

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki, FACS, FRCS Ed. Hon.

Detektion von *KRAS*-Gen-Mutationen beim Bronchialkarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Zahnmedizin
im Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Bettina Nicola Maria Ostermayer, geb. Loos
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2015

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.07.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Izbicki

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. K. Kutsche

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Epidemiologie der Bronchialkarzinoms	6
1.2	Histologie und Pathogenese	8
1.3	Diagnostik	11
1.4	Genetische Veränderungen	15
1.5	Das <i>KRAS</i> -Gen	16
1.6	Therapieverfahren	19
1.7	Prognose	22

2. Arbeitshypothese und Fragestellung 24

3. Material und Methode

3.1	Material	25
3.2	Tumormaterial	27
3.3	Anfertigung von Kryogewebeschnitten	27
3.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Kryogewebeschnitte	28
3.5	Histologische Untersuchung	28
3.6	Mikrodissektion der Gewebeschnitte	29
3.7	Isolierung der Tumor-DNA	29
3.8	Konzentrationsbestimmung der DNA (Verfahren I)	30
3.9	Isolierung der Referenz-DNA auf EDTA-Blut	30
3.10	Mikrosatellitenanalyse	30
3.11	Loss of Heterozygosity	33
3.12	Amplifikation der Tumor-DNA	35
3.13	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.14	Aufreinigung der amplifizierten DNA	36
3.15	Konzentrationsbestimmung der DNA (Verfahren II)	37
3.16	Cycle Sequencing Reaction	38
3.17	Aufreinigung der DNA mittels DyeEx Spin Kit	39
3.18	Auftrennung & Analyse der bei der Didesoxymethode...	39

3.19	Klinische Daten	41
3.20	Statistische Auswertung	41
4.	Ergebnisse	
4.1	Patientencharakteristika	42
4.2	Mikrosatellitenanalyse	44
4.3	<i>KRAS</i> -Gen-Sequenzierung	48
4.4	Therapieverlauf	51
4.5	Überlebensanalyse	53
5.	Diskussion	56
6.	Zusammenfassung	61
7.	Abkürzungsverzeichnis und Schreibweise	
7.1	Abkürzungsverzeichnis	62
7.2.	Schreibweise	63
8.	Literaturverzeichnis	64
9.	Danksagung	77
10.	Curriculum Vitae	78
11.	Eidesstattliche Versicherung	79

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Bronchialkarzinoms

Innerhalb Deutschlands zählt das Bronchialkarzinom sowohl bei Männern als auch bei Frauen zu der dritthäufigsten Krebserkrankung. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für beide Geschlechter bei etwa 68 Jahren und entspricht damit dem Erkrankungsalter für Krebs im Allgemeinen [1].

In Deutschland liegt der Anteil der durch Krebs verursachten Todesfälle nach Angaben des Robert-Koch-Instituts beim männlichen Geschlecht für Lungenkrebs mit etwa 26 % auf Rang 1. Bei Frauen liegt der Anteil mit etwa 11,6 % auf Rang 3. In westlichen Ländern zählt das Bronchialkarzinom nach wie vor zu den häufigsten krebsassoziierten Todesursachen [1-2]. Trotz der Fortschritte in der Diagnostik und Therapie liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit Lungenkarzinom in europäischen und nordamerikanischen Ländern nur in einem Bereich von 5,5 – 15,7 % [3-4].

Nach Angaben des Statistischen Bundesamts verstarben im Jahr 2005 42.217 Personen (30.347 Männer und 11.870 Frauen) an Erkrankungen, die in Zusammenhang mit dem Konsum von Tabakprodukten gebracht werden können [5].

Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Lungenkrebs (90 %) sind die im Tabakrauch enthaltenen Kanzerogene, dazu zählen u. a. Benzpyren, Nitrosamin, β -Naphthalin, Hydrazin, Polonium und Kadmium. Daneben sind Asbest, ionisierende Strahlung, Radon, Quarzstäube und die durch sie hervorgerufene Silikose als Verursacher von Lungenkrebs bekannt [1, 6-17].

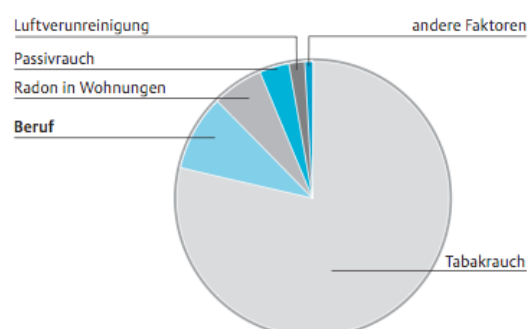


Abbildung 1.1

Bedeutung einzelner Risikofaktoren im Hinblick auf das Lungenkrebsrisiko [6]

Bei Männern kann das Bronchialkarzinom in 90 %, bei Frauen in 75 % der Fälle auf das Rauchen zurückgeführt werden. Die Dauer und Intensität, mit welcher die Inhaltsstoffe konsumiert werden, sind hierbei ausschlaggebend [8]. Auch lässt das Passivrauchen das Risiko einer Erkrankung um das Zweifache ansteigen. Ebenso erhöhen spezifische genetische Faktoren und familiäre Prädispositionen das Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken [9-17].

Weiter wirkt sich der sozioökonomische Status auf die Erkrankungshäufigkeit aus; so tritt Lungenkrebs in der Bevölkerungsgruppe mit niedrigem Einkommen und schlechter Ausbildung häufiger auf als in der Gruppe mit hohem sozioökonomischen Status [7].

Seit 1990 ist bei Männern eine Tendenz des Rückgangs von Inzidenz und Mortalität zu beobachten, der auf die steigende Nichtraucheranzahl zurückgeführt wird; laut CDC (Centers for Disease Control and Prevention) nahm die Anzahl von Neuerkrankungen in den Jahren von 2005 bis 2009 bei Männern um 2,6 % ab [18], bei Frauen zeichnet sich eine eher gegenläufige Tendenz ab. Dieser Trend wird dem gesteigerten Zigarettenkonsum von Frauen zugeschrieben [1].

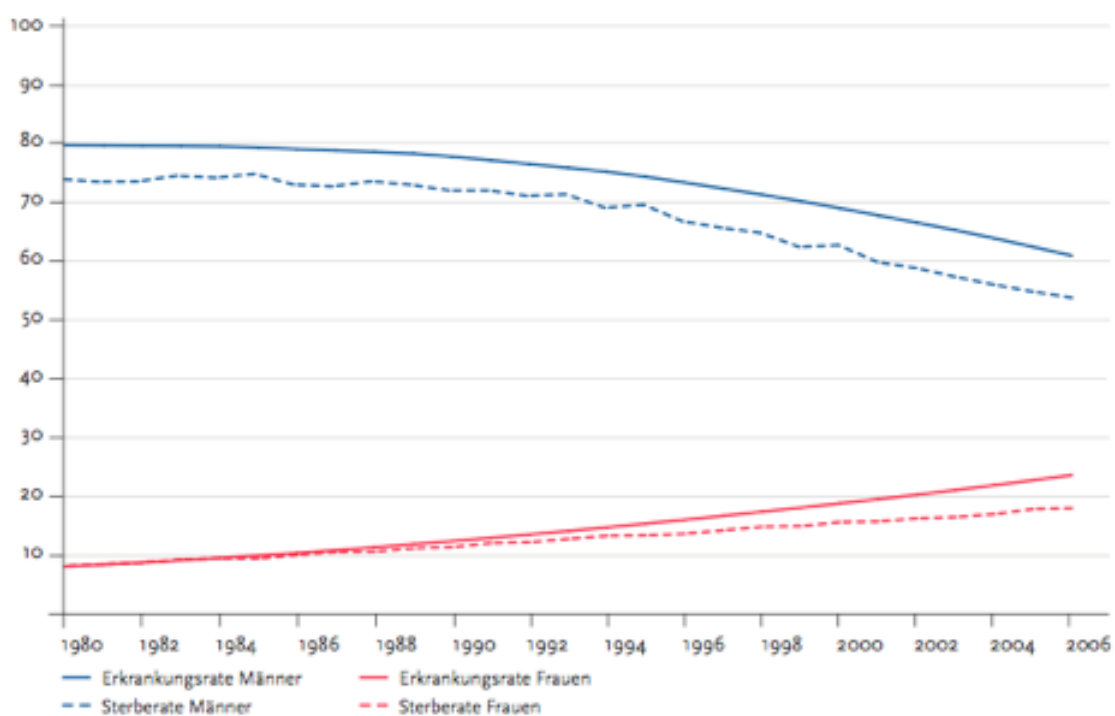


Abbildung 1.2

Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterbedaten in Deutschland 1980-2006 [1]

Nach aktuellen Umfragen rauchen in Deutschland derzeit 37 % der erwachsenen Männer und 28% der erwachsenen Frauen (≥ 18 Jahre) [1].

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass bis zum Jahr 2025 weltweit jährlich zehn Millionen Menschen an den Folgen des Tabakkonsums sterben werden [19].

1.2 Histologie und Pathogenese

Unter einem Bronchialkarzinom versteht man eine maligne Neoplasie, die von den Zellen der unteren Atemwege ausgeht. Topografisch am häufigsten betroffen ist der Oberlappen der rechten Lunge, der aufgrund des größeren Ventilationsvolumens eine ausgedehntere Kontaktfläche hat.

Pathohistologisch werden zwei Hauptgruppen der Bronchialkarzinome unterschieden: das großzellige Bronchialkarzinom (NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer) mit einem Anteil von 75-80% und das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC, Small Cell Lung Cancer) mit einem Anteil von etwa 20 %. Weiterhin werden die NSCLC in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und großzellige Karzinome unterteilt [20].

Das Plattenepithel- und das Adenokarzinom kommen am häufigsten vor, wobei ihre Inzidenz geografischen Schwankungen unterliegt. So ist das Plattenepithelkarzinom am weitesten in den westlichen Industriestaaten verbreitet und mit dem Rauchen assoziiert, während das Adenokarzinom vor allem in asiatischen Ländern und bei Nichtrauchern und Frauen auftritt [12-13].

Das Plattenepithelkarzinom (SCC, Squamous Cell Carcinoma) macht mit etwa 40% den größten Teil der NSCLC aus und zeigt eine starke Korrelation mit dem Tabakrauchen [15]. Durch den chronischen Reiz des Rauchs auf das die Bronchien auskleidende respiratorische Epithel kommt es zu einer Entzündung und zur Plattenepithelmetaplasie, in deren Folge es zur Dysplasie kommen kann. Charakteristisch sind das langsame Wachstum und die frühe Metastasierung in die regionalen Lymphknoten. Regressive Veränderungen wie Nekrosen, Blutungen und Zysten können auftreten. Es wird ein verhornender von einem nichtverhornenden Typ unterschieden, letzterer geht aufgrund der größeren Entartung mit einer schlechteren Prognose einher [20].

Das Adenokarzinom (AC) wird in drei Gruppen unterteilt: in präinvasive/nichtinvasive, minimalinvasive und invasive Läsionen. Als präinvasive Läsionen des Adenokarzinoms werden die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH) und das Adenocarcinoma in situ (AIS) bezeichnet. Das AAH und das AIS gehören zu den lepidischen (lat. reinen) Läsionen, die sich durch ein nichtinvasives Wachstum auszeichnen. Dagegen werden alle anderen Adenokarzinome als invasiv bezeichnet, da sie die Fähigkeit der Gewebsinvasion, der

lymphogenen, hämatogenen oder aerogenen Metastasierung haben. Die histologischen Subtypen werden auch als invasiv bezeichnet, wenn sie nicht invasiv gewachsen sind. Die neue Einteilung ersetzt alte Bezeichnungen; so ist das Adenocarcinoma in situ ≤ 3 cm das frühere bronchioalveoläre Karzinom, das lepidisch prädominante Adenokarzinom ersetzt das frühere nicht muziöse bronchioalveoläre Karzinom, das heutige invasiv muziöse Adenokarzinom steht für das frühere muziöse bronchioalveoläre Karzinom [21-22].

Die Bronchialkarzinomeinteilung nach der WHO/IARC sowie die Einteilung der Adenokarzinome nach ASLC/ATS/ERS sind in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1

Einteilung der Bronchialkarzinome nach WHO 1999/ IARC 2004 und ASLC/ATS/ERS-Klassifikation des Adenokarzinoms 2011 [20-21]

Plattenepithelkarzinom

Varianten

- papillär
- klarzellig
- kleinzellig
- basaloid

Adenokarzinom

Präinvasive Läsionen

- atypische adenomatöse Hyperplasie
- Adenocarcinoma in situ (≤ 3 cm)
- nicht muziös
- muziös
- gemischt muziös/ nicht muziös

Großzelliges Bronchialkarzinom

- großzelliges neuroendokrines Karzinom
- klarzelliges Karzinom
- basaloides Karzinom
- lymphoepitheliales Karzinom

Minimalinvasives Adenokarzinom

- (≤ 3 cm lepidisch prädominantes ADC)
- nicht muziös
- muziös
- gemischt muziös / nicht muziös

Kleinzelliges Bronchialkarzinom

- adenosquamöses Karzinom
- sarkomatoides Karzinom
- Karzinoidtumor
- Speicheldrüsentumore

Invasives Adenokarzinom

- lepidisch prädominant (ehem. BAC)
- azinär prädominant
- papillär prädominant
- mikropapillär prädominant
- solid prädominant

Varianten

- mukoepideroid
- adenoidzystische
- epithelial-myoepithelial

Varianten invasiver Adenokarzinome

- invasiv muziöses ADC
- kolloidal
- fetal (niedrig und hoch maligne)
- enterisch

Das großzellige Karzinom (LCLC, Large Cell Lung Cancer) wird nach der WHO-Klassifikation in eine eigene Subgruppe unterteilt, gehört aber immunhistochemisch zu den entdifferenzierten Plattenepithel- oder Adenokarzinomen. Wegen ihrer Größe und den hellzelligen Arealen kann man sie lichtmikroskopisch jedoch nicht mehr als solche erkennen. Sie machen ca. 15 % der NSCLC aus [20].

Das kleinzellige Karzinom (SCLC) gehört als eigene Gruppe zu den Karzinoiden. Als Karzinoide werden Tumorformen bezeichnet, die vom neuroendokrinen System ausgehen. Es werden die typischen von den atypischen Karzinoiden unterschieden. Die typischen Karzinoide liegen meist zentral und wachsen langsam über einen längeren Zeitraum lokal begrenzt. Sie zeigen eine bessere Prognose als die hoch malignen atypischen Karzinoide. Sie weisen eine vermehrte Zell- und Kernpolymorphie auf, meist sind sie peripher gelegen. Das kleinzellige Bronchialkarzinom geht aus den neuroendokrinen APUD-Zellen hervor und zeichnet sich durch seine kleinen, runden, im lockeren Zellverband liegenden Zellen aus. SCLC bilden sich bevorzugt in den zentralen Bronchien. Sie können ektope Hormone bilden und so zu Paraneoplasien führen (z. B. Cushing-Syndrom). Charakteristisch für das kleinzellige Karzinom sind das rasche Wachstum und die sehr frühe Metastasierung in die umliegenden Lymph- und Blutbahnen. Klinisch zeigen sie hierdurch eine schlechtere Prognose. Siebzig Prozent der kleinzelligen Karzinome sind inoperabel und können nach Diagnosestellung meist nur palliativ behandelt werden [20].

Neben dem Primärtumor bestimmt die lymphogene und hämatogene Metastasierung den Krankheitsverlauf und die Sterblichkeit wesentlich. Beim Bronchialkarzinom zeigt sich häufig ein sehr früher mediastinaler Lymphknotenbefall. Zeitlich schließt sich der Befall der interpulmonalen Lymphknoten an, gefolgt von der Metastasierung in die parabronchialen und hilären Lymphknoten [23]. Lebermetastasen zählen mit 35-40% zu den häufigsten Fernmetastasen beim Bronchialkarzinom, gefolgt von Metastasen des Skelettsystems (30%) der Nebennieren (22-34%) und des Gehirns (14-19%). Nicht selten werden Bronchialkarzinome primär durch das Finden von Fernmetastasen diagnostiziert [24].

Einzelne Tumorzellen oder kleine Tumoraggregate, sogenannte disseminierte Tumorzellen (DTZ), die einen Durchschnitt von 0,2 mm nicht überschreiten dürfen (UICC, Union Internationale Contre le Cancer), können bereits zum Zeitpunkt der Diagnose in mesenchymales Gewebe (Knochenmark, Lymphknoten) eingewandert sein. In diesem Fall spricht man von einer minimal residualen Krebserkrankung (MRD) [25-26].

1.3 Diagnostik

Die pathologische Beurteilung erfolgt nach dem Tumor-Staging über die TNM-Klassifikation, bei welcher das Bronchialkarzinom anhand seiner Ausbreitung und Differenzierung in Stadien eingeteilt wird [27-28]. Neben der klinischen Anamnese und körperlichen Untersuchung werden bildgebende Verfahren, wie die Röntgenaufnahme des Thorax (p. a. und seitlich), die Spiral-Computertomographie oder die Thoraxsonographie, zur Beurteilung herangezogen. Des Weiteren können verschiedene Tumormarker im Serum nachgewiesen werden. Immunzytochemische und molekularbiologische Verfahren stehen zur Detektion von einzelnen disseminierten Tumorzellen (DTZ) im Blut, in den Lymphknoten oder im Knochenmark zur Verfügung. Diese Tumormarker, neuronenspezifische Enolase (NSE), das Pro Gastrin Releasing Peptide (ProGRP), Cytokeratin 19 Fragmente (CYFRA 21-1) und das karzinoembryonale Antigen (CEA), haben sich für das Bronchialkarzinom als relevante Tumormarker mit einer hohen diagnostischen Aussagekraft herauskristallisiert. Trotz der Korrelation zwischen Tumorgroße und präoperativem Tumormarkerwert ist kein generelles Staging mittels der tumorassoziierten Antigene beim Bronchialkarzinom möglich. Die Tumormarker können aber für die genauere Einteilung des histologischen Subtyps, eine Einschätzung des Ausmaßes der Erkrankung und eine erste Aussage über die Prognose hilfreich sein [29-31]. Die Tumormarker sind weiterhin für die Verlaufskontrolle nach Resektion des Primärtumors und für das Erstellen des Therapieplans wichtig. Der postoperative Markerabfall lässt auf die vollständige Entfernung des Tumors bzw. das Ansprechen auf die Chemotherapie schließen. Im umgekehrten Fall kann das Ausbleiben dieses Abfalls ein Hinweis auf Metastasierung, einen Residualtumor oder Therapieversagen sein. Der vorzeitige Wiederanstieg nach kurativer Resektion spricht i. d. R. für ein Tumorrezidiv [32].

Weitere häufig eingesetzte Untersuchungsmethoden sind die Sputumzytologie und die Bronchoskopie. Basislaboruntersuchungen liefern zudem wichtige Informationen über Blutbild, Leber- und Nierenwerte und Gerinnung. Zusätzlich werden Spezialuntersuchungen wie die Szintigraphie und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) angewandt [23].

Nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) beschreibt die TNM-Klassifikation

den Grad der Ausbreitung des primären Tumors (T), den Befall der regionalen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung [27, 33-35]. In Tabelle 1.2 ist der Vergleich der bis 2009 geltenden 5. und 6. Auflage der UICC-TNM-Klassifikation mit der ab 2010 geltenden 7. Auflage dargestellt [7, 33-35].

Tabelle 1.2

UICC-TNM-Klassifikation [7, 33-35]

UICC TNM 5. und 6. Auflage

IASLC, UICC TNM 7. Auflage

T1 Tumor bis 3 cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus bronchoskopisch frei

T1 Tumor bis 3 cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus bronchoskopisch frei

T1a Läsion bis 2 cm

T1b Läsion größer 2 cm bis 3 cm

T2 Tumor > 3 cm oder Befall von
- Hauptbronchus $\geq$ 2 cm entfernt von Carina oder
- viszerale Pleura infiltriert oder
- Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge

T2 Tumor > 3 cm $\leq$ 7 cm mit Befall von:

- Hauptbronchus $\geq$ 2 cm entfernt von Carina oder

- viszerale Pleura infiltriert oder

- Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus,

aber nicht der ganzen Lunge

T2a Läsion bis 5 cm

T2b Läsion bis 7 cm

T3 Tumor jeder Größe mit Infiltration von
- Brustwand oder
- Zwerchfell oder
- mediastinaler Pleura oder
- parietalem Perikard
Hauptbronchus $\leq$ 2 cm entfernt von

T3 T2-Tumor größer als 7 cm
Tumor jeder Größe mit Infiltration von
- Brustwand oder
- Zwerchfell oder
- mediastinaler Pleura oder

	Carina, Carina selbst frei Atelektase oder obstruktive Entzündung der ganzen Lunge		- parietalem Perikard Hauptbronchus ≤ 2 cm entfernt von Carina, Carina selbst frei Atelektase oder obstruktive Entzündung der ganzen Lunge getrennte Herde im selben Lungenlappen (ehem. T4)
<i>T4</i>	Tumor jeder Größe mit Infiltration von - Mediastinum oder - Herz oder - großen Gefäßen - Trachea oder - Ösophagus oder - Wirbelkörper oder - Carina getrennte Herde im selben Lungenlappen (neu → T3) Tumor mit malignem Pleuraerguss (neu → M1a)	<i>T4</i>	Tumor jeder Größe mit Infiltration von - Mediastinum oder - Herz oder - großen Gefäßen - Trachea oder - Ösophagus oder - Wirbelkörper oder - Carina Tumorherde in anderen Lungenlappen ipsilateral (ehem. M1)
<i>M1</i>	Tumorherde in einem anderen Lungenlappen ipsilateral (neu → T4) Tumorherde in einem anderen Lungenlappen kontralateral Fernmetastasen	<i>M1a</i>	Tumor mit malignem Pleura oder Perikarderguss Tumorherde in der kontralateralen Lunge
		<i>M1b</i>	Fernmetastasen

Unterteilt wird in die Stadien I-IV, welche den späteren Therapieplan und die Prognose bestimmen.

Tabelle 1.3

Stadieneinteilung der UICC-TNM-Klassifikation 7. Auflage [36]

Okkultes Karzinom	Tx	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3 selber Lappen*	N0	M0
Stadium IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T3 selber Lappen*	N1	M0
	T3 selber Lappen*	N2	M0
	T4 Ausdehnung	N0	M0
	T4 Ausdehnung	N1	M0
	T4 Herd ipsilateral#	N0	M0
	T4 Herd ipsilateral#	N1	M0
Stadium IIIB	T4 Ausdehnung	N2	M0
	T4 Herd ipsilateral#	N2	M0
	jedes T	N3	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1a (Maligner Pleura- oder Perikarderguss oder kontralaterale Metastase)
	jedes T	jedes N	M1b (Fernmetastase)

*Herd/e im selben Lappen; # Tumorherd/e im anderen Lungenlappen ipsilateral

1.4 Genetische Veränderungen

Die Tumorentstehung ist ein multifaktorielles Versagen mehrerer Mechanismen innerhalb einer Zelle. Die von einer Mutation betroffene Zelle kloniert sich und gibt die Fehlinformation des Tumorphänotyps an ihre Tochterzellen weiter. Bereits in präneoplastischen Veränderungen wie einer Hyperplasie, Dysplasie oder einem Carcinoma in situ sind genetische Veränderungen histologisch nachweisbar [7, 37].

Unter einer Mutation versteht man eine spontane oder induzierte Änderung des Erbgutes, die auf drei verschiedenen Ebenen ablaufen kann. Es werden die Genom-, Chromosomen- und die Genmutation unterschieden.

Eine *Genommutation* ist eine numerische Veränderung des Chromosomensatzes (Karyotyp). Betroffen sind hierbei entweder vollständige Chromosomensätze oder einzelne Chromosomen, die vervielfacht oder vermindert vorliegen.

Als *Chromosomenmutationen* werden strukturelle Veränderungen an einzelnen Chromosomen zusammengefasst. Mutationen im Bereich des p-Arms von Chromosom 3 sind mit 90 % in SCLC und > 80 % in NSCLC die mit am häufigsten auftretenden genetischen Veränderungen in Bronchialkarzinomen [38-40].

Bei *Genmutationen* kommt es durch Austausch, Verlust oder Einfügen von Basen zur DNA-Veränderung (Translokation, Transversion, Punktmutation). Es kann damit eine Veränderungen auf proteinebene Einhergehen. Durch die Aktivierung oder Deaktivierung von entscheidenden Kontrollgenen, wie z. B. Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen (TSG) und DNA-Reparaturgenen, kommt es im weiteren Verlauf innerhalb der Zelle zu Veränderungen. Es wird zwischen stillen-, missense- und nonsense-Mutationen unterschieden. Eine stille-Mutation, die zu keinem Austausch einer Aminosäure führt, bleibt in der Regel ohne weitere Konsequenz. Bei einer missense-Mutation (sinnverändernden) tritt eine Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins auf. Durch das Einfügen eines Stopcodons kommt es bei der nonsense-Mutation (unsinn) zu einem verfrühten Abbruch der Translation, das Protein wird also nicht fertiggestellt [41-42].

Nach dem Two-Hit-Model von Knudson müssen sich Mutationen auf beiden Allelen eines Tumorsuppressorgens ereignen, damit die Zelle in Richtung Tumorentstehung geht. Es kommt dadurch zur Geninaktivierung und häufig zu einer verminderten Genexpression (*loss of function*) [43-44].

Das Tumorsuppressorgen *P53* ist ein Regulationsmolekül des Zellzyklus und als Transkriptionsfaktor für die Expression von Genen und die induzierte Apoptose verantwortlich. Durch Mutationen im Bereich von 17p13 wird das Gen inaktiviert. Häufig handelt es sich um G-T-Transversionen, die u. a. durch Kanzerogene im Zigarettenrauch hervorgerufen werden können. Zudem konnte eine verschlechterte Prognose beim Auftreten

von *P53*-Mutationen innerhalb von NSCLC nachgewiesen werden [45-47].

Veränderungen des Chromosomenabschnitts auf dem sich das Tumorsuppressorgen *Retinoblastom* (*RB* in 13q14) befindet, konnten sowohl in NSCLC als auch in SCLC nachgewiesen werden [48-49].

Damit ein Protoonkogen zu einem Onkogen wird, genügt ein dominantes Mutationsereignis, bei welchem ein defektes Allel zur Tumorentstehung führt. Das mutierte Allel ist dominant über das Wildtyp-Allel und geht mit einem Funktionsgewinn des exprimierten Proteins einher (*gain of function*) [43, 50].

Zu den Protoonkogenen, die an der Entstehung von Bronchialkarzinomen mitbeteiligt sind, zählen u. a. die *RAS*-Onkogene, speziell das *KRAS*-Gen und die Gene der *ERBB*-Familie. Zu dieser Familie gehört auch der *Epidermal Growth Factor Receptor*, *EGFR*. Bei 60 % der Plattenepithel- und Adenokarzinome wurde eine gesteigerte EGFR-Expression beobachtet [51-55].

Eine Methode, um den Verlust eines Allels feststellen zu können, ist die Mikrosatellitenanalyse. Mikrosatelliten *Short Tandem Repeats* (*STR*) sind kleine, meist nur zwei bis vier Basenpaare umfassende, im Genom verstreut liegende repetitive DNA-Sequenzen. Mikrosatelliten werden häufig als DNA-Marker in der Genetik verwendet, da sie polymorph sind, d. h. es gibt in der Bevölkerung viele verschiedene Allele und viele Personen sind heterozygot. Eine Heterozygotie liegt also vor, wenn mütterliches und väterliches Allel eine unterschiedliche Anzahl an repetitiven Sequenzen aufweisen. Ist die Anzahl der Repeats auf beiden Allelen gleich, so besteht eine Homozygotie. Liegt in einem Tumor auf einem Chromosom eine große Deletion vor, die z. B. mehrere Gene (u. a. Tumorsuppressorgene) umfasst, so kann dieser Allelverlust durch eine Mikrosatellitenanalyse aufgedeckt werden, vorausgesetzt, es liegt eine Heterozygotie für die analysierten DNA-Marker vor. Bei der Mikrosatellitenanalyse wird die DNA der Tumorprobe mit der DNA einer Blutprobe desselben Patienten verglichen. Durch den Vergleich der analysierten Mikrosatellitenallele im Tumor mit denen im gesunden Vergleichsgewebe kann ein *Loss of Heterozygosity* (LOH) festgestellt werden [56-58].

1.5 Das *KRAS*-Gen

Bereits 1981 wurden die virale *Harvey*- und *Kirsten*-*RAS*-Sequenz in Ratten entdeckt und deren Verhalten, sich von normalen Zellen in aktivierte Onkogene zu verwandeln, beschrieben [60]. Man nahm an, dass sich die Veränderung der *RAS*-Gene ähnlich wie die der *SRC*-Onkogene, hervorgerufen durch die *ROUS Sarcoma-Viren* (RSV), verhalten würden [61]. Das *Kirsten Sarcoma Virus Associated Oncogene* wurde *KRAS* (*KI-RAS*)

genannt, das *Harvey Sarcoma Virus Associated Oncogene HRAS*. Kurz darauf wurde auch das dritte Mitglied der *RAS*-Familie, *NRAS*, nachgewiesen [62-63]. Mutierte Gene der *RAS*-Familie wurden zunehmend in menschlichen Geweben wie der Blase, dem Kolon und der Lunge gefunden [64]. Detaillierte Untersuchungen zeigten, dass es sich hierbei um Punktmutationen der Codons 12, 13 und 61 handelte [41-53]. Weitere Bedeutung kam der Feststellung zu, dass *RAS*-Mutationen nicht bei primären Zellen gefunden werden konnten und die Tumorentstehung ein mehrstufiger Mechanismus ist, der nur bei Zellen mit Prädisposition erfolgen kann [65-66].

Die *RAS*-Onkogene gehören zu den Guanosintriphosphat-bindenden Proteinen (G-Proteine) und wurden erstmals 1980 vom Edward-Scolnick-Institut beschrieben [42, 67]. *NRAS* und *HRAS* besitzen vier Exons, *KRAS* weist zwei alternative vierte Exons auf (IVa, IVb), sodass zwei verschiedene Genprodukte gebildet werden. Beide entsprechen einer relativen Molmasse von jeweils 21 kDa. Das *KRAS*-Gen befindet sich auf dem kurzen (p) Arm von Chromosom 12 in der Bande p12.1 [67].

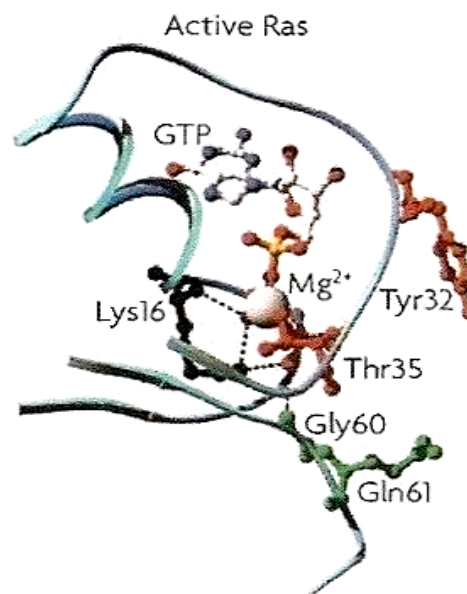


Abbildung 1.3

Strukturmodell des GTP-gebundenen KRAS-Proteins [66]

RAS-Proteine werden in der Regel durch Ligandenbindung an Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert, die Aktivierung ist aber auch ohne Rezeptor-Tyrosinkinasen möglich. Entscheidend bei der Aktivierung von *RAS* ist das Adapterprotein GFRB2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2), welches das erhaltene Wachstumssignal (z. B. EGF) auf das Guaninnukleotidaustauschmolekül SOS (Son of Sevenless) überträgt. *RAS* wird so durch den Austausch von Guanindiphosphat (GDP) zu Guanintriphosphat (GTP) in einen aktiven Zustand überführt. Das Wachstumssignal erzeugt über die MAP- (Microtubule Associated

Protein Kinase) und ERK 1/2-Kinasen (Extracellular signal-Regulated Kinases) eine Aktivierungskaskade. Das aktivierte ERK transloziert in den Zellkern und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren, welche an spezifische *DNA response elements* binden und dadurch die Expression bestimmter Gene regulieren [58-59].

Durch Hydrolyse wird RAS inaktiviert. Hierbei wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der GDP-gebundene Ruhezustand erreicht; dieser Prozess kann durch GTPase aktivierende Proteine (GAP) beschleunigt werden. Eine Punktmutation kann die GTPase-Aktivität blockieren. So bildet sich eine intrinsische Resistenz, GTP kann nicht mehr zu GDP hydrolysiert werden, und das Protein verbleibt in seinem aktiven Zustand. Ein ständiges Wachstumssignal, das unabhängig vom EGF-Rezeptor ist, sorgt für ein unkontrolliertes Wachstum der Zelle [67-68].

RAS-Mutationen kommen in menschlichen Tumoren mit am häufigsten vor und betreffen sowohl solide Tumore (epithelialen oder mesenchymalen Ursprungs) als auch hämatopoetische Tumore (Leukämien). Sechzig Prozent der Pankreastumore haben eine *KRAS*-Mutation, bei 25 % des Dünndarmkrebses liegt eine *NRAS*-Mutation vor und bei 16 % der Speicheldrüsentumore eine *HRAS*-Mutation [67].

Die häufigsten *RAS*-Mutationen sind Punktmutationen im *KRAS*-Gen, das sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (12p) befindet. Die Punktmutationen betreffen bevorzugt die Codons 12, 13 oder 61; es handelt sich meist um eine G-T- (73 %), seltener um eine G-C-Transversion. Codon 12 (GGT), welches die Aminosäure Glycin codiert, wird zu TGT = Lysin oder GTT = Valin, bei G-C-Transversionen wird nach Alanin ausgetauscht.

Neunzig Prozent der im Bronchialkarzinom auftretenden Mutationen befinden sich in Codon 12 und 13 [67-69]. Von den *RAS*-Onkogenen hat das *KRAS*-Gen die höchste Mutationsfrequenz im Bronchialkarzinom mit einem Anteil von etwa 15-20 % [70]. *HRAS* und *NRAS* zeigen beide nur zu etwa 1 % Mutationen, die ein Bronchialkarzinom hervorrufen können. *KRAS*-Gen-Mutationen kommen häufiger bei männlichen Rauchern und in Adenokarzinomen vor, hier vor allem in muzinösen Adenokarzinomen. Etwa 20-30% der Adenokarzinome haben eine *KRAS*-Gen-Mutation. Mutationen im SCLC sind dagegen selten [67-79].

Ein Zusammenhang zwischen LOH und Lungenkrebs wurde in mehreren Studien an humanem Gewebe und in experimentellen Tierversuchen untersucht, ebenso wie die Frage nach der Tumorsuppressorfunktion des *KRAS*-Gens [77-85]. Bei heterozygoten Mäusen mit einem Allelverlust im Bereich des *Kras*-Gens kamen spontan und chemisch induzierte Tumore signifikant häufiger vor als bei zwei intakten *Kras*-Allelen. Dabei konnte eine hohe Frequenz von LOHs, auf Chromosom 6, der Region des *Kras*-Gens, gezeigt werden [77]. In einer Studie mit B6c3f1-Mäusen untersuchte man die Aktivierung der Map-Kinase und fand einen Zusammenhang zwischen *Kras* und LOH des Wildtyp-Allels [80]. Nachfolgende

Studien an humanem Gewebe versuchten einen ähnlichen Zusammenhang herzustellen. Man ging davon aus, dass die dominante Wirkung des mutierten *RAS*-Allels entweder durch eine Überexpression des mutierten Gens oder durch den Verlust des Wildtyp-Allels hervorgerufen wird. Bei einer Untersuchung von Li et al. [79] an humanen Zellkulturen wurde bei etwa 50% der untersuchten Adenokarzinome und LCLC ein LOH auf Chromosom 12p beschrieben, und etwa 40% der Adenokarzinome und LCLC zeigten eine Mutation im *KRAS*-Gen. Alle Adenokarzinome und LCLC mit einer *KRAS*-Mutation hatten einen LOH im Bereich von *KRAS*. Der prozentuale Anteil von Tumoren mit LOH in der Region 12p12-13 war genauso hoch wie der Anteil von Tumoren mit einer *KRAS*-Mutation. An transgenen Ratten, die eine Überexpression des Wildtyp-Kras-Gens aufwiesen, konnten MINU-induzierte Mamma-Karzinome signifikant häufiger reduziert werden als bei ihren nicht transgenen Wurfgeschwistern [84]. Auch an Thymusgewebe von Mäusen führte die Überexpression von Wildtyp-Nras zum Schutz vor einem Thymuskarzinom [85]. Damit kann Wildtyp-*KRAS* das onkologische Potenzial des mutierten *KRAS*-Gens hemmen. Bei der onkologischen Aktivierung des *KRAS*-Gens kommt es jedoch häufiger zur Überexpression mutierter Allele als zum Verlust des Wildtyp-Allel, gain of function überwiegt also gegenüber loss of function [81].

1.6 Therapieverfahren

Das Tumor-Staging bestimmt das therapeutische Vorgehen und beeinflusst signifikant die spätere Prognose.

Beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom im Stadium I/II sind die Lappenresektion und die systemische Lymphknotendissektion indiziert. Primäres Therapieziel ist die radikale Resektion mit einem freien Resektionsrand (R0).

Eine neoadjuvante Chemotherapie bringt keine Verlängerung der rezidivfreien noch der Gesamtüberlebenszeit und wird daher nicht empfohlen. Ebenso erreicht man mit einer adjuvanten Chemo- und/oder Radiotherapie keine Verbesserung der Überlebenszeit [86]. Eine definitive Radiotherapie sollte zu diesem Zeitpunkt nur bei inoperablen Patienten erfolgen oder bei R1-resizierten Patienten, die nicht nachresiziert werden können. Die angewandte Dosis sollte hierbei 60 Gray (Gy) betragen [7].

Patienten im fortgeschrittenen Stadium IIIA/IIIB wird nach kompletter Resektion und systemischer Lymphknotendissektion eine anschließende sequenzielle adjuvante Chemo- und Radiotherapie empfohlen. Die adjuvante Chemotherapie, welche mit cisplatinhaltigen Kombinationen erfolgen sollte, zeigt einen signifikanten Anstieg der Fünf-Jahres-Überlebensrate [87]. Gängige Zytostatika bei der Bronchialkarzinomtherapie sind neben

Cisplatin Zytostatika der dritten Generation: Carboplatin, Docetaxel, Gemcitabin, Vinorelbin und Paclitaxel [88-89]. Cisplatin und Carboplatin gehören zu den Platinderivaten. Unter Bildung eines Platin-Addukts gehen sie eine kovalente Bindung mit der DNA ein. Die DNA-Reparaturenzyme werden gehemmt und die Apoptose induziert. Docetaxel, ein Taxol, fixiert während der Mitose den Spindelapparat und unterbindet die Zellteilung. Auch Paelitaxel hat diesen Wirkungsmechanismus. Pyrimidinanaloga wie Gemcitabin und 5-Fluorouracil unterbrechen als Antimetaboliten die DNA-Replikation [7].

Ist im Stadium IIIA/IIIB, bei ungünstiger Lage des Tumors, eine Operation nicht möglich, kann als alleinige Therapie auch eine definitive Radiotherapie mit 60-70 Gy erfolgen [7].

Im Stadium IV liegt die mediane Überlebenszeit zwischen acht und zwölf Monaten, dies ist im Vergleich zu anderen metastasierten Tumoren ein relativ kurzes Zeitfenster. Durch das fortgeschrittene Tumorstadium ist eine kurative Therapie nicht mehr möglich. Von vornherein sollte in dieser Situation ein stabiler und zuverlässiger Betreuungskontext hergestellt und geprüft werden, ob eine Erkrankungsmanifestation einer zeitnahen Intervention bedarf. Ziele der Palliativbehandlung sind: a) die Reduktion tumorbedingter Symptome durch eine adäquate Schmerzbehandlung nach dem WHO-Stufenschema und b) die Verlängerung der Überlebenszeit [7].

Dabei sollte in der Erstlinientherapie eine cisplatinbasierte Kombinationschemotherapie durchgeführt werden, alternativ kann eine carboplatin- oder platinfreie Kombinationstherapie mit Drittgenerationszytostatika erfolgen. Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand und Kontraindikation zur Behandlung mit platinbasierten Chemotherapeutika können eine Monotherapie mit Drittgenerationszytostatika erhalten.

Neben der beschriebenen Standardtherapie kann im fortgeschrittenen und Endstadium sowie bei Metastasen eine seit 2005 in Deutschland zugelassene personalisierte Therapie, eine target therapy erfolgen. Diese setzt direkt auf molekularer Ebene einer Zielstruktur (z. B. EGFR oder Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) an, wodurch eine kontrollierte Inhibition des Tumorwachstums erreicht werden soll. Die zur Anwendung kommenden Medikamente sind die EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren (EGFR-TKI) Erlotinib (Tarceva®), Gefitinib (Iressa®) und die EGFR-Antikörper Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®) [90]. Erlotinib und Gefitinib hemmen die Phosphorylierung von ERBB1/HER1, auch bekannt als EGFR. Im weiteren Verlauf kommt es hierdurch zur Wachstumshemmung und zum Einleiten der Apoptose. Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®) sind IgG-spezifische Antikörper gegen EGFR. Sie hemmen die Signalweiterleitung von EGFR und induzieren die Apoptose [91-93]. Des Weiteren wird die Expression von Angiogenesefaktoren und die Metastasierung durch Tumorzellen gehemmt [94].

Bei Patienten im Stadium IIIB/IV führt die Behandlung mit Cetuximab zusätzlich zur

platinbasierten Kombinationschemotherapie zu einer statistisch signifikanten Verbesserung der Remissionsrate und der medianen Überlebenszeit. Bei Patienten im Stadium IIIB/IV kann Cetuximab in der Erstlinienbehandlung zusätzlich zur platinbasierten Kombinationschemotherapie eingesetzt werden [7, 95].

In der IPASS-Studie (IRESSA **Pan-Asia Study**) [96] wurde bei 1.217 asiatischen Patienten mit Adenokarzinom und keinem oder begrenztem Nikotinkonsum in der Primärbehandlung der Stellenwert einer Therapie durch den EGF-Rezeptor Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib mit einer Chemotherapie (Carboplatin/Taxol) verglichen. Die Patientengruppe mit Gefitinib zeigte eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens. Bei nachgewiesener *EGFR*-Mutation zeigte die Therapie mit Gefitinib im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie eine signifikante Verbesserung der Remissionsrate wie auch des progressionsfreien Überlebens. Die Ergebnisse dieser Studie führten dazu, dass Gefitinib bei Patienten mit Nachweis einer *EGFR*-Mutation im Stadium IIIB/IV des NSCLC in allen Therapielinien zugelassen wurde.

Das objektive Ansprechen gemäß RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) beträgt bei Erlotinib (Tarceva®) für das Bronchialkarzinom 8,9 % [97].

Studien zufolge sprechen bei Adenokarzinomen mit *EGFR*-Mutation die Medikamente Gefitinib oder Erlotinib an, jedoch gibt es bisher keine Erfolge von Gefitinib oder Erlotinib bei Adenokarzinomen mit *KRAS*-Mutationen [92, 97-101].

Dem ERBB-Signalweg sind die GTPase-Proteine nachgeschaltet, was dem EGFR eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der *KRAS*-Gene gibt. Trotzdem werden *KRAS*-Mutationen nur selten zusammen mit *EGFR*- Mutationen in einem Tumor gefunden [92]. Die Behandlung mit EGFR-TKI bei Patienten mit *KRAS*-Gen-Mutationen spricht, im Gegensatz zu Patienten mit *EGFR*-Mutationen, schlecht an und führt zum Therapieversagen [57], sodass *KRAS*-Gen-Mutationen als Negativindikator bei der Therapie mit EGFR-TKI gelten [72, 92, 97-100]. Die Überexpression von AREG und des *Insulin-like growth factor-1 Receptors*, die zu einer Hemmung von BAX/KU70 und der Apoptose führt, kann durch gezieltes Eingreifen mit amphiregulin-directed small hairpin RNA in den PI3K/AKT-Signalweg wieder aufgehoben werden, und die induzierte Apoptose durch Gefitinib kann stattfinden [7, 99]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der ERBB3-Rezeptor-Tyrosinkinase eine Hemmung der MAP-Kinase (Mitogen-Activated Protein Kinase) zur Folge hat, was wiederum zu einer Hochregulation von ErBB führt und für die intrinsische Medikamentenresistenz verantwortlich ist. Mit einer Kombination aus EGFR und ERBB2 kann diese Inhibition aufgehoben werden [100]. Weitere Therapieansätze sind verschiedene Biomarker wie cMET, *hepatocyte growth factor receptor*, *HGFR*, (pY1003), die in in-vitro-Versuchen bei Patienten mit einer *KRAS*-Gen-Mutation ansprechen und als target-Therapie eingesetzt werden könnten [100]. Generell zeigte sich, dass das Ansprechen von monoklonalen Antikörpern beim Bronchialkarzinom weniger erfolgreich ist als der Einsatz von EGFR-TKI und daher in

Kombination mit Chemotherapeutika der dritten Generation gegeben wird [101-106]. Bei Behandlungen mit Cetuximab und Panitumumab an Patienten mit kolorektalem Karzinom und *KRAS* wurde ein ähnlich schlechtes Ansprechen der Behandlung mit monoklonalen Antikörpern festgestellt [100].

1.7 Prognose

Mit einer besseren Prognose verbunden sind Tumore der Klassen I-II und operable Tumore der Klasse III. Bei NSCLC-Patienten steht ein fortgeschrittenes Tumorstadium in direktem Zusammenhang mit einem kürzeren Überleben [23, 33, 104-105].

Tumore mit starker Entartung oder erhöhter Zell- und Kernpolymorphie neigen zu invasivem Wachstum und früher Metastasenbildung. Mit zunehmender Gefäßdichte im Tumor verschlechtert sich die Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf und die Überlebensdauer. Ohne die Versorgung durch Blutgefäße kann der Tumor jedoch eine Größe von 1 bis 2 mm³ nicht überschreiten [106-108].

Neben dem Diagnosestadium haben der histologische Tumortyp und die Mutation einen entschiedenen Einfluss auf die Prognose, die wiederum von Ethnie, Geschlecht und exogenen Faktoren, wie Rauchen und Umweltfaktoren, beeinflusst wird [105-109].

In Tabelle 1.4-5 ist die Fünf-Jahres-Überlebensrate bezogen auf das Tumorstadium und den histologischen Tumortyp dargestellt.

Tabelle 1.4

Einteilung der Tumorstadien nach UICC und der Fünf-Jahres Überlebensrate [104 - 106]

<i>Stadium</i>	<i>Fünf-Jahres-Überlebensrate in %</i>
IA	69-89
IB	52-75
IIA	45-52
IIB	33
IIIA	24-44

Tabelle 1.5

Fünf-Jahres-Überlebensrate bezogen auf die histologischen Lungentumore [108-109]

<i>Tumortyp</i>	<i>Frequenz in %</i>	<i>Fünf-Jahres- Überlebensrate in % (alle Stadien)</i>
Adenokarzinom	32	17
Plattenepithelkarzinom	29	15
Small Cell Lung Cancer	18	5
Large Cell Carcinoma	9	11

Ebenso zeigen die histologischen Subtypen einen prognostischen Einfluss: Lipide Adenokarzinome, wie die nichtinvasive, atypische adenomatöse Hyperplasie und das Adenocarcinoma in situ, haben ein 100-%iges Überleben, ihnen wird keine Marginalität zugeordnet. Auch das invasiv-muziöse Adenokarzinom hat mit einem Fünf-Jahres-Überleben von 88,5 % eine gute Prognose [1, 22].

Die am häufigsten vorkommenden somatischen Mutationen beim Lungenkrebs sind *KRAS*-Gen- und *EGFR*-Mutationen. Beide Mutationsarten kommen überwiegend bei Adenokarzinomen vor. *KRAS*-Gen-Mutationen finden sich häufiger bei männlichen Rauchern, *EGFR*-Mutationen dagegen häufiger bei Nichtrauchern, Frauen und Asiaten. Als Ethnie haben die Asiaten ein höheres Vorkommen von Adenokarzinomen als die Menschen in westlichen Industrieländern (Kaukasier) [12-13, 57, 75-76].

Die Prognose für *KRAS*-Gen-Mutationen ist signifikant schlechter [51, 64, 71, 76]. Patienten mit einer Mutation auf Codon 13 haben eine schlechtere Prognose als Patienten mit einer Mutation auf Codon 12 [110].

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

KRAS-Gen-Mutationen gehören zu den häufigsten Mutationen, die in Tumoren gefunden werden. Um eine individuelle Therapie zu ermöglichen, ist ihre Detektion wichtig [92, 99]. Bei der Tumorentstehung, die aus dem *RAS*-Protoonkogen ein *RAS*-Onkogen entstehen lässt, liegt eine gain of function Mutation vor und das mutierte Allel ist dominant gegenüber dem Wildtyp-Allel. Es kommt zur Fehlregulation innerhalb der Zelle und zum Tumorwachstum. Ein Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity – LOH) ist häufig mit anderen Onkogendefekten kombiniert, sodass dies auch für die *KRAS*-Gen-Mutation zutreffen kann [52, 77, 79]. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Häufigkeit der *KRAS*-Gen-Mutationen in den verschiedenen Lungenkarzinomen untersucht werden. Zusätzlich wurde die Analyse von Mikrosatelliten für eine LOH-Analyse herangezogen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Geräte

ABI Prism® 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, California, USA
BioDoc Analyze, Biometra GmbH, Göttingen, Germany
Bio Rad 3000xi Electrophoresis Power Supply, Lab Recyclers, Inc., Maryland, USA
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop products, Wilmington, USA
Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator, Life Technologies, Darmstadt, Germany
Tissue-Tek® Cryo3® Microtome/Cryostat, Sakura Finetek, Staufen, Germany
Thermomixer Compact, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Thermocycler Personal, Biometra GmbH, Göttingen, Germany
Zentrifuge 5415 D, Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Reagenzien

Aceton Emplura, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
Bromphenolblau (BPB), Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
dNTP (2,5 mM dNTP Mix), Invitrogen, Darmstadt, Germany
Eosin B, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
80 % Ethanol, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
96 % Ethanol, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
98 % Ethanol, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
100 % Ethanol, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml), Sigma-Aldrich, München, Germany
Eukitt®, Sigma-Aldrich, München, Germany
Forward- und Reverse Primer (5 pM/μl), Qiagen, Hilden, Germany
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Germany
GenScan Rox 500 Size Standard, Applied Biosystems, California, USA
Hi-Di-Formamid, Applied Biosystems, California, USA
Papanicolaous Lösung p. a., Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
Proteinkinase K, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
Salzsäure (HCl), 1 mol, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
SeaKem LE Agarose, Basel, Switzerland
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound, Sakura Finetek, Staufen, Germany

Water Molecular Biology Reagent, Sigma-Aldrich, München, Germany
Xylol, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany

Enzyme

AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Applied Biosystems, California, USA

Kits

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, California, USA
QIAamp DNA Mini Kits, Qiagen, Hilden, Germany
QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Germany
QIAamp UltraSens Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany

Puffer

AL-Buffer, Qiagen, Hilden, Germany
ATL-Buffer, Qiagen, Hilden, Germany
AW1, Qiagen, Hilden, Germany
AW2, Qiagen, Hilden, Germany
Buffer IV, BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Buffer PBI, Qiagen, Hilden, Germany
Buffer PE, Qiagen, Hilden, Germany
Loading Dye Solution, Fermentas, St. Leon-Rot, Germany
Tris-Acetate-EDTA-Puffer (TEA-Puffer), Merck Chemicals, Darmstadt, Germany
Tris-Borate-EDTA Puffer (TBE-Puffer), Merck Chemicals, Darmstadt, Germany

Verbrauchsmaterial

Sterile Einmalpinzetten, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Cutfix®-Skalpells, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
Objektträger Stärke ca. 1 mm, Lauda-Königshofen, Germany
Deckgläser Stärke No. 1, Lauda-Königshofen, Germany
Microplates 96, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml Eppendorf Safe-Lock Tube, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
ep Dualfilter T.I.P.S.®, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
epT.I.P.S. LoRetention, Eppendorf AG, Hamburg, Germany

3.2 Tumormaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden Bronchialkarzinome auf Loss of Heterozygosity (LOH) und Mutationen im *KRAS*-Gen untersucht. Die Gewebeproben aus der Tumorbank der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, aus den Jahren 1999 bis 2008, stammen aus einem Kollektiv von 300 Bronchialkarzinompatienten. Teile des intraoperativ entfernten Bronchialkarzinomgewebes wurden, nach vorheriger Patienteneinwilligung für Studienzwecke bei -80 °C tiefgekühlt und gelagert. Das Patientenkollektiv bestand aus 300 Patienten, denen 420 Gewebeproben operativ entnommen wurden.

3.3 Anfertigung von Kryogenschnitten

Um festzustellen, ob die Gewebeproben der Tumorbank Tumorzellen enthalten, also „tumor positiv“ sind und der Tumorgehalt ausreichend für eine DNA-Isolierung ist, wurden zunächst Kryogenschnitte angefertigt.

Durchführung

Das bei -80 °C gelagerte Bronchialkarzinomgewebe wird mit sterilen Pinzetten in kleine Plastikbehälter gegeben und mit Tissue-Tek eingebettet. Nach ausreichender Kühlung des Tissue-Tek auf -20 °C wird das Tumorgewebe mithilfe des Kryotoms geschnitten. Pro Gewebeprobe werden zwei Objektträger mit einer Gewebeschnittgröße von 6 µm angefertigt, beschriftet, bei -20 °C tiefgekühlt und gelagert.

3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Kryogewebeschnitte

Durchführung

Die gekühlten Gewebeschnitte werden 30 min. an der Luft getrocknet. Zur Fixation werden die Schnitte für 2 min. in Aceton gestellt und anschließend kurz mit Aqua dest. gespült. Die Zellkernfärbung erfolgt für 5-10 sec. in Papanicolaous. Daraufhin wird für 5-10 sec. mit HCL gespült und die Schnitte unter fließendem Wasser gebläut. Zur Neutralisation werden

die Schnitte kurz in Aqua dest. getaucht. Die Gegenfärbung des Plasmas erfolgt für 10 sec. in Eosin. Es folgt eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydration.

Tabelle 3.1

Aufsteigende Alkoholreihe

1 sec.	80 %	Ethanol
15-20 sec.	96 %	Ethanol
15-20 sec.	98 %	Ethanol
15-20 sec.	100 %	Ethanol
15-20 sec.	100 %	Ethanol

Anschließend werden die Schnitte zur Reinigung in Xylol gestellt, gesäubert und mit Eindeckgläsern und Eukitt fixiert.

3.5 Histologische Untersuchung

Die angefertigten Gewebeschnitte wurden zur Beurteilung in das Institut für Pathologie am UKE gegeben. Hier wurde das Gewebe auf größere entartete Zellverbände, die sich zur DNA-Isolierung eignen, untersucht und gekennzeichnet.

Von den 420 operativ entnommenen Gewebeproben der 300 Patienten zeigten 146 Proben einen Tumornachweis. In 274 Proben konnte kein ausreichendes Tumormaterial nachgewiesen werden. Ausreichend entartete Zellen, die sich zur DNA-Isolierung eignen, wurden an 40 Gewebeschnitten diagnostiziert.

3.6 Mikrodissektion der Gewebeschnitte

Durchführung

Zunächst werden Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 180 ml ATL-Puffer vorbereitet. Nach Vergleich mit den tumormarkierten HE-gefärbten Schnitten werden mit dem Kryotom etwa zehn Gewebeschnitte mit einer Größe von 30-40 μm angefertigt. Circa 25 mg des tumortragenden Gewebes werden mithilfe eines sterilen Skalpells vom OT abgelöst und in

das bereitstehenden 2,0 ml-Microcentrifuge-Tubes mit ATL-Puffer überführt. Durch die Mikrodisektion wird gewährleistet, dass die am Ende zu untersuchende Probe einen Tumorgehalt von mindestens 80 % aufweist.

3.7 Isolierung der Tumor-DNA

Durchführung

Der Thermomixer wird auf 56 °C Temperatur vorgeheizt. Zur Lyse der Gewebeschnitte werden 20 µl Proteinase-K zu den Tumorschnitten im ATL-Puffer gegeben. Die Inkubation im Thermomixer erfolgt so lange, bis sich das Gewebe gelöst hat. Zur Effizienzsteigerung werden die Proben in regelmäßigen Abständen durchmischt. Nach vollständiger Lyse werden die Proben gevortext, um das entstandene Kondensat an den Rändern und Verschlüssen der ERGs zu beseitigen. Im Anschluss werden 200 µl AL-Puffer dazugegeben, die Proben werden durchgemischt und bei 70 °C im Thermomixer für 10 min. inkubiert. Nach erneutem Vortexen werden 200 µl Ethanol (100 %) hinzugefügt und zentrifugiert. Die Proben werden auf Extraktionssäulen, QIAamp Spin Columns, übertragen, welche in 2ml-Auffang-ERGs gestellt werden. Die Proben werden 1 min. bei 8000 rpm zentrifugiert, die entstandenen Filtrate werden verworfen und die Säulen in neue 2ml-ERGs gestellt. Die zu isolierende DNA bleibt an der Silicagel-Membran der Spin Columns gebunden und wird in den folgenden zwei Schritten mit je 500 µl AW1-Puffer und AW2-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wird zentrifugiert: 8000 rpm 1 min. (AW1-Puffer) bzw. 14000 rpm 3 min. (AW2-Puffer). Die ERGs werden ausgetauscht und der Überstand wird verworfen. Zuletzt werden die Spin Columns ohne Zugabe von Flüssigkeit bei 10000 rpm 1 min. zentrifugiert.

Die anschließende Elution erfolgt in zwei Schritten mit jeweils 50 µl H₂O in 1,5-ml-ERGs. Nach Auftragen des Wassers erfolgt eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur, um ein Lösen der DNA in den Säulen zu ermöglichen, bevor die Proben für 1 min. bei 8000 rpm zentrifugiert werden. Die isolierte DNA liegt nun in 100 µl H₂O vor.

3.8 Konzentrationsbestimmung der DNA (Verfahren I)

Durchführung

Bei der photometrischen Bestimmung werden 1-2 µl der DNA-Lösung in das NanoDrop®-Spektrophotometer gegeben. Zwischen unterem und oberem Säulenfuß entsteht eine

Flüssigkeitssäule, durch welche ein Lichtstrahl mit einer Wellenlänge von 260 nm geleitet wird. Als Referenzwert dienen 1-2 µl reines H₂O, mit welchem das Gerät vorher geeicht worden ist. Die Reinheit der gemessenen DNA wird durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260/280 nm definiert. Eine hohe Reinheit liegt bei einem Quotienten von (OD_{260}/OD_{280}) 1,8-2,0 vor. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, bei 280 nm (OD_{280}). $OD_{280} = 1$ entspricht 50 µg/mL doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der OD_{260} zur OD_{280} zeigt an, wie stark eine DNA-Lösung verunreinigt ist. Ein Verschleppen verschiedener organischer Stoffe, wie Isolationspuffer oder Ethanol, wird durch ein Verhältnis < 2 der Extinktionen bei 260/230 nm festgestellt.

3.9 Isolierung der Referenz-DNA aus EDTA-Blut

Durchführung

Zur Isolierung der Referenz-DNA werden nach Angaben des Herstellers (QIAamp UltraSens Kit) 200 µl EDTA-Blut mit Proteinase-K und dem Lysis Buffer AL vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min. bei 56 °C im Thermomixer werden 200 µl Ethanol hinzugefügt. Durch anschließendes Zentrifugieren wird aus den lysierten Lymphozyten die in ihnen befindliche DNA frei. Die DNA bindet an die Silicagel-Membran und wird in zwei weiteren Waschschritten mit AW1 und AW2 von restlicher Kontamination befreit und schließlich nach kurzer Inkubation mit 200 µl Aqua dest. in ein 1,5-ml-Eppendorf-Tube eluiert.

3.10 Mikrosatellitenanalyse

Durch den systematischen Vergleich von Tumorgewebe und Blut wird mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern untersucht, ob ein Allelverlust im Tumor vorliegt. Um dies zu beurteilen, muss für den entsprechenden Mikrosatellitenmarker in DNA aus Leukozyten eine Heterozygotie vorliegen. Liegt ein Allelverlust im Tumor vor, ist nur noch eins der beiden Allele im Tumor nachweisbar bzw. kommt es zu einer deutlichen Verringerung der Intensität des entsprechenden PCR-Produktes, da im Tumorgewebe meist auch noch gesundes Stomagewebe enthalten ist. Gemessen wird dies anhand eines LOH-Quotienten. Besteht bereits eine Homozygotie für den untersuchten Mikrosatellitenmarker in Blut-DNA, so ist dieser Marker nicht informativ.

Die untersuchten Mikrosatelliten liegen über den kurzen Arm des Chromosoms 12 verteilt

und umfassen das *KRAS*-Gen in Position 12p12.1. Sie wurden auf Grund der Publikation von Li et al [79] ausgewählt.

In Tabelle 3.2 sind die in der Tumoruntersuchung verwendeten Mikrosatellitenprimer aufgelistet [79].

Tabelle 3.2

Verwendete Mikrosatellitenprimer in der Versuchsanordnung

<i>Mikrosatelliten</i>	<i>Primersequenz</i>	<i>Länge (bp)</i>
<i>D12S89</i>	D12S89-F:5' - ATTTGAGAGCAGCGTGT TTT -3' D12S89-R:5' - CCATTATGGGGAGTAGGGGT -3'	254-288
<i>D12S358</i>	D12S358-F:5' - GCCTTTGGGAAACTTTGG -3' D12S358-R:5' -TAAGCCCTTTTATTTTTCCTAAC-3'	238-270
<i>D12S310</i>	D12S310-F:5' - GAAAACTAATTGCCCCTTAC -3' D12S310-R:5' - TTTAGATTCTCCAAATGCC -3'	243-253
<i>D12S1606</i>	D12S1606-F:5' - ATGAGAGGCCAAATTAAAG -3' D12S1606-R:5' - CTACTGTTGTGT CAGGGTCA -3'	271-279
<i>D12S1596</i>	D12S1596-F:5' - TCATGTGGCTGGTAGAGAAG -3' D12S1596-R:5' - CGTGAAGCAGATTTATCGTG -3'	271-279
<i>D12S1617</i>	D12S1617-F:5' - AGCCTGAGGGGCCACAT -3' D12S1617-R:5' - TGGGCAACTTGGATAAGAAACA -3'	271-279
<i>D12S1592</i>	D12S1592-F:5' - GCTGAGTGTGGTGGCAC -3' D12S1592-R:5' - GAGACTATTCCAACAGTGTATTTTC -3'	238-280
<i>G 60541</i>	G60541-F:5' - CCACATCCTGTGTCTGGAATGTA-3'	245-326

Abbildung 3.1 zeigt ein Ideogramm des Chromosoms 12 sowie die Lokalisation von *KRAS* und den verwendeten Mikrosatelliten.

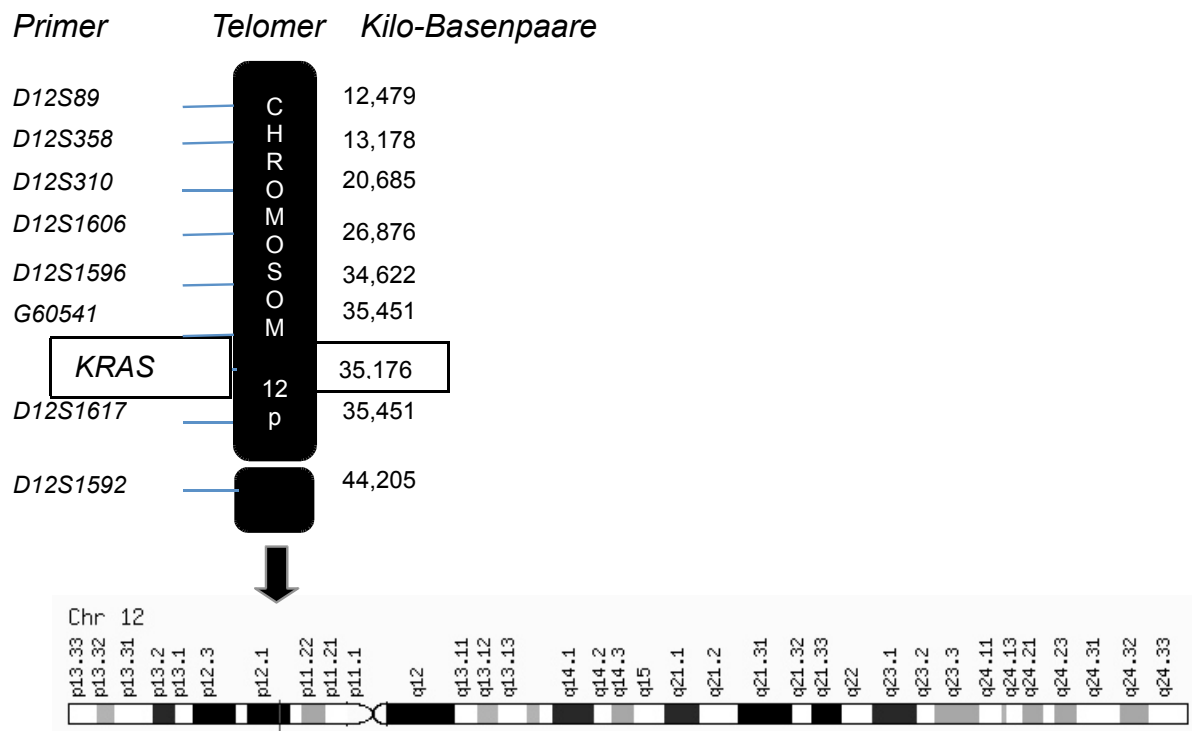


Abbildung 3.1

Chromosom 12. Der Pfeil markiert den Bereich des *KRAS*-Gens. Vergrößert dargestellt ist der Bereich um das *KRAS*-Gen mit der jeweiligen Lokalisation der Mikrosatellitenmarker [111]

Durchführung

Amplifikation der Mikrosatelliten aus der Tumor-DNA mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction.

Für jeden Mikrosatelliten wird in einem 2,0-ml-Eppendorf-Tube ein „Mastermix“ hergestellt, der auf die Anzahl der Proben multipliziert wird.

Gemäß des Protokolls werden Aqua dest., Puffer, dNTPs, forward- und reverse-Primer (5-pM/μl) und Taq Gold Polymerase zusammengegeben, so dass ein PCR-Ansatz für 8,0 μl je Tube einer 96-Well-Platte vorhanden ist. Zu einer Hälfte des Ansatzes kommen 2,0 μl isolierte Tumor-DNA, zu der anderen Hälfte des Ansatzes gesunde Referenz-DNA desselben Patienten. Die Ansätze laufen über vierzig PCR-Zyklen im Thermocycler. Jeder Zyklus besteht aus Denaturierung, Annealing und Extension.

Das Programm startet mit einer Erwärmungsphase auf 94 °C. Bei dieser Temperatur denaturiert die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge. Es folgt das Annealing (Anlagerung) der Mikrosatellitenprimer, welches bei 55 °C für die Marker *D12S1596*, *D12S1617*, *D1S1592*, *D12S358*, *D12S310*, *G60541* und bei 57 °C für die Marker *D12S1606*, *D12S89* stattfindet. Die anschließende Anlagerung findet üblicherweise zwischen 46 und 65 °C statt und ist abhängig von der Länge und der Basensequenz des Primers. Die

Temperaturunterschiede machen so eine hochspezifische Anlagerung des Primers möglich. Jeder forward- und reverse-Primer bindet an seinen Komplementärstrang, wodurch die genaue Anfangs- und Endsequenz festgelegt wird. Als letzten Schritt vervollständigt die Taq Polymerase bei 72 °C mit einer Minute Laufzeit die DNA-Stränge, beginnend am 3'-Ende. Dabei werden komplementäre Nukleotide (dNTPs), die sich in der Lösung befinden, aneinandergesetzt, so dass ein Doppelstrang entsteht. Am 5'-Polynukleotid sind die Primer mit Fluoreszenzfarbstoff markiert und enthalten: Fluorescein/Carboxyfluorescein, Rhodamin/6-Carboxytetramethylrhodamin und HEX.

Die Konzentration der Amplifikate steigt exponentiell nach der Gleichung: $(2^n - 2n) \cdot x$: n steht für die Anzahl der Vermehrungszyklen, 2n für Produkte des ersten und zweiten Vermehrungszyklus, deren Länge nicht definiert ist, und x für die Anzahl der ursprünglichen DNA-Matrizen. Theoretisch lässt sich mit dieser Technik genetisches Material unendlich amplifizieren, praktisch wird aber nie eine hundertprozentige Ausbeute erreicht [56].

3.11 Loss of Heterozygosity

In den menschlichen Zellen liegt ein diploider Chromosomensatz vor, mit je einer Kopie des Genoms von Mutter und Vater. Daraus ergibt sich, dass für die autosomalen Gene zwei Allele vorliegen, ein mütterliches und ein väterliches Allel, z. B. wie bei Mikrosatelliten hinsichtlich ihrer Länge, so spricht man von Heterozygotie. Sind die beiden Allele gleich lang, bezeichnet man sie als homozygot. Geht durch eine Mutation ein Allel verloren, spricht man von einem Verlust der Heterozygotie (*Loss of Heterozygosity* = LOH).

Durchführung

Die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten und amplifizierten Mikrosatellitenbereiche werden mittels Kapillarelektrophorese dargestellt.

Für die elektrophoretische Auftrennung muss die DNA als Einzelstrang vorliegen. Hierzu werden 0,5 µl der amplifizierten DNA in einer 96-Well-Platte mit 40 µl HiDi Formamid und 0,2 µl Rox500-Längenstandard zusammengefügt. Die Well-Platte kommt für 10 min. in den Thermocycler und wird auf 94 °C erhitzt. Das Formamid denaturiert die DNA, indem es verhindert, dass sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen ausbilden, nachdem diese in zwei Einzelstränge zerfallen sind. Rox500-Standard ist ein interner Längenstandard, der aus DNA-Fragmenten bekannter Größe besteht und als Referenz für die Analyse am ABI Prism310c dient. Zur Analyse kommen die Proben in ein 96-„slot-Tray“ des ABI Prism310c-Gerätes und werden gemäß der 310 GeneScan Analysis

Software analysiert [56].

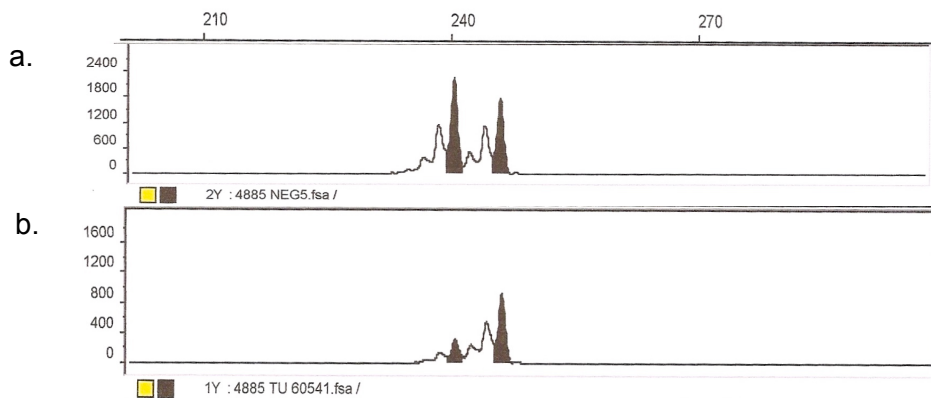
Das ABI Prism310c beruht auf dem Funktionsprinzip der Gelelektrophorese, bei welcher geladene Moleküle unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Beim Anlegen einer Spannung wandert die durch ihre Phosphatreste negativ geladene DNA in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Größe der DNA-Fragmente wird im Vergleich zu einem Marker bekannter Fragmentgröße festgestellt.

Das ABI Prism310c ist mit einem Computer verbunden, auf welchem die Steuerungs- und Analysesoftware vorhanden ist. Über den Computer lassen sich die für die Analyse wichtigen Parameter einstellen: Injektionszeit der Kapillare (3 sec.), Temperatur der Heizplatte (60°C), Längenstandard (Rox500), Laufzeit eines Analysevorgangs (17 min.) und verwendetes Gelpolymer (POP 4). Die Elektrode liefert die benötigte Spannung (ca. 15 kV). Die Kapillare steht während des gesamten Vorgangs mit einem Ende im Elektrophoresepolymer, 4 % Dimethylpolyacrylamid (POP 4). Das Probenmaterial wird zur Analyse über das andere Ende der Kapillare aufgenommen. Der verwendete Puffer enthält 100 mM Taps, 1 mM EDTA und hat einen pH-Wert von 8.0. Die DNA-Fragmente werden elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und passieren einen Laser, der Lichtwellen bestimmter Wellenlänge (488 nm, 514 nm) emittiert. Treffen die Lichtwellen auf die in den DNA-Fragmenten eingebauten Farbstoffe (Fluophore), werden diese zur Fluoreszenz angeregt und beginnen Licht anderer Wellenlänge zu emittieren. Eine CCD-Kamera erfasst die Wellenlängenveränderungen und wandelt sie in ein elektronisches Signal um. Die Intensität des Signals wird in der Ausschlagshöhe abgebildet. Mit der entsprechenden Computer-Software (GeneScan, Applied Biosystems) können die Signale grafisch dargestellt und ausgewertet werden.

Die erwartete Länge der Fragmente kann aus der UniSTS database des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen werden.

Jeder Peak repräsentiert ein Allel des analysierten Genortes. Homozygote Allele haben nur einen Peak, heterozygote zwei. Die Höhe der Peaks wird beim Auftreten zweier Allele unterschiedlicher Länge ins Verhältnis gesetzt. Ein Allelverlust ist gegeben, wenn der LOH-Quotient ≤ 0.5 oder ≥ 1.5 beträgt. Liegt eine Homozygotie vor, kann keine Aussage über ein LOH getroffen werden [56].

Abbildung 3.2 zeigt einen *Loss of Heterozygosity* für den Mikrosatellitenmarker *D12S89*.



Sample	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
2Y, 4	17.70	240.51	2426	19991	4826
2Y, 7	17.88	246.37	1911	15290	4874
1Y, 3	17.72	240.46	348	3371	4833
1Y, 6	17.90	246.31	1003	8331	4881

Abbildung 3.2

Grafische Darstellung der kapillarelektrophoretischen Auftrennung des Markers *D12S89*:

- Die gesunde Vergleichsprobe (Blut) zeigt die zwei schwarzmarkierten Peaks als Ausdruck der unterschiedlichen Allele, eine Heterozygotie liegt vor.
- Die Tumorprobe zeigt im Vergleich zu der Blutprobe einen sehr kleinen Peak bei 240 bp, hier liegt ein LOH vor.

3.12 Amplifikation der Tumor-DNA

Durchführung

Der Mastermix wird mit der Anzahl der Proben für die PCR multipliziert und angesetzt.

In ein 2,0 ml Eppendorf-Tube werden 10 µl Buffer IV, 8 µl dNTP's, je 2 µl forward und reverse Primer, 0,5 µl Tag Polymerase und 2 µl der zu amplifizierenden Tumor-DNA zusammengefügt. Der Mastermix wird mit 74,5 µl Aqua dest. aufgefüllt, so dass ein Endvolumen von 100 µl besteht. Im Thermocycler läuft der Ansatz über 55 PCR-Zyklen (s. o.). Nach Beendigung der Zyklen werden im Thermocycler mit dem Programm Restriktase die amplifizierten DNA-Fragmente im Bereich des *KRAS*-Gens geschnitten, um die sich anschließende Sequenzierung zu gewährleisten.

3.13 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese kann nach dem beschriebenen Prinzip ebenso in einem horizontalen Agarosegel erfolgen. Dabei wirken die Poren des Gels, deren Größe durch die Agarosekonzentration bestimmt ist, wie ein Netz, durch das die Fragmente passieren müssen. Dabei gelangen kleinere Fragmente schneller als große durch die Poren und legen so pro Zeiteinheit eine größere Strecke zurück. Sichtbar gemacht wird die DNA durch Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiniumbromid). Ethidiumbromid ist eine DNA-bindende Substanz, die zwischen die Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls interkaliert und unter UV-Bestrahlung fluoresziert.

Durchführung

Zunächst wird der TAE-Elektrophoresepuffer hergestellt. Um ein zweiprozentiges Agarosegel zu erhalten, werden 3 mg Agarose abgewogen und mit 150 ml 1x TAE-Puffer vermischt. Das Ganze wird in der Mikrowelle kurz aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat und keine Schlieren sichtbar sind. Nach kurzem Abkühlen werden 8 ml Ethidiumbromid (1 %, 10 mg/ml) in die flüssige Agarose gegeben und in die Elektrophoresekammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Sobald das Agarosegel fest geworden ist, wird es vollständig mit Elektrophoresepuffer (100 ml 1x TAE-Puffer) übergossen. In die beiden äußeren Geltaschen werden je 8 µl der Kontroll-DNA K562 pipettiert, in die inneren Kammern je 8 µl des PCR-Produktes. Die Kammer wird mit etwa 100 V in ein elektrisches Feld versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt so lange, bis sich der Farbmarker des Auftragspuffers am Ende des Gels befindet. Abschließend werden die PCR-Produkte mit dem eingelagerten Ethidiumbromid in einem Transilluminator unter UV-Bestrahlung (360 nm) sichtbar gemacht, mit einer Kamera aufgenommen und ausgewertet.

3.14 Aufreinigung der amplifizierten DNA

Das PCR-Produkt wird mithilfe des QIAquick PCR Aufreinigungskits (Qiagen) gereinigt und so von nicht verwendeten dNTPs, Primern, Enzymen und Salzen der PCR-Reaktion befreit. Die Reinigung erfolgt aufgrund der selektiven Bindungseigenschaften einer Siliziummembran, welche bei einem pH-Wert $\leq 7,5$ und hoher Salzkonzentration Nukleinsäuren reversibel bindet, während andere Bestandteile die Membran passieren können. Verändern sich der pH-Wert (pH 7,0-8,5) und die Salzkonzentration, löst sich die an der Membran gebundene DNA [56].

Durchführung

Zu Beginn wird das PCR-Produkt mit dem fünffachen Volumen an PBI-Puffer versetzt und gut durchmischt. Der PBI-Puffer enthält die für die Bindung notwendigen chaotropen Salze in hoher Konzentration, einen pH-Wert von $\leq 7,5$ sowie einen pH-Indikator. Der pH-Wert liegt im optimalen Bereich, wenn sich die Lösung gelb färbt. Anschließend wird die Lösung auf eine Reinigungssäule in einem 2-ml-Auffanggefäß übertragen und für 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert, wobei die DNA an die Siliziummembran bindet. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule wieder auf dem Auffanggefäß platziert. Es folgt ein Waschschrift mit 750 μ l PE-Puffer, bei dem vor allem die Salze entfernt werden. Es wird erneut für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss wieder verworfen und noch einmal für 1 min. zentrifugiert, um sicherzugehen, dass kein PE-Puffer in der Säule zurückbleibt. Dann wird die Säule in ein neues ERG gestellt und 30 μ l H₂O auf die Mitte der Säule pipettiert. Es wird 5-10 min. bei RT inkubiert, um ein Lösen der DNA von der Membran zu ermöglichen. Zuletzt wird noch einmal für 1 min. zentrifugiert. Das PCR-Produkt liegt nun aufgereinigt in H₂O vor und kann auf seine Konzentration überprüft werden [56].

3.15 Konzentrationsbestimmung der DNA (Verfahren II)

Durchführung

Auf das vorbereitete Agarosegel wird das PCR-Produkt und zur Kontrolle die Ladder-DNA aufgetragen. Mit einem Transilluminator wird unter UV-Bestrahlung (360 nm) das fluoreszierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht und mit einer Kamera festgehalten. Die Intensität der Fluoreszenz gibt Aufschluss über die Menge der vorhandenen DNA (siehe hierzu auch 3.13).

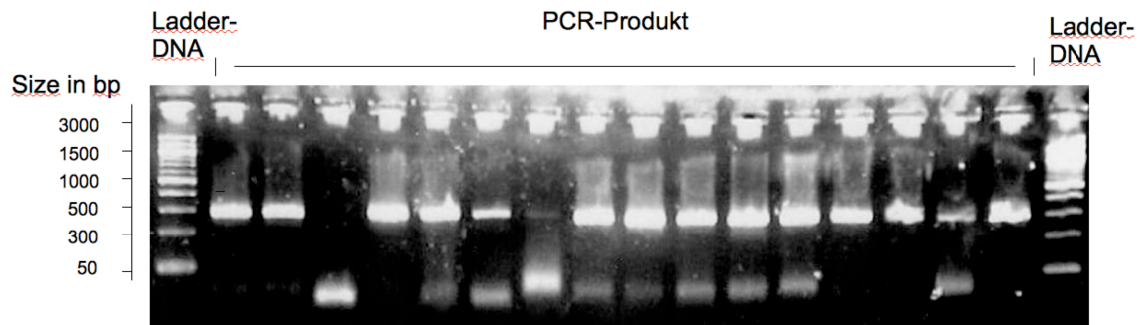


Abbildung 3.3

Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte im Agarosegel, dargestellt mit den fluoreszierenden DNA-Banden. Die seitlichen Banden zeigen die Ladder-DNA als Referenz.

3.16 Cycle Sequencing Reaction

Um eine Mutation im *KRAS*-Gen nachzuweisen, wird das PCR-Produkt nach dem Sanger-Verfahren sequenziert (*Sanger et al., 1977*), welches auf der enzymatisch katalysierten Synthese von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten beruht. Es wird mit einem Primer gearbeitet, der nur einen DNA-Strang synthetisiert, daher ist die Ausbeute nicht exponentiell. Nach dem Zufallsprinzip wird entweder ein Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) oder ein fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP) von der DNA-Polymerase eingebaut.

Tabelle 3.3

Verwendeter Primer [112]

Primer *KRAS* 1/4 FS:5' -TATCGGTCGTCGACTCAGAGTAGATTCG - 3'

Durchführung

Die Cycle Sequencing Reaction (CSR) erfolgt nach dem BigDye®-Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits-Protokoll. Zunächst wird unter ständiger Kühlung ein Mastermix pro Primer hergestellt und in eine Well-Platte vorgelegt. Abhängig von der zuvor ermittelten DNA-

Konzentration (siehe 3.13) wird, um ein definiertes Konzentrations- und Endvolumen zu erhalten, entsprechend Aqua dest. und DNA zugegeben. Der Primer Kras 1/4 liegt vor den zu sequenzierenden Codons 12 und 13 des *KRAS*-Gens. Das errechnete Volumen von PCR-Produkt und Aqua dest. beträgt 11,4 µl. Diesem werden 4 µl PBI Buffer, 4 µl Reaction Mix (dNTP's + ddNTP's) und 0,6 µl des Primer KRAS 1/4 FS zugefügt, so dass ein Endvolumen von 20 µl entsteht. Im Thermocycler wird dieser Ansatz mit dem Programm "Sequenzierung" amplifiziert. Beginnend mit der Denaturierung bei 96°C für 10 Sekunden, dem Annealing bei 50°C für 5 Sekunden und der Elongation bei 60°C für 4 Minuten, erfolgt dies in sechzig Zyklen mit anschließender Kühlung auf 4 °C [113].

3.17 Aufreinigung der DNA mittels DyeEx Spin Kit

Nach der Cycle Sequencing Reaction werden die Proben mithilfe des Dye Ex 2.0 Spin Kit gereinigt und von nicht verwendeten Nukleotiden befreit.

Durchführung

Die DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge werden dazu auf das Gelharz der DyeEx Spin Columns aufgegeben und für 3 min. bei 2700 rpm zentrifugiert. Die Reinigung verläuft über eine Chromatographiesäule, die große Moleküle (DNA) durchwandern können, kleine (Nukleotide) dagegen nicht. Die gelöste DNA bleibt im Eluat, der überschüssige BigDye-Anteil in den Poren des Spin Columns zurück. Die gereinigte DNA wird unter Lichtschutz an der Luft getrocknet [113].

3.18 Auftrennung und Analyse der bei der Didesoxymethode nach Sanger entstehenden DNA-Fragmente

Die Sequenzierung ermöglicht es, eine genaue Basenabfolge zu bestimmen. Dabei werden verschieden lange fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Die DNA-Fragmente sind an ihrem 3'-Ende mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Didesoxynukleotid terminiert. Die Sequenz wird durch die unterschiedlichen

Fluoreszenzfarbstoffe der Basen rekonstruiert; je nach endständigem Didesoxynukleotid emittieren die Fragmente verschiedene Wellenlängen und können zugeordnet werden. Mithilfe der Computersoftware BioEdit 7.0.5.3 werden die Daten grafisch dargestellt und ausgewertet (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Abbildung 3.4 zeigt die Basenabfolge des *KRAS*-Gens. Abbildung 3.5 stellt die Basensequenz der untersuchten DNA dar.

Durchführung

Das CSR-Produkt wird nach einer zwei minütigen Denaturierung bei 95 °C in eine elektrokinetische Injektion versetzt. Dabei wird eine Kathode neben der sich im Probengefäß befindenden Kapillare platziert und für 18 sec. unter Spannung gesetzt. In der Folge kommt es zu einer erhöhten Ionenkonzentration im Bereich der Kapillare (Anode). Durch den Austausch des Probengefäßes durch einen Elektrophoresepuffer und erneuter Spannungszugabe kommt es innerhalb der Kapillare zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente. Am Ende der Kapillare befindet sich ein Argon-Ionen-Laser, der die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente zur Emission anregt. Eine CCD-Kamera erfasst die Signale [113].

```

... gtact ggtggagtat ttgatagtgt attaacctta
tgtgtgacat gttctaatat agtcacattt tcattatttt tattataagg cctgctgaaa
ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA GCT GGT GGC GTA GGC
AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG CTA ATT CAG AAT CAT TTT GTG GAC
GAA TAT GAT CCA ACA ATA GAG
gtaaatcttg ttttaatatg catattactg gtgcaggacc attctttgatt acagataaag
gtttctctga ccattttcat gagt...
1/1 R

```

Abbildung 3.4

Ausschnitt einer Basenabfolge des sequenzierten *KRAS*-Gens, 289 bp. Markiert sind Codon 12 (GGT) und Codon 13 (GGC), 90 % der Mutationen treten in diesem Bereich auf.

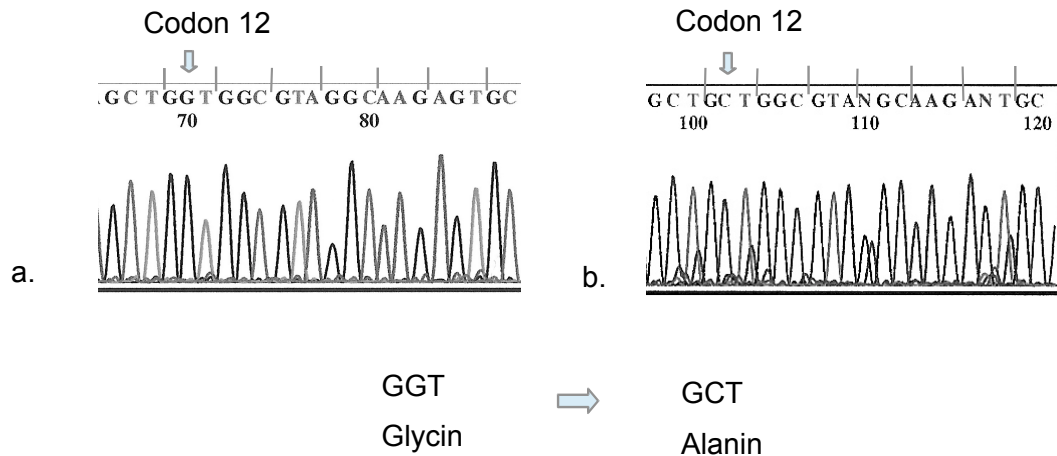


Abbildung 3.5

Dargestellt ist ein sequenzierter und mit der Computersoftware BioEdit 7.0.5.3 ausgewerteter Abschnitt des *KRAS*-Gens.

- a) Sequenz des *KRAS*-Gens aus Blut-DNA. Der Pfeil markiert das Codon 12 mit der Basenabfolge GGT, die für die Aminosäure Glycin codiert
- b) Sequenz des *KRAS*-Gens aus Tumor-DNA. Der Pfeil markiert das Codon 12, in welchem eine G-nach-C Transversion stattgefunden hat. Anstelle von Glycin wird die Aminosäure Alanin codiert.

3.19 Klinische Daten

Geschlecht, Alter, Operationsdatum und histopathologische Daten wurden aus den Krankenakten der Patienten, von denen die Proben stammen, entnommen und mit den Follow-up-Daten ergänzt.

3.20 Statistische Analyse

Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, Tumortyp und Staging, LOH-Vorkommen, *KRAS*- und *EGFR*-Mutation sowie der Therapieverlauf wurden in Excel-Tabellen zusammengefasst und durch deskriptive Statistik und Survivalanalyse mit Kaplan-Meier-Kurven ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika und klinische Daten

Von den insgesamt 300 chirurgisch resezierten Bronchialkarzinomen, die in diese Studie eingeschlossen wurden, kamen nach Anfertigung von Kryogewebeschnitten 40 Tumorgewebeproben für die weitere DNA-Isolierung in Betracht. Alle anderen Tumorproben konnten wegen des zu geringen Tumor-DNA-Gehaltes nicht verwendet werden. Fünfzehn Patienten aus dem Kollektiv hatten ein Plattenepithelkarzinom, 17 ein Adenokarzinom. Bei 5 Patienten wurde ein Large Cell Lung Cancer diagnostiziert, bei weiteren 3 Patienten ein Small Cell Lung Cancer.

In Tabelle 4.1 sind die Patientencharakteristika sowie die klinischen Daten zum Diagnosezeitpunkt dargestellt.

Tabelle 4.1

Patientencharakteristika und klinische Daten

	Patientenzahl (%)	Median (Bereich)
Geschlecht		
männlich/weiblich	22/18 (55/45)	
Alter (Jahre)		67 (70)
Tumorentität		
PEC	15 (37)	
AC	17 (43)	
LCLC	5 (13)	
SCLC	3 (8)	
smoker/non-smoker/u.k. 22/ 3/15 (55/8/37)		

Tumorgröße, Lymphknotenbefall, vorhandene Metastasen und Differenzierung der unterschiedlichen Tumorentitäten zum Diagnosezeitpunkt sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Fünfzehn Prozent (6) der Patienten zeigen außerdem weitere Tumore, die nicht als Metastase des Bronchialkarzinoms identifiziert wurden, sondern unabhängig davon entstanden waren. Bei zwei weiteren Patienten sind außerdem Bronchialkarzinome in der nächsten Verwandtschaft bekannt.

Tabelle 4.2

Tumorcharakteristika

	Tumorentität			
	PEC (%)	AC (%)	LCLC (%)	SCLC (%)
Tumorgroße				
T1	2 (13)	4 (24)	1 (20)	-
T2	6 (40)	7 (40)	3 (60)	1 (33)
T3	3 (20)	2 (12)	1 (20)	2 (66)
T4	4 (27)	4 (24)	-	-
Lymphknotenbefall				
N0	4 (27)	4 (24)	3 (60)	2 (66)
N1	5 (33)	3 (18)	1 (20)	1 (33)
N2	6 (40)	10 (58)	1 (20)	-
Metastasen				
M1	10	10	5	-
Differenzierung				
D I	-	-	-	1 (33)
D II	10 (66)	6 (36)	1 (20)	2 (66)
D III	5 (33)	10 (58)	4 (80)	-
D IV	-	1 (6)	-	-

Ein Rezidiv trat bei 35 % der Patienten auf. Dabei betrug die Zeit bis zum Rezidiv im Mittel 16,5 Monate (Median 11). Tabelle 4.3 zeigt das Auftreten eines Rezidivs bei den verschiedenen Tumorentitäten.

Tabelle 4.3

Rezidivfrequenz und Mortalität

	Tumorentität			
	PEC	AC	LCLC	SCLC
Rezidiv	6	6	2	-
Monate zum Rezidiv	18,8	12,8	9,5	-
(Median)	(15)	(3)	(9,5)	
Mortalität	12	9	5	0
Monate bis zum	28,8	16	21	-
Exitus (Median)	(26,3)	(4)	(13,5)	

4.2 Mikrosatellitenanalyse

Die acht verwendeten Mikrosatellitenprimer liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 und umfassen das *KRAS*-Gen in 12p12.1. (Abbildung 3.1).

Die PCR-Produkte der untersuchten Mikrosatelliten wurden bei 40 Bronchialkarzinompatienten auf *Loss of Heterozygosity* (LOH) untersucht. Ein definierter LOH-Score wurde durch die Addition aller registrierten LOH der acht Mikrosatellitenmarker berechnet. Demnach wurde festgelegt, dass ein LOH als erwiesen gilt (positiver LOH-Score), wenn drei oder mehr positive Ergebnisse verzeichnet wurden. Als negativer LOH-Score wurden Ergebnisse gewertet, die nach mindestens zwei Untersuchungen kein LOH aufwiesen (3.11 *Loss of Heterozygosity*) [114].

Von den 40 Bronchialkarzinompatienten standen jeweils die gewonnene Tumor-DNA sowie die gesunde Referenz-DNA zu Untersuchungszwecken zur Verfügung.

Insgesamt wies die Hälfte der Patienten (50 %) Untersuchungsergebnisse mit mindestens drei LOH auf und hatte demnach einen positiven LOH-Score. Die klinischen Daten sowie die Patientencharakteristika sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4

Patientencharakteristika und klinische Daten

	Patientenzahl (%)	Median (Bereich)
LOH	20 (50)	
Geschlecht	14/6	
männlich/weiblich		
Alter (Jahre)		64 (37-79)
Tumorentität		
PEC	6 (30)	
AC	9 (45)	
LCLC	3 (15)	
SCLC	2 (10)	
smoker/non-smoker/u.k.	13 /1/6	
	(65/5/30)	
KRAS-Gen-Mutation	8 (20)	

Die pathohistologischen Befunde und das Tumor-Staging für die LOH-Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 wiedergegeben.

Tabelle 4.5

Pathohistologische Ergebnisse bei 20 LOH-positiv-Patienten

	Tumorentität			
	PEC (%)	AC (%)	LCLC (%)	SCLC (%)
Tumorgroße				
T1	1 (16)	2 (22)	1 (25)	-
T2	2 (33)	2 (22)	1 (50)	1 (50)
T3	2 (33)	2 (22)	1 (25)	1 (50)
T4	1 (16)	3 (33)	-	-
Lymphknotenbefall				
N0	1 (16)	2 (22)	2 (66)	1 (50)
N1	2 (33)	6 (66)	1 (33)	1 (50)
N2	3 (50)	1 (11)	-	-
Metastasen				
M1	5 (83)	7 (77)	2 (66)	-
Differenzierung				
D I	-	-	-	1 (50)
D II	5 (83)	3 (33)	1 (33)	1 (50)
D III	1 (16)	5 (55)	2 (66)	-
D IV	-	1 (11)	-	-
Rezidiv	3 (50)	4 (44)	1 (33)	-
Monate zum Rezidiv	21,6	7,7 (2,5)	11	
(Median)	(19)		(11)	
Mortalität	5 (83)	6 (66)	3 (100)	-
Monate bis zum	19,8	23	23,0	
Exitus	(20,8)	(9,2)	(13,5)	
(Median)				

Die Tumorgroße lag für T1 bei 20 %, T2, T3 bei 30 % und T4 bei 20 %. Keinen Befall der Lymphknoten zeigten 30 % der Patienten, einen ipsilateralen Befall 50 %. Kontralateral befallene Lymphknoten waren bei 20 % der Patienten nachweisbar. Siebzig Prozent hatten eine Metastase. Der überwiegende Anteil wies ein Grading II (50 %) oder III (40 %) auf. Ein Rezidiv trat bei 50 % der Patienten auf. Die Monate bis zum Rezidiv lagen im Mittel bei 14,6 (Median 11). Zwei Patienten hatten Tumore anderer Herkunft. Insgesamt rauchten sechs Männer (46 %) und fünf Frauen (83 %). Die Ergebnisse der LOH-Analyse sind in Tabelle 4.6 aufgezeigt.

Tabelle 4.6

LOH-Frequenz auf Chromosom 12 beim Br-Ca, gezeigt an den verschiedenen Tumorentitäten

LOH Primer	LOH- Frequenz (%)			
	PEC	AC	LCLC	SCLC
<i>D12S89</i>	1	2	1	-
<i>D12S358</i>	3	3	2	2
<i>D12S310</i>	-	3	1	1
<i>D12S1606</i>	2	2	-	1
<i>D12S1596</i>	1	3	3	-
<i>D12S1617</i>	3	4	2	-
<i>D12S1592</i>	2	1	-	-
<i>G60541</i>	2	5	1	-

Von den 15 Plattenepithelkarzinomen hatten 7 Patienten (40 %) ein LOH. Dabei traten unter Verwendung acht verschiedener LOH-Primer 14 LOH auf. Die höchste Frequenz, drei Patienten (20 %), hatten die Primer *D12S1617* und *D12S358*. Je zwei LOH befanden sich in den Primern *D12S1592*, *D12S1606* und *G60541*. Der Primer *D12S310* zeigte kein LOH.

Über 50 % der Patienten, die ein Adenokarzinom hatten, zeigten bei der Mikrosatellitenanalyse ein LOH. Insgesamt traten 23 LOH auf. Hier lag die höchste Frequenz mit fünf Patienten bei dem Primer *G60541*, vier Patienten hatten ein LOH mit dem Primer *D12S1617*. Der Large Cell Lung Cancer hatte bei drei der insgesamt fünf betroffenen Patienten (60 %) ein LOH. Dabei lag die LOH-Frequenz bei 10, verteilt auf 6 unterschiedliche Primer. Die höchste Frequenz hatte mit 3 LOH der Primer *D12S1596*, jeweils 2 LOH hatten die Primer *D12S358* und *D12S1617*. Zwei von drei Small-Cell-Lung-Cancer-Patienten (66 %) hatten ein LOH. Die LOH-Frequenz lag bei vier. Dabei traten zwei LOH in dem Primer *D12S358* auf.

Der Primer *D12S358* hatte die höchste LOH-Frequenz, 10 Patienten zeigten auf dieser Sequenz ein LOH. Neun Patienten hatten ein LOH im Primer *D12S1617*.

In Tabelle 4.7 ist die Häufigkeit gezeigt, mit der ein LOH an den unterschiedlichen Mikrosatellitenmarkern bei den Patienten auftritt.

Tabelle 4.7

LOH-Frequenz auf Chromosom 12p beim Br-Ca mit acht verschiedenen Mikrosatellitenmarkern, gezeigt an den 40 Br-Ca Patient.

Patienten	Mikrosatellitenprimer							
	D12S89	D12S358	D12S310	D12S1606	D12S1596	D12S1617	D12S1592	G60541
1	R	R	NI	R	NI	LOH	NI	R
2	R	LOH	NI	NI	R	LOH	R	LOH
3	R	R	R	R	R	R	LOH	R
4	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
5	R	LOH	LOH	NI	NI	NI	NI	NI
6	R	R	NI	NI	NI	R	R	R
7	NI	LOH	NI	NI	LOH	LOH	NI	LOH
8	LOH	NI	R	NI	NI	LOH	NI	LOH
9	NI	R	NI	NI	NI	NI	NI	NI
10	R	R	NI	NI	R	NI	NI	NI
11	R	R	NI	R	NI	NI	R	NI
12	R	R	NI	NI	R	R	NI	R
13	NI	LOH	NI	R	LOH	NI	NI	NI
14	R	R	NI	R	NI	R	NI	R
15	R	NI	LOH	R	NI	NI	NI	NI
16	NI	R	R	R	R	R	NI	NI
17	R	NI	R	R	R	R	R	R
18	R	LOH	NI	R	NI	R	R	R
19	R	LOH	NI	LOH	NI	R	NI	R
20	R	R	NI	NI	NI	R	NI	R
21	NI	R	NI	NI	NI	R	NI	R
22	NI	NI	NI	NI	R	NI	R	NI
23	R	NI	NI	R	LOH	LOH	R	LOH
24	R	NI	NI		NI	NI	NI	NI
25	NI	LOH	NI	R	R	LOH	NI	LOH
26	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	NI	NI	NI
27	R	R	R	LOH	R	R	R	R
28	NI	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	LOH
29	R	NI	NI	LOH	NI	NI	NI	NI
30	R	NI	NI	NI	R	R	NI	R
31	LOH	LOH	NI	R	R	LOH	NI	LOH
32	R	R	LOH	R	NI	NI	NI	NI
33	R	R	NI	R	NI	R	NI	R
34	R	R	NI	NI	R	NI	NI	NI
35	R	R	NI	NI	NI	R	NI	R
36	R	R	NI	R	R	R	NI	R
37	NI	NI	NI	R	R	R	R	R
38	R	R	R	NI	LOH	LOH	NI	LOH
39	LOH	LOH	NI	R	LOH	LOH	R	LOH
40	NI	NI	NI	NI	R	R	NI	R
	5	12	5	6	7	11	3	10
	13%	30%	13%	15%	18%	28%	8%	25%

Insgesamt gab es 59 positive LOH Ergebnisse bei 20 verschiedenen Patienten. Der Mikrosatellit *D12S358* hatte mit 12 LOH's die höchste Frequenz (30%), gefolgt von den Markern *D12S1617* und *G60541* mit 11 und 10 positiven LOH Ergebnissen. Fünf Patienten hatten nur ein einzelnes LOH.

4.3 *KRAS*-Gen-Sequenzierung

Nach der Voruntersuchung auf chromosomale Imbalancen in Form eines *Loss of Heterozygosity* (LOH) konnte bei 8 der 40 (20 %) untersuchten Bronchialkarzinom-Patienten eine Mutation von *KRAS* Codons 12 festgestellt werden. Dabei handelte es sich um eine GGT-GCT-Transversion (siehe 3.16). Diese Basenveränderung hat zur Folge, dass anstelle von Glycin Alanin codiert wird.

Tabelle 4.8 zeigt die Patientencharakteristika und klinische Daten.

Tabelle 4.8

Patientencharakteristika und klinische Daten der *KRAS*-Gen-Sequenzierung

	Patientenzahl (%)	Median (Bereich)
<i>KRAS</i>-Gen-Mutation	8 (20)	
Geschlecht		
männlich/weiblich	4/4	
Alter (Jahre)		67 (35-75)
Tumorentität		
PEC	2 (25)	
AC	4 (50)	
LCLC	2 (25)	
SCLC	-	
smoker/non-smoker/u.k.	7/0/1 (87/ 0/13)	
LOH	6 (75)	
Geschlecht		
männlich/weiblich	2/4	

Die Tumorgroße lag für T1 bei 13 %, für T2 bei 38 %, für T3 und T4 jeweils bei 25 %.

Alle Patienten hatten einen kontralateralen Lymphknotenbefall, 88 % hatten Metastasen.

Die Tumordifferenzierung lag überwiegend im Bereich von G III, 75 %. Dreiundsechzig Prozent der Patienten hatten ein Rezidiv. Der Zeitraum zum Rezidiv lag bei 5 Monaten (Median 4). Es bestand eine Mittelwertabweichung von 3. Ein Patient hatte einen zweiten Tumor anderer Herkunft, ein weiterer einen nahen Verwandten mit der Diagnose Bronchialkarzinom. Insgesamt rauchten zwei Männer (50 %) und vier Frauen (100 %).

Die pathohistologischen Befunde sowie das Tumor-Staging für die *KRAS*-Gen-Mutation sind in Tabelle 4.9 wiedergegeben.

Tabelle 4.9

Pathohistologische Ergebnisse: 8 Patienten mit *KRAS*-Gen-Mutation

	Tumorentität			
	PEC (%)	AC (%)	LCLC (%)	SCLC (%)
Tumorgroße				
T1	-	-	1 (50)	-
T2	1 (50)	1 (25)	1 (50)	-
T3	1 (50)	1 (25)	-	-
T4	-	2 (50)	-	-
Lymphknotenbefall				
N0	-	-	-	-
N1	-	-	-	-
N2	2 (100)	4 (100)	2 (100)	-
Metastasen				
M1	2 (100)	3 (75)	2 (100)	-
Differenzierung				
D I	-	-	-	-
D II	1 (50)	-	-	-
D III	1 (50)	3 (75)	2 (100)	-
D IV	-	1 (25)	-	-
Rezidiv	2	2	1	-
Monate zum Rezidiv	11	3	8	-
(Median)	(11)	(3)	(8)	-
Mortalität	2 (100)	2 (50)	2 (100)	-
Monate bis zum Exitus	15	15	9	-
(Median)	(15)	(15)	(9)	-

Fünfundsiebzig Prozent der Tumorproben mit *KRAS*-Gen-Mutation zeigten bei der zuvor durchgeführten LOH-Analyse ein LOH. Dabei hatten Tumore, die bei mehreren verschiedenen Tumormarkern positive LOH-Ergebnisse verzeichneten, auch häufiger Mutationen im *KRAS*-Gen. Sechzig Prozent der Tumore, die bei mindestens vier unterschiedlichen Mikrosatellitenprimern ein LOH zeigten, wiesen eine Mutation im *KRAS*-Gen auf. Bei drei verschiedenen Mikrosatellitenprimern lag die Bilanz der Tumore mit LOH und Mutation bei 40 %, mit zwei nur noch bei 30 %. Die Häufigkeit von *KRAS*-Gen-Mutationen im Zusammenhang mit dem Vorkommen von LOH und bezogen auf die gesamte Tumorfrequenz ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

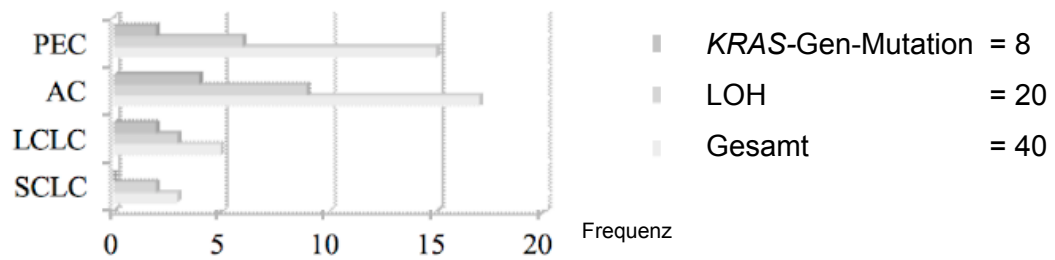


Abbildung 4.1

Häufigkeiten von *KRAS*-Gen-Mutationen gemessen an der LOH-Frequenz und der gesamten Tumorfrequenz

Von den zwei Plattenepithelkarzinompatienten hatte einer zuvor ein LOH mit dem Primer *D12S358* gezeigt. Alle Adenokarzinompatienten hatten positive LOH-Ergebnisse in allen getesteten LOH-Primern. Einer der zwei LCLC-Patienten hatte auf fast allen Primersequenzen ein LOH, ausgenommen die Primer *G60541* und *D12S1606*. Abbildung 4.2 zeigt die LOH-Frequenz der verschiedenen LOH-Primer bei Patienten mit *KRAS*-Gen-Mutationen.

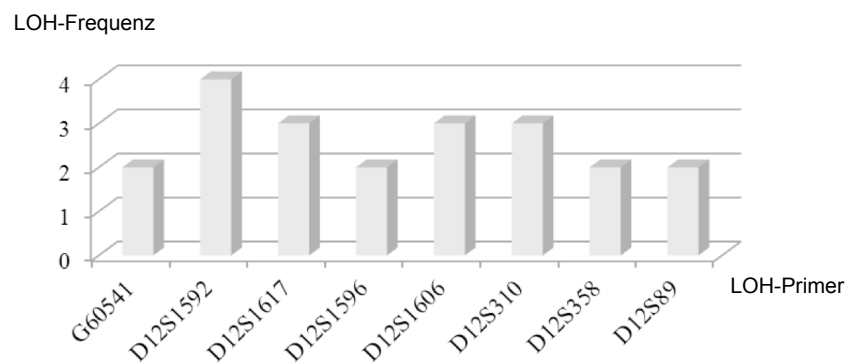


Abbildung 4.2

LOH-Frequenz, aufgezeigt für die verschiedenen LOH-Primer bei Patienten mit einer *KRAS*-Gen-Mutation

4.4 Therapieverlauf

Dem gesamten untersuchten Patientenkollektiv wurde das Bronchialkarzinom operativ entfernt. Vierzig Prozent der Patienten erhielten eine Chemotherapie in Form einer neoadjuvanten, adjuvanten oder Palliativtherapie. Eine Strahlentherapie erfolgte bei insgesamt 8 (20 %) Patienten. Details der Therapie sind in Tabelle 4.10 aufgeführt.

Tabelle 4.10

Therapieverfahren bei vierzig Lungenkrebspatienten

Therapie	Patientenzahl (%)
Operation	40 (100)
Chemotherapie	16 (40)
EGFR-TKI	3
Radiotherapie	8 (20)

Aufgrund der Lage und Ausbreitung der Tumore wurde zur Entfernung der Karzinome überwiegend eine Pneumektomie durchgeführt. Weitere operative Eingriffe waren die Lob- und Bilobektomie, die Unterlappenresektion, Teilresektion der Lunge sowie atypische Resektionen. Bei insgesamt vier Patienten konnte das Tumorgewebe nicht vollständig entfernt werden, hier ergab sich eine R₁-Resektion. Die Patienten mit R₁ erhielten eine neoadjuvante Chemotherapie. Insgesamt erhielten zwei Patienten präoperativ einen neoadjuvanten Zyklus. Weitere zwei Patienten erhielten sowohl einen neoadjuvanten Zyklus als auch eine später folgende palliative Therapie. Eine alleinige adjuvante Therapie nach Tumorresektion wurde bei 7 Patienten angewendet. Eine Palliativtherapie nach Operation erhielten insgesamt 4 Patienten, 2 Patienten in Kombination mit einer neoadjuvanten Therapie. Bei der Zytostatikatherapie kamen hauptsächlich Kombinationen aus den Zytotherapeutika Cisplatin, Vinorelbin, Gemcitabin und Carboplatin zum Einsatz, die in mehreren Zyklen liefen.

Weitere 3 Patienten wurden mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Iressa therapiert. Nachdem mindestens 3 Zyklen der gängigen Zytostatikatherapie erfolglos blieben, wurden diese als Therapieversager eingestuft. Nur einer der Patienten, der mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Iressa therapiert wurde, hatte ein nachgewiesenes positives LOH im *KRAS*-Gen. Ein weiterer der insgesamt drei Therapieversager zeigte eine Mutation im *KRAS*-Gen sowie eine Mutation im *EGFR*. Zwei der behandelten Patienten verstarben trotz

des Einsatzes innerhalb von zwei Jahren. Beide verstorbenen Patienten hatten ein Plattenepithelkarzinom und waren Raucher. Der dritte Patient hatte ein Adenokarzinom und ist im aktuellen Follow-up. Alle Patienten hatten Metastasen und ein Rezidiv (UICC IV). Der Zeitraum zum Rezidiv betrug 21 Monate (Median 24). Die Patienten waren alle jünger als das mittlere Erkrankungsalter, der Mittelwert lag bei 54 Jahren (Median 58, Mittelwertabweichung 11). Einer der Patienten hatte einen Zweittumor, bei einem weiteren war eine familiäre Häufung vorhanden.

Der überwiegende Anteil der Patienten, die zuvor eine Chemotherapie erhalten hatten, bekam im Anschluss eine Radiotherapie. Der größte Anteil der Tumore, die bestrahlt wurden, waren Plattenepithelkarzinome, daneben gab es zwei Adenokarzinome und eine NSCLC. Alle Patienten, die eine Radiotherapie erhielten, wiesen zuvor Metastasen auf, über 60 %, hatten ein Rezidiv. Zusätzlich war die Prognose durch niedrige Differenzierung und befallene Lymphknoten schlecht. Ein Patient hatte einen nichttumorfreen Resektionsrand.

In Tabelle 4.11 sind die Therapiemaßnahmen aufgeführt.

Tabelle 4.11

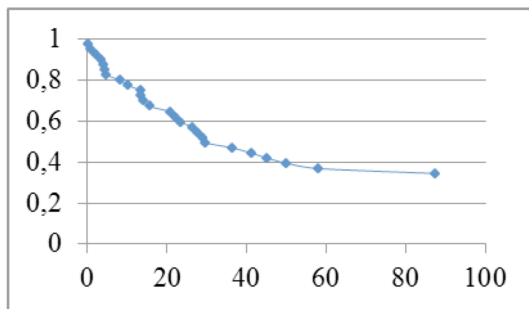
Therapiemaßnahmen für die verschiedenen Tumore

	Tumorentität			
	PEC	AC	LCLC	SCLC
Operationsmethode				
Pneumektomie	8	11	1	1
Lob-, Bilobektomie	3	4	1	1
Unterlappenresektion	1	1	1	-
andere	2	2	1	2
Resektionsausmaß				
R ₀	13	15	5	3
R ₁	2	2	-	-
Chemotherapie				
neoadjuvant	2	3	2	-
adjuvant	3	4	-	-
palliativ	2	2	-	-
Radiotherapie				
60-70 Gy	2	1	2	-
Therapieversager				
Iressa	2	1	-	-

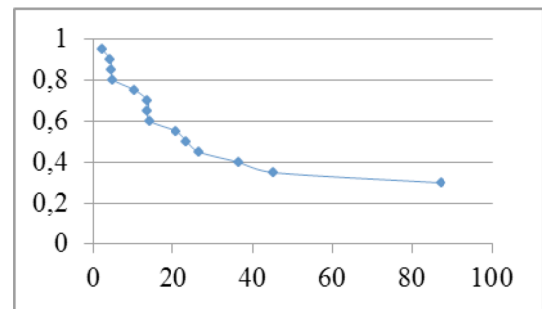
4.5 Überlebensanalyse

Die 40 operativ entfernten Bronchialkarzinome, welche in dieser Studien Verwendung fanden, wurden zwischen dem Zeitraum Februar 1999 und Juni 2007 entnommen und bis Mai 2010 im Follow-up verfolgt. Der Beobachtungszeitraum betrug 11,2 Jahre. Die durchschnittliche Beobachtungszeit betrug 10,7 Monate. Siebenundzwanzig Patienten (67 %) waren bis Mai 2010 verstorben, 13 (33 %) befanden sich im Follow-up. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 63,8 Jahren (Median 66,2). Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug 67,3 Jahre (Median 70,3). Der Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Tod betrug 22,8 Monate (Median 18,2). Abbildung 4.3 zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeiten vom Diagnosezeitpunkt bis zum Versterben, dargestellt anhand der Kaplan-Meier-Kurve. Das Gesamtüberleben aller Patienten (n = 40) beträgt nach 90 Monaten 28 % (Abb. 4.3 a). Bei Patienten mit einem LOH beträgt das Gesamtüberleben (n = 20) nach 90 Monaten 25 %. (Abb. 4.3. b) Das Gesamtüberleben für Patienten mit einer *KRAS*-Gen-Mutation (n = 8) beträgt nach 30 Monaten nur noch 22 % (Abb. 4.3 c).

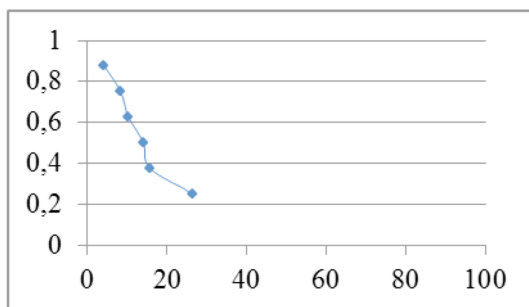
a)



b)



c)



Y-Achse: Überlebenswahrscheinlichkeit
X-Achse: Zeit in Monaten

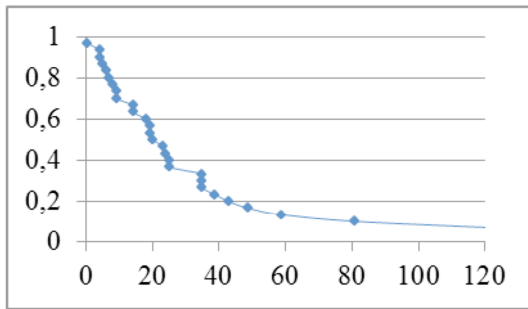
Abbildung 4.3

Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Versterben (y-Achse) in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse). Abbildung a) zeigt das Gesamtüberleben aller Patienten, Abbildung b) das Überleben für Patienten mit LOH, Abbildung c) das Überleben für Patienten mit einer *KRAS*-Gen-Mutation.

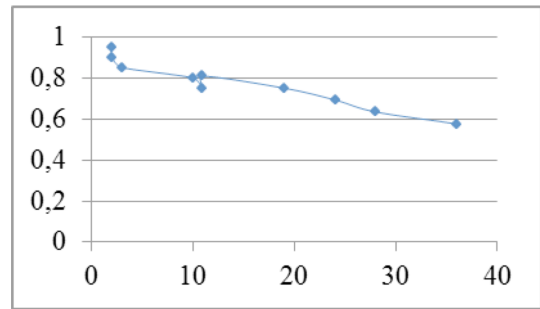
Ein Rezidiv des Bronchialkarzinoms konnte bei 28 Patienten (70 %) nachgewiesen werden. Das rezidivfreie Überleben betrug 27 Monate (Median 19,5). Abbildung 4.4 zeigt die rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit dargestellt anhand der Kaplan-Meier-Kurve. In Abbildung 4.4 a) beträgt das rezidivfreie Überleben aller Patienten (n = 40) nach 80 Monaten 5 %. In Abbildung b) beträgt das rezidivfreie Überleben aller Patienten mit einem LOH (n = 20) nach 37 Monaten 60 %. In Abbildung c) beträgt das rezidivfreie Überleben für Patienten mit einer *KRAS*-Gen-Mutation (n = 8) nach 10 Monaten 40 %.

Der Untersuchungszeitraum für das Gesamtüberleben sowie das rezidivfreie Überleben (Abb. 4.3 a-c + 4.4 a-c) unterscheidet sich aufgrund der Tatsache, dass sich einige Patienten nach Ende der klinischen Untersuchung noch im Follow-up befanden.

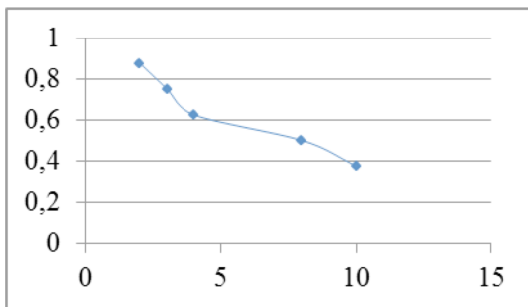
a)



b)



c)



Y-Achse: Überlebenswahrscheinlichkeit
X-Achse: Zeit in Monaten

Abbildung 4.4

Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben (y-Achse) in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse). Abbildung a) zeigt das rezidivfreie Überleben, Abbildung b) das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit LOH, Abbildung c) das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit einer *KRAS*-Gen-Mutation.

5. Diskussion

Bis heute geht die Diagnose Bronchialkarzinom meist mit einem frühen Versterben der Patienten einher [1]. Die klassischen Therapieverfahren zeigen nur geringe Erfolge und selten eine komplette Heilung. Neben der meist erst späten Diagnose sind die Aggressivität des Bronchialkarzinoms und ein geringes Ansprechen auf die Therapeutika dafür verantwortlich [7]. Der neue Therapieansatz der zielgerichteten Therapie (*target therapy*), welcher bereits in anderen Bereichen der Tumorthherapie, zum Teil sehr erfolgreich (z. B. Glivec® bei CML, Colon-CA und Iressa®) eingesetzt wird [115], richtet sich speziell gegen die tumorauslösenden Gene, die durch Mutationen aus dem Gleichgewicht der natürlichen Regulation geraten sind. Erlotinib (Tarceva®), Gefitinib (Iressa®), Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®) sind die in Deutschland zugelassenen Therapeutika beim Bronchialkarzinom [90]. Die Medikamente richten sich auf Fehlregulationen innerhalb des EGF-Rezeptors [116]. Trotz der Effektivität der Medikamente für Patienten mit aktivierenden *EGFR*-Mutationen kam es in vielen Fällen zur Tumorprogression bei Patienten ohne *EGFR*-Mutation oder bei Patienten mit einer somatischen Mutation im *KRAS*-Gen. Die EGFR-TKI greift an Strukturmolekülen der ERBB-Familie an und hemmt diese in der Signaltransduktion, dadurch wird die intrinsische Resistenz im *KRAS*-Gen nicht aufgehoben und das Wachstumssignal unabhängig von der Aktivierung von EGFR in den Zellkern weitergeleitet. Somit verlieren inhibitorische Substanzen wie Iressa® ihre Wirkung und es kommt zum Therapieversagen. In Studien konnte bewiesen werden, dass *KRAS*-Gen-Mutationen signifikant mit einem Versagen der Tyrosinkinaseinhibitoren assoziiert sind [98, 115]. Da *KRAS*-Gen-Mutationen zu den häufigsten lungenkrebsverursachenden Mutationen gehören, ist es wichtig, ein Verständnis für das Versagen der EGFR-TKI zu haben, um die Patienten besser für eine personalisierte Therapie zu selektieren und mögliche Kombinationstherapien herauszufinden. Sinnvoll erscheint daher ein Tumor-Profilung über das Vorhandensein von Mutationen in *EGFR* und im *KRAS*-Gen und deren Lokalisation, um eine bestmögliche Therapie zu erstellen [56, 92, 108].

Von den in der Studie vorkommenden Tumorentitäten war das Adenokarzinom mit 43 % am häufigsten, gefolgt vom Plattenepithelkarzinom (37 %), dem LCLC (13 %) und dem SCLC (8 %). Die Häufigkeit der im Patientenkollektiv vorkommenden Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome entspricht in etwa den Durchschnittswerten, die in der Literatur angegeben sind. Das gilt auch für das LCLC und SCLC, deren Häufigkeit sich im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte befand [20].

Eine niedrige Differenzierung, das Vorhandensein von Metastasen und auftretende Rezidive trugen, wie in der Literatur bekannt, zu einer signifikant höheren Sterblichkeit bei [27].

Ebenso konnte der gesteigerte Kontakt mit exogenen Noxen, hier vor allem die kanzerogenen Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchs, in Zusammenhang mit einer hohen Mortalität gebracht werden. Vierundneunzig Prozent der Raucher sind verstorben [12-15]. Sechsfundfünfzig Prozent der Raucher hatten ein Plattenepithelkarzinom entwickelt, 25 % ein Adenokarzinom und 19 % ein LCLC. Das Plattenepithelkarzinom stand in deutlichem Zusammenhang mit gesteigertem Nikotinkonsum [118]. Ebenfalls waren alle dem Patientenkollektiv zugehörigen Nichtraucher verstorben. Dies betraf überwiegend Patienten mit einem Adenokarzinom. Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur bekannten Erkenntnissen und scheinen auch auf Umweltfaktoren zurückzuführen zu sein [119-120].

Die zunächst durchgeführte Detektion von Heterozygotieverlusten galt der Ermittlung potenzieller Mutationen im *KRAS*-Gen. Die Auswahl der Mikrosatellitenprimer richtete sich nach vorhandenen Studien, welche in diesem Genabschnitt erfolgreich Heterozygotieverluste aufzeigen konnten und später *KRAS*-Gen-Mutationen nachwiesen [79].

In der vorliegenden Studie sprachen vor allem die Mikrosatellitenprimer *D12S358*, *D12S1617* und *G60541*, mit je 10, 9 und 8 LOH auf einen *Loss of Heterozygosity* an. Weniger positive Ergebnisse lieferten die Mikrosatellitenprimer *D12S89* und *D12S1592* mit je 3 LOH, (Tabelle 4.6). Verglichen mit der Literatur [79] gibt es Übereinstimmungen der LOH-Frequenzen bei den Primern *D12S1617*, *D12S1596*. Generell kann aber nicht von einer deutlichen Prävalenz der Primer und des Auftretens von LOH gesprochen werden. Die LOH-Frequenz bezogen auf die Tumorentitäten hatte den höchsten Anteil bei den Small-Cell-Lung-Cancer-Fälle mit 66 %, 52 % der LOH kamen in einem Adenokarzinom vor, 42 % in einem Long Cell Lung Cancer und 40 % in einem Plattenepithelkarzinom. Es scheint eine Präferenz von detektierten LOH zu bestimmten Tumorentitäten zu geben, wobei eine signifikante Aussage aufgrund der geringen Anzahl von untersuchten Tumoren in dieser Arbeit nicht möglich ist. Das häufigere Vorkommen von LOH in Adenokarzinomen im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom scheint in der Literatur eher gegenläufig zu sein [121]. Der Smoking-Status hat eine entscheidende Rolle, ebenso wie die Region, in der die Studie durchgeführt wurde (Asien, USA, Europa) und die an sie geknüpften Umwelt- und Lebensbedingungen (Luftverschmutzung, Passivrauchen, ärztliche Versorgung ect.) [120].

Tumorgröße, Grading sowie der Befall von Lymphknoten oder Metastasen hatten keinen Einfluss auf ein positives LOH-Ergebnis. Die *KRAS*-Gen-Mutation ist ein Tumorversursacher und wird nicht durch das Vorliegen von negativen Tumorprognostika hervorgerufen oder beeinflusst. Die Untersuchungsmethode zeigte eine hohe Sensitivität der LOH-Analyse insoweit, als nicht nur stark tumorös zerfallenes Gewebe auf das Verfahren ansprach, sondern auch Tumore in frühen Tumorstadien von LOH betroffen waren. Es konnte belegt werden, dass ein LOH mit einem schnelleren Versterben einhergeht (Abbildung 4.4 b).

Bei der sich anschließenden *KRAS*-Gen-Sequenzierung hatten 75 % der Patienten mit einer nachgewiesenen Mutation zuvor ein LOH. Dabei hatten 13 % der Plattenepithelkarzinome eine Mutation, 23 % der Adenokarzinome und 40 % der Large-Cell-Lung-Cancer-Fälle, kein Small Cell Lung Cancer hatte eine nachgewiesene Mutation im *KRAS*-Gen. Tumore mit einem LOH im Tumorprimer *D12S358* hatten die meisten *KRAS*-Gen-Mutationen. Alle anderen Tumorprimer zeigten mindestens zwei LOH auf eine spätere *KRAS*-Gen-Mutation. Dabei war die Häufigkeit der LOH in einem Tumor nicht ausschlaggebend. Sowohl Tumore mit einem LOH als auch mit 6 LOH zeigten in der späteren Analyse eine *KRAS*-Gen-Mutation. *KRAS*-Gen-Mutationen wurden häufiger in prognostisch schlechteren Tumoren nachgewiesen (Tabelle 4.8). Dies deutet auf eine hohe Malignität von Tumoren, die aufgrund einer *KRAS*-Gen-Mutation entstanden sind, hin. Warum jedoch einige *KRAS*-Gen-Mutationen zuvor keine positiven LOH-Ergebnisse aufzeigten, konnte in den Untersuchungen nicht herausgefunden werden. Möglich ist, dass andere Bereiche auf dem Chromosom positive Ergebnisse liefern würden. Ebenso konnte nicht geklärt werden, warum sich in 66 % der Small Cell Lung Cancer ein LOH befand, sich jedoch keine *KRAS*-Gen-Mutation nachweisen lassen konnte.

Sowohl bei der LOH-Analyse als auch bei der *KRAS*-Gen-Analyse konnte eine Präferenz zum Adenokarzinom festgestellt werden mit einem Anteil von je 45 % und 50 %. Dabei waren die *KRAS*-Gen-Mutationen, wie in der aktuellen Literatur beschrieben, vor allem bei Nichtraucherinnen zu finden, deren Durchschnittsalter 58 Jahre betrug und weit unter dem der Männer mit 72 Jahren lag [122]. Ein früheres Versterben der Patienten mit *KRAS*-Gen-Mutation konnte nachgewiesen werden (Abbildung 4.3). Ein Heterozygotieverlust konnte nur bei der Hälfte der Patienten nachgewiesen werden. In der Literatur gibt es bezüglich der Wertigkeit des Vorkommens von LOH und dem Zusammenhang von *KRAS*-Gen-Mutationen verschiedene Auffassungen. Während die Arbeitsgruppe um Li et al. [79] einen Zusammenhang bestätigt und das Vorkommen eines LOH auch in der Tumorsuppressorfunktion vom Wildtyp-*KRAS* beschreibt, gibt es Studien, die zu dem Schluss kommen, dass ein LOH nicht mit dem Vorkommen von *KRAS*-Gen-Mutationen korreliert [82]. Wildtype-*KRAS* kann das onkologische Potenzial von *KRAS* inhibieren. Bei der onkologischen Aktivierung des *KRAS*-Gens kommt es häufiger zur Überexpression mutierter Allele als zum Verlust des Wildtyp-Allels [81]. In der Literatur ist bezüglich dieses Themas in den letzten Jahren wenig veröffentlicht worden, sodass nicht abschließend geklärt werden kann, welchen Nutzen die LOH-Analyse tatsächlich für die Identifikation und die Auswahl der Therapie bringt. In dieser Arbeit zeigte der überwiegende Teil der Patienten mit einem LOH auf 12p.12.1, Codon 12 Exon 2 ebenfalls eine Mutation im *KRAS*-Gen (sechs von acht Patienten, 75 %). Sie verstarben früher, hatten ein kürzeres rezidivfreies Überleben und zeigten ein geringeres Ansprechen auf die gängigen Therapieverfahren. Dies zeigt zum

einen die hohe Malignität von *KRAS*-Gen-Mutationen und den damit verbundenen negativen Prognosefaktor, der auch in der Literatur beschrieben wird [51, 71], zum anderen auch die Dringlichkeit nach einer personalisierten Therapie für Patienten mit einer *KRAS*-Gen-Mutation. Nicht geklärt werden konnte, ob die Tumore durch eine Überexpression der mutierten *KRAS*-Gene oder durch den Verlust des Wildtyp-*KRAS* zustande kamen. Es ist möglich, dass mit einem erweiterten Primerspektrum die Ergebnisse besser aufeinander abgestimmt werden könnten, sodass ein detektiertes LOH eine *KRAS*-Gen-Mutation nach sich zieht. Nach diesen Daten könnte eine LOH-Untersuchung nicht zur alleinigen, jedoch zur diagnostischen Unterstützung bei der Auswahl der zielgerichteten Therapie herangezogen werden.

Nach wie vor ist die operative Entfernung des Tumorgewebes der Goldstandard in der Bronchialkarzinomtherapie [123]. Ob eine Chemotherapie der Operation vorangeht oder folgt, entscheidet sich nach Tumorlage und Ausbreitung ins umliegende Gewebe. In den überwiegenden Fällen wurde auf eine Chemotherapie verzichtet oder nur eine Palliativtherapie eingesetzt. Lediglich bei ausdrücklichem Therapieversagen kam es bei den Patienten in der vorliegenden Studie zum Einsatz von EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren, Iressa. Da die Anzahl der mit Tyrosinkinaseinhibitoren behandelten Patienten sehr gering war (3 Patienten), ist eine Aussage über den Behandlungsablauf nicht möglich. *KRAS*-Gen-Mutationen gelten in der Literatur teilweise als Negativindikator für eine Therapie mit EGFR-TKI, obwohl einige Patienten einen Nutzen aus dieser Therapie ziehen können. Bekannt ist, dass bei dem Versagen der EGFR-TKI die Unterdrückung der ERBB3-Rezeptor-Tyrosinkinase zur Hemmung von MEK führt. Ebenso hat die Überexpression von Amphiregulin (*AREG*) und des *Insulin-like growth factor-1 receptor* eine Hemmung der Apoptose zur Folge. Beide Mechanismen werden durch die EGFR-TKI hervorgerufen, was zur intrinsischen Medikamentenresistenz führt [8, 72, 93, 98, 102-103, 110]. In dieser Studie kann aufgrund der kleinen Anzahl von Patienten (drei Patienten), die mit Iressa therapiert wurden keine Aussage über das Ansprechen der Therapie mit EGFR-TKI getroffen werden.

Um ein Therapieversagen zu verhindern, müssen die pathogenen Mechanismen weiter untersucht und herausgefunden werden, warum ein kleiner Teil der Patienten mit einer *KRAS*-Gen-Mutation auch auf EGFR-TKI anspricht und nicht die beschriebene Medikamentenresistenz entwickelt. Hierbei könnte auch die LOH-Analyse zum Tragen kommen, um eventuell Gemeinsamkeiten zwischen *KRAS*-Gen- und *EGFR*-Mutationen zu identifizieren. Des Weiteren muss nach einem Weg gesucht werden, um direkt die Überexpression bei *KRAS*-Gen-Mutationen zu inhibieren; die tatsächliche Tumorsuppression des Wildtyp-*KRAS*-Gens muss bestätigt werden und es muss nach Verfahren zu dessen Rehabilitation gesucht werden.

Der negative Einfluss des regelmäßigen Nikotinkonsums zeigte sich bei vielen Patienten

sowohl bei den Ergebnissen der LOH-Analyse als auch bei den Ergebnissen der Sequenzierung des *KRAS*-Gens. Rauchende Patienten mit positivem LOH-Score und einer nachgewiesenen *KRAS*-Gen-Mutation verstarben häufiger und früher im Vergleich zu rauchenden Patienten ohne einen solchen Nachweis. Dies entspricht den Angaben in der Literatur.

6. Zusammenfassung

Ein Kollektiv mit 40 Bronchialkarzinom Patienten wurde nach Tumorresektion auf LOH über den p-Arm von Chromosom 12 untersucht. Alle Patienten wurden anschließend genomisch sequenziert, um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen LOH und *KRAS*-Gen-Mutation gibt und in welchen Tumorentitäten sie wie häufig vorkommen. Die zur Anwendung kommenden Mikrosatellitenmarker waren: *D12S89*; *D12S358*; *D12S310*; *D12S1606*; *D12S1596*; *D12S1617*; *D12S1592*; *G60541*.

Ergebnis der LOH-Analyse: 20 der 40 (50 %) untersuchten Patienten hatten ein LOH: 9 (45 %) AC; 6 (30 %) PEC; 3 (15 %) LCLC; 2 (10 %) SCLC; 6 weiblich; 14 männlich; 13 smoker (65 %), 1 non-smoker (5 %). Ein LOH wurde gewertet, wenn der Quotient beider Allele $\leq 0,5$ oder $\geq 1,5$ betrug.

KRAS-Gen-Sequenzierung: 8 der 40 (20 %) Patienten hatten eine Mutation G-C-Transversion im Codon 12; 4 (50 %) AC; 2 (25 %) PC; 2 (25 %) LCLC; 0 SCLC; 4 weiblich; 2 männlich. 7 (88 %) smoker; 1 (12 %) unknown smoker; 6 der 8 (75 %) Patienten hatten ein LOH.

Als Schlussfolgerung kann gelten, dass es einen Zusammenhang zwischen LOH und *KRAS*-Gen-Mutation gibt. Ein LOH ist jedoch nicht zwangsläufig ein Hinweis auf eine *KRAS*-Gen-Mutation. Ebenso kann eine *KRAS*-Gen-Mutation trotz fehlendem LOH auftreten.

7. Abkürzungsverzeichnis und Schreibweise

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenosquamöses Karzinom/Adenokarzinom
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Areg	Amphiregulin
BAX/Ku70	Teil der Signalkaskade für die Apoptose
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CCD	Charge-Coupled Device
CSR	Cycle Sequencing Reaction
CML	Chronische Myeloische Leukämie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäße
g	Gramm
G	Grading/Differenzierung
GAP	GTPase-Activating Proteins
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
HCL	Chlorwasserstoff/Salzsäure
H ₂ O	Wasser
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
Kbp	Kilo-Basenpaare
<i>KRAS</i>	Kirsten Sarcoma Virus Associated Oncogene
l	Liter
LCLC	Large Cell Lung Cancer
LOH	Loss of Heterozygosity
M	Mol

ml	Milliliter
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
N	Nodus/Lymphknoten
OT	Objektträger
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEC	Plattenepithelkarzinom
R	Resektionsrand
rpm	revolutions per minute
SCLC	Small Cell Lung Cancer
sec.	Sekunden
Src	sarkom-induzierendes Gen
T	Tumor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TSG	Tumorsuppressorgen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
u. k.	unknown
WHO	Weltgesundheitsorganisation
µl	Mikroliter

7.2 Schreibweise

Kursiv Groß (z.B. <i>KRAS</i> -Gen)	humanes Gen
Normal Groß (z.B. EGFR)	humanes Protein
Kursiv klein (z.B. <i>Kras</i> -Gen)	murines Gen
Normal klein (z.B. Kras)	murines Protein

8. Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut, Krebs in Deutschland 2005/2005 ICD-10 C33,C 34.
2. European Surgery 5/2010, Intraoperative Radiotherapie (IORT): Eine alternative Behandlungsform für das funktionell nicht operable nicht kleinzellige Bronchuskarzinom (NSCLC).
3. National Institute for Clinical Excellence (NICE), National Collaborating Centre for Acute Care. Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. London: 2005.
www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/cg024fullguideline.pdf; Stand: 10.01.2006.
4. Alberg AJ ,Ford JG, Sarnet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP Evidencebased Clinical Practice Guidelines (2nd edition). Chest 2007; 132: 29-55.
5. Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr. 217 vom 25.05.2007.
6. Pesch B, Jöckel KH, Wichmann HE. Luftverunreinigung und Lungenkrebs. Biometrie und Epidemiologie in der Medizin und Biologie 1995; 26: 134–153.
7. Interdisziplinäre S3-Leitlinie, in: Pneumologie 2010; Bd. 64 (Suppl. 2).
8. Peto R. Smoking and Death: The Past 40 Years and the Next 40. BMJ. 1994 Oct. 8;3 09(6959):937-9.
9. Hecht SS. Nature Reviews Cancer; Oct 2003; 3, 733-7 44.
10. Die Onkologie, 2010, I, 272-280, DOI: 10.1007/978-3-540-79725-8_12.
11. American Journal of Epidemiology; February 15, 2006 163(4):395- 396,.
12. Osann KE. Lung Cancer in Women: The Importance of Smoking, Family History of Cancer, and Medical History of Respiratory Disease. Cancer Res. 1991 Sep 15;51(18):4893-7.

13. Schneiderman MA, Levin DL. Trends in Lung Cancer. Mortality, Incidence, Diagnosis, Treatment, Smoking, and Urbanization. *Cancer*. 1972 Nov;30(5):1320-5.
14. Paoletti L, Jardin B, Carpenter, MJ, Cummings KM, Silvestri GA Current Status of Tobacco Policy and Control.. *J Thorac Imaging*. 2012 Jul; 27(4):213-9.
15. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, et al. Tobacco and Cancer: Recent Epidemiological Evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:99-106.
16. Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung Cancer. *Lancet*. 2000 Feb 5; 355(9202):479-85.
17. Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, Minna JD. The Achilles „heal“ of Lung Cancers? *Trends Mol Med*. 2004 Oct;10(10):481-6.
18. Henley SL, [Richards TB](#), [Underwood JM](#), [Eheman CR](#), [Plescia M](#), [McAfee TA](#); [Centers for Disease Control and Prevention \(CDC\)](#). Lung Cancer Incidence Trends Among Men and Women in the United States, 2005-2009. [MMWR Morb Mortal Wkly Rep](#). 2014 Jan 10;63(1):1-5.
19. WHO. Tobacco or Health: A Global Status Report, Book 1997.
20. World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC, Hrsg. Lyon: IARC Press, 2004: 9–124.
21. Lee HJ [Lee CH](#), [Jeong YJ](#), [Chung DH](#), [Goo JM](#), [Park CM](#), [Austin JH.J](#); [International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma: Novel Concepts and Radiologic Implications](#). *Thorac Imaging*. 2012 Nov;27(6):340- 53. DOI: 10.1097/RTI.0b013e3182688d62. IASLC/ATS/ERS.
22. Adenokarzinome der Lunge – die neue Klassifikation; *Chir*. 2013; 138: S16– S24. DOI: 10.1055/s-0033-1350878 Zentralbl.
23. Smith RA, Glynn TJ. Cancer, Supplement: Prevention and Early Diagnosis of Lung Cancer; December 2000; 89, Issue Supplement 11, 2327-2328.

24. Böcker, Denk, Heitz; Pathologie, 3. Aufl. 2004, Urban und Fischer. Kapitel 24.7: 588-596.
25. 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;347:649-5-3.
26. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and Clinical Importance of Micrometastatic Disease. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1113-24.
27. Mountain CF. A New International Staging System for Lung Cancer. *Chest* 1986;89: 225S: 33
28. The IASLC Lung Cancer Staging Project: A Proposal for a New International Lymph Node Map in the Forthcoming Seventh Edition of the TNM Classification for Lung Cancer.
29. Stieber P, Hasholzner U, Bodenmüller H, Nagel D, Sunder-Plassmann L, Dienemann H, Meier W, Fateh-Moghadam A. CYFRA 21-1- A New Marker in Lung Cancer. *Cancer* 1993; 72S: 707-713.
30. Nisman B, Heching N, Barak V. Serum Tumor Markers in Resectable and Non-resectable Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Tumor Marker Oncology* 2000; 15 (3): 195-207.
31. Molina R, Filella X, Auge JM, Fuentes R Bover I, Rifa J, Moreno V, Canals E, Viñolas N, Marquez A, Barreiro E, Borrás J, Viladiu P: Tumor Markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer as an Aid in Histological Diagnosis and Prognosis. Comparison with the Main Clinical and Pathological Prognostic Factors. *Tumor Biology* 2003;24:209-218.
32. v. Bültzingslöwen F, Emslander HP, Gallenberger S, Hasholzner U, Häußinger KE, Hauck R et al. Diagnostik des Bronchialkarzinoms. Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Tumoren der Lunge und des Mediastinums. München: W. Zuckschwerdt Verlag 2000:5-17.
33. 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.

34. Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD; The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the T Descriptors in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2007 Jul; 2(7):593-602.
35. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. UICC. TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.
36. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997; 111: 1710-1717.
37. Colby TV, Wistuba, II, Gazdar A. Precursors to Pulmonary Neoplasia. *Adv Anat Pathol* 1998;5:205-15.
38. Weaver BA, Cleveland DW. Does Aneuploidy Cause Cancer? *Curr Opin Cell Biol*, 2006;18:658-67. (74).
39. Lu Y-J, Dong X-Y, Shipley J, Zhang R-G, Cheng S-JU. Chromosome 3 Imbalances Are the Most Frequent Aberration Found in Non-small Cell Lung carcinoma. *Lung Cancer* 1999;23:61-66.
40. 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.
41. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR, Chang EH. Mechanism of Activation of a Human Oncogene. *Nature* 1982 Nov 11; 300 (5888): 143-9.
42. Gao B, Mumby S, Gilman AG. The G Protein Beta 2 Complementary DNA Encodes the Beta 35 Subunit. *J Biol Chem.* 1987 Dec 25;262(36):17254-7.
43. Knudson AG. Chasing the Cancer Demon. *Annu Rev Genet* 2000;34:1-19.
44. 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.

45. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of Mutant Forms of p53 Oncogene in Primary Lung Cancer. *Lancet*. 1990 Mar 24; 335(8691): 675-9.
46. Husgafvel-Pursiainen K, Boffetta P, Kannio A, Nyberg F, Pershagen G, Mukeria A, Constantinescu V, Fortes C, Benhamou. p53 Mutations and Exposure to Environmental Tobacco Smoke in a Multicenter Study on Lung cancer. *Cancer Res*. 2000 Jun 1; 60(11): 2906-11.
47. Efeyan A, Serrano M. *Cell Cycle*. A High-throughput Loss-of-function Screening Identifies Novel p53 Regulators. 2007 May 2;6(9):1006-10. Epub 2007 May 28.
48. Xu HJ, Hu SX, Cagle PT, Moore GE, Benedict WF. Differential Retinoblastoma Protein Expression in Neuroendocrine Tumors of the Lung. Potential Diagnostic Implications. *Am J Pathol*. 1997; 150(2): 393-400.
49. Knudson AG Jr. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971 Apr; 68(4): 820-3.
50. Lüscher B, [Nordheim](#) A. Onkogene und Protoonkogene [Kompendium Internistische Onkologie](#) 2006; 21-28.
51. Rodenhuis S, Boerrigter L, Top B, Slebos RJ, Mooi WJ, van't Veer L, van Zandwijk N. Mutational Activation of the K-ras Oncogene and the Effect of Chemotherapy in Advanced Adenocarcinoma of the Lung: a Prospective Study. *J Clin Oncol*. 1997 Jan; 15 (1): 285-91.
52. Kiefer PE, Bepler G, Kubasch M, Havemann K. Amplification and Expression of Protooncogenes in Human Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 1987 Dec 1;47 (23): 6236-42.
53. Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Activation of the T24 Bladder Carcinoma Transforming Gene Is Linked to a Single Amino Acid Change. *Nature* 1982 Dec 23; 300(5894): 762-5.
54. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME; EGFR and Cancer Prognosis. *Eur J Cancer*. 2001; 37(Suppl 4): S9-15.

55. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Barón AE, Zeng C, Franklin WA. Epidermal Growth Factor Receptor in Non-small-cell Lung Carcinomas: correlation between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. *J Clin Oncol.* 2003 Oct 15; 21(20): 3798-807.
56. Hero K; Der genetische und der didaktische Fingerabdruck, Kristin Hero, ISBN 978-3-935009-52-2.
57. Pesek M, Benesova L, Belsanova B, Mukensnabl P, Bruha F, Minarik M. Dominance of EGFR and Insignificant KRAS Mutations in Prediction of Tyrosine-kinase Therapy for NSCLC Patients Stratified by Tumor Subtype and Smoking Status. *Anticancer Res.* 2009 Jul; 29(7): 2767-73.
58. Beckmann MW; Bedeutung der LOH Analyse für die Identifizierung von Tumorgenen; Hereditäre Tumorerkrankungen, Themenschwerpunkt, Medizinische Genetik 2, 1998.
59. DeFeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowy DR, Scolnick EM, Ellis RW. Analysis of Two Divergent Rat Genomic Clones Homologous to the Transforming Gene of Harvey Murine Sarcoma Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Jun; 78(6): 3328-32.
60. Stéhelin D. The Transforming Gene of Avian Tumor Viruses. *Pathol Biol (Paris)* 1976 Oct; 24(8): 513-5.
61. Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T, Feramisco J, Stavnezer E, Fogh J, Wigler MH. Three Human Transforming Genes are Related to the Viral Ras Oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Apr; 80 (8): 2112-6.
62. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming Genes of Human Bladder and Lung Carcinoma Cell Lines Are Homologous to the Ras Genes of Harvey and Kirsten Sarcoma Viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982 June; 79 (11): 3637-3640.
63. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ. Bladder Carcinoma Oncogene Is Homologue of Harvey Sarcoma Virus Ras Gene. *Nature* 1982 Jun 10; 297(5866): 474-8 .

64. Fujita J, Srivastava SK, Kraus MH, Rhim JS, Tronick SR, Aaronson SA. Frequency of Molecular Alterations Affecting Ras Protooncogenes in Human Urinary Tract Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jun; 82(11): 3849-53.
65. Yoakum GH, Lechner JF, Gabrielson EW, Korba BE, Malan-Shibley L, Willey JC, Valerio MG, Shamsuddin AM, Trump BF, Harris CC. Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells Transfected by Harvey Ras Oncogene *Science* 1985 Mar 8; 227 (4691): 1174-9.
66. Karnoub AE and Weinberg RA. Ras Oncogens: Split Personalities, *Nature Reviews*, July 2008, 525.
67. Viallet J, Sausville EA. Involvement of Signal Transduction Pathways in Lung Cancer Biology. *J. Cell Biochem Suppl* 1996; 24: 237-46.
68. Graziano SL, [Gamble GP](#), [Newman NB](#), [Abbott LZ](#), [Rooney M](#), [Mookherjee S](#), [Lamb ML](#), [Kohman LJ](#), [Poiesz BJ](#). Prognostic Significance of K-ras Codon 12 Mutations in Patients with Resected Stage I and II Non-small-cell Lung Cancer. [J Clin Oncol](#) 1999 Feb; 17(2): 668- 5.
69. Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC, Bos JL. Incidence and Possible Clinical Significance of K-ras Oncogene Activation in Adenocarcinoma of the Human Lung *Cancer Res*. 1988 Oct 15; 48(20): 5738-41.
70. Fong KM, Minna JD. Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. [Clin Chest Med](#). 2002 Mar; 23(1): 83-101.
71. Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M; Frequency and Spectrum of Mutations at Codons 12 and 13 of the c-K-ras Gene in Human Tumors. *Environ Health Perspect* 1991 93: 125- 31.
72. Hurbin A, [Wislez M](#), [Busser B](#), [Antoine M](#), [Tenaud C](#), [Rabbe N](#), [Dufort S](#), [de Fraipont F](#), [Moro-Sibilot D](#), [Cadranel J](#), [Coll JL](#), [Brambilla E](#). Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Inhibition Overcomes Gefitinib Resistance in Mucinous Lung Adenocarcinoma. [J Pathol](#) 2011 Sep; 225(1): 83-95. doi: 10.1002/path. 2897. Epub 2011 May 19.
73. Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Detection of Ras Gene Mutations in Human Lung Cancers by Single-strand Conformation Polymorphism Analysis of Polymerase Chain Reaction Products. *Oncogene*. 1990 Jul; 5(7): 1037-43.

74. Cancer statistics, 2013. Epub 2013 Jan 17. [CA Cancer J Clin](#) 2013 Jan; 63(1): 1-30. doi: 10.3322/caac.21166.
75. Boch C, [Kollmeier J](#), [Roth A](#), [Stephan-Falkenau S](#), [Misch D](#), [Grüning W](#), [Bauer TT](#), [Mairinger T](#). The Frequency of EGFR and KRAS Mutations in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC): Routine Screening Data for Central Europe from a Cohort Study. [BMJ Open](#). 2013 Apr 3; 3(4). pii: e002560. doi: 10.1136/bmjopen-2013-002560. Print 2013.
76. Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, Cigarette Smoking is Strongly Associated with Mutation of the K-ras Gene in Patients with Primary Adenocarcinoma of the Lung. *Cancer* 2001; 92:1525-30.
77. Zhang Z, [Wang Y](#), [Vikis HG](#), [Johnson L](#), [Liu G](#), [Li J](#), [Anderson MW](#), [Sills RC](#), [Hong HL](#), [Devereux TR](#), [Jacks T](#), [Guan KL](#), [You M](#). Wildtype Kras2 Can Inhibit Lung Carcinogenesis in Mice. [Nat Genet](#). 2001 Sep;29(1): 25-33.
78. Zhao Y, Miyashita K, Ando T, Kakeji Y, Yamanaka T, Taguchi K, Ushijima T, Oda S, Maehara Y. Exclusive KRAS Mutation in Microsatellite unstable Human Colorectal Carcinomas with Sequence Alterations in the DNA Mismatch Repair Gene, MLH1. *Gene*. 2008 Nov 1; 423(2): 188-93. doi: 10.1016/j.gene.2008.07.014. Epub 2008 Jul 22.
79. Li1 J, Zhang Z, Dai Z, Plass C, Morrison C, Wang Y, Wiest JS, Anderson MW and You M; LOH of chromosome 12p correlates with Kras2 mutation in non-small cell lung cancer, *Oncogene* 2003; 22: 1243–1246. doi:10.1038/sj.onc.1206192.
80. [Devereux TR](#), [Holliday W](#), [Anna C](#), [Ress N](#), [Roycroft J](#), [Sills RC](#). Map kinase activation correlates with K-ras mutation and loss of heterozygosity on chromosome 6 in alveolar bronchiolar carcinomas from B6C3F1 mice exposed to vanadium pentoxide for 2 years. [Carcinogenesis](#) 2002 Oct; 23(10): 1737-43.
81. Reynolds SH, Anderson MW. Activation of proto-oncogenes in human and mouse lung tumors. [Environ Health Perspect](#) 1991 Jun; 93: 145-8. Review.
82. Uchiyama M, Usami N, Kondo M, Mori S, Ito M, Ito G, Yoshioka H, Imaizumi M, Ueda Y, Takahashi M, Minna JD, Shimokata K, Sekido Y. [Loss of heterozygosity of chromosome 12p does not correlate with KRAS mutation in non-small cell lung cancer](#). *Int J Cancer* 2003 Dec 20; 107(6): 962-9.

83. [Chen B](#), [You L](#), [Wang Y](#), [Stoner GD](#), [You M](#). Allele-specific activation and expression of the K-ras gene in hybrid mouse lung tumors induced by chemical carcinogens. [Carcinogenesis](#) 1994 Sep; 15(9): 2031-5.
84. Thompson TA, Haag JD, Gould MN. Ras gene mutations are absent in NMU-induced mammary carcinomas from aging rats. [Carcinogenesis](#). 2000 Oct;21(10):1917-22.
85. [Diaz R](#), [Ahn D](#), [Lopez-Barcons L](#), [Malumbres M](#), [Perez de Castro I](#), [Lue J](#), [Ferrer-Miralles N](#), [Mangues R](#), [Tsong J](#), [Garcia R](#), [Perez-Soler R](#), [Pellicer A](#). The N-ras proto-oncogene can suppress the malignant phenotype in the presence or absence of its oncogene. [Cancer Res](#). 2002 Aug 1;62(15):4514-8.
86. Scagliotti G, Novello S. Adjuvant Chemotherapy After Complete Resection for Early Stage NSCLC. [Lung Cancer](#). 2003 Dec; 42 Suppl 1: S47-51.
87. El Sharouni SY, Aerts JG, Senan S, De Ruyscher DK, Groen HJ, Paul MA, Smit EF, Vonk EJ, Treatment of patients with stage III non-small cell lung cancer: concurrent high-dose chemotherapy and radiotherapy; [Ned Tijdschr Geneeskd](#) 2008 Dec 13; 52(50): 2714-7.
88. Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, Sause W, Smith TJ, Baker S Jr, Olak J, Stover D, Strawn JR, Turrisi AT, Somerfield MR; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology Treatment of Unresectable Non-small-cell Lung Cancer Guideline: Update 2003. 1: [J Clin Oncol](#). 2004 Jan 15; 22(2): 330-53. Epub 2003 Dec 22.
89. Depierre A, Westeel V, Jacoulet P. Gemcitabine induction Chemotherapy in Non-small Cell Lung Cancer. [Semin Oncol](#). 2002 Jun; 29 (3 Suppl 9): 55-60.
90. Rote Liste® 2014, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU- Zulassungen u. bestimmter Medizinprodukte), ISBN: 978-3-939192-80-0.
91. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, Ince WL, Jänne PA, Januario T, Johnson DH, Klein P, Miller VA, Ostland MA, Ramies DA, Sebisanovic D, Stinson JA, Zhang YR. Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor and in KRAS Are Predictive and Prognostic Indicators in Patients with Non-small-cell Lung Cancer Treated with Chemotherapy Alone and in Combination with Erlotinib. [J Clin Oncol](#) 2005 Sep 1; 23 (25): 5900-9. Epub 2005 Jul 25. Comment in: [J Clin Oncol](#) 2005 Sep 1; 23 (25): 5856-8.

92. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *PLoS Med.* 2005 Jan;2(1): e17. Epub 2005 Jan 25.
93. Carter TA, Wodicka LM, Shah NP, Velasco AM, Fabian MA, Treiber DK, Milanov ZV, Atteridge CE, Biggs WH 3rd, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Mehta SA, Patel HK, Pao W, Sawyers CL, Varmus H, Zarrinkar PP, Lockhart DJ. Inhibition of Drug-resistant Mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 2;102(31):11011-6. Epub 2005 Jul 26.
94. Okamoto A, Hussain SP, Hagiwara K, Spillare EA, Rusin MR, Demetrick DJ, Serrano M, Hannon GJ, Shiseki M, Zariwala M, et al. Mutations in the p16INK4/MTS1/CDKN2, p15INK4B/MTS2, and p18 Genes in Primary and Metastatic Lung Cancer. *Cancer Res.* 1995 Apr 1; 55(7): 1448-51.
95. Hanna N, Lilenbaum R, Ansari R, Lynch T, Govindan R, Jänne PA, Bonomi P. Phase II Trial of Cetuximab in Patients with Previously Treated Non-small-cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2006 Nov 20; 24 (33): 5253-8.
96. Engl N, Mok TS et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma, *J Med* 2009, 361: 947.
97. Therasse P, Arbuck SG, et al.: New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. [Journal of the National Cancer Institute](#) 2000 92(3): 205-216] [doi: 10. 1093/jnci/92. 3. 205](#)
98. Massarelli E, [Varella-Garcia M](#), [Tang X](#), [Xavier AC](#), [Ozburn NC](#), [Liu DD](#), [Bekele BN](#), [Herbst RS](#), [Wistuba II](#). KRAS Mutation is an Important Predictor of Resistance to Therapy with Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-small-cell Lung Cancer. [Clin Cancer Res.](#) 2007 May 15; 13(10): 2890-6.
99. Jeannot V, [Busser B](#), [Brambilla E](#), [Wislez M](#), [Robin B](#), [Cadranel J](#), [Coll JL](#), [Hurbin A](#). The PI3K/AKT Pathway Promotes Gefitinib Resistance in Mutant KRAS Lung Adenocarcinoma by a Deacetylase-dependent Mechanism. [Int J Cancer.](#) 2014 Jun 1; 134(11): 2560-71. doi: 10.1002/ijc.28594. Epub 2013 Dec 13.

100. Sun C, [Hobor S](#), [Bertotti A](#), [Zecchin D](#), [Huang S](#), [Galimi F](#), [Cottino F](#), [Prahallad A](#), [Grernrum W](#), [Tzani A](#), [Schlicker A](#), [Wessels LF](#), [Smit EF](#), [Thunnissen E](#), [Halonen P](#), [Lieftink C](#), [Beijersbergen RL](#), [Di Nicolantonio F](#), [Bardelli A](#), [Trusolino L](#), [Bernards R](#). Intrinsic Resistance to MEK Inhibition in KRAS Mutant Lung and Colon Cancer through Transcriptional Induction of ERBB3. *Cell Rep*. 2014 Apr 10; 7(1): 86-93. doi: 10.1016/j.celrep. 2014.02.045. Epub 2014 Mar 27.
101. Mukohara T, [Engelman JA](#), [Hanna NH](#), [Yeap BY](#), [Kobayashi S](#), [Lindeman N](#), [Halmos B](#), [Pearlberg J](#), [Tsuchihashi Z](#), [Cantley LC](#), [Tenen DG](#), [Johnson BE](#), [Jänne PA](#). Differential Effects of Gefitinib and Cetuximab on Non-small-cell Lung Cancers Bearing Epidermal Growth Factor Receptor Mutations. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Aug 17; 97(16): 1185-94.
102. [Villanueva MT](#). Lung Cancer: Cetuximab, You're fired. *Nat Rev Clin Oncol* 2014 Jan;11(1): 3. doi: 10.1038/nrclinonc. 2013.227. Epub 2013 Nov 26.
103. [Markman B](#), [Javier Ramos F](#), [Capdevila J](#), [Tabernero J](#). EGFR and KRAS in Colorectal cancer. *Adv Clin Chem*. 2010; 51: 71-119.
104. 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.
105. 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.
106. Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentiis M, De Placido S, Basolo F, Angeletti CA, Bevilacqua G. Angiogenesis as a Prognostic Indicator of Survival in Non-small-cell Lung Carcinoma: A Prospective Study. *J Natl Cancer Inst* 1997 Jun 18; 89 (12): 881-6.
107. McCarty MF, Bielenberg D, Donawho C, Bucana CD, Fidler IJ. Evidence for the causal Role of Endogenous Interferon-alpha/beta in the Regulation of Angiogenesis, Tumorigenicity, and Metastasis of Cutaneous Neoplasms. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19(7): 609-15.
108. Minna JD, Neubildung der Lunge, in *Harrisons Principles of Internal Medicine*, Pt. At 506-515, Dennis L. Kasper, MD et al., Hrsg., 16. Aufl. 2005.

109. Cetin K, Ettinger DS, Hei YJ, O'Malley CD. Clin Epidemiol. Survival by Histologic Subtype in stage IV Nonsmall Cell Lung Cancer Based on Data from the Surveillance, Epidemiology and End Results Program. 2011; 3: 139- 48. Epub 2011 Apr 28.
110. [Metro G](#), [Chiari R](#), [Duranti S](#), [Siggillino A](#), [Fischer MJ](#), [Giannarelli D](#), [Ludovini V](#), [Bennati C](#), [Marcomigni L](#), [Baldi A](#), [Giansanti M](#), [Minotti V](#), [Crinò L](#). Impact of Specific Mutant KRAS on Clinical Outcome of EGFR-TKI-treated Advanced Non-small Cell Lung Cancer Patients with an EGFR Wild Type Genotype. [Lung Cancer](#). 2012 Oct; 78(1): 81-6. Doi: 10.1016/j. Lungcan. 2012.06.005. Epub 2012 Jul 4.
111. Genetic Home Reference, Chromosom 12; U.S. National Library of Medicine, Revsied Feb. 2013.
112. Qiagen, Hilden, Niederlande.
113. Londoño MC; Molekulare Charakterisierung der Insertionsstellen von internen Tandemduplikationen des FLT3-Gens bei der akuten myeloischen Leukämie im Erwachsenenalter- Evaluation der klinischen Bedeutung, ,Stuttgart 2009.
114. Schurr PS, Oikonomou D, Kaifi JT, Merkert P, Wolter S, Kleinhans H, Reichelt U, Mann O, Gawad KA, Strate T, Yekebas EF, Izbicki JR; Clinical Value of Loss of Heterozygosity in Serum Microsatellite DNA of Patients with Gastrointestinal Stromal Tumors. Journal of clinical gastroenterology, 2009 Jan.
115. Gao B, Yeap S, Clements A, Balakrishnar B, Wong M, Gurney H; Evidence for Therapeutic Drug Monitoring of Targeted Anticancer Therapies. J Clin Oncol 2012 Aug 27.
116. Petrosyan F, Daw H, Haddad A. Spiro Targeted therapy for Lung Cancer. Anticancer Drugs 2012 Aug 27.
117. van Zandwijk N, Mathy A, Boerrigter L, Ruijter H, Tielen I, de Jong D, Baas P, Burgers S, Nederlof P. EGFR and KRAS Mutations as Criteria for Treatment with Tyrosine Kinase Inhibitors: Retro- and Prospective Observations in Non-small-cell Lung Cancer. Ann Oncol 2007 Jan; 18(1): 99103.

118. Lee PN, Forey BA, Coombs KJ. Systematic Review with Meta-analysis of the Epidemiological Evidence in the 1900s Relating Smoking to Lung Cancer. *BMC Cancer* 2012 Sep 3; 12(1): 385.
119. Poullis M, McShane J, Shaw M, Shackcloth M, Page R, Mediratta N, Gosney J. Smoking Status at Diagnosis and Histology Type as Determinants of Long-term Outcomes of Lung Cancer Patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012 Aug 16.
120. Krishnan VG, Ebert PJ, Ting JC, Lim E. Whole-Genome Sequencing Of Asian Lung Cancers: Second-Hand Smoke Unlikely To Be Responsible for Higher Incidence Of Lung Cancer Among Asian Never-Smokers. *Cancer Res* 2014 Sep 4. pii: canres. 3195.2013.
121. Yoshino I, Osoegawa A, Yohena T, Kameyama T, Oki E, Oda S, Maehara Y. Loss of heterozygosity (LOH) in non-small cell lung cancer: difference between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Respir Med.* 2005 Mar;99(3):308-12.
122. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, Brzostowski EB, Riely GJ, Kris MG, Zakowski MF, Ladanyi M. Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-related KRAS-mutant Cancers. *Clin Cancer Res* 2012 Sep 26.
123. Okada M, Nishio W, Sakamoto T et al. Evolution of Surgical Outcomes for Nonsmall Cell lung Cancer: Time Trends in 1465 Consecutive Patients Undergoing Complete Resection. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 1926-1930.

9. Danksagung

Ich danke all den Menschen, die an mich geglaubt und mich unterstützt haben. Der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, dem Labor der Allgemeinen Chirurgie am UKE, dem Institut für Pathologie, Frau Prof. Kutsche, Herrn Prof. Bockhorn, Herrn Prof. Kalinin, Frau Dr. Kalinina und Frau Dr. Thieltges und vor allem danke ich meinem Mann und meiner Familie für ihre Unterstützung.

10. Curriculum Vitae

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: