UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki

Der Single Nucleotide Polymorphismus +1135 (A>C) des Platelet-derived Growth Factor B Gens als prognostischer Marker bei Lungenadenokarzinom-Patienten

Dissertation

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

vorgelegt von:

Adnan Duhovic
aus Foca

Hamburg 2015

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.11.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Bockhorn

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. W. Fiedler

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung..... 5

2. Einleitung..... 7
2.1 Übersicht..... 7
2.2 Therapie..... 8
2.3 Personalisierte Medizin und genetische Polymorphismen..... 10
2.3.1 Untersuchte Polymorphismen und Signalwege..... 11
2.3.2 Die Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Platelet Derived Growth Factor B (PDGF-B) Signalwege……..... 12
2.3.3 Der endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) Pathway..... 16

3. Material und Methoden..... 19
3.1 Patientenkollektiv..... 19
3.2 DNA Extrahierung, Sequenzierung und Genotypisierung..... 19
3.3 Statistische Verfahren..... 24

4. Ergebnisse..... 26
4.1 Studienkohorte..... 26
4.2 Polymorphismen..... 29

5. Diskussion..... 33

6. Zusammenfassung 38

7. Abkürzungsverzeichnis..... 40

8. Literaturverzeichnis..... 42

9. Danksagung..... 51

10. Lebenslauf..... 52

11. Eidesstattliche Erklärung 54

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Progress sowie das Größenwachstum maligner Erkrankungen und somit auch des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomes (Non-Small Cell Lung Cancer; NSCLC) ist von der Neovaskularisation abhängig. Hierbei ist der Zeitpunkt des sogenannten "Angiogenic Switch" von zentraler Bedeutung, da sich die Balance zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren zugunsten der proangiogenetischen Faktoren verschiebt (Baeriswyl et al. 2009). Aus diesem Grund sind neue anti-angiogenetische Therapien sowie Mechanismen mit einem vermuteten Einfluss auf die Tumorangiogenese der Gegenstand von zahlreichen Untersuchungen (Herbst et al. 2005). Diese Forschung resultierte u.a. mit der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen VEGF (Gridelli et al. 2007). Die an der Tumorangiogense beteiligten Proteine weisen eine Vielzahl von funktionellen Keimbahnpolymorphismen in ihren Genen auf und die Arbeitshypothese war, dass die unten ausgewählten Polymorphismen als prognostische Marker bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen dienen könnten.

Die untersuchten Polymorphismen in der vorliegenden Arbeit sind u.a. Teil des VEGF Signalweges, der seine proangiogenetischen Effekte primär über den VEGF Rezeptor 2 (VEFGR2) auf Gefäßendothelzellen vermittelt (Carmeliet et.al 2005). Allerdings führt die durch VEGF vermittelte Angiogenese zur Entstehung von desorganisierten, unreifen und durchlässigen Gefäßen. Die Reifung dieser Gefäße ist abhängig von perivaskulären Stromazellen, welche durch den platelet-derived Growth Factor beta (PDGF-B) aktiviert werden. Letzterer weist ebenfalls Polymorphismen auf, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind (Abramsson et al. 2003, Cao R et al. 2002, Cao R et al. 2003, Cao Y et al. 2009, Zhang et al. 2009).
Darüberhinaus werden die Angiogenese, die Gefäßpermeabilität und der Gefäßtonus durch die endotheliale Stickstoff-Monoxid Synthetase (eNOS) mittels Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst (Duda et al. 2004). Der eNOS Signalweg wiederum wird aktiviert durch VEGF, PDGF und Sphingosin 1-Phosphat (S1P).
Die Interaktion zwischen VEGF und eNOS Signalweg wird möglicherweise zusätzlich durch Polymorphismen beeinflusst bzw. moduliert.

Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit behandelt:

1.) Korrelieren die Keimbahnpolymorphismen der oben genannten Signalwege mit klinisch pathologischen Patientencharakteristika?
2.) Eignen sich diese Polymorphismen als prognostische Marker bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom?

2. Einleitung

2.1 Übersicht

Maligne Erkrankungen sind in den Industrieländern, inklusive Deutschland, die zweithäufigste Todesursache nach Herzkreislauferkrankungen. Im Jahr 2013 betrug der Anteil der Todesfälle durch maligne Erkrankungen 25% an den Gesamtsterbefällen (Statistisches Bundesamt Wiesbaden; Destatis).
Das Bronchialkarzinom macht bei Männern 14% und bei Frauen 7% aller neu aufgetreten malignen Erkrankungen aus. Die Inzidenz des Bronchialkarzinoms ist bei Männern 2,5 mal höher als bei Frauen, wobei sich die Inzidenz bei Frauen seit 1980 verdreifacht hat. Bei Männern ist die Inzidenz seit Anfang der 1990er Jahre rückläufig. Durch die schlechtere Prognose bei Männern macht der Anteil an Krebssterbefällen bei Männern 26% und bei Frauen 12% aus (GEKID, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2010).

Der Hauptrisikofaktor für Lungenkrebs ist das aktive und passive Tabakrauchen (Haldorsen et al. 1999). Der steigende Anteil an Raucherinnen in der Gesamtbevölkerung erklärt den Anstieg der Lungenkarzinominzidenz bei Frauen (Lortet-Tieulent et al. 2014). Als weitere Risikofaktoren gelten die natürliche Radonbelastung in Gebäuden sowie insbesondere im Rahmen von Berufskrankheiten die Asbestbelastung (Melloni et al. 2014). Bei Patienten, die sowohl Raucher sind als auch mit Asbest gearbeitet haben, steigt das Risiko exponentiell. Die Asbestose und deren Folgeerkrankungen sind als Berufserkrankung in Deutschland anerkannt (Frost et al. 2011). Weitere seltenere Risikofaktoren beinhalten die Exposition gegenüber Arsen, Chlormethylether, Chrom, Senfgas und polyzyklische Kohlenwasserstoffe (Syrigos et al. 2006).

Das Bronchialkarzinom wird üblicherweise histologisch unterteilt in das kleinzellige (SCLC; Small Cell Lung Cancer) und nicht-kleinzellige (NSCLC) Karzinom. Letzteres lässt sich wiederum weiter unterteilen in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, großzellige undifferenzierte Karzinome und noch eine Reihe weiterer seltener Subtypen. Der historisch am häufigsten auftretende Subtyp ist das Plattenepithelkarzinom, gefolgt vom Adenokarzinom, wobei in den letzten Jahren

eine Umkehr der Inzidenzrate zu beobachten ist (Lortet-Tieulent et al. 2014). Die Ursache für diese Veränderungen in den Inzidenzraten ist noch nicht vollends geklärt. Es gibt Hinweise, dass Unterschiede in der Zusammensetzung der verkauften Zigaretten in den letzten 50 Jahren mitbeteiligt sind. So ist der Nikotin- und Teergehalt pro Zigarette gesunken, der Nitratgehalt hingegen ist gestiegen (Wynder et al. 1995). Die Prognose der Erkrankung ist ebenfalls abhängig vom histologischen Subtyp. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei den nicht-kleinzelligen variiert zwischen 13 und 19%. Bei der kleinzelligen Variante überschreitet die 5-Jahres-Überlebensrate die 5% Marke nicht (Syrigos et al 2006).

Lungenkrebs wird üblicherweise erst spät im Krankheitsverlauf entdeckt und somit haben bei Diagnosestellung 80% der Patienten einen disseminierten und nicht resezierbaren Tumor. In 90% der Fälle präsentieren sich die Patienten mit klinischen Symptomen bei der Diagnosestellung. Zufallsbefunde in der Bildgebung stellen die Ausnahme dar. Symptome entstehen durch das Lokalwachstum des Primärtumors, seine Ausbreitung in die angrenzenden intrathorakalen Strukturen, Fernmetastasen, nichtspezifische systemische Effekte und paraneoplastische Symptome (Leitlinie: “Lungenkarzinom - Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge" 2010; Gerber et al 2002). Zu den klassischen Symptomen gehören länger anhaltender Husten, teils mit Auswurf und Gewichtsverlust. Zu den Spätsymptomen zählen Hämoptysen sowie verschiedene paraneoplastische Symptome (Syrigos et al 2006).

2.2 Therapie

Im klinischen Alltag hat sich aus therapeutischen Gründen die Unterteilung in kleinzellige (SCLC) und nicht-kleinzellige (NSCLC) Karzinome bewährt. Das Staging der Erkrankung erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation (T-Primärtumor; N-Lymphknoten; M-Fernmetastasierung) und lässt sich nach UICC (Union internationale contre le cancer) weiter in Stadien unterteilen (Tabelle 1).
Gemäß den deutschen Leitlinien der Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin ist beim NSCLC in frühen Stadien (I-II) die radikale Operation Therapie der Wahl, adjuvant sollte bei R0 Resektion in Stadium II eine Chemotherapie durchgeführt werden. Bei R1 Resektion sollte eine Nachresektion

erfolgen, falls dies nicht möglich ist, wird eine Bestrahlung mit etwa 60Gy empfohlen. Alternativ kann bei nicht operablen Patienten auch eine kurative Radiotherapie durchgeführt werden mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 40% in Stadium I. In Stadium III sollte neben einer adjuvanten Chemotherapie bei mediastinalem Lymphknotenbefall eine postoperative Mediastinalbestrahlung durchgeführt werden. Bei operablen Tumoren kann eine präoperative (neoadjuvante) Induktions-Chemotherapie oder Radiotherapie erwogen werden. Bei nicht resezierbaren, lokal begrenzten Tumoren kann alternativ eine Platin basierte Chemotherapie in Kombination mit einer Radiotherapie durchgeführt werden (Leitlinie: “Lungenkarzinom - Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge" 2010, Felip E et.al 2005).

Beim kleinzelligen Lungenkarzinom steht aufgrund der hohen Zellteilungsrate die Chemotherapie im Vordergrund. Bei lokalisierten Erkrankungen (T1-2 N0-1) kann eine Operation mit einer Chemotherapie und Radiatio des Schädels kombiniert werden, ansonsten ist die Therapie der Wahl die Chemotherapie, ggf. in Kombination mit einer Radiotherapie. Die SCLC sind charakterisiert durch eine initial hohe Responserate auf Chemo- bzw. Radiotherapie, allerdings im Verlauf auch durch eine Therapieresistenz bei metastasierten Erkrankungen (Leitlinie: “Lungenkarzinom - Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge" 2010, Früh et.al. 2013).

Tabelle 1: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC 7. Auflage (Leitlinie Lungenkarzinom, 2010)

UICC Stadium	TNM Stadium (Primärtumor, Lymphknoten, Fernmetastasen)
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 gleicher Lappen N0 M0
Stadium IIIA	T1, T2 N2 M0 T3 N1, N2 M0 T3 gleicher Lappen N1 M0 T3 gleicher Lappen N2 M0 T4 Ausdehnung N0 M0 T4 Ausdehnung N1 M0 T4 Herd ipsilateral N0 M0 T4 Herd ipsilateral N1 M0
Stadium IIIB	Jedes T N3 M0 T4 Ausdehnung N2 M0 T4 Herd ipsilateral N2 M0
Stadium IV	Jedes T Jedes N M1

2.3 Personalisierte Medizin und genetische Polymorphismen

Die personalisierte Medizin respektive individualisierte Diagnostik und Therapie sind in den letzten Jahren ein zentrales Thema in der medizinischen Forschung

geworden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine erhöhte Tumorvaskularisation als auch die Expression von proangiogenetischen Faktoren wie z.B. VEGF mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Weiters wurde gezeigt, dass genetische Polymorphismen einen Einfluss auf Krankheitsverlauf und Therapieerfolg haben (Rosell et al. 2003). Angiogenesefaktoren, welche an der Tumorangiogenese beteiligt sind, weisen genetische Polymorphismen auf, welche biologisch aktiv sind und somit einen Einfluss auf die Tumorangiogenese haben können. Maeda et al. konnten anhand von VEGF zeigen, dass manche Polymorphismen die Proteinexpression beeinflussen und andere Polymorphismen wiederum keine Wirkung auf die Expression zeigen (Brown et al. 1997, Dvorak et al. 1995, Folkman et al. 1971, Maeda et al. 2013).

In einer Population entstehen durch Mutationen Variationen in der Genomsequenz. Wenn der Unterschied hierbei lediglich im Austausch einer Base besteht, spricht man von einem Single Nucleotide Polymorphismus (SNP), bei Verlust einer Base von Deletionspolymorphismus und bei Einfügen einer Base von Insertionspolymorphismus. Die SNPs können im kodierenden oder im nicht kodierenden Anteil eines Gens oder in Regionen zwischen den Genen auftreten. Mutationen innerhalb des kodierenden Anteils des Gens können entweder synonym sein (Protein ändert sich nicht) oder nicht synonym sein (Genprodukt ändert sich). Auch Mutationen in nichtkodierenden Teilen eines Gens können z.B. das Gensplicing, die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder die Sequenz von nicht-kodierender RNA beeinflussen. Die verschiedenen Varianten innerhalb einer Population im kodierenden Teil eines Gens bezeichnet man als Allel. Da Menschen einen diploiden Chromosomensatz besitzen, kann eine Person homozygot (zwei gleiche Allele) oder heterozygot (zwei verschiedene Allele) für ein Allel sein. Je nach Vererbungsmuster kann ein Allel dominieren oder es liegt eine Kodominanz vor (Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014).

2.3.1 Untersuchte Polymorphismen und Signalwege

Um den Einfluss von Keimbahn-Polymorphismen bei Patienten mit NSCLC zu untersuchen, wurden bereits vorbeschriebene Polymorphismen der VEGF-, PDGF-

und eNOS Signalwege ausgewählt. Voraussetzung für die Auswahl der Polymorphismen war, dass diese bereits gut dokumentiert und etabliert sein mussten, gemäß vorangegangenen Publikationen möglichst einen funktionellen Einfluss auf mRNA Prozessierung, Stabilität oder die Translation der Zielgene aufwiesen und bisher noch nicht auf ihren Wert als potentielle prognostische Marker beim NSCLC untersucht worden waren. Weiterhin musste die seltenere homozygote Allelfrequenz mindestens 5% in kaukasischen Patientenkollektiven betragen (National Center for Biotechnology Information Databank; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Insgesamt wurden sieben Keimbahnpolymorphismen ausgewählt und eine Genotypisierung in den NSCLC-Proben der Patienten durchgeführt. (S1PR1 -1577 G>T, rs2038366; S1PR1 -532 C>G rs59317557; VEGFR2 -2854 T>G, rs1551645; VEGFR2 +23408 A>C, rs7655964; eNOS +894 G>T, rs1799983; eNOS Intron 4 VNTR; PDGFB +1135 A>C, rs1800817)

Folgend werden die genannten Signalwege und die ausgewählten Polymorphismen detailliert beschrieben.

2.3.2 Die Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Platelet Derived Growth Factor B (PDGF-B) Signalwege

Der VEGF Signalweg hat einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die physiologische als auch auf die pathologische Angiogenese etwa im Rahmen des Tumorwachstums. VEGF gehört zu einer Genfamilie, welcher VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD und der Plazentare Wachstumsfaktor (PLGF) angehören. VEGFA spielt eine Schlüsselrolle in der Angiogenese, VEGFC und VEGFD in der Lymphangiogenese. VEGF fördert bei Gefäßendothelzellen (EC) Proliferation, Migration und führt zu einer Änderung der Genexpression. Gleichzeitig jedoch bewirkt VEGF bei Endothelzellen eine Hyperpermeabilität, wodurch Plasmaproteine in den extravasalen Raum gelangen und extravasales Fibrinogen polymerisiert. Das extravasale Fibrin dient als eine provisorische Matrix, die das Wachstum von neuen Blutgefäßen und Mesenchymzellen fördert, welche wiederum zur Entstehung eines reifen und vaskularisierten Stromas beitragen. Die durch VEGF ausgelöste

Hyperpermeabiltät und der Übertritt von Plasmaproteinen in den extravasalen Raum scheinen somit eine zentrale Rolle in der Angiogenese zu spielen (Ferrara et al. 2003, Dvorak et al. 1995). Die VEGF Genexpression wird beeinflusst durch den Sauerstoffpartialdruck, wobei geringe Sauerstoffpartialdrücke die VEGF mRNA Expression induzieren. Auch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Onkogenen spielen eine Rolle in der Regulation der VEGF Expression, hierzu gehören der Epidermal Growth Factor (EGF), der Transforming Growth Factor alpha und beta (TGF), der Insulin like Growth Factor 1 (IGF-1) sowie der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Ferrara et al. 2003).
VEGF vermittelt seine Wirkung über die Tyrosinkinase Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Hierbei scheint die VEGFR-2 Aktivierung entscheidend für die Angiogenese zu sein (Ferrara et al. 2003). Der VEGFR-2 Level korreliert mit der Wachstumsrate, der Mikrogefäßdichte, Proliferation sowie mit der Metastasierungswahrscheinlichkeit bei verschiedenen Tumoren (Takahashi et al. 1995, Hara et al. 2006).
Es gibt eine Reihe von funktionellen Keimbahnvariationen im VEGFR-2 Gen, von diesen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei ausgewählt (-2854T>G, rs1551645 und +23408 A>C, rs7655964), bei denen ein biologischer Effekt auf die DNA Bindung respektive die mRNA Expression nachgewiesen werden konnte (Glubb et al. 2011).

Der Platelet derived Growth Factor (PDGF) ist ein Glykoprotein, welches von Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen produziert wird. Es liegt vor als Hetero- oder Homodimer, bestehend aus PDGF-A oder PDGF-B Ketten, welche kovalent durch Disulfidbrücken gebunden sind. Es besteht somit eine AA, BB oder AB Isoform. Seit kurzem ist auch eine PDGF-C sowie PDGF-D Kette bekannt, wodurch zwei weitere Isoformen hinzukommen (PDGF-CC und PDGF-DD) (Andrae et al. 2008). Bei PDGF-C und PDGF-D sind keine Heterodimere bekannt. Sämtliche PDGFs haben eine gemeinsame typische Wachstumsfaktordomäne. Diese ist beteiligt an der Dimerisierung der zwei Untereinheiten, Rezeptorbindung und Aktivierung. Die Wachstumsfaktordomäne der PDGFs zeigt eine hohe Übereinstimmung mit der entsprechenden Domäne der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Wachstumsfaktoren mit einer Länge von in etwa 100 Aminosäuren. Diese homologe VEGF/PDGF Domäne ist eine evolutionär in zahlreichen Organismen wie z.B. auch in der Drosophila anzutreffende

Aminosäurestruktur. Wenn man die verschiedenen PDGF Ketten miteinander vergleicht, erkennt man, dass diese im Laufe der Evolution durch Duplikation von Ursprungsgenen entstanden sind. Die Gene, die für PDGF kodieren, finden sich auf vier verschiedenen Chromosomen. Die Gene, die für PDGF-A sowie PDGF-B codieren, finden sich auf Chromosom 7 und 22, während PDGF-C und-D auf Chromosom 4 und 11 beheimatet sind. Die Gene für PDGF-A und –B bestehen aus 7 Exons. Exon 1 entspricht der Signalsequenz, Exon 2 und 3 sind Präkursorsequenzen, die beim Prozessieren im Golgi Apparat entfernt werden. Exon 4 und 5 entsprechen der Wachstumsfaktor Domäne und Exon 6 entspricht der C-terminalen Sequenz (Fredriksson et al. 2004).

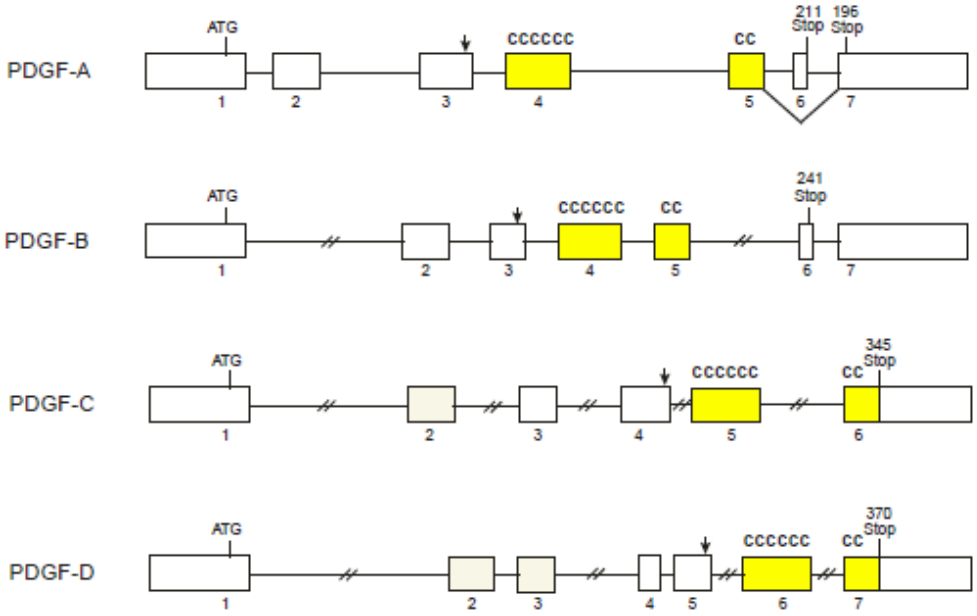

Abbildung 2: Struktur der Gene, die für die PDGF-Ketten kodieren. Die Exons, die für die VEGF/PDGF Domäne kodieren sind gelb markiert. PDGF-A hat durch alternatives Splicing zwei Isoformen (Li et.al 2003).

Die PDGF Gene werden in verschiedenen Geweben im Körper exprimiert mit einem einzigartigen Expressionsmuster für jede Isoform in den verschiedenen Organen. PDGF-A wird in den meisten Gewebearten exprimiert, am stärksten in Herz, Pankreas und Skelettmuskel. PDGF-B wird ebenfalls am meisten in Herz und Plazenta exprimiert, aber auch im Vergleich zu den anderen Isoformen am stärksten in der Lunge. Die Rezeptoren des PDGF heißen PDGFR-alpha sowie PDGFR-beta, es handelt sich hierbei um Tyrosinkinaserezeptoren (Fredriksson et.al 2004).

In Studien zeigte sich, dass PDGF-B beteiligt ist an der Rekrutierung von Perizyten in Gehirnkapillaren sowie glomerulären Nierenkapillaren. Es zeigte sich, dass die endotheliale Expression von PDGF-B lediglich auf unreife Kapillaren sowie das Endothel von wachsenden Arterien beschränkt war. Diese Beobachtungen zeigen die Rolle von PDGF-B in der Zellproliferation von glatten Muskelzellen und Perizyten (Hellström et.al 1999).

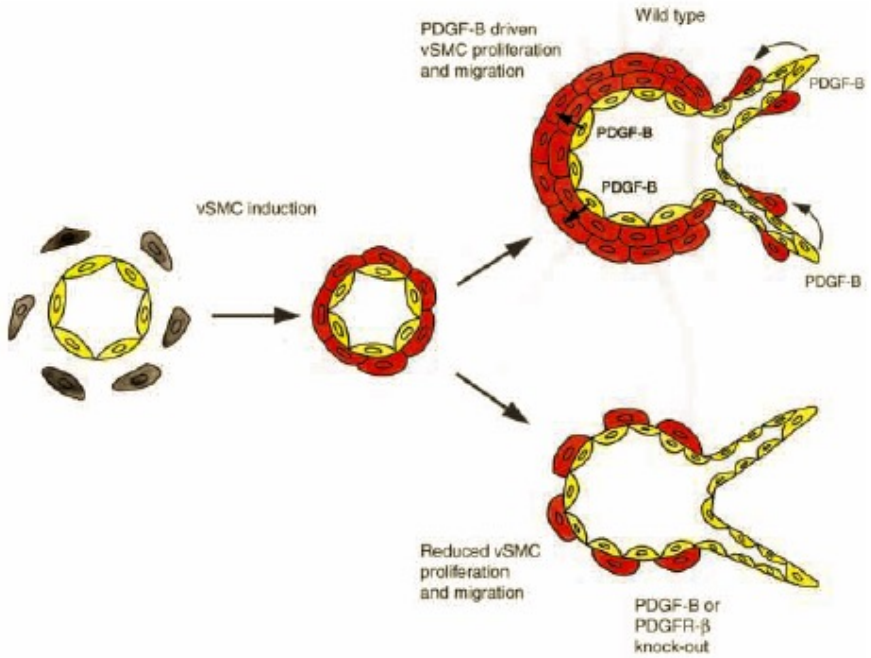

Abbildung 3: Bedeutung von PDGF-B in der Neovaskulogenese: Undifferenzierte Mesenchymzellen (grau) umschließen das neu entstandene Endothelialrohr (gelb) und vereinigen sich zur Gefäßwand (rot). PDGF-B wird von den Endothelzellen freigesetzt, es kommt zur Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen. Bei Mangel an PDGF-B kommt es zu einer verminderten Proliferation und Migration der Pericyten und glatten Muskelzellen (Hellström et al. 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass PDGF neben der Vaskulogenese auch eine wichtige Rolle in der Lymphangiogenese spielt und in weiterer Folge somit auch in der lymphogenen Metastasierung. In Experimenten mit der Kornea von Mäusen konnte beobachtet werden, dass sowohl PDGF-A als auch PDGF-B das Wachstum von lymphatischen Gefäßen induzieren (Cao et al. 2004). In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit NSCLC und Lymphknotenmetastasierung, die Expression von PDGF-A sowie auch die des

Rezeptors PDGFR-alpha signifikant erhöht ist. Die PDGF-A Expression korreliert laut Donnem et al. somit mit der Lymphknotenmetastasierung (Donnem et al. 2010).
Es zeigte sich weiter, dass PDGF-A ein essenzieller autokriner Regulator für die VEGF-A Expression ist (Shikada et al. 2005).
Während VEGF-A bekanntermaßen an der Angiogenese beteiligt ist, hat sich herausgestellt, dass es auch eine Rolle in der Lymphangiogense spielt (Donnem et al. 2009).
Donnem et al. konnten weiterhin zeigen, dass die Expression von PDGF-B zusammen mit VEGF 3 mit einer signifikant schlechteren Überlebensrate bei Patienten mit NSCLC einhergeht. Die Autoren vermuten, dass der prognostische Wert der proangiogenetischen Faktoren abhängig ist von der Tumorgröße und es konnte gezeigt werden, dass PDGF-B ein starker unabhängiger prognostischer Faktor in T2a Tumoren ist (Donnem et al. 2010).
Im PDGF-B Gen wurde ein SNP in Intron 1 an Position +1135C/A (rs1800817) untersucht. Dieser soll gemäß vorangegangener Untersuchungen die Affinität von PDGF-B zu seinem Rezeptor PDGFR-ß beeinflussen, wobei die exakte funktionelle Aktivität noch nicht abschließend geklärt ist (Ben-Ari et al. 2006; Tambur et al. 2006).

2.3.3 Der endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) Pathway

Die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase (eNOS) ist ein Stickstoffmonoxid produzierendes Enzym, dass die Angiogenese und Vaskulogenese fördert. Eine Reihe von proangiogenetischen Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGFB, S1P und Angiopoietin1 (Ang1) führt zur Aktivierung der eNOS (Duda et al. 2004).
VEGF und PDGFB aktivieren eNOS indirekt durch einen Anstieg der Sphingosin 1-Phosphat Rezeptor 1 (S1PR-1) Dichte auf Endothelzellen (Igarashi et al. 2003). Die Aktivierung wird vermittelt durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration. ENOS katalysiert als Enzym die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO). Das NO beeinflusst eine Reihe physiologischer Funktionen wie Neovaskularisation, Gefäßtonus, Plättchenaggregation, Gefäßpermeabilität und Leukozyten-Endothel Interaktion (Förstermann et al. 2012).

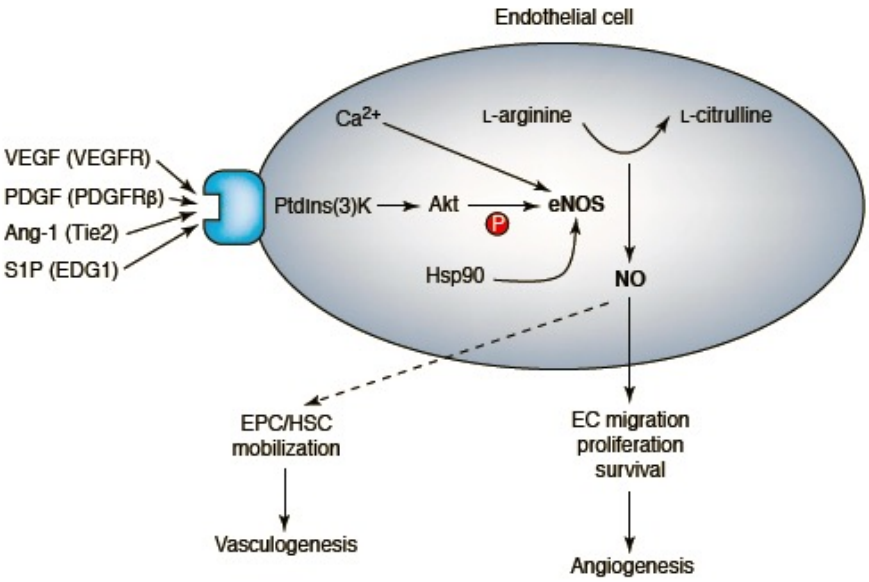

Abbildung 1: Induktion Neovaskularisation durch eNOS (Duda et al. 2004)

Es wurden zwei SNPs im eNOS Gen untersucht. Ersterer befindet sich in Exon 7 (+849T/G, rs1799983) und führt in vivo experimentell bei einer venösen Okklusionsplethysmographie der Brachialarterie zu einer verminderten basalen NO-Produktion (Veldman et al. 2002). Der zweite Polymorphismus ist ein Tandemrepeatpolymorphismus (VNTR-Variable Number Tandem Repeat) in Intron 4 des eNOS Gens (NOS3). Eine hohe Repeatsequenz führt hierbei laut in vitro Untersuchungen in humanen aortalen Endothelzellen zu einer verminderten eNOS mRNA Expression (Zhang et al. 2008). In einer Studie von Fujita et al. konnte gezeigt werden, dass der VNTR Polymorphismus bei Patienten mit fortgeschrittenen NSCLC signifikant mit der Überlebensrate assoziiert ist. Der am weitesten verbreitete Genotyp b/b hat eine schlechtere Prognose als der a-Allel Typ. Die Autoren glauben, dass beim kürzeren a-Allel Typ geringere Mengen an 27-nt small RNA produziert werden, welche aufgrund von Histon Acetylierung und DNA Methylierung die m-RNA Produktion verringern (eine kürzere Repeatsequenz besitzt ein höheres Level an eNOS mRNA Produktion) (Zhang et al. 2008, Fujita et al. 2010). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass NO welches von eNOS produziert wird, bekanntermaßen durch DNA Schäden zytotoxisch auf Tumorzellen wirkt. (Sonveaux et.al 2009) Mortensen et.al konnten zeigen, dass bei prämenopausalen Patientinnen mit Mamma-Karzinom in peritumoralen Mikrogefäßen immunreaktiv eNOS exprimiert wurde und dass dies ein positiver prognostischer Faktor war (Mortensen et al. 1999).

Das Gen für den Rezeptor der Sphingosine 1-Phosphatase S1PR1 weist zwei SNPs im Promotor auf (-1577G/T, rs2038366 und -532C/G, rs59317557), welche in vitro die Rezeptorexpression beim Menschen beeinflussen und einen Einfluss auf die Sensitivität, der durch VEGF und PDGF vermittelten Induktion des S1PR-1 haben. Als Antwort auf Wachstumsfaktoren wie PDGF und VEGF kommt es beim -532C/G Polymorphismus zu einer erhöhten Transkription von S1PR1 (Sun et.al 2010). VEGF und PDGF aktivieren eNOS sowohl direkt als auch indirekt über eine Erhöhung des S1PR1 in den Endothelzellen (Igarashi et.al 2003; Igarashi et.al 2007).

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Die Studie wurde von der Hamburger Ärztekammer genehmigt und ist in Übereinstimmung mit den Empfehlungen für prognostische Tumormarkerstudien (Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies - REMARK) (Mc Shane et al. 2005). Es wurden insgesamt 554 Patienten (n=554), welche von 1996 bis 2012 aufgrund eines primären nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms operativ behandelt wurden, für den Einschluss in die Studie evaluiert. Die Ausschlusskriterien für die Studie umfassten synchrone maligne Zweiterkrankungen, palliative Operationen, andere histopathologische Diagnosen als Adenokarzinom oder Plattenepithelkarzinom der Lunge, nicht vorhandene DNA-Proben oder ein fehlendes schriftliches Einverständnis der Patienten. Das Studienkollektiv umfasste schlussendlich 228 Patienten. Die klinisch-pathologischen Daten wurden einer prospektiven Datenbank entnommen und die Nachsorge Daten wurden durch Befragung von Hausärzten oder der Patienten in der Nachsorgeambulanz akquiriert. Alle Patienten wurden rückwirkend nach der aktuell gültigen siebenten Version der TNM Klassifikation eingeteilt (Ma et al. 2001). Die Patienten mit einem Stadium ≥ II (Tabelle 1) erhielten nach 2004 eine adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin und Vinorelbin. Patienten mit einem Stadium Ib erhielten eine adjuvante Therapie bei einer Tumorgröße >4cm sowie bei Lymphknotenbefall (L+) oder Veneninvasion (V+). Eine auf die adjuvante Chemotherapie folgende Bestrahlung (50-60Gy) wurde abhängig vom Gesamtzustand des Patienten nach der Operation durchgeführt.

3.2 DNA Extrahierung und Genotypisierung

Die DNA wurde aus EDTA-Blut nach einem Standardverfahren mit Hilfe des QIAamp kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die DNA Konzentration wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (Wilmigton, Deutschland) bestimmt. Dann wurden die DNA Proben mit sterilem Wasser (DNase frei, RNase frei, Sigma-Aldrich®, USA) auf eine Konzentration von 10ng/µl verdünnt und bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt die Basis der Genotypisierung dar. Die PCR ist ein Verfahren zur in vitro Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten. Zur Durchführung einer PCR benötigt man DNA mit dem zu vervielfältigenden Abschnitt sowie 2 Primer, welche den Startpunkt der Reaktion auf den 2 DNA Strängen bilden. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist die DNA-Polymerase (zb. Taq Polymerase), diese ist ein Enzym, welches die Replikation katalysiert. Eine wichtige Anforderung an die Polymerase ist, dass sie auch bei hohen Temperaturen nicht zerstört wird, weshalb sie aus thermophilen Bakterien gewonnen wird. Es werden außerdem Desoyribonukleinsäuretriphosphate zum Aufbau des neuen DNA Stranges, Mg2+ Ionen sowie eine Pufferlösung benötigt. Das oben genannte Reaktionsgemisch wird in einem sogenannten Thermocycler erhitzt auf eine Temperatur, die zur Denaturierung des Original-DNA Stranges führt und die Polymerasekettenreaktion in Gang setzt. Die Reaktion setzt sich aus 3 Abschnitten zusammen. Der erste Schritt ist die Denaturierung bei einer Temperatur von ca 94-96°C, hierbei wird die doppelsträngige DNA durch Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen getrennt. Der zweite Schritt ist die Hybridisierung der Primer mit den Einzelsträngen, welche bei einer niedrigeren Temperatur erfolgt. Als letzter Schritt erfolgt die Elongation (Amplifikation), hierbei katalysiert die DNA-Polymerase die Synthetisierung eines zweiten DNA Stranges. Die freien Nukleotide binden am 3` Ende des Primers und im weiteren Verlauf der Amplifikation binden die freien Nukleotide am 3`Ende des vorangegangenen Nukleotids. Diese drei Schritte werden mehrfach wiederholt. Das PCR Produkt kann anschließend klassisch in ein Agarose-Gel eingebracht und anschließend eine Spannung angelegt werden. Aufgrund der Ladung der DNA Fragmente bewegen sich diese in Richtung des Pluspoles. Da die DNA Fragmente sich, abhängig von ihrer Länge, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit bewegen, werden diese somit aufgetrennt. Die Länge der PCR Produkte kann mittels einer DNA Leiter festgestellt werden, die DNA Fragmente mit bekannter Größe enthält und ebenfalls mit den zu untersuchenden Proben in der Elektrophorese mitläuft.

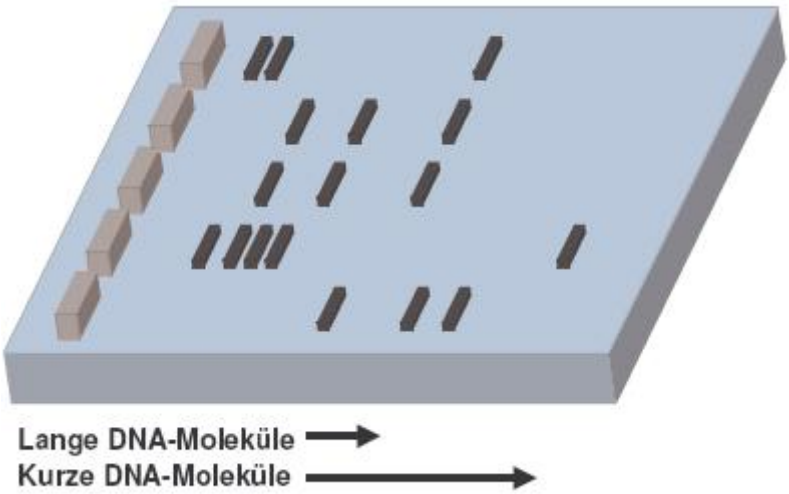

Abbildung 2: Schema DNA Gel-Elektrophorese (www.fginfo.tu-berlin.de)

Eine Weiterentwicklung der klassischen Elektrophorese zur Analyse von größeren Mengen an DNA im Sinne einer Hochdurchsatzmethode ist die Kapillarelektrophorese. Diese kann die Gel-Elekrophorese ersetzen und basiert auf der Trennung von geladenen Teilchen im Rahmen der Bewegung in einem Kapillarrohr unter Einfluss eines elektromagnetischen Feldes. Für die PCR werden Floureszenz-Farbstoff markierte Primer verwendet. Die Kettenabbruchprodukte werden im Anschluss mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, von einem Laser zur Floureszenz angeregt und von einem Detektor registriert. Hierdurch ist es möglich, DNA Fragmente unterschiedlicher Länge anhand ihrer Floureszenz zu detektieren (Nationales Genomforschungsnetz).

Eine weitere Option zur Genotypisierung stellt die real time (Echtzeit) PCR dar und ermöglicht eine Quantifizierung der DNA mittels Floreszenz Farbstoffen. Häufig werden hierbei TaqMan® Sonden verwendet, im Reaktionsgemisch sind bereits genotypspezifische Primer enthalten, die jeweils am 5´ Ende ein Reporter-Fluorophor enthalten, dessen Floureszenz durch einen Quencher mittels strahlungsfreier Energieübertragung (FRET-Förster Resonanzenergietransfer) unterdrückt wird. Die zur DNA-Probe kompatible Sonde hybridisiert während des PCR Zyklus mit der DNA und die Taq-Polymerase baut aufgrund ihrer 5'3' Exonukleaseaktivität das 5´Ende der Sonde ab. Die Floureszenz des Reporters wird somit nicht mehr vom Quencher unterdrückt und kann gemessen werden (Abbildung 3).

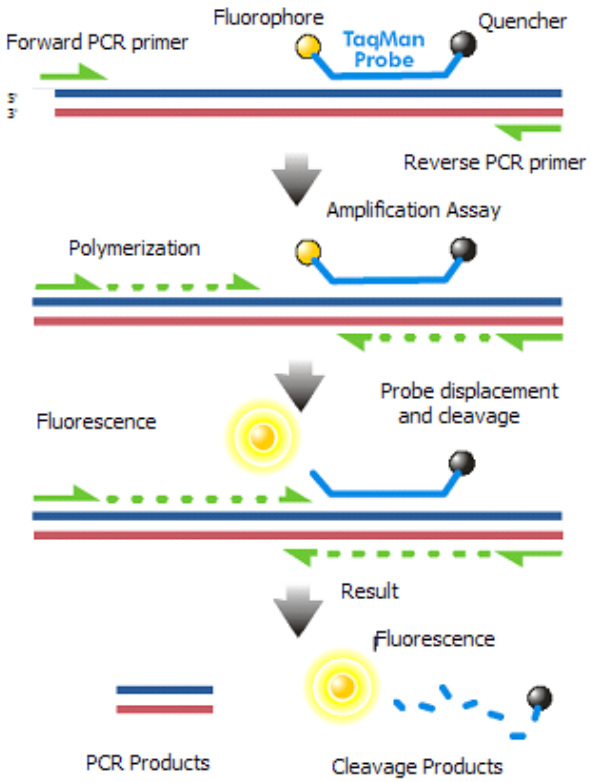

Abbildung 3: Real Time PCR mit TaqMan® Sonden (www.wikipedia.org)

Die Genotypisierung der SNPs wurde gemäß dem etablierten TaqMan® Protokoll, wenn möglich mit fertigen TaqMan® Assays (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), durchgeführt. Jeder Lauf beinhaltete hierbei eine Positivkontrolle für jeden Genotyp mit Verifizierung mittels Sequenzierung.

Für den PDFGF-B +1135 A>C Polymorphismus war kein fertiges Assay verfügbar. Die Genotypisierung wurde hier mittels einer klassischen Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Gelelektrophorese, kombiniert mit einer Kapillarelektrophorese, durchgeführt (Perrey et al. 1999). Für die Detektierung des A zu C Polymorphismus von PDGF-B +1135 wurde ein Gemisch aus drei Primern verwendet. Dieses umfasste einen Sense Primer mit positiver Polarität (5´-TGTTCTCGGGTTCCCAAAGG–3) und zwei Antisense Primer mit negativer Polarität (5′- ATTCATTACCTTCGCCCCCC-3′ mit 5'FAM Modifikation und 5´-ATTCATTACCTTCGCCCCCA–3´ mit 5´HEX Modifikation). Die Größe des PCR Produkts umfasste 263 bp. Die internen Kontrollprimer haben das humane Wachstumshormon Gen amplifiziert mittels eines Sense Primers (5´-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3) und eines fluoreszierenden Antisense Primers (5´-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3´) mit 5´FAM Modifikation. Die Größe des PCR Produkts umfasste 429bp. Die PCRs wurden mit 10µl Reaktionsgemisch

bestehend aus 10ng extrahierter DNA, 1mM Desoxyribonukleinsäure-3phosphat Gemisch (Invitrogen, Darmstadt, Germany), 2µM Sense und Antisense Primer (MWG, Ebersberg, Germany) und 8,5% Nuklease freien Wassers durchgeführt. Das PCR-Protokoll bestand aus wiederholten Zyklen bei 95°, 55°, 59° und 72°C für 35 bis 50 Sekunden. Die Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde gemessen durch Kapillarelektrophorese mittels eines ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Hierfür wurde ein Gemisch aus 0,1µl PCR Produkt, 40ml Formamid (HiDi) und 0,2µl Genescan-500ROX Standard für 2 Minuten bei 94°C denaturiert.

Der 27 Basenpaare große Tandemrepeatpolymorphismus (VNTR) auf Intron 4 des eNOS Gens wurde mittels einer klassischen Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt. Hierfür wurde ein Sense Primer (5´- AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3´) und ein fluoreszierender Antisense Primer (5′-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3′) mit 5´FAM Modifikation verwendet. Die PCRs wurden mit einem 10 µl Reaktionsgemisch bestehend aus 10ng extrahierter DNA, 2,5 µMol Desoxyribonukleinsäure-3phosphat Mix (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), 2,5µMol Sense und Antisense Primer (MWG, Ebersberg, Deutschland), 0,025 U Ampli Taq Gold Polymerase (Applied Biosystems, Carslbad, USA), 50% Dimethylsulfoxid Lösung und Nuklease freiem Wasser durchgeführt. Die PCR beinhaltete wiederholte Zyklen bei 95°, 55° und 72°Celsius für eine Dauer von 60 Sekunden bis 2 Minuten. Die Größe des PCR Produkts betrug entweder 392 Basenpaare bei einem kurzen 4-Wiederholungen (Repeat) Allel oder 420 Basenpaare bei einem langen 5-Wiederholungen (Repeat) Allel. Die Größe des amplifizierten Fragments wurde auch hier mittels Kapillarelektrophorese bestimmt. Zur Qualitätskontrolle wurden 10% der untersuchten Proben zufällig ausgewählt und eine erneute Genotypisierung durchgeführt. Die Konkordanz der Ergebnisse betrug >98%.

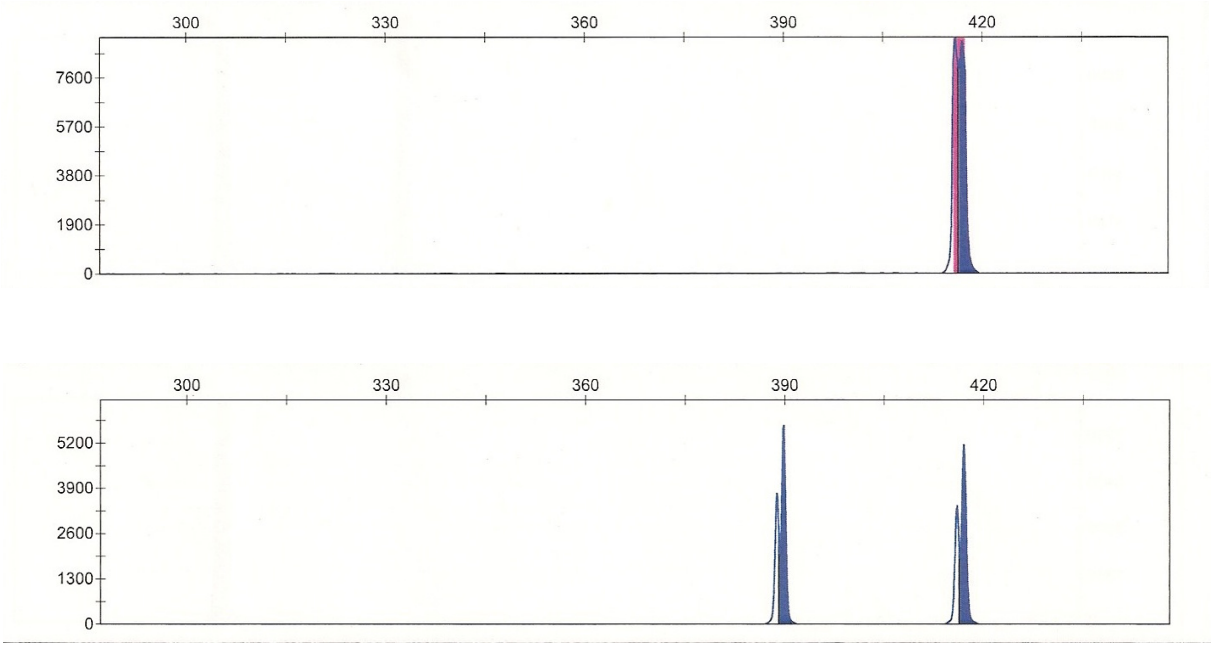

Abbildung 4+5: Beispiele für Auswertung des VNTR Polymorphismus von eNOS nach Kapillarelektrophorese mittels ABI PRISM

Für die PCR werden ein Sense Primer sowie ein floureszierender Antisenseprimer hinzugegeben. Es entstehen zwei DNA-Produkte unterschiedlicher Länge: ein kurzes Allel mit 4 Wiederholungen und einer Größe von 392 Basenpaaren und ein langes Allel mit 5 Wiederholungen und einer Größe von 420 Basenpaaren. Mittels der Anregung des floureszierenden Primers durch einen Laser und der Aufzeichnung durch einen Detektor kann die Länge der DNA Fragmente gemessen werden.

In der Probe in Abbildung 4 kann man zwei Ausschläge bei 420 Basenpaaren erkennen, was bedeutet, dass diese Probe homozygot für das lange Allel ist. In Abbildung 5 erkennt man einen Ausschlag bei 392 Basenpaaren und einen bei 420, diese Probe besitzt somit ein kurzes und ein langes Allel und ist somit heterozygot.

3.3 Statistische Verfahren

Für die statistische Analyse wurde SPSS 21.0 für MAC (SPSS Inc., Chicago, IL) genutzt. Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde eine etwaige Korrelation zwischen Polymorphismen und klinisch-pathologischen Daten untersucht. Homozygote und heterozygote Risikogenotypen wurden, im Falle einer homozygoten Risikogenotypfrequenz von ≤10% zusammen in einem dominanten Modell kombiniert. Die Überlebenskurven der Patienten wurden anhand der Kaplan-Meier Methode erstellt und mittels log Rank Test analysiert. Die Daten für das Überleben werden dargestellt als Mittelwerte mit einer Standardabweichung und einem Konfidenzintervall von 95% (95% KI) sowie als Zahl der Risikopatienten (Number of

patients at risk). Durchschnittswerte werden insbesondere angegeben und gekennzeichnet für den Fall, dass die mediane Überlebenszeit nicht erreicht wird.
Als Gesamtüberlebenszeit (Overall Survival - OS) wird jener Zeitraum bezeichnet vom Tag der Operation bis zum Tod oder dem letzten Kontakt, je nachdem welches Ereignis innerhalb der ersten 60 Monate als erstes auftrat. Als rezidivfreie Überlebenszeit (Disease Free Survival - DFS) wurde jener Zeitraum definiert, beginnend vom Tag der Operation bis zum Datum der Diagnose eines Rezidivs, des letzten Kontakts zum Patienten oder des Todes, je nachdem welches Ereignis als erstes innerhalb der ersten 60 Monate auftrat.
Patienten, die innerhalb von 30 Tagen nach der Operation verstorben sind (Krankenhausmortalität) sowie lebende Patienten ohne Rezidiv beim letzten Kontakt oder nach 60 Monaten wurden zensiert. Für die multivariate Analyse wurde das Cox Regressions Modell genutzt. Die Resultate wurden als Hazard-Ratio und mit einem Konfidenzintervall von 95% angegeben. Als signifikant werden Ergebnisse mit einem p-Wert von <0,05 bei zweiseitigem Test angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Studienkohorte

Die ursprüngliche Studienkohorte setzte sich aus 228 kaukasischen Patienten, die von 1996 bis 2012 behandelt wurden, zusammen. Das mediane Alter der Studienpopulation betrug 64,4 Jahre (37,5- 91,9 Jahre). Keiner der Patienten erhielt eine neoadjuvante Therapie. In der Studienkohorte fanden sich elf Patienten mit Fernmetastasen (singuläre Hirnmetastasen, Operation des Primarius nach neurochirurgischer Resektion) und insgesamt 21 Patienten zeigten positive Resektionsränder nach der Operation. Es wurden 14 Patienten, die innerhalb von 30 Tagen nach der Operation verstorben sind (perioperative Mortalität), aus der Überlebensanalyse ausgeschlossen. Schlussendlich setzte sich die Studienpopulation für die Überlebensanalyse aus 214 Patienten zusammen, von denen 120 ein Adenokarzinom und 94 ein Plattenepithelkarzinom hatten. Eine adjuvante Therapie erhielten 74 Patienten und 125 Patienten entwickelten ein Rezidiv. Es starben 114 Patienten im Median nach 32,4 Monaten (95% Konfidenzintervall zwischen 1,1 und 147,6 Monaten) im Nachsorgezeitraum. Die detaillierten klinisch-pathologischen und Überlebensdaten finden sich in Tabelle 2 für die gesamte Studienpopulation, in Tabelle 3 für die Subgruppe der Adenokarzinompatienten sowie in Tabelle 4 für die Subgruppe der Plattenepithelkarzinompatienten.

Tabelle 2. Klinisch-Pathologische Charakteristika und klinische Ergebnisse

		Rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben		
	n=214	Monate(95% KI)	HR (95% KI)	P[a]	Monate (95% KI)	HR (95% KI)	P[a]
Alter,Jahre							
<60	81	31.7 (18.87-44.53)	Referenz	*0.306*	40.6 (20.97-60.23)	Referenz	*0.143*
≥60	133	24.0 (13.66-34.35)	1.21 (0.84-1.75)		32.4 (20.45-44.35)	1.34 (0.91-1.97)	
Geschlecht							
Männlich	144	22.6 (15.69-29.51)	Referenz	*0.901*	29.8 (20.08-39.52)	Referenz	*0.245*
Weiblich	70	32.4 (18.60-46.20)	0.98 (0.67-1,42)		42.7 (25.86-59.55)	0.79 (0.53-1.18)	
Zelltyp							
AC	120	26.2 (13.96-38.45)	Referenz	*0.871*	38.8 (30.03-47.57)	Referenz	*0.606*
SqCC	94	26.0 (16.12-35.88)	0.97 (0.68-1.38)		29.8 (22.10-37.51)	1.10 (0.76-1.59)	
Grading							
I[1]	8						
II[1]	113	39.9 (29.02-50.78)	Referenz	*0.001*	40.3 (36.16-44.33)*	Referenz	***<0.001***
III	93	12.9 (4.75-21.06)	1.83 (1.28-2.60)		18.1 (9.02-27.18)	1.97 (1.36-2.85)	
Tumor-stadium							
I	80	41.0 (35.72-46.17)*	Referenz	*<0.001*	42.6 (37.60-47.58)*	Referenz	*<0.001*
II	61	42.6 (35.96-49.24)	1.48 (0.91-2.42)		53.2 (32.80-73.60)	1.33 (0.80-2.22)	
III[1]	63	5.9 (0.0-12.84)	3.79 (2.45-5.86)		16.4 (8.62 -24.18)	3.02 (1.93-4.72)	
IV[1]	10						
Residual Tumor							
R0	195	31.7 (21.63-41.77)	Referenz	***0.006***	38.5 (28.17-48.83)	Referenz	***0.007***
R1	19	9.4 (0.0-33.15)	2.06 (1.22-3.48)		10.5 (0.0-26.43)	2.09 (1.21-3.60)	
Adjuvante Therapie							
Ja	140	38.5 (26.55-50.45)	Referenz	***0.032***	43.3 (30.80-55.80)	Referenz	*0.203*
Nein	74	18.8 (10.09-27.51)	1.48 (1.03-2.11)		26.6 (21.79-45.29)	1.28 (0.88-1.86)	

a, p Werte basieren auf dem Log Rank Test; 1, Frequenzen≤ 10% werden zusammengefasst in einem dominanten Modell; HR, Hazard Ratio; KI, Konfidenz Intervall; *, Durchschnitt, Median wurde nicht erreicht.

Tabelle 3. Klinisch-Pathologische Charakteristika und Klinisches Ergebnis - AC Subgruppe

		Rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben		
	n=120	Monate(95% KI)	HR (95% KI)	P[a]	Monate(95% KI)	HR (95% KI)	P[a]
Alter, Jahre							
<60	52	38.4 (22.12-54.68)	Referenz	*0.344*	42.9 (25.39-60.41)	Referenz	*0.105*
≥60	68	20.4 (12.43-28.37)	1.26 (0.78-2.05)		26.6 (5.77-47.43)	1.54 (0.91-2.61)	
Geschlecht							
Männlich	74	20.4 (11.16-29.64)	Referenz	*0.429*	26.6 (12.09-41.11)	Referenz	*0.092*
Weiblich	46	38.8 (28.30-49.31)	0.82 (0.50-1.34)		45.4 (29.67-61.13)	0.63 (0.37-1.08)	
Grading							
I[1]	8						
II[1]	55	43.3 (28.93-57.67)	Referenz	***0.001***	43.4 (38.15-48.70)*	Referenz	***0.001***
III	57	11.8 (2.46-21.14)	2.17 (1.34-3.52)		18.1 (9.79-26.41)	2.45 (1.45.4.12)	
Tumor Stadium							
I	53	40.2 (33.76-46.64)*	Referenz	*<0.001*	41.8 (35.62-47.92)*	Referenz	*<0.001*
II	27	43.3 (36.77-49-83)	1.34 (0.68-2.76)		43.3 (22.79-63.82)	1.20 (0.58-2.49)	
III[1]	31	8.3 (6.60-10.05)	4.90 (2.78-8.66)		19.7 (5.79-33.61)	2.96 (1.66-5.28)	
IV[1]	9						
Residual Tumor							
R0	114	26.2 (9.74-42.67)	Referenz	*0.259*	38.8 (29.30-48.30)	Referenz	*0.578*
R1	6	1.7 (0.0-31.95)	1.68 (0.67-4.20)		10.5 (0.00-59.71)	1.33 (0.48-3.69)	
Adjuvante Therapie							
Ja	76	38.8 (28.80-48.80)	Referenz	***0.021***	43.3 (35.32-51.28)	Referenz	*0.245*
Nein	44	11.8 (3.16-20.44)	1.74 (1.08-2.81)		24.5 (11.23-37.77)	1.35 (0.81-2.26)	

a, p Werte basieren auf dem Log Rank Test; 1, Frequenzen≤ 10% werden zusammengefasst in einem dominanten Modell; HR, Hazard Ratio; KI, Konfidenz Intervall; *, Durchschnitt, Median wurde nicht erreicht.

Tabelle 4. Klinisch-Pathologische Charakteristika und Klinisches Ergebnis - SqCC Subgruppe

		Rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben		
	n=94	month (95% KI)	HR (95% KI)	P[a]	month (95% KI)	HR (95% KI)	P[a]
Alter, Jahre							
<60	29	25.9 (10.90-40.90)	Referenz	*0.640*	29.8 (20.11-39.49)	Referenz	
≥60	65	26.0 (13.31-38-69)	1.15 (0.64-2.05)		32.4 (21.66-43.14)	1.11 (0.62-2.00)	*0.730*
Geschlecht							
Männlich	70	26.0 (13.31-38.69)	Referenz	*0.450*	29.9 (18.32-41.48)	Referenz	*0.776*
Weiblich	24	24.2 (2.11-46.29)	1.25 (0.70-2.23)		29.2 (23.34-35.06)	1.09 (0.59-2.01)	
Grading							
I[1]	0						
II[1]	58	34.3 (14.29-54.31)	Referenz	*0.148*	34.3 (6.53-62.07)	Referenz	*0.091*
III	36	15.4 (0.53-30.27)	1.48 (0.87-2.51		15.8 (0.32-31.28)	1.58 (0.92-2.72)	
Tumor-Stadium							
I	27	42.0 (32.91-51.04)*	Referenz	*0.002*	43.7 (34.97-52.35)*	Referenz	*0.002*
II	34	42.4 (20.21-64.59)	1.73 (0.8-3.72)		54.0 (8.96-99.04)	1.52 (0.70-3.31)	
III[1]	32	12.3 (6.90-17.7)	3.31 (1.59-6.88)		16.4 (7.7-25.06)	3.17 (1.52-6.58)	
IV[1]	1						
Residual Tumor							
R0	81	34.3 (17.44-51.16)	Referenz	***0.011***	36.5 (12.89-60.11)	Referenz	***0.004***
R1	13	9.4 (0.00-29.01)	2.32 (1.19-4.54)		10.1 (0.00-27-25)	2.61 (1.33-5.13)	
Adjuvante Therapie							
Ja	64	34.3 (17.06-51.54)	Referenz	*0.432*	42.4 (16.03-68.78)	Referenz	*0.551*
Nein	30	21.5 (14.59-28.41)	1.24 80.72-2.14)		27.9 (22.16-33.64)	1.18 (0.68-2.06)	

a, p Werte basieren auf dem Log Rank Test; 1, Frequenzen≤ 10% werden zusammengefasst in einem dominanten Modell; HR, Hazard Ratio; KI, Konfidenz Intervall; *, Durchschnitt, Median wurde nicht erreicht.

4.2 Polymorphismen

Es wurden sieben Keimbahn Polymorphismen untersucht. Der S1PR1 -532 C>G und der eNOS +894 G>T Polymorphismus wurden, da sie sich nicht im Hardy Weinberg Gleichgewicht befanden, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Allel-Frequenzen der übrigen Polymorphismen haben mit den in der "National Center for Biotechnology Information Databank" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) publizierten Allelfrequenzen übereingestimmt.

Die Analyse des PDGF-B +1135 A>C Polymorphismus zeigte eine signifikante Korrelation mit Tumorrezidiven (p=0,025) und der Mortalität (p=0,016) bei Anwesenheit eines C Allels in der Subgruppe der Adenokarzinome. Keine weiteren histopathologischen Korrelationen waren evident. In der univariaten Überlebensanalyse in der Subgruppe der Adenokarzinome zeigte sich, dass Patienten mit einem C-Allel eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit mit 14,8 Monaten gegenüber 41,0 Monaten hatten (p=0,018; Tabelle 5, Abbildung 6). Es zeigte sich außerdem eine kürzere Gesamtüberlebenszeit mit 34,6 Monaten gegenüber 41 Monaten (der Median wurde nicht erreicht, p 0,011; Tabelle 6; Abbildung 7). Für die Subgruppe der Plattenepithelkarzinome fand sich keine signifikante Korrelation in der Studienkohorte (Tabelle 5,6).

In der multivariaten Analyse wurde ebenfalls die Anwesenheit des C-Allel als negativer prognostischer Faktor für das rezidivfreie Überleben (p=0,008, HR 2,08) und das Gesamtüberleben (p=0,006, HR 2,24) in der Adenokarzinom-Subgruppe identifiziert. Die Ergebnisse wurden stratifiziert nach Alter, Geschlecht, Grading, Tumorstadium und Resektionsstadium (Tabelle 7; Abbildung 8+9).

Von den restlichen analysierten Polymorphismen zeigte der eNOS VNTR Polymorphismus mit fünf Wiederholungen eine signifikante Korrelation mit Lymphknotenmetastasen (N+) in der Subgruppe der Plattenepithelkarzinome (p=0,014). Das homozygote VEGFR2 +23408 A-Allel zeigte eine signifikante Korrelation mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und einem fortgeschrittenen Tumorstadium in der gesamten Studienkohorte und der Plattenepithelkarzinom Subgruppe (p=0,012, p=0,019 respektive p=0,029 und 0,047). Ansonsten waren keine weiteren signifikanten Korrelationen mit der Gesamtüberlebenszeit oder dem rezidivfreien Überleben feststellbar (Tabelle 5,6).

Tabelle 5. Polymorphismen und Rezidivfreies Überleben

		Alle			AC			SqCC	
	n=214	Monate (95% KI)	P	*n*=120	Monate (95% KI)	P	*n*=94	Monate (95% KI)	P
PDGFB +1135 A>C									
AA	107 (50.0)	32.1 (20.38-43.82)	0.196	**60 (50.0)**	**41.0 (14.56-67.44)**	**0.018**	47 (50.0)	24.0 (11.24-36.76)	0.550
AC[1]	89 (41.6)	24.2 (11.07-37-33)		**49 (40.8)**	**14.8 (2.83-26.78)**		40 (42.6)	28.0 (9.82-46.18)	
CC[1]	18 (8.4)			**11 (9.2)**			7 (7.4)		
VEGFR2 -2854 T>G									
TT	93 (43.5)	25.8 (14.05-37.55)		56 (46.7)	31.7 (18.13-45.28)		37 (39.4)	15.4 (2.76-40.44)	
GT	92 (43.0)	32.4 (18.65-46.16)	0.262	47 (39.2)	20.70 (8.23-33.17)	*0.954*	45 (47.9)	42.4 (28.18-56.62)	*0.147*
GG	29 (13.5)	24.0 (9.32-3.68)	*0.371*	17 (14.1)	35.5 (22.80-48-14)*	*0.290*	12 (12.7)	21.6 (2.76-40.44)	*0.757*
VEGFR2 +23408 A>C									
AA	114 (53.3)	19.1 (7.01-31.19)	*0.223*	64 (53.3)	17.1 (2.34-31.86)	*0.364*	50 (53.2)	21.6 (4.76-38.43)	*0.421*
AC[2]	89 (41.6)	32.4 (19.63-45.17)		51 (42.5)	32.7 (16.70-48-70)		38 (40.4)	28.4 (8.78-48.02)	
CC[2]	11 (5.1)			5 (4.2)			6 (6.4)		
eNOS 27bp VNTR									
Lang	153 (71.5)	26.5 (19.11-33.89)	*0.650*	83 (69.2)	22.1 (0.00-50.12)	*0.923*	70 (74.5)	28.0 (18.48-37.52)	*0.626*
Lang/Kurz[3]	57 (26.6)	22.1 (0.00-47.18)		35 (29.2)	26.5 (15.08-37.92)		22 (23.4)	21.6 (0.00-60.63)	
Kurz[3]	4 (1.9)			2 (1.6)			2 (2.1)		
S1PR1 -1577 G>T									
GG	91 (42.5)	26.0 (17.12-34.88)		47 (39.2)	19.1 (7.10-31.10)		44 (46.8)	28.4 (16.91-39.90)	
GT	93 (43.5)	32.7 (17.65-47.76)	*0.641*	57 (47.5)	38.4 (22.53-54.27)	*0.514*	36 (38.3)	25.8 (10.72-40.88)	*0.880*
TT	30 (14.0)	21.5 (10.94-32.06)	*0.729*	16 (13.3)	34.3 (21.76-46.82)*	*0.428*	14 (14.9)	21.5 (13.32-29.68)	*0.706*

1-3, Polymorphismen mit einer Genotypfrequenz (homozygotes minor Allel) ≤10% werden zusammengefasst in einem dominanten Modell; +, Durchschnitt, Median wurde nicht erreicht; in Klammern Prozentwerte angegeben; AC, Adenokarzinom; PDGFB, platelet-derived growth factor beta polypeptide; KI, Konfidenz Intervall; eNOS, endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase 3; SqCC: Plattenepithelkarzinom; S1PR1, sphingosine 1-phosphate receptor 1; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2

Tabelle 6. Polymorphismen und Gesamtüberleben

		Alle			AC			SqCC	
	n=214	Monate(95% KI)	P	*n*=120	Monate(95% KI)		*n*=94	Monate(95% KI)	P
PDGFB +1135 A>C									
AA	107 (50.0)	36.8 (21.84-51.76)	0.195	60 (50.0)	41.0 (34.97-47.24)*	***0.011***	47 (50.0)	29.2 (22.28-36.12)*	0.510
AC*	89 (41.6)	34.6 (21.84-51.76)		49 (40.8)	34.6 (17.14-52.06)		40 (42.6)	42.4 (9.54-75.26)	
CC*	18 (8.4)			11 (9.2)			7 (7.4)		
VEGFR2 -2854 T>G									
TT	93 (43.5)	32.4 (21.84-42.96)		56 (46.7)	36.8 (29.50-44.10)		37 (39.4)	20.8 (4.96-36.65)	
GT	92 (43.0)	38.8 (16.41-61.19)	0.276	47 (39.2)	24.5 (1.70-47.30)	*0.935*	45 (47.9)	42.4 (17.97-66.83)	*0.081*
GG	29 (13.5)	47.4 (4.09-90.71)	*0.183*	17 (14.1)	44.2 (33.21-55.18)*	*0.132*	12 (12.7)	27.8 (17.11-38.49)	*0.646*
VEGFR2 +23408 A>C									
AA	114 (53.3)	29.8 (18.03-41.57)	*0.435*	64 (53.3)	32.4 (13.73-51.07)	*0.842*	50 (53.2)	27.9 (6.21-49.59)	*0.362*
AC*	89 (41.6)	40.6 (28.71-52.49)		51 (42.5)	42.9 (32.49-53.32)		38 (40.4)	32.4 (12.09-52.71)	
CC*	11 (5.1)			5 (4.2)			6 (6.4)		
eNOS 27bp VNTR									
Lang	153 (71.5)	36.5 (25.86-47.14)	*0.555*	83 (69.2)	42.7 (32.68-52.82)	*0.618*	70 (74.5)	21.6 (0.00-50.38)	*0.662*
Lang/Kurz*	57 (26.6)	27.8 (7.41-48.19)		35 (29.2)	34.8 (11.57-58.03)		22 (23.4)	29.9 (21.32-38.48)	
Kurz*	4 (1.9)			2 (1.6)			2 (2.1)		
S1PR1 -1577 G>T									
GG	91 (42.5)	34.3 (24.14-44.46)		47 (39.2)	32.4 (13.13-51.67)		44 (46.8)	34.4 (18.21-50.39)	
GT	93 (43.5)	38.5 (25.29-51.73)	*0.623*	57 (47.5)	42.9 (31.87-53.93)	*0.477*	36 (38.3)	29.9 (16.90-42.90)	*0.966*
TT	30 (14.0)	24.5 (11.67-37.33)	*0.954*	16 (13.3)	37.9 (25.57-50.13)*	*0.535*	14 (14.9)	24.5 (9.97-39.03)	*0.587*

1-3, Polymorphismen mit einer Genotypfrequenz (homozygotes minor Allel) ≤10% werden zusammengefasst in einem dominanten Modell; +, Durchschnitt, Median wurde nicht erreicht; in Klammern Prozentwerte angegeben; AC, Adenokarzinom; PDGFB, platelet-derived growth factor beta polypeptide; KI, Konfidenz Intervall; eNOS, endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase 3; SqCC: Plattenepithelkarzinom; S1PR1, sphingosine 1-phosphate receptor 1; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2

Tabelle 7 Multivariate Analyse - AC Subgruppe

		Rezidivfreies Überleben		Gesamtüberleben	
	n=120	HR (95% KI)	P	HR (95% KI)	P
Alter					
<60	52 (43.3)	Referenz		Referenz	
≥60	68 (56.7)	1.62 (0.95-2.76)	0.076	1.83 (1.02-3.3)	0.044
Geschlecht					
Männlich	74 (61.7)	1.12 (0.65-1.94)	0.690	1.38 (0.77-2.4)	0.282
Weiblich	46 (38.3)	Referenz		Referenz	
Grading					
G1*	8 (6.7)				
G2*	55 (45.8)	Referenz		Referenz	
G3	57 (47.5)	1.04 (0.58-1.84)	0.901	1.52 (0.85-2.7)	0.160
UICC					
I	53 (44.2)	Referenz		Referenz	
II	27 (22.5)	1.25 (0.61-2.55)	0.546	1.08 (0.50-2.30)	0.850
III*	31(25.8)	5.57 (2.78-11.13)	**<0.001**	3.06 (1.57-5.94)	**0.001**
IV*	9 (7.5)				
R-Status					
R0	114 (95.0)	Referenz		Referenz	
R1	6 (5.0)	1.21 (0.42-3.48)	0.723	1.22 (0.40-3.74)	0.731
PDGFB +1135					
AA	60 (50.0)	Referenz		Referenz	
AC*	49 (40.8)	2.08 (1.21-3.57)	**0.008**	2.24 (1.26-4.00)	**0.006**
CC*	11 (9.2)				

*, Polymorphismen mit einer Genotypfrequenz (homozygotes minor Allel) ≤10% werden zusammengefasst in einem dominanten Modell; AC, Adenokarzinom; PDGFB, platelet-derived growth factor beta polypeptide; KI, Konfidenz Intervall; HR, Hazard Ratio

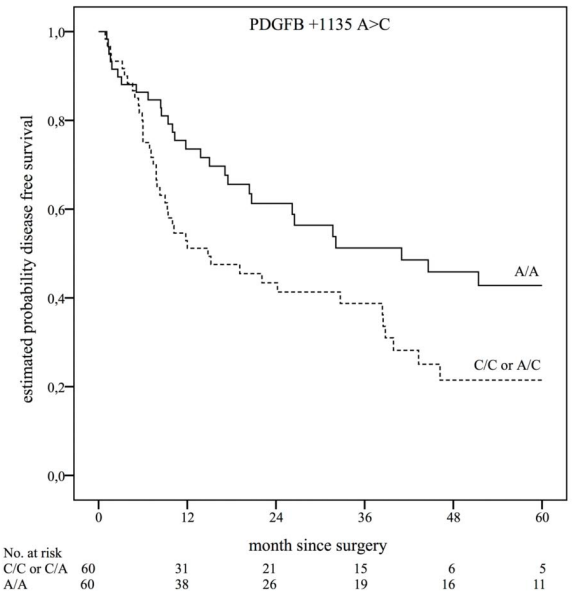

Abbildung 6: Kaplan – Meier Plot für rezidivfreies Überleben in Relation zum PDGFB +1135 Genotyp

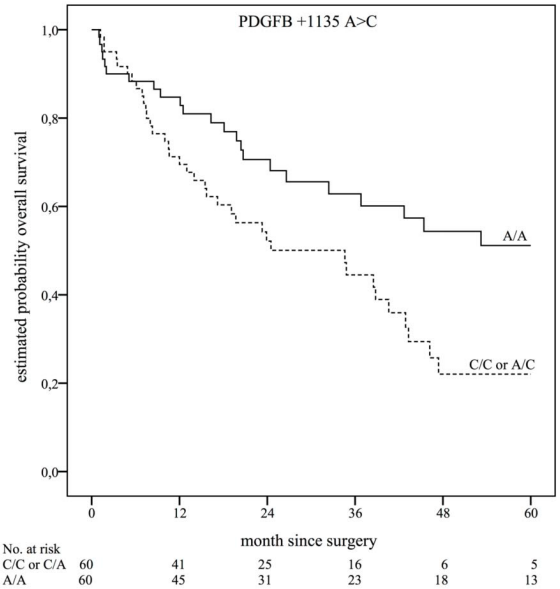

Abbildung 7: Kaplan – Meier Plot für das Gesamtüberleben in Relation zum PDGFB 1135 Polymorphismus

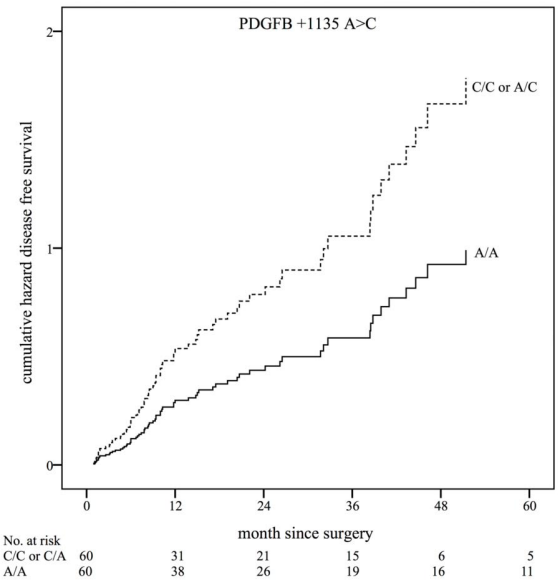

Abbildung 8: Kummulatives Hazard - Rezidivfreie Überlebenszeit

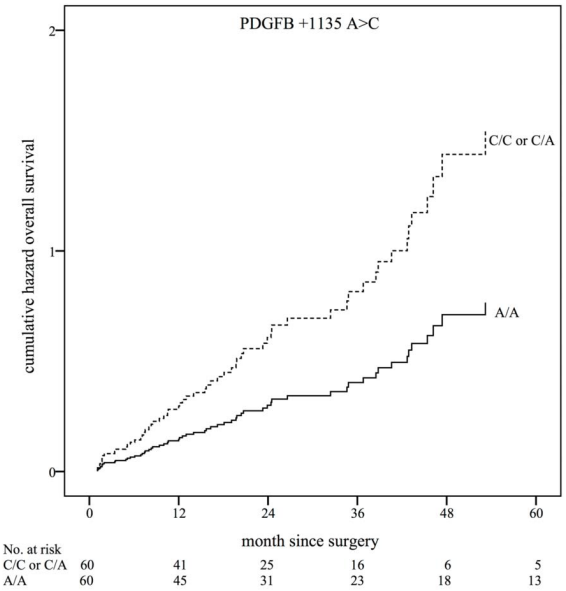

Abbildung 9: Kummulatives Hazard - Gesamtüberlebenszeit

5. Diskussion

In zahlreichen Studien wurden bereits prognostische genetische Marker für das NSCLC untersucht. Hierbei wurden eine Reihe von molekularen Markern, im Sinne von genetischen Tumormutationen mit prognostischem Wert, entdeckt. Am besten untersucht bislang sind Mutationen des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) sowie KRAS, welche in der Praxis bereits von Onkologen genutzt und bestimmt werden. Neu zu dieser Gruppe hinzugekommen ist die anaplastic lymphoma kinase (ALK). Es besteht ein unterschiedliches Mutationsmuster zwischen den einzelnen histologischen Subgruppen (Rose-James et al. 2012). Dies ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einer immer weiter personalisierten Medizin. Auf der anderen Seite hingegen ist die Datenlage bezüglich Keimbahnpolymorphismen und deren Wert als prognostische Marker beim NSCLC weniger eindeutig. In einer groß angelegten Studie von Nygaard et al. wurden insgesamt 107 SNPs von EGF, VEGF und DNA Reperaturenzymen untersucht. SNPs mit einem signifikanten Ergebnis wurden in einer zweiten Validationskohorte erneut untersucht. In der ersten Untersuchung wurden mehrere signifikante Einzelnukleotidpolymorphismen in VEGF entdeckt, allerdings konnte kein einziger in der Validationskohorte bestätigt werden, was die Schwierigkeit illustriert, zuverlässige Keimbahnpolymorphismen mit gutem prognostischen Wert zu finden (Nygaard et al. 2010). Es gibt jedoch immer wieder einzelne vielversprechende Ergebnisse wie beispielsweise dem proapoptotischen Protein Bcl-2-like 11 (BIM) bei Patienten mit EGFR positivem Tumor im Bezug auf das krankheitsprogressionsfreie Überleben (Isobe et al. 2014). Weitere entdeckte Keimbahnpolymorphismen sind VEGFR-2+4422 (AC)10-14 als positiver prognostischer Marker für das Wiederauftreten von Metastasen und das Gesamtüberleben für das Plattenepithelkarzinom, VEGFR-2-906 C>T und VEGFR-2-271 waren ein positiver prognostischer Faktor für ein Lokalrezidiv bzw. das Gesamtüberleben bei Patienten mit einem Adenokarzinom (Uzunoglu et al. 2012).

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass Keimbahnpolymorphismen von Genen, welche mit der Aktivierung des VEGF-, eNOS- und PDGF-B-Signalwegs assoziiert sind, als prognostische Marker für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom dienen könnten. Insgesamt wurden sieben Polymorphismen in 228 Proben, die von operativ behandelten Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom stammen,

analysiert. Nach Ausschluss von zwei Polymorphismen, welche sich nicht im Hardy Weinberg Gleichgewicht befanden, konnte ein SNP an Position +1135 des PDGF-B Gens als unabhängiger prognostischen Marker bei Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge identifiziert werden. Bei Vorhandensein eines C-Allels kam es, verglichen mit homozygoten A-Allel Trägern, zu einem zweifachen Anstieg des Risikos für ein Tumorrezidiv und Tod (HR-Gesamtüberleben: 2,24, Tabelle 7). Die potentielle klinische Relevanz dieser signifikanten Korrelation wird erklärt durch den Einfluss von PDGF-B auf die Angiogenese. Die Induktion der Tumor-Neovaskularisation, der sogenannte angiogenetische Switch, ist ein Kennzeichen für den malignen Krankheitsprogress (Bergers et al. 2003). Der durch VEGF aktivierte Signalweg ist ein entscheidender Faktor für die Angiogenese und unterstützt das Überleben der Gefäßendothelzellen, die Proliferation, die Migration sowie die Gefäßpermeabilität. Allerdings führt die von VEGF vermittelte Angiogenese zur Entstehung von desorganisierten, unreifen und durchlässigen Gefäßen. Die Reifung dieser Gefäße ist abhängig von perivaskulären Stromazellen, welche durch PDGF-BB aktiviert werden, also dem Dimer von PDGF-B (Abramsson et al. 2003; Cao et al. 2002; Cao et al. 2003; Cao et al. 2009, Zhang et al. 2009). Das PDGF-BB Dimer bindet bevorzugt am PDGFR-ß Rezeptor und wird parakrin sezerniert von u.a. Pericyten und glatten Gefäßmuskelzellen (Alvarez et al. 2006, Donnem et al. 2008). Die Aktivierung der PDGFR-ß Rezeptoren führt zur Gefäß- und Stromareifung sowie zur Induktion von Erythropoetin mRNA und Proteinexpression und fördert somit die Tumorangiogenese. Das PDGF-BB wirkt auch endokrin, stimuliert die extramedulläre Hämatopoese und hat somit gleichfalls einen Einfluss auf das Tumorwachstum (Xue et al. 2011). Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass das Vorhandensein eines C-Allels ein unabhängiger negativer prognostischer Faktor beim Adenokarzinom der Lunge ist. Dies führt zu der Annahme, dass der Basenaustausch einen funktionellen Einfluss hat, welcher jedoch zur Zeit noch nicht abschließend geklärt ist. Dementsprechend kann der Polymorphismus entweder eine vermehrte oder verminderte perivaskuläre Stromazellaktivierung und extramedulläre Hämatopoese bewirken.

Der Polymorphismus befindet sich im ersten Intron des PDGF-B Gens, was gegen die Annahme der funktionellen Aktivität des Polymorphismus spricht. Allerdings gibt es Hinweise, dass Introns trotzdem eine wichtige Rolle in der transkriptionellen

Regulation von Genen haben (Li H et al. 2012). Für das PDGF-B Gen haben Franklin et al. gezeigt, dass das erste Intron Regulationselemente für die Transkription beinhaltet (Franklin et al. 1991). Diese Beobachtung wurde auch von Dirks et al. bestätigt. Die Autoren haben in Intron 1 einen sogenannten Silencer Abschnitt entdeckt, welcher die Transkriptionsaktivität eines Gens herabsetzen kann. Weiterhin haben sie einen alternativen PDGF-B Gen Promotor in Intron 1 entdeckt, welcher zu einem alternativen m-RNA Transkript führt. In diesem m-RNA Transkript fehlt eine GC-reiche Sequenz, welche inhibitorisch auf die Translation wirkt (Dirks et al. 1995a; Dirks et al. 1995b).

Die Identifizierung von C-Allel Trägern bei Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge könnte in Zukunft auch therapeutische Konsequenzen haben. Erhöhte PDGF-BB Konzentrationen im Plasma bei verschiedenen malignen Erkrankungen unterstreichen die klinische Relevanz von PDGF-BB für Tumorwachstum und Krankheitsprogression (Leitzel et al. 1991). Insbesondere beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom wurde gezeigt, dass die PDGF-B Expression ein unabhängiger negativer prognostischer Marker ist (Donnem et al. 2008; Kawai et al. 1997, Donnem et al. 2010). Neuere präklinische Inhibitionsstudien für PDGF-B zeigten, dass eine gesteigerte PDGF-B Expression sich negativ auf das Überleben auswirkt (Falcon et al. 2011). Es wurde gezeigt, dass durch Blockade des PDGF-B bei Mäusen mit Lewis Lungentumoren die Vaskularisierung um 80% reduziert wird. Allerdings hatten die verbliebenen Gefäße einen größeren Perizytenanteil, welcher zu einer normalen Gefäßentwicklung führte. Schlussendlich verbesserte die Blockade von PDGF-B die Verteilung von Chemotherapeutika im Tumor. Die simultane Blockade von PDGF-B und eine Chemotherapie zeigten somit einen synergistischen Effekt. Dieser Effekt wurde erklärt durch eine Normalisierung der Gefäße nach PDGF-B Inhibition, in weiterer Folge einer effizienteren Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und somit auch einer besseren Erreichbarkeit des Tumors für Chemotherapeutika. Dementsprechend könnte die Blockade von PDGF-B allerdings auch zu einer erhöhten Zellproliferation sowie zum Wachstum von Lewis Lungenkarzinomen führen. Folglich erfüllt der Polymorphismus möglicherweise auch die Kriterien für einen unabhängigen prädiktiven Marker in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen.
Ergänzend zu der Arbeit von Falcon et al. konnten Hosaka et al. zeigen, dass PDGF-BB bei medikamentöser Inhibition zur Verhinderung von Tumorwachstum und

Metastasierung bei Tumoren mit hoher PDGF-BB Expression führen. Bei Tumoren mit geringer oder fehlender PDGF-BB Expression hingegen fördert die medikamentöse Inhibition die Tumorzelldissemination und Metastasierung aufgrund der Ablation der Perizyten von den Tumorgefäßen. Die Ursache für diese entgegengesetzte Wirkung findet sich in der Signalweiterleitung über den PDGF-ß Rezeptor. Bei persistierend hoher Exposition von Perizyten gegenüber PDGF-BB kommt es zu einer Herabregulierung von PDGF-ß, was wiederum zur Verminderung der α1β1 Integrin Spiegel führt. Dieses Integrin ist wiederum beteiligt an der Adhäsion der Perizyten an Matrix Komponenten der Blutgefäße. Die Autoren glauben, dass persistierend hohe PDGF-BB Spiegel, welche vom Tumor produziert werden, ab einem bestimmten Schwellenwert zu einem Verlust von Perizyten führt und in weiterer Folge zur Tumorzelldissemination. Unter dieser Annahme hat die Inhibition von PDGF-BB in diesem Fall einen positiven Effekt. Bei Tumoren mit einer geringen PDGF-BB Expression wird PDGF-BB primär in den Endothelzellen gebildet und hat einen stabilisierenden Einfluss auf die Gefäße. Wenn nun PDGF-BB inhibiert wird, fällt dieser Einfluss weg und es kommt zu einer erhöhten Tumorzelldissemination und Metastasierung (Hosaka et al. 2013).

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Adenokarzinome der Lunge PDGF produzieren und somit in erster Linie in die Gruppe der Tumoren mit hoher PDGF-BB Expression gehören (Bravo M et al. 1991, Safi A et al. 1992). Im Falle, dass das C-Allel zu einer reduzierten mRNA-, respektive Protein-Expression führt, kann dies zu einer verlängerten Gesamtüberlebenszeit sowie rezidivfreien Überlebenszeit bei Adenokarzinom Patienten führen. Letztendlich bleibt unklar welchen Effekt der PDGF-B +1135 A>C Polymorphismus auf die mRNA-, respektive die Proteinexpression hat. Falls der Polymorphismus einen funktionellen Einfluss auf das Überleben hat, wäre eine prätherapeutische Bestimmung der PDGF-B Expression in Kombination mit der Genotypisierung notwendig. Hier könnten zukünftigen Studien, welche Genotypisierung und Immunhistochemie kombinieren, für Klarheit sorgen.

Der PDGF-B +1135 Polymorphismus hatte nur bei Adenokarzinomen der Lunge einen prognostischen Einfluss. Allerdings wurden von Eilertsen et al. erst vor kurzem zelltyp-abhängige Antworten auf eine Hypoxie beim NSCLC beschrieben (Eilertsen et al. 2012). Es wurde gezeigt, dass der durch Hypoxie induzierte, proangiogenetisch wirkende Anstieg der VEGF-A Expression nur beim Adenokarzinom zu finden war,

beim Plattenepithelkarzinom allerdings nicht. Da bekanntermaßen VEGF-A einen signifikanten Anstieg der PDGF-B Expression in Adenokarzinomzelllinien der Lunge induziert, könnte diese zelltyp-abhängige Antwort auf Hypoxie die fehlende prognostische Aussagekraft beim Plattenepithelkarzinom erklären (Reinmuth et al. 2007). Die unterschiedliche zelltyp-spezifische Reaktion auf Hypoxie könnte der Grund für die berichteten unterschiedlichen Antworten auf Chemotherapie und spezifische Therapien in Studien sein. Aus diesem Grund wurden die Histologie und der molekulare Subtyp als wichtige Faktoren für die Therapiewahl erkannt (Pikor et al. 2013; Langer et al. 2010). Eine weitere wichtige Limitierung der Studienpopulation ist, dass sie Patienten beinhaltet, welche von 1996 bis 2012 behandelt wurden, aber adjuvante Therapieregimes erst im Jahr 2004 im untersuchten Krankenhaus eingeführt wurden und es sich somit um eine klinisch heterogene Gruppe von Patienten handelt. Allerdings zeigt sich in der multivariaten Analyse, die die adjuvante Therapie berücksichtigt, kein Einfluss auf die Signifikanz des Resultats.

Zusammengefasst ist das C-Allel des PDGFB +1135 A>C Polymorphismus ein negativer prognostischer Faktor für das rezidivfreie und das Gesamtüberleben von Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge, die sich einer kurativem Resektio unterziehen. Die mögliche zukünftige klinische und therapeutische Relevanz ist abhängig vom funktionellen Einfluss auf mRNA Prozessierung, Stabilität sowie Translation und muss in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Der Progress von malignen Erkrankungen, so auch beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom, ist abhängig von der Tumorangiogenese. Die endothelständige Stickstoffmonoxid Synthetase (eNOS) sowie der VEGF Signalweg haben eine zentrale Bedeutung in der Neovaskularisation und Angiogenese. Eine erhöhte Tumorvaskularisation als auch die Expression von proangiogenetischen Faktoren korreliert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechteren Prognose. An der Angiogenese sind eine Vielzahl von Enzymen und Signalwegen beteiligt, wobei in einer Population genetische Variationen der beteiligten Enzyme vorkommen, die durch Mutationen entstanden sind. Diese genetischen Polymorphismen können das Genprodukt ändern bzw. zu einer stärkeren oder schwächeren Expression führen und somit einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und den Therapierfolg haben.

Der VEGF Signalweg ist beteiligt an der physiologischen und pathologischen Angiogenese. VEGF führt primär über den VEGFR2 Rezeptor zu einer Änderung der Genexpression bei Gefäßendothelzellen und fördert Proliferation und Migration. Allerdings bewirkt VEGF eine Hyperpermeabilität der Endothelzellen und somit auch der Gefäße. Dies dürfte zum Teil einen physiologischen Hintergrund haben. Die Entwicklung reifer Gefäße ist abhängig von perivaskulären Stromazellen, die durch Platelet Derived Growth Factor beta (PDGF-B) aktiviert werden. Darüber hinaus werden die Angiogenese, die Gefäßpermeabilität und der Gefäßtonus durch die endotheliale Stickstoff Monoxid Synthetase (eNOS) mittels Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst. Der eNOS Signalweg wiederum wird aktiviert durch VEGF, PDGF und Sphingosin 1-Phosphat (S1P).

Anhand der DNA von 228 Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, die von 1996 bis 2012 operativ behandelt worden sind, wurden mithilfe der konventionellen PCR mit anschließender Elektrophorese oder Taq-Man-Sonden die Genotypen von insgesamt sieben Polymorphismen für jeden Patienten bestimmt. (S1PR1 -1577 G>T, rs2038366; S1PR1 -532 C>G rs59317557; VEGFR2 -2854 T>G, rs1551645; VEGFR2 +23408 A>C, rs7655964; eNOS +894 G>T, rs1799983; eNOS Intron 4 VNTR; PDGFB +1135 A>C, rs1800817)

Die unterschiedlichen Polymorphismen wurden mittels Chi Quadrat Test und Log Rank Test mit den klinisch-pathologischen Daten korreliert. Hierbei wurde ein SNP an Position +1135 des PDGF-B Gens als unabhängiger prognostischer Marker bei Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge identifiziert In der multivariaten Analyse fand sich für die rezidivfreie Überlebenszeit eine HR von 2,08 (p=0,08), für das Gesamtüberleben eine HR von 2,24 (p=0,006). Im Vergleich zu homozygoten A-Allel Trägern hatten heterozygote C-Allel Träger eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit (14,8 vs 41,0 Monate; p=0,018) und Gesamtüberlebenszeit (34,6 vs 41,0 Monate; p=0,011). Die Relevanz wird durch die zentrale Rolle von PDGF-B in der Angiogenese erklärt. Es fördert die Gefäß- und Stromareifung, die Induktion der Erythropoetin mRNA und Proteinexpression sowie auch die extramedulläre Hämatopoese. Die genauen Auswirkungen auf Expression und Translation sind aber noch nicht abschließend geklärt. Der +1135 des PDGF-B Polymorphismus könnte zukünftig als unabhängiger prognostischer Marker dienen. Die Re-Evaluation in einer größeren Studienpopulation erscheint im Hinblick auf die signifikanten Ergebnisse und einen möglichen therapeutischen Wert gerechtfertigt.

7. Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenokarzinom
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
Ang1	Angiopoietin1
BIM	Bcl-2-like 11
Ca	Calcium
Destatis	Statistisches Bundesamt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Epithelzelle
EGF	Epidermal Growth Factor
EPC	Endothelial Progenitor Cell (EPC)
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
HR	Hazard Ratio
HSC	Hematopoetic Stem Cell
HSP90	Heat Shock Protein 90
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
KI	Konfidenzintervall
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
M	Metastasen
mM	Millimolar
m-RNA	Messenger Ribonukleinsäure
N	Nodes – Lymphknoten
NCBI	National Center for Biotechnology Information Databank
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer – Nicht kleinzellige Bronchialkarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-B	Platelet Derived Growth Factor Beta Polypeptid
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Rezeptor
Ptdins(3)K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
R	Residualtumor
RNA	Ribonukleinsäure

S1PR1	Sphingosine 1-Phosphat Rezeptor
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SqCC	Plattenepithelkarzinom
T	Tumor
TGF	Transforming Growth Factor
V	Veneninvasion
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

8. Literaturverzeichnis

1. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C (2003) Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. The Journal of clinical investigation 112: 1142-1151.
2. Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE (2006) Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. Mayo Clinic proceedings 81: 1241-1257.
3. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Genes & development 22: 1276-1312.
4. Baeriswyl V, Christofori G (2009) The angiogenic switch in carcinogenesis. Semin Cancer Biol. 19(5): 329-37.
5. Ben-Ari Z, Tambur AR, Pappo O, Sulkes J, Pravica V, Hutchinson I, Klein T, Tur-Kaspa R, Mor E (2006) Platelet-derived growth factor gene polymorphism in recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. Transplantation 81: 392-397.
6. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nature reviews Cancer 3: 401-410.
7. Bravo M, Vàsquez R, Rubio H, Salazar M, Pardo A, Selman M (1991) Production of platelet-derived growth factor by human lung cancer. Respir Med. 85(6): 479-85.
8. Brown LF, Detmar M, Claffey, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF (1997) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*. 79: 233-269.
9. Cao R, Brakenhielm E, Li X, Pietras K, Widenfalk J, Ostman A, Eriksson U, Cao Y (2002) Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and -alphabeta receptors. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 16: 1575-1583.
10. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y (2003) Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. Nature medicine 9: 604-613.

11. Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, Meister B, Ikomi F, Tritsaris K, Dissing S, Ohhashi T, Jackson DG, Cao Y (2004) PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. Cancer Cell 6: 333-345.
12. Cao Y (2009) Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. Science signaling 2: re1.
13. Carmeliet P (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. Oncology 69 Suppl 3: 4-10.
14. Dirks RP, Jansen HJ, van Gerven B, Onnekink C, Bloemers HP (1995a) In vivo footprinting and functional analysis of the human c-sis/PDGF B gene promoter provides evidence for two binding sites for transcriptional activators. Nucleic acids research 23: 1119-1126.
15. Dirks RP, Onnekink C, Jansen HJ, de Jong A, Bloemers HP (1995b) A novel human c-sis mRNA species is transcribed from a promoter in c-sis intron 1 and contains the code for an alternative PDGF B-like protein. Nucleic acids research 23: 2815-2822.
16. Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Busund LT, Bremnes RM (2008) Prognostic impact of platelet-derived growth factors in non-small cell lung cancer tumor and stromal cells. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer 3: 963-970.
17. Donnem T, Al Shibli K, Al Saad S, Delghandi MP, Busund LT, Bremnes RM (2009) VEGF-A and VEGFR-3 correlate with nodal status in operable non-small cell lung cancer: inverse correlation between expression in tumor and stromal cells. Lung Cancer 63: 277-283.
18. Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Busund LT, Bremnes RM (2010) Co-expression of PDGF-B and VEGFR-3 strongly correlates with lymph node metastasis and poor survival in non-small-cell lung cancer. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 21: 223-231.
19. Duda DG, Fukumura D, Jain RK (2004) Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. Trends in molecular medicine 10: 143-145.

20. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 146: 1029-1039.
21. Eilertsen M, Pettersen I, Andersen S, Martinez I, Donnem T, Busund LT, Bremnes RM (2012) In NSCLC VEGF-A Response to Hypoxia May Differ between Squamous Cell and Adenocarcinoma Histology. Anticancer Research 32: 4729-4736.
22. Falcon BL, Pietras K, Chou J, Chen D, Sennino B, Hanahan D, McDonald DM (2011) Increased vascular delivery and efficacy of chemotherapy after inhibition of platelet-derived growth factor-B. The American journal of pathology 178: 2920-2930.
23. Felip E, Stahel RA, Pavlidis N (2005) ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of non-small-cell lung cancer (NSCLC). Ann Oncol.16 Suppl 1:i28-9.
24. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 9: 669-676.
25. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 285: 1182-1186.
26. Forstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J 33: 837a.
27. Franklin GC, Donovan M, Adam GI, Holmgren L, Pfeifer-Ohlsson S, Ohlsson R (1991) Expression of the human PDGF-B gene is regulated by both positively and negatively acting cell type-specific regulatory elements located in the first intron. The EMBO journal 10: 1365-1373.
28. Fredriksson L, Li H, Eriksson U (2004) The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. Cytokine Growth Factor Rev 15: 197-204.
29. Frost G, Darnton A, Harding AH (2011) The effect of smoking on the risk of lung cancer mortality for asbestos workers in Great Britain (1971-2005). Ann Occup Hyg. 55(3): 239-47.
30. Früh M, De Ruysscher D, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E; ESMO Guidelines Working Group (2013) Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. Suppl 6: vi99-105.

31. Fujita S, Masago K, Mio T, Mishima M, Hatachi Y, Katakami N, Fukuhara A, Hata A, Kaji R, Kim YH (2010) Genetic polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene correlate with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. BMC Medical Genetics 11: 167.
32. Gerber RB, Mazzone P, Arroglia AC (2007) Paraneoplastic syndromes associated with bronchogenic carcinoma. Clin Chest Med 23(1): 257.
33. Glubb DM, Cerri E, Giese A, Zhang W, Mirza O, Thompson EE, Chen P, Das S, Jassem J, Rzyman W, Lingen MW, Salgia R, Hirsch FR, Dziadziuszko R, Ballmer-Hofer K, Innocenti F (2011) Novel functional germline variants in the VEGF receptor 2 gene and their effect on gene expression and microvessel density in lung cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 17: 5257-5267.
34. Gridelli C., Maione P., Rossi A., de Marinis F (2007) The role of bevacizumab in the treatment of non-small cell lung cancer: Current indications and future developments. Oncologist 12: 1183–1193.
35. Haldorsen T, Grimsrud T (1999) Cohort analysis of cigarette smoking and lung cancer incidence among Norwegian women. Int J Epidemiol. 28(6): 1032-6.
36. Hara H, Akisue T, Fujimoto T, Imabori M, Kawamoto T, Kuroda R, Fujioka H, Yamamoto T, Doita M, Kurosaka M (2006) Expression of VEGF and its receptors and angiogenesis in bone and soft tissue tumors. Anticancer Res. 26(6B): 4307-11.
37. Heinrich P, Müller M, Graeve L (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 146.
38. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C (1999) Role of PDGF-B and PDGFR-β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. Development 126, 3047-3055.
39. Herbst RS, Onn A, Sandler A (2005) Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23: 3243-3256.
40. Hosaka K, Yang Y, Seki T, Nakamura M, Andersson P, Rouhi P, Yang X, Jensen L, Lim S, Feng N, Xue Y, Li X, Larsson O, Ohhashi T, Cao Y (2013) Tumour PDGF-BB expression levels determine dual effects of anti-PDGF

drugs on vascular remodelling and metastasis. Nature communications 4: 2129.

41. Igarashi J, Erwin PA, Dantas AP, Chen H, Michel T (2003)VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 10664-10669.
42. Igarashi J, Miyoshi M, Hashimoto T, Kubota Y, Kosaka H (2007) Hydrogen peroxide induces S1P1 receptors and sensitizes vascular endothelial cells to sphingosine 1-phosphate, a platelet-derivedlipid mediator. Am J Physiol Cell Physiol. 292: C740-8.
43. Isobe K, Hata Y, Tochigi N, Kaburaki K, Kobayashi H, Makino T, Otsuka H, Sato F, Ishida F, Kikuchi N, Hirota N, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Iyoda A, Homma S (2014) Clinical significance of BIM deletion polymorphism in non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation. J Thorac Oncol. 9(4): 483-7.
44. Kawai T, Hiroi S, Torikata C (1997) Expression in lung carcinomas of platelet-derived growth factor and its receptors. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 77: 431-436.
45. Krebs in Deutschland (GEKID, Zentrum für Krebsregisterdaten) (2010) [Online im Internet] URL: https://www.gbe-bund.de/pdf/Lunge_C33_34_2010.pdf [Stand 01.03.2015, 18:41].
46. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC (2010) The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 28: 5311-5320.
47. Leitlinie "Lungenkarzinom - Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge" (2010); Autoren: Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungmedizin (DGP), Deutsche Krebsgesellschaft DKG.
48. Leitzel K, Bryce W, Tomita J, Manderino G, Tribby I, Thomason A, Billingsley M, Podczaski E, Harvey H, Bartholomew M, Lipton A (1991) Elevated plasma platelet-derived growth factor B-chain levels in cancer patients. Cancer research 51: 4149-4154.
49. Li H, Chen D, Zhang J (2012) Analysis of intron sequence features associated with transcriptional regulation in human genes. PloS one 7: e46784.

50. Li X, Eriksson U (2003) Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGFD. Cytokine Growth Factor Rev 14: 91–8.
51. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, Rutherford M, Weiderpass E, Bray F (2014) International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. Lung Cancer.84(1): 13-22.
52. Ma L, Elliott SN, Cirino G, Buret A, Ignarro LJ, Wallace JL (2001) Platelets modulate gastric ulcer healing: role of endostatin and vascular endothelial growth factor release. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 6470-6475.
53. Maeda A, Nakata M, Yasuda K, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Hirami Y, Shimizu K (2013) Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on non-small cell lung cancer tumor angiogenesis. Oncol Rep. (1): 39-44.
54. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM; Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics (2005) Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23: 9067-9072.
55. Melloni BB (2014) Lung cancer in never-smokers: radon exposure and environmental tobacco smoke. Eur Respir J. 44(4): 850-2.
56. Mortensen K, Holck S, Christensen IJ, Skouv J, Hougaard DM, Blom J, Larsson LI (1999) Endothelial cell nitric oxide synthase in peritumoral microvessels is a favorable prognostic indicator in premenopausal breast cancer patients. Clin Cancer Res. 5: 1093–1097.
57. National Center for Biotechnology Information Databank [Online im Internet] URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp [Stand 01.03.2015, 19:09].
58. Nationales-Genomforschungsnetz [Online im Internet] URL: http://www.ngfn.de/index.php/die_entschl__sselung_des_gesamten_meschlichen_genoms.html [Stand 27.01.2015 um 18:51].
59. Nygaard AD, Spindler K-LG, Andersen RF, Jakobsen A (2010) The Predictive Value of Germline Polymorphisms in Patients with NSCLC. Journal of Cancer Therapy, no. 1, pp. 219-228.

60. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV (1999) ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. Transplant immunology 7: 127-128.
61. Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL (2013) Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. Lung Cancer 82: 179-189.
62. Reinmuth N, Rensinghoff S, Raedel M, Fehrmann N, Schwoppe C, Kessler T, Bisping G, Hilberg F, Roth GJ, Berdel W, Thomas M, Mesters RM (2007) Paracrine interactions of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in endothelial and lung cancer cells. International journal of oncology 31: 621-626.
63. Rose-James A, Sreelekha TT (2012) Molecular Markers with Predictive and Prognostic Relevance in Lung Cancer. Lung Cancer Inter. 2012: ID 729532.
64. Rosell R, Taron M, Camps C, Lopez-Vivanco G (2003) Influence of genetic markers on survival in non-small cell lung cancer. Drugs Today 39(10): 775.
65. Safi A, Sadmi M, Martinet N, Menard O, Vaillant P, Gallati H, Hosang M, Martinet Y (1992) Presence of elevated levels of platelet-derived growth factor (PDGF) in lung adenocarcinoma pleural effusions. Chest. 102(1): 204-207.
66. Shikada Y, Yonemitsu Y, Koga T, Onimaru M, Nakano T, Okano S, Sata S, Nakagawa K, Yoshino I, Maehara Y, Sueishi K (2005) Platelet-derived growth factor-AA is an essential and autocrine regulator of vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung carcinomas. Cancer Res 65: 7241–7248.
67. Sonveaux P, Jordan BF, Gallez B, Feron O (2009) Nitric oxide delivery to cancer: why and how? Eur J Cancer, 45: 1352-1369.
68. Statistisches Bundesamt Wiesbaden - Destatis [Online im Internet] URL: https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html [Stand 01.03.2015, 18:24].
69. Sun X, Ma SF, Wade MS, Flores C, Pino-Yanes M, Moitra J, Ober C, Kittles R, Husain AN, Ford JG, Garcia JG (2010) Functional variants of the sphingosine-1-phosphate receptor 1 gene associate with asthma susceptibility. J Allergy Clin Immunol 126: 241–249.
70. Syrigos K., Nutting C., Roussos C (2006) Tumors of the Chest: Biology, Diagnosis and Management. Springer Berlin Heidelberg. 3-5, 109.

71. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM (1995) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. Cancer Res. 55(18): 3964-8.
72. Tambur AR, Pamboukian S, Costanzo MR, Heroux A (2006) Genetic polymorphism in platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor are significantly associated with cardiac allograft vasculopathy. The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation 25: 690-698.
73. TU-Berlin, [Online im Internet] URL: http://www.fginfo.tu-berlin.de/projects/pics_stud_info/kurz-lang.JPG [Stand 27.01.2015, 18:08].
74. Uzunoglu FG, Kaufmann C, Wikman H, Güngör C, Bohn BA, Nentwich MF, Reeh M, Pantel K, Bockhorn M, Kutup A, Mann O, Izbicki JR, Vashist YK (2012) Vascular endothelial growth factor receptor 2 gene polymorphisms as predictors for tumor recurrence and overall survival in non-small-cell lung cancer. Ann Surg Oncol. 19(7): 2159-68.
75. Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PW, Smits P (2002) The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. J Hypertens. 20: 2023–7.
76. Wikipedia, [Online im Internet] URL: http://en.wikipedia.org/wiki/TaqMan#mediaviewer/File:Taqman.png [Stand 04.03.2015, 18:02].
77. Wynder EL, Muscat JE (1995) The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology. Environ Health Perspect. 103(Suppl 8): 143–148.
78. Xue Y, Lim S, Yang Y, Wang Z, Jensen LD, Hedlund EM, Andersson P, Sasahara M, Larsson O, Galter D, Cao R, Hosaka K, Cao Y. (2012) PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. Nature medicine 18: 100-110.
79. Zhang J, Cao R, Zhang Y, Jia T, Cao Y, Wahlberg E (2009) Differential roles of PDGFR-alpha and PDGFR-beta in angiogenesis and vessel stability. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 23: 153-163.

80. Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li XN, Chen L, Zhang Y, Coselli JS, Wang XL (2008) Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. Molecular biology of the cell 19: 3997-4005.

9. Danksagung

Mein Dank gilt für die Unterstützung im gesamten Verlauf der Dissertation von Beginn der Arbeit im Labor bis zum Abschluss Herrn Dr. med. FG Uzunoglu. Außerdem möchte ich mich bedanken für die Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Maximilian Bockhorn.

Als weiteres gilt mein Dank für das Ermöglichen meiner Dissertation der gesamten Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf und ihrem Leiter Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki. Im Speziellen möchte ich Frau Petra Merkert hervorheben für Ihre Hilfe im Labor.

Abschließend noch einmal ein großes Dankeschön an meine Familie und meine Freundin, die mich in dieser Zeit immer unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Duhovic
Vorname:	Adnan
Adresse:	Rodlergasse 20, 1190 Wien
E-Mail:	adnan.duhovic@googlemail.com
Geburtsdatum:	02.11.1987

Ausbildung und Beruf:

seit 04/2014	Arzt in Ausbildung an der Medizinischen Universität Wien Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin / Abteilung für Nuklearmedizin
10/2007 - 11/2013	Medizinstudium am Universitätsklinikum Eppendorf (Universität Hamburg) Staatsexamen (11/2013) abgeschlossen mit Note: 2,0
10/2006 - 4/2007	Wehrdienst beim Österreichischen Bundesheer
9/1999 - 6/2006	Bundesgymnasium/Bundesrealgymnasium Lichtenfels Graz Matura mit "Ausgezeichnetem Erfolg" abgeschlossen (Notenschnitt: 1,0) Fächer: Deutsch, Englisch, Mathematik, Chemie, Geschichte und Politische Bildung
1994 - 1998	Volksschule Graben in Graz

Praktika und sonstige Aktivitäten:

04/2013 - 07/2013	PJ Tertial Chirurgie Israelitisches Krankenhaus Hamburg
12/2012 - 03/2013	PJ Tertial Innere Medizin Inselspital Bern/Schweiz
08/2012 - 12/2012	PJ Tertial Neurologie Marienkrankenhaus Hamburg
09/2011	Famulatur Universitätsklinikum Belgrad/Serbien (Notfallmedizin)
09/2010	Famulatur in einer Hausarztpraxis
04/2010 - 06/2010	Famulatur im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder (Neurologie + Innere Medizin)
02/2008 - 03/2008 07/2008 - 09/2008	Pflege - Praktikum im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Graz / Eggenberg
2005	Mitglied der Jugendjury des Festivals des Österreichischen Films-DIAGONALE
1997-1998	Kinderdarsteller bei den Vereinigten Bühnen Graz

Sprachen:

Deutsch:	Muttersprache
Englisch:	Gut in Wort und Schrift
Bosnisch/Kroatisch/Serbisch:	Gut in Wort und Schrift
Italienisch	Grundlagen

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: .....