder von der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie (Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, UKE) oder von dem Institut für Thoraxchirurgie (Zentrales Krankenhaus Gauting, München) zur Verfügung gestellt.

Für die Studie wurde Gewebe von primären Bronchialkarzinomen von 92 Patienten analysiert, die in dem Zeitraum 1989-2006 operiert wurden. Es handelte sich ausschließlich um bis zum Zeitpunkt der Operation unbehandelte Patienten, die sich im klinischen Tumorstadium T1-4, N0-3, M0 befanden. Während der Operation wurden zudem die lokoregionalen LK entfernt und KM entnommen. Patienten, behandelt am UKE in Hamburg, wurden durch einseitige Punktion des Beckenkamms KM entnommen. Von in München operierten Patienten wurde für die KM-Entnahme zusätzlich zu einer beidseitigen Punktion des Beckenkamms eine Punktion der Rippen durchgeführt. Das KM wurde innerhalb von 48 h aufgearbeitet und anschließend analysiert (s. Kapitel 2.2.1). Weiterhin wurde als Referenz Normalgewebe der Lunge von drei Patienten des UKEs verwendet.

Die histologischen Diagnosen und klinischen Stadien wurden anhand von Hämatoxylin und Eosin gefärbten Formalin-fixierten Gewebeproben nach den Richtlinien der TNM-Klassifikation der *International Union Against Cancer* (UICC) bewertet. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht der Einteilung der Tumorgewebe und deren Verwendung in dieser Arbeit. Das Tumorgewebe wurde in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Des Weiteren wurden Paraffinschnitte eines *Tissue Microarrays* (TMA) von Prof. Dr. Glatzel aus dem Institut für Neuropathologie (UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt, die 36 auswertbare Gehirnmetastasen von primären Bronchialkarzinomen enthielten (s. Kapitel 2.2.14).

Tabelle 2.1. Charakterisierung der Bronchialkarzinompatienten und Aufteilung der Patientenkollektive für die verschiedenen Analysen. Zum Zeitpunkt der Primäroperation wurden bei allen Patienten keine distanten Metastasen nachgewiesen.

	Primärtumore								Gehirn- metastasen (n=36)
	Gesamt (n=92)		CGH (n=30) *		Affymetrix (n=16)		FISH (n=78) †		
	KM-neg	KM-pos	KM-neg	KM-pos	KM-neg	KM-pos	KM-neg	KM-pos	
Histologie ‡									
AC	29	20	16	14	9	7	23	12	14
SCC	23	14	0	0	0	0	23	14	10
LCLC	5	0	0	0	0	0	5	0	0
SCLC	0	0	0	0	0	0	0	0	7
andere	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Geschlecht									
weiblich	23	8	7	6	5	2	20	4	14
männlich	35	26	9	8	4	5	32	22	22
Alter [a]									
Bereich	37-83	48-81	49-78	51-75	49-76	55-75	37-83	48-81	44-75
Mittelwert	62	63	61	64	65	67	63	63	57
Tumorgroße									
pT1	15	12	6	4	5	1	13	9	ND
pT2	35	15	9	10	3	5	32	11	ND
pT3	3	6	1	0	1	1	2	5	ND
pT4	5	1	0	0	0	0	5	1	ND
Differenzierungsgrad ‡									
G1/2	34	17	9	8	6	3	30	11	ND
G3	22	14	6	6	3	4	21	12	ND
LK-Status									
negativ	27	16	8	6	3	2	26	12	ND
positiv	31	18	8	8	6	5	26	14	ND

* ausgeschlossen zwei Tumorproben, die nicht in die weiteren Auswertungen einbezogen wurden

† einschließlich 18 ACs, welche ebenfalls in CGH-Analysen untersucht wurden

‡ Daten zur Histologie fehlen von fünf Gehirnmastasen und zum Differenzierungsgrad von fünf Primärtumoren

ND Daten nicht vorhanden

2.1.2 Zelllinien

Tabelle 2.2 Herkunft der verwendeten humanen Zelllinien.

Zelllinie	Typ	Ursprungsgewebe	Literatur
BEAS-2B	Normale Bronchialepithelzellen	mit SV-40 immortalisierte, normale Bronchialepithelzellen	(193)
H1993	Adenokarzinom der Lunge	Lymphknoten	(194)
H1395	Adenokarzinom der Lunge	Primärtumor	(194)
HTB-56	Anaplastisches Karzinom der Lunge	nicht bekannt	(195)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

2.1.3.1 Chemikalien

Die Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Sollten Lösungen für Arbeiten mit RNA verwendet werden, wurden sie mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC, Sigma) behandeltem Wasser angesetzt.

AB-Serum	Biotest AG, Dreieich
Aceton	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Aminosäuren, essentielle	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
5'-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-CdR)	Invitrogen, Karlsruhe
Bactoagar	BD Biosciences
Bactotrypton	BD Biosciences
BEBM®-Medium	Clonetics, Walkersville, MD
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Colcimid	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Cot-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Cresyl-Violet-Acetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Desoxynukleosidtriphosphat-Set	Roche, Mannheim
Dextran	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diethylprocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
EDTA (Diethylen-diamin-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eosin G-Lösung (0,5 % wässrig)	Merck Eurolab, Darmstadt
Entellan	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol, Isopropanol	Merck Eurolab, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ficoll-Plaque	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fixogum	Marabuwerke GmbH&Co., Tamm
Formaldehydlösung, mindestens 37%	Merck Eurolab, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Merck Eurolab, Darmstadt
Gel Star Nucleic Acid Gel Stain	Lonzo, Rockland, USA
Giemsa-Lösung	Merck Eurolab, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Glycerin	Merck Eurolab, Darmstadt
Glycerol	Merck Eurolab, Darmstadt
Glyzergel Mounting Medium	Diagnostika GmbH, Hamburg
Hämalaun	Merck Eurolab, Darmstadt
Hank's Salt Solution	Biochrom KG, Germany
Hefeextrakt	BD Biosciences
Hefe tRNA	Invitrogen, Karlsruhe
Kalimchlorid (KCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck Eurolab, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (K ₂ H ₂ PO ₄)	Merck Eurolab, Darmstadt
Levamisol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MEM-Medium	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methylenblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Naphtol-AS-BI-Phosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck Eurolab, Darmstadt
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche, Mannheim
Neufuchsin	Merck Eurolab, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim
PBS, Dulbecco's	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Pepsin	Zymed, Berlin
Phytohämagglutinin	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Proteinase K-Lösung	Serva, Heidelberg
RPMI 1640	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Seakem® LE Agarose	FMC-Bioproducts, Rockland, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Sodium-Pyruvat	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Spot-Light Tissue Heat Pretreatment	Zymed, Berlin
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck Eurolab, Darmstadt

Trichostatin A (TSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	Merck Eurolab, Darmstadt
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin-EDTA 10 x konzentriert	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Trypsinlösung	ICN Biomedicals
Vectashield	Vector Laboratories, CA
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.3.2 Antikörper

Tabelle 2.3. Antikörper zum Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen im KM.

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Anti-Pan CK A45-B/B3	0,2 mg/ml	Micromet, Martinsried
MOPC21	1 mg/ml	Sigma, Deisenhofen
Sekundärantikörper Z259	2,5 mg/ml	Dako, Hamburg
APAAP-Komplex	0,1 mg/ml	Dako, Hamburg

2.1.3.3 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide stammten von den Firmen Operon und TibMolBiol und wurden mit dem Reinheitsgrad HPSF (*High Purity Salt Free*) im 0,01 mmol-Maßstab synthetisiert.

Tabelle 2.4. Verwendete Oligonukleotide für Methylierungs-Analysen.

Bezeichnung *	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur [°C]	Amplikon [Bp]	Literatur
HERC5 Seq-F	TTAAAGTGTTGGGATTATAGG	54	409	eigene
HERC5 Seq-R	CAACCTCAACTACTAAACCC			
MAGE A1 Seq-F	CCCAAGCTTTTTATTTTATTTAGGTAGGATT	55	322	(196)
MAGE A1 Seq-R	CGGGGTACCCCTAATATCTCTCAAACTTTTAA			
MAGE A12 Seq-F	GGATTTTTATTTAGGAAGAATTTAGTTT	52	280	(196)
MAGE A12 Seq-R	CTCTTACACCAAAATTCCTA			
T7 Seq	CCCTATAGTGAGTCGTATTA	50		

* F: forward Primer (*sense*); R: reverse Primer (*antisense*)

Tabelle 2.5. Verwendete Oligonukleotide zur DNA-Qualitätsüberprüfung und für Expressionsanalysen.

Bezeichnung *	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur [°C]	Amplikon [Bp]	Literatur
DAPP1 RT-F	CGGGCTGTACTCTCTCTGTG	52	152	eigene
DAPP1 RT-R	CGCTTCCAATCAAAGGCTG			
DLC1 RT-F	GGACACCATGATCCTAACAC	55	290	(197)
DLC1 RT-R	AGTCCATTTGCCACTGATGG			
GSTP1 RT-F	GAGGACCTCCGCTGCAAATAC	57	150	(196)
GSTP1 RT-R	CTCCCACAATGAAGGTCTTG			
HERC5 RT-F	TTAAAGTGTTGGGATTATAGG	62	150	eigene
HERC5 RT-R	CAACCTCAACTACTAAACCC			
hSRBC RT-F	AGCTCCACGTTCTGCTCTTCA	57	500	eigene
hSRBC RT-R	GGCGTGAGTGCTACATTCTGA			
MAGE A1 RT-F	CGGCCGAAGGAACCTGACCCAG	60	429	(196)
MAGE A1 RT-R	GCTGGAACCCTCACTGGGTTGCC			

MAGE A2 RT-F	AAGTAGGACCCGAGGCACTG	57	236	(196)
MAGE A2 RT-R	GAAGAGGAAGAAGCGGTCTG			
MAGE A12 RT-F	GCGCGTTGGAGGTCAGAGA	57	420	(196)
MAGE A12 RT-R	CGGATTGACTCCAGAGAGTA			
MAP9 RT-F	TGAGGGAAACGCATCTGG	58	133	eigene
MAP9 RT-R	TTCCTTGGATTTCTCAACTGC			
hOGG1 R	GTACCTAGGATCTGACCTGTG	60	120	(89)
hOGG1 F	GGGTCTTGTCGCAGCAGTC			
PDLIM3 RT-F	TCCTGGCTATTGACGGCTTTG	58	150	eigene
PDLIM3 RT-R	GGGCTTTCCCATCTTCAGATAC			
RARb RT-F	CGATGCCAATACTGTGCGACTCC	60	200	(129)
RARb RT-R	AGCTGGCAGAGTGAAGGGAAAG			
TLR2 RT-F	CTCATTGTGCCCATGCTC	62	140	eigene
TLR2 RT-R	GCCTGATTGGAGGATTCTTC			

* F: forward Primer (sense); R: reverse Primer (antisense)

2.1.3.4 Puffer und Lösungen

PBS, pH 7,4 (10x)	1,54 M NaCl, 0,08 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 0,02 M KH ₂ PO ₄
SSC (20x, pH 7)	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat
TBE (10x, pH 8)	0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 0,02 M Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O
TE-Puffer (10 mM, pH 7,4)	10 mM Tris, 1 mM EDTA

2.1.3.5 Zellkultur- und Nährmedien

RPMI-Medium für die Zelllinien H1993 und H1395

90% (v/v) RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin

MEM-Medium für die Zelllinie HTB-56

90% (v/v) MEM Medium, 10% (v/v) FCS, 1% Sodium-Pyruvat,
1% essenzielle Aminosäuren, 2 mM Glutamin

BEBM-Medium für die Zelllinie BEAS-2B

100% (v/v) BEBM®-Medium, 0,5 ng/ml EGF, 500 ng/ml Hydrocortison,
0,005 mg/ml Insulin, 0,035 mg/ml Rinderhypophyse-Extrakt, 500 nM Ethanolamin,
500 nM Phosphoethanolamin, 0,01 mg/ml Transferrin, 6,5 ng/ml Triiodothyronin,
500 ng/ml Epinephrin, 0,1 ng/ml Retinolsäure

Zugabe der Supplemente durch Verwendung von BEBM® Single Quots (Clonetics)
möglich.

LB-Ampicilin/Chloramphenicol Agar-Platten

10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Bactoagar, 10 g/l NaCl, 50 µg/l Ampicilin
bzw. 25 µg/l Chloramphenicol

TB-Medium

Lösung I: 12 g/l Bactotrypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, ad 900 ml Aqua dest.

Lösung II: 23,1 g/l KH_2PO_4 , 125,4 ng/l K_2HPO_4 , ad 100 ml Aqua bidest., pH 7,2

Beide Lösungen wurden getrennt autoklaviert. Anschließend wurden 100 ml der Lösung II mit 900 ml der Lösung I vermischt und kühl gelagert.

2.1.3.6 Verwendete käufliche Systeme (Kits)**Tabelle 2.6. Übersicht der verwendeten käuflichen Systeme.**

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
BioPrime DNA Labeling System	DNA Labeling	Invitrogen, Karlsruhe
BigDye® Terminator v. 1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems, Darmstadt
EZ DNA Methylation-Gold Kit™	Natriumbisulfit-Behandlung von genomischer DNA	Zymo Research
Large Construct Kit	BAC Isolation	Qiagen, Hilden
LightCycler FastStart DNA Master ^{Plus}	RTQ-PCR	Roche, Diagnostica
SYBR Green I		
RealQ-PCR Master Mixes	RTQ-PCR	Ampliqon, Dänemark
RNeasy® Micro Kit	RNA Isolation	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	RNA Isolation	Qiagen, Hilden
SuperScript First-Strand Synthesis	cDNA Konvertierung	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning Kit	Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe
Two-Cycle-Target Labeling Kit	Expressionsanalysen	Affymetrix, Santa Clara, USA
EpiTect Bisulphite Kit	Natriumbisulfit-Behandlung von genomischer DNA	Qiagen, Hilden
QIAmp® DNA Micro Kit	DNA Isolation	Qiagen, Hilden
QIAmp® DNA Mini Kit	DNA Isolation	Qiagen, Hilden
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Plasmid-Isolation	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Homogenisierung von Zell-Lysaten	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	DNA Isolation	Qiagen, Hilden
Whole Blood Erythrocyte Lysing Kit	Erythrozyten-Lyse	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.3.7 BAC-Klone und FISH-Sonden

Die rekombinanten *E. coli*-Stämme mit den verwendeten BAC-Klonen wurden vom *German Resource Center for Genome Research* (RZPD, Berlin) bezogen. Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte in TB-Medium mit dem Selektionsantibiotikum Chloramphenicol (25 µl/ml). Die BAC-Sonden wurden unter Verwendung des Large Construct Kits von Qiagen isoliert und mit Spektrum Orange-markierten dUTPs markiert. Die Fluoreszenz-markierten Zentromer-Sonden stammten von der Firma Vysis (Downer Grove, USA).

Tabelle 2.7. BAC-Klone und Zentromer-Sonden.

Klon / Sonde*	Bindungsstelle	Markierung
RP11-570L13	4q21.23	Spektrum Orange
RP11-266I24	17q21.31	Spektrum Orange
Cen 11	11p11.11-q11.11	Spektrum Aqua
Cen 12	12p11.1-q11	Spektrum Green
Cen 15	15p11.2	Spektrum Aqua
Cen 17	17p11.1-q11.1	Spektrum Aqua

* Cen: Zentromersonde

2.1.4 Geräte

Affymetrix Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
Affymetrix Gene Chip Scanner 7G	Affymetrix, Santa Clara, USA
Analysenwaage, Satorius BP6100	MS Laborgeräte, Heidelberg
Analysenwaage, Satorius CP2245	MS Laborgeräte, Heidelberg
Agilent Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Brutschrank, Hera150	Heraeus Kendro, Langselbold
Durchlichtmikroskop	Wilovet S Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzkanal und Kamera	Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geldokumentations-System, GeneGenius 2	Syngene, Cambridge, UK
Gelkammer, ComPor L Mini	Bioplastics RV, Landgraaf, Niederlande
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg
Hybridisierungsstation GeneTAC	Genomic Solutions, Ann Arbor, USA
Hybridisierungsstation Hybarray12 hybstation	Perkin Elmer, Waltham, USA
Kühlzentrifuge, 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Microarray Scanner G250B	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Mikrotom	Promicro, München
Nanodrop ND-1000 Spectrometer	PeqLab, Erlangen
P.A.L.M. Laser Microbeam System	P.A.L.M, Bernried
pH-Meter	inoLab WTW, Heidelberg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rollmischer, Stuart SRT1	Bibby Sterilin, Staffordshire, UK
Scanner, Epson 1680	LaserSoft Imaging AG, Kiel
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Thermocycler	Flexigene Techne, Staffordshire, UK
Tischzentrifuge, Heraeus B12	Kendro, Langselbold
Tissue Micro Arrayer for paraffin and frozen TMA	TSS (Technischer Service & Support)
Wasserbad, GFL-1003	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge, Heraeus 3S-R	Kendro, Langselbold
Zentrifuge, Rotofix 32	Hettich, Villingen-Schwenningen
Zytozentrifuge	Hettich, Villingen-Schwenningen

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung und Nachweis von disseminierten Tumorzellen in Knochenmarkaspiraten

2.2.1.1 Isolierung disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark

Die Trennung von mononuklearen Blutzellen und epithelialen Zellen von Erythrozyten und Granulozyten wurde mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nach Braun et al. durchgeführt (53, 55) (s. Abbildung 2.1). Das durch Punktion aus dem oberen Beckenkamm bzw. den Rippen entnommene Knochenmark wurde in Heparin enthaltenen Monovetten aspiriert. Die mononuklearen Zellen wurden durch eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Dichte 1,077 g/mol) bei 800 x g für 30 min bei RT separiert. Die Interphase mit den mononuklearen Zellen wurde abgenommen und mit 50 ml PBS für 10 min bei 1.400 rpm gewaschen. Abhängig von dem Erythrozytenanteil wurde ggf. eine zusätzliche Erythrozyten-Lyse nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Whole Blood Erythrocyte Lysing Kit, R&D Systems, Minneapolis). Von den mononuklearen Zellen wurden jeweils $7 \cdot 10^5$ Zellen für 3 min bei 1.000 rpm auf einen Objektträger (Superfrost Plus, Fischer) zentrifugiert (Zytospins). Die Zytospins wurden über Nacht getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.1.2 Immunzytochemische Färbung zum Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark

Das Vorhandensein von DTZ im KM wurde anhand der Auswertung von drei mit A45-B/B3 und drei mit MOPC21 gefärbten Zytospins mit je $7 \cdot 10^5$ Zellen bestimmt. Patienten, die mindestens eine Zytokeratin-positive Zelle in ihrem KM-Aspirat aufwiesen, wurden als KM-positiv deklariert.

DTZ in der mononuklearen Fraktion der Knochenmarkaspirate wurden mit Hilfe einer immunzytochemischen Untersuchung nach der APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) nachgewiesen (s. Abbildung 2.1) (198). Als monoklonaler Primärantikörper wurde A45-B/B3 (IgG1, Micromet, München, Germany) eingesetzt, der sich spezifisch gegen ein gemeinsames Epitop verschiedener Zytokeratinkomponenten (u.a. Zytokeratin 8, 18 und 19 sowie Zytokeratin 8/19 Heterodimere) richtet (53, 199). Zytokeratine stellen als intrazelluläre Polypeptide einen essentiellen Bestandteil des Zytoskeletts aller epithelialen Zellen dar, werden jedoch nicht in mesenchymalen Zellen exprimiert. Daher sind sie als spezifische Marker für die Detektion von epithelialen Tumorzellen im mesenchymalen KM geeignet. Zur Kontrolle jeder immunzytochemischen Färbung wurden als Positivkontrolle Zytospins mit Zellen der Zytokeratin-positiven Mammakarzinomzelllinie MCF7 verwendet. Als Isotyp-Kontrolle diente der MOPC21 Antikörper (Sigma).

Die mononuklearen Zellen auf den Zytospins wurden 5 min in Aceton fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 10% AB-Serum in PBS für 20 min bei RT

blockiert. Anschließend wurden die Zellen 45 min mit dem monoklonalen Primärantikörper A45-B/B3 (2 µg/ml, Micromet) inkubiert. Nach Waschen in PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Kaninchen-Anti-Maus Brückenantikörper Z 0259 (125 µg/ml, Dako). Die in PBS gewaschenen Zytospins wurden nun für 30 min mit einem APAAP-Konjugat (1 µg/ml, Dako) inkubiert, dem eine 20-minütige Färbung mit der Substratlösung folgte. Das APAAP-Konjugat baut sich aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem gegen den Sekundärantikörper gerichteten Maus-Antikörper auf. Der Sekundärantikörper kann dadurch den Primärantikörper mit dem APAAP-Konjugat verbinden. Die alkalische Phosphatase hydrolysiert Naphtolphosphatester (Substrat) zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole reagieren mit Diazoniumsalzen (hier Neufuchsin) und bilden unlösliche Azofarbstoffe. Endogene alkalische Phosphatasen des Knochengewebes und einiger Leukozyten wurden durch den Zusatz von Levamisol gehemmt. Nach dem Waschen der Zytospins in PBS folgte eine Hämatoxylin-Gegenfärbung in Mayer's Hämalaun Lösung (1:5) und das Eindeckeln der Objektträger mit Glyzergel Mounting Medium. Das automatische Scannen und die Auswertung erfolgte mit dem *Automated Cellular Imaging System* (ACIS; Clariant, Kalifornien, USA) (200).

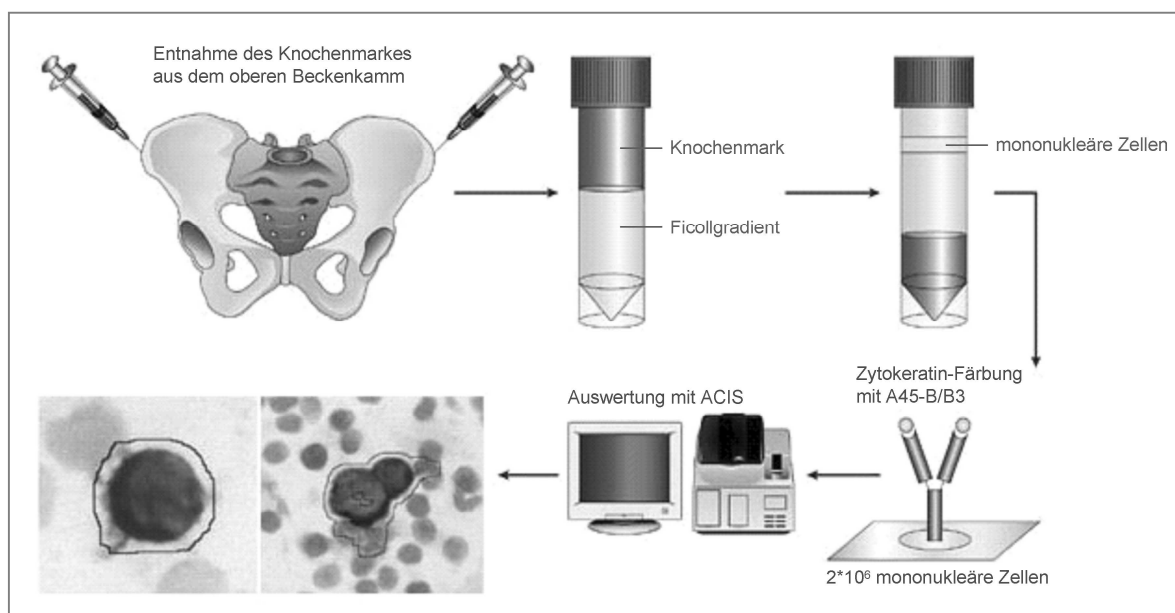


Abbildung 2.1. Aufreinigung und Auswertung der KM-Aspirate unter Verwendung eines Ficoll-Dichtegradienten (modifiziert nach Pantel et al. (33)).

Substratlösung (frisch angesetzt)

- | | |
|----------|--|
| Lösung 1 | 78,8 ml Aqua dest., 4,2 ml 1 M Tris (pH 9,5), 200 µl 0,625 M Levamisol |
| Lösung 2 | 415 µl 0,56 M NaNO ₂ , 166 µl 5% Neufuchsin |
| Lösung 3 | 42 mg Napthol-AS-Bi-Phosphat, 500 µl Dimethylformamid |

Lösung 2 wird mit Lösung 1 vermischt, Lösung 3 wird hinzugeben und filtriert.

2.2.2 Färbungen von Tumorgewebeschnitten

2.2.2.1 Hämaltoxylin-Eosin Färbung

Bei der Hämaltoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung) handelt es sich um eine kombinierte Kern- und Plasmafärbung. Die Hämaltoxylinfärbung führt in erster Linie zu einer kontrastreichen Darstellung der Zellkerne in einem blauen Farbton, während Eosin das Plasma der Zellen rötlich färbt.

Paraffingewebeschnitte (6-8 µm dick) wurden zunächst 2x 10 min in Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Ethanolreihe hydriert, um anschließend 5 min in Mayer's Hämalun-Lösung gefärbt zu werden. Gefriergewebeschnitte (8 µm dick) wurden 5 min in Aceton fixiert und dann 1 min in Hämaltoxylin gefärbt. Es folgte bei beiden Protokollen nach kurzem Spülen in 3%iger Salzsäure in Ethanol eine Wässerung von 7 min in fließendem Leitungswasser. Die Gewebeschnitte wurden 10 sec in Eosin gefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (80%, 96% und 100% Ethanol) je 1 min dehydriert. Nach der Inkubation für 2x 10 min in Xylol wurden die Gewebeschnitte mit Entellan eingedeckelt.

2.2.2.2 Toluidinblau/ Methyleneblau-Färbung

Für die Isolation von genomischer DNA aus Tumorzellen wurden die Schnitte mit Toluidinblau/Methyleneblau gefärbt und luftgetrocknet. Diese Färbung bietet einen sehr guten Kontrast und konnte daher auch für die Mikrodisektion verwendet werden. Die Tumorzellen wurden dunkelblau und das Stroma rosa gefärbt.

Die Gefriergewebeschnitte wurden in 75%igem Ethanol bei -20°C für 2 min auf den Objektträgern fixiert. Nach kurzer Inkubation in Aqua dest. folgte die Färbung in einer filtrierten Toluidinblau/Methyleneblau-Lösung (1% (w/v) Toluidinblau, 0,2% (w/v) Methyleneblau in Aqua dest.) für 30 sec. Die Gewebeschnitte wurden 1 min in Aqua dest. gewaschen und anschließend in 75% und 100%igem Ethanol dehydriert. Die Gewebeschnitte wurden direkt zur Dissektion der Tumorzellen verwendet (s. Kapitel 2.2.3).

2.2.2.3 Färbung mit Cresyl-Violet-Acetat

Cresyl-Violet-Acetat färbt die Tumorzellen dunkelviolet und das Stroma rosa an. Diese Färbung wurde bei Gewebeschnitten angewendet, aus denen anschließend Gesamt-RNA isoliert werden sollte. Die Gefriergewebeschnitte wurden zunächst in -20°C kaltem 75%igem Ethanol fixiert. Die Färbung erfolgte in einer filtrierten Cresyl-Violet-Acetat-Lösung (1% (w/v) in absolutem Ethanol) für 20 sec bei RT. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in 75% und 100%igem Ethanol dehydriert und direkt zur Dissektion der Tumorzellen verwendet (s. Kapitel 2.2.3).

2.2.3 Dissektion des Tumorgewebes

Bei Bronchialkarzinomen handelt es sich um besonders heterogene Tumore, die von Stroma, Bindegewebe und Lymphozyten durchzogen sein können. Für die folgenden Analysen wurde hochreine Tumor-DNA benötigt. Um einen Anteil von mindestens 70% an Tumorzellen zu erreichen, wurden abhängig von der Homogenität der Tumorgewebeschnitte, entweder ganze Tumorstücke verwendet oder aus dem Gesamtumor homogene Tumorareale mit manueller Dissektion oder Mikrodissektion gewonnen.

2.2.3.1 Manuelle Dissektion

Tumorareale wurden anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten bestimmt und markiert. Weitere Gewebeschnitte (10 µm dick) wurden auf sterile positiv geladene Objektträger (Superfrost Plus) gebracht, kurz getrocknet und entsprechend gefärbt (s. Kapitel 2.2.2). Unter einem inversen Lichtmikroskop (Hund Wetzlar) wurden die Tumorzellen mit einer sterilen 27 G Injektionsnadel (Braun, Melsungen) manuell dissektiert und in den jeweiligen Puffer für die DNA- bzw. für die RNA-Isolierung überführt (s. Kapitel 2.2.4).

2.2.3.2 Mikrodissektion mittels *lasure pressure catapulting*

Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion können Zellen und Zellbestandteile gezielt aus komplexen Gewebeproben isoliert werden, um anschließend damit RNA-, DNA- und Proteinanalysen durchzuführen. Die Laser gestützte Mikrodissektion wurde nach der Methode des *lasure pressure catapultings* (LPC) durchgeführt und fand unter Verwendung des P.A.L.M. *Laser Microbeam Systems* (*Photo Activated Localization Microscopy*; P.A.L.M, Bernried) statt.

Die 7 µm dicken Gewebeschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, die mit einer Polyethylen-Naphtalat-Membran beschichtet waren (P.A.L.M.). Diese beschichteten Objektträger erhöhen nicht nur die Absorption im UV-A-Bereich, sondern bilden zusätzlich ein stabilisierendes Rückgrat beim späteren Katapultieren der mikrodissektierten Gewebestücke in das Auffanggefäß. Die Objektträger wurden vor Verwendung für 30 min mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, um ihre hydrophobe Natur herabzusetzen. Neben einer besseren Haftung der Tumorgewebeschnitte wurde so zusätzlich für Sterilität und Zerstörung von potentiell kontaminierenden Nukleinsäuren gesorgt. Die Gewebeschnitte wurden entsprechend der Toluidinblau/Methylenblau-Färbung gefärbt (s. Kapitel 2.2.2) und bei RT getrocknet.

Das Computergesteuerte System des *Laser Microbeam Systems* besteht aus einem Mikroskop mit UV-Laser, das an einem Computer und an eine digitale Videokamera angeschlossen ist (s.

Abbildung 2.2). Mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware wurde der herauszuschneidende Bereich am Computer markiert (A), die zu isolierende Probe mit einem Laserstrahl (337 nm Nitrogenlaser) vom Nachbargewebe abgetrennt (B) und dann vom Laser durch einen ultrakurzen Puls vom Objektträger in den Deckel eines *Adhesive Cap* (P.A.L.M.) katapultiert (C). Die Einstellungen der Geschwindigkeit, Energie und des Fokus des Lasers erfolgten manuell und richteten sich nach dem jeweiligen Gewebetyp, der Färbung und Dicke des Gewebes. Um die Gewebestücke aus dem Deckel herauszulösen, wurde der jeweilige Lyse-Puffer hinzu gegeben, 15 min bei RT auf dem Kopf stehend inkubiert und anschließend bei höchster Geschwindigkeit für 30 min zentrifugiert. Mikroskopisch wurde überprüft, ob alle Gewebestücke aus dem Deckel entfernt wurden. Das nun morphologisch exakt definierte Probenmaterial konnte zur weiteren Isolierung von Nukleinsäuren verwendet werden (s. Kapitel 2.2.4).

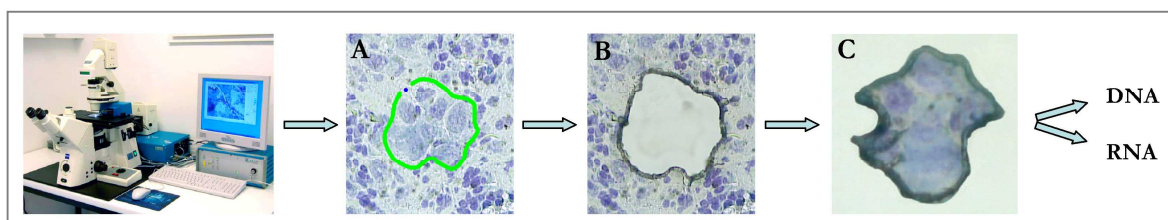


Abbildung 2.2. Mikrodisektion eines Tumorgewebeschnitts zur Isolierung einzelner Tumorzellen aus dem Zellverband unter Verwendung des P.A.L.M. *Laser Microbeam System*.

2.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

Die DNA-Isolierung wurde unter Verwendung des QIAmp® DNA Micro (< 1 µg) oder QIAmp® DNA Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers ohne Verwendung von *carrier*-DNA oder Glycerol durchgeführt. Die Gewebestücke bzw. die Zellen wurden in 180 µl Lyse-Puffer und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) für 48 Stunden bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Durch die verlängerte Proteinase K-Inkubation (im Vergleich zu der vom Hersteller empfohlenen Inkubation über Nacht) wurde die Ausbeute an hochmolekularer DNA aus dem Gewebe erheblich erhöht. Die weitere DNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Elution der DNA, wurde zunächst 25 µl bzw. 60 µl DNase-freies Wasser auf die Säule gegeben, diese bei RT für 3 min inkubiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die Qualität und Quantität wurde durch Messungen am Nanodrop Spektrophotometer (PeqLab, Erlangen) und Real-Time-quantitative-PCR bestimmt. Die Ausbeute an genomischer DNA betrug im Allgemeinen 10 µg für Tumorstücke bzw. Zellen, 5 µg für manuell dissektierte und 0,5-0,7 µg für mikrodisektierte Gewebeschnitte. Bis zur weiteren Verwendung wurde die genomische DNA bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Für alle Lösungen wurde mit DEPC behandeltes Wasser verwendet und unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet.

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Micro bzw. des RNeasy® Mini Kits (Qiagen). Das Tumorgewebe bzw. die Zellen wurden in 250 µl Lyse-Puffer und 2,5 µl Mercaptoethanol homogenisiert. Zur Isolation der RNA aus Zellkulturen wurden die Zellen zunächst mit Hilfe des QIAshredders (Qiagen) aufgeschlossen. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Da für die spätere Verwendung hochreine RNA ohne Kontaminationen mit DNA benötigt wurde, wurde ein DNA-Verdau für 15 min bei RT mit 30 U DNase (Qiagen) durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde mit 14 µl bzw. 60 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Die Qualität und Quantität der erhaltenen Gesamt-RNA wurde zum einem mit dem Nanodrop Spektrophotometer und zum anderen mit dem Bioanalyzer bestimmt. 750 ng Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde zur Qualitätskontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Gesamt-RNA bei -80°C gelagert.

2.2.5 Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.5.1 Nanodrop Spektrophotometer

Die Bestimmung der Konzentration wurde mit dem Nanodrop ND-1000-Spektrophotometer (PeqLab) durchgeführt. Für jede Messung wurde 1 µl der DNA- bzw. RNA-Lösung eingesetzt. Bei einer reinen DNA-Lösung sollte der Absorptionsquotient A_{260nm}/A_{280nm} einen Wert von 1,8 und für eine reine RNA-Lösung einen von 2,0 aufweisen. In dem Wellenlängenbereich von 220 nm bis 350 nm konnten zusätzlich die Absorptionsmessung beeinflussende Substanzen wie Alkohole und Verunreinigungen durch Proteine detektiert werden.

2.2.5.2 Bioanalyzer

Die Quantität und Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Agilent2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca) überprüft. Zum Nachweis von RNA-Konzentrationen im Bereich von 200 pg bis 5 ng wurde der RNA 6000 Pico LabChip (Agilent) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip einer Kapillarelektrophorese und dem Nachweis des in die RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *PicoGreen*. Dabei wird die automatisierte, parallele Analysierung von zwölf RNA-Proben hinsichtlich ihrer Größenverteilung und Konzentration ermöglicht.

2.2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke erfolgte in horizontalen Elektrophoreseapparaturen. Je nach erwarteter Fragmentlänge wurden 0,8 – 2%ige (w/v) TBE-Agarosegele verwendet, denen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid bzw. Gel-Star zugesetzt wurde. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Vol. DNA-Probenpuffer (50 % Glycerol, 1 mM EDTA, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylencyanol) versetzt, auf die Gele aufgetragen und bei einer Spannung von 90 V aufgetrennt. Zur Abschätzung der Molekulargröße wurde ein Molekulargewichts-Marker (Roche bzw. Invitrogen) verwendet. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurde mit Hilfe eines Transilluminators (Anregungswellenlänge 234 nm) in die DNA eingelagertes Ethidiumbromid bzw. Gel-Star zur Fluoreszenz angeregt und die Gele zur Dokumentation fotografiert (Geldokumentationssystem Gene Genius 2 der Firma Syngene, Cambridge, UK).

2.2.6 Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.2.6.1 Ethanolfällung

Zur Aufreinigung und ggf. Aufkonzentrierung der DNA wurde eine Alkoholfällung durchgeführt. Die DNA wurde mit 2,5 Vol. absolutem Ethanol und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,4) versetzt, so dass sie während einer Inkubation bei -20°C ausfiel. Nach Pelletierung durch 30 min Zentrifugation bei 14.000 x g wurde die DNA durch Waschen mit 70%igem Ethanol von Salz- und wasserlöslichen Substanzen gereinigt. Die getrocknete DNA wurde in TE (pH 7,4) bzw. Nuklease-freiem Wasser gelöst.

2.2.6.2 Bandenextraktion aus Agarosegelen

Um PCR-Produkte aufzureinigen und zu isolieren, wurden diese durch Gelelektrophorese in einem 0,8-2%igem (w/v) TBE-Agarosegele mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden unter Benutzung von UV-Licht herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde entsprechend der Herstellervorschrift mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel isoliert, in TE eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.7 Erststrang cDNA-Synthese

Die Konvertierung von Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit dem SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers. Als Primer wurden Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer verwendet, welche mit den poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle hybridisieren können. Ein µg Gesamt-RNA wurde mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und

1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) in 8 µl H₂O für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend für 3 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 2 µl 10x Reaktionspuffer, 4 µl MgCl₂-Lösung (25 mM), 2 µl DTT-Lösung (0,1 M) und 1 µl RNase Inhibitor zugegeben. Nach Inkubation für 2 min bei 42°C wurden 50 U SuperScript II Reverse Transkriptase hinzugefügt. Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte bei 42°C für 50 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen (70°C, 15 min) gestoppt, und die RNA durch Zugabe von 1 µl RNase H (37°C, 20 min) abgebaut. Für Expressionsanalysen mittels PCR wurden Gebrauchslösungen mit einer Verdünnung von 1:10 in Aqua dest. angesetzt. Die cDNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.8 Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA

Die hier verwendete Methode zur Methylierungsanalyse genomischer DNA basiert auf der von Frommer entwickelten Bisulfit-Reaktion (176). Durch Behandlung der genomischen DNA mit Natriumbisulfit wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, während die Methylgruppe das methylierte Cytosin vor der Deaminierung schützt und das Cytosin erhalten bleibt (s. Abbildung 2.3). Durch die selektive Umwandlung der unmethylierten Cytosine in Uracil wird die Methylierungsinformation in eine Sequenzinformation umgeschrieben. In einer anschließenden methylierungs-spezifischen PCR (MSI-PCR) und/oder Sequenzierung verhält sich Uracil wie Thymin, wohingegen methyliertes Cytosin weiterhin als Cytosin erkannt wird.

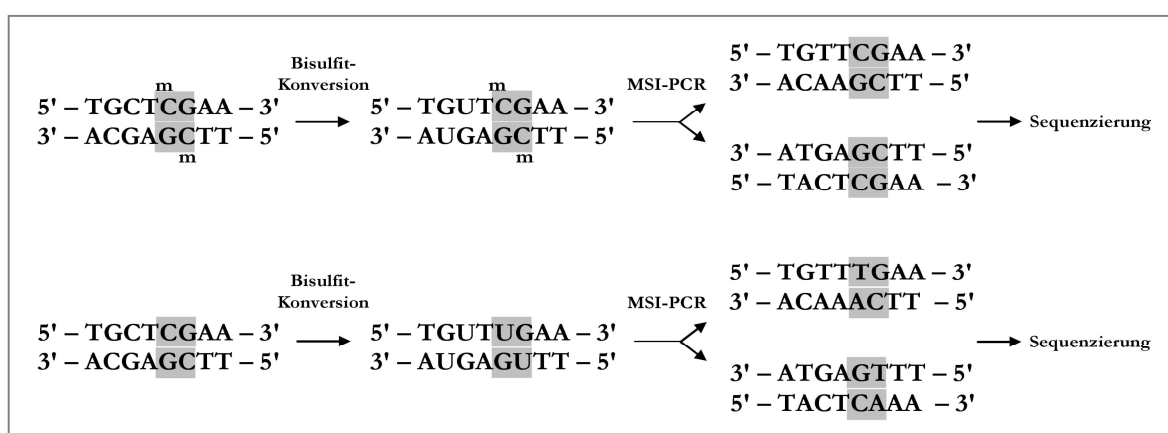


Abbildung 2.3. Schematische Darstellung der Natriumbisulfit-Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil in genomischer DNA. Konversionen lassen sich entweder durch Methylierungs-spezifische PCRs (MSI-PCR) oder durch Sequenzierung nachweisen. Durch die Sequenzunterschiede lässt die Sequenz einen Rückschluss auf das Methylierungsmuster der genomischen DNA zu. Methyl-Cytosin-Reste sind in der Sequenz durch mC dargestellt.

Die Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA erfolgte entweder unter Verwendung des EZ DNA Methylation-Gold Kits™ (Zymo Research) oder des EpiTect Bisulphite Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. 500 ng genomische DNA wurde in 20 µl Aqua bidest. resuspendiert und mit CT Conversion Reagent bzw. Bisulfite Mix versetzt. Da für eine Umwandlung des Cytosins

die DNA in Einzelstrang-DNA vorliegen muss, wurde die DNA zunächst bei 98°C denaturiert. Es folgte eine Inkubation bei 64°C bzw. 60°C. Die Natriumbisulfit-behandelte DNA wurde über Zymo-Spin IC™ Säulen (Zymo Research) aufgereinigt und in Elutionspuffer gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifizierung spezifischer Nukleinsäure-Fragmente. Zu analytischen Zwecken wurden die Amplifikationen unter Verwendung der Ampli Taq Gold DNA-Polymerase (Roche Diagnostics) durchgeführt. Sollten synthetisierte cDNA-Fragmente in Vektoren kloniert werden, wurde die Qiagen DNA Polymerase (Qiagen) verwendet. Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für eigene Primer wurden zunächst Gradienten-PCRs durchgeführt.

Standard-Ansatz:

2	µl	10x PCR-Buffer	
2	µl	MgCl ₂	(3,5 mM)
2	µl	dNTP	(8 mM, Roche Diagnostics)
0,8	µl	Primer <i>forward</i>	(100 pmol/µl)
0,8	µl	Primer <i>reverse</i>	(100 pmol/µl)
0,15	µl	DNA-Polymerase	(5 U/ µl)
1	µl	DNA	(2 µl bisulfit-behandelte DNA, 1 µl cDNA 1:20)
		add Aqua dest.	25 µl

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1x	Initiale Denaturierung	95	10:00
	Annealing	Variation A	0:30
	Extension	72	Variation B
35-40x	Denaturierung	95	0:30
	Annealing	Variation A	0:30
	Extension	72	Variation B
1x	Finale Amplifikation	72	7:00
	Kühlung	4	∞

Variation A: Annealing-Temperatur lag zwischen 52°C und 64°C und wurde abhängig vom AT-Gehalt der jeweiligen Primer variiert (s. Tabelle 2.4 und 2.5).

Variation B: Die Extensionszeit lag zwischen 0:30 min und 1:30 min und wurde je nach erwarteter Länge des PCR-Produktes variiert (s. Tabelle 2.4 und 2.5).

2.2.10 Light-Cycler™ semi-quantitative Real-Time-quantitative-PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR (RTQ-PCR) im LightCycler™ wurde entweder unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I (Roche Diagnostics) oder des RealQ-PCR Master Mixes (Ampliqon) durchgeführt. In einer RTQ-PCR wird - im Gegensatz zur konventionellen PCR - die Anzahl der entstandenen Kopien mit Hilfe von fluoreszierenden

Farbstoffen nach jedem Zyklus gemessen. Der hier verwendete Farbstoff SYBR-Green bindet an doppelsträngige DNA, so dass die Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkten zunimmt. Bevor ein Signal vor dem Hintergrundsignal detektiert werden kann, wird eine Mindestmenge von ungefähr 10^{10} - 10^{11} Kopien an DNA benötigt. Dieser Schwellenwert wird als CT-Wert (*Threshold Cycle*) bezeichnet und beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dieser Wert ist gleichzeitig ein Hinweis auf die vorliegende Konzentration der Template-DNA in der Probe (je geringer die Konzentration, desto später wird der Schwellenwert erreicht und dementsprechend höher ist der CT-Wert). Nach einem exponentiellen Anstieg des Signals nähert sich die Fluoreszenz einem Maximum an. Anschließend kann eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, anhand derer sich die Fragmentlänge(n) und die Spezifität bestimmen lässt. Indem die Temperatur kontinuierlich von 60°C auf 90°C erhöht wird, wird die DNA aufgeschmolzen, so dass einzelsträngige DNA entsteht. Der Farbstoff SYBR-Green wird freigesetzt, welches als Fluoreszenzabnahme registriert wird. Da unspezifische Primerdimere einen niedrigeren Schmelzpunkt besitzen als die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten, wird eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt ebenfalls Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments und somit über die Anfangskonzentration der cDNA.

Ansatz unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I

1	µl	Master Mix	
0,8	µl	MgCl ₂	(3 mM)
0,5	µl	Primer <i>forward</i>	(100 pmol/µl)
0,5	µl	Primer <i>reverse</i>	(100 pmol/µl)
1	µl	DNA	(Minimum 10 ng)
		add Aqua dest. 10 µl	

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Temperaturveränderungsrate [°C/s]
1x	Initiale Denaturierung	95	10:00	20
45x	Denaturierung	95	0:05	20
	Annealing	Variation A	0:08	20
	Extension	72	0:10	20
1x	Schmelzung	95	0:10	20
		60	0:10	20
		98	0:10	
1x	Kühlung	40	0:30	20
		RT	∞	

Variation A: Annealing-Temperatur lag zwischen 52°C und 64°C und wurde abhängig vom AT-Gehalt der jeweiligen Primer variiert (s. Tabelle 2.4 und 2.5).

Ansatz unter Verwendung des RealQ-PCR Master Mixes

10 µl	Master Mix	(3 –7 mM)
0,8 µl	Primer <i>forward</i>	(100 pmol/µl)
0,8 µl	Primer <i>reverse</i>	(100 pmol/µl)
0,4 µl	Glass blocking agent	
2 µl	DNA	(Minimum 10 ng)
	add Aqua dest. 20 µl	

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Temperaturveränderungsrate [°C/s]
1x	Initiale Denaturierung	50	2:00	20
	Denaturierung	95	15:00	20
40x	Denaturierung	95	0:07	20
	Annealing	Variation A	0:10	20
	Extension	72	0:15	20
1x	Kühlung	RT	∞	

Variation A: Annealing-Temperatur lag zwischen 52°C und 64°C und wurde abhängig vom AT-Gehalt der jeweiligen Primer variiert (s. Tabelle 2.4 und 2.5).

2.2.11 Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten**2.2.11.1 Ligation und Transformation**

Die hier durchgeführten Klonierungen wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) nach Anleitungen des Herstellers durchgeführt. 4 µl des PCR-Produktes wurde mit 1 µl Salzlösung und 1 µl Vektor pCR® 2.1 (Invitrogen) versetzt und bei RT 15 min inkubiert. Die Ligationsansätze wurden bei -20°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurde der *E. coli* Bakterienstamm TOP10 (Invitrogen) verwendet. Zu 25 µl transformationskompetenten Bakterien wurden 2 µl des Ligationsansatzes gegeben. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde mit den Zellen für 45 sec ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C bei 450 rpm inkubiert. 70 µl des Transformationsansatzes wurden auf LBA-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.11.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers von Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 30 µl DNase-freiem Wasser von der Säule eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.11.3 Analyse der Klonierungsprodukte mittels *EcoRI*-Verdau

Der Erfolg der Klonierung wurde durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* überprüft. Dazu wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 10 U *EcoRI* (New England BioLabs, Frankfurt am Main), 1 µl des entsprechenden Puffers und 1 µl Aqua dest. vermischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 95°C inaktiviert. Das Ergebnis des Verdau wurde mit einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (s. Kapitel 2.2.5).

2.2.11.4 DNA-Sequenzierung

Die hier durchgeführte Sequenzierung erfolgte nach der klassischen Didesoxy-Methode (201) unter Verwendung des BigDye® Terminator v. 1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystem, Darmstadt). Der vom Hersteller gelieferte BigDye Mix enthielt AmpliTaq-Polymerase, dNTPs und die vier unterschiedlich fluoreszenz-markierten Didesoxy-Analoga.

Für einen 10 µl- wurden 200 ng gereinigte DNA in maximal 6,5 µl H₂O, 2 µl BigDye Mix und 1,5 pmol Primer eingesetzt. Anschließend wurde folgende Sequenzierungsreaktion im Thermocycler durchgeführt:

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1x	Initiale Denaturierung	96	2:00
25x	Denaturierung	96	0:30
	Annealing	50	0:15
	Extension	60	1:00
1x	Kühlung	4	∞

Die Entfernung von Primern, Primerdimeren, nichtpolymerisierten dNTP's und ddNTP's erfolgte mittels Gelfiltration durch Sephadex G50 Superfine (Abgene). Hierzu wurde das Multi Screen Assay-System verwendet. Zur Vorbereitung wurden *Multi Screen* HV Platten mit Sephadex gefüllt. Nach Zugabe von H₂O musste das Sephadex zunächst 3 h bei RT vorquellen. Zur Aufreinigung wurden die Sequenzier-Proben auf die mit Wasser gewaschenen Säulen der Platte gegeben und für 5 min bei 910 x g in eine 96-well Platte zentrifugiert. Die Kapillarelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer unter Verwendung des Polymers POP7 und 36 cm langen Kapillaren (Applied Biosystems).

2.2.12 Analysen zu Veränderungen der DNA-Kopienanzahl mittels Array-CGH

Die CGH ist eine molekularzytogenetische Methode, mit der sich chromosomale Aberrationen nachweisen lassen. Tumor- und Referenz-DNA werden dabei gleichzeitig auf normale Metaphasechromosomen (klassische CGH), BAC-Klone, cDNA oder Oligonukleotiden (Array-

CGH) hybridisiert. Bei der hier verwendeten Array-CGH wurden Glasobjektträger (CodeLink™ Slides, Amersham Biosciences) mit gespotteten 60er Oligonukleotiden für 28.830 verschiedene Gene verwendet (163). Jedes Oligonukleotid konnte anschließend einem bestimmten Gen bzw. einer bestimmten Chromosomenlokalisierung zugeordnet werden. Array-CGHs wurden für 30 primäre AC der Lunge durchgeführt (s. Tabelle 2.1).

2.2.12.1 Markierung der genomischen DNA mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Die Markierung der DNA wurde gemäß dem Protokoll von van den Ijssel et al. unter Verwendung des BioPrime DNA Labeling Systems (Invitrogen, Germany) durchgeführt (163). Als Referenz diente ein Gemisch aus Leukozyten-DNA von 10 gesunden männlichen bzw. von 10 gesunden weiblichen Probanden.

Von jedem Patienten wurden 300 ng Tumor-DNA mit 2,5x Random Primer (Invitrogen, Germany) und Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 42 µl vermischt und bei 100°C für 10 min denaturiert. Parallel wurden 300 ng Referenz-DNA des gegensätzlichen Geschlechts ebenfalls mit Random Primer und Aqua bidest. vermischt und denaturiert. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden den Ansätzen jeweils 5 µl dNTP-Mix, 2 µl 1 mM Cy3-dCTP (Tumor-DNA, Perkin Elmer) bzw. Cy5-dCTP (Referenz-DNA, Perkin Elmer) und 40 U Klenow DNA-Polymerase (Invitrogen) hinzugefügt. Die Ansätze wurden bei 37°C für 16 h inkubiert. Nichtgebundenes Cy3-, bzw. Cy5-dCTP wurde mit Hilfe von Quant G-40 Micro Columns (Amersham) nach Anweisungen des Herstellers entfernt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben entweder im Dunkeln bei RT oder bei -20°C gelagert.

dNTP-Mix

4 µl dATP (100 mM), 4 µl dGTP (100 mM), 4 µl dTTP (100 mM), 1 µl dCTP (100 mM), 2 µl 1 M Tris (pH7,6), 0,4 µl 0,5 M EDTA (pH 8), 184,6 µl Aqua dest.

2.2.12.2 Hybridisierung der Array-CGH

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden zunächst Codelink™ Slides 15 min in Blockierungslösung (0,1 M Tris, 50 mM Ethanolamin, pH 9,0) bei 50°C inkubiert. Nach Waschen mit 4x SSC/0,1% SDS bei 50°C für 30 min wurden die Objektträger zum Trocknen 3 min bei 1.000 rpm zentrifugiert.

50 µl der Cy3-markierten Tumor-DNA und 50 µl der Cy5-markierten Referenz-DNA wurden mit 10 µg humaner Cot-1 DNA vermischt. Diese aus der Plazenta stammende Cot-1 DNA besitzt eine Fragmentgröße von 50-300 Bp und dient der Absättigung hochrepetitiver DNA-Sequenzen im Bereich des Heterochromatins (202). Die DNA wurde nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M

Natrium-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. gekühltem absolutem Ethanol durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 30 min pelletiert. Nach Trocknung des DNA-Pellets bei RT wurde die DNA in 26 µl 20% SDS, 13 µl Hefe tRNA (100 µg/µl) sowie 91 µl Mastermix (14,3% (w/v) Dextransulfat, 50% (v/v) Formamid, 2,9x SSC, pH 7.0) resuspendiert. Die Hybridisierungslösung wurde bei 73°C für 10 min denaturiert, 60 min zur Blockierung der repetitiven Sequenzen durch die Cot-1 DNA bei 37°C inkubiert und auf die Array-CGHs pipettiert. Die Kohybridisierung der Tumor- und Referenz-DNA erfolgte über Nacht. Die Hybridisierungs- und Waschschrte wurden unter Verwendung einer GeneTAC/Hybararray12 Hybstation (Genomic Solutions/Perkin Elmer) durchgeführt (163). Anschließend wurden die Objektträger aus der Hybridisierungsstation herausgenommen, kurz in 0,01 SSC gewaschen, durch Zentrifugation für 3 min bei 1.000 x g getrocknet und die einzelnen Kanäle bei 532 nm (Cy3) und 633 nm (Cy5) mit dem Microarray Scanner G250B (Agilent Technologies) gescannt.

2.2.12.3 Auswertung der Array-CGH

Die Auswertung der Array-CGH wurde in Zusammenarbeit mit Salla Ruosaari (Helsinki University of Technology, Laboratory of Computer and Information Science, Espoo, Finland) durchgeführt.

Mit Hilfe des Programms BlueFuse Version 3.1 (BlueGenome, Cambridge, UK) wurden die Bilddateien der einzelnen Kanäle (Cy3 und Cy5) basierend auf einem Bayes'schen Modell in Signalintensitäten umgerechnet (163). Signale mit einer zu geringen Intensität (Schwellenwert $\leq 0,2$) wurden als nicht vertrauenswürdig deklariert und ausgeschlossen. Die aufgrund von Kratzern und Hintergrundgeräuschen unzuverlässigen und morphologisch schlecht zu messenden Signale wurden unter Verwendung eines eigenen Programms ebenfalls aus dem Datensatz entfernt (s. Abbildung 2.4) (203).

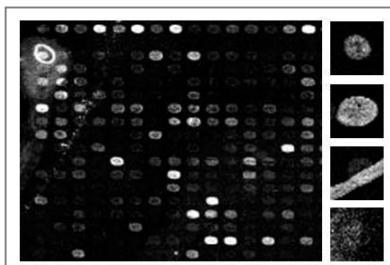


Abbildung 2.4. Ausschnitt einer gescannten Array-CGH. Beispiele für Signale, die aufgrund von variierender Größe, Kratzern oder Hintergrundgeräuschen aus den weiteren Analysen ausgeschlossen wurden (aus (203)).

Um die Qualität der Hybridisierung der Array-CGHs überprüfen zu können, wurde ein „Sex-Mismatch“ durchgeführt, d. h. als Referenz-DNA wurde DNA des gegensätzlichen Geschlechtes verwendet. Daher mussten sowohl das X- als auch das Y-Chromosom in den folgenden Analysen ausgeschlossen werden. Als Referenz-DNA wurde DNA aus Leukozyten von gesunden

männlichen bzw. weiblichen Probanden verwendet. Leukozyten besitzen durch VDJ-Rekombinationen (*variable, diversity, joining*) auf den Chromosomen 8 und 15 typische genomische Veränderungen (204). Um einen Einfluss auf die Profile der DNA-Kopienanzahl zu vermeiden, wurden folgende chromosomale Regionen aus den Analysen ausgeschlossen:

Chromosom 8	Bp 141.481-141.891
Chromosom 15	Bp 20.554-20.956
Chromosom 15	Bp 104.036-105.054

Das Fluoreszenz-Verhältnis der Tumor- zur Referenz-DNA wurde für jedes Oligonukleotid bestimmt und zur Basis 2 logarithmiert (Log2Ratio). In der Tumor-DNA unterrepräsentierte DNA-Sequenzen führten zur stärkeren Hybridisierung der Referenz-DNA; das Fluoreszenzsignal der Referenz-DNA überwog (Cy5-Signal) und die Log2Ratio nahm einen negativen Wert an. Im umgekehrten Fall einer DNA-Überrepräsentation bindet entsprechend mehr Tumor-DNA (Cy3-Signal). Dies führte zu einer positiven Log2Ratio. Bei einem Gleichgewicht von Tumor- und Referenz-DNA nahm die Log2Ratio den Wert null an.

Befanden sich für ein Oligonukleotid mehrere Spots auf dem Array (identifizierbar anhand der Chromosomenposition), wurde aus den Fluoreszenz-Verhältnissen der Median gebildet. Die Oligonukleotide wurden entsprechend ihrer physikalischen Lokalisation sortiert. Der Datensatz wurde anschließend für jeden einzelnen Patienten normalisiert, so dass die Mittelwerte und Varianzen für die mittleren 80% der Log2Ratios der Autosome 1-22 vergleichbar wurden. Eine Gauß'sche Normalverteilung mit einer Standardabweichung entsprechend von 150.000 Bp wurde angewendet, um die Daten zu filtern und Hintergrundgeräusche zu minimieren.

Zur Identifizierung von chromosomalen Regionen, die mit dem Vorhandensein von DTZ im KM bzw. mit Metastasen in den LK assoziiert waren, wurde das Programm DRF (*Differential Region Finding*) angewendet. Bei diesem Programm wurden die Daten auf Unterschieden betreffend der DNA-Kopienanzahl zwischen zwei Gruppen (KM-positive und KM-negative bzw. LK-positive und LK-negative Patienten) untersucht (205). Die Chromosomen wurden in sich überlappenden Segmenten mit einer Größe von 0,5-1,0 MBp unterteilt. Jedes Segment wurde einzeln mit einem Permutationstest unter Verwendung von 10.000 Permutationen auf Veränderungen zwischen den Gruppen analysiert. Bei diesem Test wurden die Patientengruppen immer wieder zufällig neu vermischt. Anschließend wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der die Patienten anhand ihrer Log2Ratio den jeweiligen Gruppen zugeordnet werden konnten. Chromosomale Regionen mit einem p-Wert < 0,05 wurden als potentiell mit dem KM- bzw. LK-Status assoziiert angesehen. Bereiche, die weniger als 10 MBp auseinander lagen, wurden zusammengefügt und die p-Werte neu berechnet.

Zusätzlich wurden Bruchstellen, DNA-Gewinne oder Verluste für jeden einzelnen Patienten mit dem Programm aCGH-Smooth unter Verwendung der Standardeinstellungen und $\lambda=4$ ermittelt (206). Basierend auf dem *Sex-Mismatch* wurde die Nulllinie für die aCGH-Smooth Werte gesetzt. War dies nicht möglich, wurde sie mit FISH-Analysen unter Verwendung verschiedener Zentromer-Sonden (Zentromer 10, 15 und 17) bestimmt. Als *High Level* Amplifikationen wurden DNA-Überrepräsentationen definiert, deren cCGH-Smooth Werte mindestens den 2fachen Wert des X-Chromosoms aufwiesen.

2.2.13 Erstellen von Expressionsprofilen von primären Bronchialkarzinomen mittels Oligo-Expressionsarrays

Expressionsprofile von 16 AC der Lunge und drei Normalgeweben wurden mit dem Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 (HG-U133 Plus 2.0, Affymetrix, Santa Clara) erstellt (s. Tabelle 2.1). Dieser Chip enthielt etwa 1.300.000 Oligonukleotide für 47.400 Transkripte bzw. für 38.500 gut charakterisierte humane Gene. 13 von den Tumorproben wurden ebenfalls mit Hilfe der Array-CGH auf genomischer Ebene analysiert.

Zur Erhöhung der Robustheit der Hybridisierung befinden sich auf dem Affymetrix Expressionsarray zu jedem Transkript elf verschiedene 25-mer lange Oligonukleotide, die komplementär zu einer Sequenz am 3'-Ende der zugehörigen RNA sind. Zu diesen „*Perfect Match*“-Sonden gehören ebenfalls elf „*Mismatch*“-Sonden, die bis auf eine Fehlpaarung in der Mitte die gleiche Sequenz des jeweiligen Oligonukleotids besitzen. Dies soll zu keiner bzw. zu einer schwächeren Bindung führen. Durch die Bindungsstärke an den *Mismatch*-Sonden können Hintergrundgeräusche und unspezifische Interaktionen quantifiziert und mit den Signalen der *Perfect Match*-Sonden verrechnet werden (207). Die *Perfect Match*-Sonde bildet mit der jeweiligen *Mismatch*-Sonde ein Probenpaar. Auf dem Array sind zu jedem Transkript auf unterschiedlichen Positionen elf Probenpaare vorhanden, welche zusammen den Probensatz (*Probe-Set*) bilden. Zur Quantifizierung der Durchführung und Qualität der Hybridisierung sind auf dem Array verschiedene Kontrollen vorhanden. Zum einen gibt es sogenannte *Hybridization Controls* (*bioB*, *bioC*, *bioD* und *cre*), die vor der Hybridisierung in verschiedenen Konzentrationen zur Probenlösung gegeben werden. Desweiteren werden den Proben *Spike Controls* beigefügt (*dap*, *lys*, *phe*, *thr*), die als Kontrolle der cDNA-Synthese, Amplifikation und Markierung dienen. Zusätzlich befinden sich auf jedem Mikroarray Sonden für die 3'- und die 5'-Region von verschiedenen *Housekeeping Controls* (*GAPDH*, β -*Aktin*). Aus dem Fluoreszenzverhältnis der 3'- und 5'-Region kann auf die RNA-Qualität geschlossen werden.

2.2.13.1 cRNA-Herstellung

Die Durchführung der Expressionsarrays fand in Zusammenarbeit mit Kristin Reeck am Institut für Klinische Chemie im Labor von Dr. Thomas Streichert am UKE gemäß des *Eukaryotic Sample and Array Processing Manuals* des Herstellers (Affymetrix) statt. Aufgrund der geringen Menge an Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des Two-Cycle-Target Labeling Kits das Two Cycle Protocol verwendet.

Ausgehend von 50 ng Gesamt-RNA pro Ansatz wurde unter Verwendung von T7-Oligo(dT)-Primern und SuperScript II Reverse Transkriptase bei 42°C für 60 min die Erststrang cDNA-Synthese durchgeführt. Die folgende Zweitstrang-Synthese fand unter Zugabe von *E. coli* DNA-Polymerase I, dNTPs (10 mM) und RNase H statt. Während einer zweistündigen Inkubation bei 16°C erfolgten die Synthese des zweiten komplementären cDNA-Stranges und der Verdau der Gesamt-RNA. Die cDNA diente als Template bei der folgenden *in vitro*-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase. Diese Transkriptionsreaktion lieferte in 16 h bei 37°C eine 100-500fache lineare Amplifikation der Ausgangs-RNA. Die cRNA wurde mit Hilfe des GeneChip Sample Cleanup Module nach Herstellerangaben gereinigt und die Konzentration photometrisch ermittelt. In einer weiteren Amplifikationsrunde dienten 600 ng cRNA als Template zur Herstellung einer weiteren Erststrang cDNA unter Verwendung von Random Primern, SuperScript II Reverse Transkriptase, dNTPs und RNase Inhibitor. Nach Verdau der cRNA durch RNase H wurde für die Zweitstrang-Synthese der cDNA T7-Oligo(dT)Primer, dNTPs und *E. coli* DNA Polymerase I hinzugegeben und bei 16°C für 2 h inkubiert. Durch die Zugabe von T4-Polymerase (10 min bei 16°C) wurden eventuell vorhandene einzelsträngige Enden der cDNA aufgefüllt. Die synthetisierte cDNA wurde aufgereinigt und in einer folgenden *in vitro*-Transkription durch die T7-RNA-Polymerase und Biotin-markierten dUTPs zu cRNA umgeschrieben. Die Biotin-markierte cRNA wurde aufgereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt. In einer anschließenden Reaktion wurden 15 µg cRNA durch eine Metall-katalysierten Hydrolyse bei 94°C für 35 min in Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 35-200 Nukleotiden fragmentiert. Die Qualität und durchschnittliche Transkriptgröße wurde durch die Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.13.2 Hybridisierung und Erfassung der Rohdaten

Fünf µg Biotin-markierte cRNA wurden mit Kontroll-B2-Oligonukleotiden, eukaryotische Hybridisierungskontrollen, Heringssperma, BSA und Hybridisierungspuffer auf die Arrays gebracht. Die Hybridisierung der Expressionsarrays erfolgte in einem Affymetrix *Hybridization Oven* 640 (Affymetrix) für 16 Stunden bei 45°C (60 U/min). Die Waschschritte und die Färbung mit Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin wurden mit Hilfe der Affymetrix *GeneChip Fluidics Station* 450 durchgeführt. Anschließend wurde die Fluoreszenz des Phycoerythrin bei 488 nm unter Verwendung des Affymetrix *GeneChip Scanner* 7G gemessen und visualisiert.

2.2.13.3 Auswertung der Expressionsarrays

Die Auswertungen der Expressionsarrays wurden in Zusammenarbeit mit Salla Ruosaari (Helsinki University of Technology, Laboratory of Computer and Information Science, Espoo, Finland) durchgeführt.

Zunächst wurden mit Hilfe der Software Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS 5) die Expressionsdaten aus der Aufnahme-datei extrahiert und auf 100 skaliert. Zur Kontrolle der ordnungsgemäßen Durchführung befanden sich auf dem Mikroarray Sonden für *Hybridization* und *Spiking Controls*. Zusätzliche Sonden für die 3'- und 5'-Region der *Housekeeping* Gene *GADPH* und β -*Actin* zeigten eine gute Vergleichbarkeit der Arrays.

Für jeden einzelnen Mikroarray wurden die Signale der *Probe-Sets* in *absent* (fehlend), *marginal* (grenzwertig) oder *present* (vorhanden) eingeteilt und jeweils der prozentuale Anteil bestimmt. *Probe-Sets*, die in allen Patienten *absent* vorlagen, wurden aus dem Datensatz entfernt. Es wurden nur Signale ausgewertet, die bei mindestens 33% der Patienten in der jeweiligen Gruppe (KM-negativ/-positiv bzw. LK-negativ/-positiv) als *present* eingestuft wurden. Die Sequenzen der *Probe-Sets* unterscheiden sich durch ihren GC-Gehalt in ihrer Bindungsfähigkeit und somit in ihrer absoluten Intensität. Um die Signalintensitäten miteinander vergleichen zu können, wurde eine GC-Normalisierung mit der *GC Robust Multi-Array Average* Methode durchgeführt (208). Aus den einzelnen Expressionswerten der Normalgewebe wurde der Median gebildet und als Referenz verwendet. Das Verhältnis der Expression für jedes Transkript des Tumors und der Referenz wurde berechnet und zur Basis 2 logarithmiert (Log2Ratio). Informationen zu den *Probe-Sets* wie Genname und physikalische Position wurden aus der Affymetrix NetAffs erhalten. *Probe-Sets* ohne oder mit mehrdeutigen Informationen über ihre physikalische Lokalisation wurden aus den Analysen ausgeschlossen.

Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt, entweder KM-positiv *versus* KM-negativ oder LK-positiv *versus* LK-negativ. Um chromosomale Regionen zu finden, die differenziell exprimierte *Probe-Sets* aufwiesen, wurden die Expressionsdaten in gleicher Weise mit dem DRF-Programm ausgewertet wie die Array-CGH (s. Kapitel 2.2.12). Um chromosomale Regionen zu ermitteln, in denen Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl zu einer differenziellen Genexpression zwischen den Gruppen führten, wurden die Ergebnisse der Array-CGH und der Expressionsanalyse miteinander kombiniert. Nur chromosomale Regionen, die in beiden Analysen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufwiesen, wurden in die weiteren Auswertungen mit einbezogen. Die Grenzen dieser Regionen wurden auf Basis der Array-CGH festgelegt.

Zusätzlich wurden, um einzelne differenziell exprimierte *Probe-Sets* ohne Berücksichtigung ihrer Chromosomenposition zu finden, *Receiver Operating Characteristic* (ROC) Kurven berechnet (146, 209). Die berechnete Fläche unter der Kurve entsprach der Wahrscheinlichkeit, Patienten anhand

ihrer Expressionswerte in die richtige Gruppe einordnen zu können (z. B. KM-positiv oder KM-negativ). Von dieser Wahrscheinlichkeit lässt sich auf die Signifikanz schließen. Weiterhin wurden - entsprechend der ROC-Analysen - empirische p-Werte mit Hilfe eines Permutationstestes unter Verwendung von 10.000 Permutationen berechnet. *Probe-Sets* mit einem Signifikanzniveau kleiner 0,05 und einem ROC-Wert $<0,2$ oder $>0,8$ wurden als statistisch signifikant angesehen und als differenziell exprimiert in beiden Gruppen eingestuft.

Um zu überprüfen, ob eine spezifische Region durchschnittlich mehr differenziell exprimierte *Probe-Sets* aufwies als die übrigen, wurde die Anzahl der *Probe-Sets* mit p-Werten kleiner als 0,05 bestimmt. 10.000 chromosomale Bereiche mit einer identischen Anzahl an *Probe-Sets* wie in der zu untersuchenden Region wurden ausgewählt und differenziell exprimierte *Probe-Sets* gezählt. Anhand des Anteils an chromosomalen Regionen, die mindestens so viele differenziell exprimierte *Probe-Sets* aufwiesen wie die zu untersuchende Region, wurde der endgültige p-Wert bestimmt.

Das Programm Cluster 3.0 wurde verwendet, um basierend auf den ROC-Analysen differenziell exprimierte Gene und die dazugehörigen *Probe-Sets* zu clustern (210). *Probe-Sets*, deren Sequenzen homolog zu nicht charakterisierten Genen waren, wurden ausgeschlossen. Befanden sich auf dem Array mehrere *Probe-Sets* für ein Gen, so wurde der Mittelwert der Expressionswerte (Log2Ratio) für jedes Gene bestimmt und verwendet. In der hierarchischen *Cluster*-Analyse wurde die euklidische Distanzmatrix und die *Complete Linkage*-Methode gewählt (210). Die Ausgabedatei wurde mit Java Treeview graphisch dargestellt (211). Zunächst wurde eine *Cluster*-Analyse unter Verwendung aller differenziell exprimierten *Probe-Sets* durchgeführt. Die 104 differenziell exprimierten Gene, die in den fünf chromosomalen Regionen lagen, wurden ebenfalls geclustert. Eine Einordnung in funktionelle Kategorien dieser Gene wurde unter Verwendung des *functional annotation charts* für biologischen Prozesse der Datenbank DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) durchgeführt (212).

2.2.14 Herstellung eines *Tissue Microarrays*

Die Herstellung des *Tissue Microarrays* (TMA) erfolgte nach Wikman et al., unter Verwendung eines *Tissue Micro Arrayer* (TSS) (213). Der TMA bestand aus 136 Stanzen von Bronchialgeweben, darunter jeweils zwei Stanzen von 51 Karzinomen und 17 Lymphknoten. Zusätzlich wurden 24 Kontrollstanzen eingebettet, darunter Stanzen von gesundem Bronchial- und Prostatagewebe, sowie von Mamma- und Kolonkarzinomen.

Anhand von HE-gefärbten Paraffinschnitten wurden repräsentative Tumorregionen von einer erfahrenen Pathologin (Dr. Susan Koops, Institut für Pathologie, UKE) markiert. Jeweils zwei Stanzen mit einem Durchmesser von 1,0 mm wurden aus dem markierten Bereich des jeweiligen Paraffinblocks entnommen. Die Stanzen wurden mit einem Abstand von 1,75 mm in einen neuen

Paraffinblock gebettet. Damit sich das Paraffin der Stanzen mit dem Paraffinblock verbindet, wurde dieser zunächst 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Für die weitere Verwendung wurden 2-4 µm dicke Paraffinschnitte auf positiv geladenen Glasobjektträgern (Superfrost Plus) gezogen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.15 Präparation von Metaphasechromosomen

Metaphasechromosomen wurden aus T-Lymphozyten aus Blut eines gesunden Spenders und aus allen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien gewonnen. 500 µl des in Li-Heparinröhrchen entnommenen Blutes wurde in einer T25-Kulturflasche mit 10 ml Zellkultur-Medium (RPMI-1640, 5% FCS) versetzt. Zusätzlich wurde der Kultur das pflanzliche Lektin Phytohämagglutinin zugesetzt, welches die Zellteilung von T-Lymphozyten stimuliert (214, 215). Nach einer Inkubation von 72 h bei 37°C wurde zu den Zellkulturen, die sich im exponentiellen Wachstum befinden sollten, 50 µl des Spindelgiftes Colcemid, einer chemisch modifizierte Form des Colchizins, gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dies führte zu einer Hemmung der Ausbildung des Spindelapparates, wodurch sich teilende Zellen im Stadium der Metaphase anhäuften. Sollten Metaphasechromosomen aus adhärent wachsenden Zelllinien präpariert werden, wurde den Zellkulturen über Nacht Colcemid zugesetzt. Nach dem Ernten der Zellen und Zentrifugation bei 1.000 rpm für 5 min wurden die Zellen in einer hypotonen 0,075 M Kaliumchloridlösung für 20 min bei 37°C inkubiert. Dabei kam es zu einer Ausdehnung der Zellen und somit zu einer besseren Verteilung der Metaphasechromosomen. Damit die Struktur der Metaphasechromosomen dauerhaft erhalten blieb, wurden sie nach Zentrifugation bei 1.000 rpm in vier Waschgängen mit eiskaltem Fixativ (1:4 Eisessigsäure/Methanol) fixiert. Das Pellet wurde in Fixativ resuspendiert und für mindestens 12 h bei -20°C eingefroren. Vor dem Aufbringen der Metaphasechromosomen auf Objektträger wurde die Suspension 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert und das Fixativ erneuert.

Positiv geladene Objektträger (Superfrost Plus) wurden für 2 h in absolutem Ethanol und anschließend in Aqua bidest. gewaschen. Um die Objektträger optimal verwenden zu können, wurden sie bei 4°C in Aqua dest. gekühlt. Die Metaphasechromosomen wurden auf die feuchten Objektträger getropft und durch leichtes Blasen verteilt. Die einzelnen Chromosomen sollten in voller Ausdehnung sichtbar sein und nicht übereinander liegen. Für FISH (s. Kapitel 2.2.18) wurden die Objektträger über Nacht bei RT getrocknet. Für die Giemsa-Färbung zur Chromosomentypisierung wurden die Objektträger für 30 min bei 100°C inkubiert, um anschließend direkt verwendet zu werden. Eine Aufbewahrung von einer Woche war bei 4°C möglich.

2.2.16 Giemsa-Färbung zur Chromosomentypisierung

Die Giemsa-Lösung wird zur Färbung von Metaphasechromosomen verwendet und besteht aus Methylenazur, Methylenviolett, Methylenblau und Eosin, gelöst in Methanol und Glycerin. Dunkle G-Banden – chromosomale Regionen, die überdurchschnittlich viele AT-Basenpaare enthalten – sind von helleren Zwischenräumen getrennt. Jedes Chromosom besitzt dabei ein charakteristisches G-Bandenmuster, so dass anhand einer Karyotypanalyse spezifische Chromosomenkarten erstellt werden können (216).

Die Objektträger mit den Metaphasechromosomen wurden je nach Zelllinie 40-60 sec in einer 0,015%igen Trypsinlösung inkubiert und anschließend in Leitungswasser gespült. Für 30 sec wurden die Objektträger nun in PBS geschwenkt. Es folgte die Färbung in einer gefilterten Giemsa-Lösung (1:20) für 10 min. Nachdem die Objektträger in Leitungswasser gespült und luftgetrocknet wurden, erfolgte die Begutachtung unter dem Mikroskop. Die Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Sabine Langer (Institut für Humangenetik, Klinikum rechts der Isar, München) und Penny Nymark (Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finnland) mit dem elektronischen Suchsystem Metafer Version 1.3 (Vysis) und dem Programm Ikaros zur Chromosomentypisierung (Vysis).

2.2.17 Herstellung von DNA-Sonden

Für die Studie wurden DNA-Sonden für die chromosomalen Bereiche 4q21 und 17q21 hergestellt. Die BAC-Klone RP11-570L13 und RP11-260I24 (*Bacterial Artificial Chromosome*) wurden in rekombinanten *E. coli*-Stämmen vermehrt. Die *E. coli*-Kulturen wurden in TB-Medium angezogen, die BAC-Klone isoliert und durch die Methode des *Random Primings* mit Fluoreszenz markiert (217). Die Qualität und Quantität der Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden wurden zunächst mit einer FISH-Analyse an Metaphasechromosomen und Lymphozyten eines gesunden Probanden getestet. Die Protokolle für Gefriergewebe- und Paraffinschnitte wurden anschließend für jede DNA-Sonde separat etabliert.

2.2.17.1 Isolation der BAC-Klone

Die hier durchgeführten BAC-Isolationen wurden mit dem Large Construct Kit (Qiagen) mit geringen Abweichungen gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Methode basiert auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (218), einem Verdau mit ATP-abhängiger Exonuklease und anschließender Anionenaustauschchromatographie.

Zur Anreicherung der BAC-Klone RP11-570L13 und RP11-260I24 wurden rekombinante *E. coli*-Kolonien in 500 ml TB-Medium mit dem Selektionsantibiotikum Chloramphenicol (25 µg/ml) über Nacht im Schüttler kultiviert (37°C, 300 rpm). Im Unterschied zum angegebenen Protokoll

wurde in jedem Schritt die doppelte Menge an Puffer verwendet. Nach Elution von der Säule wurde die BAC-DNA mit dem 0,6fachen Volumen Isopropanol gefällt (30 min, 1.800 x g, 4°C) und in TE-Puffer (pH 7,4) aufgenommen. Anschließend erfolgte zur Aufreinigung der isolierten BAC-DNA eine Ethanolfällung (s. Kapitel 2.2.6). Nach Messung der DNA-Konzentration mit dem Nanodrop Spektrophotometer wurde die BAC-DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Ausbeute betrug im Allgemeinen 15 - 30 µg.

2.2.17.2 Markierung der DNA-Sonden durch *Random Priming*

Zur Markierung der BAC-DNA wurde die Methode des *Random Primings* unter Verwendung des BioPrime DNA Labeling Systems (Invitrogen) gewählt (217).

Ein µg zu markierende BAC-DNA wurde 5 min bei 100°C denaturiert und mit dNTPs, Random Hexameren und dem Klenow Fragment der DNA-Polymerase I versetzt. Die Hexanukleotide statistischer Zusammensetzung hybridisierten als Primer an die DNA. Zusätzlich wurden 2,5 mM mit Spektrum Orange markierte dUTPs (Invitrogen) hinzu gegeben. Die Markierung erfolgte durch den Einbau der Fluoreszenz-markierten dUTPs unter Verwendung von 40 U des Klenow-Fragments bei der Synthese eines neuen Doppelstranges. Nach Inkubation für 2 h bei 37°C wurden nichtgebundene Nukleotide mit Hilfe von Bio-Spin 30 Tris Columns (Biorad) nach Anweisung des Herstellers entfernt. Nach einer Ethanolaufreinigung (s. Kapitel 2.2.6) wurde die DNA in TE-Puffer (pH 7,4) bzw. in Hybridisierungspuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.18 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Analyse von Geweben, Zellen oder Metaphasechromosomen mit Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) erlaubt den numerischen und strukturellen Nachweis von chromosomalen Regionen. Dazu wird das zu untersuchende Material nach entsprechender Vorbehandlung mit einer Fluoreszenz-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die Wahl der Vorbehandlung ist abhängig von der DNA-Sonde und muss für jede entsprechend etabliert werden. Für eine spezifische Färbung muss der Verlust von Nukleinsäuren aus den Zellen möglichst gering gehalten werden. Die DNA-Sonde muss in das Gewebe eindringen können und es sollte zu keinen Veränderungen in der Gewebemorphologie kommen.

Zur Verifizierung der Array-CGH Ergebnisse wurden FISH-Analysen mit den DNA-Sonden 4q21 und 17q21 an Gefriergewebeschnitten von 14 bzw. 10 Patienten durchgeführt. Die genomischen Aberrationen dieser Gewebeproben wurden zuvor mittels der Methode der Array-CGH bestimmt. Zur Validierung der Aberrationen in 4q21 und 17q21 wurden Paraffinschnitte eines TMAs mit auswertbaren Stanzen von 44 primären Bronchialkarzinomen mit entsprechender FISH

untersucht. Zusätzlich wurden FISH-Analysen zu 4q21 an weiteren 29 Gefriergewebeschnitten (22 AC, 20 SCC, 1 LCLC) und an Paraffingewebeschnitten eines TMAs mit 36 auswertbaren Gehirnmastasen durchgeführt (s. Tabelle 2.1).

2.2.18.1 FISH an Metaphasechromosomen, Gefriergewebeschnitte und Zellen

Die bei -20°C gelagerten Objektträger mit dem zu hybridisierendem Material wurden bei RT aufgetaut und in -20°C kaltem 75%igen Ethanol für 2 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte 9 min, bzw. die Zellen und Metaphasechromosomen 7-9 min, in einer 0,1 µg/ml Proteinase K-Lösung bei 37°C inkubiert. Die Objektträger wurden in PBS gewaschen, gefolgt von einer Ethanoldehydrierung (70%, 80% und 100% Ethanol) und Denaturierung bei 75°C für 5 min in Denaturierungslösung (70% Formamid, 0,6 x SSC, pH 7,4). Es folgte wiederum eine Ethanoldehydrierung.

Für die Hybridisierung mit der Spektrum Orange-markierten DNA-Sonde wurde folgender Probenansatz verwendet:

	Volumen [µl]
humane Cot-1 DNA	1
Spektrum Orange-markierte DNA-Sonde	1
Spektrum Aqua-markierte Zentromersonde	0,5
Hybridisierungspuffer	8
Gesamtvolumen	10,5

Der Probenansatz wurde für 5 min bei 75°C denaturiert und auf die luftgetrockneten Objektträger gegeben. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wurde das Gewebe bzw. die Zellen mit einem Deckgläschen bedeckt und die Ränder mit Fixogum abgedichtet. Die Objektträger wurden zur Hybridisierung 16 Stunden bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach entfernen der Deckgläschen wurden die Objektträger dreimal in 50% Formamid/2x SSC und zweimal in 2x SSC jeweils für 10 min bei 46°C gewaschen, gefolgt von einem letzten Waschschrift in 0,1x SSC für 5 min bei 46°C. Anschließend wurden die Proben mit Vectashield eingedeckelt, welches dem Schutz vor Photobleichung dient und den Kernfarbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) enthält. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Hybridisierungspuffer: 70% Formamid, 50% Dextransulfat., 4 x SSC, pH 7

2.2.18.2 FISH an Paraffingewebe

Die 2-5 µm dicken Paraffinschnitte wurden auf positiv geladene Objektträger (Superfrost Plus) gezogen und bei 37°C über Nacht im Trockenschrank inkubiert. Die Schnitte wurden zur Entparaffinierung zunächst 1 h bei 60°C erhitzt, anschließend bei RT zweimal 10 min in Xylol

inkubiert und für je 5 min in 100% und 80% Ethanol dehydriert. Es folgte die Fixierung des Gewebes bei -20°C für 10 min in 2% Formaldehyd in Methanol und Waschen in PBS bei RT. Zur Denaturierung der Gewebeschnitte wurden die Objektträger 10 min bei 90°C in Spot-Light Tissue Heat Pretreatment Puffer inkubiert und anschließend 15 min bei RT abgekühlt. Nach Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte mit Pepsin überschichtet und bei 37°C für 10 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden in PBS gewaschen und durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert.

Für die Hybridisierung mit der Spektrum Orange-markierten DNA-Sonde wurde folgender Probenansatz verwendet:

	Volumen [µl]
humane Cot-1 DNA	1
Spektrum Orange-markierte DNA-Sonde	3
Spektrum Aqua-markierte Zentromersonde	1
Hybridisierungspuffer	9
Gesamtvolumen	14

Der Probenansatz wurde auf die getrockneten Gewebeschnitte gegeben, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Nach Denaturierung bei 95°C für 3 min folgte die Hybridisierung bei 37°C für 16 h. Die Deckgläschen wurden in 2x SSC/0,3% NP-40 vom Objektträger gelöst und bei 70°C für 2 min im gleichen Puffer gewaschen. Es folgten Waschschrte für je 10 min bei RT in 2x SSC/0,3% NP-40 und PBS. Nach Dehydrierung durch eine aufsteigende Ethanolreihe wurden die Gewebeschnitte mit Vectashield eingedeckelt. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.2.18.3 Auswertung der FISH-Analysen

Die gefärbten Gewebeschnitte bzw. Zellen wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet. Zur Aufnahme von Bildern wurde ein Bilddokumentationsprogramm der Firma Applied Imaging verwendet. HE-gefärbte Gewebeschnitte dienten parallel zur Identifizierung der Tumoreale bei Gewebeschnitten. Für die Auswertung der FISH-Analysen wurden mit dem DAPI-Filter nicht überlappende Tumoreale mit morphologisch intakten Tumorzellen bestimmt. Die Hybridisierungssignale wurden für jede Sonde separat mit dem entsprechenden Filter für Spektrum Orange (eigene Sonden) und Aqua (Zentromersonde) ausgewertet (s. Abbildung 2.5). Die Signalauswertung erfolgte bei einer 630 oder 1000-fachen Vergrößerung. Im Durchschnitt wurden von jeder Probe die Fluoreszenzsignale von 61 Tumorzellen (38-150 Zellen) gezählt. Zusätzlich wurden Signale von 100 normalen Zellen außerhalb des Tumorbereiches von sechs der untersuchten Proben gezählt. Diese

Negativkontrolle diente zur Messung des experimentellen Fehlers und zur Definierung der Abgrenzung von Veränderungen in der Kopienanzahl zum Normalzustand. Das Verhältnis von Signalen der DNA-Sonde zu Signalen der Zentromer-Sonde wurde bestimmt. Ein Verhältnis von $\geq 1,5$ wurde als DNA-Gewinn und $\leq 0,75$ als DNA-Verlust definiert.

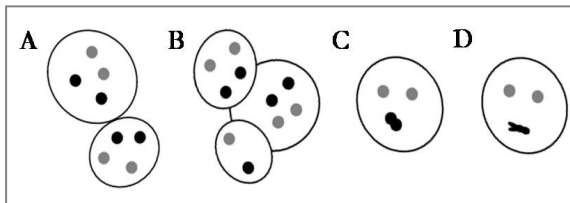


Abbildung 2.5. Beurteilung von FISH-Signalen.

(A) Je zwei Signalen pro Sonde. (B) Zellen nicht auswertbar, da Nuclei sich überlappen. (C) Zwei graue und ein schwarzes Signal. (D) Als Signale werden zwei graue und ein schwarzes diffuses Signal gewertet (nach Vysis).

2.2.19 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in sterilen Kulturflaschen der Firma Nunc (Wiesbaden) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Hera150-Brutschränken (Kendro) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂. Die Zelllinien wurden abhängig der Zellteilungsrate ein- bis zweimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierzu wurden die adhärenent wachsenden Zellen mit PBS bei 37°C gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) von der Kulturschale abgelöst. Der Vorgang wurde durch Zugabe von frischem vorgewärmtem Vollmedium gestoppt und die resuspendierten Zellen in einer Dichte von 20-30% ausgesät.

Zur längeren Lagerung von eukaryontischen Zellen wurden die Zellen in Flüssigstickstoff bei -196°C eingefroren. Um die Bildung von Eiskristallen in den Zellen zu verhindern, wurden den Zellen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam das Wasser entzogen. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (10% (v/v) DMSO, 90% (v/v) Vollmedium) resuspendiert, in Kryotubes (Nunc, Wiesbaden) überführt und auf -80°C gekühlt. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen nach dem Auftauen (37°C im Wasserbad) mit Vollmedium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen. Die im Vollmedium resuspendierten Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.20 Re-Expression von hypermethylierten Genen in bronchialen Zelllinien

2.2.20.1 Optimierung der Behandlung von Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A

Bei 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) handelt es sich um ein Cytidin-Analogon, bei dem die 5'-Carbongruppe des Pyrimidinringes durch eine Nitrogruppe ersetzt ist. Nach Einbau in die DNA anstelle von Cytosin wird die anschließende Methylierung durch die Nitrogruppe verhindert. Die

so hervorgerufene Demethylierung von CpG-Inseln kann zu einer Re-Expression von zuvor reprimierten Genen führen. Aufgrund der Toxizität von 5-Aza-CdR wurde zunächst zur Etablierung des Versuchsaufbaus der Einfluss verschiedener Konzentrationen und Behandlungszeiträume auf die Zelllinien BEAS-2B, H1395, H1993 und HTB-56 untersucht. Die Zellen wurden mit einer Anfangskonzentration von ~15% in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach vollständiger Adhäsion wurde in Parallelansätzen 5-Aza-CdR in den Konzentrationen 0,5 μ M, 1 μ M und 5 μ M zugefügt. Gleichzeitig dienten Zellkulturen ohne Zugabe von 5-Aza-CdR als Negativkontrollen. Das in sterilem Wasser gelöste 5-Aza-CdR wurde wegen seiner Instabilität für jede Behandlung frisch aufgetaut und nur einmal verwendet. Das Medium wurde alle 24 h gewechselt. Durch Kombination von 5-Aza-CdR mit Trichostatin A (TSA) – einem Inhibitor der Histon-Deacetylasen – ist es möglich, die Effektivität der Re-Expression von Genen zusätzlich zu steigern (196). Daher wurden in einem weiteren Ansatz (0,5 μ M und 1 μ M 5-Aza-CdR) die Auswirkungen einer zusätzlichen Behandlung von 300 nM TSA für die letzten 12 h untersucht. Die Zellen wurden nach drei, fünf und sieben Tagen geerntet. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen mit 1 ml RLT-Lyse-Puffer (Qiagen) mit β -Mercaptoethanol von dem Flaschenboden abgeschabt und in Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspensionen wurden für die Isolation von genomischer DNA und Gesamt-RNA in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt (s. Kapitel 2.2.4). Durch Vergleich der Kontrollen mit den behandelten Zellen wurde abhängig von der Konzentration und des Behandlungszeitraumes der Einfluss von 5-Aza-CdR auf die Demethylierung und somit auf eine mögliche Re-Expression von Genen ermittelt. Die Expression von sieben tumor-assoziierten Genen (*GSTP1*, *hSRBC*, *RAR β* , *DLC1*, *MAGE A1*, *MAGE A2* und *MAGE A12*), die häufig in Bronchialkarzinomen durch Hypermethylierung reprimiert vorliegen (129, 131, 196, 197), wurde mittels Reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR) und RTQ-PCR untersucht (s. Kapitel 2.2.10). Zusätzlich wurde das Methylierungsmuster der Gene *MAGE A1* und *MAGE A12* der Zelllinien BEAS-2B und H1993 durch Natriumsulfit-Behandlung der genomischen DNA (s. Kapitel 2.2.8) und anschließender Sequenzierung (s. Kapitel 2.2.11) analysiert.

2.2.20.2 Behandlung der Zellen für Expressionsanalysen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Anhand der Vorversuche wurde das endgültige Protokoll zur Behandlung der Zelllinien für die folgenden Mikroarray-Analysen festgelegt. Die Zellen wurden in Triplikaten mit einer Anfangskonfluenz von 10% in T75-Schalen ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Alle Zelllinien wurden mit einer 5-Aza-CdR Konzentration von 1 μ M behandelt, während die Kontrollen ohne Zusatz des Demethylierungsagens im normalen Medium kultiviert wurden. Jeden Tag wurde bei allen Kulturen das Medium gewechselt und den behandelten Zellen neues 5-Aza-CdR zugefügt. Nach Ernten der Zellen wurde jeweils Gesamt-RNA und genomische

DNA isoliert und die Quantität bzw. Qualität mit dem Nanodrop Spektrophotometer und Agarosegelen überprüft (s. Kapitel 2.2.5). Die Gesamt-RNA und DNA der Triplikate wurden jeweils zu gleichen Anteilen vermischt. Die Re-Expression der „Testgene“ aus den Vorversuchen konnte mit RT-PCR bestätigt werden und die Natriumsulfit-Behandlung und Sequenzierung der Gene *MAGE A1* und *MAGE A12* zeigten ebenfalls die gleichen Ergebnisse wie zuvor in den Vorversuchen.

2.2.20.3 Erstellen von Expressionsprofilen mittels der Arraytechnologie

In Zusammenarbeit mit Dirk Kemming (Institut für Tumorbilogie, UKE) wurden Expressionsanalysen der Zelllinien unter Verwendung des 4x44 K human Two-Color Gene Expression Mikroarrays der Firma Agilent durchgeführt und ausgewertet. Bei diesem Array befinden sich vier einzelne Mikroarrays auf einem Objektträger, so dass alle Expressionsprofile gleichzeitig erstellt werden konnten. Bedingte Abweichungen durch die praktische Durchführung konnten so vermieden werden. Die Mikroarrays enthielten 44.000 Oligonukleotide für mehr als 41.000 bekannten Genen und Transkripten. Die Durchführung der Expressionsanalysen wurde gemäß dem Protokoll Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis nach Anleitungen des Herstellers ausgeführt. Von jeder Zelllinie wurde die Gesamt-RNA der Kontrolle mit Cy5-dCTPs (grün) und die der 5-Aza-CdR behandelten Zellen mit Cy3-dCTPs (rot) markiert und gemeinsam auf einem der vier Mikroarrays kohybridisiert.

Pro Ansatz wurden ein µg Gesamt-RNA unter Zugabe der *Spike*-Kontrollen, T7 Promotor Primern, dNTPs, RNase Out und Reversen Transkriptase bei 40°C für 2 h in cDNA konvertiert. Die cDNA diente als Template in der folgenden *in vitro*-Transkription mit einer T7-RNA-Polymerase (2 h bei 40°C), wobei die cRNA der Kontrollen mit Cy5-dCTP und die der 5-Aza-CdR behandelten Zellen mit Cy3-dCTP markiert wurden. Die markierte cRNA wurde über RNeasy Mini Spin Columns (Qiagen) aufgereinigt und die Konzentration mit dem Nanodrop Spektrophotometer bestimmt. 825 ng der Cy3-markierten und der entsprechenden Cy5-markierten cRNA einer Zelllinie wurden zusammengegeben und unter Zugabe von Fragmentierungspuffer bei 60°C für 30 min fragmentiert. Der Ansatz wurde in Hybridisierungspuffer auf die Arrays gebracht und bei 65°C für 17 h hybridisiert. Nach Waschen wurden die Arrays mit dem GenePix 4000B Scanner (Agilent) mit einer Auflösung von 5 µm gescannt und die Rohdaten ausgewertet.

2.2.20.4 Auswertung der Expressionsarrays

Unter Verwendung des Software-Pakets R (Version R 2.5.1) wurden die Bilddateien in Signalintensitäten konvertiert. Zur Qualitätsüberprüfung wurde zu Beginn unter Verwendung des RNA *Spike-In* Kits (Agilent) der Gesamt-RNA Cy5- bzw. Cy3-markierte Kontrollproben zugefügt.

Deren Signalintensitäten gaben im anschließenden QC-Report von Agilent einen Hinweis auf die Qualität der experimentellen Durchführung und die Vergleichbarkeit der Arrays. Weitere Qualitätskriterien wie die Stärke von Hintergrundsignalen wurden ebenfalls im QC-Report ausgewertet, um mögliche Abweichungen zu erkennen. Da alle Qualitätskriterien erfüllt wurden, konnten die Daten für eine weitere Auswertung verwendet werden. Signale, die durch Kratzer und Hintergrundgeräusche unzuverlässig und schlecht zu messen waren, wurden ebenso wie die *Spike-In* Kontrollen und Leerproben aus dem Datensatz entfernt. Die Werte für die Signalintensitäten wurden skaliert, indem die Mediane aller Arrays aneinander angepasst wurden (Median-Skalierung; Median=130). Zur Visualisierung und Charakterisierung der Signalintensitäten wurden mit dem Programm R sowohl vor als auch nach der Skalierung Box- und Dichteplots der Arrays erstellt. Unter Verwendung der Funktion *normalize.loes* der Agilent *Feature Extraction Software 9.5.1* wurden die Daten normalisiert und Log10Ratios aus den Signalintensitäten der Kontrolle und den Signalintensitäten der mit 5-Aza-CdR behandelten Proben gebildet. Eine Log10Ratio von null ergab sich, wenn kein Unterschied zwischen den Signalintensitäten der Kontrolle und der mit 5-Aza-CdR behandelten Zellen vorlag. Eine negative Log10Ratio ergab sich bei einer höheren Signalstärke (erhöhte Expression) und eine positive bei einer niedrigeren Signalstärke (verringerte Expression) nach 5-Aza-CdR Behandlung. Gene, die mindestens eine 2fache Veränderung für die Log2Ratio im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen, werden im Folgenden als „differenziell reguliert“ bezeichnet.

Eine Einordnung in funktionelle Kategorien dieser Gene fand wiederum unter Verwendung des *functional annotation tool* für biologische Prozesse der Datenbank DAVID statt (212).

2.2.21 Allgemeine statistische Auswertungen

2.2.21.1 Chi-square und Fisher's Exact Test

Der Chi-square und der Fisher's Exact Test wurden verwendet, um die Beziehung zwischen den genomischen Aberrationen in 4q und 17q und den traditionellen Risikofaktoren zu bestimmen. Die Analysen wurden mit dem Programm SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) für PC (Version 11 für Windows) durchgeführt.

2.2.21.2 Multivariate Analyse

Die signifikanten Faktoren wurden auf ihre Unabhängigkeit in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell als Indikatorvariablen überprüft. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant deklariert. Die Auswertung wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Natalie Reimers (Institut für Tumorbilogie, UKE, Hamburg) mit dem Programm SPSS durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Hämatogen disseminierte Tumorzellen bzw. Lymphknotenmetastasen in Korrelation zu klinischen und pathologischen Risikofaktoren

Der Nachweis von hämatogen in das KM disseminierten Tumorzellen erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben an KM-Aspiraten unter Verwendung einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und anschließender immunhistochemischer Färbung auf Einzelzellebene. Die DTZ wurden mit dem monoklonalen Antikörper A45-B/B3 gegen ein gemeinsames Epitop verschiedener Zytokeratine gefärbt (u. a. CK8, 18 und 19, sowie CK8/19 Heterodimere) und unter Verwendung eines automatisierten Systems (ACIS) nachgewiesen (55). Primärtumore von Patienten mit mindestens einer DTZ im KM-Aspirat werden in dieser Arbeit als KM-positiv und Patienten ohne nachweisbare DTZ als KM-negativ bezeichnet. KM-Aspirate von 92 Patienten wurden untersucht und DTZ in 37% nachgewiesen. Dabei wurden in KM-Aspiraten aus dem Becken 1-100 DTZ (Median zwei DTZ) und aus den Rippen 1-500 (Median zwei DTZ) nachgewiesen, wobei dieser Unterschied keine Signifikanz aufwies. Es konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen dem KM-Status und der Tumorgroße, dem Status der LK, dem Differenzierungsgrad, dem Geschlecht und der Histologie nachgewiesen werden (s. Tabelle 3.1).

Um Metastasen in den Lymphknoten zu detektieren, wurden von jedem Patienten mit einem NSCLC während der Primäroperation die lokoregionalen LK entnommen, Paraffinschnitte mit HE gefärbt und durch einen Pathologen auf das Vorhandensein von Tumorzellen untersucht. Primärtumore von Patienten mit bzw. ohne LK-Metastasen werden jeweils als LK-positiv bzw. als LK-negativ bezeichnet. Eine signifikante positive Korrelation bestand zwischen dem Auftreten von LK-Metastasen und der Tumorgroße ($p=0,008$; s. Tabelle 3.1).

Der LK-Status wies keine signifikante Korrelation zum KM-Status auf ($p=1,000$). Zwischen dem gleichzeitigen Nachweis von DTZ im KM und Lymphknotenmetastasen (doppelpositive Patienten, $n=18$) bestand eine signifikante Korrelation mit der Tumorgroße ($p=0,007$).

Tabelle 3.1. KM- und LK-Status in Korrelation zu klinischen und pathologischen Faktoren.

	Anzahl n	KM-Status			LK-Status		
		negativ (n)	positiv (n)	p-Wert *	negativ (n)	positiv (n)	p-Wert *
Gesamt	92	63% (58)	37% (34)		47% (43)	53% (49)	
Histologie				0,279			0,300
gesamt	92	63% (58)	37% (34)		47% (43)	53% (49)	
AC	49	59% (29)	41% (20)		43% (21)	57% (28)	
SCC	37	62% (23)	38% (14)		46% (17)	54% (20)	
LCLC	5	100% (5)	0		89% (4)	20% (1)	
andere	1	100% (1)	0		100% (1)	0	
Geschlecht				0,170			0,280
gesamt	92	63% (58)	37% (34)		47% (43)	43% (49)	
weiblich	31	74% (23)	26% (8)		55% (17)	45% (14)	
männlich	61	57% (35)	43% (26)		43% (26)	57% (35)	
Tumorgroße				0,104			0,008
gesamt	92	63% (58)	37% (34)		47% (43)	53% (49)	
pT1	27	56% (15)	44% (12)		67% (18)	33% (9)	
pT2	50	70% (35)	30% (15)		46% (23)	54% (27)	
pT3/4	15	53% (8)	47% (7)		13% (2)	87% (13)	
Differenzierungsgrad ‡				0,653			0,276
gesamt	87	64% (56)	36% (31)		47% (41)	53% (46)	
G1/2	51	67% (34)	33% (17)		53% (27)	47% (24)	
G3	36	61% (22)	39% (14)		39% (14)	61% (22)	

* univariater p-Wert berechnet mit Chi²-Test nach Pearson bzw. exakter Test nach Fisher

‡ Differenzierungsgrad ist von fünf Patienten nicht bekannt

Die Patienten wurden abhängig ihres KM- und LK-Status in folgende Gruppen eingeteilt: (1) KM-negativ (n=58), (2) KM-positiv (n=34), (3) LK-negativ (n=43) und LK-positiv (n=49).

3.2 Qualität der aus Gewebeschnitten isolierten DNA und RNA

Die meisten Tumorgewebe von Bronchialkarzinomen sind äußerst heterogen und von stromalen Fibroblasten und Leukozyten infiltriert. Um einen Einfluss dieser unerwünschten Zelltypen auf die Array-CGHs und Expressionsprofile zu vermeiden, wurde für die Gewinnung der Tumor-DNA bzw. Gesamt-RNA ein Anteil an Tumorzellen von mindestens 70% angestrebt. Zur genauen Beurteilung wurde von jeder Tumorprobe ein Gewebeschnitt mit HE gefärbt und anhand der Homogenität und Größe der Tumoreale die entsprechende Methode zur Isolierung der Tumorzellen gewählt (s. Abbildung 3.1).

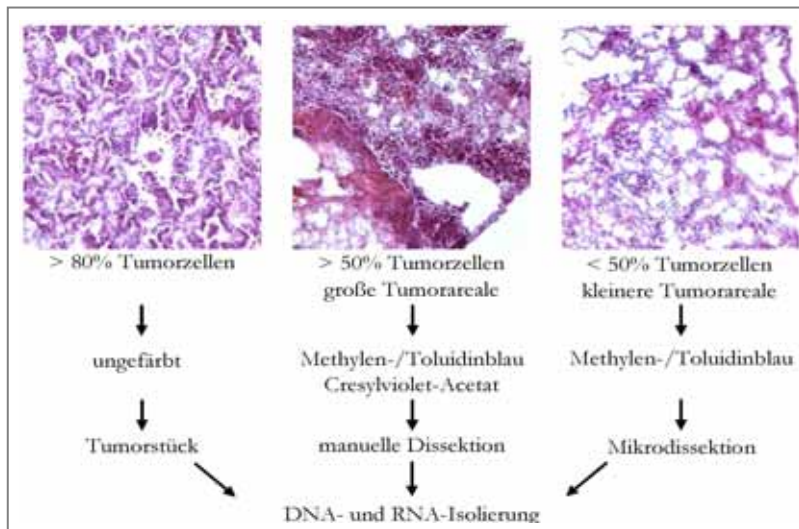


Abbildung 3.1. HE-gefärbte Gefriergewebeschnitte (7 µm) von primären Bronchialkarzinomen. Anhand des prozentualen Anteils an Tumorzellen und der Größe der einzelnen Tumoreale wurde die Färbung der Gewebeschnitte und die Methode der Isolierung der Nukleinsäure gewählt.

Eine optimale Färbung der Gewebeschnitte musste die Differenzierung zwischen Tumorzellen und dem nicht-malignen umliegenden Gewebe gewährleisten, ohne dabei einen Einfluss auf die Qualität der Nukleinsäuren zu haben. Eine HE-Färbung konnte nicht verwendet werden, da bereits Spuren von Hämalaun in der Gesamt-RNA durch die Komplexbildung mit Mg^{2+} -Ionen nachfolgende enzymatische Reaktionen stören kann (219). Die gängige Färbung mit Methylengrün (220) führte weder zu einer guten Zelldifferenzierung, noch zu einer Absorptionserhöhung der Laserenergie. Eine Färbung mit den Thiazinfarbstoffen Toluidin-/Methylenblau bot sich hingegen sowohl für manuell dissektierte als auch für mikrodisektierte Gewebeschnitte an. Neben einer deutlichen Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen führte sie zusätzlich zu einer Erhöhung der Absorption der Laserenergie. Dieses hatte den Vorteil, dass bei der Mikrodissektion weniger Energie benötigt und somit das Gewebe geschont wurde. Gefriergewebeschnitte zur Isolierung von Gesamt-RNA für die manuelle Dissektion wurden mit einer auf Alkohol basierenden Cresylviolet-Acetat-Lösung gefärbt, welche weder eine Degradierung noch Einbußen in den RNA-basierenden Analysen verursachte. Aufgrund ihrer schwachen Intensität konnte diese Färbung allerdings nur für die manuelle Dissektion und nicht für die Mikrodissektion verwendet werden.

Um zu gewährleisten, dass in allen Analysen Nukleinsäuren mit vergleichbarer Qualität eingesetzt wurden, wurde – zusätzlich zur Messung mit dem Nanodrop Spektrophotometer – eine Real-Time PCR mit genomischer DNA und eine Qualitätsbestimmung durch den Agilent 2100 Bioanalyser mit der Gesamt-RNA durchgeführt.

Die Messungen mit dem Nanodrop Spektrophotometer zeigten deutliche Unterschiede in der Quantität und Qualität der extrahierten DNA und RNA. Während die aus ungefärbten Tumorstücken und manuell dissektierten Gewebeschnitten gewonnenen Nukleinsäuren den typischen *Peak* des Absorptionsmaximums bei 260 nm aufwiesen (s. Abbildung 3.2, A, B, D und E), konnte dieser bei Nukleinsäuren aus mikrodisektierten Tumorgewebeschnitten nur

angedeutet beobachtet werden (C und F). Obwohl es sich bei dem P.A.L.M. *Laser Microbeam System* um einen Kaltlaser handelte, musste davon ausgegangen werden, dass in der isolierten Zellpopulation ein gewisser Anteil von Zellen vorhanden war, deren Nukleinsäuren UV-induzierte Schäden aufwiesen (221). Zusätzlich führte die Mikrodisektion durch den hohen Zeitaufwand und der Umgebungstemperatur zur schnelleren Degradation der Gesamt-RNA. Daher wurde in den meisten Fällen die Gesamt-RNA für die Analysen aus manuell dissektiertem Tumorgewebe oder aus Tumorstücken isoliert. Durch die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum Nukleinsäure) als auch bei 280 nm (Absorptionsmaximum Proteine) lässt sich die Reinheit der Nukleinsäure abschätzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260}/OD_{280} -Wert (OD = optische Dichte) von 1,8 und eine reine RNA-Lösung von 2,0. Bei deutlichen Abweichungen ($\pm 0,2$) wurden die Nukleinsäuren mit einer Ethanol-fällung aufgereinigt.

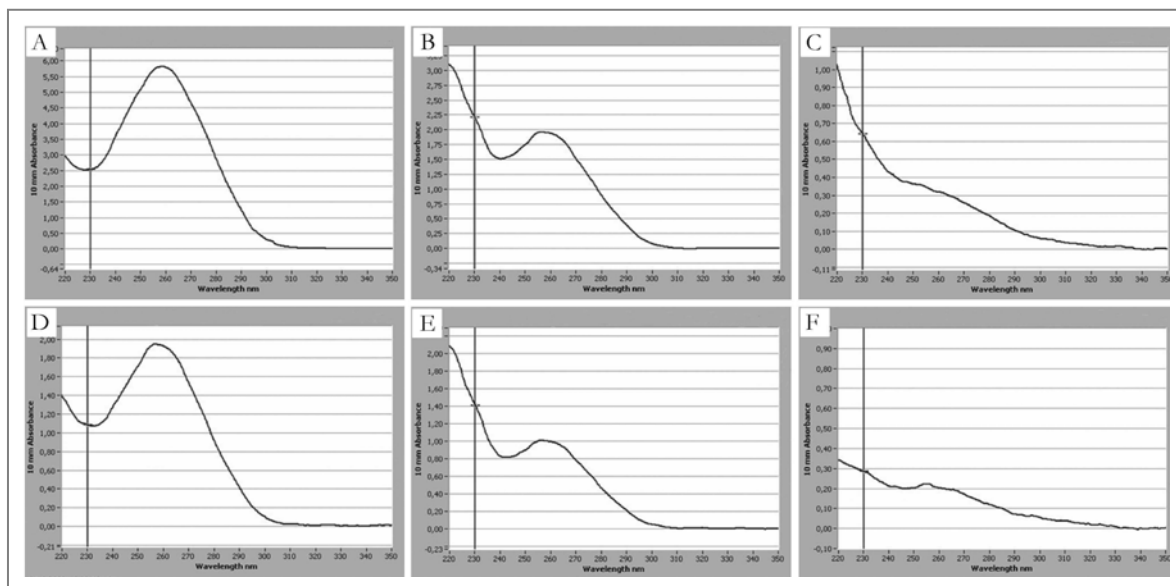


Abbildung 3.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von genomischer DNA und Gesamt-RNA aus Bronchialkarzinomen in Abhängigkeit der Färbung und Isolationsmethode. Darstellung des Absorptionsspektrums von 220 nm bis 350 nm von genomischer DNA (A-C) und Gesamt-RNA (D-F). (A, D) Nukleinsäure aus ungefärbten Tumorstücken, (B, E) manuell dissektiertem und (C, F) aus mikrodisektiertem Geweben.

Alle RNA-Proben wurden zusätzlich mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer untersucht, um für die Mikroarray-Studie eine vergleichbare Qualität zu gewährleisten. Die Qualität und der Grad der Degradierung wurde mit Hilfe eines Densitogramms bestimmt (s. Abbildung 3.3). Der Graph einer Gesamt-RNA von guter Qualität sollte eine flache Basislinie und deutliche *Peaks* für die 18S und 28S rRNA (ribosomale RNA) aufweisen. Für weitere Analysen wurden nur RNA-Proben mit guter Qualität verwendet.

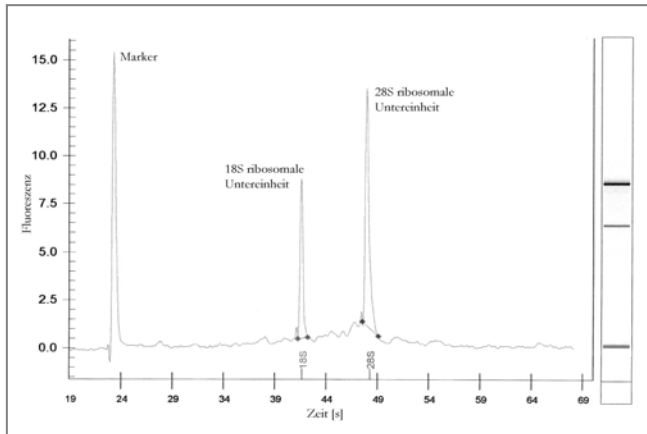


Abbildung 3.3. Densitogramm als Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA. Die Gesamt-RNA wurde aus manuell dissektiertem Tumorgewebe isoliert und die Qualität mit Hilfe des Agilent Bioanalyzers überprüft. *Peaks* der 18S und 28S rRNA und eine flache Basislinie deuten auf eine gute Qualität der Gesamt-RNA hin. Auf der Ordinate ist die Fluoreszenz der Fragmente, auf der Abszisse die Zeit in Sekunden dargestellt.

Obwohl Messungen mit dem Nanodrop Spektrophotometer deutliche Unterschiede in der Qualität der genomischen DNA aufwiesen, konnten diese mit einer RTQ-PCR nicht bestätigt werden (s. auch Kapitel 2.2.10). Durch den Nachweis des Reparaturgens *bOGG1* (8-*O*-xoguanin DNA *Glycosylase*) wurde die Integrität der genomischen DNA untersucht und kein qualitativer Unterschied zwischen den unterschiedlich isolierten DNA-Proben festgestellt (s. Abbildung 3.4). Es konnte deshalb davon ausgegangen werden, dass unabhängig von der gewählten Isolationsmethode, die genomische DNA eine vergleichbare Qualität aufwies.

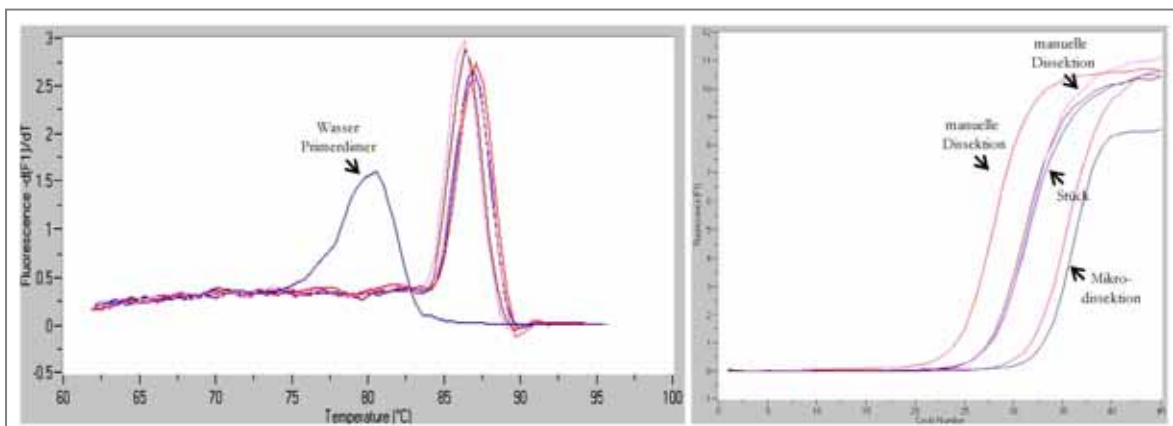


Abbildung 3.4. Ergebnis einer RTQ-PCR mit genomischer DNA isoliert aus Gewebestücken, manuell dissektiertem und mikrodissektiertem Gewebe. Nach Messungen der DNA-Konzentration mit dem Nanodrop Spektrophotometer wurde für jeden PCR-Ansatz 10 ng genomische DNA verwendet. Es zeigte sich, dass die Messungen von geringen DNA-Konzentrationen mit deutlichen Abweichungen behaftet sind (rechtes Bild). Dennoch konnte unter dem Nachweis des Reparaturgens *bOGG1* zwischen den einzelnen Proben kein Unterschied in der DNA-Qualität nachgewiesen werden (linkes Bild).

3.3 Genomische Analysen von primären Bronchialkarzinomgeweben mittels Array-CGH

3.3.1 Auswahl der geeigneten Mikroarray-Technik für CGH

Zum Nachweis von Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl bieten sich verschiedene Arten von CGHs basierend auf der Mikroarray-Technik an. Es wurde daher zunächst untersucht, mit welchem Mikroarray die DNA-Kopienanzahl der hier verwendeten Tumorgewebe am sensitivsten bestimmt werden kann. Einerseits musste die Qualität der genomischen DNA den Ansprüchen der Mikroarrays genügen, um ein Auftreten von Hintergrundsignalen zu vermeiden. Andererseits sollten möglichst kleine Aberrationen nachweisbar sein, um auch DNA-Gewinne bzw. Verluste von geringer Größe detektieren zu können. Zur Auswahl standen zwei CGHs. Eine basierend auf BAC-Klonen (BAC-CGH) und eine basierend auf Oligonukleotiden (Oligo-CGH). Beide CGHs wurden mit genomischer DNA einer manuell dissektierten und einer mikrodissektierten Tumorprobe durchgeführt. Die Ergebnisse wurden miteinander verglichen.

Die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Tumor- und Referenz-DNA (Gemisch aus Leukozyten-DNA von gesunden Probanden) wurden gleichzeitig auf die Mikroarray-CGH hybridisiert, wo sie um die homologen Bindungsstellen konkurrierten. Das Fluoreszenzverhältnis der Signale der Tumor- zur Referenz-DNA wurde bestimmt und zur Basis 2 logarithmiert (Log_2Ratio). Bestand ein Gleichgewicht zwischen Tumor- und Referenz-DNA, handelte es sich um eine genomisch unauffällige Region, und die Log_2Ratio nahm den Wert 0 an. Überwogen DNA-Sequenzen der Tumor-DNA banden diese entsprechend mehr als die Referenz-DNA und die Log_2Ratio wurde positiv ($\text{Log}_2\text{Ratio} > 0$). In der Tumor-DNA unterrepräsentierte DNA-Sequenzen führten zur stärkeren Hybridisierung der Referenz-DNA und somit zu einer negativen Log_2Ratio ($\text{Log}_2\text{Ratio} < 0$). Zusätzlich wurden Bruchstellen, DNA-Gewinne und Verluste für jeden einzelnen Patienten mit dem Programm aCGH-Smooth ermittelt. Die Profile der DNA-Kopienanzahl der BAC- und der Oligo-CGH wurden miteinander verglichen (s. Abbildung 3.5). Entsprechend den Beobachtungen von Carvalho et al. zeigten die CGH-Profile beider Tumorproben für größere Aberrationen jeweils das gleiche Muster (162). Aufgrund der höheren Auflösung (~100 kb) und der dadurch gesteigerten Sensitivität der Oligo-CGH ließen sich zusätzliche kleinere Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl detektieren.

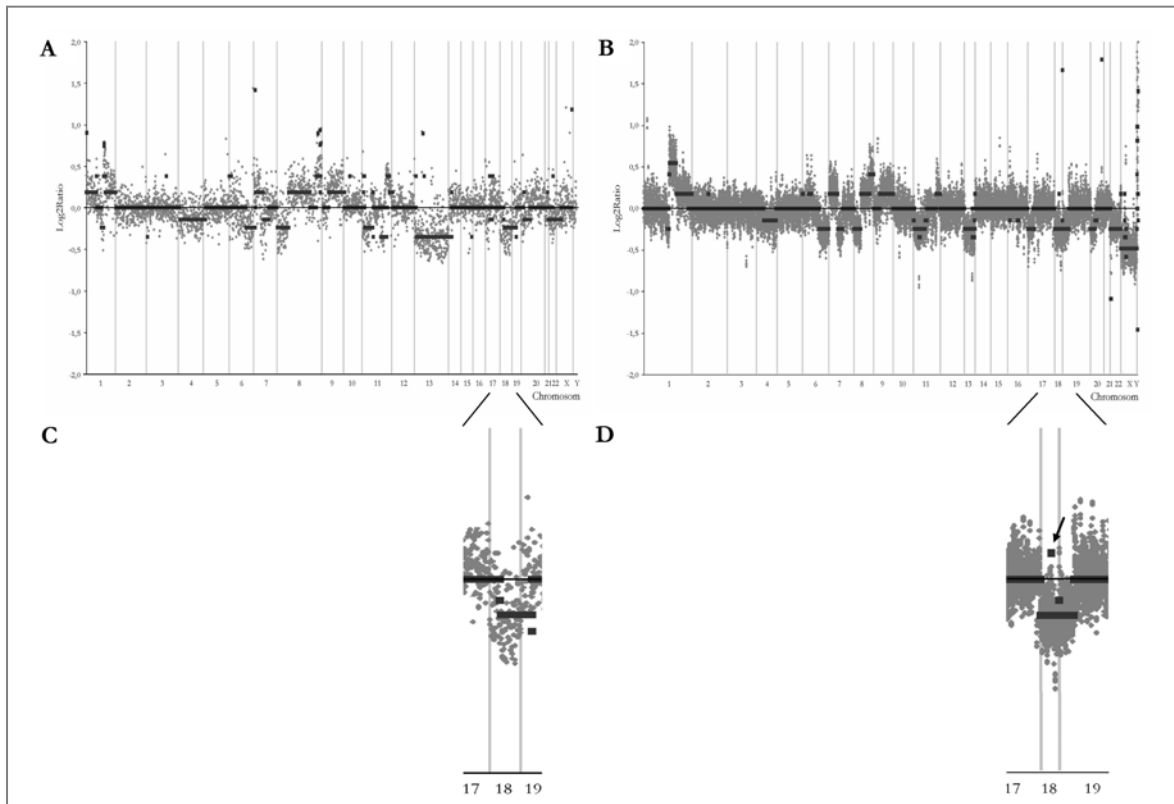


Abbildung 3.5. Vergleich der Profile für die DNA-Kopienanzahl ermittelt durch (A) Array-CGH basierend auf BAC-Klonen und durch (B) Array-CGH basierend auf Oligonukleotiden für eine manuell dissektierte Tumorprobe. Aufgetragen sind die Log2Ratios der Fluoreszenzsignale (hellgrau, y-Achse) und die durch aCGH-Smooth detektierten DNA-Aberrationen (dunkelgrau) gegen die Chromosomen (x-Achse). Der Beginn und das Ende der Chromosomen sind durch senkrechte Linien markiert. Negative Smooth-Werte weisen auf einen Verlust der DNA, positive auf einen Gewinn und Smooth-Werte gleich 0 auf eine genomisch unauffällige Region hin. Beide Profile zeigten das gleiche Aberrationsmuster mit wenigen Hintergrundsignalen. DNA-Gewinne und Verluste sind deutlich anhand der Smooth-Linien zu erkennen. Eine Vergrößerung des Chromosoms 18 (C, D) zeigte, dass es sich bei der Oligo-CGH um die sensitivere Methode handelte, mit der sich zusätzlich kleinere Aberrationen mit einer Größe von 2,8 kb (Pfeil) nachweisen ließen.

Oligo-CGHs bieten den Vorteil, dass ihre Auswertung direkt auf Genebene stattfindet und daher jedes Oligonukleotid direkt einem Gen zugeordnet werden kann. BAC-Klone decken durch ihre Größe hingegen meistens mehrere Gene ab, so dass eine direkte Zuordnung zu einem bestimmten Gen oft nicht möglich ist. Mit der Verwendung von Oligo-CGHs wird somit der direkte Nachweis eines möglichen Einflusses von Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl auf die Genexpression erlaubt (164).

Zur Ermittlung von Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl wurden für alle Tumorproben Oligo-CGHs verwendet. Diese werden im Weiteren mit „Array-CGH“ bezeichnet.

3.3.2 Einfluss der DNA-Isolierungsmethode auf die Profile der Array-CGH

Die DNA-Kopienanzahl von 32 bronchialen AC wurde unter Verwendung von Array-CGHs mit 27.849 Oligonukleotiden bestimmt. Die verwendete Tumor-DNA wurde entweder aus

Tumorstücken (n=3) oder aus manuell dissektiertem (n=6) bzw. mikrodisektiertem Gewebe (n=23) isoliert und auf ihre Qualität und Quantität hin überprüft. Bei der Referenz-DNA handelte es sich um ein Gemisch aus Leukozyten-DNA von 10 weiblichen bzw. 10 männlichen Probanden. Um die Qualität der Array-CGHs besser beurteilen zu können, wurde ein *Sex-Mismatch* durchgeführt. Die gemeinsame Hybridisierung von weiblicher Tumor- (XX) und männlicher Referenz-DNA (XY) sollte zu einem DNA-Gewinn des gesamten X-Chromosoms und einen DNA-Verlust des Y-Chromosoms führen (s. Abbildung 3.6.C). Wurde hingegen männliche Tumor-DNA mit weiblicher Referenz-DNA kohybridisiert, wies das X-Chromosom einen DNA-Verlust auf (s. Abbildung 3.6.A). Die Gonosomen dienten so zur Hybridisierungskontrolle und mussten aus den weiteren Auswertungen ausgeschlossen werden.

Nicht auswertbare Signale durch variierende Größe, Kratzer und Hintergrundgeräusche wurden unter Verwendung von Bluefuse und einem eigenem Programm aus dem Datensatz entfernt (163, 203). Insgesamt konnten im Durchschnitt 88,6% aller Signale ausgewertet werden. Dabei bestand kein Unterschied zwischen der Verwendung von manuell dissektierter oder mikrodisektierter DNA (88,9% vs. 88,3%). Wurde Tumor-DNA aus ungefärbten Tumorstücken gewonnen, konnten durchschnittlich 90,5% aller Signale verwendet werden. Zur besseren Visualisierung wurde aus den Log2Ratios der „*Moving Average*“ gebildet, d.h. aus fünf aufeinander folgenden Log2Ratios wurde der Mittelwert berechnet und gegen die Chromosomen in einem Diagramm aufgetragen. Bruchstellen, DNA-Gewinne und Verluste wurden durch die Verwendung von aCGH-Smooth bestimmt. Anhand der Werte des aCGH-Smooth für das X-Chromosom wurde für jedes einzelne CGH-Profil die Nulllinie festgesetzt. Da Tumorgewebe häufig DNA-Verluste für das X-Chromosom aufweisen und diese sich auf das aCGH-Smooth auswirken können, konnte nicht für alle CGH-Profile eine eindeutige Nulllinie bestimmt werden. In diesen Fällen wurde die Nulllinie mit FISH-Analysen für die Zentromere von Chromosom 17, 15 und 11 bestimmt.

Abbildung 3.6 zeigt vier Profile der DNA-Kopienanzahl von Tumorproben, deren genomische DNA mit unterschiedlichen Methoden isoliert worden ist. Die Verwendung von DNA aus ungefärbten Tumorstücken führte zu Profilen mit deutlich sichtbaren genomischen Veränderungen und wenigen Hintergrundsignalen (A). Der etwas höhere Gehalt an infiltrierten normalen Zellen (maximal 30%) in der manuell dissektierten Tumorprobe führte hingegen zur Verschleierung kleinerer Aberrationen (B). Dieses Problem wurde mit der Mikrodisektion umgangen, bei der einzelne Tumorzellen aus dem Gewebeverband isoliert wurden (C und D). Nachteil dieser zeitaufwendigen Methode ist ihr großer Einfluss auf die DNA-Qualität, was zu deutlichen Hintergrundsignalen in den CGH-Profilen führen konnte (D).

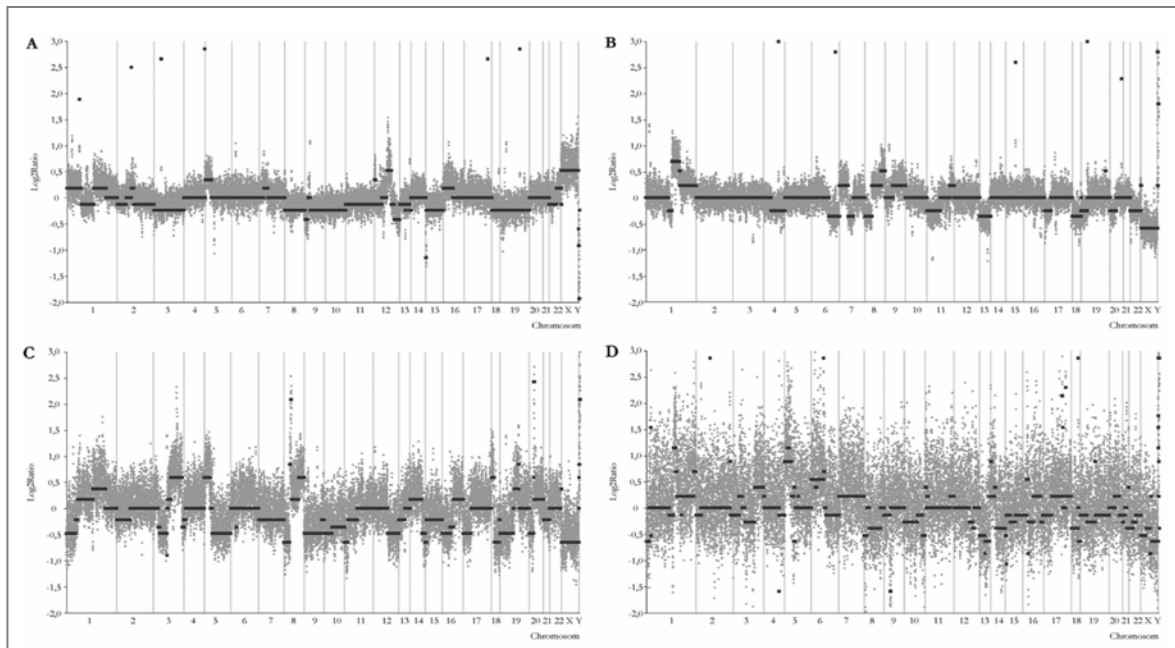


Abbildung 3.6. Profile der DNA-Kopienanzahl von vier Tumorsproben unter Verwendung von Array-CGH. (A) DNA aus ungefärbten Tumorstücken. (B) DNA aus manuell dissektiertem Tumorgewebe und (C, D) aus mikrodisektiertem Tumorgewebe. Durch aCGH-Smooth erhaltene aberrante Regionen sind durch dunkelgraue Linien markiert.

Zwei CGH-Profile, für deren Erstellung genomische DNA aus mikrodisektiertem Tumorgewebe verwendet wurde, konnten aufgrund von starken Hintergrundsignalen nicht ausgewertet werden. Es wurde erneut genomische DNA isoliert – diesmal aus manuell dissektiertem Tumorgewebe – und die Array-CGH wiederholt. Die so erhaltenen Profile der DNA-Kopienanzahl wiesen deutlich weniger Hintergrundsignale auf und DNA-Gewinne und Verluste konnten identifiziert werden (s. Abbildung 3.7). Für die weiteren Auswertungen konnten diese Profile verwendet werden. Zwei der 32 durchgeführten Array-CGHs konnten nicht in die weitere Auswertung mit einbezogen werden, da ihre Profile auch nach erneuter DNA-Isolation zu viele Hintergrundgeräusche aufwiesen.

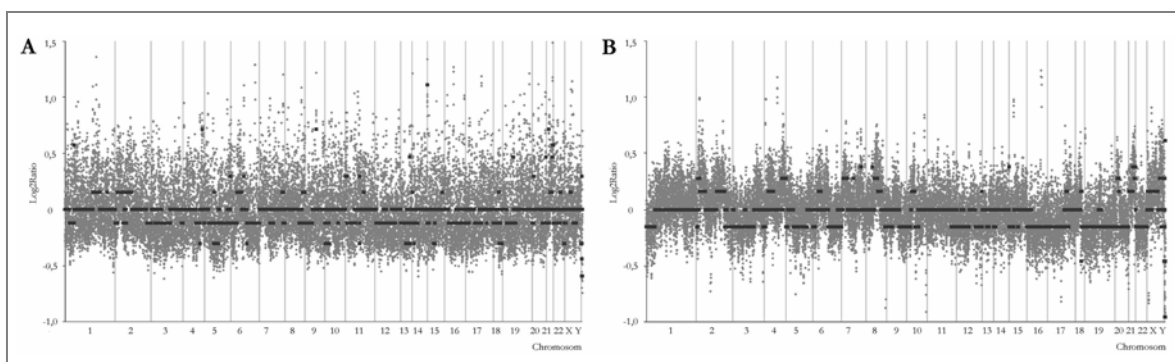


Abbildung 3.7. Vergleich der CGH-Profile genomischer DNA aus mikrodisektiertem (A) und manuell dissektiertem Gewebe (B) der gleichen Tumorsprobe. Während das CGH-Profil der mikrodisektierten DNA aufgrund der starken Hintergrundsignale nicht auswertbar war, ließ die manuell dissektierte DNA den Schluss auf DNA-Verluste und Gewinne zu.

3.3.3 Allgemeine DNA-Aberrationsmuster in primären Bronchialkarzinomen

In allen mit Array-CGH untersuchten Tumorproben konnten Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl mit Hilfe des Programms aCGH-Smooth nachgewiesen werden, die den bereits beschriebenen Aberrationsmustern in Bronchialkarzinomen ähneln (222). Abbildung 3.8 zeigt für jedes Chromosom den prozentualen Anteil an DNA-Überrepräsentationen und DNA-Verlusten aller 30 bronchialen Tumorproben. Allgemein wurden auf Basis der Gesamtzahl der Klone mit positiven Smooth-Werten mehr DNA-Gewinne in T2-3 (31%) als in T1 Tumoren (17,5%) gefunden. Das Auftreten von DNA-Verlusten wies zwischen T1 und T2-3 Tumoren (19,8% vs. 16,4%) keinen signifikanten Unterschied auf (s. Tabelle 6.1 im Anhang).

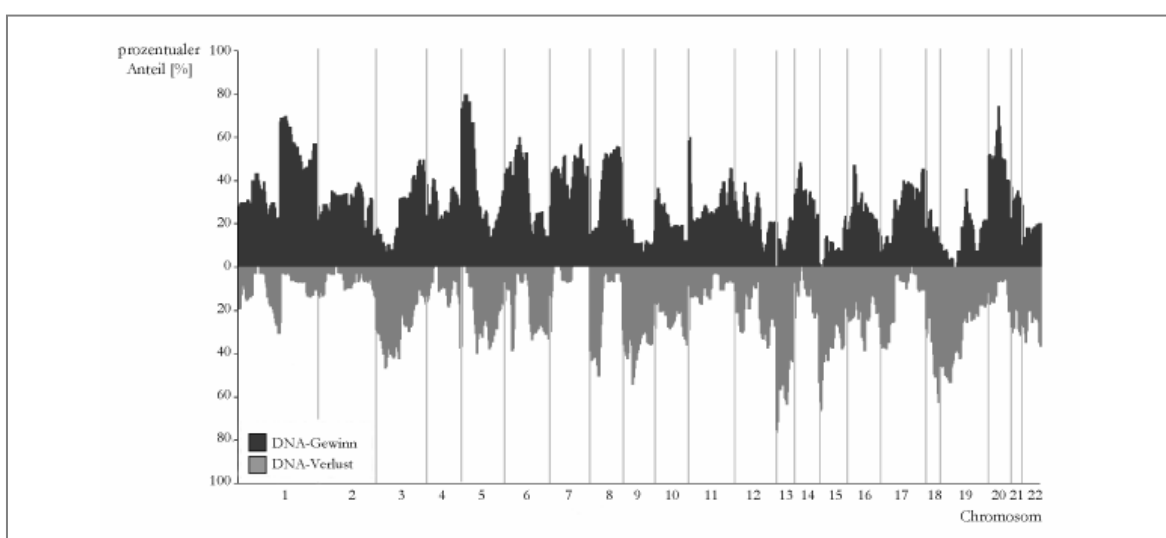


Abbildung 3.8. Prozentualer Anteil an DNA-Gewinnen und DNA-Verlusten in 30 primären Bronchialkarzinomen auf Basis von positiven (DNA-Gewinne) und negativen Smooth-Werten (DNA-Verluste) der Array-CGH.

27 verschiedene chromosomale Regionen wiesen in mehr als 30% der Tumorproben Überrepräsentationen oder Verluste der DNA auf. Die am häufigsten vorkommenden DNA-Gewinne in allen Patienten traten in 5pter-q11 (60%), 1q43-qter (40%), 11pter-p15.5 (39%), 8p12-p11.21 (39%), 8q12.1-qter (36%), 20pter-q11.21 (36%), 6p22.1-6p21.31 (36%) und 7p13-q11.21 (36%) auf. Die häufigsten DNA-Verluste wurden in 13q14.11-q22.1 (50%), 15qcen-q13.3 (43%), 9p13.1-q21.11 (42%) und 13q32.3-33.3 (33%) gefunden. DNA-Überrepräsentationen in mehr als 30% der Patienten lagen auf den chromosomalen Regionen von 1q, 2, 3q, 4p, 5p, 6p, 7, 8q, 11, 14, 17q und 20, während DNA-Verluste innerhalb dieser Bereiche nur in weniger als 10% der Fälle auftraten. Ähnliches galt für DNA-Verluste der Chromosomenregionen 3p, 8p, 9q, 13, 15, 17p, 18q und 19p, in denen DNA-Gewinne nur selten nachweisbar waren. DNA-Überrepräsentationen und Verluste wurden in den Chromosomen 10, 12, 16 und 21 in annähernd gleicher Häufigkeit gefunden.

Es wurde die These aufgestellt, dass die Entstehung von Bronchialkarzinomen durch drei verschiedene Signalkaskaden initiiert werden kann – entweder durch Überrepräsentation von Chromosom 7 oder 12 oder durch Verluste von 3p (223). In unseren Daten gehörten DNA-Gewinne von Chromosom 7 und DNA-Verluste von 3p zu den häufigsten chromosomalen Veränderungen, welche sich gegenseitig auszuschließen scheinen. Keine der 12 Tumorproben mit vollständig verloren gegangenen 3p-Arm wies eine DNA-Überrepräsentation von 7p auf, welche ebenfalls in 12 Tumoren gefunden wurden. Von sieben Fällen, die einen partiellen DNA-Verlust von 3p zeigten, besaßen drei einen DNA-Gewinn von 7p. Häufiges Auftreten von DNA-Überrepräsentationen auf Chromosom 12 konnte hingegen nicht gefunden werden. Grund hierfür könnte sein, dass es sich bei den untersuchten Bronchialkarzinomen um Adenokarzinomen handelte, bei denen DNA-Überrepräsentationen von Chromosom 12 eher selten auftreten.

Das Fluoreszenzverhältnis von Tumor- zu Referenz-DNA nimmt linear zur DNA-Kopienanzahl zu (224). Als *High Level* Amplifikationen wurden DNA-Überrepräsentationen definiert, deren aCGH-Smooth Werte mindestens den 2fachen Wert des X-Chromosoms aufwiesen. Entsprechend wurden in 12 von den 30 untersuchten Primärtumoren 11 distinkte *High Level* Amplifikationen mit einer Größe von <10 MBp in 22 verschiedenen Lokalisationen gefunden (s. Tabelle 6.2 im Anhang). Sieben Bronchialkarzinome besaßen mehr als eine *High Level* Amplifikation. 16 Autosomen wiesen mindestens eine *High Level* Veränderung in der DNA-Kopienanzahl auf, wobei auf den Chromosomen 1, 8, 12 und 19 mehr als ein Amplikon gefunden wurde. In den meisten Fällen waren die Amplikons nur in einer Tumorprobe vorhanden, mit Ausnahme von 8p11.21 (3 Proben), 12p11.22 (2 Proben), 12q15 (3 Proben) und 14q12 (2 Proben). Auf fünf dieser chromosomalen Regionen liegen die bekannten tumorassoziierten Onkogene *FGFR1* (8p11.21), *cMYC* (8q24.21), *ERBB2* (17q12), *MDM2* (12q15) und *E2F1* (20p11).

3.3.4 Genomische Aberrationsmuster in Assoziation mit der hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark

Durch Vergleich der DNA-Kopienanzahl von KM-positiven mit KM-negativen Tumorproben wurde untersucht, ob Veränderungen in distinkten chromosomalen Regionen nachweisbar sind, die mit einer frühen Disseminierung von Tumorzellen in das KM in Verbindung gebracht werden können. Mit Hilfe des bioinformatischen Programms aCGH-Smooth können sowohl DNA-Verluste und Gewinne dargestellt als auch potenzielle chromosomale Bruchstellen markiert werden (206). Weiterhin wurden mit dem Programm DRF chromosomale Unterschiede in der DNA-Kopienanzahl zwischen den beiden Gruppen identifiziert.

Obwohl generell kein Unterschied in der Gesamtzahl an alterierenden CGH-Klonen gefunden wurden (s. Tabelle 6.1 im Anhang), zeigten 32 chromosomale Regionen mit einer Größe von 1,2 bis 107 MBp (Median 2,45 MBp) einen signifikanten Unterschied in ihrer DNA-Kopienanzahl abhängig vom KM-Status (s. Tabelle 6.3 im Anhang). Vorher wurden signifikante chromosomale Regionen mit einem p-Wert $< 0,05$ und einem Abstand von weniger als 10 MBp (*minimal aberrated regions*) zusammengefasst und der p-Wert erneut berechnet. Mit Ausnahme der Chromosomen 6, 13 und 18 wiesen alle Autosomen mindestens eine chromosomale Region auf, in der die DNA-Kopienanzahl in einer der beiden Gruppen signifikant verändert war (s. Abbildung 3.9). Von den Aberrationen war jeweils nur ein Allel betroffen. Es wurden keine *High Level* Amplifikationen oder homozygote DNA-Verluste spezifisch für den KM-Status gefunden.

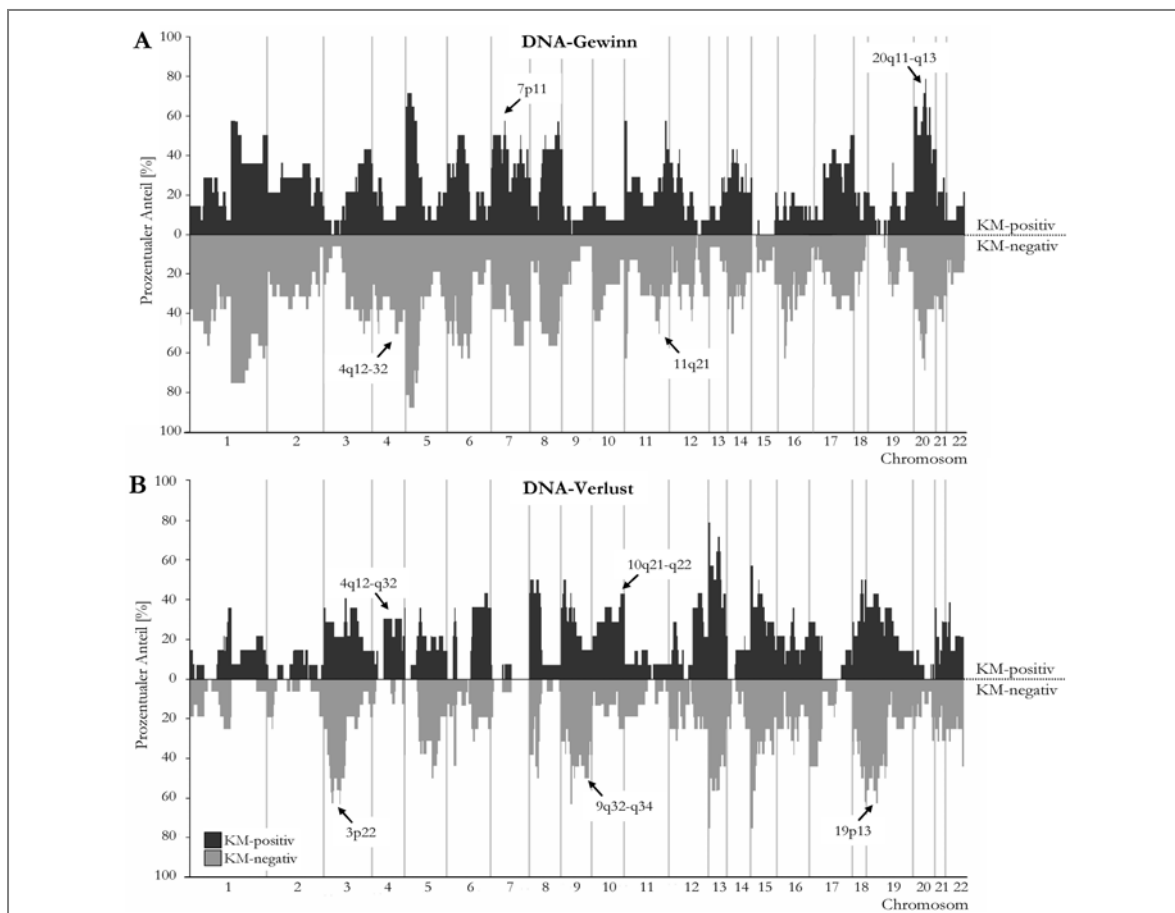


Abbildung 3.9. Prozentualer Anteil an DNA-Gewinnen (A) und DNA-Verlusten (B) in KM-positiven (schwarz) und KM-negativen (grau) Patienten. Repräsentative chromosomale Aberrationen in den beiden Gruppen sind durch Pfeile markiert.

DNA-Überrepräsentationen in neun und Verluste in drei chromosomalen Regionen wurden in der KM-positiven Gruppe signifikant häufiger gefunden als in der KM-negativen und scheinen mit dem Vorhandensein von DTZ im KM assoziiert zu sein.

Abbildung 3.10 zeigt sowohl für die KM-positive (A) als auch für die KM-negative Gruppe (B) ein repräsentatives CGH-Profil mit spezifischen Aberrationen für den KM-Status. Beide Tumorgewebe wiesen für Bronchialkarzinome typische DNA-Gewinne und Verluste auf (siehe auch Kapitel 3.3.2). Die Probe AC27 wies die für KM-positive Patienten spezifischen DNA-Verluste von Chromosom 4q und 10q und einen DNA-Gewinn von 17q auf. AC9, repräsentativ für die KM-negative Gruppe, zeigte DNA-Überrepräsentationen von 1q, 4q und 14q und ein DNA-Verlust von 19q. Zusätzlich wurden in beiden Tumorproben *High-Level* Amplifikationen nachgewiesen, welche aber nicht mit dem KM-Status assoziiert waren. Während AC27 Amplifikationen in 12p12 (*KRAS*), 12q14 (*MDM2*) und 14q21 aufwies, besaß AC9 drei in 3q27, 8p11 (*FGFR1*) und 20p11.

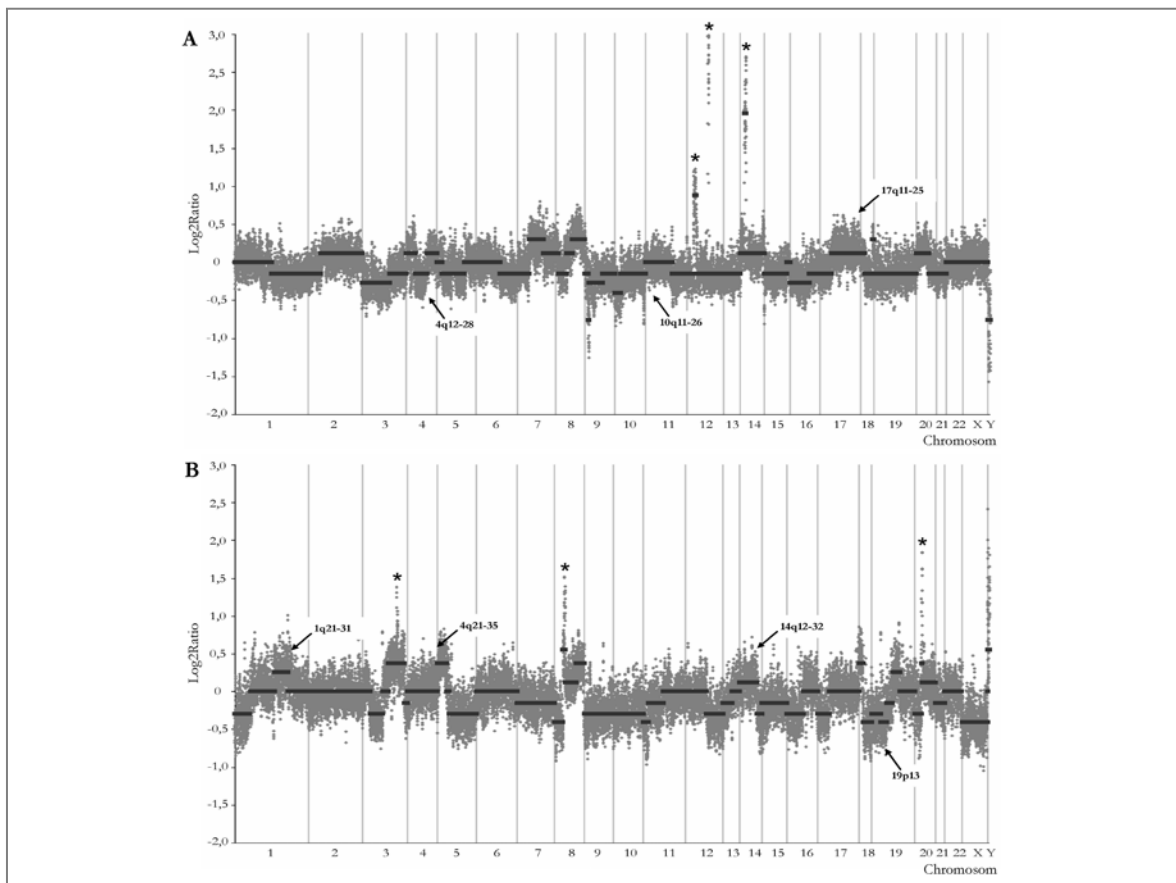


Abbildung 3.10. Zwei repräsentative CGH-Profile für die DNA-Kopienanzahl von (A) einem KM-positiven (AC27) und (B) einem KM-negativen Patienten (AC9). Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl werden durch dunkelgraue Linien (aCGH-Smooth) dargestellt. Chromosomale Aberrationen spezifisch für die beiden Gruppen sind durch Pfeile und *High Level* Amplifikationen durch Sternchen markiert. Der *Moving Average* der Log2Ratios wurde gegen die Chromosomen aufgetragen.

4q war mit 107 MBp die größte chromosomale Region, die Unterschiede in der DNA-Kopienanzahl zwischen KM-positiven und KM-negativen Tumorproben aufwies. Während ein DNA-Gewinn von 4q12-q32 öfters in KM-negativen Patienten (63%) zu finden war, lag diese

Region häufig unterrepräsentiert bei KM-positiven Patienten vor (29%, p-Wert = 0,024). Zwei der KM-positiven Fälle wiesen einen Verlust des gesamten 4q-Arms auf.

3.3.5 Genomische Aberrationsmuster in Assoziation mit der lymphogenen Metastasierung

Um genomische Aberrationen zu finden, die in Verbindung mit der lymphogenen Disseminierung gebracht werden können, wurden die Patienten anhand ihres LK-Status in die Gruppen LK-negativ (n=14) und LK-positiv (n=16) unterteilt. Die Durchführung der Auswertung erfolgte wie bereits in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

Die Gesamtanzahl von DNA-Gewinnen und Verlusten wies keinen signifikanten Unterschied zwischen der LK-positiven und der LK-negativen Gruppe auf (s. Tabelle 6.1 im Anhang). Acht Chromosomen zeigten unabhängig vom KM-Status Veränderungen in ihrer DNA-Kopienanzahl, welche spezifisch für den LK-Status waren (Abbildung 3.11). Insgesamt wurden 12 chromosomale Regionen gefunden, die signifikante genomische Veränderungen mit einem p-Wert < 0,05 aufwiesen (s. Tabelle 6.4 im Anhang). Diese Bereiche besaßen eine Größe von 1,2 MBp bis 46,6 MBp (Median 8,0 MBp). Die größte signifikante Region mit 46,6 MBp befand sich in 3q13-q25 und wurde in 70% der LK-positiven Patienten gefunden. Die Überrepräsentation von Chromosom 20q12 korrelierte zwar nur mit dem KM-Status, wurde allerdings interessanterweise vorwiegend in der doppel-positiven Gruppe (LK-positiv und KM-positiv) nachgewiesen. In sechs von acht Fällen war ein DNA-Gewinn von 20q12 zu finden (67%), während in einfach-positiven Fällen (LK-positiv oder KM-positiv) eine Überrepräsentation in 50% bzw. 43% der Fälle auftrat.

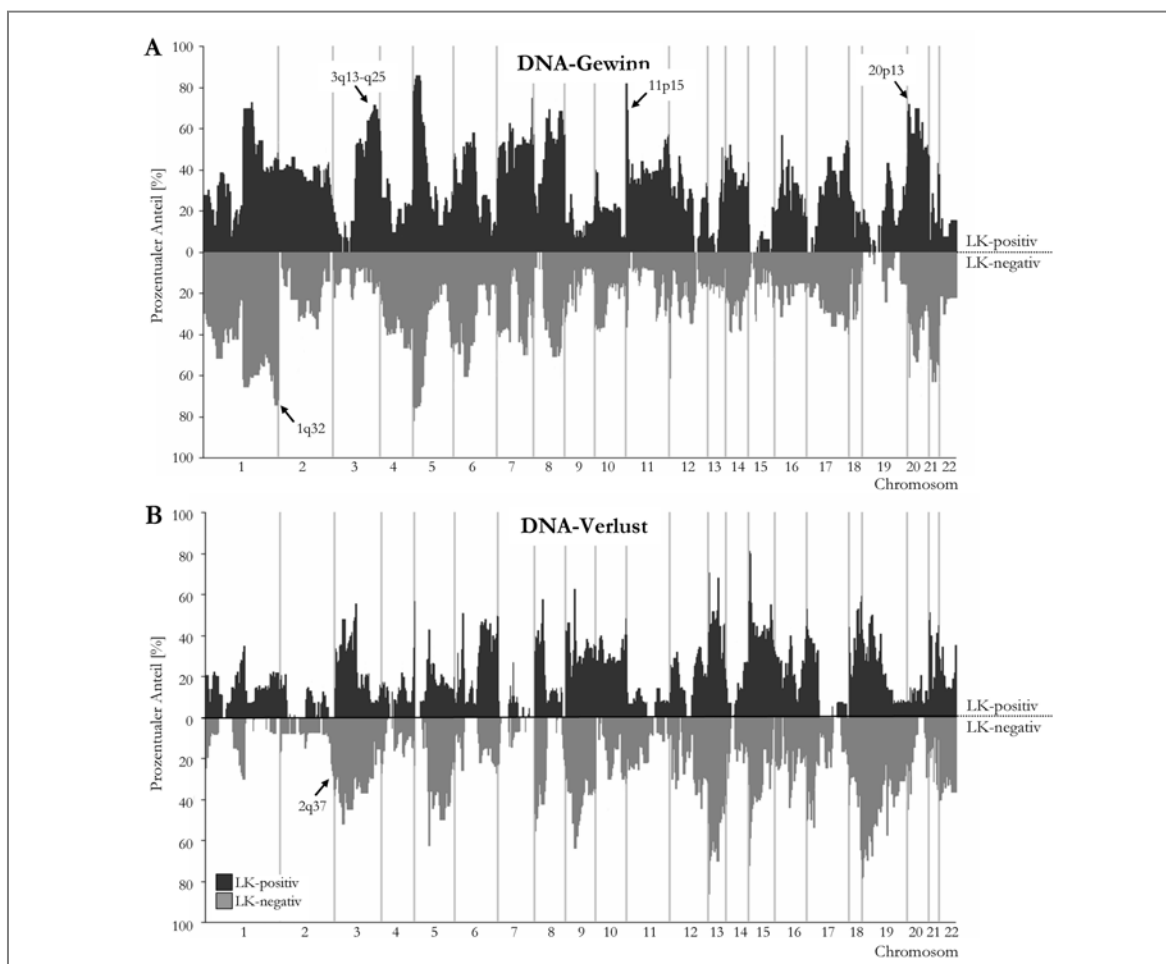


Abbildung 3.11. Prozentualer Anteil an Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl abhängig von dem LK-Status. (A) DNA-Gewinne und (B) DNA-Verluste. Repräsentative Aberrationen in beiden Gruppen sind durch Pfeile markiert. LK-positive Fälle werden schwarz, LK-negative grau dargestellt.

3.4 Genexpressionsanalysen an primären Bronchialkarzinomgeweben

3.4.1 Qualität der Genexpressionsanalysen

Genexpressionsanalysen wurden an 16 primären Bronchialkarzinomen unter Verwendung des Affymetrix GeneChips® Human Genome U133 Plus 2.0 durchgeführt, der Oligonukleotide für 47.400 Transkripte bzw. für 38.500 gut charakterisierte humane Gene enthält. Zu jedem Transkript befanden sich auf dem Expressionsarray 11 Probenpaare, die wiederum aus *Mismatch*- und *Perfect Match*-Sonden bestanden. Die Probenpaare eines Transkriptes bilden zusammen das *Probe-Set* (Probensatz). Die Qualität der Gesamt-RNA wurde zuvor mit dem Nanodrop Spektrophotometer und dem Bioanalyzer überprüft. Als Referenz diente Gesamt-RNA von normalem Lungengewebe von drei Patienten.

Der Nachweis der *Hybridization* und *Spiking Controls* belegte die ordnungsgemäße Durchführung der cDNA-Synthese, Amplifikation, Markierung und Hybridisierung der Mikroarrays. Um die Effizienz und Qualität der *in vitro* Transkription der Gesamt-RNA zu Biotin-markierter cRNA zu überprüfen und somit eine Vergleichbarkeit der Arrays zu gewährleisten, befanden sich auf dem

Expressionsarray Sonden für die 3'- und 5'-Region der *Housekeeping* Gene *GADPH* und β -*Aktin*. Während bei einmaliger Transkription der Gesamt-RNA zu cRNA ein Signal-Verhältnis der 3'- zur 5'-Sonde von eins zu erwarten ist, verschiebt sich dieses durch die zusätzliche *in vitro* Transkription des Two-Cycle-Target Kits in Richtung der 3'-Sonde und somit in den positiven Bereich. Für die Auswertung der Arrays war es wichtig, dass die Verhältnisse für *GADPH* und β -*Aktin* der einzelnen Arrays miteinander vergleichbar waren (s. Tabelle 6.5 im Anhang).

Für jeden einzelnen Mikroarray wurde der prozentuale Anteil der Signale unter allen *Probe-Sets* ermittelt, die als *absent* (fehlend), *marginal* (grenzwertig) oder *present* (vorhanden) angesehen wurde. Der mittlere Prozentsatz der detektierten Signale (*present*) für alle 16 Mikroarrays lag bei $56,6 \pm 3,1\%$. Dies war gut vergleichbar mit bereits veröffentlichten Expressionsdaten von Bronchialkarzinomgeweben, wo durchschnittlich 40-60% der Gene exprimiert vorgefunden wurden (151, 225-227). Zudem sprach die geringe Standardabweichung der Signale für eine gute Qualität und ausreichende Vergleichbarkeit der Arrays untereinander.

Aus den Intensitäten der Signale ergab sich das Verhältnis der Genexpression in der Tumorprobe zur Referenz, welches zur Basis 2 logarithmiert wurde (Log2Ratio). Bei einer Überexpression von Genen in der Tumorprobe nahm die Log2Ratio einen positiven und bei einer verminderten Genexpression einen negativen Wert an. Vergleiche der Log2Ratios der Expressionsprofile mit den Log2Ratios der Array-CGH zeigten eine deutliche Korrelation zwischen der DNA-Kopienanzahl und der veränderten Genexpression (s. Abbildung 3.12). Lagen DNA-Überrepräsentationen vor, führte dies zu einer allgemeinen Erhöhung der Genexpression. Verluste der DNA hingegen zogen eine verminderte Genexpression mit sich. Die Veränderungen innerhalb der DNA-Kopienanzahl und der Genexpression waren spezifisch für die jeweilige Tumorprobe und wiesen eine starke Korrelation auf.

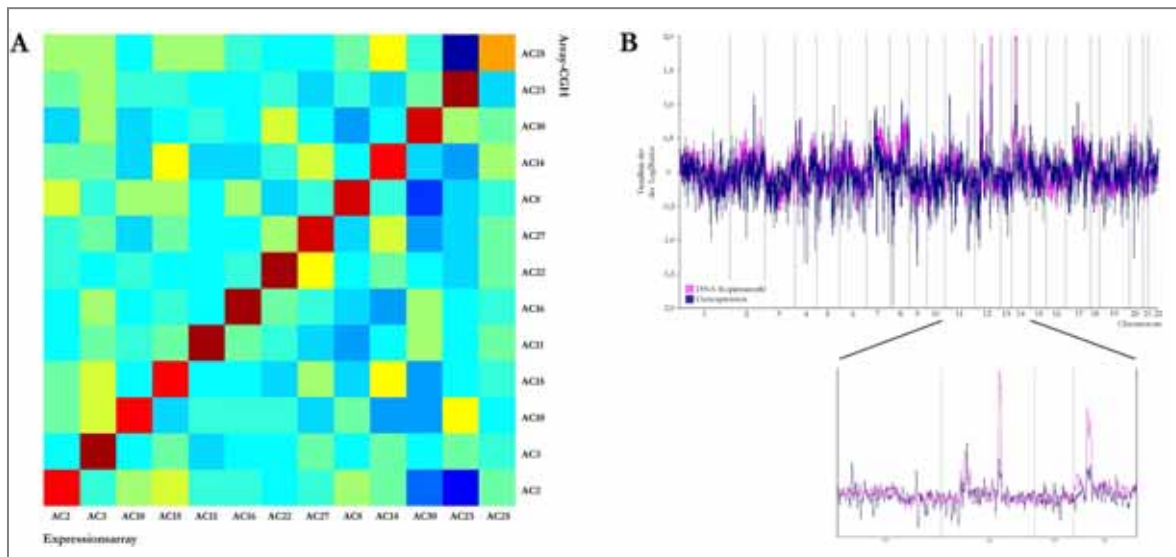


Abbildung 3.12. Korrelation der Genexpression mit der DNA-Kopienanzahl für jede einzelne Gewebeprobe. (A) Die *Heatmap* wurde mittels einer Pearson-Korrelation durch Vergleich der normalisierten Log2Ratios der Expressionsarrays (x-Achse) und der Array-CGH Ergebnisse (y-Achse) erhalten. Für die Berechnung wurde auf Basis der Ergebnisse für die Array-CGH den DNA-Gewinnen die Zahl 1, DNA-Verlusten die Zahl -1 und den normalen DNA-Kopienanzahl die Zahl 0 zugeordnet. Jede Zeile und Spalte in der *Heatmap* repräsentiert eine Gewebeprobe. Blaue Quadrate entsprechen einer geringen, rote einer hohen Korrelation der Log2Ratios. Wie zu erwarten, korrelieren nur die Log2Ratios der gleichen Gewebeprobe miteinander. (B) Darstellung des *Moving Averages* der Log2Ratios des Expressionsarrays (blau) und der Array-CGH (pink) einer Gewebeprobe gegen die einzelnen Chromosomen. Bei einer Vergrößerung der Chromosomen 11 bis 14 wird der starke Einfluss der DNA-Kopienanzahl auf die Genexpression sichtbar.

3.4.2 Differenziell exprimierte Gene in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus

Die Auswertung der Expressionsprofile erfolgte mit zwei unabhängigen Methoden und bezog sich jeweils auf das *Probe-Set* eines Transkriptes. DRF wurde für die Expressionsdaten in gleicher Weise verwendet wie zuvor für die Array-CGH. Zusätzlich wurden ROC-Analysen ohne Berücksichtigung der Chromosomenposition der Sonden durchgeführt, um Gene mit einem möglichen Einfluss auf die hämatogene Disseminierung zu identifizieren. ROC-Analysen sind eine gängige Methode, um eine differenzielle Genexpression zwischen mehreren Gruppen nachzuweisen (146, 209). *Probe-Sets* mit einem Signifikanzniveau kleiner 0,05 und einem ROC-Wert $<0,2$ oder $>0,8$ wurden als statistisch signifikant angesehen und als differenziell exprimiert in beiden Gruppen eingestuft. Insgesamt wurden 5,2% aller *Probe-Sets* ($n=1.733$) signifikant differenziell in den Gruppen KM-negativ und KM-positiv exprimiert – dies entsprach 1.491 verschiedenen Genen. Die differenziell exprimierten *Probe-Sets* wurden mittels des Klassifikationsprogramms Cluster 3.0 in der *complete linkage*-Methode des hierarchischen *Clusterings* analysiert (210). Das Hierarchische *Clustering* ist ein Verfahren bei dem Proben, die ein ähnliches Expressionsprofil aufweisen, in Gruppen (*Cluster*) zusammengefasst werden (228). Das Ergebnis wird in Form einer *Heatmap* in Kombination mit einem Dendrogramm graphisch dargestellt, bei dem die Länge der einzelnen Arme die Ähnlichkeit der Proben zueinander darstellt. Das Hierarchische *Clustering* aller differenziell exprimierten *Probe-Sets* führte zu einer Einteilung der

Tumorproben entsprechend ihres KM-Status in zwei Gruppen (s. Abbildung 6.1 im Anhang). Zusätzliche Analysen zur funktionellen Klassifizierung (*Gene Ontology Classification*) der 100 signifikantesten *Probe-Sets* im Vergleich zu allen auf dem Array vertretenden *Probe-Sets* zeigten, dass sich diese in 19 Unterkategorien ($p < 0,05$) einordnen ließen (s. Tabelle 6.6 im Anhang), welche in drei funktionelle Kategorien zusammengefasst werden konnten: allgemeine Regulation von zellulären Prozessen ($n=4$), Metabolismus ($n=7$) und Transkription ($n=8$).

Mittels Array-CGH wurden genomische Aberrationen abhängig vom KM-Status nachgewiesen. Damit diese sich auf den Phänotyp von Tumorzellen auswirken können, müssen sie darüber hinaus zu einer Veränderung in der Genexpression führen. Daher wurden die 32 chromosomalen Regionen auf Unterschiede innerhalb ihrer Genexpression in der KM-negativen und der KM-positiven Gruppe untersucht. Fünf der 32 signifikanten chromosomalen Regionen zeigten aufgrund von Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl ein differenzielles Genexpressionsmuster. Diese befanden sich auf den Chromosomen 4q, 10p, 10q, 17q und 20q (s. Tabelle 3.2). Tabelle 6.7 im Anhang zeigt für jede in der Array-CGH verwendete Tumorprobe die DNA-Kopienanzahl für diese fünf signifikanten chromosomalen Regionen. Eine Korrelation mit dem LK-Status sowie eine mit dem gleichzeitigen Auftreten verschiedener Aberrationen konnte nicht gefunden werden.

Von 2.390 *Probe-Sets*, die innerhalb der fünf signifikanten Regionen lagen, wurden 9,6% ($n=230$) differenziell exprimiert, was 104 Genen entsprach. Insgesamt waren dies durchschnittlich mehr *Probe-Sets* als auf den übrigen Loci ($p < 0,006$). Die Regionen auf 4q und 10p wiesen, unabhängig von ihrer chromosomalen Größe, eine überdurchschnittlich große Anzahl an differenziell exprimierten *Probe-Sets* auf ($p=0,02$ bzw. $p=0,03$). Differenziell exprimierte *Probe-Sets* wurden entweder verteilt über die chromosomale Regionen von 10q21-q22 und 20q11-q13 oder *geclustert* in sogenannte „*Hot Spots*“ auf 4q, 10p und 17q vorgefunden (s. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2. Chromosomale Regionen mit signifikanten Veränderungen sowohl in der DNA-Kopienanzahl als auch in der Genexpression abhängig von der hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen in das KM.

Chromosomale Region	<i>Hot spot</i>	Chromosomale Position [Bp] *		Größe [MBp]	Anzahl differenziell exprimierter Gene (gesamt) §	p-Wert †
		Start	Stopp			
4q12-q32		53.366.370	160.418.260	107,1	73 (361)	0,018
	4q12	54.167.910	57.736.376	3,6		0,014
	4q13.3	71.919.290	72.224.426	0,3		< 0,001
	4q13.3	75.390.722	76.955.477	1,6		0,001
	4q21.22-q22.1	84.169.468	88.716.020	4,5		< 0,001
	4q31.3	154.058.720	155.829.160	1,8		< 0,001
10p12-p11		21.226.537	33.663.602	12,4	10 (51)	0,033
	10p12.1-p11.23	27.464.067	30.357.407	2,9		0,005
10q21-q22		69.901.693	81.498.257	11,7	5 (86)	0,657
17q21		35.634.377	46.397.044	11,0	5 (205)	0,240
	17q21.1-21.2	35.634.377	36.107.770	0,5		0,032
20q11-q13		30.636.537	56.318.195	25,8	11 (209)	0,548

* Chromosomenlokalisierung basierend auf UCSC Blat (Version März 2006).

§ Signifikanz der Gene basiert auf ROC-Analysen (ROC-Wert < 0,2 oder > 0,8 und p-Wert < 0,05).

† Signifikanz beruht auf Anzahl der differenziell exprimierten *Probe-Sets* innerhalb der chromosomalen Region verglichen mit dem Durchschnitt

Die chromosomalen Regionen 4q12-q32, 10p12-p11 und 10q21-q22 lagen signifikant häufiger unterrepräsentiert in der KM-positiven und überrepräsentativ in der KM-negativen Gruppe vor. Dies führte dementsprechend auf der einen Seite zu einer verminderten Expression einzelner Gene in der KM-positiven und auf der anderen Seite zu einer erhöhten Genexpression in der KM-negativen Gruppe. 17q21 und 20q11-q13 zeigten eine DNA-Überrepräsentation in der KM-positiven Gruppe, was mit einer Überexpression einzelner Gene einherging. Insgesamt wurden in den fünf signifikanten chromosomalen Regionen 104 Gene identifiziert, welche basierend auf ROC-Analysen differenziell exprimiert vorlagen (s. Tabelle 3.2 und 6.8 im Anhang). In Tumorgewebe von KM-positiven Patienten lagen 48 Gene unterexprimiert vor. Abbildung 3.13 zeigt das hierarchische *Clustering* dieser 104 Gene. Die Gene wurden in zwei Hauptarme eingeordnet, die sich wiederum in drei separate Arme unterteilen ließen. Dabei enthielt ein Arm alle, bis auf einen, KM-negativen Patienten. Verglichen mit allen Genen auf dem Array zeigten die 104 differenziell exprimierten Gene in folgenden funktionellen Kategorien eine signifikante Anreicherung: Enzymaktivierung (n=58), Biopolymer-Metabolismus (n=27), Zellorganisation und Biogenese (n=16), Chromosomenorganisation und Biogenese (n=11) und positive Regulation der Zellproliferation (n=4) (s. Tabelle 6.6 im Anhang).

3.4.3 Differenziell exprimierte Gene in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

Es wurden 12 chromosomale Regionen gefunden, die Veränderungen in ihrer DNA-Kopienanzahl in Abhängigkeit vom LK-Status aufwiesen. Gene, die in diesen Bereichen liegen, wurden daraufhin auf eine differenzielle Genexpression in den Gruppen LK-negativ und LK-positiv untersucht. Die Durchführung der Auswertung erfolgte wie bereits unter Kapitel 3.4.2 beschrieben.

Insgesamt wurden 3,5% aller *Probe-Sets* (n=1164) signifikant differenziell in den beiden Gruppen exprimiert (p-Wert < 0,05 und ROC-Wert < 0,2 oder > 0,8). Dieses entsprach 917 bekannten Genen.

Keine der 12 signifikanten chromosomalen Regionen für Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl zeigten einen signifikanten Unterschied in ihrer Genexpression. Von 1.391 *Probe-Sets*, die innerhalb dieser Regionen lagen, wurden lediglich 30 differenziell exprimiert (s. Tabelle 6.4 im Anhang). Die differenziell exprimierten Gene lagen verteilt über die chromosomalen Regionen. Wie schon die Ergebnisse der Array-CGH zeigten, konnten keine *Hot spots* gefunden werden.

Es konnten für den Status der Lymphknoten keine spezifischen chromosomale Regionen gefunden werden, deren Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl zu einer differenziellen Genexpression zwischen den beiden Gruppen führte.

3.5 Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl in den Chromosomenabschnitten 4q und 17q in Abhängigkeit zur hämatogenen Disseminierung ins Knochenmark

3.5.1 Etablierung und Validierung von DNA-Sonden für 4q und 17q

Chromosomale Untersuchungen mit Array-CGH und Expressionsanalysen an 30 primären Bronchialkarzinomgeweben führten zur Identifizierung von fünf chromosomalen Regionen, die sowohl signifikante Veränderungen in ihrer DNA-Kopienanzahl als auch Unterschiede in der Genexpression in Abhängigkeit zur hämatogenen Disseminierung in das KM aufwiesen. Zur Validierung und Verifizierung an einem größeren Patientenkollektiv wurden für die chromosomalen Regionen 4q21.23 und 17q21.31 spezifische DNA-Sonden etabliert und FISH-Analysen durchgeführt. BAC-Klone mit entsprechenden *Inserts* wurden angezogen, die BAC-DNA isoliert und mit der Methode des *Random Primings* mit Fluoreszenz-markierten dUTPs markiert. Zur Überprüfung der Spezifität wurde zunächst für jede einzelne DNA-Sonde die FISH an Metaphasechromosomen und Lymphozyten eines gesunden Probanden etabliert (s. Abbildung 3.14). Als grundlegende Bedingungen für eine spezifische Hybridisierung musste die DNA-Sonde in die Zelle eindringen und die Zellmorphologie erhalten bleiben. Um die Aussagekraft der

weiteren Untersuchungen zu gewährleisten, wurden nur DNA-Sonden mit einer hohen Spezifität, gut auswertbaren Signalen und geringen Hintergrundsignalen verwendet. Für diese wurden weitere Protokolle für die Färbung an Gefrier- und Paraffingewebeschnitten etabliert. Als Referenz-Sonden wurde kommerziell erwerbliche Zentromer-Sonden für die Chromosomen 10, 12, 15 und 17 verwendet. Für die Auswertung wurde das Verhältnis von Signalen der DNA-Sonde zu Signalen der Zentromer-Sonde bestimmt. Anhand der Auswertung und der Bestimmung des experimentellen Fehlers von FISH an normalen Zellen in infiltrierten Tumorgewebe ergaben sich als Abgrenzungen zu dem Normalzustand ein Verhältnis von $\geq 1,5$ für eine DNA-Überrepräsentation und $\leq 0,75$ für einen DNA-Verlust.

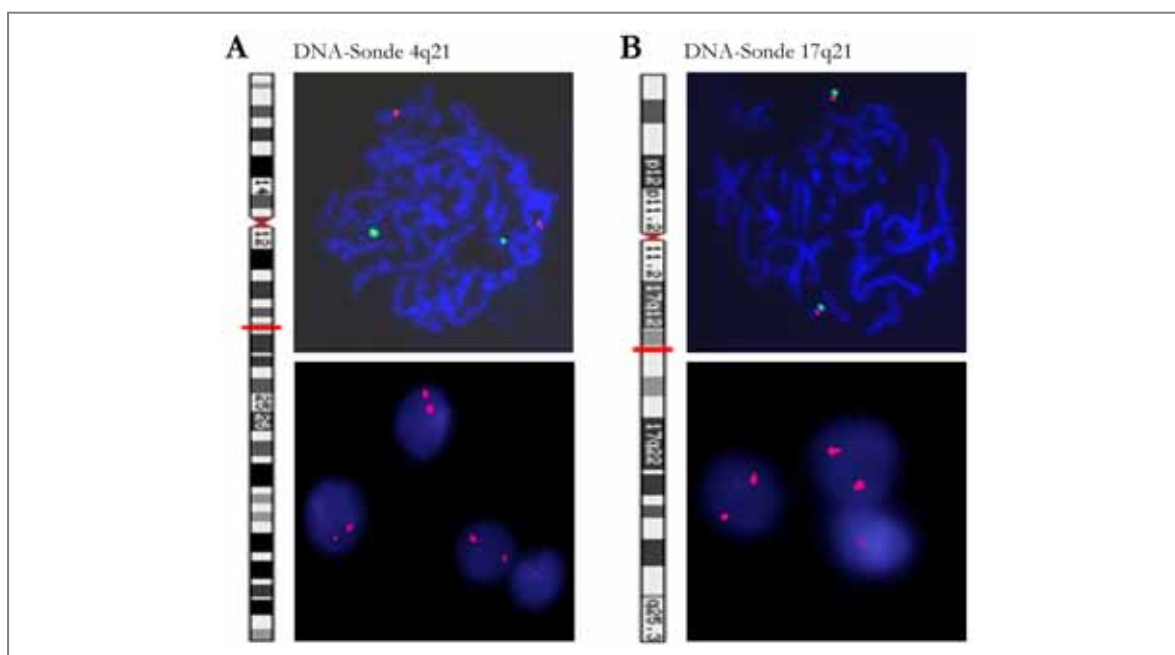


Abbildung 3.14. FISH an Metaphasechromosomen und Lymphozyten eines gesunden Probanden für (A) 4q21 und (B) 17q21. Die Lage der DNA-Sonden auf dem jeweiligen Chromosom wird durch einen waagerechten roten Strich markiert. (A) Die DNA-Sonde 4q21 wird durch rote und die Zentromer-Sonde 15 durch grüne Fluoreszenz-Signale dargestellt. FISH an Lymphozyten wurde ohne eine Zentromer-Sonde durchgeführt. Die DNA-Sonden binden spezifisch an die Chromosomen, keine Hintergrundsignale vorhanden. (B) DNA-Sonde 17q21 durch rote und Zentromer-Sonde 17 durch grüne Fluoreszenz-Signale dargestellt. FISH an Metaphasechromosomen zeigt deutlich die Spezifität der DNA-Sonde für 17q21. Beide Sonden hybridisieren spezifisch an Chromosom 17 ohne die Bildung von Hintergrundsignalen. Die Bilder wurden mit einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen.

Gefriergewebeschnitte von Tumorproben, mit deren genomischen DNA bereits Array-CGH durchgeführt wurde, dienten zur Validierung der Ergebnisse für 4q21 und 17q21. FISH-Analysen an 14 Tumorgewebeschnitten – drei mit DNA-Gewinnen, drei mit DNA-Verlusten und acht mit normaler DNA-Kopienanzahl – wurden für 4q21 durchgeführt. Alle auf der Array-CGH basierenden chromosomalen Aberrationen konnten bestätigt werden. Während mit Array-CGH bei einer Tumorprobe keine chromosomalen Veränderungen festgestellt wurden, wurde mit der

FISH ein Verlust der DNA detektiert. In diesem Fall mussten für die Array-CGH und für die FISH-Analyse unterschiedliche Bereiche des Tumorgewebes verwendet werden. Die Heterogenität von Bronchialkarzinomen kann zu Veränderungen des Aberrationsmusters innerhalb des Tumorgewebes und somit zu voneinander abweichenden Ergebnissen führen. In der weiteren Auswertung wurde für diese KM-negativen Patienten ein Verlust der DNA in 4q21 angenommen.

Die DNA-Kopienanzahl bei neun von zehn Tumorproben (eine mit DNA-Verlust, vier mit DNA-Überrepräsentationen und fünf mit unveränderter DNA-Kopienanzahl) stimmten mit den Ergebnissen der Array-CGH für 17q21 überein. Ein DNA-Verlust konnte mit einer Sonde/Zentromer 17-Ratio von 0,83 bzw. Sonde/Zentromer 15-Ratio von 0,73 nicht eindeutig bestimmt werden. Fünf der 14 verwendeten Tumorgewebe zeigten in den FISH-Analysen Polyploidie für die Chromosomen 15 und 17 (vier tri- und eine tetraploide Probe). Die Abbildungen 3.15 und 3.16 zeigen repräsentative Ergebnisse der FISH für 4q21 und 17q21 für jeweils drei Gewebeproben im Vergleich zu den entsprechenden Ergebnissen der Array-CGH.

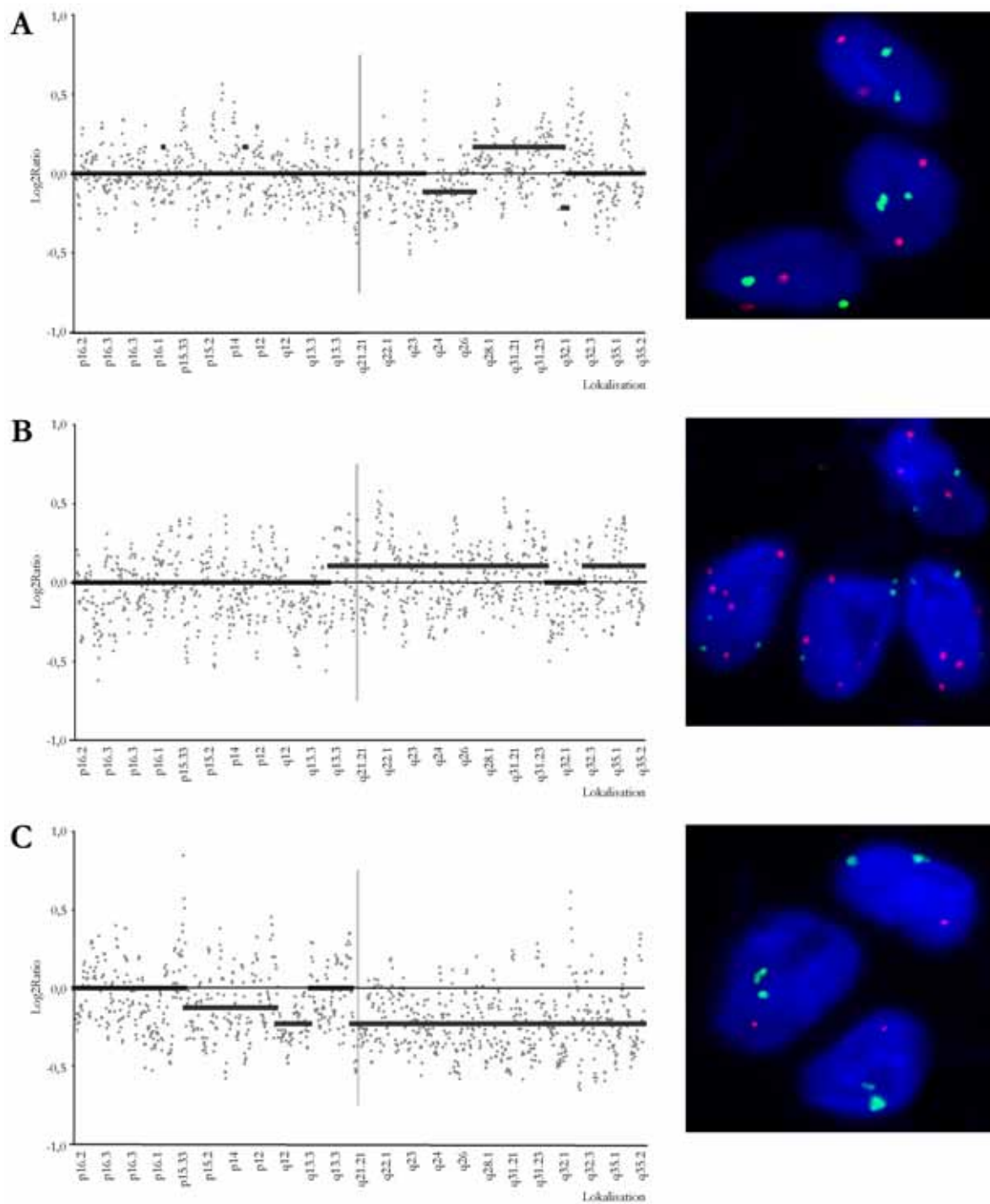


Abbildung 3.15. FISH-Analysen für 4q21 im Vergleich zur Array-CGH von drei Tumorgeweben. In den Diagrammen für die Array-CGH sind die Log2Ratios gegen die chromosomalen Banden des Chromosoms 4 aufgetragen. Die chromosomale Lage der DNA-Sonde wird durch einen senkrechten, grauen Strich markiert. Die DNA-Sonde für 4q21 wird in den Bildern der FISH durch orangene Signale und die Zentromer-Sonde 15 durch die Pseudofarbe grün dargestellt. Die Bilder wurden mit einer 630 fachen Vergrößerung aufgenommen. (A) Diploide Tumorzellen einer KM-negativen Tumorprobe (AC29) mit unveränderter DNA-Kopienanzahl für 4q21. (B) Diploide Tumorzellen einer KM-negativen Tumorprobe (AC7) mit einer DNA-Überrepräsentation von 4q21. (C) Für Zentromer 15 diploide Tumorzellen einer KM-positiven Gewebeprobe (AC30) mit einem Allel-Verlust von 4q21. Die Ergebnisse der FISH-Analysen korrelierten mit den Ergebnissen der Array-CGH.

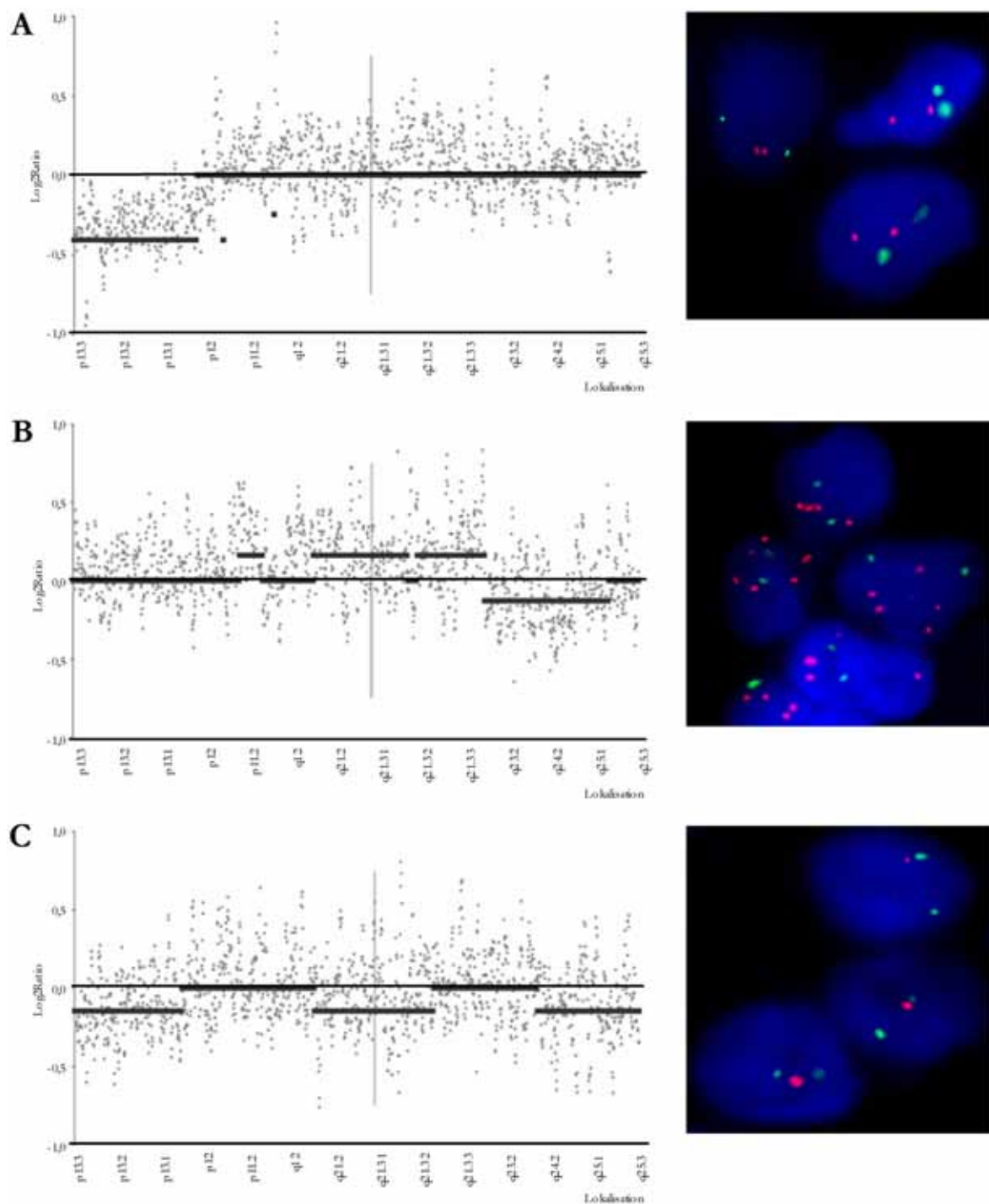


Abbildung 3.16. FISH-Analysen für 17q21 im Vergleich zur Array-CGH von drei Tumorgeweben. In den Diagrammen für die Array-CGH sind die Log2Ratios gegen die chromosomalen Banden des Chromosoms 17 aufgetragen. Die chromosomale Lage der DNA-Sonde wird durch einen senkrechten, grauen Strich markiert. In den Bildern der FISH-Analyse wird die DNA-Sonde für 17q21 durch orangefarbene Signale und die Zentromer-Sonde 17 durch die Pseudofarbe Grün dargestellt. Die Bilder wurden mit einer 630 fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Zentromer-Sonde 17 lag entsprechend der Array-CGH in jeder Zelle im diploiden Zustand vor. (A) Normale DNA-Kopienanzahl für 17q21 einer KM-positiven Tumorseite (AC30). (B) DNA-Überrepräsentation von 17q21 in einer KM-positiven Tumorseite (AC27) und (C) Verlust eines Allels in einer KM-negativen Tumorseite (AC2). Die Ergebnisse der FISH korrelierten mit den Ergebnissen der Array-CGH.

3.5.2 Korrelation der chromosomalen Aberrationen mit klinischen und pathologischen Faktoren

Zur Verifikation der genomischen Veränderungen in 4q und 17q an einem größeren Patientenkollektiv wurden weitere FISH-Analysen an Gefriergewebeschnitten und an einem TMA mit Stanzen primärer Bronchialkarzinome durchgeführt. Aufgrund von fehlenden Tumorzellen in den Gewebestanzen, während der Färbung abgelöstem Gewebe und dem Vorhandensein von nekrotischem oder beschädigtem Gewebe, konnte nicht von allen in den TMA integrierten Gewebeproben ein interpretierbares Ergebnis erzielt werden.

Eine mögliche Korrelation zwischen DNA-Verlusten von 4q21 bzw. DNA-Gewinnen von 17q21 und der frühzeitigen hämatogenen Disseminierung in das KM wurde daher an interpretierbaren FISH-Analysen von weiteren 58 bzw. 31 Tumorproben mit bekanntem KM-Status statistisch evaluiert. Keiner dieser Patienten wies zum Zeitpunkt der Primärdiagnose Fernmetastasen auf.

3.5.2.1 Korrelation von DNA-Verlusten in 4q21 mit klinischen und pathologischen Faktoren

Interpretierbare Ergebnisse für die FISH-Analysen in 4q21 konnten von 18 KM-positiven und 40 KM-negativen Tumorproben erhalten werden. Korrelierend mit den Ergebnissen der Array-CGH wurde ein DNA-Verlust von 4q21 signifikant häufiger in KM-positiven (50%) als in KM-negativen Patienten (10%) beobachtet ($p=0,003$). Ein mit dem KM-Status assoziiertes Auftreten von DNA-Überrepräsentationen konnte dahingegen nicht nachgewiesen werden (6% vs. 12%). Durch Kombination der Ergebnisse der FISH-Analyse und der Array-CGH lag letztendlich die DNA-Kopienanzahl von 4q21 für 88 Patienten mit bekanntem KM-Status vor. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem DNA-Verlust von 4q21 und dem Vorhandensein von DTZ im KM (38% vs. 9%, $p=0,002$) (s. Tabelle 3.3). Dabei handelte es sich jeweils um den Verlust von nur einem Allel. Univariate Analysen unter Verwendung des Fisher's Exact Test zeigten, dass der KM-Status, die Histologie und das Geschlecht die einzigen Faktoren waren, die signifikant mit dem Auftreten von DNA-Verlusten in 4q21 assoziiert waren. Interessanterweise schien ein DNA-Verlust von 4q häufiger in KM-positiven Patienten mit einem SCC (32%) aufzutreten als in KM-positiven Patienten mit einem AC (11%; $p=0,027$). Die multivariate Analyse (binäre logistische Regression) zeigte, dass es sich bei dem KM-Status um den einzigen unabhängigen Faktor handelte, der mit einem DNA-Verlust von 4q korrelierte ($p=0,003$).

Tabelle 3.3. Auftreten von DNA-Verlusten in 4q21 in Korrelation mit klinischen und pathologischen Faktoren.

	Anzahl (n=88)	Aberrationen in 4q21 (n)			univariater p-Wert *	multivariater p-Wert **
		DNA-Verlust	DNA-Gewinn	normal		
KM-Status (n=88)					0,002	0,003
negativ	56	9% (5)	18% (10)	73% (41)		
positiv	32	38% (12)	6% (2)	56% (18)		
LK-Status (n=88)					0,788	NS
negativ	42	21% (9)	19% (8)	60% (25)		
positiv	46	17% (8)	9% (4)	74% (34)		
Histologie (n=82) †					0,027	NS
AC	45	11% (5)	16% (7)	73% (33)		
SCC	37	32% (12)	8% (3)	60% (22)		
Geschlecht (n=88)					0,044	NS
weiblich	30	8% (2)	17% (5)	77% (23)		
männlich	58	26% (15)	12% (7)	62% (36)		
Tumorgroße (n=88)					0,134	NS
pT1/2	74	16% (12)	15% (11)	69% (51)		
pT3/4	14	36% (5)	7% (1)	57% (8)		
Differenzierungsgrad (n=82) ‡					0,779	NS
G1/2	46	17% (8)	11% (5)	72% (33)		
G3	36	17% (6)	14% (5)	69% (25)		

* univariater p-Wert berechnet mit Fisher's Exact Test für DNA-Verluste vs. Summe aus DNA-Gewinnen und normaler DNA-Kopienanzahl

** binäre logistische Regression für das Auftreten von DNA-Verlusten in 4q21 unter Einbeziehung der unabhängigen Variablen KM-Status, LK-Status, Histologie, Differenzierungsgrad, Geschlecht, Ploidie und Tumorgroße; akzeptierte Fehlerwahrscheinlichkeit von 5%

† aufgrund der geringen Anzahl an Patienten wurden LCLC (n=5) und SCLC (n=1) ausgeschlossen

‡ aufgrund von fehlenden klinisch-pathologischen Daten variierte die Gesamtanzahl an Proben

Zusätzlich wurden FISH-Analysen für 4q21 an einem TMA mit 36 auswertbaren Stanzen (von 40) von Gehirnetastasen von primären Bronchialkarzinomen mit den Zentromeren 15 und 11 als Referenzen durchgeführt. 39% der Metastasen zeigten den Verlust eines Allels von 4q, wohingegen DNA-Gewinne nur in 6% der Stanzen gefunden wurden. Univariate Analysen wiesen keine Korrelation von DNA-Verlusten auf 4q21 mit der Histologie, dem Alter und dem Geschlecht nach (s. Tabelle 3.4). Ähnlich zu KM-positiven Primärtumoren wurde ein DNA-Verlust von 4q häufiger in SCC als in AC detektiert (50% vs. 36%). Interessanterweise konnte in 33% der Stanzen ein Verlust des Zentromers 15 nachgewiesen werden, wobei es sich bei zwei Stanzen um den Verlust beider Allele und in den restlichen zehn Stanzen um den Verlust eines Allels handelte. Ein DNA-Gewinn für Zentromer 15 wurde dahingegen nur in einem Fall beobachtet (3%). Eine Korrelation von den Aberrationen des Zentromers 15 mit DNA-Verlusten von 4q21 wurde nicht gefunden.

Tabelle 3.4. Korrelation von chromosomalen DNA-Verlusten in 4q21 in Gehirnmetastasen mit pathologischen Faktoren.

	Anzahl (n=36)	Anzahl an Aberrationen in 4q21 (n)			univariater p-Wert *
		DNA-Verlust	DNA-Gewinn	normal	
Gesamt	36	39% (14)	6% (2)	55% (20)	
Histologie (n=32) ‡					0,692
AC	14	36% (5)	0	64% (9)	
SCC	10	50% (5)	10% (1)	40% (4)	
LCLC	1	0	0	100% (1)	
SCLC	7	43% (3)	0	57% (4)	
Geschlecht (n=36)					0,473
weiblich	14	50% (7)	7% (1)	43% (6)	
männlich	22	32% (7)	4% (1)	64% (14)	
Alter (n=36)					0,139
bis 57 Jahre	20	25% (5)	5% (1)	79% (14)	
ab 57 Jahre	16	56% (9)	6% (1)	38% (6)	

* univariater p-Wert berechnet mit Fisher's Exact Test für DNA-Verluste vs. Summe aus DNA-Gewinnen und normaler DNA-Kopienanzahl

‡ Daten zur Histologie fehlten von vier Gehirnmetastasen; p-Wert berechnet mit Chi²-Test nach Pearson

3.5.2.2 Korrelation von DNA-Gewinnen in 17q21 mit klinischen und pathologischen Faktoren

Array-CGH und Expressionsanalysen zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen DNA-Überrepräsentationen in 17q21 und der daraus resultierenden Überexpression einzelner Gene mit der hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen in das KM. Von weiteren 31 primären Bronchialkarzinomen wurden auswertbare Ergebnisse für die DNA-Kopienanzahl in 17q21 erhalten. Es wurde weder eine signifikante Korrelation der DNA-Gewinne mit dem KM-Status, noch mit dem LK-Status, der Histologie, dem Geschlecht und dem Differenzierungsgrad gefunden. Auch bei Kombination der FISH-Analysen mit den Ergebnissen der Array-CGH konnten keine signifikanten Assoziationen zu klinischen und pathologischen Faktoren nachgewiesen werden (s. Tabelle 3.5). Weiterhin bestand kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DNA-Verlusten in 4q21 und DNA-Gewinnen in 17q21 in der KM-positiven Gruppe.

Tabelle 3.5. Auftreten von DNA-Gewinnen in 17q21 in Korrelation mit klinischen und pathologischen Faktoren.

	Anzahl (n=61)	Aberrationen in 17q21 (n)			univariater p-Wert *	multivariater p-Wert **
		DNA-Verlust	DNA-Gewinn	normal		
KM-Status (n=61)					0,767	NS
negativ	44	5% (2)	34% (5)	61% (27)		
positiv	17	6% (1)	41% (7)	53% (9)		
LK-Status (n=61)					0,286	NS
negativ	29	3% (1)	28% (8)	69% (20)		
positiv	32	6% (2)	44% (14)	50% (16)		
Histologie (n=59) †					0,555	NS
AC	42	7% (3)	41% (17)	52% (22)		
SCC	17	0	24% (4)	76% (13)		
Geschlecht (n=61)					1,000	NS
weiblich	23	4% (1)	35% (8)	61% (14)		
männlich	38	5% (2)	37% (14)	58% (22)		
Tumorgroße (n=61)					0,341	NS
pT1/2	33	6% (2)	21% (7)	73% (24)		
pT3/4	25	4% (1)	60% (15)	36% (9)		
Differenzierungsgrad (n=51) ‡					0,380	NS
G1/2	32	6% (2)	35% (11)	59% (19)		
G3	22	4% (1)	55% (12)	41% (9)		

* univariater p-Wert berechnet mit Fisher's Exact Test für DNA-Gewinne vs. Summe aus DNA-Verlusten und normaler DNA-Kopienanzahl

** binäre logistische Regression für das Auftreten von DNA-Gewinnen in 17q21 unter Einbeziehung der unabhängigen Variablen KM-Status, LK-Status, Histologie, Differenzierungsgrad, Geschlecht, Ploidie und Tumorgroße; akzeptierte Fehlerwahrscheinlichkeit von 5%

† aufgrund der geringen Anzahl an Patienten wurden LCLC (n=3) und andere (n=1) ausgeschlossen

‡ aufgrund von fehlenden klinisch-pathologischen Daten variierte die Gesamtanzahl an Proben

3.5.2.3 Korrelation von Polyploidien mit klinischen und pathologischen Faktoren

Anhand der Verwendung von mehreren Zentromer-Sonden konnten Vermutungen bezüglich der Ploidie der Tumorzellen einer Gewebeprobe gemacht werden. Jeder Gewebeschnitt wurde mit mindestens zwei verschiedenen Zentromer-Sonden untersucht, bei fraglichen Ergebnissen wurden ein bis zwei weitere verwendet. Polyploidien konnten in 30% der Tumorproben (gesamt n=73) nachgewiesen werden. Hierbei traten 18 Tumorgewebe mit triploiden und vier mit tetraploiden Tumorzellen auf. Das Auftreten von Polyploidien konnte häufiger in Tumorgeweben mit Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl in 4q21 oder 17q21 gefunden werden (s. Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6. Ploidie in Korrelation mit klinischen und pathologischen Faktoren.

	Anzahl	Ploidie (n)		univariater p-Wert *
		2n	>2n	
4q21 (n=71)				0,214
Verlust	16	56% (9)	44% (7)	
Gewinn/normal	55	75% (41)	25% (14)	
17q21 (n=45)				0,511
Gewinn	17	65% (11)	35% (6)	
Verlust/normal	28	75% (21)	25% (7)	
KM-Status (n=73)				0,436
negativ	48	73% (35)	27% (13)	
positiv	25	64% (16)	36% (9)	
LK-Status (n=73)				1,000
negativ	36	69% (25)	31% (11)	
positiv	37	70% (26)	30% (11)	
Histologie (n=68) †				0,191
AC	33	61% (20)	39% (13)	
SCC	35	77% (27)	23% (8)	
Geschlecht (n=73)				0,412
weiblich	23	78% (18)	22% (5)	
männlich	50	66% (33)	34% (17)	
Tumorgroße (n=73)				0,742
pT1/2	60	68% (41)	32% (19)	
pT3/4	13	77% (10)	23% (3)	
Differenzierungsgrad (n=65)‡				0,426
G1/2	34	74% (25)	26% (9)	
G3	31	61% (19)	39% (12)	

* univariater p-Wert berechnet mit Fisher's Exact Test

† aufgrund der geringen Anzahl an Patienten wurden LCLC (n=5) ausgeschlossen

3.6 Identifikation von Tumorsuppressorgenen auf 4q mittels Methylierungsstudien an bronchialen Zelllinien

Die genomischen Analysen und das Erstellen von Expressionsprofilen an primären Bronchialkarzinomen zeigten eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten von DNA-Verlusten auf 4q, die zu einer verminderten Genexpression führten, mit dem Vorhandensein von DTZ im KM. Dabei handelte es sich bei den DNA-Unterrepräsentationen von 4q jeweils um den Verlust von nur einem Allel. Zur vollständigen Inhibierung der Expression von Tumorsuppressorgenen muss nach der *Two Hit*-Hypothese von Knudson (7) die Genexpression des zweiten Allels durch weitere Modifikationen wie Mutationen oder Hypermethylierungen zusätzlich reprimiert werden (73). Die Bedeutung von Veränderungen im DNA-

Methylierungsmuster, vorwiegend in den Promoterbereichen von tumorassoziierten Genen, spielt sowohl bei der Entstehung und Progression von malignen Tumoren als auch bei deren Metastasierung in distante Organe eine entscheidende Rolle. Anhand von drei humanen bronchialen Tumorzelllinien (H1993, H1395 und HTB-56), die einen heterozygoten chromosomalen Verlust auf 4q aufwiesen, wurde der Einfluss aberranter Hypermethylierungen auf die Genexpression untersucht (194, 195). Durch Erstellen von Expressionsprofilen dieser drei Zelllinien mit Hilfe der Mikroarraytechnik und Vergleich mit einer Zelllinie aus nicht malignen epithelialen Lungengewebe (BEAS-2B), konnten mögliche Tumorsuppressorgene auf Chromosom 4q identifiziert werden.

3.6.1 Genomische Charakterisierung der humanen Zelllinien

Die Ploidie und DNA-Kopienanzahl für 4q der drei humanen bronchialen Tumorzelllinien H1395, H1993 und HTB-56 wurde anhand von FISH-Analysen, Array-CGH und Karyogrammen an Metaphasechromosomen bestimmt. Als Referenz wurde die Zelllinie BEAS-2B verwendet und ebenfalls zunächst auf genomischer Ebene charakterisiert.

Bei der Referenz-Zelllinie BEAS-2B handelt es sich um durch SV40-Transformation immortalisierte humane Epithelzellen der Bronchien (193), die mit durchschnittlich 46 Chromosomen pro Zelle (variiert von 45 bis 48) einen diploiden Karyotypen aufwiesen. Anhand von Giemsa-gefärbten Metaphasechromosomen wurde ein Karyogramm erstellt, welches in Übereinstimmung mit der Array-CGH und den FISH-Analysen nur einige wenige auffällige chromosomalen Veränderungen aufwies (s. Abbildung 3.18 und 3.19). Für die chromosomale Region 4q lag, wie erwartet, ebenfalls eine normale DNA-Kopienanzahl vor. In allen untersuchten Zellen wurde sowohl ein X- als auch ein Y-Chromosom nachgewiesen, so dass es sich bei dieser Zelllinie eindeutig um einen männlichen Karyotypen handelte. Die Tumorzelllinien H1395, H1993 und HTB-56 wiesen hingegen starke Veränderungen innerhalb ihrer Chromosomenstruktur auf. Aufgrund von diversen Translokationen, Inversionen, DNA-Verlusten und Überrepräsentationen konnten mehrere Metaphasechromosome der Karyogramme nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Zelllinie H1993 war mit durchschnittlich 86 Chromosomen pro Zelle (79-92) tetraploid (s. Abbildung 3.19). Veränderungen in der Chromosomenstruktur verhinderte die Zuordnung von jeweils 10 Metaphasechromosomen. Die DNA-Kopienanzahl für 4q schwankte mit zwei bis fünf Allelen pro Zelle, sowohl bei den FISH-Analysen für 4q21 als auch bei der Auswertung der Metaphasechromosomen. Durchschnittlich wurden für 4q drei Allele nachgewiesen, was bei einer vorliegenden Tetraploidie eine chromosomale Unterrepräsentation bedeutete. Die Ergebnisse der Array-CGH zeigten hingegen deutlich, dass ein Verlust von 4q vorlag (s. Abbildung 3.18). Bei dieser Zelllinie handelte es sich um einen weiblichen Karyotypen, wobei die Anzahl der X-Chromosome zwischen eins und vier pro Zelle variierte. Allgemein zeigten die Untersuchungen

zur Ploidie, dass es sich bei H1993 um eine äußerst instabile Zelllinie handelte. Die Zelllinie H1395 wies durchschnittlich 57 Chromosomen pro Zelle (54-59) auf und war somit als hypotriploid zu bezeichnen. Die Chromosomen 1, 2, 5, 7, 8, 14, 16, 17, 18 und 19 lagen triploid vor, wobei sich drei Metaphasechromosomen nicht zuordnen ließen. Entsprechend den FISH-Analysen zeigte die DNA-Kopienanzahl für 4q21 mit entweder einem oder mit zwei Allelen einen Verlust auf, was durch die Array-CGH ebenfalls belegt werden konnte (s. Abbildung 3.18 und 3.19). Das Geschlecht dieser Zelllinie ließ sich nicht eindeutig bestimmen. Da kein Y- und nur ein X-Chromosom pro Zelle nachweisbar war, wurde von einem weiblichen Karyotyp ausgegangen.

Untersuchungen an Metaphasechromosomen zeigten, dass die Zelllinie HTB-56 mit durchschnittlich 56 Chromosomen pro Zelle (55-58) ebenfalls hypotriploid war (s. Abbildung 3.19). Während die Giemsa-Färbung der Metaphasechromosomen das Vorhandensein von durchschnittlich drei Chromosomen 4 pro Zelle zeigte, konnte dies mit FISH-Analysen für 4q21 nicht nachgewiesen werden (2 Allele pro Zelle). Die Ergebnisse der Array-CGH belegten, dass in dieser Zelllinie ein Verlust des gesamten Chromosoms 4 vorlag (s. Abbildung 3.18). Bei dieser Zelllinie handelte es sich um einen männlichen Karyotyp.

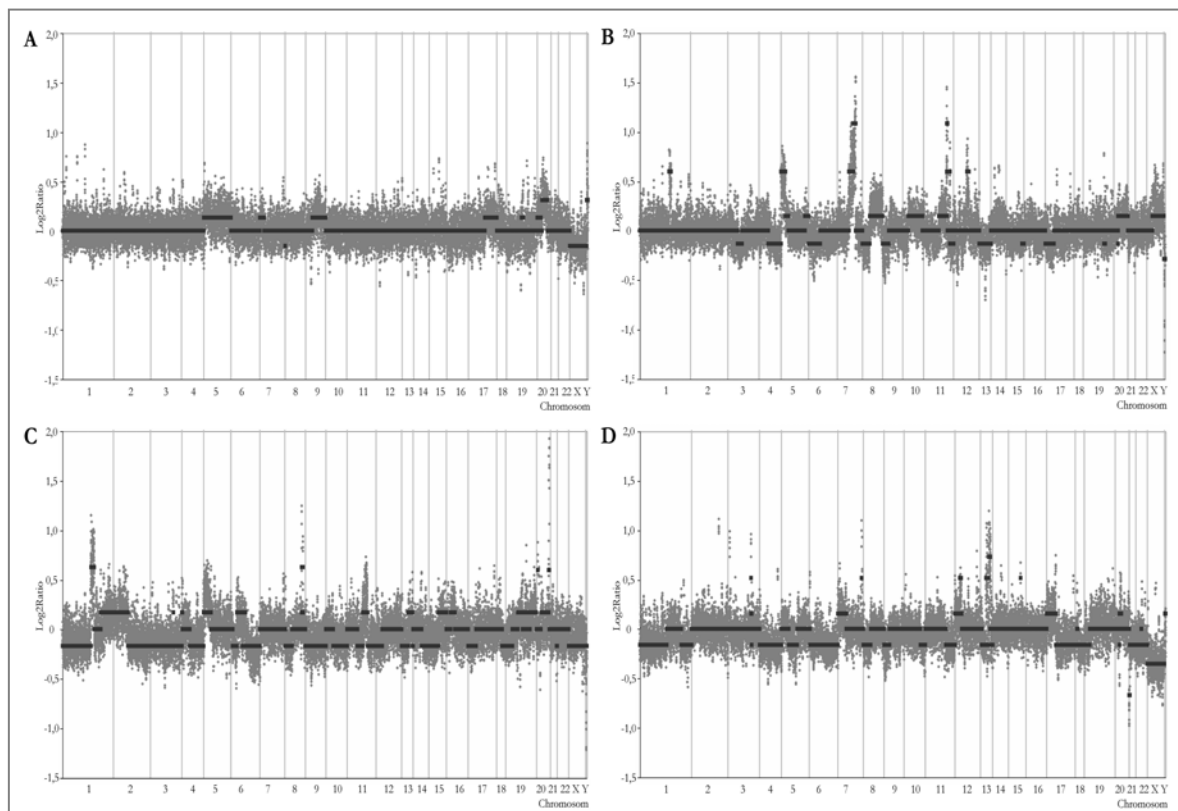
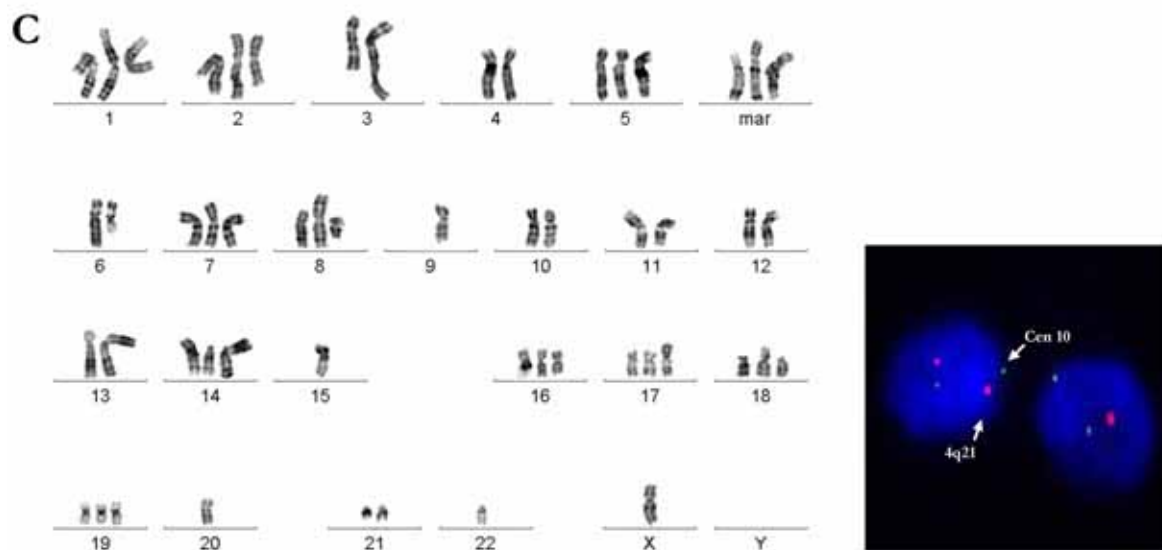
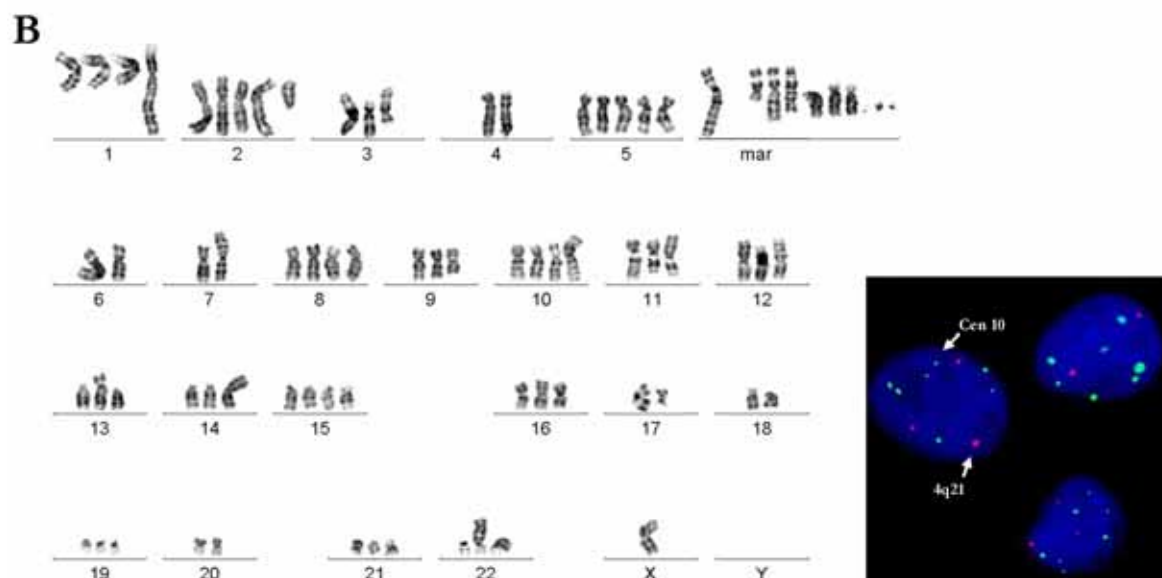
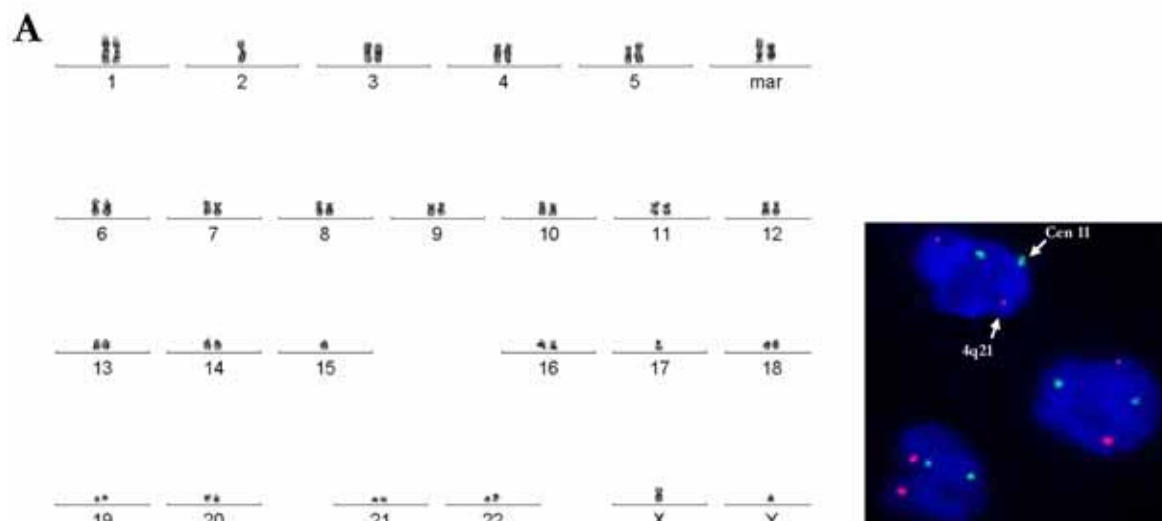


Abbildung 3.18. CGH-Profil für die DNA-Kopienanzahl der vier Zelllinien. (A) Referenz-Zelllinie BEAS-2B; (B) Tumorzelllinie H1993; (C) Tumorzelllinie H1395 und (D) HTB-56. Aufgetragen ist der *Moving Average* der Log2Ratios der Fluoreszenzsignale (hellgrau, y-Achse) und die durch aCGH-Smooth detektierten DNA-Aberrationen (dunkelgrau) gegen die Chromosomen (x-Achse). Der Beginn und das Ende der Chromosomen sind durch senkrechte Linien markiert. Negative Smooth-Werte weisen auf einen Verlust der DNA, positive auf einen Gewinn und Smooth-Werte gleich 0 auf eine genomisch unauffällige Region hin.



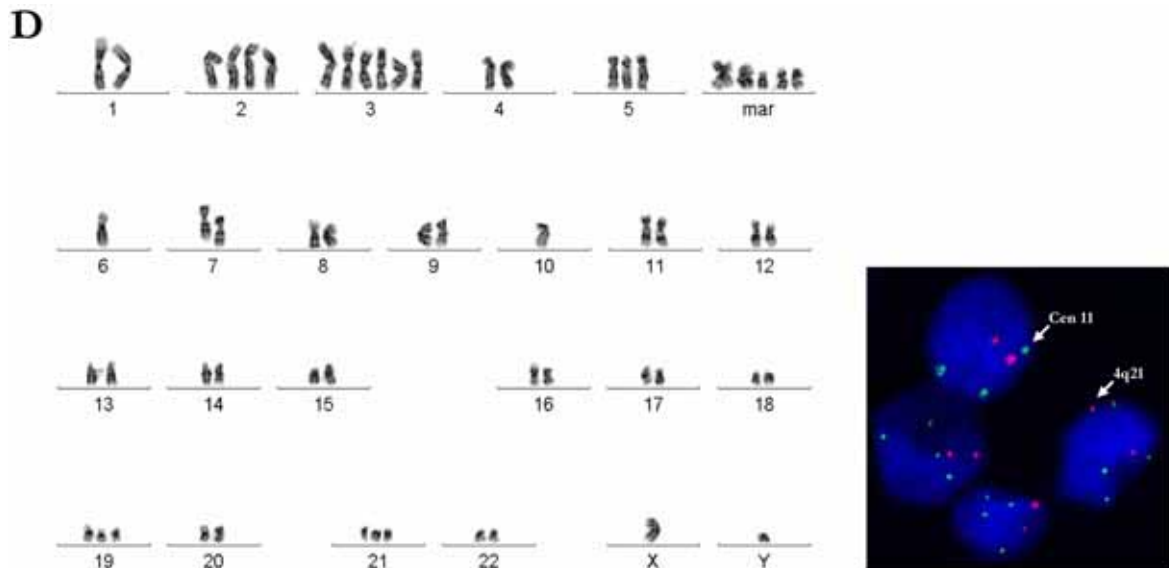


Abbildung 3.19. Karyogramme erstellt an Giemsa-gefärbten Metaphasechromosomen und FISH-Analysen für 4q21 der Zelllinien (A) BEAS-2B, (B) H1993, (C) H1395 und (D) HTB-56. Die Metaphasechromosomen wurden eingeteilt anhand ihrer Bänderung (links). Chromosomen, die sich aufgrund ihrer stark abweichenden Struktur nicht zuordnen ließen, werden als „mar“ bezeichnet. FISH-Analysen für 4q21 wurden an Interphase-Zellen der einzelnen Zelllinie durchgeführt (links). Die DNA-Sonde 4q21 wird durch rote und die Zentromer-Proben (Cen) durch grüne Fluoreszenz-Signale dargestellt. Die Bilder der FISH-Analysen wurden mit einer 630 fachen Vergrößerung aufgenommen.

Zusammenfassend konnte für jede Tumorzelllinie abhängig von der jeweiligen Ploidie eine DNA-Unterrepräsentation von 4q nachgewiesen werden. Dabei stimmten die mit Array-CGH ermittelten Profile der DNA-Kopienanzahl der beiden Zelllinien H1395 und H1993 mit denen bereits von Garnis et al. publizierten überein (194). Die Zelllinie BEAS-2B konnte aufgrund ihres überwiegend normalen Chromosomensatzes und einer normalen DNA-Kopienanzahl für 4q als Referenz verwendet werden.

3.6.2 Etablierung der Methode zur Demethylierung von CpG-Inseln

3.6.2.1 Etablierung der Bedingungen für die Zellkultur

5-Aza-CdR ist ein Demethylierungs-Agens, dessen molekulare Struktur einem Cytidin-Analogon entspricht, bei dem die Carbongruppe an Position 5 des Pyrimidinrings durch eine Nitrogruppe ersetzt ist (s. Abbildung 3.20). Die demethylierende Wirkung ergibt sich durch Einbau in die DNA anstelle von Cytosin während der Replikation. Durch die Nitrogruppe wird eine anschließende Methylierung verhindert, was zur Demethylierung aller CpG-Inseln in den neu-synthetisierten DNA-Strängen führt. Dies kann zur Re-Expression von zuvor durch Methylierung reprimierten Genen führen. Durch Kombination von 5-Aza-CdR mit TSA ist es möglich, die Effektivität der Re-Expression von Genen zu steigern. Als Histondeacetylase-Inhibitor führt TSA zu einer Hyperacetylierung der Histone. Die daraus resultierende Auflockerung der Chromatinstruktur

kann somit Einfluss auf die Genaktivität transkriptionell inaktiver Bereiche haben (229). Beide Substanzen besitzen eine hohe Toxizität, die sich u. a. aus der Dekondensation des Chromatins, der Alteration der DNA-Replikations-Zeit und der Induktion von Chromosomenbrüchen ergibt. Daher wurde zunächst in Vorversuchen getestet, welche Konzentration und welcher Behandlungszeitraum für eine zuverlässige Demethylierung am besten geeignet waren, ohne dabei auf die Zellen toxisch zu wirken.

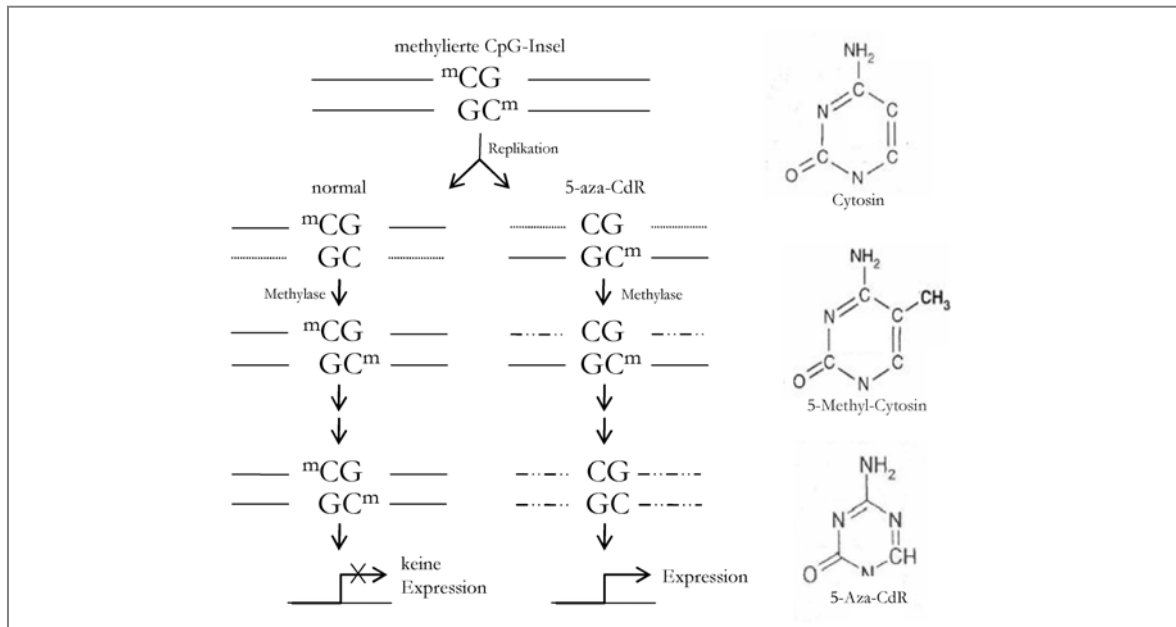


Abbildung 3.20. Struktur und Wirkungs-weise des Cytidin-Analogon 5-Aza-CdR. Bei einer normalen Zellteilung wird das Methylierungsmuster auf die neu-synthetisierten DNA-Stränge durch das endogene Enzym Methylase übertragen (durchgezogene Linie). Dies kann zur Reprimierung der Expression einzelner Gene führen. Die Behandlung mit dem Demethylierungs-Agens 5-Aza-CdR führt während der Replikation zu dessen Einbau in die neu-synthetisierten DNA-Stränge anstelle von Cytosin. Die Methylase ist nicht in der Lage, 5-Aza-CdR zu methylieren (gestrichelte Linie). Der Verlust der Methylierung von CpG-Inseln kann zur Re-Expression von zuvor reprimierten Genen führen.

Die Zelllinien (BEAS-2B, H1395, H1993 und HTB-56) wurden mit einer Anfangskonfluenz von ~15% ausgesät (s. Tabelle 3.8). Während jeweils ein Kontrollansatz unbehandelt blieb, wurden die Zellen mit 0,5 μM , 1 μM und 5 μM 5-Aza-CdR für drei, fünf und sieben Tage behandelt. Zusätzlich wurden die Zelllinien BEAS-2B, H1993 und H1395 in einem weiteren Ansatz für die letzten 12 h mit TSA kultiviert. Von allen Zellansätzen wurden jeweils Gesamt-RNA und genomische DNA isoliert und die Quantität bzw. Qualität mit dem Nanodrop Spektrophotometer und Agarosegelen überprüft. Die nicht mit 5-Aza-CdR behandelten Ansätze werden im weiteren Kontext als „Kontrollen“ und die unter Zusatz von 5-Aza-CdR kultivierten Zellen als „behandelte Zellen“ bezeichnet.

Tabelle 3.8 zeigt eine Übersicht des Konfluenzverhaltens der Zellen für die Konzentrationen 0,5 μM und 1 μM 5-Aza-CdR und den daraus berechneten Anteil an Ursprungszellen nach dem

dritten, dem fünften und dem siebten Tag. Da die Ursprungszellen ihren Methylierungs-Status nicht verändern, sollte ihr Anteil in der Zellpopulation zum Zeitpunkt der Ernte möglichst gering sein. Um einen Anteil von <20% an Ursprungszellen in der Zellkultur zu erreichen, mussten die Zellen dementsprechend bis zur 100% igen Konfluenz kultiviert werden (s. Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8. Übersicht der Kultivierung und Behandlung der Zelllinien mit 0,5 μ M und 1 μ M 5-Aza-CdR.

Die Zellen wurden mit einer Anfangskonfluenz von 10-20% (Tag 0) ausgesät und drei, fünf bzw. sieben Tage kultiviert. Da die 5-Aza-CdR Behandlung der Zelllinie HTB-56 zu einem späteren Zeitpunkt statt fand, wurde diese nur mit 1 μ M 5-Aza-CdR behandelt. Die Zelllinie H1395 musste am sechsten Tag passagiert werden. Mit steigender Konfluenz der Zellen nimmt der Anteil an Ursprungszellen mit ursprünglichem Methylierungsmuster in den Zellkulturen ab.

	Kultivierung		Zell-Konfluenz [%]		Anteil an Ursprungszellen [%]	
	[Tag]	Kontrolle	5-Aza-CdR		5-Aza-CdR	
			0,5 μ M	1 μ M	0,5 μ M	1 μ M
BEAS-2B	0	20	20	20	100	100
	3	60	60	60	33	33
	5	70	70	70	28	28
	7	90	90	90	10	10
H1993	0	15	15	15	100	100
	3	30	30	25	50	63
	5	50	35	30	43	50
	7	80	30	25	50	63
H1395	0	20	20	20	100	100
	3	70	70	70	29	29
	5	90	90	90	22	22
	6		passagiert 1:2			
	7	70	60	60	8	8
HTB-56	0	10	ND	10	ND	100
	3	70	ND	70	ND	14
	5	85	ND	85	ND	12

ND: nicht durchgeführt

Mit Ausnahme der Zelllinie H1993 haben die übrigen Zelllinien Konzentrationen von 0,5 μ M und 1 μ M 5-Aza-CdR gut toleriert und zeigten, verglichen mit den Kontrollen, keine ersichtlichen Veränderungen in der Wachstumsrate oder Zellmorphologie. Konzentrationen von 5 μ M 5-Aza-CdR hatten hingegen in allen Zelllinien eine stark verlangsamte Zellteilungsrate und morphologische Veränderungen zur Folge. Die Zellen nahmen eine rundliche Form an und lagerten sich zu „multi-layer“ Zellhaufen zusammen. Ein Großteil der Zellen verlor ihre Adhäsionseigenschaft und ging in die Apoptose über. Die Zelllinie H1993 zeigte bereits bei niedrigeren Konzentrationen deutliche Veränderungen in der Zellteilungsrate, so dass nach sieben Tagen Kultivierung nur eine Endkonfluenz von 25-30% erreicht werden konnte. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit TSA führte bei allen Zelllinien zur Apoptose und wurde daher als sehr kritisch beurteilt.

3.6.2.2 Nachweis der Demethylierung auf Expressionsebene

Die Wirkung von 5-Aza-CdR auf den Methylierungsstatus der Zellen lässt sich sowohl auf Expressionsebene mit einer RT-PCR als auch auf genomischer Ebene durch Natriumsulfit-Behandlung der DNA mit anschließender Sequenzierung bestimmen. Durch Vergleich der Kontrollen mit den behandelten Zellen kann die Effizienz der Demethylierung abhängig von der verwendeten 5-Aza-CdR Konzentration und der Behandlungsdauer abgeschätzt werden. Als Kontrollgene wurden Gene ausgewählt, die in Bronchialkarzinomen häufig aufgrund von Hypermethylierung reprimiert vorliegen. Dabei handelte es sich um die vier tumorassoziierten Gene *GSTP1*, *bSRBC*, *RARβ* und *DLC1* (129, 131, 197). Drei weitere Gene der MAGE-Familie (*melanoma antigen family*, *MAGE A1*, *MAGE A2* und *MAGE A12*) wurden verwendet, um den Demethylierungsstatus der Kontroll-Zelllinie BEAS-2B zu überprüfen. Diese Gene werden, mit Ausnahme der Fortpflanzungsorgane, in Normalgeweben aufgrund von Hypermethylierungen nicht exprimiert (196). Es wurde daher davon ausgegangen, dass eine Genexpression in der Kontroll-Zelllinie BEAS-2B erst nach Demethylierung nachweisbar sein würde.

Der Einfluss einer möglichen Hypermethylierung dieser sieben Gene auf die Genexpression wurde anhand der Gesamt-RNA von behandelten und unbehandelten Zelllinien untersucht. Zum Nachweis der mRNA Transkription eines spezifischen Gens bietet sich eine RT-PCR an. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wurde die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde diese als Ausgangsmaterial in einer PCR verwendet, um spezifische Sequenzen der Gene zu amplifizieren. Nur bei einer Expression der mRNA kann ein PCR-Produkt gebildet werden, wobei sich kleinere quantitative Unterschiede in der Stärke der Genexpression mittels gelelektrophoretischer Auftrennung nicht nachweisen lassen. Da nicht bekannt war, ob die Zelllinien im basalem Zustand diese Gene exprimieren, wurde zunächst die Genexpression der Kontrollen untersucht. Konnte keine oder nur eine erniedrigte Genexpression nachgewiesen werden, wurde die Expression nach Behandlung mit 5-Aza-CdR überprüft. Eine Demethylierung sollte zur vollständigen Re-Expression der Gene führen. Gene, die im basalen Zustand keine bzw. eine geringe Genexpression aufwiesen, und diese sich durch Demethylierung re-exprimieren ließ, werden im Weiteren als „differenziell reguliert“ bezeichnet. Tabelle 3.9 zeigt einen Überblick über die Expression der sieben untersuchten Gene in den Zelllinien mit Beispielen für die RT-PCR.

Tabelle 3.9. Genexpression der sieben untersuchten Gene in den vier Zelllinien vor und nach Behandlung mit 5-Aza-CdR. Die Zelllinien wurden für fünf Tage mit 0,5 μ M bzw. 1 μ M 5-Aza-CdR bis zur annähernden Konfluenz kultiviert. Differenziell regulierte Gene sind grau hinterlegt, dabei steht – für keine, (+) für eine schwache, + für eine normale und ++ für eine starke mRNA Expression. Für jede Zelllinie wird das Ergebnis der RT-PCR für ein differenziell reguliertes Gen mit einem Agarosegel gezeigt. (A) BEAS-2B, *MAGE A1*, 420 Bp; (B) H1993, *MAGE A2*, 236 Bp; (C) H1395, *GSTP1*, 150 Bp; (D) HTB-56, *MAGE A1*, 429 Bp. Während die nicht behandelten Zellen (K) keine bzw. eine schwache mRNA Expression aufwiesen, war diese nach Behandlung der Zellen mit 5-Aza-CdR deutlich erhöht. Als Marker (M) wurde der DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche) verwendet.

ND nicht durchgeführt

Zelllinie	<i>GSTP1</i>			<i>hSRBC</i>			<i>RARβ</i>			<i>DLC1</i>		
	Basal	5-Aza-CdR		Basal	5-Aza-CdR		Basal	5-Aza-CdR		Basal	5-Aza-CdR	
		0,5 μ M	1 μ M		0,5 μ M	1 μ M		0,5 μ M	1 μ M		0,5 μ M	1 μ M
BEAS-2B	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
H1993	(+)	+	++	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)
H1395	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HTB-56	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	+

Zelllinie	<i>MAGE A1</i>			<i>MAGE A2</i>			<i>MAGE A12</i>		
	Basal	5-Aza-CdR		Basal	5-Aza-CdR		Basal	5-Aza-CdR	
		0,5 μ M	1 μ M		0,5 μ M	1 μ M		0,5 μ M	1 μ M
BEAS-2B	-	+	+	(+)	+	+	-	+	+
H1993	(+)	+	+	(+)	+	+	(+)	(+)	(+)
H1395	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+
HTB-56	(+)	ND	+	+	ND	+	+	ND	+

A

501 Bp
404 Bp
320 Bp

B

320 Bp
242 Bp
190 Bp

C

190 Bp
135 Bp

D

489 Bp
410 Bp
320 Bp
242 Bp

Die Gene *hSRBC*, *RAR β* und *DLC1* wurden sowohl im unbehandelten als auch im behandelten Zustand von allen vier Zelllinien ohne sichtbare Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen exprimiert (s. Tabelle 3.9). Die Zelllinie H1993 zeigte für die Gene *GSTP1*, *MAGE A1* und *MAGE A2* in der Kontrollgruppe jeweils eine niedrige Expression, die durch Behandlung mit 5-Aza-CdR deutlich erhöht wurde. Dies deutete auf eine heterogene Hypermethylierung der Zellen im Normalzustand hin. Als differenziell regulierte Gene und somit als Marker für die Demethylierung wurde bei der Zelllinie H1395 die Gene *MAGE A1* und *GSTP1* identifiziert. Die Zelllinie HTB-56 wies eine differenziell regulierte Genexpression nur für das Gen *MAGE A1* auf. Wie erwartet, konnte für die Referenz-Zelllinie BEAS-2B im Normalzustand keine Expression der Gene *MAGE A1* und *MAGE A12* (homogene Hypermethylierung) und nur eine geringe für *MAGE A2* nachgewiesen werden. Die Expression dieser Gene ließ sich ebenfalls durch Demethylierung induzieren.

Mit einer RT-PCR ließ sich die Stärke der Genexpression nicht quantitativ auswerten. Kleinere quantitative Unterschiede in der Expressionsstärke abhängig von der verwendeten 5-Aza-CdR Konzentration und der Behandlungsdauer konnten, mit Ausnahme für das Gen *GSTP1* der Zelllinie H1993, nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.21).

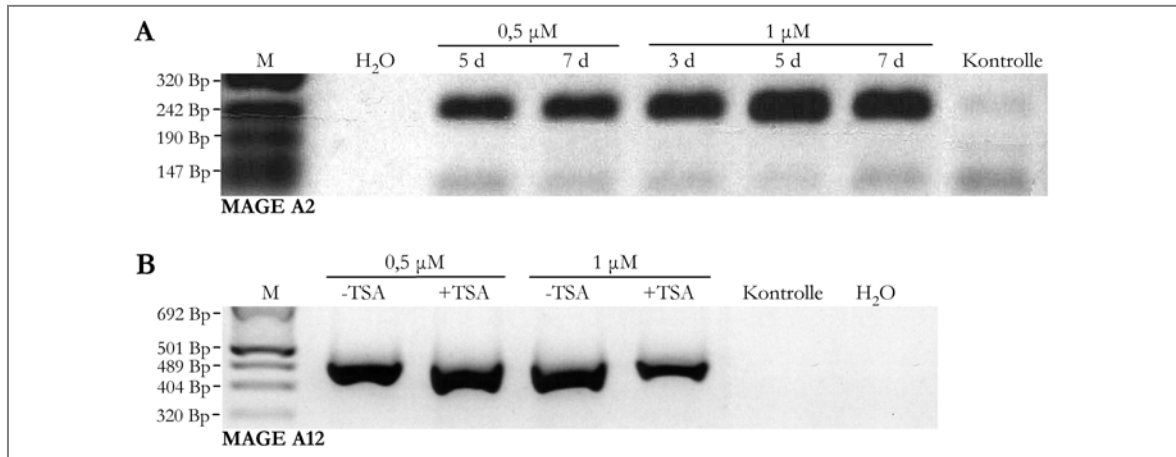


Abbildung 3.21. Einfluss (A) der verschiedenen 5-Aza-CdR Konzentrationen, der Behandlungsdauer und (B) der zusätzlichen Behandlung mit TSA auf die Expression der Gene *MAGE A2* und *MAGE A12* der Zelllinie BEAS-2B. (A) Während die Kontrolle (unbehandelt) eine geringe Genexpression für *MAGE A2* aufwies, wurde diese durch Behandlung mit 5-Aza-CdR deutlich erhöht. Mittels RT-PCR war abhängig von der 5-Aza-CdR Konzentration bzw. der Behandlungsdauer kein Unterschied in der Expressionsstärke ersichtlich. (B) *MAGE A12* wurde von der Zelllinie BEAS-2B erst nach Demethylierung exprimiert. Es war keine zusätzliche Erhöhung der Expression durch Zugabe von TSA nachweisbar. Als Marker (M) wurde der DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche) verwendet.

Da die Verwendung von 5 μ M 5-Aza-CdR und TSA sowohl starke Einbußen in der Zellteilungsrate und Morphologie als auch Apoptose zur Folge hatte, wurden diese Bedingungen aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Für jede Zelllinie konnte mindestens ein Gen nachgewiesen werden, welches differenziell durch Methylierung reguliert wurde. Diese wurden im Weiteren als Marker verwendet, um zu überprüfen, welche 5-Aza-CdR Konzentration (0,5 μ M bzw. 1 μ M) zu einer möglichst vollständigen Demethylierung führte. Zur genauen Bestimmung der Expressionsstärke wurde mit den entsprechenden cDNAs der Kontrolle, der mit 0,5 μ M und der mit 1 μ M 5-Aza-CdR behandelten Zellen eine RTQ-PCR unter Verwendung des LightCycler-Systems durchgeführt (s. Kapitel 2.2.10). Die Ergebnisse der RTQ-PCR zeigten, dass die Verwendung von 1 μ M 5-Aza-CdR sowohl bei der Zelllinie H1993 als auch bei BEAS-2B zu einer stärkeren Genexpression von *GSTP1* bzw. *MAGE A1* führte als 0,5 μ M 5-Aza-CdR. Die Kontrollgruppen bestätigten die niedrige Genexpression der unbehandelten Zellen (s. Abbildung 3.22).

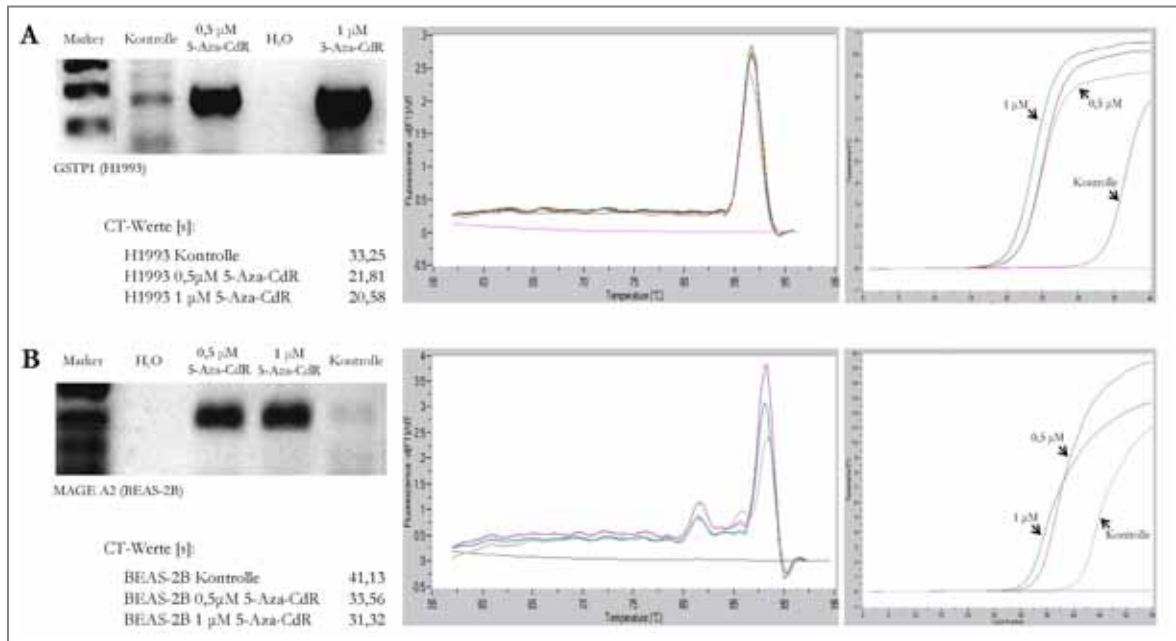


Abbildung 3.22. Nachweis der mRNA Expression der Gene (A) *GSTP1* der Zelllinie H1993 und (B) *MAGE A2* der Zelllinie BEAS-2B vor und nach Behandlung mit 5-Aza-CdR. Anhand gelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR Produkte konnte nur für *GSTP1* der Zelllinie H1993 ein Konzentrationsabhängiger Unterschied in der Expressionsstärke beobachtet werden. Das Ergebnis der RTQ-PCR zeigte hingegen für beiden Gene, dass die Genexpression sich durch Verwendung der höheren 5-Aza-CdR Konzentration (1 μ M) steigern ließ. Die CT-Werte geben einen Hinweis auf die vorliegende Konzentration der *Template*-DNA. Je geringer die Konzentration, desto später wird der Schwellenwert erreicht, an dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, was sich dementsprechend in einem höheren CT-Wert ausdrückt. Die Demethylierung durch 5-Aza-CdR führt bei differenziell regulierten Genen zu einer Erhöhung der Expression und somit der *Template*-DNA. Dies führt in einer folgenden RTQ-PCR zu niedrigeren CT-Werten.

3.6.2.3 Nachweis der Demethylierung auf genomischer Ebene

Eine weitere Möglichkeit, den Status der Demethylierung nach Behandlung mit 5-Aza-CdR zu ermitteln, stellt die Natriumsulfit-Behandlung von genomischer DNA mit anschließender Sequenzierung dar. Diese chemische Behandlung führt zu einer Konversion von nicht-methyliertem Cytosin in Uracil, welches sich in einer anschließenden PCR wie Thymin verhält (5'-TG). Methyliertes Cytosin wird hingegen nicht deaminiert und die Sequenzfolge 5'-CG bleibt erhalten. Die Methylierungsinformation wird so in eine Sequenzinformation umgeschrieben. Der Unterschied in der Sequenz kann durch Sequenzierung nachgewiesen werden und lässt Rückschlüsse auf das ursprüngliche Methylierungsmuster der genomischen DNA zu (s. Kapitel 2.2.8).

Im unbehandelten Zustand konnte für die Zelllinie BEAS-2B keine mRNA Expression der Gene *MAGE A1* und *MAGE A12* nachgewiesen werden. Die Behandlung der Zelllinien sowohl mit 0,5 μ M als auch mit 1 μ M 5-Aza-CdR führte zur vollständigen Re-Expression dieser Gene (s. Tabelle 3.9). Nach Natriumsulfit-Behandlung der genomischen DNA wurden die Promotorregionen beider Gene mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Für die Kontrolle und 1 μ M 5-Aza-

CdR wurden jeweils 12 und für 0,5 μM drei Klone untersucht. Abbildung 3.23 zeigt ein Beispiel für das Ergebnis der Sequenzierungen des Gens *MAGE A1*. Die Sequenzierung der Klone zeigte, dass durchschnittlich 83% aller untersuchten CpG-Inseln ($n=12$; von 54% bis 100%) der Kontrolle im methylierten Zustand vorlagen. Während eine Behandlung der Zellen mit 0,5 μM 5-Aza-CdR zu einer Demethylierung von nur 19% führte (von 15% bis 23%), konnte unter Verwendung von 1 μM 5-Aza-CdR eine Demethylierung der CpG-Inseln von durchschnittlich ~71% (von 36% bis 100%) erreicht werden. Für das Gene *MAGE A12* konnte ähnliches beobachtet werden. Hier führte die Behandlung mit 1 μM 5-Aza-CdR zur Demethylierung von 83% aller in diesem Bereich befindlichen CpG-Inseln ($n=12$, von 50% bis 100%), während in der Kontrolle nur 30% demethyliert vorlagen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine 5-Aza-CdR Konzentration von 0,5 μM für die Zelllinie BEAS-2B nicht ausreichend war, um eine vollständige Demethylierung zu gewährleisten.

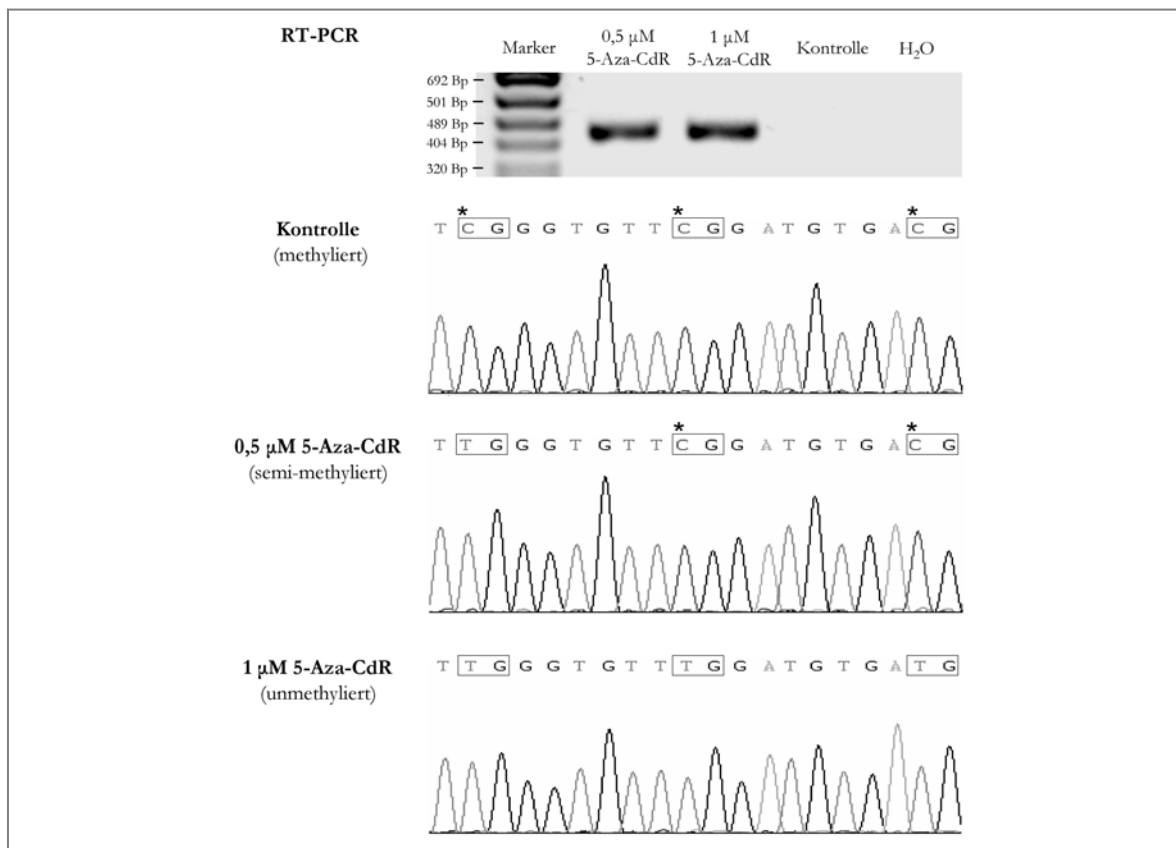


Abbildung 3.23. Ausschnitt des Methylierungsmusters des Gens *MAGE A1* der Zelllinie BEAS-2B vor und nach 5-Aza-CdR Behandlung. Unmethylierte CpG-Inseln werden durch Behandlung mit Natriumsulfit zu Uracil deaminiert, welche in einer anschließenden PCR als Thymidin gelesen werden (5'-TG). Die Methylgruppe der methylierten CpG-Inseln schützt vor einer Deaminierung und die Cytosine bleiben in der Nukleotidsequenz erhalten (5'-CG). Sequenzierungen und Vergleiche mit der Originalsequenz ermöglichen somit eine Aussage über den Methylierungszustand der CpG-Inseln (durch Kästchen markiert). Methylierte CpG-Inseln werden zusätzlich durch Sternchen markiert. In der Kontrolle lagen 17% aller CpG-Inseln demethyliert vor. Während die Behandlung mit 0,5 μM 5-Aza-CdR nur zu einer Demethylierung von 19% führte, konnte mit 1 μM 5-Aza-CdR eine von 71% erreicht werden.

Zusammenfassend zeigten die Vorversuche zur Re-Expression verschiedener differenziell regulierter Gene sowohl auf Expressions- als auch auf genomischer Ebene, dass eine 5-Aza-CdR Konzentration von 1 μM benötigt wurde, um eine möglichst vollständige Demethylierung der Zelllinien zu gewährleisten. Um den Anteil an Ursprungszellen mit methylierten CpG-Inseln in der Zellkultur gering zu halten, sollten die Zellen beginnend bei 10% bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert werden. Eine zusätzliche Behandlung mit TSA führte zur Apoptose und wurde somit nicht verwendet.

3.6.3 Einfluss von Hypermethylierungen auf die Genexpression von Tumorzelllinien

3.6.3.1 Demethylierung von CpG-Inseln in Zelllinien

In jeweils drei Parallelansätzen wurden die Zelllinien mit einer anfänglichen Konfluenz von 10% ausgesät. Nach Zelladhäsion wurde 5-Aza-CdR mit einer Konzentration von 1 μM zugesetzt und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Tabelle 3.10 gibt eine Übersicht über die Kultivierung und den erwarteten Anteil an Zellen in der Zellsuspension mit ursprünglichem Methylierungsmuster. Wie bereits in den Vorversuchen beobachtet, zeigte die Zelllinie H1993 durch die Behandlung neben einer geringen Wachstums- zusätzlich eine hohe Sterberate. Es konnte daher nur eine endgültige Konfluenz von $\sim 25\%$ erreicht werden.

Tabelle 3.10. Übersicht der Kultivierung und 5-Aza-CdR Behandlung der humanen Zelllinien.

Zelllinie	Kultivierung	Konfluenz [%]		Erwarteter Anteil an Ursprungszellen [%]
	[Tage]	Kontrolle	1 μM 5-Aza-CdR	1 μM 5-Aza-CdR
BEAS-2B	4	95	95	11
H1993	7	80	25	60
H1395	6	80	80	13
HTB-56	4	85	85	12

Die Zellen wurden abhängig von ihrer Konfluenz nach vier bis sieben Tagen geerntet und sowohl die Gesamt-RNA als auch die genomische DNA isoliert. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde durch Messungen mit dem Nanodrop Spektrophotometer bestimmt. Die Gesamt-RNA der Parallelansätze wurde vereinigt und zur Qualitätskontrolle standardmäßig auf Agarosegele aufgetragen (s. Abbildung 3.24). Die als zwei getrennte Banden laufende 28S und 18S rRNA dienten als interne Marker für die RNA-Integrität.

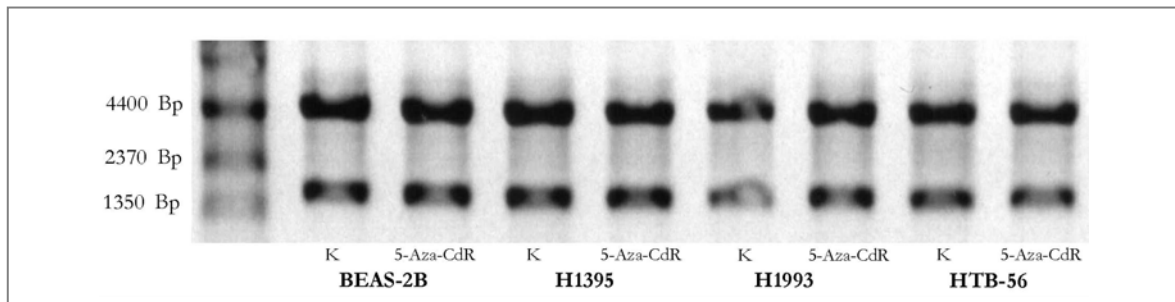


Abbildung 3.24. Integritätskontrolle der Gesamt-RNA isoliert aus den Zelllinien mit und ohne (K) 5-Aza-CdR Behandlung. Die isolierte RNA der Parallelansätze wurden zusammengefügt und jeweils 750 ng auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Banden der 28S (ca. 4kb) und 18S rRNA (ca. 2kb) dienen als Integritätsnachweis. Als Marker wurde der 0,24-0,5 kb RNA Ladder (Invitrogen) verwendet.

Die Behandlung der Zellen mit 5-Aza-CdR sollte zur möglichst vollständigen Demethylierung aller CpG-Inseln führen. In den Vorversuchen wurde spezifisch für jede Zelllinie Gene bestimmt, die aufgrund von Methylierungen in ihren Promotorbereichen eine verminderte Genexpression aufwiesen. Alle in den Vorversuchen ermittelten Unterschiede in der Genexpression zwischen Kontrolle und behandelten Zellen wurden mittels RT-PCR oder Natriumsulfit-Sequenzierung an den endgültigen Proben bestätigt. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass die Demethylierung erfolgreich war und die Proben sich für das Erstellen von Expressionsprofilen eigneten.

3.6.3.2 Auswertung der Mikroarray-Analysen

Genexpressionsprofile der vier Zelllinien wurden unter Verwendung des 4x44 K human Two-Color Gene Expression Mikroarrays von Agilent erstellt. Da alle Expressionsprofile zur gleichen Zeit unter Verwendung von nur einem Mikroarray erstellt wurden, konnten Abweichungen aufgrund der praktischen Durchführung ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen waren die jeweiligen kohybridisierten Proben (un- und behandelte Zellen einer Zelllinie) direkt miteinander vergleichbar. Zunächst wurde die Qualität der Daten sowohl vor als auch nach der Normalisierung bestimmt. Mit Hilfe des für Agilent Arrays existierenden QC-Reports wurden verschiedene Qualitätskriterien wie *Spike-In* Kontrollen und Hintergrundgeräusche überprüft, um mögliche Abweichungen zu erkennen. *Boxplots* wurden zur Visualisierung und Charakterisierung der Signalintensitäten vor und nach der Skalierung erstellt (s. Abbildung 3.25). Dabei handelt es sich um eine graphische Darstellung, die die Streuung, die Schiefe und den Median der Daten beruhend auf den empirischen Quartilen zeigt. Die Box umfasst 50% der Daten und stellt dabei den Interquartilsabstand dar, welches als Maß für die Streuung herangezogen werden kann. Der Median wird in der Box durch eine waagerechte Linie gekennzeichnet, welche einen Eindruck über die Streuung der den Daten zugrunde liegenden Verteilung vermittelt. Bereits vor der Skalierung wiesen die Arrays eine gute Vergleichbarkeit auf,

welche zusätzlich durch die folgende Median-Skalierung verbessert werden konnte. Die Vergleichbarkeit der Arrays wurde ebenfalls durch die dazugehörigen Dichteplots visualisiert. Dabei handelt es sich um Histogramme der Intensitätsverteilung für jeden einzelnen Array. Erwartungsgemäß wiesen nur wenige Transkripte einen hohen Expressionslevel auf. Differenzen zwischen den Arrays waren nicht zu erkennen.

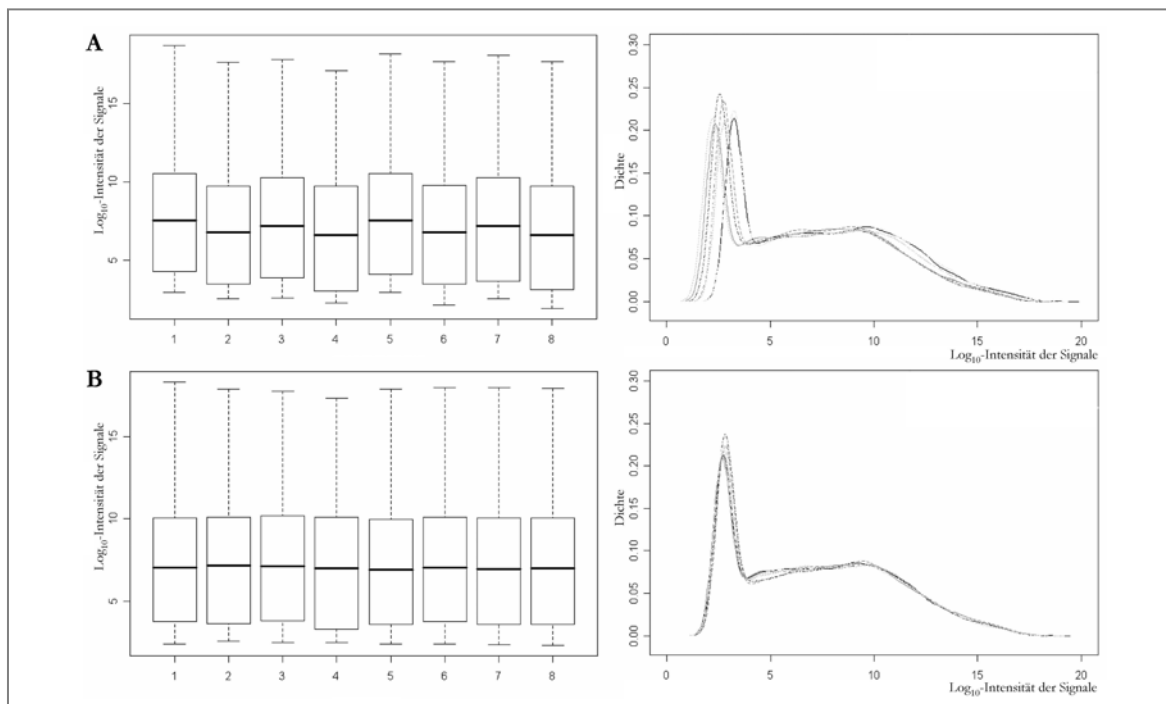


Abbildung 3.25. Box- und Dichteplots der Intensitätsverteilung der Expressionssignale (A) vor und (B) nach der Median-Skalierung zur Qualitätskontrolle.

Nach der Median-Skalierung wurde aus den Signalintensitäten der Kontrolle und denen der behandelten Zellen für jede Zelllinie die Log10Ratio gebildet. Lag keine Veränderung in der mRNA Expression vor, nahm die Log10Ratio den Wert null an. Wurde die mRNA Expression durch die Behandlung von 5-Aza-CdR unterdrückt, besaß die Log10Ratio einen positiven Wert. Eine negative Log10Ratio bedeutete, dass eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Genexpression nach Behandlung vorlag. Im Folgenden werden nur Gene als differenziell reguliert bezeichnet, die eine Veränderung in ihrer Genexpression nach 5-Aza-CdR Behandlung um mindestens das 2fache der Log10-Werte ($\pm 0,301$ der Log10Ratio) im Vergleich zu ihrer Kontrolle aufwiesen.

Die Behandlung der Zellen mit 5-Aza-CdR führte zu Veränderungen in der Genexpression von durchschnittlich 10,8% der auf dem Array vertretenen Gene, wobei die Zelllinie HTB-56 mit 4,3% die wenigsten differenziell regulierten Gene besaß (s. Tabelle 6.9 im Anhang). 54-64% dieser Gene zeigten nach Behandlung eine Erhöhung in ihrer Genexpression. Allerdings konnte noch keine Aussage getroffen werden, ob diese Veränderung auf der Demethylierung von CpG-Inseln

beruhte oder diese durch eine Stressantwort auf die zytotoxische Wirkung von 5-Aza-CdR hervorgerufen wurde.

Abbildung 3.26 zeigt ein Venn-Diagramm, das mit Hilfe von Schnittmengen die Anzahl an Genen angibt, die in den Zelllinien gemeinsam differenziell reguliert vorliegen. 156 Gene waren in allen vier Zelllinien und 132 in den drei Tumorzelllinien (H1993, H1395 und HTB-56) gemeinsam differenziell reguliert.

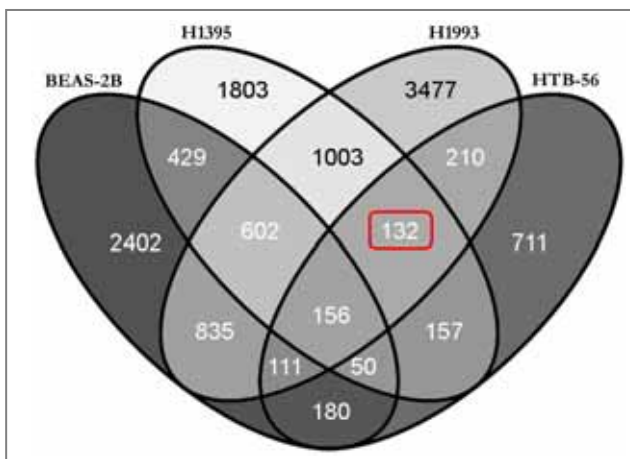


Abbildung 3.26. Venn-Diagramm der differenziell regulierten Gene nach 5-Aza-CdR Behandlung für die Zelllinien BEAS-2B, H1395, H1993 und HTB-56. Als differenziell reguliert wurden nur Gene bezeichnet, deren Genexpression sich im Vergleich zur Kontrolle nach 5-Aza-CdR Behandlung um mindestens das zweifache der Log10-Werte veränderte. Für die Zelllinien wurde die Anzahl der gemeinsam differenziell regulierten Gene berechnet und die dazugehörigen Schnittmengen dargestellt. 132 Gene (rot umrandet) wurden in den drei Tumorzelllinien differenziell reguliert.

Die Zelllinie BEAS-2B wurde als Kontroll-Zelllinie verwendet, da sie aus normalen Lungen-Epithelzellen generiert worden ist. Sowohl das erstellte Karyogramm mit den dazugehörigen FISH-Analysen als auch die Expressionsstudien der Gene der MAGE-Familie zeigten, dass diese Zelllinie bis auf ein paar wenige chromosomale Abweichungen den Status einer nicht malignen Zelllinie besaß. Es konnte daher angenommen werden, dass die von dieser Zelllinie differenziell regulierten Gene entweder im Zuge einer Stressantwort exprimiert wurden oder aber keinen bedeutenden Einfluss auf die Karzinogenese besaßen. Tatsächlich zeigten Analysen zur Funktionalität, dass 32% dieser differenziell regulierten Gene zur Kategorie Stressantwort und Apoptose gehörten. Aus diesem Grund wurden alle Gene aus dem Datensatz herausgenommen, die in BEAS-2B eine veränderte Expression um mindestens das zweifache der Log10-Werte nach 5-Aza-CdR Behandlung aufwiesen. Weiterhin wurde als Ausschlusskriterium festgelegt, dass potentielle tumorassoziierte Gene in mindestens zwei der drei Tumorzellen differenziell reguliert sein müssen. Die chromosomale Verteilung der so ermittelten 1.218 Gene (3% von insgesamt 40.440 Genen) für die Chromosomen 1-22 ist in Abbildung 3.27 dargestellt. Interessanterweise lagen auf Chromosom 19 überdurchschnittlich viele Gene, deren Expression durch Demethylierung gesteigert werden konnte. Dies könnte auf das Vorhandensein von chromosomalen Bereichen beruhen, die durch Methylierung *imprinted* vorliegen (230).

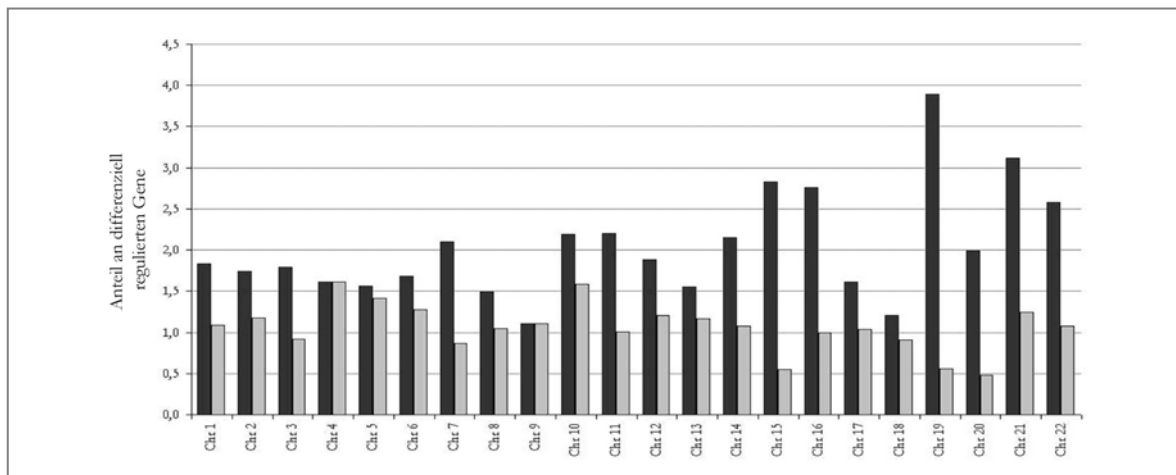


Abbildung 3.27. Verteilung der differenziell regulierten Genen auf den Chromosomen 1-22. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an in mindestens zwei Tumorzelllinien differenziell regulierten Genen bezogen auf die auf dem Array vertretenen Gene eines Chromosoms. Die Gene wiesen keine Veränderungen in ihrer Expression in der Referenz-Zelllinie BEAS-2B auf. Dunkelgraue Balken stellen nach 5-Aza-CdR Behandlung hoch regulierte und hellgraue Balken die herunter regulierten Gene dar.

Um potentielle Tumorsuppressorgene zu finden, deren Expression in den Tumorzelllinien durch Hypermethylierung reprimiert wurde, waren nur Gene von Interesse, bei denen es nach Demethylierung durch 5-Aza-CdR zu einer Erhöhung in der Genexpression kam.

3.6.4 Hypermethylierte Gene auf 4q als potentielle Tumorsuppressorgene

Durch genomische Untersuchungen und Expressionsanalysen an primären Bronchialkarzinomen konnte gezeigt werden, dass ein DNA-Verlust von 4q signifikant mit dem Vorhandensein von DTZ im KM korrelierte und zur Reprimierung der Expression von 48 Genen führte. Aufgrund dieser großen Anzahl wurde anhand der durchgeführten Methylierungsstudien versucht, spezifische tumorassoziierte Gene näher einzugrenzen. Entsprechend dem Zustand in primären Bronchialkarzinomen wurden gezielt Tumorzelllinien ausgewählt, die bereits einen heterozygoten Verlust für 4q aufwiesen. Das noch vorhandene Allel wurde auf differenziell regulierte Gene hin untersucht.

Auf Chromosom 4q wurden 28 Gene identifiziert, die in mindestens zwei der drei untersuchten Tumorzelllinien durch Hypermethylierung differenziell reguliert vorlagen (s. Abbildung 3.28).

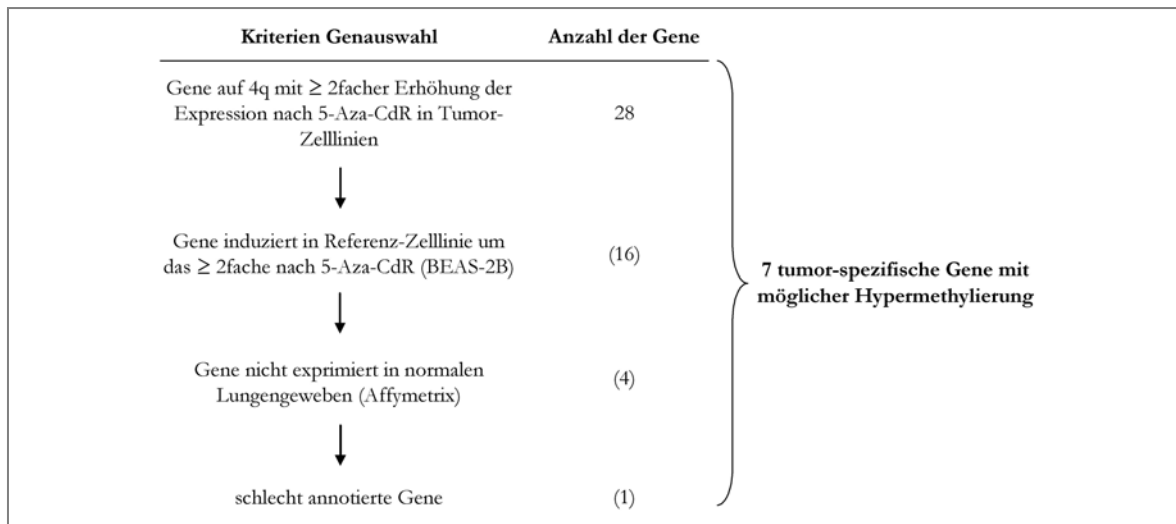


Abbildung 3.28. Strategie zum Nachweis potentieller Tumorsuppressorgene auf 4q. Die Expressionsprofile für 4q der Zelllinien, behandelt mit dem Demethylierungs-Agens Aza-5-CdR (1 μ M), wurden mit denen der Kontrollen verglichen. In der Referenz-Zelllinie induziert vorliegende Gene ($n=16$) wurden von denen, die in mindestens zwei der drei Tumorzelllinien induziert wurden, abgezogen, da es sich dabei mit größter Wahrscheinlichkeit nicht um tumor-spezifische Gene handelte. Weiterhin wurden Gene abgezogen, die in normalem Lungengewebe nicht exprimiert wurden ($n=4$). Letztendlich wurden Gene abgezogen, deren Sonden zu keinem annotierten Gen passten ($n=1$). Als potentielle Tumorsuppressorgene auf 4q wurden 7 Gene gefunden.

16 von diesen Genen zeigten ebenfalls eine differenzielle Regulation in der Kontroll-Zelllinie BEAS-2B und wurden daher aus dem Datensatz entfernt. Um eine Bedeutung in der Karzinogenese zu besitzen, müssen potentielle Tumorsuppressorgene in gesunden Lungengeweben exprimiert werden. Hierfür wurden die Daten der Expressionsstudien zu den primären Bronchialkarzinomen herangezogen, bei denen ebenfalls Expressionsprofile für drei normale Lungengewebe erstellt wurden (s. Kapitel 3.4). Weitere vier Gene wiesen keine Expression im Normalgewebe auf und mussten daher ausgeschlossen werden. Ein weiteres Gen wurde aus dem Datensatz entfernt, da zur Sonde kein dazugehöriges Gen identifiziert werden konnte. Es konnten sieben tumor-spezifische Gene nachgewiesen werden, deren Expression in zwei der drei Tumorzelllinien durch mögliche Hypermethylierungen im Promotorbereich reprimiert vorlagen (s. Tabelle 3.11). Die Gene *HERC5*, *CHIC2* und *DAPP1* zeigten zudem eine Expression, die eine signifikante Assoziation mit dem positiven KM-Status von Patienten mit einem primären Bronchialkarzinom aufwies (s. Kapitel 3.4.2). KM-positive Primärtumore zeigten dabei signifikant häufiger eine verminderte Expression als KM-negative. Daher lag die Vermutung nahe, dass der Verlust der Genexpression dieser Gene auf eine Kombination aus DNA-Unterrepräsentation von 4q und Hypermethylierung beruhen könnte.

Tabelle 3.11. Differenziell durch Methylierung regulierte Gene auf 4q.

Gen		Alias	Chromosomale Region	Tumor-Zelllinie			p-Wert*
				H1395	H1993	HTB-56	
<i>CHIC2</i>	cysteine-rich hydrophobic domain 2	<i>BTL</i>	4q12	↑	↑	—	0,01
<i>AREG</i>	amphiregulin		4q13.3	↑	↑	—	NS
<i>HERC5</i>	cyclin E-binding protein 1	<i>CEB1</i>	4q22.1	↑	↑	—	0,04
<i>DAPP1</i>	B cell adaptor molecule of 32 kDa	<i>BAM32</i>	4q23	↑	↑	—	0,02
<i>TLR2</i>	toll-like receptor 2		4q31.3	—	↑	↑	NS
<i>MAP9</i>	microtubule-associated protein	<i>ASAP</i>	4q32.1	—	↑	↑	NS
<i>PDLIM3</i>	Actinin-associated LIM protein	<i>ALP</i>	4q35.1	↑	↑	—	NS

* p-Wert für Assoziation der verminderten Genexpression mit dem KM-positivem Status von primären Bronchialkarzinomen

NS nicht signifikant

↑ erhöhte Expression nach Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-CdR

— keine veränderte Genexpression nach Behandlung

Um die Ergebnisse der Auswertung zu überprüfen, wurde mittels RTQ-PCR die Expression von fünf dieser differenziell regulierten Gene an den Zelllinien validiert. Abbildung 3.29 zeigt das Ergebnis der RTQ-PCR, wobei für jedes Gen eine Zelllinie mit und eine ohne differenzieller Regulation durch Methylierung dargestellt wird. Die CT-Werte geben einen Hinweis auf die Konzentration der *Template*-cDNA und somit auf die Höhe der Genexpression (s. Kapitel 2.2.10). Je höher der CT-Wert, desto niedriger war die Konzentration der eingesetzten cDNA und dementsprechend die Genexpression. Eine Erhöhung der Genexpression durch Demethylierung sollte von daher zu niedrigeren CT-Werten führen. Es konnten alle auf Basis der Mikroarrays erstellten Ergebnisse bestätigt werden.

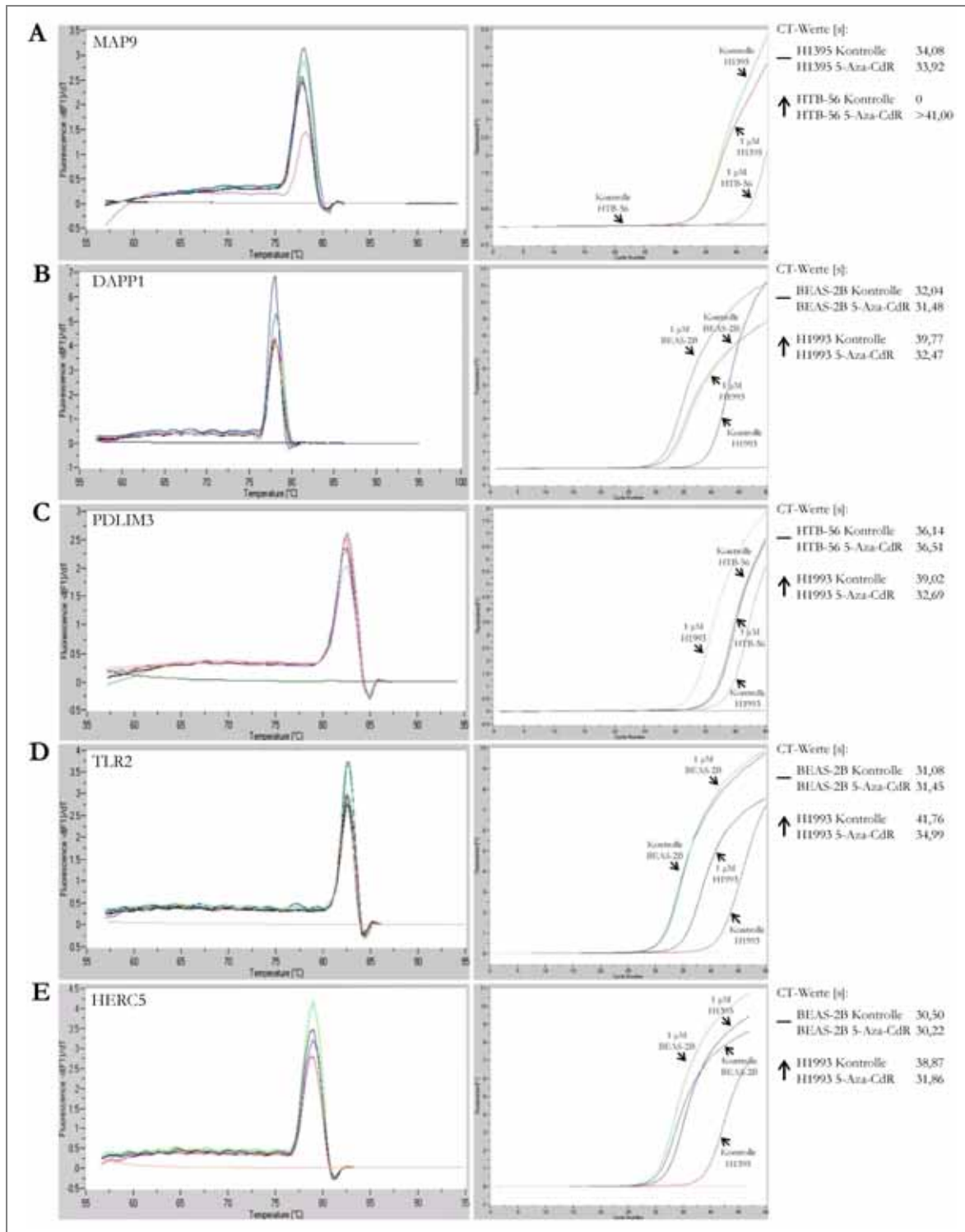


Abbildung 3.29. RTQ-PCR zur Validierung der Genexpression der differenziell regulierten Gene auf 4q vor und nach Behandlung mit 5-Aza-CdR. Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse und des Fluoreszenzverhaltens von (A) *MAP9*, Zelllinie H1395 und HTB-56; (B) *DAP1*, Zelllinie BEAS-2B und H1993; (C) *PDLIM3*, Zelllinie HTB-56 und H1993; (D) *TLR2*, Zelllinie BEAS-2B und H1993; (E) *HERC5*, Zelllinie BEAS-2B und H1395. Für jeden Ansatz ist der CT-Wert angegeben, der einen Hinweis auf die vorliegende Konzentration der *Template*-DNA gibt. Je geringer die Konzentration, desto höher der CT-Wert. Eine Demethylierung durch 5-Aza-CdR führt bei differenziell regulierten Genen zu einer Erhöhung der Expression und somit der *Template*-DNA. Dies führt in einer folgenden RTQ-PCR zu niedrigeren CT-Werten.

- keine differenziell regulierte Genexpression
- ↑ differenziell regulierte Genexpression

4. Diskussion

Das Bronchialkarzinom gehört zu den am häufigsten diagnostizierten Tumorarten in westlichen Industrieländern und stellt die Hauptursache aller malignombedingten Todesfälle dar (1, 10). Schätzungsweise 40% der Patienten mit vollständiger Resektion eines NSCLC, ohne Metastasen in den LK oder distanten Organen zum Zeitpunkt der Primäroperation, bekommen innerhalb der ersten zwei Jahre ein Rezidiv (231). Es wird vermutet, dass bereits zum Zeitpunkt der Primärresektion DTZ oder Mikrometastasen vorhanden sind. Mit den aktuellen Routineuntersuchungen sind diese nicht nachweisbar. Gestreut in die regionalen Lymphknoten oder in den Blutkreislauf können DTZ zu Vorläufern von späteren Metastasen in distanten Organe werden (33, 49).

In dieser Arbeit wurden unter Verwendung unterschiedlicher Mikroarray-Technologien chromosomale Aberrationen und Gene identifiziert, die einen Einfluss auf die hämatogene bzw. lymphogene Disseminierung des primären Bronchialkarzinoms haben. Neben der Identifizierung von potentiellen diagnostischen Markern tragen die Ergebnisse zum besseren Verständnis der Biologie des Disseminierungsprozesses bei.

4.1 Methodische Aspekte

Die Entwicklung der Array-Technologie hat die Forschung in Hinsicht auf den Nachweis von genomischen Imbalancen und der Genexpression in den letzten Jahrzehnten revolutioniert. Dabei sind die Anwendungsmöglichkeiten vielfältig. Am häufigsten werden, wie auch in dieser Studie, Mikroarrays zum Nachweis von Variationen in der Genexpression oder in der DNA-Kopienanzahl verwendet (162, 164, 183). Kombinationen verschiedener Array-Technologien eröffneten die Möglichkeit, Veränderungen innerhalb der Genexpression im direkten Zusammenhang mit chromosomalen Aberrationen zu ermitteln. Mögliche „Targetgene“ für einen gezielten Nachweis oder Therapie des Bronchialkarzinoms ließen sich bereits auf diesem Weg identifizieren (232-237).

Eine sorgfältige Auswahl der Tumorproben ist für die Auswertung sehr bedeutend, um Einflüsse wie Tumorgröße, Geschlecht, Alter und Histologie zu vermeiden. Bereits in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Histologie chromosomale Aberrationen auftreten und diese in einem direkten Zusammenhang mit der Entwicklung der jeweiligen Subtypen stehen (82, 238-241). Daher wurden die Untersuchungen zunächst auf Bronchialkarzinome des Subtyps AC beschränkt. Des Weiteren zeigten Petersen et al. bereits, dass in metastasierten SCC deutlich mehr genomische Aberrationen auftreten als in nicht-metastasierten (242). Um zu gewährleisten, dass die detektierten genomischen und genetischen Veränderungen im Zusammenhang mit einer frühen Disseminierung von Tumorzellen stehen, wurden in dieser Studie nur Patienten

ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Primäroperation keine distanten Metastasen aufwiesen. Tumorgewebe, insbesondere Bronchialkarzinome, können sich deutlich im Anteil an infiltrierten Zellen, wie stromalen Fibroblasten oder Leukozyten, unterscheiden. Daher wurden die Tumorzellen abhängig von der Heterogenität des Gewebes entweder durch manuelle Dissektion oder durch Mikrodissektion mittels LPC aus dem Gewebeverband isoliert. So konnte ein Einfluss dieser unerwünschten Zellstrukturen auf die Array-Ergebnisse vermieden werden (221, 243).

Genomische Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl wurden mit einer Array-CGH ermittelt, wobei chromosomale Bereiche, die im Tumorgenom über- bzw. unterrepräsentiert vorliegen, durch Vergleich mit normaler genomischer DNA identifiziert wurden (157, 244). Die eher selten auftretenden balancierten Translokationen in epithelialen Tumoren lassen sich allerdings auf diese Weise nicht nachweisen (79). Während die klassische CGH auf einer Hybridisierung auf Metaphasechromosomen beruht, verwenden Array-CGHs BAC-Klone, cDNA-Sonden oder Oligonukleotide (159, 161, 162). Durch die Verwendung von Array-CGHs, basierend auf Oligonukleotiden, lässt sich das Auflösungsvermögen nahezu unbegrenzt erhöhen (163). Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Vergleich zwischen Array-CGHs mit BAC-Klonen und Oligonukleotiden konnte die Ergebnisse von Wicker et al. bestätigen (245). Letztere ermöglichen durch ihre hohe Auflösung sowohl die Detektion kleinerer Alterationen, wie distinkten *High Level* Amplifikationen, als auch den Nachweis des schwierig zu ermittelnden DNA-Verlustes (246). Ein weiterer Vorteil bietet die Auswertung auf Genebene, die einen direkten Zusammenhang zwischen der DNA-Kopienanzahl und der Genexpression erlaubt (164). In dieser Studie wurde als Referenz Leukozyten-DNA von gesunden Probanden verwendet, die einen normalen diploiden Chromosomensatz aufweisen. Allerdings führen VDJ-Rekombinationen als Folge des adaptiven Immunsystems bei Leukozyten zu typischen genomischen Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl, wie z. B. auf Chromosom 8 und 15 (204, 247). Diese chromosomalen Regionen wurden deshalb aus den Auswertungen ausgeschlossen.

Aufgrund von mehr oder weniger starken Hintergrundsignalen, verursacht durch Polymorphismen, Aneuploidie sowie die experimentelle Durchführung war zur Auswertung dieses komplexen Datensatzes eine hoch sensitive Datenanalyse nötig (248). In publizierten Arbeiten werden ganz unterschiedliche Strategien zur Auswertung dargestellt, wobei keine der statistischen Methoden deutlich favorisiert zu sein scheint. Für die Auswertung dieser Studie wurde daher eine Kombination aus zwei Analyseverfahren gewählt. Zum einen wurden mit dem bioinformatischen Programm aCGH-Smooth potentielle Bruchpunkte sowie DNA-Gewinne und DNA-Verluste ermittelt (206) und zum anderen wurden signifikante chromosomale Veränderungen zwischen zwei Patientengruppen mit dem Programm DRF identifiziert. DRF wurde bereits bei dem Nachweis von spezifischen chromosomalen Aberrationen in Bronchialkarzinomen angewendet, bei denen Asbest als Krebsauslöser galt (205, 249). Ein durchgeführter *Sex-Mismatch* gab

zusätzliche Hinweise auf die Qualität der Array-CGH und wurde zur Identifizierung von *High-Level* Amplifikationen verwendet (163, 232).

Chromosomale Aberrationen resultieren nicht zwangsläufig in einer Veränderung der Expression für alle in diesem Bereich liegenden Gene. Wie Dehan et al. kürzlich darstellte, soll in NSCLC sowohl die erhöhte als auch die verminderte Genexpression von nur 16% der Gene direkt auf chromosomale Aberrationen zurückzuführen sein (232). Dahingegen wiesen Studien an Tumorzelllinien sowie an Mammakarzinomen in 30-60% der Gene Veränderungen in ihrer Genexpression basierend auf der DNA-Kopienanzahl nach (233, 234, 250, 251). Pinkel und Albertson bestätigten die Notwendigkeit, zusätzlich die Genexpression in den alterierenden chromosomalen Regionen zu untersuchen (246). Nur Gene, die zusätzlich zur aberranten DNA-Kopienanzahl, Veränderungen in ihrer Expression aufweisen, können eine potentielle Rolle in der Karzinogenese und in der Progression spielen (232).

Zum Nachweis von Chromosomenbereichen, in denen chromosomale Aberrationen zu signifikanten Veränderungen in der Genexpression führen, wurden mit Mikroarrays Expressionsprofile von den Primärtumoren erstellt. Die Auswahl der optimalen Referenz stellt für jede Tumorart einen kritischen Faktor dar. Als Referenz wurde normales Lungengewebe von drei verschiedenen Patienten verwendet, wobei diese in Hinblick auf Alter und Geschlecht mit den Bronchialkarzinompatienten vergleichbar waren (145). Es zeigte sich, dass 56% der auf dem Array vertretenen Gene eine mRNA Expression in den Tumorproben aufwiesen, was vergleichbar mit anderen Studien für Bronchialkarzinome ist (151, 225-227). Differenziell exprimierte Gene in zwei Patientengruppen wurden mit ROC-Analysen ermittelt (146, 209). Unter Verwendung von *Cluster*-Analysen lassen sich Patienten mit ähnlichen Expressionsprofilen in Gruppen zusammenfassen (228). Weiterhin ist es möglich, mit *Pathway*-Analysen unter Verwendung verschiedener Datenbanken für die Karzinogenese bedeutende Signaltransduktionswege zu identifizieren, in denen die differenziell exprimierten Gene involviert sind.

Um chromosomale Bereiche zu identifizieren, in denen gehäuft differenziell exprimierte Gene vorkommen, wurde DRF in gleicher Weise wie zuvor für die Array-CGH verwendet. Ein Vergleich der Ergebnisse der Array-CGH mit der Genexpression führte zum Nachweis von mehreren chromosomalen Aberrationen, die mit einer signifikanten Veränderung der Genexpression zwischen den zwei Gruppen korrelierten.

Die Durchführung von Mikroarrays ist sehr kostspielig und konnte daher im Rahmen dieser Studie nur für ein kleines Patientenkollektiv verwendet werden. Aus diesem Grund ist eine Verifikation der identifizierten chromosomalen Aberrationen an einem größeren Patientenkollektiv nötig. Hierfür bot sich die Verwendung eines TMAs an. Diese haben einerseits den Vorteil, dass tausende Proben zusammen unter den gleichen Bedingungen untersucht werden

können und andererseits, das der Materialverbrauch z. B. an DNA-Sonde gering gehalten werden kann (190). Im Rahmen dieser Studie wurden die Ergebnisse für die DNA-Kopienanzahl mit FISH-Analysen sowohl für vier verschiedene Zentromere als auch für zwei chromosomale Regionen auf 17q und 4q an den für die Mikroarrays verwendeten Tumorproben verifiziert und auf ein zusätzliches unabhängiges Patientenkollektiv ausgeweitet (252, 253). FISH ist eine sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Diagnostik etablierte Technik (254, 255), mit der es möglich ist, DNA- und RNA-Sequenzen mittels Fluoreszenz-markierten Sonden auf Zellebene zu visualisieren und zu untersuchen (224, 256). DNA-Verluste lassen sich durch das Fehlen und DNA-Gewinne durch das häufigere Auftreten der Fluoreszenz-Signale nachweisen.

Die Anwendungsmöglichkeiten von Expressionsarrays sind vielfältig. In dieser Studie wurden weitere verwendet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression in Zelllinien zu ermitteln und so potentielle Tumorsuppressorgene zu identifizieren. Eine epigenetische Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene durch aberrante Hypermethylierung der Promotorbereiche wird häufig in Bronchialkarzinomen beobachtet und scheint einen wichtigen Einfluss auf die Pathogenese zu haben (257). Die genomweite Demethylierung durch Behandlung mit Demethylierungs-Agenzien führt zu einer Re-Expression von Genen, die zuvor durch Methylierungen der CpG-Inseln in Promoterbereichen inaktiviert waren (179, 180). Ein Vergleich der Re-Expressionsprofile von Normalgewebe mit Tumorgewebe lässt auf das Vorhandensein von potentiellen Tumorsuppressorgenen schließen (181). Diese werden in Normalgeweben exprimiert und liegen in Tumorgewebe durch Hypermethylierung reprimiert vor.

4.2 Allgemeine genomische Veränderungen in primären Bronchialkarzinomen

Die Karzinogenese des Bronchialkarzinoms ist ein mehrstufiger Prozess und das Auftreten von molekularen Veränderungen, sowohl auf genomischer als auch auf Expressionsebene, kann zur Entstehung eines manifesten Karzinoms führen (79). DNA-Verluste können chromosomale Bereiche mit bekannten Tumorsuppressorgenen betreffen, deren Verlust bzw. deren Inaktivierung in der Karzinogenese eine fundamentale Rolle spielt (68, 258). Andererseits können DNA-Gewinne bzw. *High Level* Amplifikationen zur Aktivierung von bekannten oder potentiellen Onkogenen führen, welche ihrerseits die Tumorentstehung durch Veränderungen in der Zellteilung und -differenzierung fördern (66, 67, 251). Durch vergleichende Analysen konnten anhand von häufig auftretenden chromosomalen Aberrationen bestimmte genomische Muster ermittelt und diese in der Karzinogenese eingeordnet werden (79).

Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl wurden an 30 Geweben primärer Bronchialkarzinomen des Subtyps AC mit Array-CGH ermittelt. Grundsätzlich wies jede

Tumorprobe genomische Aberrationen auf. In Übereinstimmung mit anderen Studien konnten häufig auftretende chromosomale Veränderungen wie DNA-Überrepräsentationen von 1q, 5p, 7p und DNA-Verluste von 3p, 9q und 17p nachgewiesen werden (82, 223, 232, 240, 241, 259-262). Dabei scheinen DNA-Gewinne des Chromosoms 7 in Form von Trisomien als frühes Ereignis in NSCLC aufzutreten und können bereits im entfernt liegenden premalignen Lungengewebe detektiert werden (78). Die Profile der DNA-Kopienanzahl des hier verwendeten Kollektivs wiesen ebenfalls die für AC spezifischen genomischen Imbalancen wie DNA-Überrepräsentation von 1q und DNA-Verluste von 3q, 9q und 19p auf (263-265). Die in der Karzinogenese früh auftretenden DNA-Gewinne auf 1q und 20q sowie DNA-Verluste von 18q gehören zu den häufigsten Ereignissen und werden ebenfalls in AC anderer Tumoridentitäten nachgewiesen, wie z. B. in Mamma- (266-268), Kolon- (269) oder Magenkarzinomen (270).

In elf der 30 untersuchten Tumorgewebe konnten *High Level* Amplifikationen an 22 verschiedenen chromosomalen Loci identifiziert werden, darunter DNA-Überrepräsentationen von bekannten Onkogenen wie *cMYC* (8q24), *CCND1* (11q13) und *MDM2* (12q15) (222, 271). Weitere oft beschriebene distinkte Amplikons schlossen 3q25, 11q35, 14q13, 19q13 und 22q11 ein (194, 271-273). Studien zeigten, dass *High Level* Amplifikationen von 14q13 mit dem Fortschreiten der Krebserkrankung korrelieren und somit mit einer schlechten Prognose assoziiert zu sein scheinen (226, 240, 260). Zwei der in dieser Studie untersuchten Tumorgewebe wiesen ebenfalls *High Level* Amplifikationen von 14q13 auf, wobei als potentielle Targetgene *NKX2-1* (*TTF1*; *Transcription Termination Factor 1*) und *FOXA1* (*Forkhead Box A1*) vermutet werden (274-278).

Die Auswertungen der Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl in den Bronchialkarzinomen zeigten unabhängig vom KM- bzw. LK-Status, dass sowohl allgemein bekannte als auch für AC spezifische chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus ließen sich aufgrund der hoch auflösenden Array-CGH neben bereits publizierten *High Level* Amplifikationen diverse unbekannte wie z. B. auf 16p und 9p detektieren, die interessante neue chromosomale Regionen für potentielle Onkogene darstellen.

4.3 Für die hämatogene Disseminierung relevante genomische Aberrationen und ihr Einfluss auf die Genexpression

Bereits zum Zeitpunkt der Resektion können DTZ im KM bei 22-60% der Patienten mit einem primären Bronchialkarzinom nachgewiesen werden (55, 279-282). Dabei beruht der Nachweis auf einer immunhistochemischen Färbung von Zytokeratin-positiven Zellen, die aufgrund der hohen Sensitivität die Detektion von nur einer epithelialen Tumorzelle innerhalb einer Millionen normaler KM-Zellen erlaubt (53, 55). Die Spezifität des Antikörpers, welcher gegen ein gemeinsames Epitop verschiedener Zytokeratine gerichtet ist, wurde durch Analysen mit

annähernd 200 gesunden Probanden nachgewiesen (53, 55). Da DTZ im KM ungleichmäßig verteilt vorliegen, sollten für eine hohe Trefferquote möglichst mehrere KM-Aspirate aus dem Beckenkamm und den Rippen entnommen und untersucht werden (54). Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte für KM-Aspirate von Patienten des UKEs mit dem *ACIS*, einem voll automatisierten System, welches sich im Vergleich zur rein manuellen Mikroskopie durch eine höhere Sensitivität und Reproduzierbarkeit auszeichnet (200).

In acht von zwölf Studien wurde gezeigt, dass das Auftreten von DTZ im KM mit einer schlechten Prognose für Patienten mit einem NSCLC verbunden ist (2-4, 49, 57, 59, 60, 62). Unklar ist derzeit, ob es sich bei der Streuung von Zellen aus dem Primärtumor um einen selektiven Prozess oder um ein eher spontanes Ablösen von Tumorzellen aus dem Zellverband handelt. Untersuchungen an primären Mammakarzinomen zeigten bereits, dass die frühe hämatogene Disseminierung von Tumorzellen in das KM scheinbar auf ein spezifisches Expressionsmuster des Primärtumors zurückzuführen ist (5, 6). Dies würde bedeuten, dass die frühzeitige Disseminierung durch eine Reihe von Genen kontrolliert wird. Der Nachweis genomischer Aberrationen bzw. Veränderungen in der Genexpression, die zur Progression und Metastasierung von Tumoren führen, könnte äußerst hilfreich in der Diagnostik oder in der Wahl der Therapie sein. Der Nachweis von abnormalen Zellen im Sputum oder in bronchialen Abstrichen, u. a. mit FISH-Sonden für die Gene *EGFR* und *C-MYC*, ist bereits in vielen Laboratorien etabliert und erhöht in Kombination mit den routinemäßigen zytologischen Analysen die diagnostische Sensitivität (191, 192).

Für das Bronchialkarzinom sind zurzeit noch keine für die hämatogene Disseminierung von Tumorzellen spezifischen genomischen Veränderungen bzw. Genexpressionsmuster bekannt. Durch den Vergleich der DNA-Kopienanzahl mit der Genexpression in primären Bronchialkarzinomen von Patienten mit bzw. ohne DTZ im KM konnten in dieser Arbeit für die hämatogene Disseminierung spezifische genomische Aberrationen nachgewiesen werden, die außerdem einen Einfluss auf die Genexpression besaßen. Diese chromosomale Regionen bzw. Targetgene könnten als prognostische Marker oder zur Entwicklung neuer Medikamente für das Bronchialkarzinom bedeutend sein.

Die Patienten wurden entsprechend ihres KM-Status in zwei Gruppen eingeteilt (KM-positive und KM-negative Gruppe). Unter Verwendung einer sensitiven statistischen Auswertung (DRF) und dem Programm aCGH-Smooth wurden 32 chromosomale Regionen identifiziert, die signifikante Veränderungen in ihrer DNA-Kopienanzahl in Abhängigkeit des KM-Status der Patienten aufwiesen. In NSCLC konnten bereits für einige dieser Aberrationen, wie z. B. DNA-Überrepräsentationen auf 4q, 8q, 17q und 20p und DNA-Verluste auf 10q eine signifikante Assoziation mit dem metastatischen Phänotyp nachgewiesen werden (242, 260, 283). Einzelne chromosomale Aberrationen, die bei Bronchialkarzinomen mit dem Auftreten von distanten

Metastasen korrelierten, zeigten keine Assoziation mit dem KM-positiven Status. So scheinen DNA-Verluste auf 4p, 6q und DNA-Überrepräsentationen auf 7q in anderen Signalkaskaden der Metastasierung involviert zu sein als in dem spezifischen Prozess der Mikrometastasierung (242, 260, 283).

Chromosomale Aberrationen haben nicht zwangsläufig für alle in dieser Region liegenden Genen auch Veränderungen in der Genexpression zur Folge (232, 233, 250). Daher wurden die 32 signifikanten chromosomalen Regionen auf Unterschiede hinsichtlich ihrer Genexpression in der KM-negativen und der KM-positiven Gruppe untersucht. Von den primären Bronchialkarzinomgeweben wurden Expressionsprofile erstellt und diese mit der DNA-Kopienanzahl verglichen. Es wurden fünf chromosomale Regionen identifiziert, deren Veränderungen sowohl auf genomischer als auch auf Expressionsebene eine signifikante Assoziation mit dem KM-Status der Patienten aufwiesen. Mit 104 der insgesamt 1.367 signifikant differenziell exprimierten Gene lagen innerhalb dieser chromosomalen Bereiche überdurchschnittlich viele Gene, die eine Assoziation mit dem KM-Status zeigten ($p < 0,006$). Das *Clustern* führte zu einer annähernd vollständigen Separation der Patienten in zwei Gruppen entsprechend ihres KM-Status.

Zwei der fünf chromosomalen Regionen zeigten DNA-Überrepräsentationen (17q und 20q) und drei DNA-Verlusten (4q, 10p und 10q) in der KM-positiven Gruppe. DNA-Gewinne auf den Chromosomen 4 und 10 wurden zudem häufiger in der KM-negativen Gruppe gefunden. Die Ergebnisse konnten mit FISH-Analysen für 4q und 17q an Geweben, die bereits für die Array-CGH verwendet wurden, bestätigt werden. Da diese ersten Schritte des „Screenings“ unter Verwendung eines relativ kleinen Patientenkollektivs stattfanden, wurde die DNA-Kopienanzahl für 4q und 17q mit FISH-Analysen an einem größeren unabhängigen Patientenkollektiv verifiziert.

Das häufigste Ereignis in der Array-CGH waren DNA-Verluste auf Chromosom 4q12-q32 in der KM-positiven und DNA-Gewinne in der KM-negativen Gruppe. Weitere FISH-Analysen an zusätzlichen Gewebeproben konnten bestätigen, dass ein Verlust von 4q21 signifikant häufiger in KM-positiven als in KM-negativen Patienten zu finden ist ($p = 0,002$). Die multivariate Analyse zeigte, dass es sich bei dem KM-Status um den einzigen unabhängigen Faktor handelte, der mit einem DNA-Verlust von 4q korrelierte. Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen erstmals auf eine spezifische Rolle von 4q in der hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen in Form von Tumorsuppressorgenen unabhängig von der lymphatischen Disseminierung hin.

Erste Beweise für das Vorhandensein von potentiellen Tumorsuppressorgenen auf Chromosom 4 und ihr möglicher Einfluss auf die Karzinogenese wurden bereits Anfang der neunziger Jahre gefunden. Zusätzliches Einführen von Chromosom 4 in die humane Teratomzelllinie PA-1 (Zelllinie eines Keimzelltumors) *via* Zellfusion führte zu Veränderungen in der Zellmorphologie

und zur Suppression der Tumorgenität in Nacktmäusen (284). Bei drei weiteren Tumorzelllinien (generiert aus einem Zervix-, Blasenkarzinom und aus einem Glioblastom) ließ sich ebenfalls durch chromosomalen Transfer von Chromosom 4 der zuvor inhibierte Alterungsprozess (Seneszenz) wiederherstellen (285). Vermutlich befindet sich mindestens ein Gen auf Chromosom 4, welches in der Zellalterung und der Wachstumsregulation involviert ist. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, wiesen Goeze und Kollegen an primären AC der Lunge eine Korrelation zwischen dem DNA-Verlust von 4q und der Entstehung von distanten Metastasen und dem Auftreten von DNA-Gewinnen in der nicht-metastatischen Patientengruppe auf (260). In primären Leberkarzinomen, in oralen SCC und Gehirnmastasen korrelierte ein DNA-Verlust von 4q ebenfalls signifikant mit der Tumorprogression (286-288).

In Gehirnmastasen der Lunge konnte in dieser Studie darüber hinaus in 39% der Fälle ein Verlust von 4q detektiert werden. Es zeigte sich, dass DNA-Verluste von 4q in Primärtumoren der Lunge mit ähnlicher Häufigkeit gefunden wurden, wobei DNA-Gewinne der KM-negativen Gruppe in Gehirnmastasen nur selten auftraten (6%). Ebenso wie in primären Tumoren war der DNA-Verlust von 4q21 nicht nur auf den Subtyp AC beschränkt, sondern wurde sogar in einer höheren Frequenz in Gehirnmastasen der SCC und SCLC gefunden. Dies verdeutlicht den Einfluss von 4q-Verlusten, der nicht nur auf die ersten Schritte der metastatischen Kaskade beschränkt zu sein scheint, sondern auch für die Manifestation von distanten Metastasen sowohl in NSCLC als auch in SCLC bedeutend ist (288).

Die chromosomale Region 4q12-q32 war mit 107 MBp die größte chromosomale Region, die gefunden wurde und besaß unabhängig von der chromosomalen Größe die meisten differenziell exprimierten Gene. Diese wurden in fünf einzelnen *Hot Spots* gefunden, was die Existenz von mehr als einem Tumorsuppressorgen vermuten lässt. Keines dieser Gene (z. B. *Cyclin G2*, *Betacellulin*) zeigte eine Übereinstimmung mit Prädiktoren für die Mikrometastasierung in Brustkrebspatientinnen oder mit bekannten Suppressorgen der Metastasierung (5, 6, 289, 290). Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um Gene handelt, die eine spezifische Rolle in der Mikrometastasierung von Bronchialkarzinomen besitzen. Ebenso in SCLC, AC des Ösophagus und malignen Mesotheliom wurden mehrere einzelne kleinere DNA-Verluste in 4q beschrieben, wobei zurzeit noch kein potentiell Targetgen identifiziert werden konnte (291-294). In SCLC wurde ein homozygoter DNA-Verlust des Gens *MAPK10* (*Mitogen-activated Protein Kinase 10*) nachgewiesen. Dieses Gen wies weder eine Reprimierung der Expression noch einen homozygoten DNA-Verlust in dem hier verwendeten Kollektiv auf (294).

Die Array-CGH Analysen zeigten weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von DNA-Überrepräsentationen in 17q21 mit dem Vorhandensein von DTZ im KM. Dies ließ sich allerdings an einem größeren Patientenkollektivs mit FISH-Analysen nicht bestätigen. Während in der vorliegenden Studie DNA-Überrepräsentationen in 17q21 keinen Einfluss auf die

Überlebenswahrscheinlichkeit zeigten, korreliert die Überexpression von bekannten Proto-Onkogenen auf 17q wie z. B. *TOP2A* (*Topoisomerase 2A*) in Bronchial-, Mamma- und Magentumoren mit einer schlechten Prognose (145, 295, 296). Aufgrund seiner Funktion in der DNA-Replikation werden *TOP2A* Inhibitoren bereits als chemotherapeutische Agenzien in der Behandlung von Bronchialkarzinomen eingesetzt (297). Die Zytokeratine *KRT23*, *KRTAP4-10* (AP: assoziiertes Protein) und *KRT17* ebenso wie *TNS4* (*Tensin 4*, *CTEN*) wurden in der KM-positiven Gruppe signifikant häufig überexprimiert. Zytokeratine gehören zur Familie der Intermediärfilamente und werden in epithelialen Zellen exprimiert. Die Expression von *KRT17* korreliert mit einer schlechten Prognose für Brustkrebspatientinnen, die zum Zeitpunkt der Primäroperation keine Lymphknotenmetastasen aufwiesen (298). Der Nachweis einer positiven *KRT17* Expression könnte somit entscheidend zur Wahl der Therapie beitragen (298). Für *TNS4* konnte bereits eine Korrelation mit der Tumorprogression in Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden (299). Obwohl letztendlich die Korrelation zwischen dem Auftreten von DNA-Überrepräsentationen auf 17q und DTZ im KM nicht bestätigt werden konnte, wurden einige viel versprechende Gene identifiziert, die eine grundlegende Bedeutung in der metastatischen Kaskade haben können.

DNA-Gewinne in 20q11-13 wurden in dieser Studie signifikant häufiger in KM-positiven als in KM-negativen Patienten gefunden. Chromosomale Gewinne von 20q wurden bereits in verschiedenen Tumoridentitäten gefunden (82, 300-302), wobei DNA-Überrepräsentationen in 20q12-13 vor allem in der Entstehung von bronchialen AC in jüngeren Patienten involviert zu sein scheinen (265). Während in Magenkarzinomen DNA-Gewinne von 20q mit der Tumorentstehung und der -progression korrelieren (270, 303), werden sie in Kopf- und Halstumoren häufig mit der Lymphknotenmetastasierung in Verbindung gebracht (304). Interessanterweise wurden in unserer Analyse DNA-Überrepräsentationen vorwiegend in der doppel-positiven Gruppe (LK-positiv und KM-positiv) gefunden. Möglicherweise spielt dieser Locus sowohl in der hämatogenen als auch in der lymphogenen Disseminierung eine Rolle. Von insgesamt 170 Genen zeigten nur sieben eine signifikante Erhöhung in ihrer Expression aufgrund des DNA-Gewinnes. Das Gen *ADA* (*Adenosin-Deaminase*), welches die irreversible Deaminierung von Adenosin und Deoxyadenosin katalysiert (305), wies in 83% der KM-positiven Patienten eine Überexpression auf. Während langsam wachsende, gut differenzierte Tumore keine erhöhte ADA-Aktivität zeigen, konnte ein Anstieg der Enzymaktivität in schnell wachsenden malignen Tumoren nachgewiesen werden (306). Andere Studien zeigten hingegen, dass die Akkumulation von Adenosin in soliden Tumoren mit Tumorwachstum, Angiogenese und Inhibierung des Immunsystems korreliert (305), was die äußerst komplexe Natur der Metastasierung verdeutlicht.

Weiterhin korrelierten DNA-Überrepräsentationen auf Chromosom 10 mit dem KM-negativen und DNA-Verluste mit dem KM-positiven Status. Während Studien an NSCLC und bronchialen

Tumorzelllinien zeigten, dass es sich bei den chromosomalen Aberrationen auf Chromosom 10 häufiger um DNA-Verluste handelte (307), wiesen Kim et al. für SCC und SCLC eine Assoziation zwischen dem Auftreten von DNA-Überrepräsentationen auf 10p und einer schlechten Prognose nach (308).

In der hier vorgestellten Studie konnten erstmals spezifische genomische Aberrationen für die frühe hämatogene Disseminierung von Tumorzellen primärer Bronchialkarzinome nachgewiesen werden, die zu einer differenziellen Expression potentiell tumorassoziierter Gene führten. Die genomische Instabilität, die durch eine erhöhte Aberrationsrate die Akkumulation von verschiedenen genetischen Ereignissen erlaubt, resultiert größtenteils in Aneuploidie und wurde von Pollak et al. kürzlich als „*the seventh hallmark of cancer*“ bezeichnet (309). Es ist mittlerweile unumschritten, dass Aneuploidie, sowie chromosomale Aberrationen an sich, eine bedeutende Rolle in der Tumorentwicklung und Progression spielen (310). Das Level der Aneuploidie konnte in einer weiteren Studie entsprechend der chromosomalen Instabilität in ein spezifisches Genmuster übersetzt werden. Dieses erwies sich als starker Prognosemarker für verschiedene Tumortypen wie Mamma-, Bronchial- und Kolonkarzinome (311). Im Rahmen der hier durchgeführten Studie konnte der Zusammenhang von Aneuploidie und dementsprechend, der der chromosomalen Instabilität, mit dem mikrometastatischen Status der Patienten gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die frühe hämatogene Disseminierung ein spezifischer Prozess ist, der unter der Kontrolle verschiedener molekularer Veränderungen zu stehen scheint.

Besonders der DNA-Verlust auf Chromosom 4q sowohl in KM-positiven Patienten als auch in Gehirnmastasen lässt vermuten, dass wichtige Suppressorgene der Metastasierung sich in dieser chromosomalen Region befinden. In Abhängigkeit vom KM-positiven Status wiesen 48 Gene auf 4q eine verminderte Genexpression auf. Keines dieser Gene wurde bereits zuvor als Tumorsuppressorgen publiziert. Da es sich beim DNA-Verlust von 4q immer nur um den Verlust eines Allels handelte, muss das zweite Allel eines potentiellen Tumorsuppressorgens durch z. B. Methylierung reprimiert vorliegen. Dies eröffnete die Möglichkeit, an bronchialen Zelllinien, die bereits einen heterogenen Verlust von 4q aufwiesen, den Einfluss der Methylierung auf die Genexpression zu untersuchen und auf diesem Weg Gene zu identifizieren, die mit der hämatogene Disseminierung von Tumorzellen assoziiert zu sein scheinen (s. Kapitel 4.5).

Die mit Array-CGH ermittelten signifikanten Korrelationen zwischen den genomischen Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl mit dem KM-Status wurden für zwei der fünf chromosomalen Regionen (4q und 17q) an einem größeren Patientenkollektiv validiert. Nur für 4q konnte auch an einem größeren Patientenkollektiv die signifikante Assoziation bestätigt werden. Um weitere falsch positive Ergebnisse auszuschließen, sollen zukünftig auch die übrigen drei chromosomalen Regionen validiert werden.

4.4 Für die lymphogene Disseminierung relevante genomische Aberrationen und ihr Einfluss auf die Genexpression

Das Auftreten von Metastasen in den lokalen und regionalen LK gehört zusammen mit dem Tumorstatus und dem Vorhandensein von Fernmetastasen zu den wichtigsten Prognosefaktoren für Patienten mit einem NSCLC (312, 313). Die Behandlung der Patienten wird häufig durch den Status der LK bestimmt. Bei LK-negativen Patienten wird vielfach nur eine kurative Operation durchgeführt, während Patienten mit Metastasen in den LK, aufgrund der bereits aufgetretenen Streuung des Tumors, zusätzlich adjuvante bzw. neoadjuvante Chemotherapien erhalten (314, 315). Dementsprechend konzentrieren sich viele Studien darauf, die Sensitivität der zurzeit in der Routine verwendeten Verfahren zum Nachweis von LK-Metastasen weiter zu erhöhen (316). Verschiedene Studien haben bereits chromosomale Imbalancen bzw. Genexpressionsprofile im Zusammenhang mit der LK-Metastasierung identifiziert, um diese zur Etablierung neuerer Nachweisverfahren bzw. zur Ermittlung potentieller Targetgene zu nutzen (314, 317, 318).

In dieser Arbeit konnten 12 chromosomale Regionen auf acht Autosomen (1q, 2, 3q, 7q, 9q, 11, 14q und 20p) nachgewiesen werden, die in Abhängigkeit vom LK-Status der Patienten genomische Aberrationen in den Bronchialkarzinomgeweben aufwiesen. Bei neun dieser Imbalancen handelte es sich um DNA-Gewinne, die signifikant häufiger in LK-positiven Patienten auftraten. Dabei sind DNA-Gewinne in 3q und 7q häufig auftretende Ereignisse in Primärtumoren mit LK-Metastasen sowohl in Ovarial- und Ösophaguskarzinomen als auch in Kopf- und Halstumoren (319-324). Bockmühl et al. verglichen die genomischen Imbalancen von primären Kopf- und Halstumoren mit denen von LK-Metastasen und konnten zeigen, dass in LK-Metastasen häufiger DNA-Überrepräsentationen auf Chromosom 7 zu finden sind als in nicht-metastasierten Primärtumoren (323). Bereits in Gehirntumoren konnten DNA-Gewinne von Chromosom 7 nachgewiesen werden (288). Bei NSCLC tritt der DNA-Gewinn von Chromosom 7 allerdings als ein frühes Ereignis in der Karzinogenese auf und kann bereits in premalignem Lungengewebe gefunden werden (78) (vgl. auch Kapitel 4.2). Vergleiche der DNA-Kopienanzahl zwischen Primärtumoren und LK-Metastasen wurden für NSCLC bisher nicht durchgeführt.

DNA-Überrepräsentationen von Chromosom 20q scheinen ebenso von großer Bedeutung für die Metastasierung von Tumorzellen in die LK zu sein (321, 325, 326). In dieser Arbeit konnte nur eine signifikante Korrelation zwischen DNA-Gewinnen auf 20q mit dem Vorhandensein von DTZ im KM festgestellt werden. Es zeigte sich aber, dass diese DNA-Überrepräsentation häufig in Kombination mit dem doppel-positiven Status (LK-positiv und KM-positiv) zu finden war, was auf eine äußerst schlechte Prognose schließen lässt. Dies weist darauf hin, dass sich auf 20q potentielle Onkogene befinden, die unabhängig von der Art des Disseminierungswegs eine allgemeine Rolle in dem Prozess der Metastasierung spielen.

Bisher wurde in keiner Studie der Einfluss von chromosomalen Imbalancen auf die Genexpression in Abhängigkeit von der lymphogenen Metastasierung für das Bronchialkarzinom untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergleiche der genomischen Aberrationen mit den Genexpressionsprofilen zeigten keinen Zusammenhang zwischen den 12 signifikanten chromosomalen Regionen und den differenziell exprimierten Genen. Von insgesamt 1.391 *Probe-Sets*, wiesen lediglich 30 eine differenzielle Genexpression auf (2,2%). Verschiedene Expressionsstudien an Bronchialkarzinomen führten bereits zum Nachweis von Genmustern, anhand derer sich die Patienten gemäß ihrem LK-Status in die jeweilige Gruppen einordnen ließen (314, 318). LK-negative Bronchialkarzinome ließen sich zudem zusätzlich in aggressive und in weniger aggressive Tumore einteilen, die signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben und in der Rezidivrate aufwiesen (314). In Übereinstimmung zu der hier durchgeführten Studie, lagen die differenziell exprimierten Gene dabei nicht geclustert in einzelnen Chromosomenabschnitten, sondern verteilt über das gesamte Genom vor (314, 318). Somit scheint die für die lymphogene Metastasierung grundlegende Genexpression nicht auf Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl zurückzuführen zu sein, sondern überwiegend auf regulatorischen Veränderungen, wie z. B. der epigenetischen Inaktivierung von Genen durch Hypermethylierungen, zu beruhen.

Das Genexpressionsmuster, welches unabhängig von genomischen Imbalancen spezifisch für die lymphogene Disseminierung gefunden wurde, unterschied sich beträchtlich von dem der hämatogenen Disseminierung. Nur 26 Gene wurden signifikant für beide Disseminierungswege differenziell exprimiert. Darunter befand sich u. a. das Gen *MMP-10* (Matrix-Metalloproteinase 10 = Stromelysin 2, 11q22), welches signifikant häufiger in Tumorgewebe von Patienten überexprimiert wurde, die sowohl DTZ im KM als auch Metastasen in den LK aufwiesen (doppel-positive Gruppe). Die Proteine der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind an der Degradation der extrazellulären Matrix sowohl in normalen physiologischen Prozessen, wie der Embryonalentwicklung, der Reproduktion und der Gewebedifferenzierung, als auch bei Krankheiten, wie Arthritis oder Metastasierung, beteiligt (327-329). Die erhöhte Expression von *MMP-10* könnte die Invasion von Tumorzellen in die Blutbahn oder in das Lymphsystem begünstigen und somit zum Auftreten von Metastasen nicht nur in den LK sondern auch in distanten Organen führen. In NSCLC konnte eine Assoziation zwischen der mRNA-Expression und dem Proteingehalt für *MMP-10* nachgewiesen werden, während im Normalgewebe ein signifikant niedrigerer Proteingehalt vorlag (330-332). Des Weiteren korrelierte der Proteingehalt für *MMP-10* mit dem Vorhandensein von Metastasen in den LK in NSCLC (333).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die für die lymphogene Metastasierung zugrunde liegenden Veränderungen in der Genexpression überwiegend nicht auf chromosomale Imbalancen, sondern überwiegend auf regulatorische Veränderungen beruhen.

4.5 Potentielle Tumorsuppressorgene auf 4q

Im Rahmen dieser Studie wurden sowohl die DNA-Kopienanzahl als auch die Expressionsprofile von primären Bronchialkarzinomgeweben von Patienten mit bzw. ohne DTZ im KM miteinander verglichen. Ziel war es, genomische Muster bzw. Gene zu identifizieren, die einen potentiellen Einfluss auf die frühe hämatogene Disseminierung haben und zukünftig als prognostische Marker verwendet werden könnten.

Als häufigstes Ereignis wurde ein DNA-Verlust von 4q in der KM-positiven Gruppe nachgewiesen mit einer verminderten Expression von 48 Genen. Mit FISH-Analysen an einem TMA konnte die signifikante Korrelation von 4q-Verlusten mit dem KM-positiven Status an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden. In Gehirnmetastasen der Lunge wurden ebenfalls häufig DNA-Unterrepräsentationen gefunden, was für das Vorhandensein von potentiellen Tumorsuppressorgenen auf 4q spricht. Dabei handelte es sich allerdings immer um den Verlust von nur einem Allel. Nach der *Two Hit*-Hypothese von Knudson müssen jedoch für die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen mindestens zwei Ereignisse erfolgen, um beide Allele funktionell auszuschalten (7, 73). Bei dem ersten Ereignis kann es sich, wie hier bei 4q, um einen DNA-Verlust von einem Allel handeln. Das folgende Ereignis im zweiten Allel führt schließlich zur vollständigen Inhibierung der Genexpression und kann z. B. auf der Hypermethylierung einer CpG-reichen Domäne beruhen (126, 128). Hypermethylierungen von CpG-Inseln in Promotorbereichen sind ein häufig auftretendes Phänomen in Karzinomen, das zur Inhibierung der Expression von tumorassoziierten Genen führen kann (117, 125-127, 334). Zurzeit ist noch nicht vollständig geklärt, welche verschiedenen Mechanismen der DNA-Hypermethylierung zugrunde liegen. Die Überexpression der DNA-Methylase ist ein häufig auftretendes Ereignis (335, 336), kann aber nicht in allen Tumoren beobachtet werden (337). Auch Karzinogene, wie z. B. Nickel und Arsen, scheinen Hypermethylierung hervorzurufen und so Veränderungen in der Genexpression zu induzieren (338). Das Phänomen der Hypermethylierung und dessen inhibierende Wirkung auf die Genexpression wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um mögliche Tumorsuppressorgene auf 4q mit einem Einfluss auf die hämatogene Disseminierung näher einzugrenzen und einzelne Targetgene zu bestimmen.

Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang zwischen der DNA-Hypermethylierung und der Genexpression in Tumoren können Untersuchungen an Zelllinien unter Verwendung von 5-Aza-CdR liefern (181, 339). 5-Aza-CdR ist ein Demethylierungs-Agens, dessen molekulare Struktur einem Cytidin-Analogen entspricht (340). Durch Einbau in neu synthetisierte DNA-Stränge während der Replikation führt 5-Aza-CdR zu einer genomweiten Demethylierung und somit zur Re-Expression von Genen, deren Expression zuvor durch Methylierung inhibiert wurde (179, 180). Potentielle Tumorsuppressorgene, deren Expression spezifisch in Tumoren durch Hypermethylierungen inhibiert wird, lassen sich durch den Vergleich von Expressionsprofilen vor

und nach Behandlung mit 5-Aza-CdR von epithelialen Lungenzelllinien mit bronchialen Tumorzelllinien identifizieren (181). In dieser Studie wurden als bronchiale Tumorzelllinien die drei Zelllinien H1395, H1993 und HTB-56 und als nicht maligne epitheliale Lungenzelllinie die Kontroll-Zelllinie BEAS-2B verwendet.

Aufgrund der Toxizität führt die Behandlung von Zelllinien mit 5-Aza-CdR zu einer Verringerung der Zellteilungsrate und zu einer erhöhten Apoptose (341, 342). Deshalb musste zunächst die optimale Konzentration und Behandlungsdauer für jede Zelllinie ermittelt werden. Da 5-Aza-CdR nur in den neu synthetisierten DNA-Strängen zur Demethylierung führt, bleibt in den Ursprungszellen das ursprüngliche Methylierungsmuster erhalten. Um diesen Anteil an Zellen und ihren Einfluss auf das Expressionsprofil minimal zu halten, wurden die Zellkulturen mit einer geringen Zelldichte begonnen und möglichst bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Die demethylierende Wirkung der unterschiedlichen 5-Aza-CdR Konzentrationen wurde sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf genomischer Ebene an verschiedenen tumorassoziierten Genen (*GSTP1*, *hSRBC*, *RAR β* und *DLC1*) untersucht, die häufig in Bronchialkarzinomen aufgrund von Hypermethylierungen reprimiert vorliegen (129, 131, 197). Mit Genen der MAGE-Familie, die außer in den Fortpflanzungsorganen in Normalgewebe aufgrund von Hypermethylierungen nicht exprimiert werden, wurde der Demethylierungsstatus der nicht malignen Kontroll-Zelllinie überprüft (196). Es zeigte sich, dass für alle in dieser Studie verwendeten Zelllinien die optimale 5-Aza-CdR Konzentration bei 1 μ M lag.

Genexpressionsprofile der drei bronchialen Tumorzelllinien (H1993, H1395 und HTB-56) und der nicht malignen bronchialen Zelllinie (BEAS-2B) wurden mit der Array-Technologie vor und nach Behandlung mit 5-Aza-CdR erstellt. Durch Vergleich der Expressionsprofile wurden Gene nachgewiesen, die sich durch Demethylierung re-exprimieren lassen, also im nativen Zustand der Zelle methyliert vorlagen. Um eine möglichst vergleichbare Situation zum Tumorgewebe von KM-positiven Patienten zu gewährleisten, wurden die bronchialen Tumorzelllinien H1993, H1395 und HTB-56 verwendet, die u. a. einen heterogenen DNA-Verlust für 4q aufweisen (194). In dieser Arbeit konnte für jede Tumorzelllinie sowohl mit Karyogrammen an Metaphasechromosomen als auch mit FISH-Analysen und Array-CGH der heterogene Verlust von 4q bestätigt werden. Die Referenzzelllinie BEAS-2B wies sowohl auf genomischer Ebene (Karyogramme, FISH, Array-CGH) als auch auf Genexpressionsebene (Expression der MAGE-Gene) mit geringen Abweichungen den Zustand einer aus humanen Epithelzellen der Bronchien gewonnenen Zelllinie auf (193).

Es kann daher angenommen werden, dass die von der Referenz-Zelllinie differenziell durch Methylierung regulierten Gene entweder im Zuge einer Stressantwort exprimiert wurden oder aber keinen bedeutenden Einfluss auf die Karzinogenese besitzen. Tatsächlich zeigten Analysen zur Funktionalität, dass 32% dieser differenziell regulierten Gene zur Kategorie der Stressantwort und

Apoptose gehörten. Von daher wurden nur Gene in die nähere Betrachtung einbezogen, die eine methylierungsunabhängige Expression in der Referenz-Zelllinie BEAS-2B aufwiesen (181). Weiterhin mussten die Gene in normalen Lungengeweben exprimiert werden. Die Demethylierung durch 5-Aza-CdR sollte bei Tumorsuppressorgenen zu einer deutlichen Steigerung der Genexpression in mindestens zwei der drei Tumorzelllinien führen. Nach diesen Kriterien konnten auf 4q sieben tumor-spezifische Gene nachgewiesen werden, die als potentielle Tumorsuppressorgene in Frage kommen. Für drei dieser Gene (*HERC5*, *DAPP1* und *CHIC2*) konnte in Kapitel 4.3 bereits eine Korrelation zwischen der verminderten Expression und der frühen hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen in das KM von Patienten mit einem NSCLC gezeigt werden. Deshalb werden diese Gene nachfolgend etwas genauer charakterisiert.

HERC5 wurde zunächst als *CEB1* (*cyclin E-binding protein-1*) beschrieben und ist auf Chromosom 4q22 lokalisiert (343). Während Pankreaskarzinom-Zelllinien häufig eine erhöhte Expression von *HERC5* aufweisen (344), konnte im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen dem Verlust der Genexpression in primären Bronchialkarzinomen und der frühen hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen gefunden werden. Weiterhin zeigten zwei der drei untersuchten bronchialen Tumorzelllinien eine verminderte Genexpression aufgrund von Hypermethylierungen.

Die HERC-Proteine, eine Untergruppe der HECT-Ligasen (*homologous to E6-associated protein C-terminus*), weisen neben einer HECT-Domäne eine oder mehrere RCC1 (*regulator of chromosome condensation-1*)-ähnliche Domänen auf (345). Sie gehören zur Familie der Ubiquitin-Ligasen und katalysieren die reversible Kopplung von Ubiquitin an das Zielprotein, welches daraufhin in den Proteosomen proteolytisch abgebaut werden kann (346). Es konnte gezeigt werden, dass *HERC5* neben der Ubiquitinierung eine weitere bedeutende Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. Als negativer Regulator bindet *HERC5* an Cyclin E bzw. Cyclin-CdK2 und verzögert so den Übergang der G1- in die S-Phase (347). Die RCC1-ähnlichen Domänen weisen eine Ähnlichkeit zur Sequenz des RCC1-Proteins auf, welches bei der DNA-Replikation die vorzeitige Chromosomenkondensation verhindert (345). Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von *HERC5* und den Tumorsuppressorgenen *TP53* und *RB* in HeLa-Zellen (Zelllinien eines Zervixkarzinoms) gezeigt werden (347). Während bei funktionell aktivem *TP53* und *RB* eine geringe mRNA Expression von *HERC5* nachweisbar ist, steigt diese bei Mutanten deutlich an. Inhibierung der Genexpression und somit der Verlust der Genfunktion von *HERC5* scheint in Tumorzellen zu einer erhöhten Zellteilungsrate zu führen und kann somit einen bedeutenden Einfluss auf die Tumorprogression und Disseminierung haben.

Das Gen *DAPP1* (*dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides*) ist auch unter den Gennamen *BAM32* (*B cell adaptor molecule of 32 kDa*) oder *PHISH* (*phosphoinositide-interacting SH2 domain containing protein*) bekannt. Mehrere Gruppen konnten bereits zeigen, dass es sich bei *DAPP1* um ein ubiquitär exprimiertes Gen handelt, dessen höchste mRNA Expression in der Plazenta und im

Lungengewebe vorliegt, dicht gefolgt vom Gehirn, Herz, Niere, Leber, Pankreas und dem Muskelgewebe (348, 349). Dahingegen zeigten Marshall und Kollegen, dass die Expression von *DAPP1* hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems, wie der B-Lymphozyten, beschränkt ist (350). Für *DAPP1* wurden verschiedene Funktionen postuliert. Zum einen fungiert *DAPP1* als Adaptor, um andere Proteine als Antwort auf extrazelluläre Signale zur Plasmamembran zu rekrutieren (348). Des Weiteren spielt *DAPP1* eine Rolle in der Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten (351). Sowohl in B-Lymphozyten als auch in verschiedenen humanen Geweben kann *DAPP1* durch die Bindung an PI3 (Phosphatidylinositol-3)-Kinasen zur Aktivierung von RAC-1 führen (348, 351), das als GTP-bindendes Protein der RAS-Familie eine wichtige regulatorische Rolle bei der Interaktion von Integrinen mit dem Aktinzytoskelett spielt (352, 353). Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist für die Zellmigration einzelner Tumorzellen, deren Invasion in die Lymph- bzw. Blutbahn und letztendlich Extravasation in distante Organe von großer Bedeutung und somit grundlegende Voraussetzung für die Metastasierung (354). Zajchowski zeigte bereits, dass für RHO – ebenfalls ein Mitglied der RAS-Familie – in hochmetastatischen Mammakarzinomzelllinien eine verminderte Genexpression im Vergleich zu gering metastatischen vorliegt (355). Diese Daten zusammen mit veröffentlichten Genexpressionstudien über das humane Medulloblastom bestätigten, dass Veränderungen im Zytoskelett eine bedeutende Rolle für die metastastische Kapazität von Tumorzellen spielen (356). Dies würde dafür sprechen, dass eine verminderte Genexpression von *DAPP1* in Primärtumoren von KM-positiven Patienten zu einer verminderten Aktivierung von RAC-1 führen und dementsprechend die Zellmigration erleichtern könnte.

In KM-positiven Bronchialkarzinomen und in zwei bronchialen Tumorzelllinien wurde außerdem eine verminderte Expression von *CHIC2* (*Cysteine-rich hydrophobic domain*) nachgewiesen. Über die Funktion von *CHIC2*, auch bekannt als *BTL* (*Brx-like translocated in leukemia*) ist derzeit wenig bekannt. Die Proteine der CHIC-Familie (*CHIC1*, *CHIC2*) besitzen eine cysteinreiche, hydrophobische Domäne und sind auf vesikulären Strukturen und auf der Plasmamembran nachweisbar (357). Es zeigte sich, dass dieses Gen häufig in chromosomale Translokationen (t(4; 12)(q11; p13)) bei akuten myeloischen Leukämien involviert ist (358, 359). Als Konsequenz entsteht ein *in-frame* Fusionsgen auf Chromosom 12 aus *CHIC2* (Exon 1-3) und *ETV6* (*ets variant gene 6*, Exon 2-8), wobei die onkogene Wirkung des Proteins noch nicht bekannt ist (358).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse belegen erstmals, dass die frühe hämatogene Disseminierung von Tumorzellen in Patienten mit einem primären Bronchialkarzinom ein spezifischer Prozess ist und unter der Kontrolle verschiedener molekularer Veränderungen steht. Anhand von Methylierungsversuchen an bronchialen Tumorzelllinien wurden drei potentielle Tumorsuppressorgene auf 4q ermittelt, deren verminderte Genexpression in KM-positiven Patienten vermutlich auf einer Kombination von DNA-Verlust und Hypermethylierung beruht.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um diesen Zusammenhang an Patientenmaterial zu bestätigen und die Mechanismen der Tumorsuppressoren zu analysieren.

4.6 Ausblick

Bereits mehrere Studien zeigten die prognostische Relevanz von DTZ im KM auf das Überleben der Patienten zum Zeitpunkt der primären Resektion des Bronchialkarzinoms. Allerdings sind KM-Biopsien und der Nachweis disseminierter Tumorzellen im KM aufwendige Analyseverfahren, die nicht routinemäßig in allen Labors durchgeführt werden können. Durch die Identifikation von Markern könnte durch einfache Nachweisverfahren am Primärtumor (z. B. PCR oder immunhistochemische Färbungen) ein Hinweis auf das Vorhandensein von DTZ im KM gegeben und die Patienten dementsprechend in Risikogruppen eingestuft werden.

Anhand von genomischen Studien zur DNA-Kopienanzahl und Expressionsanalysen konnten im Rahmen dieser Studie erstmals genomische Aberrationen nachgewiesen werden, die signifikant mit einer frühen hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen in Patienten mit einem primären Bronchialkarzinom korrelieren. Der Verlust von einem Allel von 4q war das prominenteste Ereignis sowohl in Primärtumoren als auch in Gehirnmetastasen der Lunge und führte zu einer verminderten Expression von 48 Genen in der KM-positiven Gruppe. Weitere Methylierungsuntersuchungen an bronchialen Tumorzelllinien zeigten, dass die verminderte Expression von drei dieser Gene (*CHIC2*, *HERC5* und *DAPP1*) neben einem heterogenen DNA-Verlust wahrscheinlich zusätzlich auf Hypermethylierungen zurückzuführen ist. Obwohl bisher noch keine Daten über eine mögliche Hypermethylierung und deren Einfluss auf die Expression dieser potentiellen Tumorsuppressorgene vorhanden sind, deuten Sequenzanalysen der Promotorbereiche auf einen hohen Anteil an CpG-Inseln hin. Untersuchungen zeigten allerdings, dass aus bisher noch nicht bekannten Gründen Zelllinien wesentlich stärker methyliert sind als Primärtumore (360, 361). Um von den Tumorzelllinien letztendlich auf die primären Bronchialkarzinome schließen zu können, muss zunächst der Methylierungsstatus in den Primärtumoren in Abhängigkeit vom KM-Status ermittelt werden. Durch die Etablierung von methylierungsspezifischen PCRs wäre es möglich, die genomische DNA der Tumore mit geringem Aufwand auf das Vorhandensein von Hypermethylierungen zu untersuchen und auf diese Weise Rückschlüsse auf die prognostische Relevanz zu erhalten. An einem größeren Patientenkollektiv müsste zudem untersucht werden, ob der alleinige Nachweis einer verminderten Expression dieser drei Tumorsuppressorgene ausreicht, um eine prognostische Aussage zu erhalten. Kombinationen aus FISH-Analysen (DNA-Verlust von 4q), MSI-PCRs, RT-PCRs und immunhistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern könnten die Sensitivität erhöhen und ein einfaches Nachweisverfahren für die frühe hämatogene Disseminierung darstellen.

5. Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
2. Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, et al. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993;53:1027-31.
3. Passlick B, Kubuschok B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K. Isolated tumor cells in bone marrow predict reduced survival in node-negative non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1999;68:2053-8.
4. Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, et al. Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg* 1995;222:415-23; discussion 23-5.
5. Naume B, Zhao X, Synnestvedt M, et al. Presence of bone marrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer. *Molecular oncology* 2007:1-12.
6. Woelfle U, Cloos J, Sauter G, et al. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 2003;63:5679-84.
7. Knudson AG. Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 2000;34:1-19.
8. UICC Cancer Atlas, 2006.
9. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:99-106.
10. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 2005;40:90-7.
11. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest* 2002;122:1037-57.
12. Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *Lancet* 2000;355:479-85.
13. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:733-44.
14. Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G. Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. *Chest* 1997;112:1474-9.
15. Peto R. Smoking and death: the past 40 years and the next 40. *Bmj* 1994;309:937-9.
16. Kreuzer M, Kreienbrock L, Gerken M, et al. Risk factors for lung cancer in young adults. *Am J Epidemiol* 1998;147:1028-37.
17. Schneiderman MA, Levin DL. Trends in lung cancer. Mortality, incidence, diagnosis, treatment, smoking, and urbanization. *Cancer* 1972;30:1320-5.
18. Karjalainen A, Anttila S, Vanhala E, Vainio H. Asbestos exposure and the risk of lung cancer in a general urban population. *Scand J Work Environ Health* 1994;20:243-50.
19. O'Reilly KM, McLaughlin AM, Beckett WS, Sime PJ. Asbestos-related lung disease. *Am Fam Physician* 2007;75:683-8.
20. Moller P, Folkmann JK, Forchhammer L, et al. Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008.
21. Shields PG, Harris CC. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J Clin Oncol* 2000;18:2309-15.
22. Osann KE. Lung cancer in women: the importance of smoking, family history of cancer, and medical history of respiratory disease. *Cancer Res* 1991;51:4893-7.

23. Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink H, Harris C Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization classification of tumours, Lyon. France, 2004.
24. Mertelsmann R, Engelhard R, Berger D Das rote Buch - Hämatologie und internistische Onkologie. Das Bronchialkarzinom, Vol. 2, p. 588-97: Ecomed medicine, 2006.
25. Nackaerts K, Axelson O, Brambilla E, et al. Epidemiology of lung cancer: a general update. Eur Respir Rev 2002;12:112-21.
26. Böcker W, Denk H, Heitz U Pathologie, Vol. 2.: Urban & Fischer Verlag München, 2001.
27. Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. Cancer 1997;80:1803-4.
28. Choi YS, Shim YM, Kim K, Kim J. Pattern of recurrence after curative resection of local (stage I and II) non-small cell lung cancer: difference according to the histologic type. J Korean Med Sci 2004;19:674-6.
29. Harpole DH, Jr., Herndon JE, 2nd, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. Cancer Res 1995;55:51-6.
30. Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. Chest 1986;89:225S-33S.
31. Berger D, Engelhard R, Mertelsmann R Das rote Buch - Hämatologie und Internistische Onkologie, 2. edition: ecomed medicine, 2006.
32. Wistuba II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. Annu Rev Pathol 2006;1:331-48.
33. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer 2004;4:448-56.
34. Hart IR, Saini A. Biology of tumour metastasis. Lancet 1992;339:1453-7.
35. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. Pathol Int 2002;52:255-64.
36. Salon C, Lantuejoul S, Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. The E-cadherin-beta-catenin complex and its implication in lung cancer progression and prognosis. Future Oncol 2005;1:649-60.
37. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer 2002;2:161-74.
38. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J Cell Biol 1994;124:619-26.
39. Orr FW, Wang HH. Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis. Surg Oncol Clin N Am 2001;10:357-81, ix-x.
40. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer 2002;2:563-72.
41. Uhr JW, Scheuermann RH, Street NE, Vitetta ES. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. Nat Med 1997;3:505-9.
42. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. Science 1977;197:893-5.
43. Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. Nature 2002;418:823.

44. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000;60:1388-93.
45. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970;45:773-82.
46. Liotta LA, Kohn E. Cancer invasion and metastases. *Jama* 1990;263:1123-6.
47. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;8:98-101.
48. Ewing J A treatise on tumours, 3rd edition: Philadesphia: Saunders,W.B, 1928.
49. Pantel K, Izbicki J, Passlick B, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 1996;347:649-53.
50. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1113-24.
51. Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG, et al. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 1981;44:85-90.
52. Coombes RC, Dearnaley DP, Buckman R, et al. Detection of bone metastases in patients with breast cancer. *Invasion Metastasis* 1982;2:177-84.
53. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994;3:165-73.
54. Schlimok G, Funke I, Holzmann B, et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:8672-6.
55. Braun S, Pantel K, Muller P, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342:525-33.
56. Poncelet AJ, Weynand B, Ferdin F, Robert AR, Noirhomme PH. Bone marrow micrometastasis might not be a short-term predictor of survival in early stages non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;20:481-8.
57. Ohgami A, Mitsudomi T, Sugio K, et al. Micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1997;64:363-7.
58. Hsu CP, Shai SE, Hsia JY, Chen CY. Clinical significance of bone marrow microinvolvement in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;100:794-800.
59. Sugio K, Kase S, Sakada T, et al. Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and beta-catenin: risk assessment by immunohistochemistry. *Surgery* 2002;131:S226-31.
60. Kasimir-Bauer S, Schleucher N, Weber R, Neumann R, Seeber S. Evaluation of different markers in non-small cell lung cancer: prognostic value of clinical staging, tumour cell detection and tumour marker analysis for tumour progression and overall survival. *Oncol Rep* 2003;10:475-82.
61. Osaki T, Oyama T, Gu CD, et al. Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:2930-6.
62. Yasumoto K, Osaki T, Watanabe Y, Kato H, Yoshimura T. Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected

- nonsmall cell lung cancer: a multicenter prospective study. *Ann Thorac Surg* 2003;76:194-201; discussion 02.
63. Brunsvig PF, Flatmark K, Aamdal S, et al. Bone marrow micrometastases in advanced stage non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer* 2008.
64. Relihan N, McGreal G, Kelly J, Ryan D, O'Sullivan GC, Redmond HP. Combined sentinel lymph-node mapping and bone-marrow micrometastatic analysis for improved staging in breast cancer. *Lancet* 1999;354:129-30.
65. Mattioli S, D'Ovidio F, Tazzari P, et al. Iliac crest biopsy versus rib segment resection for the detection of bone marrow isolated tumor cells from lung and esophageal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:576-9.
66. Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12:145R-52.
67. Knuutila S, Autio K, Aalto Y. Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes. *Am J Pathol* 2000;157:689.
68. Colby TV, Wistuba II, Gazdar A. Precursors to pulmonary neoplasia. *Adv Anat Pathol* 1998;5:205-15.
69. Wistuba I, Gazdar AI-DoP, Pontificia Universidad Catolica de Chile, Santiago, Chile. Characteristic genetic alterations in lung cancer. *Methods in Molecular Medicine* 2003;74:3-28.
70. Wistuba II, Mao L, Gazdar AF. Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene* 2002;21:7298-306.
71. Vita VD, Hellman S, Rosenberg S *Cancer-Principles & Practice of Oncology*, 5 edition, Vol. 1, p. 858, 1997.
72. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:F21-59.
73. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, et al. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000;26:16-7.
74. Weaver BA, Cleveland DW. Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:658-67.
75. Geigl JB, Langer S, Barwisch S, Pflieger K, Lederer G, Speicher MR. Analysis of gene expression patterns and chromosomal changes associated with aging. *Cancer Res* 2004;64:8550-7.
76. Oshimura M, Barrett JC. Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environ Mutagen* 1986;8:129-59.
77. Testa JR, Liu Z, Feder M, et al. Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95:20-32.
78. Lee JS, Pathak S, Hopwood V, et al. Involvement of chromosome 7 in primary lung tumor and nonmalignant normal lung tissue. *Cancer Res* 1987;47:6349-52.
79. Balsara B, Pei J, Testa J. Comparative genomic hybridization analysis. *Methods in Molecular Medicine*. 2002;68:445-57.
80. Balsara BR, Sonoda G, du Manoir S, Siegfried JM, Gabrielson E, Testa JR. Comparative genomic hybridization analysis detects frequent, often high-level, overrepresentation of DNA sequences at 3q, 5p, 7p, and 8q in human non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:2116-20.

81. Bjorkqvist AM, Tammilehto L, Nordling S, et al. Comparison of DNA copy number changes in malignant mesothelioma, adenocarcinoma and large-cell anaplastic carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1998;77:260-9.
82. Petersen I, Bujard M, Petersen S, et al. Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Research* 1997;57:2331-5.
83. Lu Y-J, Dong X-Y, Shipley J, Zhang R-G, Cheng S-JU-hwscsaBTC-VT-efeddea. Chromosome 3 imbalances are the most frequent aberration found in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 1999;23:61-66.
84. Wistuba, II, Behrens C, Virmani AK, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res* 2000;60:1949-60.
85. Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:691-9.
86. Toledo G, Sola JJ, Lozano MD, Soria E, Pardo J. Loss of FHIT protein expression is related to high proliferation, low apoptosis and worse prognosis in non-small-cell lung cancer. *Mod Pathol* 2004;17:440-8.
87. Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, Minna JD. Loss of Fhit expression in non-small-cell lung cancer: correlation with molecular genetic abnormalities and clinicopathological features. *Br J Cancer* 2000;82:1191-7.
88. Gebert JF, Moghal N, Frangioni JV, Sugarbaker DJ, Neel BG. High frequency of retinoic acid receptor beta abnormalities in human lung cancer. *Oncogene* 1991;6:1859-68.
89. Wikman H, Risch A, Klimek F, et al. hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int J Cancer* 2000;88:932-7.
90. Mulshine JL, Treston AM, Brown PH, Birrer MJ, Shaw GL. Initiators and promoters of lung cancer. *Chest* 1993;103:4S-11S.
91. Orren MM, Mirsky AF. Relation between ocular manifestations and onset of spike-and-wave discharges in petit mal epilepsy. *Epilepsia* 1975;16:771-9.
92. Gazdar AF, Bader S, Hung J, et al. Molecular genetic changes found in human lung cancer and its precursor lesions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:565-72.
93. Mitsudomi T, Steinberg SM, Oie HK, et al. ras gene mutations in non-small cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer Res* 1991;51:4999-5002.
94. Rosell R, Li S, Skacel Z, et al. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene* 1993;8:2407-12.
95. Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, et al. p53 null mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early-stage non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1999;59:5572-7.
96. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2000;6:4055-63.
97. Rodenhuis S, Slebos RJ. The ras oncogenes in human lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:S27-30.

98. Clayton SJ, Scott FM, Walker J, et al. K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. *Clin Chem* 2000;46:1929-38.
99. Kern JA, Slebos RJ, Top B, et al. C-erbB-2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest* 1994;93:516-20.
100. Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1993;20:105-27.
101. Clements NC, Jr., Nelson MA, Wymer JA, Savage C, Aguirre M, Garewal H. Analysis of K-ras gene mutations in malignant and nonmalignant endobronchial tissue obtained by fiberoptic bronchoscopy. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1374-8.
102. Kim YT, Kim TY, Lee DS, et al. Molecular changes of epidermal growth factor receptor (EGFR) and KRAS and their impact on the clinical outcomes in surgically resected adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2007.
103. Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, et al. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* 1988;48:5738-41.
104. Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 2007;6:1006-10.
105. Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, Maynard R, Minna JD. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 1999;5:791-800.
106. Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, et al. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol* 1996;149:1941-52.
107. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, et al. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Oncogene* 1990;5:1603-10.
108. Husgafvel-Pursiainen K, Boffetta P, Kannio A, et al. p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:2906-11.
109. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
110. Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol* 2000;18:3221-9.
111. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:1634-7.
112. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990;335:675-9.
113. Jablonka E, Lamb MJ. The changing concept of epigenetics. *Ann N Y Acad Sci* 2002;981:82-96.
114. Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA. Cancer Epigenetics: Modifications, Screening, and Therapy. *Annu Rev Med* 2007.
115. Holliday R. A new theory of carcinogenesis. *Br J Cancer* 1979;40:513-22.
116. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-80.

117. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003;3:253-66.
118. Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 1996;30:441-64.
119. Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993;366:362-5.
120. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:226-31.
121. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001;2:21-32.
122. Woodcock DM, Lawler CB, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD. Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem* 1997;272:7810-6.
123. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986;321:209-13.
124. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11995-9.
125. Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol* 1999;9:359-67.
126. Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 2000;36:2294-300.
127. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001;38:285-303.
128. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21:5427-40.
129. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249-55.
130. Dammann R, Strunnikova M, Schagdarsurengin U, et al. CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma. *Eur J Cancer* 2005;41:1223-36.
131. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000;60:892-5.
132. Cadieux B, Ching TT, Vandenberg SR, Costello JF. Genome-wide Hypomethylation in Human Glioblastomas Associated with Specific Copy Number Alteration, Methylenetetrahydrofolate Reductase Allele Status, and Increased Proliferation. *Cancer Res* 2006;66:8469-76.
133. Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, et al. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res* 2006;66:8462-9468.
134. Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 2004;14:427-32.
135. Piyathilake CJ, Henao O, Frost AR, et al. Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung (United States). *Cancer Causes Control* 2003;14:37-42.
136. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983;301:89-92.

137. Verma M, Srivastava S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol* 2002;3:755-63.
138. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003;22:6479-83.
139. Widschwendter M, Jones PA. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. Commentary re: J. Kwong et al., Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 8: 131-137, 2002, and H-Z. Zou et al., Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 8: 188-191, 2002. *Clin Cancer Res* 2002;8:17-21.
140. Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res* 2003;63:7641-5.
141. Widschwendter A, Muller HM, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:565-71.
142. Kaminski N, Krupsky M. Gene expression patterns, prognostic and diagnostic markers, and lung cancer biology. *Chest* 2004;125:111S-5S.
143. McDoniels-Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD, Lubet RA, You M. Differential Gene Expression in Human Lung Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res* 2002;8:1127-38.
144. Nacht M, Dracheva T, Gao Y, et al. Molecular characteristics of non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15203-8.
145. Wikman H, Kettunen E, Seppanen JK, et al. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene* 2002;21:5804-13.
146. Kettunen E, Anttila S, Seppanen JK, et al. Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;149:98-106.
147. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13784-9.
148. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13790-5.
149. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002;8:816-24.
150. Bianchi F, Nuciforo P, Vecchi M, et al. Survival prediction of stage I lung adenocarcinomas by expression of 10 genes. *J Clin Invest* 2007;117:3436-44.
151. Larsen JE, Pavey SJ, Passmore LH, Bowman RV, Hayward NK, Fong KM. Gene expression signature predicts recurrence in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:2946-54.
152. Hibi K, Liu Q, Beaudry GA, et al. Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1998;58:5690-4.
153. Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y, et al. Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2001;91:433-7.
154. Ford CE, Hamerton JL. The chromosomes of man. *Nature* 1956;178:1020-3.
155. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-3.

156. Wilson MG, Ebbin AJ, Towner JW, Spencer WH. Chromosomal anomalies in patients with retinoblastoma. *Clin Genet* 1977;12:1-8.
157. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-21.
158. Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:172-5.
159. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;23:41-6.
160. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:399-407.
161. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004;36:299-303.
162. Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 2004;57:644-46.
163. van den Ijssel P, Tijssen M, Chin SF, et al. Human and mouse oligonucleotide-based array CGH. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e192.
164. Pinkel D, Albertson DG. Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:331-54.
165. Brennan C, Zhang Y, Leo C, et al. High-resolution global profiling of genomic alterations with long oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2004;64:4744-8.
166. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17765-70.
167. Lindblad-Toh K, Tanenbaum DM, Daly MJ, et al. Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol* 2000;18:1001-5.
168. Janne PA, Li C, Zhao X, et al. High-resolution single-nucleotide polymorphism array and clustering analysis of loss of heterozygosity in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 2004;23:2716-26.
169. Greshock J, Feng B, Nogueira C, et al. A comparison of DNA copy number profiling platforms. *Cancer Res* 2007;67:10173-80.
170. Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, et al. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res* 2006;34:528-42.
171. van Steensel B, Henikoff S. Epigenomic profiling using microarrays. *Biotechniques* 2003;35:346-50, 52-4, 56-7.
172. Hatada I, Kato A, Morita S, et al. A microarray-based method for detecting methylated loci. *J Hum Genet* 2002;47:448-51.
173. Tompa R, McCallum CM, Delrow J, Henikoff JG, van Steensel B, Henikoff S. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr Biol* 2002;12:65-8.
174. Wei SH, Chen CM, Stratthdee G, et al. Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. *Clin Cancer Res* 2002;8:2246-52.

175. Gitan RS, Shi H, Chen CM, Yan PS, Huang TH. Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res* 2002;12:158-64.
176. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1827-31.
177. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-6.
178. Adorjan P, Distler J, Lipscher E, et al. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e21.
179. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
180. Yuan BZ, Jefferson AM, Popescu NC, Reynolds SH. Aberrant gene expression in human non small cell lung carcinoma cells exposed to demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Neoplasia* 2004;6:412-9.
181. Shames DS, Girard L, Gao B, et al. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* 2006;3:e486.
182. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-70.
183. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21:33-7.
184. Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 1993;364:555-6.
185. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21:10-4.
186. Yang IV, Chen E, Hasseman JP, et al. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002;3:research0062.
187. Novorodovskaya N, Whitfield ML, Basehore LS, et al. Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments. *BMC Genomics* 2004;5:20.
188. Mohr S, Bottin MC, Lannes B, et al. Microdissection, mRNA amplification and microarray: a study of pleural mesothelial and malignant mesothelioma cells. *Biochimie* 2004;86:13-9.
189. Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol* 2000;18:457-9.
190. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*. 1998;4:844-7.
191. Bubendorf L, Muller P, Joos L, et al. Multitarget FISH analysis in the diagnosis of lung cancer. *Am J Clin Pathol* 2005;123:516-23.
192. Halling KC, Rickman OB, Kipp BR, Harwood AR, Doerr CH, Jett JR. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of lung cancer in bronchoscopic specimens. *Chest* 2006;130:694-701.
193. Ohnuki Y, Reddel RR, Bates SE, Lehman TA, Lechner JF, Harris CC. Chromosomal changes and progressive tumorigenesis of human bronchial epithelial cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;92:99-110.

194. Garnis C, Lockwood WW, Vucic E, et al. High resolution analysis of non-small cell lung cancer cell lines by whole genome tiling path array CGH. *Int J Cancer* 2006;118:1556-64.
195. Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, et al. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:2112-6.
196. Wischniewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 2006;4:339-49.
197. Seng TJ, Low JS, Li H, et al. The major 8p22 tumor suppressor DLC1 is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal, and cervical carcinomas, and inhibits tumor cell colony formation. *Oncogene* 2007;26:934-44.
198. Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-29.
199. Stigbrand T, Andres C, Bellanger L, et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour Biol* 1998;19:132-52.
200. Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, et al. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* 2000;6:3552-9.
201. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7.
202. Kang SH, Park CH, Jeung HC, Kim KY, Rha SY, Chung HC. Integrated in silico and biological validation of the blocking effect of Cot-1 DNA on Microarray-CGH. *Int J Mol Med* 2007;19:901-8.
203. Ruosaari S, Hollmén J. Image analysis for detecting faulty spots from microarray images. *Lecture Notes In Computer Science* 2002;2534:259 - 66.
204. Schatz DG. V(D)J recombination. *Immunol Rev* 2004;200:5-11.
205. Nymark P, Wikman H, Ruosaari S, et al. Identification of specific gene copy number changes in asbestos-related lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:5737-43.
206. Jong K, Marchiori E, Meijer G, Vaart AV, Ylstra B. Breakpoint identification and smoothing of array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics* 2004;20:3636-7.
207. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996;14:1675-80.
208. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4:249-64.
209. Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988;240:1285-93.
210. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14863-8.
211. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 2004;20:3246-8.
212. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003;4:P3.
213. Wikman H, Seppanen JK, Sarhadi VK, et al. Caveolins as tumour markers in lung cancer detected by combined use of cDNA and tissue microarrays. *J Pathol* 2004;203:584-93.

214. Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 1960;20:462-6.
215. Hungerford DA, Nowell PC. Chromosome studies in human leukemia. III. Acute granulocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1962;29:545-65.
216. Neumeister B, Besenthal I, Liebich H *Klinikleitfaden Labordiagnostik*, Vol. September 2000: Urban & Fischer Verlag, 2000.
217. Wikman H, Nymark P, Vayrynen A, et al. CDK4 is a probable target gene in a novel amplicon at 12q13.3-q14.1 in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;42:193-9.
218. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513-23.
219. Burck H *Histologische Technik*, 5. unveränderte Auflage edition: Thieme-Verlag, 1982.
220. Okuducu AF, Janzen V, Hahne JC, Ko Y, Wernert N. Influence of histochemical stains on quantitative gene expression analysis after laser-assisted microdissection. *Int J Mol Med* 2003;11:449-53.
221. Espina V, Milia J, Wu G, Cowherd S, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Methods Mol Biol* 2006;319:213-29.
222. Balsara BR, Testa JR. Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* 2002;21:6877-83.
223. Hoglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Mitelman F. Statistical dissection of cytogenetic patterns in lung cancer reveals multiple modes of karyotypic evolution independent of histological classification. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;154:99-109.
224. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:2934-8.
225. Talbot SG, Estilo C, Maghami E, et al. Gene expression profiling allows distinction between primary and metastatic squamous cell carcinomas in the lung. *Cancer Res* 2005;65:3063-71.
226. Petersen S, Heckert C, Rudolf J, et al. Gene expression profiling of advanced lung cancer. *Int J Cancer* 2000;86:512-7.
227. Miura K, Bowman ED, Simon R, et al. Laser capture microdissection and microarray expression analysis of lung adenocarcinoma reveals tobacco smoking- and prognosis-related molecular profiles. *Cancer Res* 2002;62:3244-50.
228. Quackenbush J. Computational approaches to analysis of DNA microarray data. *Methods Inf Med* 2006;45 Suppl 1:91-103.
229. Ekwall K, Olsson T, Turner BM, Cranston G, Allshire RC. Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* 1997;91:1021-32.
230. Maegawa S, Yoshioka H, Itaba N, et al. Epigenetic silencing of PEG3 gene expression in human glioma cell lines. *Mol Carcinog* 2001;31:1-9.
231. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111:1710-7.
232. Dehan E, Ben-Dor A, Liao W, et al. Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007;56:175-84.
233. Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, et al. Impact of DNA Amplification on Gene Expression Patterns in Breast Cancer *Cancer Res* 2002;62:6240-45.

234. Wolf M, Mousses S, Hautaniemi S, et al. High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: impact of copy number on gene expression. *Neoplasia* 2004;6:240-7.
235. Gray JW, Collins C. Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 2000;21:443-52.
236. Sun Z, Yang P. Gene expression profiling on lung cancer outcome prediction: present clinical value and future premise. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2063-8.
237. Dacic S. Molecular profiling of lung carcinoma: identifying clinically useful tumor markers for diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2007;7:77-86.
238. Tonon G, Wong KK, Maulik G, et al. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9625-30.
239. Tonon G, Brennan C, Protopopov A, et al. Common and contrasting genomic profiles among the major human lung cancer subtypes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005;70:11-24.
240. Yakut T, Schulten HJ, Demir A, et al. Assessment of molecular events in squamous and non-squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 2006;54:293-301.
241. Sy SM-H, Wong N, Lee T-W, et al. Distinct patterns of genetic alterations in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *European Journal of Cancer* 2004;40:1082-94.
242. Petersen S, Aninat-Meyer M, Schluns K, Gellert K, Dietel M, Petersen II-IoP, University Hospital Charite, Berlin, Germany. Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *British Journal of Cancer* 2000;82:65-73.
243. Cardoso J, Molenaar L, de Menezes RX, et al. Genomic profiling by DNA amplification of laser capture microdissected tissues and array CGH. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e146.
244. du Manoir S, Speicher M, Joos S, et al. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Human Genetics* 1993;90:590-610.
245. Wicker N, Carles A, Mills IG, et al. A new look towards BAC-based array CGH through a comprehensive comparison with oligo-based array CGH. *BMC Genomics* 2007;8:84.
246. Pinkel D, Albertson DG. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 2005;37 Suppl:S11-7.
247. Cobb RM, Oestreich KJ, Osipovich OA, Oltz EM. Accessibility control of V(D)J recombination. *Adv Immunol* 2006;91:45-109.
248. Katagiri F, Glazebrook J. Overview of mRNA expression profiling using microarrays. *Curr Protoc Mol Biol* 2004;Chapter 22:Unit 22 4.
249. Wikman H, Ruosaari S, Nymark P, et al. Gene expression and copy number profiling suggests the importance of allelic imbalance in 19p in asbestos-associated lung cancer. *Oncogene* 2007;26:4730-37.
250. Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, et al. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12963-8.
251. Li R, Wang H, Bekele BN, et al. Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach. *Oncogene* 2006;25:2628-35.

252. Mohapatra G, Moore DH, Kim DH, et al. Analyses of brain tumor cell lines confirm a simple model of relationships among fluorescence in situ hybridization, DNA index, and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:311-9.
253. Ng G, Huang J, Roberts I, Coleman N. Defining ploidy-specific thresholds in array comparative genomic hybridization to improve the sensitivity of detection of single copy alterations in cell lines. *J Mol Diagn* 2006;8:449-58.
254. Halling KC, Kipp BR. Fluorescence in situ hybridization in diagnostic cytology. *Hum Pathol* 2007;38:1137-44.
255. Brown LA, Huntsman D. Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions. *J Mol Histol* 2007;38:151-7.
256. Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet* 1991;7:149-54.
257. Zochbauer-Muller S, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant DNA methylation in lung cancer: biological and clinical implications. *Oncologist* 2002;7:451-7.
258. Kohno T, Yokota J. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis? *Carcinogenesis* 1999;20:1403-10.
259. Wong MP, Fung LF, Wang E, et al. Chromosomal aberrations of primary lung adenocarcinomas in nonsmokers. *Cancer* 2003;97:1263-70.
260. Goeze A, Schluns K, Wolf G, Thasler Z, Petersen S, Petersen I. Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Journal of Pathology* 2002;196:8-16.
261. Baudis M. Genomic imbalances in 5918 malignant epithelial tumors: an explorative meta-analysis of chromosomal CGH data. *BMC Cancer* 2007;7:226.
262. Struski S, Doco-Fenzy M, Cornillet-Lefebvre PI-LdH, Hopital Robert Debre-CHU Reims, Reims, France. Compilation of published comparative genomic hybridization studies. *Cancer Genetics & Cytogenetics* 2002;135:63-90.
263. Testa J, Siegfried J, Liu Z, et al. Cytogenetic analysis of 63 non-small cell lung carcinomas: recurrent chromosome alterations amid frequent and widespread genomic upheaval. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1994;11:178-94.
264. Petersen I, Langreck H, Wolf G, et al. Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *British Journal of Cancer* 1997;75:79-86.
265. Pei J, Balsara BR, Li W, et al. Genomic imbalances in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;31:282-7.
266. Orsetti B, Nugoli M, Cervera N, et al. Genetic profiling of chromosome 1 in breast cancer: mapping of regions of gains and losses and identification of candidate genes on 1q. *Br J Cancer* 2006;95:1439-47.
267. Weber-Mangal S, Sinn HP, Popp S, et al. Breast cancer in young women (< or = 35 years): Genomic aberrations detected by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 2003;107:583-92.
268. Nessling M, Richter K, Schwaenen C, et al. Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. *Cancer Res* 2005;65:439-47.
269. Tsafrir D, Bacolod M, Selvanayagam Z, et al. Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:2129-37.

270. Kimura Y, Noguchi T, Kawahara K, Kashima K, Daa T, Yokoyama S. Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression. *Mod Pathol* 2004;17:1328-37.
271. Jiang F, Yin ZCN, Li R, Katz RL. Genomic profiles in stage I primary non small cell lung cancer using comparative genomic hybridization analysis of cDNA microarrays. *Neoplasia* 2004;6:623-35.
272. Kim YT, Lee SH, Sung SW, Kim JH. Can aberrant promoter hypermethylation of CpG islands predict the clinical outcome of non-small cell lung cancer after curative resection? *Ann Thorac Surg* 2005;79:1180-8; discussion 80-8.
273. Zhao X, Weir BA, LaFramboise T, et al. Homozygous deletions and chromosome amplifications in human lung carcinomas revealed by single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* 2005;65:5561-70.
274. Liebl L, Kraemling M, Koops S, et al. High level amplification of FOXA1 and NKX2-1 in pulmonary adenocarcinomas. submitted.
275. Saad RS, Liu YL, Han H, Landreneau RJ, Silverman JF. Prognostic significance of thyroid transcription factor-1 expression in both early-stage conventional adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 2004;35:3-7.
276. Barlesi F, Pinot D, Legoffic A, et al. Positive thyroid transcription factor 1 staining strongly correlates with survival of patients with adenocarcinoma of the lung. *Br J Cancer* 2005;93:450-2.
277. Puglisi F, Barbone F, Damante G, et al. Prognostic value of thyroid transcription factor-1 in primary, resected, non-small cell lung carcinoma. *Mod Pathol* 1999;12:318-24.
278. Thorat MA, Marchio C, Morimiya A, et al. Forkhead box A1 expression in breast cancer is associated with luminal subtype and good prognosis. *J Clin Pathol* 2008;61:327-32.
279. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3469-78.
280. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992;340:685-9.
281. Pantel K, Aignherr C, Kollermann J, Caprano J, Riethmuller G, Kollermann MW. Immunocytochemical detection of isolated tumour cells in bone marrow of patients with untreated stage C prostatic cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:1627-32.
282. Braun S, Schindlbeck C, Hepp F, et al. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin Oncol* 2001;19:368-75.
283. Yan W, Song L, Liang Q, Fang Y. Progression analysis of lung squamous cell carcinomas by comparative genomic hybridization. *Tumour Biol* 2005;26:158-64.
284. McGowan-Jordan IJ, Speevak MD, Blakey D, Chevrette M. Suppression of tumorigenicity in human teratocarcinoma cell line PA-1 by introduction of chromosome 4. *Cancer Res* 1994;54:2568-72.
285. Ning Y, Weber JL, Killary AM, Ledbetter DH, Smith JR, Pereira-Smith OM. Genetic analysis of indefinite division in human cells: evidence for a cell senescence-related gene(s) on human chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5635-9.
286. Bando K, Nagai H, Matsumoto S, et al. Identification of a 1-cM region of common deletion on 4q35 associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:284-9.

287. Lin SC, Chen YJ, Kao SY, et al. Chromosomal changes in betel-associated oral squamous cell carcinomas and their relationship to clinical parameters. *Oral Oncol* 2002;38:266-73.
288. Petersen I, Hidalgo A, Petersen S, et al. Chromosomal imbalances in brain metastases of solid tumors. *Brain Pathol* 2000;10:395-401.
289. Vaidya KS, Welch DR. Metastasis suppressors and their roles in breast carcinoma. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007;12:175-90.
290. Berger JC, Vander Griend DJ, Robinson VL, Hickson JA, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis suppressor genes: from gene identification to protein function and regulation. *Cancer Biol Ther* 2005;4:805-12.
291. Cho ES, Chang J, Chung KY, Shin DH, Kim YS, Kim SK. Identification of tumor suppressor loci on the long arm of chromosome 4 in primary small cell lung cancers. *Yonsei Med J* 2002;43:145-51.
292. Sterian A, Kan T, Berki AT, et al. Mutational and LOH analyses of the chromosome 4q region in esophageal adenocarcinoma. *Oncology* 2006;70:168-72.
293. Shivapurkar N, Virmani AK, Wistuba, II, et al. Deletions of chromosome 4 at multiple sites are frequent in malignant mesothelioma and small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:17-23.
294. Kim YH, Girard L, Giacomini CP, et al. Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene* 2006;25:130-8.
295. Kanta SY, Yamane T, Dobashi Y, Mitsui F, Kono K, Ooi A. Topoisomerase IIalpha gene amplification in gastric carcinomas: correlation with the HER2 gene. An immunohistochemical, immunoblotting, and multicolor fluorescence in situ hybridization study. *Hum Pathol* 2006;37:1333-43.
296. Jarvinen TA, Holli K, Kuukasjarvi T, Isola JJ. Predictive value of topoisomerase IIalpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1998;77:2267-73.
297. Kellner U, Rudolph P, Parwaresch R. Human DNA-Topoisomerases - Diagnostic and Therapeutic Implications for Cancer. *Onkologie* 2000;23:424-30.
298. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002;161:1991-6.
299. Sasaki H, Moriyama S, Mizuno K, et al. Cten mRNA expression was correlated with tumor progression in lung cancers. *Lung Cancer* 2003;40:151-5.
300. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, et al. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2156-60.
301. Collins C, Volik S, Kowbel D, et al. Comprehensive genome sequence analysis of a breast cancer amplicon. *Genome Res* 2001;11:1034-42.
302. Albertson D, Ylstra B, Segraves R, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nature Genetics* 2000;25:144-6.
303. Weiss MM, Snijders AM, Kuipers EJ, et al. Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization. *J Pathol* 2003;200:320-6.
304. Bockmuhl U, Petersen S, Schmidt S, et al. Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:5213-6.

305. Spychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 2000;87:161-73.
306. Balis ME. Adenosine deaminase and malignant cells. *Ann N Y Acad Sci* 1985;451:142-9.
307. Berrieman HK, Ashman JN, Cowen ME, Greenman J, Lind MJ, Cawkwell L. Chromosomal analysis of non-small-cell lung cancer by multicolour fluorescent in situ hybridisation. *Br J Cancer* 2004;90:900-5.
308. Kim TM, Yim SH, Lee JS, et al. Genome-wide screening of genomic alterations and their clinicopathologic implications in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11:8235-42.
309. Pollack JR. Chromosome instability leaves its mark. *Nat Genet* 2006;38:973-4.
310. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 2005;5:773-85.
311. Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, Harris LN, Szallasi Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 2006;38:1043-8.
312. Tezel C, Ersev AA, Kiral H, et al. The impact of immunohistochemical detection of positive lymph nodes in early stage lung cancer. *Thorac Cardiovasc Surg* 2006;54:124-8.
313. Lee JG, Lee CY, Park IK, et al. Number of metastatic lymph nodes in resected non-small cell lung cancer predicts patient survival. *Ann Thorac Surg* 2008;85:211-5.
314. Xi L, Lyons-Weiler J, Coello MC, et al. Prediction of lymph node metastasis by analysis of gene expression profiles in primary lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2005;11:4128-35.
315. Allen M. Crafting a federal legislative framework for child welfare reform. *Am J Orthopsychiatry* 1991;61:610-23.
316. Coello MC, Luketich JD, Litle VR, Godfrey TE. Prognostic significance of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2004;5:214-25.
317. Yokoi S, Yasui K, Mori M, Iizasa T, Fujisawa T, Inazawa J. Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. *Am J Pathol* 2004;165:175-80.
318. Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, et al. Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene* 2003;22:2192-205.
319. Huang KF, Lee WY, Huang SC, et al. Chromosomal gain of 3q and loss of 11q often associated with nodal metastasis in early stage cervical squamous cell carcinoma. *J Formos Med Assoc* 2007;106:894-902.
320. Yang YL, Chu JY, Luo ML, et al. Amplification of PRKCI, located in 3q26, is associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:127-36.
321. Yan W, Song L, Wei W, Li A, Liu J, Fang Y. Chromosomal abnormalities associated with neck nodal metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol* 2005;26:306-12.
322. Allen DG, White DJ, Hutchins AM, et al. Progressive genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer* 2000;83:1659-63.
323. Bockmuhl U, Schluns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I. Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33:29-35.

324. Chujo M, Noguchi T, Miura T, Arinaga M, Uchida Y, Tagawa Y. Comparative genomic hybridization analysis detected frequent overrepresentation of chromosome 3q in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2002;38:23-29.
325. Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, et al. Prediction of nodal metastasis by comparative genomic hybridization in biopsy specimens from patients with superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:5137-41.
326. Tada K, Oka M, Tangoku A, Hayashi H, Oga A, Sasaki K. Gains of 8q23-qter and 20q and loss of 11q22-qter in esophageal squamous cell carcinoma associated with lymph node metastasis. *Cancer* 2000;88:268-73.
327. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003;200:448-64.
328. Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today* 2001;6:478-82.
329. Orlichenko LS, Radisky DC. Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis* 2008.
330. Nakamura H, Saji H, Ogata A, et al. cDNA microarray analysis of gene expression in pathologic Stage IA nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer* 2003;97:2798-805.
331. Zhang X, Zhu S, Luo G, et al. Expression of MMP-10 in lung cancer. *Anticancer Res* 2007;27:2791-5.
332. Gill JH, Kirwan IG, Seargent JM, et al. MMP-10 is overexpressed, proteolytically active, and a potential target for therapeutic intervention in human lung carcinomas. *Neoplasia* 2004;6:777-85.
333. Kren L, Goncharuk VN, Krenova Z, et al. Expression of matrix metalloproteinases 3, 10 and 11 (stromelysins 1, 2 and 3) and matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) by cancer cells in non-small cell lung neoplasms. *Clinicopathologic studies. Cesk Patol* 2006;42:16-9.
334. Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:707-17.
335. Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa JP. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4045-50.
336. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000;16:168-74.
337. Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000;21:461-7.
338. Sale GJ, Towner P, Akhtar M. Functional rhodopsin complex consisting of three noncovalently linked fragments. *Biochemistry* 1977;16:5641-9.
339. Mikata R, Yokosuka O, Fukai K, et al. Analysis of genes upregulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in gastric cancer cell lines. *Int J Cancer* 2006;119:1616-22.
340. Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* 2005;32:443-51.
341. Chabot GG, Momparler RL. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on survival and cell cycle progression of L1210 leukemia cells. *Leuk Res* 1986;10:533-7.
342. Flatau E, Gonzales FA, Michalowsky LA, Jones PA. DNA methylation in 5-aza-2'-deoxycytidine-resistant variants of C3H 10T1/2 Cl8 cells. *Mol Cell Biol* 1984;4:2098-102.

343. Hochrainer K, Mayer H, Baranyi U, Binder B, Lipp J, Kroismayr R. The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects. *Genomics* 2005;85:153-64.
344. Hustinx SR, Cao D, Maitra A, et al. Differentially expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas identified through serial analysis of gene expression. *Cancer Biol Ther* 2004;3:1254-61.
345. Ohtsubo M, Kai R, Furuno N, et al. Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation. *Genes Dev* 1987;1:585-93.
346. Kroismayr R, Baranyi U, Stehlik C, Dorfleutner A, Binder BR, Lipp J. HERC5, a HECT E3 ubiquitin ligase tightly regulated in LPS activated endothelial cells. *J Cell Sci* 2004;117:4749-56.
347. Mitsui K, Nakanishi M, Ohtsuka S, et al. A novel human gene encoding HECT domain and RCC1-like repeats interacts with cyclins and is potentially regulated by the tumor suppressor proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:115-22.
348. Dowler S, Currie RA, Downes CP, Alessi DR. DAPP1: a dual adaptor for phosphotyrosine and 3-phosphoinositides. *Biochem J* 1999;342 (Pt 1):7-12.
349. Rao VR, Corradetti MN, Chen J, et al. Expression cloning of protein targets for 3-phosphorylated phosphoinositides. *J Biol Chem* 1999;274:37893-900.
350. Marshall AJ, Niir H, Lerner CG, et al. A novel B lymphocyte-associated adaptor protein, Bam32, regulates antigen receptor signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Exp Med* 2000;191:1319-32.
351. Allam A, Niir H, Clark EA, Marshall AJ. The adaptor protein Bam32 regulates Rac1 activation and actin remodeling through a phosphorylation-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2004;279:39775-82.
352. Keely P, Parise L, Juliano R. Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. *Trends Cell Biol* 1998;8:101-6.
353. Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 2006;16:522-9.
354. Lindberg U, Karlsson R, Lassing I, Schutt CE, Hoglund AS. The microfilament system and malignancy. *Semin Cancer Biol* 2008;18:2-11.
355. Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, et al. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:5168-78.
356. Fults D, Maness PF, Nakamura Y, White R. The N-ras oncogene is activated in a human medulloblastoma cell line. *Brain Res* 1989;503:281-7.
357. Cools J, Mentens N, Marynen P. A new family of small, palmitoylated, membrane-associated proteins, characterized by the presence of a cysteine-rich hydrophobic motif. *FEBS Lett* 2001;492:204-9.
358. Cools J, Bilhou-Nabera C, Wlodarska I, et al. Fusion of a novel gene, BTL, to ETV6 in acute myeloid leukemias with a t(4;12)(q11-q12;p13). *Blood* 1999;94:1820-4.
359. Harada H, Harada Y, Eguchi M, Dohy H, Kamada N. Characterization of acute leukemia with t(4;12). *Leuk Lymphoma* 1997;25:47-53.
360. Flatau E, Bogenmann E, Jones PA. Variable 5-methylcytosine levels in human tumor cell lines and fresh pediatric tumor explants. *Cancer Res* 1983;43:4901-5.
361. Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, et al. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet* 2001;10:1413-9.

6. Anhang

Tabelle 6.1. Prozentanteil der über- und unterrepräsentierten Klone der Array-CGH abhängig vom KM-, LK-Status und der Tumorgroße.

	aberrante Klone der Array-CGH [%]*		
	über-repräsentiert	unter-repräsentiert	Summe
KM-Status			
negativ	30,2	18,0	48,2
positiv	22,3	17,0	39,3
LK-Status			
negativ	23,9	18,5	42,4
positiv	28,8	16,7	45,5
Tumorgroße			
T1	17,5	19,8	37,3
T2+T3	31,0	16,4	47,4

* Anzahl der über- bzw. unterrepräsentierten Klone beruht auf positive bzw. negative Smooth-Werte.

Tabelle 6.2. High-Level Amplifikationen kleiner als 10 MBp in 30 NSCLC ermittelt mit Array-CGH.

Chromosomale Region	Chromosomale Position [Bp]*		Größe [MBp]	Tumorprobe	Onkogen
	Start	Stopp			
1p36.22-p36.13	11.840.199	16.774.797	4,9	LC28	
1p22.3-p22.2	85.437.068	88.994.388	3,6	LC17	
2q24.2	159.889.145	162.949.233	3,1	LC6	
3q25.1	153.466.446	158.362.498	4,9	LC9	
5q35.1	171.571.755	175.705.872	4,1	LC8	
7p21.3-p21.1	12.169.097	18.906.115	6,7	LC8	
8p11.21	41.598.454	42.527.128	0,9	LC3, LC9, LC26	FGFR1
8q24.21-q24.22	127.409.903	134.150.963	6,7	LC17	CMYC
9p24.1-p23	6.899.402	12.699.153	5,8	LC21	
11q13.5-q14.1	77.005.023	82.120.860	5,1	LC17	
12p11.22-p11.21	27.768.316	31.407.739	3,6	LC22, LC27	
12q13.2-q13.3	54.684.740	55.151.384	0,5	LC22	ERBB2
12q15	67.422.429	69.727.542	2,3	LC27, LC22, LC7	MDM2
14q12-q21.1	30.274.628	37.794.157	7,5	LC6, LC27	FOXA1, TTF1
15q11.2	18.848.246	19.782.182	0,9	LC8	
16p11.2	30.524.068	31.002.160	0,5	LC3	
17p11.2-p11.1	19.749.710	22.666.820	2,9	LC11	
19p12	22.728.490	24.102.688	1,4	LC17	
19q12.12-q13.12	40.928.350	41.777.341	0,9	LC17	
19q13.31-q13.32	48.914.580	50.809.733	1,9	LC3	
20p11.21	25.375.370	26.115.979	0,7	LC9	E2F1
22q11.21	17.423.673	20.155.731	2,7	LC17	

*Chromosomale Position wurde ermittelt durch Sequenzvergleich in UCSC Blat (Version März 2006).

Tabelle 6.3. Ergebnisse der Array-CGH in Abhängigkeit des KM-Status.

Chromosomale Region	Minimal aberrated region *	Chromosomale Position [Bp]		Größe [MBp]	genomische Veränderung	p-Wert
		Start	Stopp			
1p31.1		77.875.064	79.069.267	1.2	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,039
1q25.1		170.122.805	172.581.073	2.5	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,004
1q32.1-q32.2		203.519.905	205.709.228	2.2	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,027
2q11.2		98.897.095	101.065.777	2.2	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,005
2q24.2		159.918.072	162.118.569	2.2	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,029
2q32.1		185.629.166	188.187.230	2.6	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,015
3p22.1		41.835.922	43.097.085	1.3	DNA-Verlust in KM-negativ	0,019
4q12-q32.1		53.303.625	160.419.296	107.1	DNA-Verlust in KM-positiv DNA-Gewinn in KM-negativ	0,024
	4q12	53.303.625	55.003.785	1.7		0,035
	4q21.21	79.349.741	81.139.909	1.7		0,001
	4q22.1	89.801.896	91.230.000	1.4		0,027
	4q32.1	157.009.018	160.419.296	3.4		0,002
5p15.1		14.766.717	17.962.719	3.2	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,010
5q11.2		52.892.262	55.334.871	2.4	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,010
7p11.2		54.928.934	56.376.525	1.4	DNA-Gewinn in KM-positiv	0,017
8p23.1		11.003.000	12.987.660	1.9	DNA-Verlust in KM-negativ	0,016
8q24.13-q24.22		124.291.020	134.150.963	9.9	DNA-Gewinn in KM-positiv	0,084
	8q24.13	124.291.020	125.440.221	1.1		0,037
	8q24.22	133.074.893	134.150.963	1.1		0,042
9q32-q33.1		113.005.559	115.133.624	2.1	DNA-Verlust in KM-negativ	0,027
9q34.11-q34.3		129.019.813	138.292.262	9.3	DNA-Verlust in KM-negativ	0,033
	9q34.11-q34.13	129.019.813	131.343.938	2.3		0,005
	9q34.3	136.524.759	138.292.262	1.8		0,032
10p15.1-p14		6.523.876	8.342.749	6.3	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,036
10p12.31-p11.22		21.110.362	33.526.584	12.4	DNA-Gewinn in KM-negativ DNA-Verlust in KM-positiv	0,048
10q21.3-q22.3		69.852.278	81.513.171	11.7	DNA-Verlust in KM-positiv	0,080
	10q22.1	73.177.780	73.662.912	0.5		0,036
	10q22.3	79.697.190	81.513.171	1.8		0,017
11p15.5		189.965	1.975.589	1.8	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,048
11p15.2-p15.1		15.951.039	19.202.783	3.3	DNA-Gewinn in KM-positiv DNA-Verlust in KM-negativ	0,010
11q21		93.102.252	94.564.310	1.5	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,023
12p12.1-p11.22		25.520.433	28.007.885	3.0	DNA-Gewinn in KM-positiv	0,034
14q13.3-q21.1		36.055.799	37.794.157	1.7	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,024
15q23-q24.1		68.650.560	70.430.989	1.8	DNA-Verlust in KM-negativ	0,031
16q23.3-q24.3		82.316.839	88.412.354	6.1	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,130
	16q23.3-q24.1	82.316.839	83.509.391	1.2		0,019
	16q24.2-q24.3	86.479.207	88.412.354	1.9		0,022
17q21.1-q21.3		35.426.343	46.398.134	11.0	DNA-Gewinn in KM-positiv	0,091
	17q21.1-21.2	35.426.343	36.108.021	0.68		0,980
	17q21.32-q21.33	44.369.381	46.398.134	2.0		0,031
19p13.3-p13.2		5.734.371	9.384.761	3.7	DNA-Verlust in KM-negativ	0,021
19q13.12-q13.2		41.727.239	44.071.574	2.3	DNA-Gewinn in KM-positiv	0,022
19q13.31-q13.32		48.614.247	50.575.213	2.0	DNA-Verlust in KM-negativ	0,005
20p13		1.493.499	2.764.098	1.3	DNA-Gewinn in KM-positiv	0,030
20q11.21-q13.32		30.571.212	56.368.778	25.8	DNA-Gewinn in KM-positiv	0,027
	20q11.21-q11.22	30.571.212	32.477.729	1.9		0,031
	20q11.23-q11.23	33.652.135	37.101.039	3.4		0,020
	20q13.12	42.688.588	45.415.253	2.7		0,008
	20q13.32	55.352.097	56.368.778	1.0		0,046
21q22.11-q22.12		32.564.609	35.332.518	2.8	DNA-Gewinn in KM-negativ	0,019

* Signifikante chromosomale Regionen, die weniger als 10 MBp auseinander liegen, wurden kombiniert.

§ Chromosomale Position wurde ermittelt durch Sequenzvergleich in UCSC Blat (Version März 2006).

Tabelle 6.4. Chromosomale Regionen mit signifikanten Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl und differenziell exprimierten *Probe*-Sets in Abhängigkeit der lymphogenen Metastasierung.

Chromosomale Region	Chromosomale Position [Bp] * Start Stopp	Größe [MBp]	genomische Veränderung	CGH p-Wert	Anteil sign. <i>Probe</i> -Sets §	Expression p-Wert
1q32.2	205.993.944 207.237.680	1,2	DNA-Gewinn in LK-negativ	0,018	0	1,00
2p25.1	10.001.559 11.951.482	1,9	DNA-Gewinn in LK-positiv	0,044	0	1,00
2q12.1-q12.2	104.931.846 106.905.143	2,0	DNA-Gewinn in LK-positiv	0,047	5,3%	0,44
2q37.1	232.948.430 234.774.472	1,8	DNA-Verlust in LK-negativ	<0,01	0	1,00
3q13.2-q25.32	113.193.134 159.754.426	46,6	DNA-Gewinn in LK-positiv	0,009	2,9%	0,70
3q26.2-q28	170.581.680 190.351.473	19,8	DNA-Gewinn in LK-positiv	0,014	0,2%	0,98
7q11.21-q11.23	64.387.499 76.556.620	12,2	DNA-Gewinn in LK-positiv	0,028	0	1,00
9q34.3	136.573.113 138.292.262	1,7	DNA-Gewinn in LK-positiv	0,015	2,5%	0,33
11p15.5	183.776 1.975.589	1,8	DNA-Gewinn in LK-positiv	0,014	1,3%	0,90
11q21	93.184.664 94.564.310	1,4	DNA-Verlust in LK-negativ	0,034	3,0%	0,63
14q24.2-q24.3	69.996.058 73.131.603	3,1	DNA-Gewinn in LK-positiv	0,012	1,8%	0,81
20p13	1.576.930 4.150.156	2,6	DNA-Gewinn in LK-positiv	0,03	2,9%	0,63

* Chromosomenlokalisierung basierend auf UCSC Blat (Version März 2006).

§ Anteil signifikanter *Probe*-Sets mit differenzieller Expression durch Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl. Signifikanz der Gene basiert auf ROC-Analysen (ROC-Wert < 0,2 oder > 0,8 und p-Wert < 0,05).

Tabelle 6.5. Daten zur Expressionsanalysen für jede verwendete Tumorprobe.

Probe	Hintergrund	Anzahl <i>Present</i>	Anzahl <i>Absent</i>	durchschnittliche Signalintensität	<i>GAPDH</i>	<i>β-Actin</i>	Skalierungs-faktor
Normalgewebe							
N2	42,99	45,9%	52,6%	119,1	2,82	8,26	1,333
N1	47,23	47,7%	55,8%	137,1	4,23	8,92	1,175
N3	49,16	45,0%	53 5%	155,4	3,19	8,36	1,090
Tumorgewebe							
AC 33	53,19	45,1%	53,3%	172,8	2,90	20,26	0,928
AC 3	44,32	40,3%	58,2%	142,3	5,49	23,04	1,135
AC 15	52,91	39,6%	59,1%	162,6	2,30	10,06	1,025
AC 11	65,43	40,4%	58,0%	189,7	2,94	12,66	0,853
AC 16	59,53	47,0%	51,6%	179,2	3,26	10,34	0,843
AC 22	58,99	40,9%	57,5%	151,7	4,68	25,28	1,095
AC 34	61,55	44,0%	54,5%	211,7	3,42	12,72	0,733
AC 27	49,30	42,1%	56,3%	129,3	10,93	38,58	1,214
AC 8	56,28	40,2%	58,3%	130,6	7,49	28,93	1,289
AC 14	47,91	41,1%	57,5%	148,2	1,99	13,63	1,094
AC 30	58,00	37,3%	60,9%	106,4	11,94	43,16	1,576
AC 23	61,05	35,5%	62,9%	121,1	5,32	55,58	1,439
AC 25	55,51	42,7%	55,8%	172,7	2,01	14,42	0,960
AC 12	63,28	39,4%	58,8%	121,5	24,66	90,20	1,373
AC 2	40,01	40,0%	52,4%	160,5	5,12	61,80	1,325
AC 10	37,54	37,5%	54,2%	174,3	7,09	47,10	1,859

N Normalgewebe

AC Adenokarzinom der Lunge

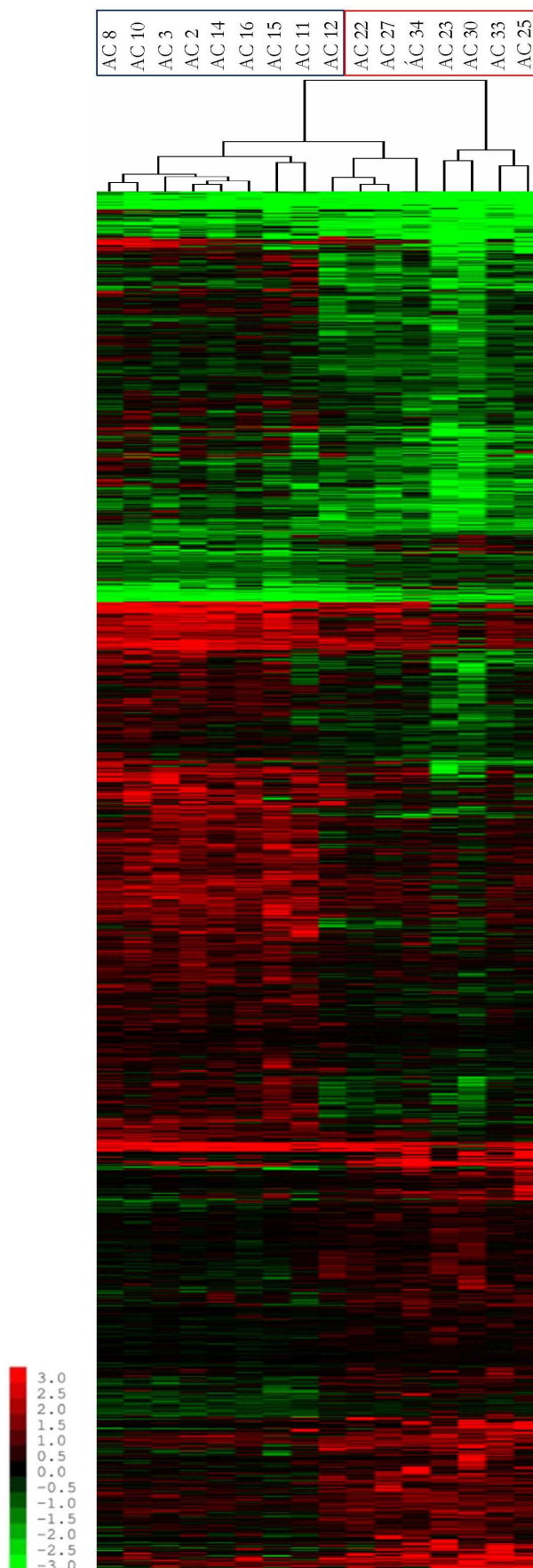


Abbildung 6.1. Hierarchisches Clustering aller differenziell exprimierter Probe-Sets, die mit der hämatogenen Disseminierung von DTZ ins KM assoziiert waren. Das Hierarchische Clustering wurde mittels Cluster 3.0 (*complete linkage* und Euklidischen Distanz) erstellt und das Ergebnis graphisch mit dem Programm Tree-View dargestellt. Grüne Quadrate entsprechen einer reduzierten, rote Quadrate einer erhöhten und schwarze einer unveränderten Genexpression. Jede Spalte repräsentiert eine Gewebeprobe und jede Zeile ein Gen. Das Dendrogramm zeigt die Ähnlichkeiten der Gewebeproben in Bezug auf ihre Genexpressionsmuster. Eine geringe Distanz der Arme des Dendrogramms innerhalb der zwei Gruppen stellt eine starke transkriptionelle Übereinstimmung dar. Die Tumorproben AC2-AC16 gehören zu der KM-negativen (blaues Rechteck) und AC22-AC34 zur KM-positiven Gruppe (rotes Rechteck).

Tabelle 6.6. Signifikant häufig auftretende funktionelle Kategorien der differenziell exprimierten *Probe-Sets* bzw. Genen für den KM-Status im Vergleich zu allen Probe-Sets auf dem Expressionsarray (*Gene Ontology Classification*).

(A) 100 signifikantesten *Probe-Sets*

Funktionelle Kategorien (GO-Term)	Anzahl involvierter Gene	Anteil an involvierter Gene [%]	p-Wert *
Molekulare Funktion			
Regulation der Transkription	16	16,7	<0,001
Transkriptionsfaktor-Aktivität	13	13,5	<0,001
Aktivatoren der Transkription	6	6,2	0,004
DNA Bindung	17	17,7	0,022
Biologische Prozesse			
Nukleosid, Nucleotid und Nukleinsäure Metabolismus	29	30,2	<0,001
Regulation der Transkription	22	22,9	<0,001
Regulation des Nukleosid, Nucleotid und Nukleinsäure Metabolismus	22	22,9	<0,001
Regulation des Metabolismus	23	24	<0,001
Transkription	22	22,9	<0,001
Regulation des zellulären Metabolismus	22	22,9	<0,001
Regulation der Transkription, DNA-basierend	20	20,8	<0,001
Transkription, DNA-basierend	20	20,8	0,001
Regulation zellulärer Prozesse	27	28,1	0,001
Regulation zellulärer physiologischer Prozesse	26	27,1	0,002
Regulation der physiologischen Prozesse	26	27,1	0,002
Regulation der biologischen Prozesse	27	28,1	0,003
primärer Metabolismus	40	41,7	0,025
zellulärer Metabolismus	40	41,7	0,041
Metabolismus	42	43,8	0,045

(B) 104 signifikant differenziell exprimierten Gene in den fünf signifikanten chromosomalen Regionen

Funktionelle Kategorien (GO-Term)	Anzahl involvierter Gene	Anteil an involvierter Gene [%]	p-Wert *
Molekulare Funktion			
EGFR (<i>epidermal growth factor receptor</i>)-Bindung	3	2,8	<0,001
mRNA Bindung	3	2,8	0,009
Transferase-Aktivität	17	16,0	0,028
katalytische Aktivität	38	35,8	0,037
Protein Serin/Threonin Phosphatase-Aktivität	3	2,8	0,049
Biologische Prozesse			
Biopolymer-Metabolismus	27	25,5	0,005
Chromosomenorganisation und Biogenese	7	6,6	0,007
Zellorganisation und Biogenese	16	15,1	0,025
Chromatinmodifikation	4	3,8	0,038
Dephosphorylierung von Aminosäuren	4	3,8	0,045
positive Regulation der Zellproliferation	4	3,8	0,049

* modifizierte Fisher's Exact-Test

Tabelle 6.7. Zusammenfassung der DNA-Gewinne und DNA-Verluste in den fünf signifikanten chromosomalen Regionen für jede einzelne Tumorseite. Prozentuale Angaben für DNA-Gewinne und Verluste für die einzelnen Patientengruppen.

Probe	chromosomale Region				
	4q12-q32	10p12-p11	10q21-q22	17q21	20q11-q13
KM-negativ, LK-negativ					
AC 1	—	↑	↑	—	—
AC 2	↑	↑	↓	↓	—
AC 3	↑	↑	—	↑	—
AC 4	↑	—	—	—	—
AC 5	↑	—	—	↓	—
AC 6	↑/↓	↑	↑	↑	↑
AC 7	↑	—	↓	↑	↑
AC 8	↑	—	—	—	—
DNA-Gewinn	88%	50%	25%	38%	25%
DNA-Verlust	13%	0%	25%	25%	0%
KM-negativ, LK-positiv					
AC 9	↑	↓	↓	—	↑
AC 10	—	—	—	—	↓
AC 15	↑	↓	—	↑	↑
AC 11	↑/↓	↑	↑	—	↓
AC 16	—	—	—	—	—
AC 13	—	—	—	—	↑
AC 14	—	—	—	—	—
AC 17	—	↑	↑	↑	↑
DNA-Gewinn	38%	25%	25%	25%	50%
DNA-Verlust	13%	25%	13%	0%	25%
KM-positiv, LK-negativ					
AC 19	—	—	↓	—	↑
AC 20	↑	↑	—	—	—
AC 23	↓	—	—	—	—
AC 22	—	—	—	—	↑
AC 21	—	—	↓	↑	↑
AC 24	↓	—	—	—	—
DNA-Gewinn	14%	14%	0%	14%	43%
DNA-Verlust	29%	0%	29%	0%	0%
KM-positiv, LK-positiv					
AC 25	—	—	—	—	↑
AC 26	—	↓	↓	↑	—
AC 27	↑/↓	↓	↓	↑	↑
AC 32	—	↑	↑	↑	↑
AC 29	—	↓	↓	↑	—
AC 30	↓	↓	—	—	↑
AC 28	—	—	—	—	↑
AC 31	—	—	—	—	↑
DNA-Gewinn	11%	11%	11%	44%	67%
DNA-Verlust	22%	44%	33%	0%	0%

AC Adenokarzinom der Lunge

— normale DNA-Kopienanzahl

↑ DNA-Gewinn

↓ DNA-Verlust

↑/↓ in dieser Region liegt sowohl ein DNA-Gewinn als auch ein DNA-Verlust vor

Tabelle 6.8. Differenziell exprimierte Gene in den fünf signifikanten chromosomalen Region in Abhängigkeit vom KM-Status. Signifikanz der Gene basiert auf ROC-Analysen (ROC-Wert < 0,2 oder > 0,8 und p-Wert < 0,05).

Gen	Lokalisation	mittlere Expressionswerte		ROC	p-Wert	
		KM-negativ	KM-positiv			
LNX	ligand of numb-protein X	4q12	1,74	-0,01	0,190	0,038
CHIC2	Cysteine-rich hydrophobic domain	4q12	-0,61	-1,69	0,127	0,011
SEC3L1	SEC3-like 1	4q12	0,03	-0,68	0,159	0,021
SRP72	signal recognition particle 72kDa	4q12	0,87	-0,12	0,167	0,026
POLR2B	Polymerase (RNA) II	4q12	0,57	-0,26	0,135	0,014
YT521	splicing factor YT521-B	4q13.2	0,07	-0,49	0,159	0,023
SAS10	disrupter of silencing 10	4q13.3	0,19	-0,54	0,127	0,011
RIPX	rap2 interacting protein x	4q13.3	0,23	-1,18	0,127	0,020
GRSF1	G-rich RNA sequence binding factor 1	4q13.3	0,80	-0,22	0,159	0,021
FLJ38991	mitochondrial COX18	4q13.3	1,50	0,79	0,079	0,003
ANKRD17	ankyrin repeat domain 17	4q13.3	1,07	0,16	0,079	0,004
MTHFD2L	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	4q13.3	1,20	0,10	0,183	0,035
BTC	betacellulin	4q13.3	0,47	-2,02	0,095	0,006
DKFZP564O0823		4q13.3	1,13	-0,14	0,175	0,027
RCHY1	ring finger and CHY zinc finger domain	4q21.1	-0,22	-1,51	0,101	0,007
G3BP2	Ras-GTPase activating protein	4q21.1	0,24	-0,63	0,175	0,024
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase	4q21.1	-0,87	-2,17	0,095	0,004
SCARB2	scavenger receptor class B	4q21.1	-0,34	-1,65	0,127	0,011
SHRM	shroom	4q21.1	0,47	-1,45	0,175	0,027
CCNG2	cyclin G2	4q21.1	0,47	-0,95	0,159	0,021
ANXA3	annexin A3	4q21.1	-1,19	-3,76	0,175	0,026
PAQR3	progesterin and adipoQ receptor family	4q21.1	1,32	0,31	0,190	0,036
HNRPD	nuclear ribonucleoprotein D	4q21.22	0,61	0,06	0,127	0,011
HNRPDL	nuclear ribonucleoprotein D-like	4q21.22	0,46	0,02	0,119	0,009
SEC31L1	SEC31-like 1	4q21.22	0,67	0,06	0,159	0,026
DKFZp686L1814		q21.22	0,55	0,15	0,135	0,013
HEL308	DNA helicase HEL308	4q21.23	0,26	-0,39	0,127	0,018
MGC11324		4q21.23	0,49	-1,29	0,175	0,025
CDS1	CDP-diacylglycerol synthase 1	4q21.23	1,05	-0,85	0,143	0,014
WDFY3	WD repeat and FYVE domain	4q21.23	0,22	-0,92	0,143	0,019
AFF1	AF4/FMR2 family	4q21.3	-0,15	-0,97	0,143	0,017
KLHL8	kelch-like 8	4q22.1	0,57	-0,20	0,151	0,024
DHRS8	dehydrogenase/reductase	4q22.1	-0,41	-1,62	0,190	0,043
NUDT9	nudix-type motif 9	4q22.1	0,07	-0,98	0,111	0,005
PPM1K	protein phosphatase 1K	4q22.1	-0,45	-1,76	0,111	0,007
HERC6	hect domain and RLD 6	4q22.1	0,98	-1,18	0,079	0,004
HERC5	hect domain and RLD 5	4q22.1	-0,13	-1,29	0,190	0,039
PIG-Y	phosphatidylinositol glycan class Y	4q22.1	-0,05	-0,90	0,175	0,029
DAPP1	dual adaptor of phosphotyrosine	4q23	0,20	-0,29	0,143	0,018
MAP2K1P1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	4q23	0,32	-0,54	0,190	0,043
EMCN	Endomucin	4q24	-4,32	-5,60	0,095	0,007
PPP3CA	Protein phosphatase 3	4q24	0,65	-0,40	0,190	0,040
PPA2	pyrophosphatase (inorganic) 2	4q24	0,62	-0,62	0,156	0,022
SLC39A8	solute carrier family	4q24	-1,97	-3,37	0,122	0,013
MGC26963		4q25	0,26	-0,72	0,159	0,019
EGF	epidermal growth factor	4q25	2,52	0,90	0,111	0,007
TIFA	TRAF-interacting protein	4q25	0,10	-0,94	0,111	0,007
ALPK1	alpha-kinase 1	4q25	0,24	-0,81	0,190	0,043
CAMK2D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase	4q26	0,54	-1,21	0,185	0,035
KIAA1627		4q26	-0,06	-0,86	0,175	0,028
FLJ23191		4q27	-1,34	-4,33	0,190	0,037
BBS7	Bardet-Biedl syndrome 7	4q27	0,32	-0,39	0,175	0,027
KIAA1223		4q28.1	0,35	-0,75	0,190	0,042

Gen		Lokalisation	mittlere Expressionswerte		ROC	p-Wert
			KM-negativ	KM-positiv		
MGC33302		4q28.1	0,84	0,04	0,143	0,017
LARP2	La ribonucleoprotein domain family	4q28.2	1,13	0,08	0,111	0,007
NARG1	NMDA receptor regulated 1	4q31.1	1,20	-0,19	0,159	0,023
SET7	SET domain-containing protein 7	4q31.1	0,01	-1,18	0,095	0,005
ELMOD2	ELMO domain containing 2	4q31.21	1,97	0,99	0,190	0,042
ZNF330	zinc finger protein 330	4q31.21	-0,54	-1,67	0,095	0,006
USP38	ubiquitin specific peptidase 38	4q31.21	-0,11	-1,11	0,155	0,021
SMARCA5	SWI/SNF related	4q31.21	0,23	-0,22	0,175	0,032
MMAA	methylmalonic aciduria cblA type	4q31.21	0,60	-0,38	0,167	0,025
DKFZP566M114	Chromosome 4 open reading frame 13	4q31.22	1,05	0,22	0,127	0,010
LRBA	LPS-responsive vesicle trafficking	4q31.23	1,96	0,57	0,175	0,027
SH3D19	SH3 domain protein D19	4q31.3	-1,29	-2,35	0,111	0,006
ARFIP1	arfaptin 1	4q31.3	0,64	-0,43	0,190	0,037
KIAA1727		4q31.3	0,10	-1,62	0,143	0,014
TRIM2	tripartite motif-containing 2	4q31.3	1,97	0,25	0,109	0,012
GAJ	GAJ protein	4q31.3	1,89	0,80	0,175	0,024
KIAA0922		4q31.3	0,33	-0,54	0,099	0,010
PLRG1	pleiotropic regulator 1	4q31.3	0,26	-0,52	0,190	0,040
ETFDH	electron-transferring-flavoprotein DG	4q32.1	0,45	-0,78	0,151	0,019
FLJ25371		4q32.1	0,63	-0,99	0,190	0,040
MLLT10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	10p12.31	-0,24	-0,89	0,031	0,183
THNSL1	threonine synthase-like 1	10p12.1	2,13	1,16	0,025	0,167
YME1L1	YME1-like 1	10p12.1	0,64	-0,17	0,020	0,159
ACBD5	acyl-Coenzyme A binding domain	10p12.1	0,67	-0,01	0,041	0,190
RAB18	RAB18, member RAS oncogene famil	10p12.1	0,72	-0,15	0,026	0,167
WAC	WW domain	10p12.1	-0,03	-0,69	0,004	0,093
LOC387647		10p11.23	0,33	-0,10	0,021	0,159
SVIL	Supervillin	10p11.23	0,17	-0,63	0,042	0,190
ARHGAP12	Rho GTPase activating protein 12	10p11.22	1,32	0,38	0,039	0,190
NRP1	Neuropilin 1	10p11.22	-1,10	-2,21	0,021	0,159
HKDC1	hexokinase domain containing 1	10q22.1	2,48	0,73	0,024	0,159
COL13A1	collagen	10q22.1	-0,06	-0,20	0,004	0,905
CHST3	carbohydrate sulfotransferase 3	10q22.1	0,95	-0,74	0,023	0,159
PPP3CB	protein phosphatase 3	10q22.2	0,89	0,33	0,019	0,151
ADK	Adenosine kinase	10q22.2	2,23	1,24	0,025	0,175
GJC1	gap junction protein	17q21.2	0,49	1,04	0,023	0,825
TNS4	tensin 4	17q21.2	-0,05	1,17	0,002	0,937
KRT23	keratin 23	17q21.2	0,02	1,88	0,003	0,921
KRTAP4-10	keratin associated protein 4-10	17q21.2	0,06	1,45	0,005	0,905
KRT17	keratin 17	17q21.2	0,20	4,48	0,001	0,952
SCAND1	SCAN domain containing	20q11.23	-0,04	0,74	0,006	0,910
DLGAP4	homolog-associated protein 4	20q11.23	0,89	1,44	0,038	0,810
LOC128439		20q11.23	0,25	1,05	0,003	0,921
L3MBTL	l(3)mbt-like	20q13.11	0,10	0,49	0,016	0,849
C20orf62	chromosome 20 open reading frame	20q13.12	-0,01	0,43	0,024	0,841
ADA	adenosine deaminase	20q13.12	-0,13	1,77	0,001	0,944
PI3	peptidase inhibitor 3	20q13.12	-0,10	2,42	0,008	0,889
C20orf67	Chromosome 20 open reading frame	20q13.12	0,06	0,45	0,017	0,849
NCOA3	Nuclear receptor coactivator 3	20q13.12	-0,09	0,62	0,021	0,841
ZFP64	zinc finger protein 64 homolog	20q13.2	0,13	0,78	0,011	0,873
BMP7	Bone morphogenetic protein 7	20q13.31	-0,19	1,06	0,042	0,810

Tabelle 6.9. Übersicht über die Anzahl der differenziell regulierten Gene der vier Zelllinien.

	BEAS-2B	H1395	H1993	HTB-56
Anzahl differenziell regulierter Gene *	5225	4624	7088	1858
%-Anteil zur Gesamtanzahl an Genen §	12,0%	10,6%	16,3%	4,3%
Anzahl herunterregulierter Gene	3342	2940	4083	1007
Anzahl heraufregulierter Gene	1883	1684	3005	851
in Übereinstimmung mit BEAS-2B		1353 (29,3%)	1951 (27,5%)	586 (31,5%)

* Unterschied in der Genexpression nach 5-Aza-CdR Behandlung um mindestens das 2fache der Log10-Werte ($\pm 0,301 \text{ Log}_{10}\text{Ratio}$)

§ 43.379 Gene sind auf dem Mikroarray vertreten

Danksagung

Abschließend möchte ich mich nun bei all den Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben. Es wird hierbei deutlich, dass ich mich stets auf ein tatkräftiges, tolles und motivierendes Team und Umfeld verlassen konnte. Ihnen und Euch allen möchte ich schon vorweg ein herzliches Dankeschön aussprechen!

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel für das interessante und aktuelle Thema sowie die Unterstützung und die netten und hilfreichen Diskussionsrunden. Darüber hinaus bedanke ich mich bei ihm, dass er mir im Rahmen meiner Arbeit die Möglichkeit gegeben hat, umfangreiche Erfahrungen im Ausland sammeln zu dürfen.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Harriet Wikman für ihre intensive, gute und vertrauensvolle Betreuung der Arbeit bedanken. Ihre eigene Begeisterung für die Forschung hat mich dabei stets motiviert.

Frau Dr. Eva Liebau danke ich für ihre Bereitschaft diese Dissertation als Vertreter des Fachbereiches Biologie zu begutachten.

Prof. Dr. Emre Yekebas, Prof. Dr. Jakob Izicki, Dr. Lena Liebl, Prof. Dr. Guido Sauter, Dr. Susann Koops und Dr. Jussuf Kaifi danke ich für die Bereitstellung des Patientenmaterials und der Patientendaten. Prof. Dr. Glatzel danke ich für den TMA mit den Gehirnetastasen.

Dr. Bauke Ylstra und Dr. Ruud Brakenhoff sowie Paul Eijk vom Medical Center der freien Universität Amsterdam danke ich für die gute Kooperation und Unterstützung bei der Array-CGH. Desweiteren danke ich Dr. Thomas Streichert, Kristin Reek und Dirk Kemming für die Durchführung der Expressionsarrays. Salla Ruosaari sowie Dirk Kemming gebührt mein Dank für die Hilfe und Unterstützung bei der Auswertung der Daten. Penny Nymark und Sabine Langer haben mich freundlicherweise bei der Auswertung der Karyogramme von den Zelllinien unterstützt.

Mein größter Dank gilt dem gesamten ITB-Team für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima – ganz besonders Kathrin Eylmann und Jolante Kropidlowski. Ich bedanke mich auch bei allen, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben und mir viele Anregungen gaben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Henning: ohne Deine Zuneigung, Geduld – vor allem während der Schreib- und Lernphase – und Unterstützung hätte ich das alles nicht geschafft! Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle Begleitung während all dieser Jahre.

Mein letzter und wohl auch wichtigster Dank geht an die Menschen, die diese Arbeit überhaupt ermöglicht haben – den Patienten, die durch ihre Gewebeproben und der zusätzlichen Knochenmark-Entnahme, einen großen Beitrag zur Forschung tragen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michaela Krämling
Geburtsdatum, -Ort: 10.04.1979, Aachen

Berufliche Stationen

Mai '04 – Juni '08 Naturwissenschaftliche Doktorandin im Institut für Tumorbilogie, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, Hamburg
Betreuer/in: Dr. Harriet Wikman und Prof. Dr. Klaus Pantel
Jan. '03 – Dez. '03 Diplomarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, Institut für Helminthologie
Betreuer/in: Prof. Dr. Eva Liebau and PD. Dr. Peter Fischer

Auslandsaufenthalte

Juni '05 – Nov. '05 Cancer Immunobiology Center, UT Southwestern Medical Center of Dallas, Dallas (Texas, U.S.A.)
Gastwissenschaftlerin bei Prof. Jonathan W. Uhr, M.D. PhD., Professor of Microbiology & Internal Medicine
März '05 Cancer Center Amsterdam, VU University Medical Center, Amsterdam, Niederlande
Gastwissenschaftlerin bei Dr. Bauke Ylstra

Ausbildung

Sept. '98 – Dez. '03 Biologiestudium an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen, Hauptfächer: Mikrobiologie/ Genetik
Sept. '89 – Mai '98 Anne-Frank-Gymnasium, Aachen

Stipendien

März '05 Short Term Scientific Missions (STSM), Scholarship of the European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research (COST Action B19)

Kongresse

Sept. '07 6th International Symposium on Minimal Residual Disease (ISMRD), Hamburg (Germany)
April '06 97th AACR Annual Meeting, Washington D.C. (U.S.A.)
Sept. '05 5th International Symposium on Minimal Residual Disease (ISMRD), San Francisco (U.S.A.)

Publikationen

Kraemling M, Ruosaari S, Eijk PP, Kaifi JT, Hollmén J, Yekebas EF, Izbicki JR, Brakenhoff RH, Streichert T, Riethdorf S, Glatzel M, Ylstra B, Pantel K, Wikman H. Genomic Profiles Associated with Early Micrometastasis in Lung Cancer: Relevance of 4q Deletion. Submitted.

Liebl L, **Kraemling M**, Sauter G, Koops S, Izbicki JR, Yekebas EF, Ylstra B, Pantel K, Wikman H. High level amplification of FOXA1 and NKX2-1 in Pulmonary Adenocarcinomas. In preparation.

Wikman H, **Kraemling M**, Kemming D, Pantel K. Identification of Target Genes in Micrometastatic Lung Cancer by Methylation Arrays. In preparation.

Abstracts für Posterpräsentationen

Kraemling M, Ruosaari S, Ylstra B, Pantel K, Wikman H. Genomic Profiles Associated with Early Micrometastatic Spread in Lung Cancer. Abstract for the 5th ISMRD 2005, San Francisco (U.S.A.).

Kraemling M, Ruosaari S, Ylstra B, Pantel K, Wikman H. Genomic Profiles Associated with Early Micrometastatic Spread in Lung Cancer. Abstract for the 97th AACR Annual Meeting 2006 #1830, Washington D.C. (U.S.A.).

Wikman H, **Kraemling M**, Eylmann K, Ylstra B, Pantel K. Genome-wide Screening for Chromosomal Aberration Patterns in Early Breast Cancer in Relation to Hematogeneous Dissemination of Tumor Cells. Abstract for the 97th AACR Annual Meeting 2006, Washington D.C. (U.S.A.).

Liebl L, **Kraemling M**, Izbicki JR, Petri S, Sauter G, Yekebas EF, Ylstra B, Pantel K, Wikman H. High Level Amplification of FOXA1 and TTF1 in Pulmonary Adenocarcinoma. Abstract for the 98th AACR Annual Meeting 2007 #1131, Los Angeles (U.S.A.).

Kraemling M, Ruosaari S, Ylstra B, Glatzel M, Pantel K, Wikman H. Genomic Profiles Associated with Early Micrometastatic Spread in Lung Cancer: Relevance of 4q Chromosomal Aberrations. Abstract for the 6th ISMRD 2007, Hamburg (Germany).

Wikman H, **Kraemling M**, Kemming D, Pantel K. Identification of Target Genes in Micrometastatic Lung Cancer by Methylation Arrays. Abstract for the 59. Mosbacher Kolloquium 'Epigenetics Molecular Principles and Mechanisms' 2008, Mosbach (Germany).