

Aus der Abteilung Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie  
(Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. F. A. Schöndube)  
im Zentrum Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Molekulargenetische Veränderungen in nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen,  
detektiert durch komparative genomische Hybridisierung (CGH)

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Timo Hellms  
aus  
Braunschweig

Göttingen 2012

**Dekan:**

**Prof. Dr. med. M. P. Schön**

**I. Berichterstatter:**

**Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. F. A. Schöndube**

**II. Berichterstatter/in:**

**III. Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>II. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>III. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>10</b>
1.1 Epidemiologie.....	10
1.1.1 Inzidenz.....	10
1.1.2 Mortalität.....	11
1.1.3 Ätiologie.....	11
1.2 Klassifikation der Tumoren.....	13
1.2.1 Entitäten.....	13
1.2.1.1 Adenokarzinom.....	13
1.2.1.2 Plattenepithelkarzinom.....	16
1.2.1.3 Großzelliges Karzinom.....	16
1.2.1.4 Kleinzelliges Karzinom.....	17
1.2.2 TNM-Klassifikation.....	18
1.2.2.1 Definition des Primärtumors „T“.....	18
1.2.2.2 Definition des Lymphknotenstatus „N“.....	20
1.2.2.3 Definition der Fernmetastasen „M“.....	20
1.2.2.4 Definition des Residualtumors „R“.....	21
1.2.3 Grading.....	22
1.2.4 UICC-Stadien.....	22
1.3 Diagnostik.....	24
1.3.1 Nichtinvasive Verfahren.....	24
1.3.1.1 Klinische Untersuchung und Anamnese.....	24
1.3.1.2 Laboruntersuchung.....	25
1.3.1.3 Röntgendiagnostik.....	25
1.3.1.4 Transthorakaler Ultraschall (TTUS).....	25
1.3.1.5 Computertomographie (CT).....	26
1.3.1.6 Magnetresonanztomographie (MRT).....	26
1.3.1.7 Positronenemissionstomographie (PET).....	26
1.3.2 Invasive Verfahren.....	27

---

1.3.2.1 Transthorakale Punktion / Pleurapunktion.....	27
1.3.2.2 Flexible Bronchoskopie.....	27
1.3.2.3 Lymphknotenbiopsie.....	27
1.3.2.4 Mediastinoskopie.....	28
1.3.2.5 Videoassistierte Thorakoskopie.....	28
1.4 Therapie.....	28
1.4.1 Chirurgische Tumorresektion.....	29
1.4.1.1 Keilexzision.....	29
1.4.1.2 Segmentektomie.....	29
1.4.1.3 Lobektomie.....	29
1.4.1.4 Bilobektomie.....	30
1.4.1.5 Pneumonektomie.....	30
1.4.1.6 Erweiterte Operationsverfahren.....	30
1.4.1.7 Videoassistierte Thoraxchirurgie (VATS).....	30
1.4.2 Chemotherapie.....	31
1.4.3 Strahlentherapie.....	31
1.4.4 Neue Therapieoptionen.....	32
1.4.4.1 Inhibitoren der EGFR-Thyrosinkinase.....	32
1.4.4.2 Antikörper gegen EGFR.....	32
1.4.4.3 Antikörper gegen VEGF.....	32
1.4.4.4 Vandetanib, ein Inhibitor von VEGFR und EGFR.....	33
1.5 Genetische Veränderungen beim Bronchialkarzinom.....	33
1.5.1 Bekannte Tumorsuppressorgene.....	34
1.5.2 Bekannte Protoonkogene.....	37
1.5.3 Weitere an der Tumorigenese beteiligte Gene.....	38
1.6 Komparative genomische Hybridisierung.....	40
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	42
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>44</b>
2.1 Patientenkollektiv.....	44
2.1.1 Zusammensetzung des Kollektivs.....	44
2.1.2 Follow-up.....	45
2.2 Labormaterialien.....	46
2.3 Labormethoden.....	50
2.3.1 Fixierung.....	50
2.3.2 Isolierung der Tumor-DNS.....	50
2.3.3 Nicktranslation.....	54
2.3.4 Komparative genomische Hybridisierung (CGH).....	57

---

2.3.5 Auswertung der CGH.....	63
2.4 Statistische Methoden.....	70
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>72</b>
3.1 Epidemiologie.....	72
3.1.1 Gesamtkollektiv.....	72
3.1.2 CGH-Kollektiv.....	74
3.2 CGH-Ergebnisse.....	76
3.2.1 CGH-Ergebnisse der Adenokarzinome.....	76
3.2.2 CGH-Ergebnisse der Plattenepithelkarzinome.....	77
3.3 Gruppenvergleiche.....	78
3.3.1 Vergleich von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.....	78
3.3.2 Vergleich von Kurz- und Langzeitüberlebenden.....	80
3.4 Auswirkungen einzelner Aberrationen auf die Überlebenszeit.....	81
3.5 Onkogenetische Bäume.....	83
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>85</b>
4.1 Epidemiologie.....	85
4.1.1 Gesamtkollektiv.....	85
4.1.2 CGH-Kollektiv.....	86
4.2 CGH-Ergebnisse.....	87
4.2.1 CGH-Ergebnisse der Adenokarzinome.....	88
4.2.2 CGH-Ergebnisse der Plattenepithelkarzinome.....	89
4.3 Gruppenvergleiche.....	91
4.3.1 Vergleich von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.....	91
4.3.2 Vergleich von Kurz- und Langzeitüberlebenden.....	94
4.4 Auswirkungen einzelner Aberrationen auf die Überlebenszeit.....	96
4.5 Onkogenetische Bäume.....	97
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>100</b>
5.1 Erkenntnisse dieser Studie.....	100
5.2 Kritische Betrachtung.....	101
5.3 Ausblicke.....	102
<b>6. Anhang: Tabellen 45 - 50.....</b>	<b>104</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>120</b>

## I. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Maligne epitheliale Tumoren der Lunge.....	15
Tabelle 2: Stadien des Primärtumors „T“.....	19
Tabelle 3: Stadien der Lymphknotenmetastasierung „N“.....	20
Tabelle 4: Stadien der Fernmetastasierung „M“.....	21
Tabelle 5: Stadieneinteilung des Residualtumors „R“.....	22
Tabelle 6: Definition der prognostisch relevanten UICC-Stadien.....	23
Tabelle 7: Unterschiede in der 5-Jahres-Überlebensrate zwischen klinisch und pathologisch diagnostizierten UICC-Stadien.....	24
Tabelle 8: Zusammenstellung aller Chemikalien und Biochemikalien.....	46
Tabelle 9: Zusammenstellung aller benutzten Laborgeräte.....	47
Tabelle 10: Liste aller Verbrauchsmaterialien.....	48
Tabelle 11: Das verwendete DNS-Isolierungssystem.....	48
Tabelle 12: Die benutzten molekularen Standards.....	49
Tabelle 13: Liste der Nukleotide und DNS-Präparate.....	49
Tabelle 14: Fluoreszenzfarbstoffkonjugate.....	49
Tabelle 15: Liste der verwendeten Enzyme.....	49
Tabelle 16: Metaphasenpräparate.....	49
Tabelle 17: Hard- und Software für die Auswertung.....	50
Tabelle 18: Zusammensetzung des DNS-Isolierungspuffers.....	51
Tabelle 19: Liste der Puffer aus dem QiAmp DNA Mini Kit von Qiagen.....	52
Tabelle 20: Zusammensetzung des TBE-Puffers.....	53
Tabelle 21: Zusammensetzung des Agarosegels.....	54
Tabelle 22: Zusammensetzung des ATL-Puffers.....	54
Tabelle 23: Zusammensetzung des 10x Reaktionspuffers.....	56
Tabelle 24: Zusammensetzung des Loading-Puffers versetzt mit EDTA.....	57
Tabelle 25: Zusammensetzung der Pepsinlösung.....	58
Tabelle 26: 2x SSC-Lösung wird durch Verdünnung der 20x SSC-Lösung hergestellt.....	58
Tabelle 27: Zusammensetzung der 20x SSC-Lösung.....	58
Tabelle 28: Zusammensetzung der Denaturierungslösung.....	58
Tabelle 29: Zusammensetzung des Mastermix.....	59

## I. Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 30: Zusammensetzung der Waschlösungen A, B und C.....	62
Tabelle 31: Zusammensetzung der Blockinglösung.....	63
Tabelle 32: Zusammensetzung der Detektionslösung.....	63
Tabelle 33: Verteilung der Patienten des Gesamtkollektivs auf Entitäten und Geschlechter.....	73
Tabelle 34: Verteilung der Patienten des Gesamtkollektivs auf die UICC-Stadien.....	73
Tabelle 35: Verteilung der Patienten des CGH-Kollektivs auf Entitäten und Geschlechter.....	75
Tabelle 36: Verteilung der Patienten des CGH-Kollektivs auf die UICC-Stadien.....	75
Tabelle 37: Liste der häufigsten Aberrationen im Genom der Adenokarzinome.....	77
Tabelle 38: Liste der häufigsten Aberrationen im Genom der Plattenepithelkarzinome.....	78
Tabelle 39: Vergleich der klinischen Parameter zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten.....	79
Tabelle 40: Vergleich der Häufigkeit chromosomaler Aberrationen von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.....	80
Tabelle 41: Statistischer Vergleich der chromosomalen Aberrationen von Kurz- und Langzeitüberlebenden.....	81
Tabelle 42: Auszug aus der Korrelation von Einzelarmveränderungen mit der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit.....	82
Tabelle 43: Vergleich der häufigsten chromosomalen Aberrationen der Adenokarzinome mit den Ergebnissen anderer Studien.....	89
Tabelle 44: Vergleich der häufigsten chromosomalen Aberrationen der Plattenepithelkarzinome mit den Ergebnissen anderer Studien.....	91
Tabelle 45: Bandengenaue CGH-Ergebnisse der Adenokarzinome.....	104
Tabelle 46: Bandengenaue CGH-Ergebnisse der Plattenepithelkarzinome.....	105
Tabelle 47: Liste der veränderten Chromosomenarme von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.....	108
Tabelle 48: Statistischer Vergleich der chromosomalen Aberrationen von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.....	111
Tabelle 49: Statistischer Vergleich der chromosomalen Aberrationen von Kurz- und Langzeitüberlebenden.....	114
Tabelle 50: Korrelation von Einzelarmveränderungen mit der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit.....	117

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate der vier wichtigsten Tumorentitäten.....	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Effekte von Aberrationen in der Tumor-DNS auf die Färbung der Metaphasechromosomen.....	42
Abbildung 3: Kriterien für die Zusammensetzung von Gesamtkollektiv und CGH-Kollektiv....	45
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Nicktranslation.....	56
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Hybridisierung.....	60
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Detektionsvorgangs.....	62
Abbildung 7: Fallbeispiel Bild 1.....	65
Abbildung 8: Fallbeispiel Bild 2.....	65
Abbildung 9: Fallbeispiel Bild 3.....	66
Abbildung 10: Fallbeispiel Bild 4.....	66
Abbildung 11: Fallbeispiel Bild 5.....	67
Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung der Färbung von Chromosom 5 im Ideogramm.....	68
Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung des Ideogramms von Patient Nr. 33.....	69
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtkollektivs.....	74
Abbildung 15: Onkogenetischer Baum der Adenokarzinome.....	84
Abbildung 16: Onkogenetischer Baum der Plattenepithelkarzinome.....	84



### III. Abkürzungsverzeichnis

5-JÜ	5-Jahres-Überlebensrate
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADH	Antidiuretisches Hormon
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatous polyposis coli
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BAX	Bcl-2 associated protein x
BCL2	B-cell-lymphoma 2
bHLHz	Basic-helix-loop-helix zipper
Biotin-16-dUTP	Biotin-markiertes Desoxyuridintriphosphat
BSA	Bovine serum albumine
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CCD	Charge-coupled device
CDK	Cyclin-dependent kinase
CGH	Comparative genomic hybridization
C-Myc	Cellular myelocytomatosis protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computertomographie
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Deoxyribunucleic acid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBUS-FNA	Endobronchial ultrasound fine needle aspiration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E2F	E2 promoter binding factor
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FDR	False discovery rate
FHIT	Fragile histidin trias gen

### III. Abkürzungsverzeichnis

---

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNA	Feinnadelaspiration
FUS1	First cell fusion mutant
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxilin-Eosin
hTERT	Humane-Telomerase-Reverse-Transkriptase
hTR	Humane-Telomerase-RNS-Komponente
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
KRAS-Gen	Kirsten rat sarcoma viral oncogen homologue
LDH	Lactatdehydrogenase
LOH	Loss of heterozygosity
LTLC	Long-term-lung-cancer-survivors
Max	Myc associated factor X
MDM2	Mouse double minute 2
MMAC1	Mutated in multiple advanced cancers
MMP	Matrix-Metallo-Proteasen
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Medizinisch-technischer Assistent
MYC	Myelocytomatosis oncogene
NRP-1	Neuropilin-1
NRP-2	Neuropilin-2
NSCLC	Non small cell lung cancer
PDE4D	Phosphodiesterase 4D
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PET	Positronenemissionstomographie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PLC- $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$
PTEN	Phosphate and tensin homolog detected on chromosome ten
RAR- $\beta$	Retinoic acid receptor $\beta$
Ras	Rat sarcoma-protein

### III. Abkürzungsverzeichnis

---

RASSF1A	Ras-Assoziationsdomänen-Familie-1A-Gen
RB	Retinoblastomprotein
RET	Rearranged during transfection
RKI	Robert-Koch-Institut
RNS	Ribonukleinsäure
SCFR	Stem cell growth factor receptor
SCLC	Small cell lung cancer
SEMA3B	Semaphorin 3B
SEMA3F	Semaphorin 3F
SIADH	Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion
SSC	Saline sodium citrat
TBE-Puffer	Puffer aus Tris, Borsäure und EDTA
THG	Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(6)-isothiocyanate
TSLC1	Tumor suppressor in lung cancer 1
TxRed	Texas red
UICC	Union for International Cancer Control
VALG	Veterans Administration Lung Study Group
VATS	Videoassistierte Thoraxchirurgie
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organization
Wnt	Wingless-type MMTV integration site
ZMYND10	Zinc finger MYND-type containing 10

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Lungenkrebs ist weltweit das Tumorleiden mit der größten Zahl an Neuerkrankungen und verantwortlich für die meisten Krebstoten [Parkin et al. 2005].

In Deutschland erkrankten im Jahr 2002 45.000 Menschen neu an Lungenkrebs. Damit ist sie die dritthäufigste Krebserkrankung bei Männern und Frauen. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 12 % bei Männern und 14 % bei Frauen zählt Lungenkrebs zu den prognostisch ungünstigsten Krebsformen und ist bei Männern auch in Deutschland die häufigste, bei Frauen die dritthäufigste Ursache für den Krebstod. Das mittlere Erkrankungsalter für Lungenkrebs liegt in Deutschland bei 68 Jahren [GEKID und RKI 2006].

### 1.1.1 Inzidenz

Die Rate der Neuerkrankungen an Lungenkrebs ist bei Männern und Frauen in Deutschland unterschiedlich. Im Jahr 2002 erkrankten nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts (RKI 2006) insgesamt 218.252 Männer und 206.011 Frauen an einem malignen Tumor. 14,9 % der Männer (32.500) und 6,1 % der erkrankten Frauen (12.450) litten an Lungenkrebs. Häufiger waren bei Männern nur Prostata- (22,3 %) und Darmkrebs (16,3 %) und bei Frauen Brust- (26,8 %) und Darmkrebs (17,4 %) [GEKID und RKI 2006].

Die Neuerkrankungsrate an Bronchialkarzinomen sank bei Männern in der Zeit von 1990 bis 2002 von 79,2 pro 100.000 auf 66,8 pro 100.000. Im gleichen Zeitraum stieg die Neuerkrankungsrate bei Frauen von 13,1 auf 21,0 pro 100.000 an. Erklärt wird die Annäherung mit dem veränderten Rauchverhalten der Bevölkerung, da die Inhalation von Tabakrauch der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs ist. Der Anteil der Raucher an der männlichen Bevölkerung in den alten Bundesländern sank zwischen 1984 und 2003 von 41,6 % auf 37,7 % ab. Der Anteil an rauchenden Frauen stieg gleichzeitig von 26,7 % auf 32,3 % an [RKI 2006].

In der amerikanischen Krebsstatistik des Jahres 2006 zeigte sich für Bronchialkarzinome eine Rate an Tumorneuerkrankungen von 77,8 pro 100.000 bei Männern und 48,9 pro 100.000 bei Frauen [Jemal et al. 2006].

### 1.1.2 Mortalität

Der Anteil der Bronchialkarzinome an allen tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen in Deutschland liegt für Männer bei 26,3 %, gefolgt von Darm- und Prostatakrebs mit 12,8 % und 10,4 %. Bei Frauen ist Lungenkrebs für 10,4 % aller Krebstoten verantwortlich und liegt damit hinter Brust- (17,8 %) und Darmkrebs (14,9 %) [GEKID und RKI 2006].

Die Mortalitätsrate sank für Männer im Zeitraum von 1990 bis 2002 von 71,9 auf 58,7 pro 100.000. Im gleichen Zeitraum stieg die Mortalitätsrate für Frauen von 11,5 auf 16,3 pro 100.000 an [RKI 2006].

Bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen war Lungenkrebs in der amerikanischen Krebsstatistik des Jahres 2006 bei Männern mit 31 % und auch bei Frauen mit 26 % die häufigste Ursache. Die Mortalitätsrate betrug im Jahr 2006 für Männer 76,3 pro 100.000 und für Frauen 40,9 pro 100.000 [Jemal et al. 2006].

### 1.1.3 Ätiologie

Die aktive Inhalation von Tabakrauch ist die Hauptursache für die Entwicklung von Lungenkrebs [Loeb et al. 1984]. Etwa 90 % der Lungenkrebserkrankungen von Männern und 60 % von Frauen können auf das Rauchen zurückgeführt werden [RKI 2006]. Die kanzerogenen Substanzen im Rauch begünstigen das Auftreten von allen histologischen Typen von Bronchialkarzinomen. Gegenüber Nichtrauchern haben Raucher durchschnittlich ein 13,4-mal höheres Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken. Dabei begünstigt das Tabakrauchen die Entstehung der einzelnen Entitäten unterschiedlich stark. Das Risiko für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen ist bei Rauchern 18,8-mal so hoch wie bei Nichtrauchern. Das Risiko für die Entstehung von kleinzelligen Bronchialkarzinomen ist 14,3-mal so hoch, für die Entstehung von großzelligen Karzinomen 34,3-mal so hoch und für die Entstehung von Adenokarzinomen 7,9-mal so hoch wie bei Nichtrauchern. Mit zunehmender Intensität und Dauer des Rauchens sowie mit zunehmender Menge gerauchter Zigaretten pro Tag steigt die Wahrscheinlichkeit, an Lungenkrebs zu erkranken. Umgekehrt nimmt die Wahrscheinlichkeit zu erkranken ab, je mehr Jahre nach der Entwöhnung vom aktiven Rauchen vergehen. Ein gutes Maß für das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, ist die Gesamtmenge der gerauchten Zigaretten in „packyears“ (Packungsjahre). Ein „packyear“ bedeutet, ein Jahr lang eine Schachtel Zigaretten pro Tag geraucht zu haben. Raucher mit bis zu 45 „packyears“ haben gegenüber Nichtrauchern ein 6,5-fach erhöhtes Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken. Raucher

mit 45 - 89 „packyears“ haben ein 12,7-fach erhöhtes Risiko und Raucher mit mehr als 90 „packyears“ haben ein 20,5-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko [Barbone et al. 1997].

Neben dem aktiven Rauchen schädigt auch das Passivrauchen die Gesundheit und wird für 1,6 % aller Neuerkrankungen verantwortlich gemacht [Molina et al. 2008]. Die passive Inhalation von Zigarettenrauch im Kindesalter erhöht das Risiko, im späteren Leben an Lungenkrebs zu erkranken, je nach Intensität des Passivrauchens, um bis zur 3,6-fachen Wahrscheinlichkeit gegenüber Kindern, die keinem Zigarettenrauch ausgesetzt waren [Vineis et al. 2005]. Die kanzerogene Wirkung des Passivrauchens konnte bereits 1986 von Wald et al. festgestellt werden, da Nichtraucherinnen, die mit Rauchern zusammen lebten, im Vergleich zu jenen, die mit Nichtrauchern zusammen lebten, eine 1,35-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit hatten, an Lungenkrebs zu erkranken. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, an Lungenkrebs zu erkranken, für nichtrauchende Frauen, die mit Rauchern zusammen leben, signifikant mit der Anzahl gerauchter Zigaretten pro Tag ansteigt. Die Wahrscheinlichkeit stieg um den Faktor 1,42 (1-14 Zigaretten pro Tag), 1,53 (15-19 Zigaretten pro Tag) und 1,91 (20 und mehr Zigaretten pro Tag) an [Hirayama 1983].

Eine weitere Ursache für die Entstehung von Lungenkrebs ist die Exposition gegenüber Asbeststäuben. Im Jahr 1955 konnte bei Arbeitern, die über mehrere Jahre Asbeststäuben ausgesetzt waren, eine ca. 10-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Lungenkrebs beobachtet werden [Doll 1955]. Die Frage nach dem Zusammenhang zwischen der Intensität der Asbestexposition und der Wahrscheinlichkeit, an Lungenkrebs zu erkranken, ist bisher nur unzureichend geklärt. Es scheint jedoch, dass eine Asbestexposition, die eine Asbestose ausgelöst hat, mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Entstehung von Lungenkrebs einhergeht [Weiss 1999].

Auch das radioaktive Gas Radon hat eine kanzerogene Wirkung und begünstigt die Entwicklung von Bronchialkarzinomen. Grundsätzlich werden durch Exposition gegenüber Radon die Entwicklung aller Lungenkrebsentitäten verstärkt. Minenarbeiter, die besonders hohen Radondosen ausgesetzt waren, neigten allerdings eher zur Entwicklung von kleinzelligen Bronchialkarzinomen oder Plattenepithelkarzinomen, wohingegen Minenarbeiter mit geringerer Radonexposition stärker zu Adenokarzinomen neigten [Kreuzer et al. 2000]. Bei Zigarettenrauchenden Minenarbeitern wirken die kanzerogenen Effekte von Radon und Tabakrauch synergistisch [Saccomanno et al. 1988].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen einer Silikose bei Bergleuten ein zusätzlicher Risikofaktor für die Entstehung von nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen ist [Taeger et al. 2006].

## **1.2 Klassifikation der Tumoren**

Die Tumoren der Lunge, der Bronchien und der Trachea werden aufgrund unterschiedlicher histologischer Morphologie den verschiedenen Entitäten und ihren Untergruppen zugeordnet. Diese Einteilung wurde 1976 durch die World Health Organization (WHO) eingeführt und gewährleistet eine internationale Vergleichbarkeit von Krankheitsdaten, Verlaufsprognosen und Forschungsergebnissen durch verbindliche Einteilungsstandards und unmissverständliche Nomenklatur [WHO 2000].

Ebenfalls aufgrund morphologischer Eigenschaften des Tumors wird vom Pathologen der Grad der Differenzierung festgelegt.

Die Ausbreitung des Tumors im Patienten wird klinisch diagnostiziert und beschreibt den Progress der Tumorerkrankung eines Patienten individuell. Beschrieben wird der Status der Erkrankung mit dem TNM-System (Tumor, Nodus, Metastase), welches einem Tumorstadium nach der Union for International Cancer Control (UICC) zugeordnet wird. Das UICC-Stadium fasst Patienten mit gleicher Prognose und gleichen Therapieoptionen zusammen [Mountain 1997].

### **1.2.1 Entitäten**

Die verschiedenen Entitäten unterscheidet man anhand ihrer morphologischen Eigenschaften in Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, kleinzellige Karzinome und großzellige Karzinome [Hatcher und Dover 2003]. Die übrigen Neoplasien werden seltenen Differenzierungsvarianten zugeordnet oder fallen in eine Gruppe unklassifizierbarer Tumoren. Der histologische Typus und seine Differenzierungsvariante werden international nach der International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) eingeteilt [WHO 2000]. Aufgrund ihres klinisch besonders aggressiven Verhaltens, der damit einhergehenden fatalen Prognose und den unterschiedlichen Therapiestrategien trennt man die kleinzelligen Bronchialkarzinome (SCLC) von den nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) [Junker und Petersen 2009].

#### **1.2.1.1 Adenokarzinom**

Adenokarzinome stellen mit ca. 32 % den größten Anteil an malignen Lungentumoren bei Frauen, Exrauchern und bei Menschen, die nie geraucht haben [Travis et al. 1995; Brambilla et al. 2001]. Durch einen starken Anstieg der Inzidenzrate sind sie in vielen Ländern inzwischen auch bei Männern die häufigste Entität [Devesa et al. 2005]. Es wird vermutet, dass die

ansteigende Inzidenz durch ein verändertes Rauchverhalten und eine veränderte Zusammensetzung des Tabakrauchs beeinflusst wird. Der Anteil rauchender Frauen ist seit vielen Jahrzehnten angestiegen und erhöhte damit auch die Inzidenz der Adenokarzinome [Devesa et al. 1991].

Mit der Einführung und Verbreitung von Filterzigaretten über die letzten Jahrzehnte änderte sich auch die Zusammensetzung des Zigarettenrauchs. Der Teer- und Nikotin-Gehalt wurde reduziert, gleichzeitig stieg der Anteil von Nitraten und ihren Verbrennungsprodukten im Rauch deutlich an. In Tierversuchen konnten unter den Verbrennungsprodukten der Nitrate hochpotente Kanzerogene gefunden werden, die Adenome und Adenokarzinome auslösen können [Hoffmann D und Hoffmann I 1997].

Es wird darüber hinaus vermutet, dass das Rauchen von Filterzigaretten und sogenannten „light“-Zigaretten zu tieferer Inhalation und damit zu einer stärkeren Ablagerung der kanzerogenen Substanzen in der Peripherie der Lunge führt. Dieser Ort stellt die Hauptlokalisation von Adenokarzinomen dar [Kreuzer et al. 2006].

Histologisch bilden Adenokarzinome eine heterogene Gruppe. Mehr als 90 % der Adenokarzinome zeigen verschiedene Differenzierungsvarianten in ein und demselben Tumor. Der überwiegenden Komponente entsprechend können sie jedoch meistens einer Untergruppe zugeordnet werden (siehe Tabelle 1) [Motoi et al. 2008].

Die 5-Jahres-Überlebensrate der Adenokarzinome ist mit 16,6 % die günstigste unter den malignen Lungentumoren (siehe Abbildung 1) [Travis et al. 1995].



**Adenokarzinome**

- gemischtes Adenokarzinom
- azinäres Adenokarzinom
- papilläres Adenokarzinom
- bronchioalveoläres Karzinom
- solides Adenokarzinom mit Mucinproduktion

**Plattenepithelkarzinome**

- papilläres Plattenepithelkarzinom
- klarzelliges Plattenepithelkarzinom
- kleinzelliges Plattenepithelkarzinom
- basaloides Plattenepithelkarzinom

**Großzellige Karzinome**

- großzelliges neuroendokrines Karzinom
- basaloides Karzinom
- lymphoepithelioma-ähnliches Karzinom
- klarzelliges Karzinom
- klarzelliges Karzinom mit rhabdoidem Phänotyp

**Kleinzellige Karzinome**

- kombiniertes kleinzelliges Karzinom

**Adenosquamöse Karzinome**

**Sarkomatoide Karzinome**

**Karzinoidtumoren**

**Karzinome vom Speicheldrüsen-Typ**

Tabelle 1: Maligne epitheliale Tumoren der Lunge. Modifiziert nach Travis et al. (2004, S. 10).

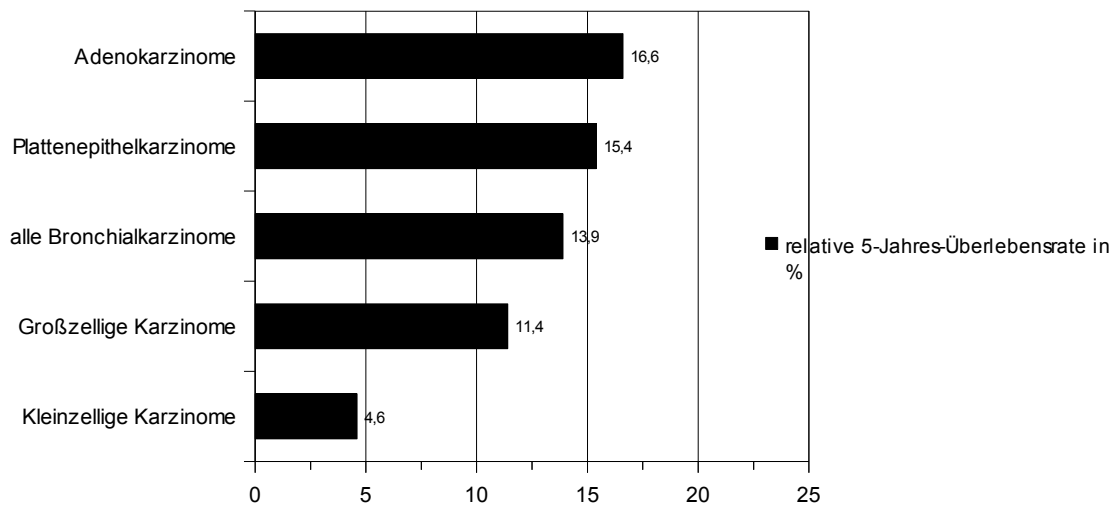


Abbildung 1: Durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate der vier wichtigsten Tumorentitäten. Modifiziert nach Travis et al. (1995, S. 198).

### 1.2.1.2 Plattenepithelkarzinom

Aufgrund der starken Zunahme der Inzidenz von Adenokarzinomen in den vergangenen Jahrzehnten sind Plattenepithelkarzinome mit ca. 29 % nicht mehr die häufigste Entität unter den Bronchialkarzinomen [Travis et al. 1995]. Bei Männern nahm die Inzidenz der Plattenepithelkarzinome sogar über Jahre langsam ab. Der Grund dafür ist vermutlich der Wechsel vieler Raucher von filterlosen Zigaretten zu „light“-Zigaretten mit reduziertem Nikotin- und Teer-Gehalt [Hatcher und Dover 2003]. Durch die hohe Konzentration von Nikotin im Rauch filterloser Zigaretten, Zigarren und Pfeifen reicht eine flache Inhalation aus, um ausreichend viel Nikotin über die Schleimhäute aufzunehmen und so das Verlangen danach zu befriedigen [Wynder und Muscat 1995]. Durch die flache Inhalation kommen die kanzerogenen Substanzen bei den Betroffenen hauptsächlich mit den oberen Atemwegen und den zentralen Anteilen der Lunge in Kontakt, wo eher Plattenepithelkarzinome als Adenokarzinome entstehen [Higgins et al. 1988].

Entsprechend ihrer primären Lokalisation kann man Plattenepithelkarzinome in ca. zwei Drittel der Fälle einer zentralen und in nur einem Drittel der Fälle einer peripheren Form zuordnen. Beide Tumortypen haben eine identische Prognose, allerdings nimmt man an, dass sie sich in ihrer Entstehung unterscheiden. Für zentral gelegene Plattenepithelkarzinome wurde eine Dysplasie-Karzinom-Sequenz beschrieben, wohingegen eine solche Sequenz für das peripher lokalisierte Karzinom und die anderen Entitäten noch nicht nachgewiesen werden konnte [Funai et al. 2003].

Histologische Kriterien für Plattenepithelkarzinome sind Verhornungszeichen und der Nachweis von Interzellularbrücken [Junker 2006]. Entsprechend ihrer Differenzierung können die Tumoren einer Untergruppe zugeordnet werden (siehe Tabelle 1).

Die 5-Jahres-Überlebensrate ist mit 15,4 % schlechter als die der Adenokarzinome (siehe Abbildung 1) [Travis et al. 1995].

### 1.2.1.3 Großzelliges Karzinom

Das großzellige Karzinom ist die seltenste der vier wichtigen Differenzierungsformen mit einem Anteil von ca. 9 % aller Bronchialkarzinome [Travis et al. 1995]. Dabei bestehen die großzelligen Karzinome aus einer Gruppe undifferenzierter Tumoren, die sich durch Abwesenheit von glandulären, plattenepithelialen oder für kleinzellige Karzinome typischen Differenzierungsmustern definiert [Junker 2006]. Ähnlich der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen nahm auch die Inzidenzrate großzelliger Karzinome in den

vergangenen Jahrzehnten ab. Aufgrund der insgesamt niedrigen Fallzahlen ist die Ursache für diese Entwicklung nur schwer zu ermitteln [Yoshimi et al. 2003].

Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit der großzelligen Karzinome liegt über der von kleinzelligen Karzinomen, ist mit 11,4 % unter den nicht kleinzelligen Tumoren allerdings die schlechteste (siehe Abbildung 1) [Travis et al. 1995]. Wie auch für die anderen Entitäten ist für die Entstehung von großzelligen Karzinomen die Inhalation von Tabakrauch der Hauptrisikofaktor [Barbone et al. 1997].

### **1.2.1.4 Kleinzelliges Karzinom**

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist mit ca. 18 % das dritthäufigste Karzinom unter den Lungentumoren [Travis et al. 1995]. Es entsteht bevorzugt in zentralen Abschnitten des Bronchialsystems [Watson und Berg 1962]. Histologisch bestimmen kleine zytoplasmaarme Tumorzellen mit hyperchromatischen, rund bis spindelförmigen Zellkernen das Bild [Junker und Petersen 2009].

Die Prognose dieser Entität ist mit unter 5 % 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit äußerst schlecht (siehe Abbildung 1) [Travis et al. 1995]. Ursächlich für die schlechte Überlebensrate sind das besonders schnelle und aggressive Wachstum, sehr früh auftretende Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie das frühzeitige Rezidivieren nach initial gutem Ansprechen auf Chemotherapie [Jackman und Johnson 2005].

Wegen der oft schon zum Zeitpunkt der Diagnose vorhandenen Metastasen und des dramatisch schnellen Verlaufs wurde für die Einteilung kleinzelliger Karzinome neben dem TNM-System der UICC auch die klinisch orientierte Unterteilung in „limited disease“ (Tumorausbreitung auf einen Hemithorax begrenzt) und „extensive disease“ (Tumorinvasion über einen Hemithorax hinaus) der VALG (Veterans Administration Lung Study Group) benutzt [Stahel et al. 1989].

60 - 70 % der SCLC werden im fortgeschrittenen Stadium „extensive disease“ diagnostiziert und haben damit eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von nur 2 %. Die 30 - 40 % der Tumoren, die sich noch im lokal begrenzten Stadium „limited disease“ befinden, haben immerhin eine 5-Jahres-Überlebensrate von 12 - 17 % [Jackman und Johnson 2005]. Aufgrund besserer Vergleichbarkeit wird inzwischen jedoch empfohlen, das TNM-System auch für die Einteilung der kleinzelligen Bronchialkarzinome zu verwenden [Shepherd et al. 2007].

## 1.2.2 TNM-Klassifikation

Um die Ausbreitung der Tumorerkrankung beurteilen zu können, die Prognose zu ermitteln und die Therapiestrategie festzulegen, wird jeder Patient mit Bronchialkarzinom einem „Staging“ (Stadieneinteilung) unterzogen. Dabei wird versucht, mit Hilfe von verschiedenen diagnostischen Verfahren, die Ausdehnung des Primärtumors und die Anzahl an befallenen Lymphknoten zu ermitteln. Außerdem wird nach Metastasen in tumorfernen Organen gesucht. Beim Einteilen in Stadien wird international das TNM-System verwendet. Dabei werden Primärtumor (T), Lymphknotenstatus (N) und Fernmetastasierung (M) beurteilt.

Die Stadieneinteilung erfolgte anhand der zu Beginn dieser Arbeit aktuellen 6. Klassifikation der UICC, die für Lungenkrebs unverändert mit der 5. Klassifikation übereinstimmt [Mountain 1997; Sobin und Wittekind 2002]. Inzwischen gibt es eine neuere 7. Klassifikation, die eine feinere Stadieneinteilung der Tumoren vorsieht [Goldstraw et al. 2007].

Dem TNM-Stadium wird ein Buchstabe vorweg gestellt, der beschreibt, wie das Stadium diagnostiziert wurde:

- c: klinische Diagnose
- p: histologisch gesicherte Diagnose
- a: autoptisch gesicherte Diagnose
- y: Tumor mit neoadjuvanter Chemotherapie vorbehandelt
- r: TNM-Stadium eines Rezidivs
- u: mittels Ultraschall bestimmtes Stadium.

### 1.2.2.1 Definition des Primärtumors „T“

Je nach Durchmesser und Infiltration in umgebende Strukturen wird ein Tumor in die Stadien T1 - 4 eingeteilt (siehe Tabelle 2). Relevant für die Einteilung ist neben dem Tumordurchmesser die Infiltration in umgebende Strukturen wie zum Beispiel Pleura, Thoraxwand und Zwerchfell. Darüber hinaus wird die endobronchiale Ausdehnung des Tumors in die Stadien eingebunden. Je weiter sich der Tumor der Trachealbifurkation und der Karina nähert, desto höher ist das Tumorstadium [Sobin und Wittekind 2002].

Eine endgültige Aussage über die Infiltration in benachbarte Organe und die Größe des Primärtumors kann jedoch erst nach einer Operation und der histologischen Aufarbeitung des Resektats getroffen werden.

1. Einleitung

Stadium	6. Edition der TNM-Klassifikation	7. Edition der TNM-Klassifikation
Tx:	Primärtumor kann nicht beurteilt werden - oder positive Zytologie aus Sputum oder Bronchiallavage; jedoch keine Lokalisation eines Primärtumors durch Bildgebung oder Bronchoskopie möglich	unverändert
T0:	kein Nachweis eines Primärtumors	unverändert
Tis:	Carcinoma in situ	unverändert
T1:	Tumordurchmesser $\leq 3$ cm ohne Invasion des Hauptbronchus	unverändert
T1a:	-	Tumordurchmesser $\leq 2$ cm
T1b:	-	Tumordurchmesser $> 2$ cm aber $\leq 3$ cm
T2:	Tumordurchmesser $> 3$ cm - oder Invasion des Hauptbronchus $\geq 2$ cm distal der Karina - oder Invasion der viszeralen Pleura - oder assoziiert mit Atelektasen oder obstruktiver Pneumonitis, die nicht die ganze Lunge betrifft	Tumordurchmesser $> 3$ cm aber $\leq 7$ cm - oder Invasion des Hauptbronchus $\geq 2$ cm distal der Karina - oder Invasion der viszeralen Pleura - oder assoziiert mit Atelektasen oder obstruktiver Pneumonitis, die nicht die ganze Lunge betrifft
T2a:	-	Tumordurchmesser $> 3$ cm aber $\leq 5$ cm
T2b:	-	Tumordurchmesser $> 5$ cm aber $\leq 7$ cm
T3:	Tumoren jeder Größe mit Invasion von Brustwand, Zwerchfell, parietalem Perikard oder mediastinaler Pleura  - oder Infiltration des Hauptbronchus $< 2$ cm distal der Karina ohne Befall der Karina - oder assoziiert mit Atelektasen oder obstruktiver Pneumonitis, die eine ganze Lunge betreffen	Tumordurchmesser $> 7$ cm, oder Tumoren jeder Größe mit Invasion von Brustwand, Zwerchfell, Nervus phrenicus, parietalem Perikard oder mediastinaler Pleura  - oder Infiltration des Hauptbronchus $< 2$ cm distal der Karina ohne Befall der Karina - oder assoziiert mit Atelektasen oder obstruktiver Pneumonitis, die eine ganze Lunge betreffen - oder separatem Tumorknoten im gleichen Lappen wie der Primärtumor
T4:	Tumoren jeder Größe mit - Invasion von Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörpern oder Karina - oder mit Tumormetastase(n) im gleichen Lungenlappen wie der Primärtumor - oder mit malignem Pleura- oder Perikarderguss	Tumoren jeder Größe mit - Invasion von Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörpern, Karina oder Nervus laryngeus recurrens - oder mit Tumormetastase in einem weiteren ipsilateralen Lungenlappen

Tabelle 2: Stadien des Primärtumors „T“. Vergleich der 6. mit der aktuellen 7. Edition der TNM-Klassifikation. Modifiziert nach Sobin und Wittekind (2002, S. 99 – 103) und Goldstraw et al. (2007, S. 709).

### 1.2.2.2 Definition des Lymphknotenstatus „N“

Den Stationen des Lymphabflusses entsprechend unterteilt man den Status der lymphogenen Metastasierung in die Stadien N0 - 3 (siehe Tabelle 3). Die Drainage der pulmonalen Lymphe erfolgt über die regionalen Lymphknoten, die intrapulmonal, peribronchial und hilär lokalisiert sind. Weiter wird die Lymphe über zentral gelegene subkarinale Lymphknoten oder Lymphknoten im Mediastinum abgeleitet. Im Verlauf der lymphogenen Metastasierung können auch weiter entfernte Lymphknotenstationen betroffen sein. Neben kontralateralen hilären oder mediastinalen Lymphknoten ist auch ein Befall extrathorakaler Stationen wie Skalenuslymphknoten oder supraklavikulärer Lymphknoten möglich. Ist ein Lymphknoten vom Tumor befallen, ohne dass vorgeschaltete Lymphknotenstationen betroffen sind, handelt es sich um eine „Skipping“-Metastase (Überspringende Metastase) [Junker et al. 1997].

Eine sichere Klärung des Lymphknotenstatus kann nur durch eine regelgerechte Lymphknotenexstirpation während einer Operation und der dazugehörigen mikroskopischen Diagnostik erfolgen.

Die Beurteilung des Lymphknotenstatus wurde in der neuen 7. Klassifikation nicht verändert [Mountain 1997; Goldstraw et al. 2007].

Stadium	6. und 7. Edition der TNM-Klassifikation
Nx	Keine Beurteilung der regionalen Lymphknoten möglich
N0	Keine Metastasen in regionären Lymphknoten nachweisbar
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen, ipsilateralen hilären und/oder intrapulmonalen Lymphknoten einschließlich durch invasives Wachstum des Primärtumors betroffene Lymphknoten
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen hilären oder mediastinalen Lymphknoten oder in supraklavikulären Lymphknoten oder in Skalenuslymphknoten

*Tabelle 3: Stadien der Lymphknotenmetastasierung „N“. Modifiziert nach Sobin und Wittekind (2002, S. 99 – 103).*

### 1.2.2.3 Definition der Fernmetastasen „M“

Absiedlungen des Primärtumors treten häufig im Knochen, im Gehirn und in der Leber auf. Außerdem kann man Absiedlungen in der Lunge selbst und in den Nebennieren finden [Yoshino et al. 2001]. Die Einteilung von Lungenmetastasen wurde jedoch in der aktuellen

7. Klassifikation geändert (siehe Tabelle 4). Demnach werden ipsilaterale pulmonale Metastasen als T3 oder T4 eingestuft und nur kontralaterale pulmonale Metastasen zu den Fernmetastasen der neu geschaffenen Kategorie M1a gerechnet. Ihr werden außerdem die Tumoren zugeordnet, die mit einem malignen Pleura- oder Perikarderguss sowie einer Pleurakarzinose assoziiert sind. Organmetastasen, die außerhalb der Lunge liegen, werden nun der Kategorie M1b zugeordnet [Goldstraw et al. 2007].

Stadium	6. Edition der TNM-Klassifikation	7. Edition der TNM-Klassifikation
Mx	Fernmetastasierung nicht beurteilbar	unverändert
M0	keine Fernmetastasen vorhanden	unverändert
M1	Fernmetastase vorhanden - oder ein Tumorknoten in einem andern Lungenlappen als dem des Primärtumors	-
M1a	-	- Metastase(n) in einem kontralateralen Lungenlappen - Maligner Pleura- oder Perikarderguss vorhanden - Pleurakarzinose vorhanden
M1b	-	Fernmetastase(n) in anderen Organsystemen als der Lunge vorhanden

Tabelle 4: Stadien der Fernmetastasierung „M“. Vergleich der 6. mit der aktuellen 7. Edition der TNM-Klassifikation. Modifiziert nach Sobin und Wittekind (2002, S. 99 - 103) sowie Goldstraw et al. (2007, S. 709).

#### 1.2.2.4 Definition des Residualtumors „R“

Das R-Stadium ergänzt die TNM-Klassifikation und beschreibt den Residualtumor, der postoperativ im Patienten verblieben ist. Besonders die Untersuchung der Resektionsränder nach einer Tumorresektion ist makroskopisch nur unzureichend möglich und bedarf einer mikroskopischen Kontrolle.

Die Art des Residualtumors wird durch drei Stadien von R0 - 2 unterteilt (siehe Tabelle 5). Dabei bedeutet R0, dass der Operateur den tumortragenden Lappen vollständig entfernen konnte und in der histologischen Untersuchung des Resektats ein ausreichender Abstand der Tumorzellen zu den Resektionsrändern festgestellt wurde. In das R1-Stadium fallen Tumoren, die intraoperativ vollständig entfernt werden konnten, bei denen in der histologischen

Untersuchung jedoch Tumorzellen in den Resektionsrändern gefunden wurden. Ebenfalls in das R1-Stadium werden Patienten eingeteilt, bei denen histologisch Tumorzellen in Gewebeproben oder Biopsien gefunden wurden, die nicht vom tumortragenden Resektat stammen. R2 bedeutet, dass es nicht gelungen ist, den Tumor komplett zu entfernen, und makroskopisch sichtbare Tumorherde verblieben sind. Die R-Klassifikation kann auch verwendet werden, um das Ergebnis von Chemo- oder Strahlentherapie zu beschreiben, wobei dafür meistens Regressionsgrade angegeben werden [Wittekind et al. 2002].

Stadium	Beurteilung
Rx	Der Status des Residualtumors kann nicht beurteilt werden
R0	Makroskopisch und mikroskopisch Tumor vollständig entfernt
R1	Tumor makroskopisch komplett entfernt, mikroskopisch sind jedoch Tumorzellen in den Resektionsrändern vorhanden
R2	Tumor makroskopisch nicht komplett entfernt

*Tabelle 5: Stadieneinteilung des Residualtumors „R“. Modifiziert nach Wittekind et al. (2002, S. 2512).*

### 1.2.3 Grading

Das „Grading“ ist eine histologische Beurteilung des Grades der Differenzierung von Tumorzellen. Mit abnehmendem Grad der Differenzierung werden sie von G1 - 3 eingeteilt, wobei G1 gut differenziert, G2 mäßig differenziert, G3 schlecht differenziert bedeutet [WHO 2000]. Die Kriterien für die verschiedenen Differenzierungsgrade sind dabei abhängig von der Tumorentität [Travis et al. 2004].

### 1.2.4 UICC-Stadien

Die TNM-Stadien werden entsprechend ihrer zu erwartenden Prognose eingeteilt und dem entsprechenden UICC-Stadium zugeordnet (siehe Tabelle 6).

Besonders genau kann die Einteilung erfolgen, wenn die TNM-Stadien durch histologische Auswertung gesichert wurden (siehe Tabelle 7). Die rein klinisch erhobenen Stadien entsprechen oft nicht den Stadien, die nach chirurgischer und pathologischer Begutachtung bestimmt werden [Mountain 1997]. Durch die ergänzenden intraoperativen Sicht- und Tastbefunde eines erfahrenen Chirurgen sowie die histologische Untersuchung aller



## 1. Einleitung

entnommenen Lymphknoten wird auch ein Fortschreiten der Tumorerkrankung erfasst, das mit bildgebenden Verfahren nicht nachweisbar ist. Mit histologisch gesicherten Tumorstadien ist also eine genauere Prognoseeinschätzung als mit rein klinisch bestimmten Stadien möglich, da sie mit größerer Wahrscheinlichkeit die tatsächliche Ausbreitung des Tumorleidens beschreiben. Patienten, die einen Zeitraum von 5 Jahren nach Diagnose eines primären Lungenkrebses überleben, werden als Langzeitüberlebende oder LTLC („Long-term-lung-cancer-survivors“) bezeichnet. Diese ca. 15 % der Erkrankten sind allerdings weiterhin gefährdet, ein Rezidiv zu erleiden. Rezidive können auch nach über 10 Jahren tumorfreien Überlebens auftreten. Darüber hinaus haben Erkrankte ein hohes Risiko, an einem Zweittumor der Atemwege zu erkranken [Molina et al. 2008].

6. Edition der TNM-Klassifikation	7. Edition der TNM-Klassifikation	UICC-Stadium
-	Tx N0 M0	Okkultes Karzinom
Tis N0 M0	Tis N0 M0	0
T1 N0 M0	T1a, b N0 M0	I A
T2 N0 M0	T2a N0 M0	I B
T1 N1 M0	T1a N1 M0 T1b N1 M0 T2a N1 M0 T2b N0 M0	II A
T2 N1 M0 T3 N0 M0	T2b N1 M0 T3 N0 M0	II B
T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0	T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0 T4 N0 M0 T4 N1 M0	III A
T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0 Jedes T N3 M0	T4 N2 M0 Jedes T N3 M0	III B
Jedes T jedes N M1	Jedes T jedes N M1a, b	IV

*Tabelle 6: Definition der prognostisch relevanten UICC-Stadien. Vergleich der Zuordnung nach 6. und 7. Edition der TNM-Klassifikation für maligne Tumoren. Modifiziert nach Sobin und Wittekind (2002, S. 99 - 103) sowie Goldstraw et al. (2007, S. 712).*

<b>5-Jahres-Überlebensrate</b>				
<b>UICC-Stadium</b>	<b>6. Edition der TNM-Klassifikation</b>		<b>7. Edition der TNM-Klassifikation</b>	
	<b>cTNM</b>	<b>pTNM</b>	<b>cTNM</b>	<b>pTNM</b>
I A	50 %	73 %	50 %	73 %
I B	40 %	54 %	43 %	58 %
II A	24 %	48 %	36 %	46 %
II B	25 %	38 %	25 %	36 %
III A	18 %	25 %	19 %	24 %
III B	8 %	19 %	7 %	9 %
IV	2 %	21 %	2 %	13 %

*Tabelle 7: Unterschiede in der 5-Jahres-Überlebensrate zwischen klinisch und pathologisch diagnostizierten UICC-Stadien. Das gleiche Patientenkollektiv wurde nach der 6. und der 7. Edition der TNM-Klassifikation für maligne Tumoren eingeteilt, um die Auswirkungen der Stadieneinteilung auf die prognostische Aussagekraft der einzelnen UICC-Stadien darzustellen. Modifiziert nach Goldstraw et al. (2007, S. 711).*

## **1.3 Diagnostik**

### **1.3.1 Nichtinvasive Verfahren**

#### **1.3.1.1 Klinische Untersuchung und Anamnese**

Mehr als 90 % der Patienten mit Lungenkrebs zeigen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose klinisch oder anamnestisch Krankheitssymptome. Nur etwa 10 % sind asymptomatisch. Die meisten Patienten leiden an unspezifischen Symptomen wie z.B. Husten, Gewichtsverlust, Übelkeit oder allgemeiner Schwäche [Beckles et al. 2003]. In einigen Fällen zeigen die Patienten Symptome, die sich direkt auf den Primärtumor zurückführen lassen. Dazu zählen beispielsweise Hämoptysen, Dysphagie, Dyspnoe oder auch Brustschmerzen, die durch verdrängendes oder invasives Wachstum des Primärtumors verursacht werden. Beckles et al. (2003) konnten zeigen, dass ca. ein Drittel der Patienten bereits bei Erstdiagnose Symptome hat, die auf ein metastasiertes Tumorleiden hinweisen. Beispiele sind Knochenschmerzen für Knochenmetastasen, Übelkeit und Erbrechen oder fokale neurologische Defizite für

Hirnmetastasen sowie allgemeine Schwäche in Kombination mit Gewichtsverlust als Zeichen für fortgeschrittene hepatische Metastasierung.

Neben diesen klinischen Zeichen, die mit dem Progress der Tumorerkrankung assoziiert sind, geht Lungenkrebs in ca. 10 % der Fälle unabhängig vom Stadium mit paraneoplastischen Syndromen einher. Dies ist der Fall, wenn der Tumor Peptidhormone, Antikörper, Immunkomplexe, Prostaglandine oder Zytokine produziert. Klinisch können sich unterschiedlichste Syndrome manifestieren, von denen Cushing-Syndrom, SIADH (Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion), Lambert-Eaton-Syndrom und Hyperkalzämie durch erhöhte Parathormonspiegel zu den häufigeren zählen [Beckles et al. 2003].

### **1.3.1.2 Laboruntersuchung**

Laboruntersuchungen ergänzen bei Lungenkrebspatienten die Suche nach Fernmetastasen. Erhöhte Kalziumspiegel und erhöhte Spiegel der Alkalischen Phosphatase (AP) können auf Knochenmetastasen hinweisen. Sind die Leberenzyme erhöht, so kann eine hepatische Metastasierung vorliegen [Spiro et al. 2007].

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das unter anderem von Tumorzellen produziert wird und klinisch als prognostischer Marker eingesetzt wird, da sich die Prognose mit steigendem Serum-LDH-Spiegel verschlechtert [Danner et al. 2010].

### **1.3.1.3 Röntgendiagnostik**

Ein Röntgenbild der Lunge ist häufig die erste Bildgebung, die zur Diagnose von Lungenkrebs führt. Es liefert einerseits grundlegende Hinweise auf die Lokalisation des Tumors und andererseits wichtige Informationen über die Beschaffenheit der Restlunge, der Pleura, des Mediastinums, der benachbarten Thoraxwand, des Herzens und aller weiteren abgebildeten umliegenden Organe [Grondin und Liptay 2002].

### **1.3.1.4 Transthorakaler Ultraschall (TTUS)**

Eine transthorakale Ultraschalluntersuchung ist ein einfaches und sicheres Verfahren zum Ausschluss oder zur Quantifizierung eines Pleuraergusses. Außerdem lässt sich mit Hilfe der Sonographie eine fragliche Brustwandinfiltration nachweisen [Goeckenjan et al. 2010].

### **1.3.1.5 Computertomographie (CT)**

Die Computertomographie des Thorax ist die sensitivste Methode zum Nachweis intrapulmonaler Verdichtungen, die bei jedem Patienten mit der Verdachtsdiagnose Lungenkrebs erfolgen sollte. Sie dient der genauen Lokalisation der Tumormasse, der Bestimmung des maximalen Tumordurchmessers und der Suche nach vom Tumor befallenen Strukturen. Morphologische Kriterien wie Spiculae, Corona radiata, eine verzogene interlobäre Fissur und vergrößerte Lymphknoten deuten auf einen malignen Prozess. Zur Beurteilung der Leber und der Nebennieren sollte die CT des Thorax den Oberbauch einschließen [Schaefer-Prokop 2010].

### **1.3.1.6 Magnetresonanztomographie (MRT)**

Die Aussagekraft einer Magnetresonanztomographie zur Beurteilung des Tumorbefalls im Mediastinum ist der einer Computertomographie gleichwertig. Auf eine MRT kann deshalb meistens verzichtet werden. Sie kann jedoch bei der Klärung der Invasivität von sogenannten „Pancoast-Tumoren“ behilflich sein, die in den apikalen Segmenten der Lunge lokalisiert sind [Silvestri et al. 2007]. Beide Schnittbildverfahren können jedoch keine absolute Sicherheit über die Invasivität gewährleisten, so dass im Zweifelsfall eine invasive Diagnostik nötig sein kann [Thomas et al. 2000].

Einen wichtigen Stellenwert hat die MRT in der Diagnostik von Hirnmetastasen erlangt. Nach bisherigen Erkenntnissen ermöglicht die Magnetresonanztomographie des Schädels bei der Diagnose von Hirnmetastasen eine größere Genauigkeit als die Computertomographie [Yokoi et al. 1999; Seute et al. 2008].

### **1.3.1.7 Positronenemissionstomographie (PET)**

Die Positronenemissionstomographie basiert auf der höheren Stoffwechselleistung von Tumorzellen, der damit verbundenen verstärkten Aufnahme von radioaktiv markierter Glukose und dem Nachweis der durch Zerfall emittierten Positronen. Die PET ist die beste Methode, um eine Beteiligung des Mediastinums durch den Tumor zu untersuchen. Sie sollte bei Patienten eingesetzt werden, die sich klinisch in einem lokal begrenzten Stadium befinden und potenziell kurativ therapiert werden können. Wenn die Ganzkörper-PET positive Herde findet, sollten diese Herde z.B. durch eine Biopsie genauer untersucht werden, um eine bereits vorhandene Fernmetastasierung auszuschließen, bevor eine Operation durchgeführt wird [Silvestri et al. 2007].

## **1.3.2 Invasive Verfahren**

### **1.3.2.1 Transthorakale Punktion / Pleurapunktion**

Die Punktion der Pleurahöhle ist ein technisch einfaches Verfahren, um für diagnostische Zwecke Proben eines Pleuraergusses zu gewinnen. Therapeutisch führt sie zu einer Entlastung und ermöglicht die freie Entfaltung der Lunge.

Nach Zentrifugation der Probe kann durch zytologische Analyse ein maligner Pleuraerguss von Ergüssen anderer Genese abgegrenzt werden. Die Sensitivität einer Untersuchung liegt bei 50 % und kann durch eine zweite Untersuchung auf 65 % gesteigert werden. Kombiniert man die zytologische Untersuchung des Pleuraergusses mit einer Biopsie der Pleura, so erhöht sich die Sensitivität auf bis zu 90 % [DeCamp et al. 1997].

### **1.3.2.2 Flexible Bronchoskopie**

Die flexible Bronchoskopie ist ein zentrales diagnostisches Verfahren, um die primäre Diagnose einer Tumorerkrankung zu stellen oder eine Stadieneinteilung eines bereits bekannten Tumors durchzuführen. In Verdachtsfällen, bei denen der Tumor durch bildgebende Verfahren nicht gefunden werden kann, ist es möglich, ergänzend eine bronchoalveoläre Lavage mit zytologischer Auswertung durchzuführen, um nach malignen Zellen zu suchen. Eine Biopsie von suspekten Arealen kann durchgeführt werden, um eine histologisch gesicherte Diagnose zu stellen. Im Rahmen der Stadieneinteilung wird mit der Bronchoskopie die endobronchiale Ausdehnung von zentral gelegenen Tumoren bestimmt. Da bildgebende Verfahren eine mediastinale Beteiligung nie sicher belegen oder ausschließen können, diese jedoch entscheidenden Einfluss auf die therapeutische Strategie hat, ist eine Diagnostik der mediastinalen Lymphknoten unbedingt erforderlich [Detterbeck et al. 2007]. Die Evaluation der Dignität von vergrößerten Lymphknoten im Mediastinum wird im Rahmen einer Bronchoskopie durch den Einsatz einer endobronchialen ultraschallgestützten Feinnadelbiopsie (EBUS-FNA) erreicht [Grondin und Liptay 2002].

### **1.3.2.3 Lymphknotenbiopsie**

Eine Lymphadenopathie von zervikalen, supraklavikulären oder Skalenuslymphknoten sollte bei Tumorpatienten unbedingt histologisch untersucht werden, um einen N3-Status auszuschließen. Die Gewinnung von Material für die histologische Untersuchung erfolgt durch eine

Feinnadelaspiration (FNA) oder durch chirurgische Exzision des vergrößerten Lymphknotens [Grondin und Liptay 2002].

### **1.3.2.4 Mediastinoskopie**

Wenn eine Fernmetastasierung ausgeschlossen werden kann, ist die Klärung des Status der lymphogenen Metastasierung der für die Prognose und das therapeutische Vorgehen nächste entscheidende Schritt. Die Mediastinoskopie, bei der unter Allgemeinanästhesie die mediastinalen Lymphknoten aufgesucht und für die histologische Untersuchung entfernt werden, ist mit einer Sensitivität zwischen 90 und 100 % ein sehr genaues Verfahren zur Klärung einer lymphogenen Metastasierung im Mediastinum [Grondin und Liptay 2002].

### **1.3.2.5 Videoassistierte Thorakoskopie**

Die videoassistierte Thorakoskopie ist ein Verfahren, bei dem eine starre Optik in die Pleurahöhle vorgeschoben wird, mit der die Inspektion der gesamten Pleurahöhle möglich ist. Neben der Kameraoptik können über weitere kleine Inzisionen Instrumente in die Pleurahöhle vorgeschoben werden, mit denen vielfältige diagnostische sowie therapeutische Interventionen durchgeführt werden können. Ähnlich wie durch eine Mediastinoskopie kann mit der videoassistierten Thorakoskopie der Status der mediastinalen Lymphknoten beurteilt werden. Über die Möglichkeiten einer Mediastinoskopie hinaus können mit diesem Verfahren auch Biopsien von paraösophagealen Lymphknoten und Lymphknoten des Ligamentum pulmonale entnommen werden. Eine weitere Indikation für eine Thorakoskopie sind rezidivierende Pleuraergüsse, die im Rahmen einer Thorakoskopie durch eine Pleurodese therapiert werden können [Grondin und Liptay 2002].

## **1.4 Therapie**

Die Therapie von NSCLC ist grundsätzlich individuell auf jeden Patienten abzustimmen, um nicht nur die Überlebenszeit, sondern auch die Lebensqualität dauerhaft zu erhöhen. Eine interdisziplinäre Behandlung hilft dabei, die optimale Therapiestrategie zu finden und die Compliance des Patienten zu erhöhen [Spira und Ettinger 2004]. An der hiesigen Universitätsklinik ist seit längerer Zeit eine entsprechende Tumorkonferenz etabliert, in der Thoraxchirurgen, Pulmologen, Onkologen, Radiologen und Strahlenmediziner die Patienten mit Lungenkrebs individuell besprechen.

### **1.4.1 Chirurgische Tumorresektion**

Der Erfolg einer Tumorresektion ist bei Patienten in wenig fortgeschrittenen Stadien am größten. Tumoren in den Stadien I und II werden grundsätzlich als resektabel angesehen und sollten nach der notwendigen Diagnostik schnell einer Operation in kurativer Intention zugeführt werden [Bains 1991]. Auch einem Teil der Patienten im Stadium IIIA kann eine Operation angeboten werden, sofern eine Operabilität gewährleistet ist [Spira und Ettinger 2004].

Grundprinzip der chirurgischen Therapie ist die Kombination von vollständiger Resektion des tumortragenden Lungenlappens entlang anatomischer Grenzen und der radikalen Entfernung aller Lymphknoten im entsprechenden Lymphabflussgebiet. Das chirurgische Verfahren wird für jeden Patienten individuell nach Lokalisation und Progress des Tumors gewählt [Bains 1991].

#### **1.4.1.1 Keilexzision**

Eine Keilexzision ist ein Verfahren, bei dem der Chirurg, unabhängig von anatomischen Grenzen, den Tumor durch Exzision mit einem Sicherheitsabstand von ca. 2 cm entfernt. Bei kleinen T1-Tumoren kann dieses Verfahren in Ausnahmefällen Anwendung finden. Aufgrund von langfristig besseren Ergebnissen auch bei kleinen Tumoren ist die Lobektomie jedoch das Verfahren der Wahl [Ginsberg und Rubinstein 1995].

#### **1.4.1.2 Segmentektomie**

Bei der Segmentektomie wird ein Lungensegment entlang der anatomischen Grenzen entfernt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, bei kleinen Tumoren weniger gesundes Lungengewebe entfernen zu müssen als bei einer Lobektomie [Ginsberg und Rubinstein 1995]. Eine Bedeutung hat die Segmentektomie in der Therapie von Patienten mit stark eingeschränkter Lungenfunktion, die eine Lobektomie nicht tolerieren [Port et al. 2002].

#### **1.4.1.3 Lobektomie**

Die Lobektomie ist das Verfahren der Wahl für peripher lokalisierte Tumoren, die auf einen Lungenlappen begrenzt sind [Ginsberg und Rubinstein 1995]. Da bereits bei 38 % der T1-Tumoren mit einer Größe von 2-3 cm Lymphknotenmetastasen vorhanden sind, sollte immer eine systematische Lymphknotendissektion erfolgen, bei der mediastinale Lymphknoten eingeschlossen werden [Ishida et al. 1990].

### **1.4.1.4 Bilobektomie**

Als Bilobektomie wird eine Resektion bezeichnet, bei der zwei der drei rechtsseitigen Lungenlappen entfernt werden. Dabei handelt es sich um die zusätzliche Entfernung des Mittellappens mit dem Oberlappen (obere Bilobektomie) oder dem Unterlappen (untere Bilobektomie). Indiziert ist dieser Eingriff, wenn der Tumor auf beide Lungenlappen ausgeht [Van Schil 2001].

### **1.4.1.5 Pneumonektomie**

Tumoren, die zentral lokalisiert sind und sich bis auf den Hauptbronchus ausdehnen, können durch eine Lobektomie nicht vollständig reseziert werden. Um sie trotzdem entfernen zu können, wird eine Pneumonektomie durchgeführt und die gesamte Lunge eines Hemithorax entfernt. Da die Pneumonektomie mit einer erhöhten Mortalität einhergeht, versucht man sie nach Möglichkeit zu vermeiden [Van Schil 2001]. In ausgewählten Fällen ist die Technik der sogenannten Manschetten-Resektion eine Alternative. Hierbei werden nach Resektion der erkrankten Bronchialabschnitte der Bronchialbaum und die entsprechenden Gefäße reanastomosiert [Suen et al. 1999].

### **1.4.1.6 Erweiterte Operationsverfahren**

Über die Resektion des tumortragenden Lungenabschnittes hinaus wird die Operation ausgedehnt, wenn benachbarte Strukturen durch den Tumor per continuitatem befallen sind. Strukturen, in die der Primärtumor direkt einwachsen kann, sind z.B. Perikard, Zwerchfell und Brustwand. Therapeutisch wird in diesen Fällen versucht, das Tumoreal „en bloc“ (in einem Stück) zu entfernen [Van Schil 2001].

### **1.4.1.7 Videoassistierte Thoraxchirurgie (VATS)**

Neben den offenen chirurgischen Verfahren, die seit Jahrzehnten etabliert sind, wird seit etwa 10 Jahren die alternative Tumorsektion durch videoassistierte endoskopische Verfahren durchgeführt. Der Stellenwert dieser minimal-invasiven Operationstechnik ist jedoch noch nicht abschließend geklärt [Yan et al. 2009].



### **1.4.2 Chemotherapie**

Verschiedene Gründe können dazu führen, dass eine Operation nicht durchgeführt werden kann. Schwere Begleiterkrankungen, Multimorbidität, ein weit fortgeschrittenes Tumorleiden oder eine technisch unmögliche Resektion sind häufige Beispiele. Diese Patienten können von einer Chemotherapie profitieren, die mit einer signifikant höheren Überlebensrate assoziiert ist [NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group 2008]. Patienten mit nicht resektablen Tumoren im Stadium III sollten ergänzend zu einer Chemotherapie eine definitive Bestrahlung erhalten. Patienten mit Tumoren im Stadium IV sollten eine auf ihren Allgemeinzustand abgestimmte palliative Chemotherapie zur Symptomkontrolle erhalten [Pfister et al. 2004].

Eine weitere Indikation für die Anwendung von Chemotherapie ist die adjuvante Nachbehandlung von operativ therapierten Patienten. Ein signifikanter Überlebensvorteil durch diese Therapie konnte jedoch nur in den Stadien IIA, IIB und IIIA festgestellt werden [Pisters et al. 2007]. Patienten in diesen Stadien wird eine cis-Platin-basierte Chemotherapie empfohlen [Bordoni 2008].

Behandlungskonzepte mit präoperativer (neoadjuvant) Chemotherapie konnten in der Therapie von NSCLC noch keine weitreichende Bedeutung erlangen. Eine neoadjuvante Behandlung kann jedoch erwogen werden, um bei technisch inoperablen Patienten durch Verkleinerung des Tumors eine Resektion zu ermöglichen [Bordoni 2008].

### **1.4.3 Strahlentherapie**

Eine Strahlentherapie in kurativer Intention sollte bei Patienten im Stadium III durchgeführt werden, bei denen keine Operation erfolgt. Sie wird in Kombination mit einer platinbasierten Chemotherapie durchgeführt [Pfister et al. 2004].

Bei Patienten im Stadium N2 führt eine neoadjuvante Bestrahlung zu besserer Resektabilität, allerdings ist noch kein Überlebensvorteil für diese Therapiestrategie nachgewiesen [Bordoni 2008].

Adjuvante Strahlentherapie hat keine lebensverlängernde Wirkung auf Patienten in den Stadien IB, IIA und IIB, allerdings konnten Überlebensvorteile für Patienten im Stadium IIIA festgestellt werden. In dieser Patientengruppe mit positivem N2-Status scheint die Strahlentherapie durch lokale Kontrolle der mediastinalen Metastasierung vorteilhaft zu sein [Pisters et al. 2007].

## **1.4.4 Neue Therapieoptionen**

### **1.4.4.1 Inhibitoren der EGFR-Thyrosinkinase**

Eine neue Therapiestrategie gegen Lungenkrebs wurde mit dem Einsatz der Thyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib und Gefitinib erfolgreich etabliert [Mok et al. 2009]. Der Effekt dieser Therapie wird durch das Eingreifen in die Signalkaskade des EGFR („Epidermal growth factor receptor“) ausgelöst. In 16,6 % aller Lungentumoren liegt eine Mutation im *EGFR*-Gen vor. Besonders hohe Mutationsraten konnten im Tumorgenom von Frauen (69,7 %), Nichtrauchern (66,6 %) und Patienten mit Adenokarzinomen (80,9 %) gefunden werden. Die Mutation bewirkt auch in Abwesenheit des Liganden eine Dauerstimulation der betroffenen Zelle durch den Rezeptor und führt damit zum Progress der Tumorerkrankung [Rosell et al. 2009]. Die Therapie mit Gefitinib führt hauptsächlich in der Gruppe der Tumoren mit *EGFR*-Mutation zu einer besseren Prognose, so dass vor dem Einsatz des Thyrosinkinaseinhibitors eine Testung des Mutationsstatus empfohlen wird [Stinchcombe und Socinski 2009]. Auch die Gabe von Erlotinib verlängert das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden signifikant und reduziert die Krankheitssymptome [Shepherd et al. 2005; Cappuzzo et al. 2010].

### **1.4.4.2 Antikörper gegen EGFR**

Anders als die Thyrosinkinaseinhibitoren greift der Antikörper Cetuximab direkt am EGFR an. In einem Kollektiv von Patienten mit EGFR-exprimierenden Tumoren in fortgeschrittenen Stadien konnte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden, wenn zu einer Chemotherapie zusätzlich Cetuximab gegeben wurde [Pirker et al. 2009].

### **1.4.4.3 Antikörper gegen VEGF**

Die Fähigkeit zur Neoangiogenese ist ein wichtiger Schritt in der Tumorigenese. Nur wenn der Tumor ausreichend durch Gefäße versorgt wird, können die maligne entarteten Zellen überleben. Da der Wachstumsfaktor VEGF („Vascular endothelial growth factor“) eine entscheidende Rolle in der Neoangiogenese spielt, ist er ein geeignetes Ziel für einen therapeutischen Ansatz. Bevacizumab ist ein Antikörper gegen VEGF, der in Kombination mit einer Chemotherapie, den Progress von Tumoren in fortgeschrittenen Stadien verlangsamen und das Überleben der Patienten signifikant verlängern kann [Sandler et al. 2006].

#### **1.4.4 Vandetanib, ein Inhibitor von VEGFR und EGFR**

Vandetanib ist ein Inhibitor der Rezeptoren von VEGF, EGF und darüber hinaus von RET („Rearranged During Transfection“), einem wichtigen Wachstumsfaktor für viele Tumorarten. Das Medikament kann oral appliziert werden und verlangsamt den Tumorprogress. Die Überlebensrate kann gegenüber einer Standardtherapie jedoch nicht signifikant verlängert werden [Herbst et al. 2010].

### **1.5 Genetische Veränderungen beim Bronchialkarzinom**

Lungenkrebs ist das Ergebnis von langfristig kumulierten DNS-Schäden, häufig verursacht durch chronische Exposition gegenüber kanzerogenen Substanzen. Die DNS-Schäden manifestieren sich als Mutationen in einzelnen Genen, entkoppeln in ihrer gemeinsamen Wirkung die Zelle von ihren Kontrollsystemen und ermöglichen Überlebensvorteile oder Wachstum.

Substanzen, die eine erhöhte Mutationsrate in Zellen bewirken, werden als kanzerogen bezeichnet. Beim Bronchialkarzinom sind es vor allem die mutagenen Verbindungen im Zigarettenrauch, die in der Lunge zu DNS-Schäden führen. Diese Schäden können sich im Genom etablieren und an Tochterzellen vererbt werden [Phillips 2002]. Dadurch ist es möglich, dass Areale entstehen, in denen alle Zellen von einer mutierten Stammzelle ausgehen und identische Gendefekte enthalten. Diesen Vorgang bezeichnet man als Feldkanzerisierung, da die mutierten Zellen preneoplastische Läsionen darstellen, in denen eine maligne Entartung durch konsekutive Mutationen erleichtert ist [Braakhuis et al. 2003]. Kritische Veränderungen auf zellulärer Ebene sind unter anderem der Verlust von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen, wodurch Apoptose verhindert wird, Wachstum und Proliferation ungehemmt gesteigert werden und Invasivität ermöglicht wird.

Weitere Tumoreigenschaften, die neben genetischen und durch epigenetische Veränderungen bedingt sein können, sind die Aktivierung der Telomerase, eine gesteigerte Neoangiogenese und die Fähigkeit zur Metastasierung [Breuer et al. 2005].

Die Aufschlüsselung der Entstehung von Lungenkrebs auf genetischer Ebene und die Isolierung der einzelnen Gene ist inzwischen deutlich fortgeschritten. Viele Tumorsuppressorgene und Onkogene konnten identifiziert und ihre Wirkungsweise geklärt werden. Die Anzahl der beteiligten Gene und die Komplexität der Mutationsmuster in Lungentumoren sind jedoch groß und nicht ausreichend erforscht. Ziel ist es, in Zukunft durch Laboruntersuchungen alle

beteiligten Gene eines Tumors zu analysieren und aus dem individuellen Mutationsmuster die Therapie und die Prognose abzuleiten [Santos et al. 2009].

### 1.5.1 Bekannte Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene haben Funktionen, die den Eigenschaften eines Tumors entgegenwirken. Beispielsweise wirken sie an Kontrollpunkten des Zellzyklus einer ungehemmten Proliferation entgegen, können Apoptose auslösen, wenn die DNS beschädigt ist, und antagonistisch die Wirkung von Wachstumssignalen einschränken. Um ein Tumorsuppressorgen zu inaktivieren, müssen beide Allele des Gens betroffen sein. Häufig funktioniert das über eine Deletion des einen Allels und über eine Mutation oder epigenetische Inaktivierung des anderen Allels [Osada und Takahashi 2002].

Inaktivierende Mutationen im *p53*-Gen gehören zu den häufig auftretenden Veränderungen bei allen Tumoren. *P53* ist auf der Chromosomenbande 17p13 lokalisiert und wirkt als Transkriptionsfaktor für Gene des Zellzyklus. Es verhindert unkontrollierte Proliferation, ermöglicht eine Unterbrechung des Zellzyklus in der G1-Phase über eine Steigerung der Expression von p21, induziert DNA-Reparatur-Gene und kann bei schwer beschädigtem Genom durch die Aktivierung von proapoptotischen Genen den programmierten Zelltod auslösen [Stiewe 2007].

Der Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus wird durch ein Kontrollsystem überwacht, an dem p16, die Cyclin abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6, Cyclin D und das Retinoblastomprotein (RB) entscheidend beteiligt sind. Im hypophosphorylierten Zustand bindet Rb den Transkriptionsfaktor E2F („E2 promoter binding factor“) und unterbindet so das Fortschreiten in die S-Phase [Sherr 1996]. Das *RB*-Gen ist auf 13q14 lokalisiert und wirkt als Tumorsuppressorgen. Verluste des Gens konnten in einem Teil der nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome gefunden werden [Tamura et al. 1997]. Im physiologischen Zellzyklus kann der Komplex aus Cyclin D1 mit CDK4 und 6 das Rb-Protein hyperphosphorylieren und damit E2F freisetzen. Eine Kontrollfunktion in diesem Prozess hat das auf 9p21 lokalisierte Tumorsuppressorgen *p16*, das ein Inhibitor der CDK4 und 6 ist. Eine Inaktivierung von *p16* ist häufig in NSCLC zu finden und kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen [Gazzeri et al. 1998; Belinsky et al. 1998].

Weitere Tumorsuppressorgene konnten auf dem besonders häufig veränderten Chromosom 3 gefunden werden. Das erklärt auch, warum der Großteil der Bronchialkarzinome einen Verlust der Heterozygotie auf dem Chromosomenarm 3p zeigt [Kok et al. 1987].

Das *Fragile Histidin Trias*-Gen (*FHIT*) liegt auf 3p14.2 und ist in NSCLC häufig von einem Allelverlust betroffen [Sozzi et al. 1996]. Das Fhit-Protein wird in allen Epithelien exprimiert und hat enzymatische Eigenschaften. Die wichtigere Funktion von Fhit scheint jedoch in der Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte zu liegen, da bei Inaktivierung die Polarität der Zelle verloren geht und der Tumor invasive Eigenschaften erhält [Joannes et al. 2010].

*RASSF1A* (Ras-Assoziationsdomänen-Familie-1A-Gen) ist ein weiteres Tumorsuppressorgen auf 3p21.3, das in ungefähr 50 % der NSCLC durch hypermethylierte Promotorregion und in geringerer Zahl auch durch Deletionen oder Mutationen inaktiviert ist. Es kann den Zellzyklus anhalten und proapoptotische Signale abgeben. Außerdem erhöht sich durch die *RASSF1A*-Wirkung die Stabilität des Genoms und die Stabilität der Mikrotubuli [Dammann et al. 2005].

Das Tumorsuppressorgen *FUS1* kann seine proapoptotische Wirkung über die Freisetzung von Cytochrom c und über eine Inhibition von MDM2 erreichen. Außerdem wirkt *FUS1* inhibitorisch auf die Funktion von EGFR, PDGFR („Platelet derived growth factor receptor“), ABL1 („Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“), SCFR („Stem cell growth factor receptor“) sowie Proteinkinase B (PKB) und verringert dadurch die Überlebenszeit und die Proliferationsrate von Tumorzellen. In ersten Therapieversuchen konnte gezeigt werden, dass durch eine Transfektion von Lungenkrebszellen mit *FUS1* die Proliferationsrate sinkt, Apoptose induziert und das Ansprechen der Tumorzellen auf Bestrahlung und Chemotherapie mit cis-Platin gesteigert wird [Ji und Roth 2008].

Das *RAR-β*-Gen (Retinsäurerezeptor-β), das auf Chromosom 3p24 lokalisiert ist, kodiert für RAR-β, einen kernständigen Rezeptor, der durch Vitamin-A-Derivate aktiviert wird und nach Dimerisierung als Transkriptionsfaktor wirkt [Leid et al. 1992]. Die Wirkung von RAR-β als Tumorsuppressorgen konnte in Zelllinien und transgenen Mäusen nachgewiesen werden [Toulouse et al. 2000; Berard et al. 1996]. Die Expression von RAR-β ist in etwa der Hälfte aller NSCLC reduziert. In diesen Tumoren geht die Fähigkeit von RAR-β verloren, über eine Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) das Wachstum und die Proliferation von Zellen zu regulieren [Xu 2007].

Semaphorine bilden eine Familie von membranassoziierten und sekretierten Proteinen, die im Zusammenspiel mit ihren Zielproteinen Plexin und Neuropilin wichtig für Nervenwachstum und Gefäßentwicklung sind [Geretti et al. 2008]. Besonders für die auf 3p21.3 lokalisierten *SEMA3B* und *SEMA3F* konnte gezeigt werden, dass sie in Bronchialkarzinomen als Tumorsuppressorgene fungieren [Gaur et al. 2009]. *SEMA3B* wirkt vor allem über eine Hemmung der Proliferation von Tumorzellen und kann Apoptose auslösen. Dieser Effekt wird von VEGF antagonisiert, so dass die Entwicklung von Tumoren in vorgeschädigten Zellen, mit

Deletionen auf 3p oder hochregulierter Expression von VEGF, bevorzugt ablaufen kann [Castro-Rivera et al. 2004]. Inaktivität von *SEMA3F* in NSCLC ist häufig durch Hypermethylierung der Promotorregion bedingt. In Tumorzellen mit niedriger *SEMA3F*-Expression wurde eine Hochregulation seiner Zielproteine, den Rezeptoren Neuropilin 1 und 2 (NRP1 und NRP2), beobachtet. Die Expression von *SEMA3F* ist außerdem invers mit der Expression von VEGF assoziiert, da auch VEGF an die Rezeptoren NRP1 und 2 bindet [Lantuéjoul et al. 2003]. Die Beteiligung von *SEMA3B* und *SEMA3F* an der Kanzerogenese von Lungenkrebs ist gesichert und die Hoffnung besteht, in Zukunft eine Therapie zu entwickeln, die an diesem Mechanismus ansetzt. Die Kenntnisse über die genaue Wirkungsweise der beiden Tumorsuppressorgene sind jedoch bis heute unvollständig und bedürfen weiterer Klärung [Potiron et al. 2009].

*TSLC1* („Tumor suppressor in lung cancer 1“) ist ein auf Chromosom 11q23.2 lokalisiertes Tumorsuppressorgen, das in NSCLC-Zelllinien das Tumorstadium unterdrücken kann [Fukami et al. 2003]. Niedrige Expressionsraten in Lungentumoren sind bedingt durch den Verlust eines Allels (LOH), ein durch Mutation verändertes Gen oder, wie in der Mehrzahl der Fälle, durch eine hypermethylierte Promotorregion [Kuramochi et al. 2001]. Das Gen kodiert für ein membranständiges Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie und ist an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt [Masuda et al. 2002]. In einem kleinen Kollektiv konnte bereits die Bedeutung von *TSLC1* als prognostischer Marker in Adenokarzinomen nachgewiesen werden [Uchino et al. 2003].

Das Tumorsuppressorgen *PTEN* („phosphate and tensin homolog detected on chromosome ten“), das auch unter dem Namen *MMAC1* („mutated in multiple advanced cancers“) bekannt ist, liegt auf der Bande 10q23.3 und kodiert für ein zytoplasmatisches Protein mit enzymatischer Aktivität [Li Jing et al. 1997]. Das Protein dephosphoryliert die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und senkt so die Konzentration des Botenstoffes PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat). PIP3 führt zu einer Aktivierung der PKB, die auf den Zellzyklus einwirkt und im aktiviertem Zustand über verschiedene Signalwege das Überleben der Zelle begünstigt. Wenn also die Funktion von *PTEN* eingeschränkt ist und die PI3K ungehindert PIP3 produziert, hat die Zelle einen Überlebensvorteil, der eine maligne Transformation begünstigt [Stambolic et al. 1998]. Niedrige Expressionsraten von *PTEN* in Bronchialkarzinomen werden zum einen durch Genmutationen, zum anderen durch Promotorhypermethylierung verursacht [Forgacs et al. 1998; Soria et al. 2002]. Die große Komplexität, mit der *PTEN* weitere Signalkaskaden der Zelle beeinflusst, ist noch nicht ausreichend geklärt. Auch die Frage, ob dieser Mechanismus

einen Angriffspunkt für ein therapeutisches Vorgehen bietet, ist noch unbeantwortet [Steelman et al. 2004].

### 1.5.2 Bekannte Protoonkogene

Die Genprodukte von Protoonkogenen sind physiologisch in der Zelle vorkommende Proteine, die häufig an der Übertragung von Wachstumssignalen beteiligt sind. Wird die Aktivität eines solchen Gens durch Mutation, Amplifikation oder Translokation erhöht, entstehen fehlerhafte Signale und die betroffene Zelle kann unkontrolliert wachsen oder proliferieren [Breuer et al. 2005].

Eines der wichtigsten Protoonkogene in Bronchialkarzinomen ist das *KRAS*-Gen („Kirsten rat sarcoma viral oncogen homologue“) auf der Chromosomenbande 12p12 [Li Jie et al. 2003; Riely et al. 2009]. Das Genprodukt von *KRAS* ist das Ras-Protein („Rat sarcoma-protein“), ein G-Protein, das Bestandteil der Signalkaskade des EGFR ist. Es vermittelt Wachstumssignale des EGFR über eine Aktivierung von verschiedenen Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren wirken und Wachstum ermöglichen. Wenn das *KRAS*-Gen durch eine Mutation dauerhaft aktiviert ist, stimuliert es die Zelle übermäßig stark mit Wachstumssignalen und kann Proliferation, Überleben und Metastasierung verursachen [Roberts et al. 2010]. Patienten, die einen Tumor mit Mutation im *KRAS*-Gen haben oder bei denen das *KRAS*-Genprodukt überexprimiert wird, haben eine schlechtere Prognose als Patienten ohne diese pathologischen Veränderungen [Mascaux et al. 2005]. Eine weitere prognostische Aussage haben Mutationen im *KRAS*-Gen auf den Erfolg einer Anti-EGFR-Therapie. Tumoren, in denen die Mutation detektiert wurde, sprechen nicht auf eine Anti-EGFR-Therapie an und sollten auf andere Weise therapiert werden, da durch ein mutiertes *KRAS*-Gen das Ras-Protein aktiviert ist, unabhängig vom Aktivitätszustand des EGFR am Anfang der Signalkaskade [Vakiani und Solit 2011].

Das *EGFR*-Gen ist ein weiteres Protoonkogen, das auf 7p12 lokalisiert ist [Wang et al. 1993]. Der EGFR bindet extrazelluläre Wachstumsfaktoren und leitet das Wachstumssignal über seine Thyrosinkinase-Domäne an intrazelluläre Signalkaskaden weiter. Zielproteine des EGFR sind beispielsweise die PI3K, PLC- $\gamma$  (Phospholipase C- $\gamma$ ) und das Ras-Protein. In ihrer Gesamtheit wird durch die Aktivierung der Zielproteine des EGFR Wachstum und Proliferation ausgelöst und das Überleben der Zelle gesichert. Eine Mutation in der Thyrosinkinase-Domäne, die zu einer dauerhaften Aktivierung der Zielproteine und damit zu übermäßig starkem Wachstum und Proliferation führt, ist ein häufiges Ereignis in Bronchialkarzinomen und fördert das Fortschreiten der Erkrankung [Roberts et al. 2010]. Die Möglichkeit, den mutierten EGFR

durch eine gezielte Therapie zu blockieren und damit dem pathologischen Wachstumssignal entgegenzuwirken, wurde bereits im Abschnitt 1.4.4 erläutert.

Die Amplifikation und Überexpression des Protoonkogens *MYC* („Myelocytomatosis oncogene“) ist ein häufiges Ereignis in malignen Lungentumoren. Es kodiert für C-Myc („Cellular Myelocytomatosis protein“), einen Transkriptionsfaktor mit einer bHLHz-Domäne („Basic-helix-loop-helix zipper“), der mit Max („Myc associated factor X“) dimerisiert und die Transkription von Genen stimuliert, die Zellen zu Wachstum, Differenzierung und Apoptose befähigen [Varella-Garcia 2009]. Die Amplifikation von *MYC* könnte zukünftig als prognostischer Marker eingesetzt werden, da Patienten ohne die Veränderung eine signifikant längere Überlebenszeit haben [Brennan et al. 1991].

### 1.5.3 Weitere an der Tumorigenese beteiligte Gene

Telomere am Ende eines jeden Chromosoms sind eine natürliche Begrenzung der Anzahl an Mitosen, die eine Zelle in ihrem Leben durchlaufen kann. Bei jeder Replikation des Genoms gibt es einen DNS-Verlust am Ende des Telomers, da die DNS-Polymerase nicht endständig mit der Replikation beginnen kann. Um durch diesen Verlust an DNS einen Verlust an relevantem Genmaterial zu verhindern, ist die Telomerregion an den Chromosomenenden mit einer repetitiven Nukleotidsequenz geschützt [Blackburn 1991]. Um die ungehemmte DNS-Replikation in Tumoren zu ermöglichen, gibt es in einem Großteil von Tumorzellen eine Aktivierung der Telomerase. Dieses Enzym wird in gesunden Zellen, mit Ausnahme von Stammzellen, nicht exprimiert. Es kann die durch häufige Replikation verkürzten Telomere durch Anbau neuer Nukleotidsequenzen wieder verlängern und der Tumorzelle Proliferation ohne den Verlust von DNS ermöglichen [Hiyama et al. 1995].

Inzwischen sind mehrere Komponenten der menschlichen Telomerase bekannt, die eine prognostische Bedeutung für NSCLC haben. Das *hTERT*-Gen (humane-Telomerase-Reverse-Transkriptase) auf der Chromosomenbande 5p15.33 ist in ca. 75 % der Lungentumoren nachweisbar und mit einer schlechten Prognose assoziiert [Hara et al. 2001; Bryce et al. 2000]. Die *hTR* (humane-Telomerase-RNS-Komponente) liegt auf der Bande 3q26.3 und kodiert für einen RNS-Strang (Ribonukleinsäure), der zusammen mit der *hTERT* die Telomerase bildet [Soder et al. 1997]. Auch für die *hTR* konnte eine Beteiligung an der Tumorigenese nachgewiesen werden. Immortalisierte Zelllinien verlieren die Fähigkeit, sich uneingeschränkt zu vervielfachen, wenn die *hTR* durch eine Antisense-RNS ausgeschaltet wird [Feng et al. 1995]. Erste klinische Studien mit dem Ziel, die Expression der Telomerase in Tumorzellen als



Ansatz für ein therapeutisches Vorgehen zu nutzen, sind bereits angelaufen. Sie werden zeigen, ob sich eine solche Therapie in naher Zukunft etablieren kann [Fernandez-Garcia et al. 2008].

Um Apoptose zu verhindern, die in gesunden Zellen z.B. bei DNA-Schäden eingeleitet wird, benutzen Krebszellen weitere Mechanismen, um ihr Fortbestehen zu sichern. Das *BCL2*-Gen („B-cell-lymphoma“) auf 18q21 ist ein Protoonkogen, dessen Genprodukt (Bcl-2) antiapoptotische Signale vermittelt [Ohno et al. 1987]. Das *BAX*-Gen („Bcl-2 associated protein x“) auf Chromosom 19 (19q13.3-q13.4) kodiert für ein Protein (Bax) mit proapoptotischen Eigenschaften. Bcl-2 und Bax bilden zusammen inaktive Heterodimere. Liegt eines der beiden Proteine in größerer Menge vor, kann es homodimerisieren und Apoptose einleiten (Bax) oder verhindern (Bcl-2) [Apte et al. 1995]. Es konnte gezeigt werden, dass in ca. 35 % aller NSCLC das Bcl-2-Protein überexprimiert wird. Patienten mit einem Bcl-2-positiven Tumor zeigen ein längeres Überleben als solche mit Bcl-2-negativen Tumoren. Bcl-2 könnte daher in Zukunft als prognostischer Marker eingesetzt werden [Martin et al. 2003]. In ersten Therapieversuchen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch gezieltes Ausschalten von Bcl-2 in Tumorzellen Apoptose induziert wird und Resistenzen gegen Chemotherapeutika überwunden werden können. In klinischen Studien wird derzeit versucht, mit neu entwickelten Medikamenten aus diesem vielversprechenden Ansatz eine Therapie zu entwickeln [Patel et al. 2009].

Ein weiteres Protein, das in Krebszellen Apoptose unterdrücken kann, ist Survivin, dessen Gen auf 17q25 lokalisiert ist [Ambrosini et al. 1997]. Die Konzentration von Survivin ist in fast allen Bronchialkarzinomen gegenüber normalem Lungengewebe erhöht [Falleni et al. 2003]. Neben den antiapoptotischen Effekten bewirkt Survivin ein verlängertes Überleben von Tumorzellen auch über eine gesteigerte Neoangiogenese [Blanc-Brude et al. 2003]. Da Survivin in einem Großteil von Tumorzellen exprimiert wird, in gesunden Zellen jedoch nicht, eignet es sich besonders gut für einen therapeutischen Ansatz. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es möglich ist, Survivin zu hemmen und damit Apoptose auszulösen. Der therapeutische Erfolg dieser Therapie wird aktuell in klinischen Studien überprüft [Carrasco et al. 2011].

Das *Cyclooxygenase-2*-Gen ist auf der Chromosomenbande 1q25.2 lokalisiert und kodiert für das Enzym COX-2, das Arachidonsäure enzymatisch in Prostaglandine umwandeln kann [Knösel et al. 2004]. Eine Überexpression der COX-2 wurde sowohl in NSCLC als auch in einer Reihe weiterer Tumoren gefunden [Sánchez-Alcázar et al. 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von COX-2 in frühen Stadien von Adenokarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [Achiwa et al. 1999]. Die Bedeutung von COX-2 in der Tumorigenese ist besonders interessant, nachdem gezeigt werden konnte, dass Nitrosamine im

Tabakrauch die Überexpression von COX-2 stimulieren und Cyclooxygenasen für die Aktivierung von Nitrosaminen in der Lunge verantwortlich sind [El-Bayoumy et al. 1999]. Die häufige Überexpression und der einfache Mechanismus, über den die COX-2 gehemmt werden kann, erwecken die Hoffnung mit dieser Strategie Therapieerfolge zu erzielen. Celecoxib ist ein Inhibitor der COX-2, der im Rahmen von klinischen Studien bereits erprobt wird [Pal et al. 2010].

Um auch die Zellen von größeren Tumoren ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen, produzieren Tumorzellen Wachstumsfaktoren, die das Ausbilden neuer Gefäße bewirken. Der Umfang der Neoangiogenese ist ein prognostischer Faktor, der nach einer Tumoresektion ermittelt werden kann [Fontanini et al. 1997]. VEGF ist ein Wachstumsfaktor, der in fünf verschiedenen splice-Varianten aus einem Gen produziert wird und dessen Zielproteine VEGFR-1 und VEGFR-2 zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören [Neufeld et al. 1999]. In ca. 80 % aller NSCLC ist VEGF überdurchschnittlich stark exprimiert und mit einer schlechten Prognose assoziiert [Lantuéjoul et al. 2003; Volm et al. 1997]. Der Einsatz von Antikörpern gegen VEGF und VEGFR wurde erfolgreich getestet und wird nun auch außerhalb klinischer Studien in der Therapie von metastasierten Adenokarzinomen eingesetzt (siehe Abschnitt 1.4.4) [Stinchcombe und Socinski 2009].

### **1.6 Komparative genomische Hybridisierung**

Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) wurde 1992 als eine Methode zur Detektion und Lokalisation von quantitativen Veränderungen der DNS-Sequenz in einem Tumorgenom beschrieben [Kallioniemi A et al. 1992]. Zu den detektierbaren Aberrationen gehören unbalancierte Chromosomenmutationen wie Verluste, Zugewinne und Amplifikationen, wenn sie eine bestimmte Länge überschreiten. Diese Aberrationen müssen einen Abschnitt mit einer Größe von drei bis fünf Megabasenpaaren betreffen, damit sie von der CGH erkannt werden. Punktmutationen und DNS-Veränderungen auf Genebene bleiben unerkannt, genauso wie Inversionen (Drehung eines DNS-Abschnitts an unveränderter Position) oder Translokationen (Verlagerung eines DNS-Abschnittes im Genom) als balancierte Chromosomenmutationen [Kallioniemi OP et al. 1994]. Eine weitere Limitierung ist die Heterogenität der untersuchten Gewebeprobe. Stammen die Zellen der Probe von unterschiedlichen Zellklonen ab und liegen in ihnen ungleiche Aberrationen vor, kann es sein, dass nicht alle Aberrationen fehlerfrei erkannt werden. Auch ist es möglich, dass gesunde Zellen des körpereigenen Immunsystems den Tumor infiltrieren und die extrahierte Tumor-DNS durch

ihr unverändertes Genom verdünnen. Andererseits wird das Ergebnis der CGH nicht von spontanen Mutationen in einzelnen Zellen verändert, sondern repräsentiert die chromosomalen Veränderungen, die im Großteil der Zellklone vorliegen. Das bedeutet, dass das Ergebnis der CGH die durchschnittlichen Veränderungen in allen Zellen der Gewebeprobe wiedergibt [Du Manoir et al. 1993]. Idealerweise beinhaltet eine zu untersuchende Gewebeprobe also nur Zellen, die von einem einzelnen Zellklon eines Tumors ausgehen und deshalb identische Aberrationen enthalten.

Im ersten Schritt der Untersuchung wird die DNS aus den Zellen der Gewebeprobe isoliert und aufgereinigt. Im nächsten Schritt wird die gewonnene Test-DNS durch Nicktranslation mit Biotin markiert [Langer et al. 1981]. Aus dem Gewebe einer gesunden Person wird ebenfalls DNS isoliert und mit Digoxigenin markiert, um sie als Referenz-DNS einzusetzen [Rigby et al. 1977].

Die markierten DNS-Fragmente werden denaturiert und mit Cot-1-DNS versetzt, die sich an hochrepetitive Sequenzen in der DNS setzt, um unspezifische Signale zu unterdrücken [Landegent et al. 1987]. Test- und Referenz-DNS werden zur Hybridisierung in gleicher Menge auf denaturierte Metaphasechromosomen gegeben und binden an ihre spezifischen homologen DNS-Sequenzen. Die Verteilung der verschiedenen markierten DNS-Fragmente auf die Metaphasechromosomen wird durch die antikörpervermittelte Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an die Markermoleküle sichtbar. Fluorescein Avidin färbt die durch Biotin markierte Test-DNS grün. Anti-Digoxigenin-Rhodamin bindet an die durch Digoxigenin markierte Referenz-DNS und leuchtet rot. Der dritte Fluoreszenzfarbstoff DAPI leuchtet blau und färbt die Metaphasechromosomen unselektiv an.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann man das Ergebnis der CGH sehen, per CCD-Kamera fotografieren und mit der entsprechenden Software auswerten. Zu sehen ist der Chromosomensatz, angefärbt in einem Mischton aus Rot und Grün. Areale mit chromosomalen Aberrationen fallen durch intensive Rot- oder Grünfärbung auf (siehe Abbildung 2).

Rot weist auf einen DNS-Verlust in der untersuchten Probe hin, da verhältnismäßig mehr rot markierte Referenz-DNS vorhanden ist, die zu diesem Bereich homolog ist. Korrelat eines solchen Bereiches können eine Deletion, ein Verlust eines Chromosomenarmes, eine Monosomie oder der Totalverlust eines Chromosoms sein. In einem grün gefärbten Areal hat überproportional viel Tumor-DNS gebunden, was darauf hinweist, dass mehr homologe DNS-Sequenzen im Tumorgenom vorhanden waren, als in dem diploiden nicht mutierten Genom der Referenz-DNS. Mögliche Erklärungen sind eine Duplikation oder eine Amplifikation des

entsprechenden Bereiches genauso wie eine Polyploidie in den Zellen der Gewebeprobe [Kallioniemi A et al. 1992].

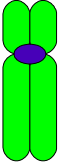
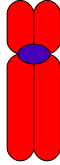
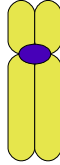
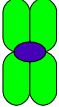
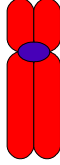
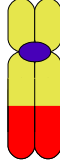
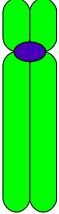
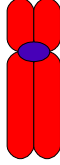
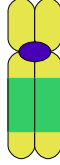
	Tumor-DNS	Referenz-DNS	Angefärbte Metaphasechromosomen
Keine Aberration im Tumorgenom:			
DNS-Verlust im Tumorgenom:			
DNS-Zugewinn im Tumorgenom:			

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Effekte von Aberrationen in der Tumor-DNS auf die Färbung der Metaphasechromosomen.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

In der Zeit von 1999 bis 2006 war in der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie ein Patientenkollektiv aus allen an Lungenkrebs operierten Patienten aufgebaut worden. Das intraoperativ entfernte Tumorgewebe der Patienten war fixiert und archiviert worden. Für die Speicherung der Patientendaten war eine relationale Datenbank angelegt worden.

Ziel dieser retrospektiven Studie war es, das Genom von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen mit der CGH auf chromosomale Imbalancen zu untersuchen und die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Ein Schwerpunkt war die Suche nach Unterschieden im Aberrationsmuster von Kurz- und Langzeitüberlebenden.

Um diese Untersuchung zu ermöglichen, wurde im Rahmen eines „Follow-up“ (Nachbeobachtung) der postoperative Verlauf jedes einzelnen Patienten des vorhandenen

Kollektivs ermittelt und in der Datenbank gespeichert. Die Überlebenszeit der Patienten des Gesamtkollektivs wurde getrennt nach Tumorentitäten in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die Untersuchung aller Tumoren mit der CGH war wegen des hohen finanziellen und zeitlichen Aufwands nicht möglich. Mit dem Ziel einer stärkeren Kontrastierung wurde die genetische Untersuchung auf Kurz- und Langzeitüberlebende fokussiert (siehe Abschnitt 2.1.1). Hintergrund dieser Selektionskriterien war die Überlegung, dass die Tumoren von Patienten mit unterschiedlichen postoperativen Verläufen Unterschiede hinsichtlich ihrer Eigenschaften wie Wachstumsgeschwindigkeit, Invasivität und Aggressivität aufweisen. Sind diese Eigenschaften des Tumors genetisch determiniert, könnten ihnen durch den Vergleich der CGH-Ergebnisse aberrierte Abschnitte im Genom zugeordnet werden, die auf beteiligte Gene schließen lassen. Wegen der stark divergierenden klinischen Verläufe könnten im Vergleich von Kurz- und Langzeitüberlebenden verantwortliche Abschnitte im Genom besonders deutlich auffallen. Die statistische Auswertung der CGH-Ergebnisse erfolgte mit dem Ziel der Klärung folgender Fragestellungen:

- Wie unterscheidet sich das Genom von Kurz- und Langzeitüberlebenden?
- Gibt es Unterschiede im Genom von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen?
- Sind einzelne Aberrationen mit kurzem oder langem Überleben assoziiert?
- Außerdem war es das Ziel dieser Studie, durch die Darstellung der Aberrationen in onkogenetischen Bäumen zu klären, ob neben einzelnen Aberrationen auch Cluster von genetischen Veränderungen auffindbar sind, die ihre Wirkung durch das Zusammenspiel beteiligter Gene entfalten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

#### 2.1.1 Zusammensetzung des Kollektivs

In der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. F. A. Schöndube) waren im Zeitraum von 1999 bis 2006 340 an Lungenkrebs erkrankte Patienten in kurativer Intention operiert worden (siehe Abbildung 3). Aus dieser Gruppe wurden Patienten für die Studie ausgewählt.

Um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden nur Patienten aufgenommen, deren Tumoren histologisch als Adeno- oder Plattenepithelkarzinome klassifiziert werden konnten. 237 der 340 Lungenkrebspatienten erfüllten diese Kriterien und bildeten das Gesamtkollektiv der Studie.

Unter der Annahme, dass der Krankheitsverlauf eines Patienten durch die genetischen Eigenschaften seines Tumors bestimmt wird, wurden zum einen Patienten mit kurzer Überlebenszeit und zum anderen Patienten mit langer Überlebenszeit ausgewählt.

Für Kurz- und Langzeitüberlebende wurden im Vorfeld folgende Kriterien aufgestellt:

- Als Kurzzeitüberlebende wurde die Gruppe definiert, deren Überlebenszeit unter dem 25. Perzentil der Patienten des jeweiligen UICC-Stadiums lag und deren Todesursache das Tumorleiden war. Damit wurden Patienten ausgeschlossen, die innerhalb von 90 Tagen an den Folgen der Operation (perioperativ) verstorben waren.
- Als Langzeitüberlebende wurden Patienten mit einer Überlebenszeit oberhalb des 75. Perzentils eines UICC-Stadiums definiert unabhängig davon, ob sie verstorben waren oder nicht.

Weil die Arbeit im Labor begonnen wurde, bevor das Follow-up abgeschlossen war, fluktuierten die Grenzen der Perzentilen für die Überlebenszeit. Nach abgeschlossener Nachsorge lag deshalb auch eine Gruppe von Patienten, deren Tumoren mit der CGH untersucht wurde, zwischen dem 25. und 75. Perzentil. Diese Patienten bildeten ein Mittelfeld, das nicht in den Vergleich zwischen Kurz- und Langzeitüberlebenden einbezogen wurde. In alle anderen statistischen Auswertungen wurden die Ergebnisse dieser Gruppe jedoch einbezogen.

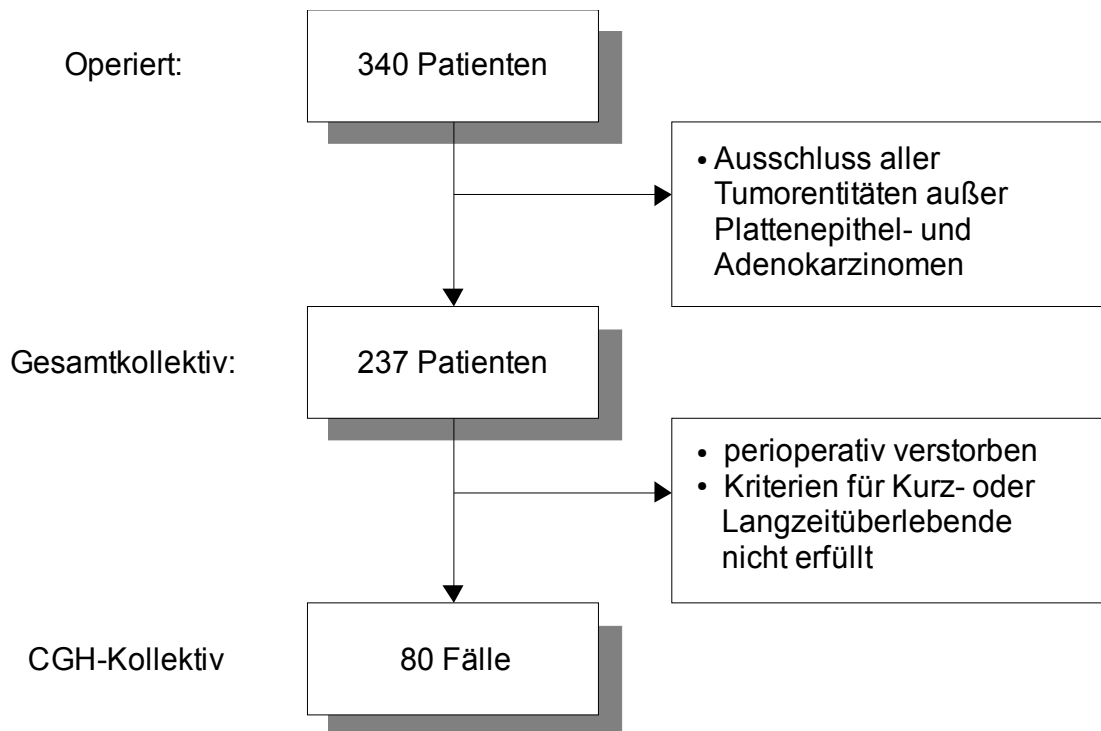


Abbildung 3: Kriterien für die Zusammensetzung von Gesamtkollektiv und CGH-Kollektiv.

### 2.1.2 Follow-up

Die prä-, intra- und postoperativ erhobenen Daten waren in eine relationale Datenbank eingetragen worden (Microsoft Access 2003).

Zu den präoperativ erhobenen Daten gehörten neben Geschlecht, Alter und Allgemeinzustand (Karnofsky-Index) auch alle Ergebnisse der „Staging“-Untersuchungen und das klinisch ermittelte TNM-Stadium.

Die intraoperativen Daten umfassten neben dem Operateur und der angewendeten Operationstechnik auch Angaben über entnommene Lymphknoten und intraoperativ beobachtete Besonderheiten.

Postoperative Daten umfassten den Zustand des Patienten, eventuell durchgeführte Bluttransfusionen sowie die Dauer der Überwachung auf der Intensivstation unmittelbar nach der Operation. Außerdem wurde das pathologisch ermittelte TNM-Stadium, Informationen über eventuelle Revisionseingriffe und Daten vom stationären Aufenthalt bis zur Entlassung des Patienten aus dem Krankenhaus gespeichert.

Ergänzt wurden die vorhandenen Daten durch die Ergebnisse der Nachsorgeuntersuchungen, die im Rahmen dieser Studie ermittelt wurden.

Um vollständige Informationen über den postoperativen Verlauf der Patienten zu bekommen, wurde ein Fragebogen mit der Bitte um Informationen entworfen und an die Hausärzte der Patienten verschickt. Neben den Hausärzten wurden auch die weiterbehandelnden Fachärzte nach aktuellen Untersuchungsergebnissen der Patienten befragt. Abgeschlossen wurde die Datenerhebung, wenn Informationen über den Zustand der Patienten 5 Jahre nach der Operation vorlagen, oder der Patient verstorben war. War es nicht möglich, durch die weiterbehandelnden Ärzte an die benötigten Information zu gelangen, wurde telefonisch Kontakt zu den Patienten aufgenommen. Die Daten von Patienten, bei denen keiner der beiden Endpunkte erreicht wurde, gingen als zensierte Daten in die Überlebenskurve ein. Patienten, bei denen es nicht möglich war, Informationen über Nachsorgeuntersuchungen und die Entwicklung der Erkrankung zu erhalten, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Für die Durchführung der Studie und den Umgang mit sensiblen Patientendaten wurde ein positives Votum der hiesigen Ethikkommission eingeholt.

### 2.2 Labormaterialien

Die Tabellen 8 - 17 enthalten eine Auflistung über alle Materialien, Reagenzien und Geräte, die für die Laborarbeit benötigt wurden. Die Menge und Konzentration der Reagenzien, die Einsatzweise der Geräte und ihre Einstellungen werden, soweit sie von den Herstellern offengelegt sind, im Kapitel 2.3 näher erläutert.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
6X Loading Dye Solution	Fermentas	St. Leon-Rot
Actinomycin-D-Mannitol	Sigma-Aldrich	Hamburg
Agarose – LE	Biozym	Hessisch Oldendorf
Albumin Fraktion V	Merck	Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	Delta Select	Dreieich
Aqua bidestillata	Universitätsmedizin Göttingen	Göttingen
Borsäure	Merck	Darmstadt
DAPI	Sigma-Aldrich	Hamburg
Dextransulfat	Merck	Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt



## 2. Material und Methoden

DNS-Puffer	Fermentas	St. Leon-Rot
EDTA	Serva Electrophoresis	Heidelberg
Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich	Hamburg
Ethanol 70 %	Sigma-Aldrich	Hamburg
Ethanol 85 %	Sigma-Aldrich	Hamburg
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Steinheim
Formamid	Sigma-Aldrich	Hamburg
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Natriumacetat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Polysorbat 20	Sigma-Aldrich	Hamburg
Resin	Bio-Rad	München
Salzsäure 1 M	Merck	Darmstadt
Salzsäure 37 %	Merck	Darmstadt
Salzsäure 5 M	Merck	Darmstadt
Tri-Natriumcitratdihydrat	Merck	Darmstadt
Tris	Merck	Darmstadt
Tris-HCl	Merck	Darmstadt
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe

*Tabelle 8: Zusammenstellung der Chemikalien und Biochemikalien.*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Anregungsfilter DAPI	Genetix	New Milton, Großbritannien
Anregungsfilter FITC	Genetix	New Milton, Großbritannien
Anregungsfilter TRITC/TxRed	Genetix	New Milton, Großbritannien
BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Brutschrank	Memmert	Schwabach
CCD-Kamera	Photometrics SENSYS	München
Elektrophoresekammer BlueMarine 100	Serva Electrophoresis	Heidelberg
Feinwaage BL 1500S	Sartorius	Göttingen
Hybridisierungskammer HYBrite	Vysis	Downers Grove, USA

## 2. Material und Methoden

Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments	Schwabach
Mikroskop Axioskop 40 FL	Carl Zeiss	Jena
Mikrotom HM 400	Microm	Volketswil, Schweiz
Objektiv Plan-Neofluar 10x/0,30	Carl Zeiss	Jena
Objektiv Plan-Neofluar 63x/1,25 Oil	Carl Zeiss	Jena
PH-Meter CG820	Schott Geräte	Mainz
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Polaroid-Kamera MP4+ ICS	Polaroid	Dreieich-Sprendlingen
Power Mac G3	Apple	Cupertino, USA
Power Mac G5	Apple	Cupertino, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg
UV-Transluminator FLX 20.M	Vilber Lourmat	Eberhardzell
Vortex-Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, USA
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf	Hamburg

*Tabelle 9: Zusammenstellung der benutzten Laborgeräte.*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Deckgläser	Menzel-Gläser	Braunschweig
Fixogum	Marabu	Tamm
Küvetten	Eppendorf	Hamburg
Objektträger	Menzel-Gläser	Braunschweig
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht

*Tabelle 10: Liste der Verbrauchsmaterialien.*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
QiAmp DNA Mini Kit	Qiagen	Hilden

*Tabelle 11: Das verwendete DNS-Isolierungssystem.*

## 2. Material und Methoden

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Lambda-DNA/ <i>EcoRI</i> Marker	Fermentas	St. Leon-Rot
pUC19 DNA/ <i>MspI</i> ( <i>HpaII</i> ) Marker	Fermentas	St. Leon-Rot

*Tabelle 12: Die benutzten molekularen Standards.*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Biotin-16-dUTP	Roche	Penzberg
COT-1 Human DNA	Roche	Penzberg
Digoxigenin-11-dUTP	Roche	Penzberg
Sequencing Grade dNTP Set	Amersham Biosciences	Piscataway, USA

*Tabelle 13: Liste der Nukleotide und DNS-Präparate.*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Anti-Digoxigenin-Rhodamin	Roche	Penzberg
Fluorescein Avidin DCS	Vector Laboratories	Burlingame, USA

*Tabelle 14: Fluoreszenzfarbstoffkonjugate.*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
DNA-Polymerase I, <i>E.coli</i>	Fermentas	St. Leon-Rot
DNase I	Roche	Mannheim
Pepsin	Sigma-Aldrich	Hamburg
Proteinase K	Roche	Mannheim

*Tabelle 15: Liste der verwendeten Enzyme.*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
CGH Metaphase Target Slides	Abbott Molecular	Wiesbaden

*Tabelle 16: Metaphasenpräparate.*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
CCD-Kamera	Metasystems GmbH	Altlussheim
ISIS FISH Imaging System Version 5.1.16	Metasystems GmbH	Altlussheim
Metafer4 Version 3.2.2	Metasystems GmbH	Altlussheim

*Tabelle 17: Hard- und Software für die Auswertung.*

## **2.3 Labormethoden**

### **2.3.1 Fixierung**

Das intraoperativ entfernte Tumorgewebe war in 4-prozentiger phosphatgepufferter Formaldehydlösung fixiert und in das Labor der Pathologie überführt worden. Dort war eine makroskopische Beurteilung des Gewebes durchgeführt und das Resektat fraktioniert in Paraffinblöcke eingebettet worden. Die histomorphologische Beurteilung des Tumors erfolgte nach dem Anfertigen von HE-Schnitten aus den Paraffinblöcken durch den Pathologen.

### **2.3.2 Isolierung der Tumor-DNS**

- Gewinnung von Tumorgewebe:

Nach Sichtung der HE-Schnitte unter dem Lichtmikroskop wurde der Schnitt mit der höchsten Dichte an Tumorzellen ( $\geq 75\%$  Tumorzellen) und der geringsten Infiltration von Zellen anderen Ursprungs ausgesucht. Der korrespondierende Paraffinblock wurde für die CGH-Untersuchung vorbereitet. Dabei wurde in allen Fällen Tumormaterial vom Primärtumor verwendet. Mit Hilfe des Mikrotoms wurden 10 - 20 jeweils 10 - 15  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte vom Paraffinblock abgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gegeben.

- Reinigung des Gewebes:

Um die Tumorzellen von Paraffin und Formalin zu reinigen, wurde 1 ml Xylol in das Reaktionsgefäß gegeben und mit Hilfe des Vortex (Schüttelgerät) durchgemischt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde das Gemisch zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Reinigungsschritt wurde einmal wiederholt. Nun wurde 1 ml Ethanol (100 %) hinzugegeben, die Probe gut durchgemischt und nach 10-minütiger Inkubation und

## 2. Material und Methoden

Zentrifugation der Überstand aus Ethanol und den darin gelösten Paraffin- und Formalinrückständen abpipettiert und verworfen. Auch dieser Reinigungsschritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das geöffnete Gefäß bei ca. 60 °C für eine Stunde im Brutschrank getrocknet, um das verbliebene Ethanol zu entfernen.

- Zersetzung der Zellproteine:  
Um die DNS aus den Zellen zu befreien, wurden 40 µl Proteinase K und 200 µl DNS-Isolierungspuffer (siehe Tabelle 18) hinzugefügt und gut vermischt. Die Proteinase K vermag die Zellkerne aufzuschließen, zersetzt alle störenden Zellproteine und belässt die DNS-Moleküle unverändert. Um eine ausreichende Wirkung zu erzielen, verblieb die Probe bei 55 °C und 850 rpm über Nacht auf dem Thermomixer. Um die Reaktion zu beenden, wurde das Enzym bei 95 °C über 8 min mit dem Thermomixer inaktiviert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß bei 13.500 rpm 10 min zentrifugiert und der Überstand, in dem sich die DNS befand, abpipettiert und weiterverarbeitet.

DNS-Isolierungspuffer		1000 ml
Tris-HCl	50 mmol/l	7,88 g
EDTA	1 mmol/l	0,37 g
Polysorbat 20	0,5 % (v/v)	5 ml

*Tabelle 18: Zusammensetzung des DNS-Isolierungspuffers. Der Puffer lag als Fertigreagenz dem QiAmp DNA Mini Kit von Qiagen bei.*

- Aufreinigung der DNS:  
Mit Hilfe des QiAmp DNA Mini Kits von Quiagen (siehe Tabelle 19) wurde im nächsten Schritt die DNS von verbliebener Restverschmutzung befreit. Dazu wurde 200 µl AL-Puffer (Lysis Puffer) zur Probe pipettiert und für 10 min bei 70 °C und 1.400 rpm mit dem Thermomixer durchgemischt. Nun wurden 240 µl Ethanol (100 %) zugegeben und die Probe für 5 min inkubiert. Die entstandene Lösung wurde auf einen siliziumhaltigen Filter gegeben, der an einem im QiAmp DNA Mini Kit enthaltenen Gefäß befestigt wurde. Durch Zentrifugation der gesamten Flüssigkeit für 2 min bei 10.000 rpm blieb die DNS im Filter haften und ein Filtrat aus Alkohol und Puffer sammelte sich im Gefäß. Das Gefäß mit dem Filtrat wurde verworfen und der Filter mit der gebundenen DNS auf ein neues Gefäß gesteckt. 500 µl des Guanidiniumchlorid enthaltenden AW1-Puffer (Waschpuffer 1) wurden auf die Filtersäule gegeben und wieder für 2 min zentrifugiert. Diese Schritte wurden nach

## 2. Material und Methoden

Zugabe von 500 µl AW2-Puffer (Waschpuffer 2) erneut durchgeführt. Im letzten Schritt, der Eluierung, konnte die gereinigte DNS aus dem Filter gelöst werden. Dazu wurde der Filter wie in den vorrausgegangenen Schritten auf ein sauberes Sammelgefäß gesteckt, 50 µl AE-Puffer (Elutionspuffer) auf die Filtersäule pipettiert, 2 min gewartet, bis sich die DNS gelöst hatte, und erneut 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Diese Schritte wurden wiederholt, so dass die DNS nach der 2. Zentrifugation in dem 100-µl-Filtrat im Sammelgefäß gelöst war. Die erhaltene Tumor-DNS wurde bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

<b>AL-Puffer</b>		Lysis Puffer
Guanidiniumchlorid	25 - 50 %	
<b>AW1-Puffer</b>		Waschpuffer 1
Guanidiniumchlorid	50 - 100 %	
<b>AW2-Puffer</b>		Waschpuffer 2
<b>AE-Puffer</b>		Elutionspuffer

*Tabelle 19: Liste der Puffer aus dem QiAmp DNA Mini Kit von Qiagen. Über die Zusammensetzung der Puffer macht der Hersteller keine genaueren Angaben.*

- **Qualitätskontrolle der DNS:**

Die Konzentration und die Länge der DNS-Fragmente sind entscheidende Faktoren, die das Ergebnis der CGH beeinflussen. Sie mussten bei allen Proben im Referenzbereich liegen. Um die Länge der DNS-Fragmente zu bestimmen, wurde ein Anteil der DNS-Probe in einem Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Im ersten Schritt wurde das Agarosegel aus 0,75 g Agarose, 45 ml Aqua bidest. und 5 ml 10-fach konzentriertem TBE-Puffer (siehe Tabelle 20 und 21) angesetzt. Das Gemisch wurde unter ständigem Rühren erwärmt, bis eine Lösung entstanden war. Im Gelraum wurde unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen 7,5 µl Ethidiumbromid in den Gelansatz gegeben. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und verändert so das Absorptionsspektrum der DNS-Moleküle. Nach Anregung mit ultraviolettem Licht leuchten die markierten Moleküle proportional zu Länge und Konzentration durch Fluoreszenz. Das angesetzte Gel wurde in die vorbereitete

## 2. Material und Methoden

Elektrophoresekammer gegeben und verfestigte sich nach 20 min. Jeweils 5 µl einer Probe wurden mit 3 µl Loading-Puffer (lag dem puc 19 Standard bei) versetzt und nach Durchmischen in eine Geltasche pipettiert. Um die Länge der DNS-Fragmente abschätzen zu können, wurde ein Längenstandard aus 3 µl Loading-Puffer, 5 µl Ampuwa und 1,5 µl Lambda-DNA/EcoR1 Marker in eine andere Geltasche gegeben. Der Lambda-DNA/EcoR1 Marker ist eine Fertigreagenz und enthält DNS-Fragmente der Längen 3530, 4878, 5643, 5804, 7421 sowie 21226 Basenpaare. Die Auftrennung der Moleküle erfolgte bei 80 V für ca. 45 min. Dabei liefen die negativ geladenen DNS-Moleküle durch das angelegte elektrische Feld in Richtung der positiv geladenen Kathode. Das Agarosegel wirkt hierbei als Molekularsieb, in dem die Wanderungsgeschwindigkeit von gleichartigen Molekülen proportional mit steigender Größe abnimmt. Des Weiteren wird die Wanderungsgeschwindigkeit vom pH-Wert des Loading-Puffers, der Stärke des elektrischen Feldes und der Ladung der Teilchen beeinflusst. Das fertige Gel wurde unter UV-Licht fotografiert und die Länge der DNS-Fragmente konnte im Vergleich zu den Fragmenten bekannter Länge bestimmt werden. Bei DNS aus Frischgewebe hatten die Fragmente eine Länge von ungefähr 20.000 Basenpaaren. DNS aus Gewebe, was in Paraffinblöcke eingebettet war, erreichte Fragmentlängen zwischen 500 und 5.000 Basenpaaren.

Die Konzentration der Tumor-DNS in der Probe wurde durch fotometrische Messung ermittelt. Hierzu wurden 5 µl der DNS mit 95 µl Aqua ad iniectabilia gemischt. Die Extinktion der verdünnten Lösung wurde im Fotometer bei 260 nm gemessen, nachdem der Leerwert mit 100 µl Aqua ad iniectabilia bestimmt wurde. Bei standardisierter Schichtdicke der Messküvette und bekanntem Extinktionskoeffizienten konnte die Konzentration mit dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden. Mit Hilfe der Konzentration konnte das Volumen berechnet werden, was genau 3 µg der DNS enthielt. Mit einer weiteren fotometrischen Messung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, wurde die Reinheit der DNS-Lösung ermittelt. Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm lag bei reiner DNS zwischen 1,8 und 1,9.

<b>TBE-Puffer</b>		<b>1000 ml</b>
TRIS	89 mmol/l	10,78 g
Borsäure	89 mmol/l	5,5 g
EDTA	2 mmol/l	0,58 g

*Tabelle 20: Zusammensetzung des TBE-Puffers.*

## 2. Material und Methoden

<b>Agarosegel</b>		<b>50 ml</b>
Agarose	1,5 % (m/v)	0,75 g
10x TBE-Puffer		5 ml
Aqua bidest.		45 ml
Ethidiumbromid	10 mg/ml	7,5 µl

Tabelle 21: Zusammensetzung des Agarosegels.

- Isolierung von Referenz-DNS:

Für die Durchführung der CGH wird neben der isolierten Tumor-DNS eine Referenz-DNS ohne Mutationen benötigt. Wegen der hohen Zelldichte und der entsprechend großen DNS-Menge eignet sich gesundes Lebergewebe von Frauen und Männern. Von diesem Gewebe wurde ein ca. 5 mm<sup>3</sup> großes Stück zugeschnitten und zerkleinert. Das Gewebe wurde mit 360 µl ATL-Puffer (siehe Tabelle 22) und 40 µl Proteinase K aus dem QiAmp DNA Mini Kit versetzt und über Nacht bei 55 °C auf dem Thermomixer inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten analog zur DNS-Isolierung aus Gewebe in Paraffinblöcken.

<b>ATL-Puffer</b>		
Edetinsäure	2,5 – 10 %	
Natriumlaurylsulfat	2,5 – 10 %	

Tabelle 22: Zusammensetzung des ATL-Puffers. Der Puffer lag als Fertigreagenz dem QiAmp DNA Mini Kit bei.

### 2.3.3 Nicktranslation

Ziel der Nicktranslation ist es, Tumor- und Referenz-DNS jeweils mit einem spezifischen Marker zu versehen, um sie später von einander unterscheiden zu können.

In dieser Studie wurde ein indirektes Verfahren angewendet, bei dem die DNS mit Molekülen markiert wurde, die später mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern sichtbar gemacht werden konnten.

Dazu wurden mit Hilfe des Enzyms DNase I „Nicks“ (Lücken) in den DNS-Strang geschnitten (siehe Abbildung 4). Diese „Nicks“ entstanden an zufälligen Stellen im Strang, an denen die DNase I binden konnte [Rigby et al. 1977].



Ein weiteres Enzym, die E. Coli-DNA-Polymerase, fand die entstandenen Lücken und entfernt mit ihrer 5' → 3' -Exonukleaseaktivität Nukleotide des „genickten“ Stranges. Mit ihrer 5' → 3' -Polymeraseaktivität synthetisierte sie einen zum intakten Strang komplementären neuen Strang. Da vor dieser Reaktion jedoch mit Biotin oder Digoxigenin markierte Nukleotide im Überschuss ins Reaktionsgefäß gegeben wurden, waren im neu synthetisierten Strang die markierten Nukleotide eingebaut. Die Tumor-DNS wurde mit Biotin-16-dUTP Nukleotiden markiert.

Um eine vorzeitige Aktivierung der beteiligten Enzyme zu verhindern, wurde auf Eis pipettiert. Das berechnete Volumen, das 3 µg Proben-DNS enthält, wurde abgemessen. Es wurden 10 µl 10x Reaktionspuffer (siehe Tabelle 23), je 2 µl dATP, dGTP, dCTP (100 mmol/l), 1 µl dTTP, 1 µl DNase I, 2 µl DNA-Polymerase (10 U/µl) und 1 µl Biotin-16-dUTP zur abgemessenen DNS gegeben und mit sterilem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde durchgemischt, zentrifugiert und bei 15 °C auf dem Thermomixer für 50 min inkubiert.

Für die Nicktranslation der Referenz-DNS wurde statt Biotin-16-dUTP 1 µl Digoxigenin-11-dUTP verwendet und die Inkubationszeit auf 60 min erhöht. Die längere Inkubationszeit wurde benötigt, weil die aus Frischgewebe isolierte DNS hochmolekularer (längerkettig) ist als solche, die in Paraffin fixiert war.

Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Abkühlen auf -20 °C gestoppt.

Durch die Wirkung der DNase I entstanden neben den Lücken in den Einzelsträngen auch Brüche im Doppelstrang, so dass die Länge der DNS-Fragmente abnahm. Die Länge der DNS-Fragmente nach der Nicktranslation wurde durch eine erneute Gelelektrophorese gemessen. Allerdings wurde, um die Enzymaktivität zu stoppen, 3 µl Loading Puffer verwendet, der mit EDTA versetzt war (siehe Tabelle 24). Als Längenstandard für die Gelelektrophorese wurde puc19 DNA/MspI Marker verwendet. Ein optimales Ergebnis konnte mit der CGH erzielt werden, wenn die Fragmente eine Länge von 150 - 650 Basenpaare hatten.

Waren die Nickprodukte länger als 650 Basenpaare, wurde der Ansatz für 10 - 15 min bei 15 °C nachinkubiert.

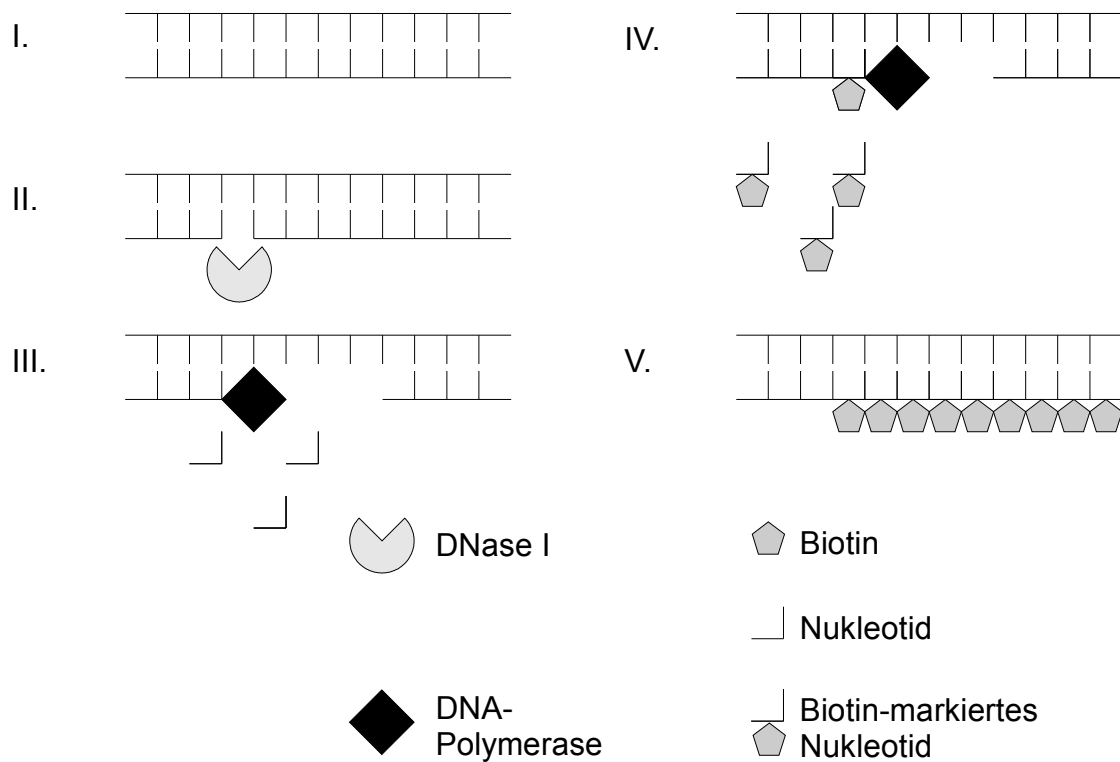


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Nicktranslation. I.: Die isolierte DNS liegt als Doppelstrang vor. II.: Die DNase I schneidet Lücken in den DNS-Strang. III.: Die DNA-Polymerase entfernt Nukleotide ausgehend von den entstandenen Lücken. IV.: Die DNA-Polymerase synthetisiert einen neuen komplementären Strang und baut die der Lösung im Überschuss zugefügten, markierten Nukleotide ein. V.: Ein mit Biotin markierter DNS-Strang entsteht.

10x Reaktionspuffer		
TRIS-HCl	500 mmol/l	
Magnesiumchlorid	100 mmol/l	
Dithiothreitol	10 mmol/l	

Tabelle 23: Zusammensetzung des 10x Reaktionspuffers. Der Puffer lag der E.coli-DNA-Polymerase von Fermentas bei.

<b>Loading-Puffer mit EDTA</b>		<b>110 µl</b>
Loading Puffer		100 µl
- TRIS-HCl	10 mmol/l	
- Bromophenol blue	0,03 %	
- Xylene cyanol	0,03 %	
- Glycerol	60 mmol/l	
EDTA	0,5 mol/l	10 µl

*Tabelle 24: Zusammensetzung des Loading-Puffers versetzt mit EDTA. Der Loading-Puffer lag dem puc 19 Standard von Fermentas bei.*

### 2.3.4 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Bei der CGH werden Tumor- und Referenz-DNS in gleicher Menge zusammengeführt und denaturiert. Dem DNS-Gemisch wird Cot-1-DNS hinzugeben, welche sich an unspezifische hochrepetitive Sequenzen (z.B.: Telomer und Zentromer) bindet. Dieser Vorgang wird als „Preannealing“ bezeichnet und gewährleistet, dass die spezifischen DNS-Sequenzen weiterhin als Einzelstränge vorliegen und an ihre homologen Sequenzen auf den Metaphasechromosomen hybridisieren [Landegent et al. 1987]. Die Stabilität des Hybriden, also des DNS-Doppelstranges, wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den Stickstoffbasen bestimmt. Die Wasserstoffbrückenbindungen können durch Kationen stabilisiert werden. Deionisiertes Formamid destabilisiert Wasserstoffbrücken. Daher führt seine Zugabe dazu, dass die DNS in Form von Einzelsträngen vorliegt.

- Vorbereitung der Metaphasechromosomen:

Die Metaphasechromosomen wurden aus Lymphozyten hergestellt, die von gesunden männlichen Spendern stammen und in der Metaphase in Zellarrest gegangen sind. Nur in dieser Phase des Zellzyklus sind sie im Lichtmikroskop sichtbar. Für die Hybridisierung mussten die Metaphasechromosomen gereinigt und denaturiert werden. Im ersten Schritt erfolgte die Reinigung der Metaphasen mit einer Pepsinlösung (siehe Tabelle 25). Durch das Enzym Pepsin wurden störende Proteine des Kernplasmas sowie das Chromatingerüst verdaut. Dafür wurde der Objektträger bei 37 °C in eine Glasküvette mit der Pepsinlösung fünf Minuten inkubiert. Weitere fünf Minuten später wurde der Objektträger in eine 2x SSC-Lösung („Saline Sodium Citrat“; siehe Tabelle 26) gestellt und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (5 min in 70 % Ethanol, 5 min in 80 % Ethanol und 5 min in 100 % Ethanol bei -20 °C). Im Anschluss wurde der Objektträger für 30 min bei

## 2. Material und Methoden

Raumtemperatur getrocknet. Die Denaturierung erfolgte für 5 min bei 69 °C in einer Lösung aus 5 ml 20x SSC (siehe Tabelle 27), 5 ml Natriumdihydrogenphosphat, 5 ml Aqua bidest. sowie 35 ml deionisiertes Formamid (siehe Tabelle 28) und wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe beendet.

<b>Pepsinlösung</b>		<b>720 µl</b>
Pepsin	20 mg/ml	20 µl
HCl	1 mol/l	700 µl

*Tabelle 25: Zusammensetzung der Pepsinlösung.*

<b>2x SSC-Lösung</b>		<b>1000 ml</b>
20x SSC-Lösung		100 ml
Aqua bidest.		900 ml

*Tabelle 26: 2x SSC-Lösung wird durch Verdünnung der 20x SSC-Lösung hergestellt. Die Lösung wurde mit HCl (37 %) auf pH7 eingestellt.*

<b>20x SSC-Lösung</b>		<b>1000 ml</b>
Tri-Natriumcitratdihydrat	0,35 mol/l	88,29 g
Natriumchlorid	3 mol/l	175,5 g

*Tabelle 27: Zusammensetzung der 20x SSC-Lösung. Die Lösung wurde mit HCl (37 %) auf pH7 eingestellt.*

<b>Denaturierungslösung</b>		<b>50 ml</b>
20x SSC-Lösung		5 ml
Natriumdihydrogenphosphat	0,5 mol/l	5 ml
Aqua bidest.		5 ml
Deionisiertes Formamid		35 ml

*Tabelle 28: Zusammensetzung der Denaturierungslösung. Die Lösung wurde mit 5 M HCl auf pH7 eingestellt.*

- Vorbereitung des DNS-Pellets:

Um die in der Nicktranslation entstandenen Lösungen für die Hybridisierung zu benutzen, mussten die zugefügten Enzyme mit EDTA inaktiviert werden. Dazu wurde zu jeder DNS-Lösung 5 µl EDTA pipettiert und die Lösungen mit dem Thermomixer auf 37 °C erwärmt.

## 2. Material und Methoden

---

Zu 67  $\mu\text{l}$  der vorbereiteten Tumor-DNS wurden nun 67  $\mu\text{l}$  einer gegengeschlechtlichen Referenz-DNS gegeben. Durch die unterschiedliche Verteilung der Gonosomen in der DNS-Mischung zeigt sich später durch unterschiedliche Färbung, ob die Methode wie gewünscht funktioniert hat. Der Lösung wurden des Weiteren 80  $\mu\text{l}$  Cot-1-DNS, 12  $\mu\text{l}$  Natriumacetat und 580  $\mu\text{l}$  Ethanol (100 %) beigemischt. Die Proben wurden für 30 min bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren, was eine Fällung der DNS zur Folge hatte. Um die DNS von der Lösung zu trennen, wurde das Gemisch bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 14.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und für einen weiteren Waschschrift wurde 800  $\mu\text{l}$  Ethanol (70 %) mit dem verbliebenen DNS-Rückstand bei  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf dem Thermomixer vermischt. Das Gemisch wurde erneut zentrifugiert und der Überstand mit den ausgewaschenen Salzen und der Restverschmutzung entfernt. Das entstandene DNS-Pellet wurde für 30 min unter dem Abzug getrocknet und danach in 6  $\mu\text{l}$  deionisiertem Formamid bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 1.400 rpm auf dem Thermomixer gelöst.

- **Hybridisierung:**

Der vorbereiteten DNS-Probe wurde nun 7  $\mu\text{l}$  Mastermix (siehe Tabelle 29) zugegeben. Diese Lösung enthält 30 % Dextransulfat, ein Polyanion, das Wasser binden kann und so eine höhere DNS-Konzentration ermöglicht. Dadurch wird eine Beschleunigung der Hybridisierung erreicht [Wetmur 1975]. Auf dem Thermomixer wurde die Probe bei  $78\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 6 min denaturiert und danach 30 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorhybridisiert. Nach 30 sek Zentrifugation erfolgte der entscheidende Hybridisierungsschritt. 13  $\mu\text{l}$  der markierten, denaturierten DNS-Lösung wurden auf einen Objektträger mit den denaturierten Metaphasechromosomen pipettiert (siehe Abbildung 5). Das Objektträgerfeld wurde mit einem Deckgläschen und Fixogum verschlossen und für 3 Tage in einer feuchten Kammer bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

<b>Mastermix</b>	
Dextransulfat	30 %
2x SSC	

*Tabelle 29: Zusammensetzung des Mastermix.*

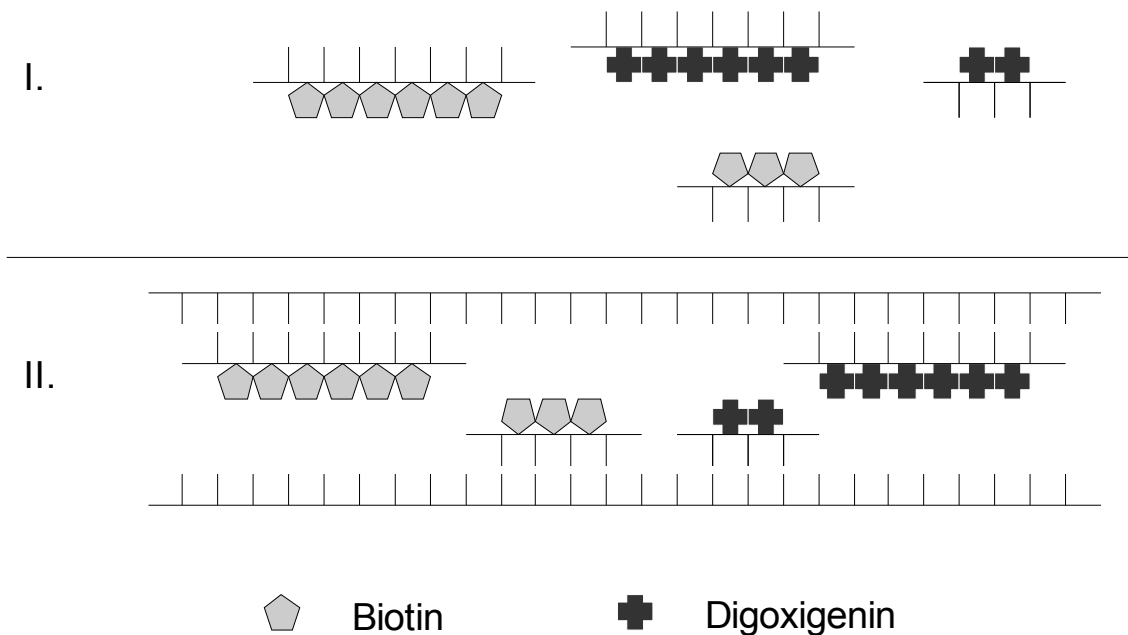


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Hybridisierung. I.: Die Lösung enthält denaturierte Tumor- und Referenz-DNS in gleicher Menge. II.: Beim Auftragen auf den Objektträger mit den denaturierten Metaphasechromosomen hybridisieren die DNS-Fragmente mit den komplementären Sequenzen der Metaphasechromosomen.

- Detektion:

Nachdem im letzten Schritt die markierte DNS an die homologe Metaphasen-DNS gebunden hat, wurde in diesem Schritt die unterschiedlich markierte DNS sichtbar gemacht. Dazu wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper gegen die Markermoleküle eingesetzt (siehe Abbildung 6). Ein Antikörper, an den der grün leuchtende Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein Avidin DCS) gebunden war, erkannte das Markermolekül Biotin als spezifisches Zielprotein und markierte die Tumor-DNS auf diese Weise grün. Das Markermolekül Digoxigenin, das in die Referenz-DNS eingebaut wurde, konnte durch Anti-Digoxigenin-Rhodamin, einen Antikörper mit rot leuchtendem Fluoreszenzfarbstoff, sichtbar gemacht werden.

Um nach der dreitägigen Inkubation die Objektträger für die Auswertung vorzubereiten, wurden verschiedene Waschlösungen eingesetzt (siehe Tabelle 30). Die Deckgläschen wurden von den Objektträgern abgenommen und das Fixogum nach 2-minütigem Einweichen in Waschlösung B entfernt. Nun wurden die Objektträger drei mal für jeweils fünf Minuten in einem Schüttelbad gewaschen. Dafür wurden drei Küvetten mit der

Waschlösung A auf 42 °C erwärmt und die Objektträger hineingestellt. Es folgte ein dreimaliges Waschen für je fünf Minuten in 42 °C warmer Waschlösung B. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden 300 µl der Blockinglösung (siehe Tabelle 31) auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckgläschen eingedeckt und 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nachfolgend wurde das Deckgläschen entfernt und wie schon zuvor drei mal in Waschlösung C gewaschen.

Die Detektionslösung (siehe Tabelle 32) wurde nach dem Ansetzen für 10 min bei 37 °C und 1.000 rpm auf dem Thermomixer gelöst und danach 3 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die lichtempfindlichen Antikörper wurden dabei ausschließlich im Dunkeln aufbewahrt. 300 µl der Detektionslösung wurden auf jeden Objektträger gegeben und erneut mit einem Deckgläschen versehen. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C in der feuchten Kammer war der Detektionsvorgang abgeschlossen. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Objektträger in Waschlösung C entfernt.

Um neben den speziell markierten Bereichen die gesamte DNS homogen anzufärben, wurde eine Lösung aus 1 µl 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), 50 µl Actinomycin und 1 ml Vectorshield angesetzt. DAPI lagert sich in Adenin- und Thymin-reichen Regionen der DNS an, fluoresziert bei Anregung blau und dient der Sichtung aller Metaphasechromosomen im Mikroskop [Schnedl et al. 1977].

20 µl der DAPI-Lösung wurden auf jeden Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen verschlossen. Das fertige Präparat wurde im Präparatekasten bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Um die volle Farbintensität der Fluoreszenzfarbstoffe zu gewährleisten, wurden die Objektträger innerhalb von zwei Wochen durch das Mikroskop fotografiert.

## 2. Material und Methoden

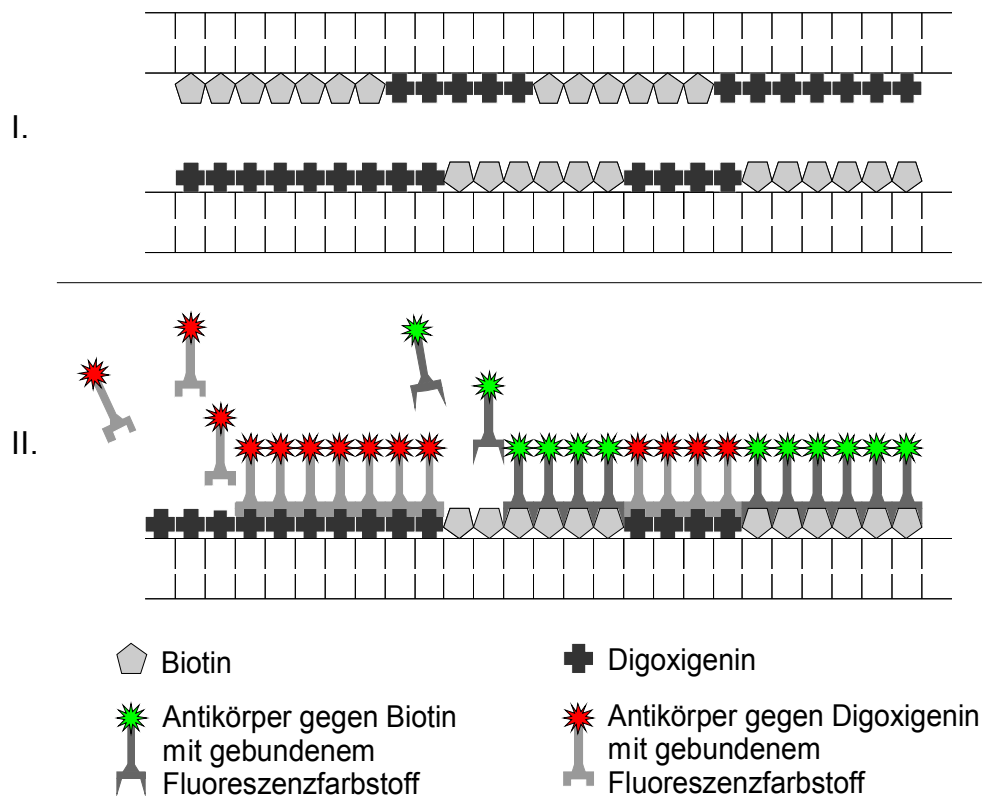


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Detektionsvorgangs. I.: Die markierten DNS-Fragmente haben vollständig an die Metaphasechromosomen gebunden. II.: Antikörper mit dem gebundenen Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein Avidin binden an die Biotinmoleküle. Antikörper mit dem gebundenen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin binden an Digoxigeninmoleküle.

<b>Waschlösung A</b>		<b>1000 ml</b>
Formamid	50 % (v/v)	500 ml
20x SSC	10 % (v/v)	100 ml
Aqua bidest.		400 ml
<b>Waschlösung B</b>		<b>1000 ml</b>
20x SSC	10 % (v/v)	100 ml
Aqua bidest.		900 ml
<b>Waschlösung C</b>		<b>1000 ml</b>
20x SSC	20 % (v/v)	200 ml
Aqua bidest.		799 ml
Tween 20	0,1 %	1 ml

Tabelle 30: Zusammensetzung der Waschlösungen A, B und C. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit 5 M HCl auf 7 eingestellt.



## 2. Material und Methoden

<b>Blockinglösung</b>	<b>3 %</b>	
BSA		300 mg
Waschlösung C		10 ml

Tabelle 31: Zusammensetzung der Blockinglösung.

<b>Detektionslösung</b>	<b>1 %</b>	
Blockinglösung	3 %	1 ml
Waschlösung C		2 ml
Anti-Digoxigenin-Rhodamin		45 µl
Fluorescein Avidin DCS		15 µl

Tabelle 32: Zusammensetzung der Detektionslösung.

### 2.3.5 Auswertung der CGH

Fünf Tage wurden benötigt, um die Tumor- und Referenz-DNS zu isolieren, mit Markermolekülen zu versetzen, sie auf die Metaphasechromosomen zu hybridisieren und durch antikörpergebundene Fluoreszenzfarbstoffe anzufärben. Das Ergebnis konnte nun durch das Mikroskop gesichtet werden. Die Metaphasen wurden fotografiert, die digitalen Fotos am Computer bearbeitet und die bearbeiteten Fotos ausgewertet. Nach der Bearbeitung wurde für jeden Patienten ein Ideogramm erzeugt (eine Abbildung des Chromosomensatzes mit einer überlagerten Linie, welche die Anfärbung der Chromosomen darstellt), welches ein vorläufiges Ergebnis zeigte. Das endgültige Ergebnis wurde manuell nach Interpretation des Ideogramms erstellt, da die Auswertungssoftware charakteristische interchromosomale Unterschiede, eindeutige Trends oder Messungenauigkeiten nur unzureichend bewerten konnte.

- **Fotografie der Metaphasen:**

Für die Fotodokumentation der Objektträger wurde das Axioskop 40FL der Firma Zeiss verwendet (Auflicht- bzw. Durchlichtmikroskop mit Auflicht-Fluoreszenz-Einrichtung). Die Objektträger wurden mit dem Übersichtsobjektiv (10-fache Vergrößerung) meanderförmig nach Metaphasen durchsucht. Jede Metaphase wurde mit dem Ölimmersionsobjektiv (63-fache Vergrößerung) auf Auswertbarkeit hin überprüft. Solche Metaphasen, bei denen ein unvollständiger Chromosomensatz vorlag oder zu viele Chromosomen überkreuzt waren, konnten nicht für die Auswertung verwendet werden. Es wurden maximal sechs nicht vorhandene oder nicht auswertbare Chromosomen pro Metaphase toleriert. Außerdem

mussten die Chromosomen eine kräftige DAPI-Färbung mit dem charakteristischen Bandenmuster aufweisen und durften weder zu groß noch zu klein sein. Mit der Aufricht-Fluoreszenz-Einrichtung konnten die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe mit ihrer individuellen Wellenlänge angeregt werden (DAPI: 330 - 370 nm; FITC: 505 nm; Rhodamin: 580 - 590 nm). Das Mikroskop verfügt über drei Lichtfilter, durch die das emittierte Licht der drei Farbstoffe in ihrem Wellenlängenbereich (DAPI: 450 - 460 nm (blau); FITC: 535 nm (grün); Rhodamin: 615 - 639 nm (rot)) sichtbar wurde. Der DAPI-Filter wurde benutzt, um manuell nach passenden Metaphasen zu suchen. Um ein Foto mit allen Farben zu erhalten, wurden drei Fotos mit den verschiedenen Lichtfiltern gemacht und mit Hilfe der Software ein Dreifarbenbild berechnet. Von jedem angefärbten Objektträger wurden 20 Metaphasen fotografiert.

- Fotobearbeitung:

Aus jeder fotografierten Metaphase wurde mit Hilfe der Bearbeitungssoftware (ISIS FISH Imaging System von Metasystems) ein Karyogramm erstellt. Dazu wurde zuerst die Qualität des Fotos automatisch verbessert (Einstellung von Kontrasten, Helligkeit und Rauschunterdrückung). Der Bereich, in dem sich die Chromosomen befanden, wurde durch das Setzen von Markierungen selektiert und der Hintergrund gelöscht (siehe Abbildung 7). Mit der automatischen Schneidefunktion versuchte die Software, alle Objekte im markierten Bereich einzeln zu erfassen. Artefakte, überkreuzte oder sehr nah aneinanderliegende Chromosomen konnten durch die Software nicht fehlerfrei getrennt werden. Unzureichend oder falsch getrennte Chromosomen wurden mit der manuellen Schneidefunktion separiert (siehe Abbildung 8) und nicht verwertbare Objekte gelöscht. Die verbliebenen Chromosomen wurden durch eine Programmfunktion automatisch in ein Karyogramm vorsortiert (siehe Abbildung 9). Die Zuordnung jedes einzelnen Chromosoms wurde jedoch manuell kontrolliert und korrigiert, da ausschließlich das Bandenmuster der einzelnen Chromosomen, was von der Software nur ansatzweise erkannt wurde, für die Sortierung nach der Nomenklatur für humane Chromosomen relevant war. Das Bandenmuster war am besten zu erkennen, wenn das DAPI-Bild in Graustufen umgewandelt und invertiert wurde (siehe Abbildung 10). Aus den 20 fotografierten Metaphasen eines Tumorpräparats entstanden 20 Karyogramme (siehe Abbildung 11), aus denen die Software das durchschnittliche Verhältnis der Färbung aller Chromosomen berechnete und in einem Ideogramm darstellte. Dadurch wurde gewährleistet, dass Fehler bei der Anfärbung oder Zuordnung von einzelnen Chromosomen nur minimalen Einfluss auf das Ergebnis hatten.

## 2. Material und Methoden

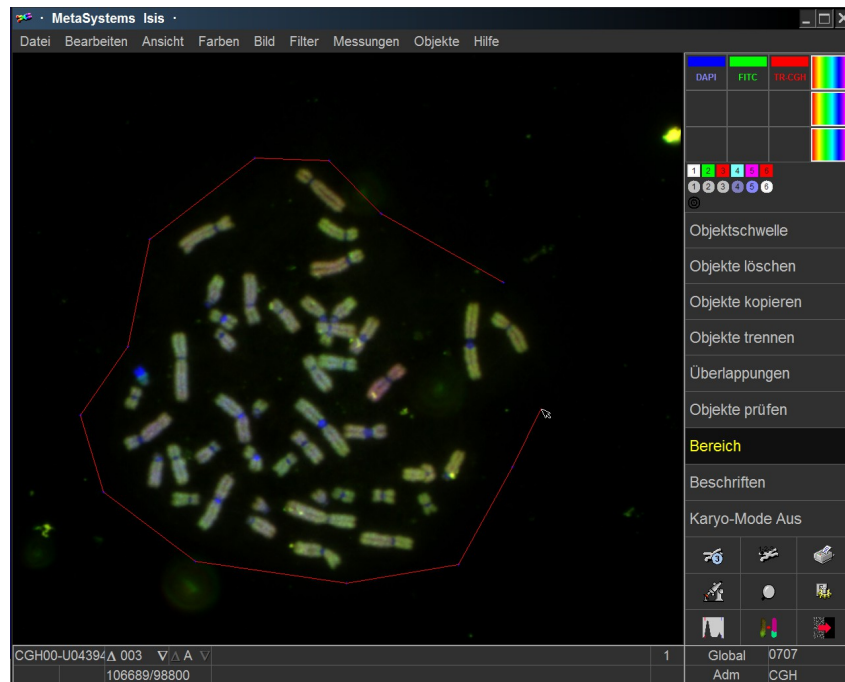


Abbildung 7: Fallbeispiel Bild 1. Der Bereich des Fotos mit der Metaphase wurde markiert und die Umgebung gelöscht.

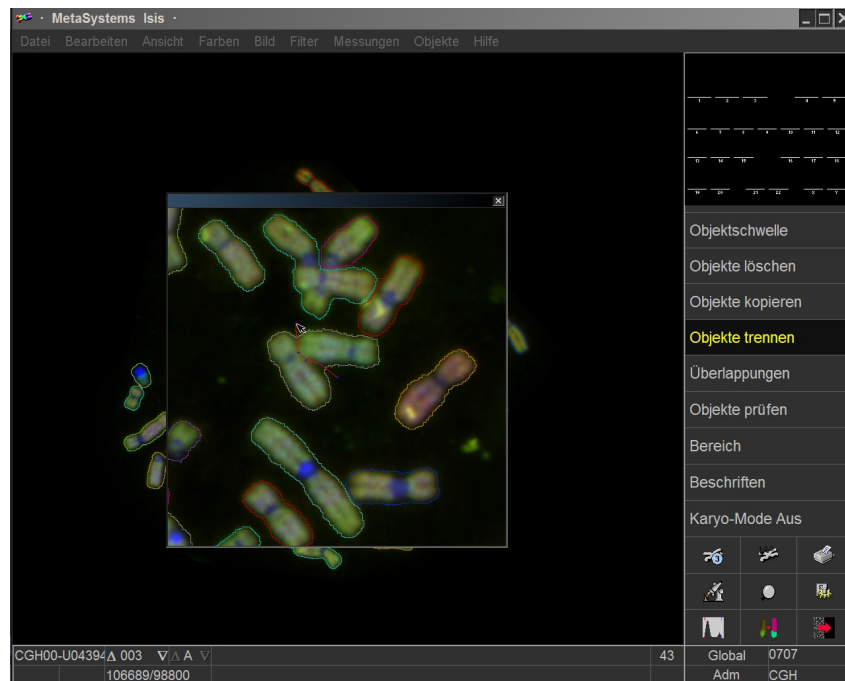


Abbildung 8: Fallbeispiel Bild 2. Trennung von Chromosomen mit der Schneidefunktion. Um Objekte genau trennen zu können, wurde der Bereich mit der Lupenfunktion vergrößert.

## 2. Material und Methoden

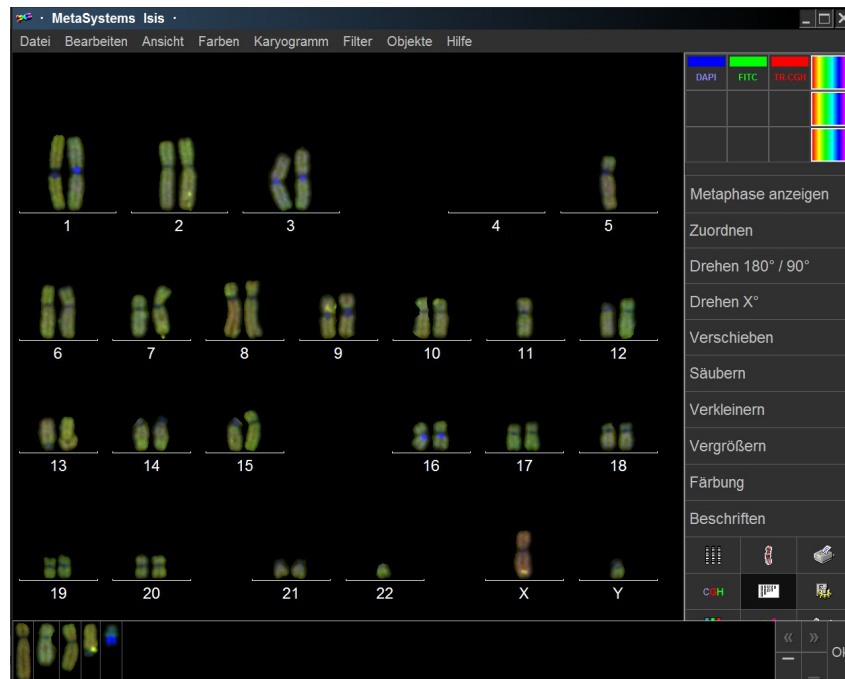


Abbildung 9: Fallbeispiel Bild 3. Automatisch vorsortierte Chromosomen im Karyogramm. Falsch gedrehte, falsch zugeordnete und nicht zugeordnete Chromosomen erforderten eine manuelle Korrektur.

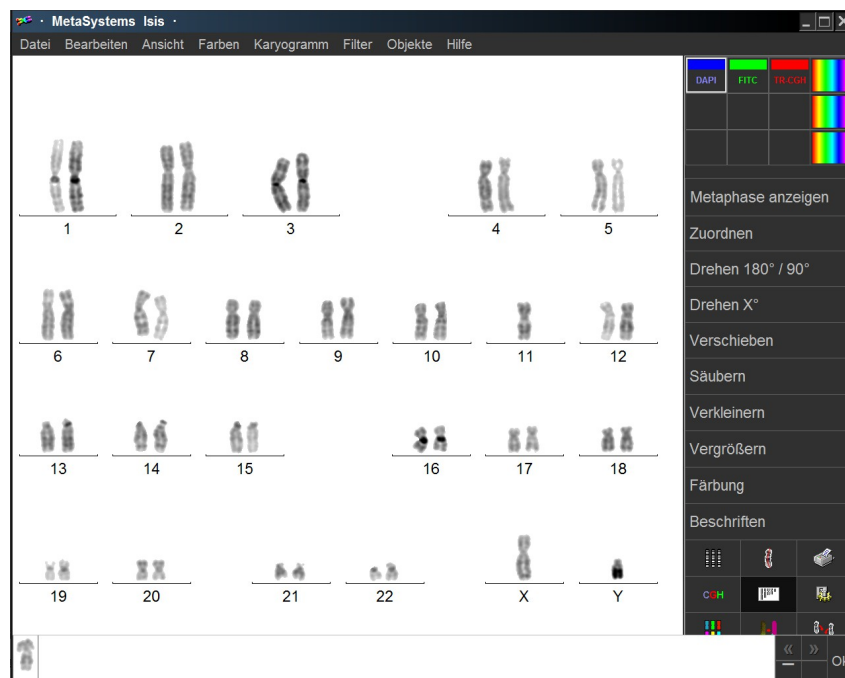


Abbildung 10: Fallbeispiel Bild 4. Darstellung der fertig sortierten Chromosomen in invertierten Graustufen.

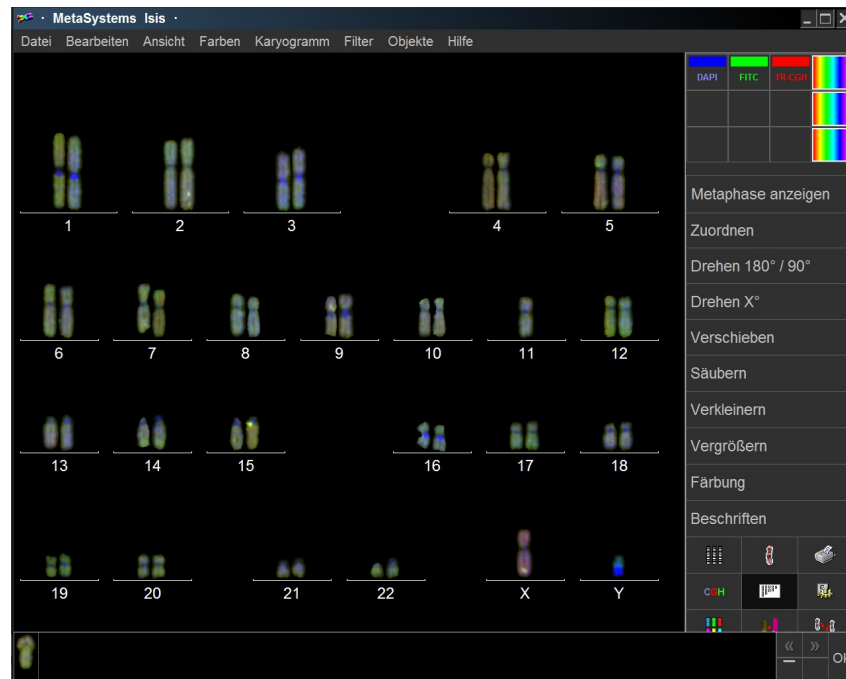


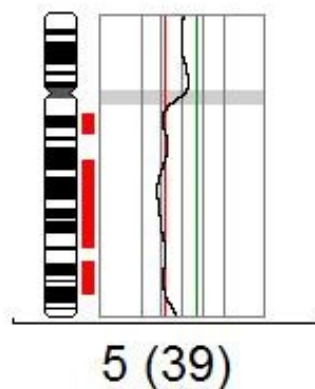
Abbildung 11: Fallbeispiel Bild 5. Nach Abschluss der Sortierung wurden die Chromosomen begradigt und für die Erstellung des Ideogramms abgespeichert.

- Ergebnis der CGH:

Wenn die Tumor-DNS keine Aberrationen enthielt, wurden alle Chromosomen von Tumor- und Referenz-DNS gleichmäßig grün und rot angefärbt (siehe Abbildung 12 und 13). In diesem Fall berechnete die Software entsprechend der Rot-Grün-Färbung im Verhältnis 1:1 einen Ratio-Wert von 1,0. Lag ein DNS-Verlust im Tumorgenom vor, gab es auch keine grün gefärbten DNS-Fragmente, die an der entsprechenden Lokalisation an die Metaphasechromosomen binden konnten und der Abschnitt wurde ausschließlich durch die rot markierte Referenz-DNS gefärbt. Im Fall eines DNS Zugewinns im Tumor lag während der Hybridisierung mehr grün als rot gefärbte homologe DNS vor, so dass vermehrt grün markierte Fragmente an der entsprechenden Lokalisation binden konnten. Im Ideogramm drückte sich der Farbunterschied in veränderten Ratiowerten aus. Überschritt der Ratio-Wert 1,20, wertete das Programm die Veränderung als Zugewinn. Bei Unterschreiten von 0,80 konnte von einem Verlust des entsprechenden DNS-Abschnitts im Tumorgenom ausgegangen werden. Eine Amplifikation wurde durch einen Ratio-Wert über 1,5 definiert. Ein Ratio-Wert von 0,5 lag bei einer Monosomie vor.

## 2. Material und Methoden

Anhand der Gonosomen war es möglich, zu überprüfen, ob die Anfärbung durch CGH funktioniert hatte. Angepasst an das Geschlecht des Tumorpatienten wurde jeweils gegengeschlechtliche Referenz-DNS für die CGH verwendet. Das unterschiedliche Verhältnis der Gonosomen in Tumor- und Referenz-DNS äußerte sich in einer intensiven Färbung der entsprechenden Metaphasechromosomen. Das Tumorgenom einer Frau enthielt gegenüber männlicher Referenz-DNS die doppelte Menge X-Chromosome, jedoch kein Y-Chromosom. Hatte die CGH fehlerfrei funktioniert, dann war das X-Chromosom der Metaphasechromosomen intensiv grün gefärbt und das Y-Chromosom leuchtete rot. Wurde männliche Tumor-DNS und weibliche Referenz-DNS verwendet, dann war ein rot leuchtendes X-Chromosom und ein grün leuchtendes Y-Chromosom der Indikator für eine erfolgreich durchgeführte CGH.



*Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung der Färbung von Chromosom 5 im Ideogramm. Neben der Numerierung steht eingeklammert die Anzahl der Chromosomen, die aus den 20 fotografierten Metaphasen auswertbar waren und deren durchschnittliche Anfärbung berechnet wurde. Neben dem Bandenmuster des Chromosoms ist die gemittelte Färbung und damit die Rot-Grün-Ratio durch eine Kurve dargestellt. Die vertikalen Linien zeigen die Ratiowerte an. Die zentrale graue Linie zeigt den Ratiowert 1,0 an. Die rote Linie steht für den Ratiowert 0,8, die grüne für den Wert 1,2. Die beiden äußeren grauen Linien stehen für die Ratiowerte 0,5 und 1,5. Überschreitet die Kurve die rote oder grüne Linie, wird ein roter bzw. grüner Balken für die entsprechenden Bereiche angezeigt.*

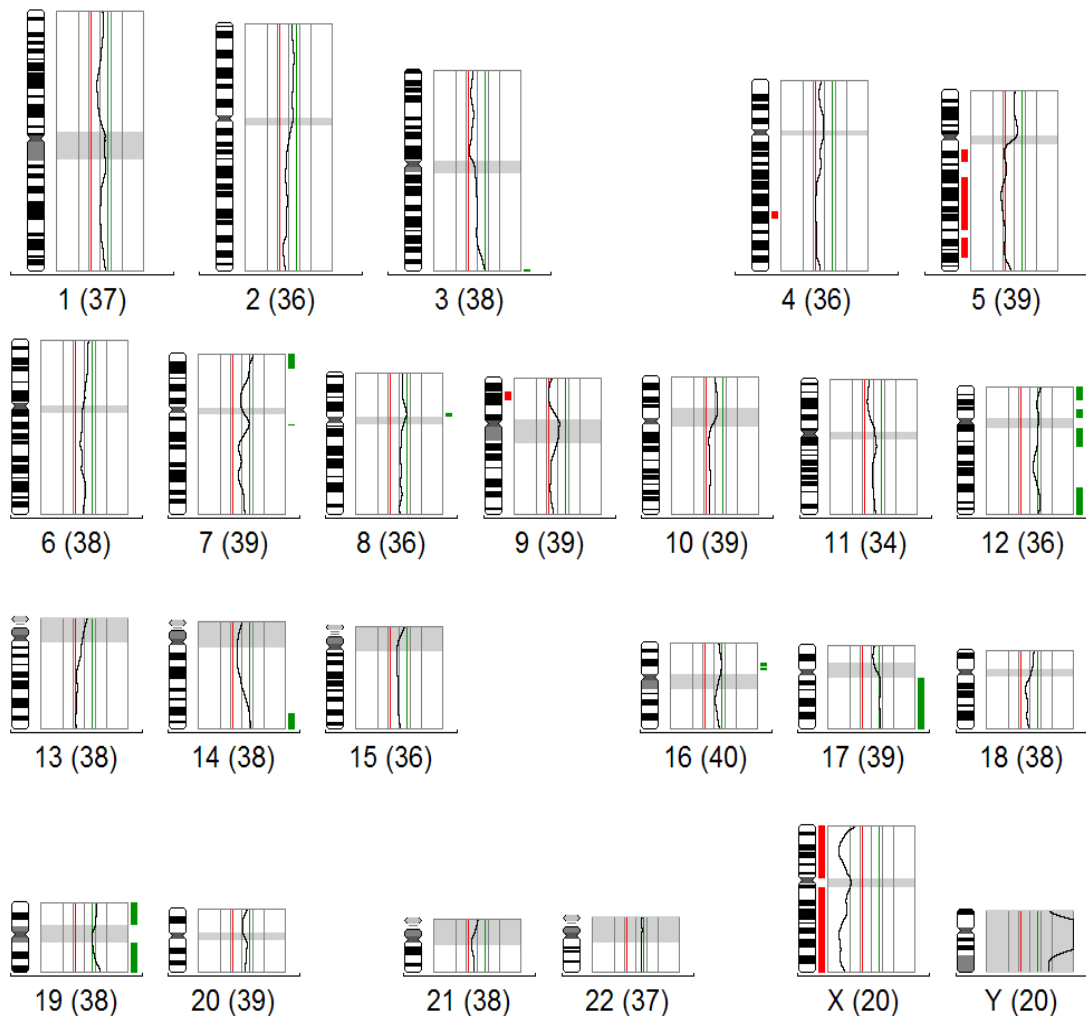


Abbildung 13: Beispielfhafte Darstellung des Ideogramms von Patient Nr. 33. Abgebildet sind alle 22 Autosomen und die 2 Gonosomen mit ihren individuellen Bandenmustern. Im Beispiel liegt eine überschwellig starke Grünfärbung auf den Chromosomen 3q, 7p, 7q, 8p, 12p, 12q, 14q, 16p, 17q, 19p und 19q vor. Auf den Chromosomen 4q, 5q, 9p wurden überschwellig starke Rotfärbungen detektiert. Die Färbung des X-Chromosoms unterschreitet konstant den Ratiowert 0,5, was darauf hindeutet, dass es sich bei dem Patienten um einen Mann handelt.

- Interpretation:

Das Ergebnis, das die Software in Form eines Ideogramms für jeden Tumor berechnet hatte, wurde erst nach einer Interpretation abschließend festgelegt und für die weitere Auswertung abgespeichert. Die Interpretation wurde von einem Team durchgeführt, dem ein CGH-erfahrener Facharzt und die für die CGH zuständige MTA angehörten. In die Bewertung des Ideogramms mussten die typischen methodenbedingten Abweichungen einbezogen werden.

So wurden die Telomer- und Zentromerregionen der Chromosomen und die p-Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21, 22 und Y nicht beurteilt. Mit Vorsicht wurden Veränderungen auf 1p32pter, 16p,19 und 22 beurteilt, da hier methodenbedingte Fehler beschrieben wurden [Kallioniemi OP et al. 1994; Kirchhoff et al. 1998]. Das abschließende Ergebnis wurde nach den Regeln der internationalen Nomenklatur für Zytogenetik nach Mitelman (1995) beschrieben und in der Datenbank gespeichert. Die ermittelten Aberrationen wurden für die statistische Auswertung vereinfacht und auf den betroffenen Chromosomenarm bezogen. Dieses Vorgehen ermöglichte die Berechnung von onkogenetischen Bäumen.

### 2.4 Statistische Methoden

- Mann-Whitney-U-Test:  
Der Test wurde verwendet, um die Parameter Alter, pT, pN, „Grading“, UICC-Stadium, Zugewinne, Verluste und Amplifikationen der beiden Tumorentitäten miteinander zu vergleichen.
- Fishers exakter Test:  
Mit Fishers exaktem Test wurde die Geschlechterverteilung zwischen den beiden Tumorentitäten untersucht. Außerdem wurde die Häufigkeit der Aberrationen zwischen zwei Gruppen mit Hilfe des Tests verglichen.
- Adjustierung der p-Werte:  
Beim Vergleich der Veränderungen auf den Chromosomenarmen zwischen zwei Gruppen wurde Fishers exakter Test durchgeführt. Je häufiger man diesen Test durchführt, desto wahrscheinlicher ist es jedoch, dass ein signifikantes Ereignis allein auf Zufall beruht. Um die Aussagekraft dieser Tests auch bei häufiger Durchführung zu erhalten, wurden die p-Werte mit Hilfe der FDR („False Discovery Rate“) adjustiert. Dadurch stiegen die p-Werte an und eine Zunahme von falsch positiven Ergebnissen, wurde verhindert.
- Kaplan-Meier-Kurve:  
Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten wurde in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.



- Logrank-Test:

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten von Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten wurden mit dem Logrank-Test verglichen.

- Maximum-Likelihood-Methode:

Die Entstehung von chromosomalen Aberrationen und die Entwicklung eines Tumors laufen bis zum Zeitpunkt der Diagnose unbeobachtet ab. Für das Verständnis der Tumorigenese ist es aber von besonderem Interesse, zu verstehen, unter welchen Bedingungen und zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung sich einzelne Mutationen im Genom manifestieren. Die Grundidee der onkogenetischen Bäume, die mit einem Algorithmus auf Basis der „Maximum-Likelihood-Methode“ nach von Heydebreck et al. (2004) berechnet werden, ist es, das Genom von vielen Tumoren einer Entität zu untersuchen, die sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden und den Zustand des Genoms zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorigenese sichtbar machen. Durch die Berechnung kann der Zeitpunkt der Entstehung einer Aberration gegenüber anderen Aberrationen eingeordnet werden. Die Darstellung der Aberrationen in onkogenetischen Bäumen lässt außerdem Schlüsse über die genetischen Veränderungen zu, die für das Entstehen einer Aberration notwendig sind.

Die Wurzel des Baumes steht für eine gesunde Zelle mit unverändertem Genom. Jede Aufgabelung entspricht einem unsichtbaren Prozess im Zellinneren, der Ausgangspunkt für eine Sequenz von Mutationen ist, welche die Tumorzelle charakterisieren. Liegt der Punkt auf dem Ast einer genetischen Aberration nah an der Wurzel, dann handelt es sich um eine häufige Mutation. Je häufiger zwei Aberrationen zusammen auftreten, desto später verzweigen sich ihre Äste. Gruppen von Aberrationen, die eng miteinander assoziiert sind und deren Äste sich erst spät verzweigen, werden als Cluster bezeichnet [Gunawan et al. 2007]. Um Fehler in den Bäumen zu vermeiden und die Cluster hervorzuheben, die den Großteil der Tumoren charakterisieren, wurden nur genetische Veränderungen einbezogen, die in mehr als 20 % der Tumoren zu finden waren.

Als Signifikanzniveau wurde für alle Tests  $\alpha = 5 \%$  festgelegt. Alle Analysen wurden mit der frei verfügbaren Software R (Version 2.8, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Epidemiologie

#### 3.1.1 Gesamtkollektiv

Das dieser Studie zu grunde liegende Gesamtkollektiv wurde von 237 an Lungenkrebs erkrankten Patienten gebildet, die in kurativer Intention operiert wurden und deren Tumoren histologisch als Adeno- oder Plattenepithelkarzinom klassifiziert wurden.

Von den 162 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen waren 16 weiblich (10 %) und 146 männlich (90 %). Der Anteil der Frauen war bei den 75 Adenokarzinompatienten mit 23 % höher als bei den Patienten mit Plattenepithelkarzinomen (siehe Tabelle 33). Neben 17 Frauen wurden 58 Männer (77 %) mit Adenokarzinomen erfasst.

Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation unterschied sich zwischen den beiden Entitäten nicht. Adeno- genauso wie Plattenepithelkarzinompatienten waren durchschnittlich 64,9 Jahre alt. Bei beiden Entitäten waren die weiblichen Patienten jedoch jünger als die männlichen. Mit durchschnittlich 59,7 Jahren waren die Frauen, die an einem Adenokarzinom litten, fast 7 Jahre jünger als die Männer mit einem Alter von 66,4 Jahren. Mit einem Durchschnittsalter von 59,3 Jahren waren die Frauen, die an einem Plattenepithelkarzinom operiert wurden, ungefähr 6 Jahre jünger als die operierten Männer (65,6 Jahre).

Die Tabelle 34 zeigt die Verteilung der Patienten auf die verschiedenen UICC-Stadien. Postoperativ wurden 5 % der Patienten in die Stadien IIIb und IV eingeteilt. Bei 2 % der Patienten war es nicht möglich, das Stadium zu bestimmen, so dass sie ins Stadium x eingeteilt wurden. Die verbleibenden 93 % der Patienten verteilten sich auf die Stadien Ia – IIIa.

Die Überlebenszeit aller Patienten wurde nach Tumorentitäten getrennt in einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meier dargestellt (siehe Abbildung 14). Patienten, die innerhalb von 90 Tagen nach der Operation verstarben, gingen als zensierte Daten in die Kurve ein. Insgesamt gingen die Daten von 51 Patienten, für deren Tod nicht primär die Krebserkrankung verantwortlich war, und 106 Patienten, die zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung noch lebten, als zensiert in die Kurve ein.

### 3. Ergebnisse

Die Adenokarzinompatienten erreichten eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 41 % und eine mediane Überlebenszeit von 58 Monaten. Die Plattenepithelkarzinompatienten hatten eine höhere 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 57 % und eine mediane Überlebenszeit von 83 Monaten. Statistisch gesehen unterschied sich die Überlebensrate der Patienten beider Tumorentitäten jedoch nicht signifikant ( $p = 0,49$ ).

Entität	Gesamtkollektiv (n = 237)	
	Adenokarzinome (n = 75)	Plattenepithelkarzinome (n = 162)
<b>Geschlecht</b>	♀ n = 17 (23 %) ♂ n = 58 (77 %)	♀ n = 16 (10 %) ♂ n = 146 (90 %)
<b>Durchschnittsalter</b>	Ø = 64,9	Ø = 64,9
<b>in Jahren</b>	♀ Ø = 59,7 ♂ Ø = 66,4	♀ Ø = 59,3 ♂ Ø = 65,6

*Tabelle 33: Verteilung der Patienten des Gesamtkollektivs auf Entitäten und Geschlechter. Für die einzelnen Gruppen ist das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation angegeben.*

UICC-Stadium	Patientenzahl	
	absolut	relativ
IA	57	24 %
IB	71	30 %
IIA	13	5 %
IIB	36	15 %
IIIA	44	19 %
IIIB	8	3 %
IV	4	2 %
x	4	2 %

*Tabelle 34: Verteilung der Patienten des Gesamtkollektivs auf die UICC-Stadien.*

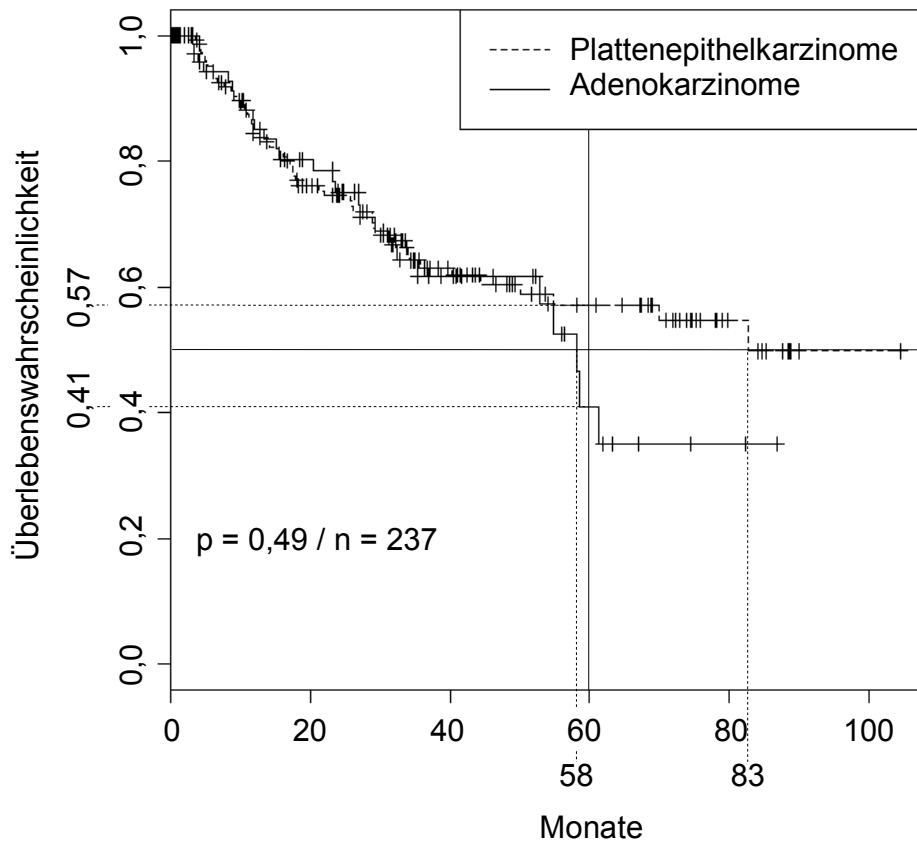


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtkollektivs. Zensierte Daten wurden durch senkrechte Striche markiert. Die mediane Überlebenszeit und die 5-Jahres-Überlebensrate der beiden Patientengruppen sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet.

### 3.1.2 CGH-Kollektiv

80 Patienten wurden als Kurz- oder Langzeitüberlebende identifiziert. Das Tumorgewebe dieser Patienten wurde mit der komparativen genomischen Hybridisierung untersucht.

Histologisch waren 25 der Tumoren Adenokarzinome und 55 Plattenepithelkarzinome (siehe Tabelle 35).

Mit 24 % war der Anteil der Frauen in der Gruppe der Adenokarzinompatienten höher als bei den Patienten mit Plattenepithelkarzinomen (9 %). Das Durchschnittsalter der Patienten mit Adenokarzinomen war mit 65,5 Jahren geringfügig niedriger als bei den Plattenepithelkarzinompatienten (65,8 Jahre).

### 3. Ergebnisse

Das durchschnittliche Alter der an einem Adenokarzinom erkrankten Frauen war, wie schon im Gesamtkollektiv, mit 63,5 Jahren niedriger als das der männlichen Patienten (66,1 Jahre). In der Gruppe der Plattenepithelkarzinompatienten waren die Frauen mit durchschnittlich 60,4 Jahren fast 6 Jahre jünger als die Männer mit 66,3 Jahren.

Die Verteilung der Patienten auf die verschiedenen UICC-Stadien ist in Tabelle 36 angegeben. Der Großteil (97 %) der Patienten war auf die Stadien Ia – IIIa verteilt. Die übrigen 2 Patienten (3 %) waren im Stadium IIIb, so dass kein Patient im Stadium IV oder x mit der CGH untersucht wurde.

Entität	CGH-Kollektiv (n = 80)			
	Adenokarzinome (n = 25)		Plattenepithelkarzinome (n = 55)	
<b>Geschlecht</b>	♀ n = 6 (24 %)	♂ n = 19 (76 %)	♀ n = 5 (9 %)	♂ n = 50 (91 %)
<b>Durchschnittsalter in Jahren</b>	Ø = 65,5		Ø = 65,8	
	♀ Ø = 63,5	♂ Ø = 66,1	♀ Ø = 60,4	♂ Ø = 66,3

*Tabelle 35: Verteilung der Patienten des CGH-Kollektivs auf Entitäten und Geschlechter. Für die einzelnen Gruppen ist das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation angegeben.*

UICC-Stadium	Patientenzahl	
	absolut	relativ
IA	16	20 %
IB	25	31 %
IIA	8	10 %
IIB	18	23 %
IIIA	11	14 %
IIIB	2	3 %
IV	0	0 %
x	0	0 %

*Tabelle 36: Verteilung der Patienten des CGH-Kollektivs auf die UICC-Stadien.*

## **3.2 CGH-Ergebnisse**

Die Genome von 80 verschiedenen Tumoren wurde mit der CGH untersucht, die Ergebnisse interpretiert und in einer relationalen Datenbank gespeichert. Im Tumorgenom von 66 Patienten konnten chromosomale Aberrationen gefunden werden. Bei 14 Tumoren konnte trotz wiederholter Durchführung keine Veränderung im Genom festgestellt werden.

Einschließlich der Wiederholungen wurden 94 CGH-Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden 1.880 angefärbte Metaphasen fotografiert und bearbeitet. Aus den Fotos wurden 86.480 Chromosomen ausgeschnitten und anhand des individuellen Bandenmusters in Karyogramme einsortiert. Die Färbung der Chromosomen wurde mit Hilfe der Bearbeitungssoftware gemessen und in Ideogrammen dargestellt. Nach der Interpretation der Ideogramme wurden die bandengenauen genetischen Veränderungen der Tumoren in der Datenbank gespeichert (siehe Tabelle 45 und 46 im Anhang).

### **3.2.1 CGH-Ergebnisse der Adenokarzinome**

In der Gruppe der Adenokarzinome wurden bei 21 Tumoren (84 %) chromosomale Aberrationen gefunden. Bei 4 Tumoren (16 %) zeigten sich keine Veränderungen im Genom.

Die beiden häufigsten Aberrationen, die in den Adenokarzinomen gefunden wurden, sind Zugewinne auf 1q und auf 8q (siehe Tabelle 37). Fast die Hälfte (48 % bzw. 44 %) aller Adenokarzinome zeigte diese Veränderungen. Zugewinne auf 5p wurden in 8 Tumoren (32 %) detektiert. Verluste auf 6q und Zugewinne auf 17q waren jeweils im Genom von 24 % der Adenokarzinome vorhanden. Zugewinne auf 16p wurden in 5 Tumoren (20 %) gefunden.

Insgesamt wurden 51 verschiedene Aberrationen im Genom der Adenokarzinome detektiert.

Mit Ausnahme der genannten Veränderungen traten sie jedoch nur in weniger als 20 % der Fälle auf (siehe Tabelle 47 im Anhang).

Außer dem X-Chromosom waren alle Chromosomen in mindestens einem Tumor von einer Aberration betroffen.

<b>Adenokarzinome</b>		
<b>Chromosomale Aberration</b>	<b>Häufigkeit</b>	
	<b>absolut</b>	<b>relativ</b>
1q+	12	48 %
2p+	3	12 %
5p+	8	32 %
5q+	3	12 %
6p+	4	16 %
6q-	6	24 %
8p-	4	16 %
8p+	3	12 %
8q+	11	44 %
9p-	4	16 %
9q-	3	12 %
12p+	4	16 %
16p+	5	20 %
17q+	6	24 %
18q-	4	16 %

*Tabelle 37: Liste der häufigsten Aberrationen im Genom der Adenokarzinome.*

### **3.2.2 CGH-Ergebnisse der Plattenepithelkarzinome**

Von den 55 untersuchten Plattenepithelkarzinomen wiesen 45 Tumoren (82 %) Aberrationen im Genom auf. Bei 10 Tumoren (18 %) wurden keine genomischen Veränderung detektiert.

Die häufigste Aberration in Plattenepithelkarzinomen war ein Zugewinn auf 3q, der in 32 Fällen und damit in über der Hälfte der Tumoren (58 %) gefunden wurde (siehe Tabelle 38). Ebenfalls auf dem 3. Chromosom lag die zweithäufigste genomische Veränderung. Verluste auf dem p-Arm des Chromosoms wurden in 24 Tumoren (44 %) festgestellt. In 35 % der Tumoren traten Verluste von 13q auf.

Insgesamt waren 16 Aberrationen mit einer Häufigkeit von mindestens 20 % im Genom der Plattenepithelkarzinome vertreten.

Die 45 Tumoren mit genomischen Veränderungen zeigten insgesamt 71 unterschiedliche Aberrationen, von denen alle Chromosomen in mindestens einem Fall betroffen waren (siehe Tabelle 47 im Anhang).

Plattenepithelkarzinome		
Chromosomale Aberration	Häufigkeit	
	absolut	relativ
1q+	15	27 %
2p+	16	29 %
3p-	24	44 %
3q+	32	58 %
4p-	11	20 %
4q-	15	27 %
5p+	16	29 %
5q-	16	29 %
7q+	16	29 %
8p-	15	27 %
8q+	13	24 %
9p-	17	31 %
11q+	12	22 %
13q-	19	35 %
18q-	12	22 %

Tabelle 38: Liste der häufigsten Aberrationen im Genom der Plattenepithelkarzinome.

### 3.3 Gruppenvergleiche

#### 3.3.1 Vergleich von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen

Beim Vergleich der klinischen Parameter von Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei Alter, pT, pN, „Grading“, und UICC-Stadium (siehe Tabelle 39). Der Frauenanteil unter den Adenokarzinompatienten war mit 24 % größer als unter den Plattenepithelkarzinompatienten (9 %), der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,15$ ).

Allgemein unterscheiden sich die CGH-Ergebnisse der Tumorentitäten, da im Genom der Plattenepithelkarzinome eine größere Zahl an Zugewinnen, Verlusten, Amplifikationen und



### 3. Ergebnisse

Veränderungen insgesamt gefunden wurde. Nur die Zahl der Amplifikationen war jedoch signifikant höher ( $p = 0,01$ ) als bei den Adenokarzinomen.

Beim Vergleich der chromosomalen Aberrationen zwischen beiden Entitäten fallen Zugewinne auf 3q auf, die signifikant häufiger ( $p = 0,000019$ ) in Plattenepithelkarzinomen (58 %), als in Adenokarzinomen (8 %) vorlagen (siehe Tabelle 40). Auch nach der Adjustierung mittels FDR war dieser Unterschied signifikant ( $p \text{ adj.} = 0,0014$ ).

Verluste auf 3p waren ebenfalls häufiger in Plattenepithelkarzinomen als in Adenokarzinomen. Sie konnten in 44 % der Plattenepithelkarzinome und nur in 8 % der Adenokarzinome gefunden werden. Der Unterschied zeigte nach der Adjustierung jedoch nur einen Trend zur Signifikanz ( $p = 0,0017$ ;  $p \text{ adj.} = 0,062$ ).

Mit 13q-, 4q-, 5q- und 7q+ wurden weitere Aberrationen häufiger bei Plattenepithelkarzinomen als bei Adenokarzinomen detektiert. Nach der Adjustierung waren die Unterschiede der Häufigkeit allerdings nicht signifikant.

12 % der Adenokarzinome wiesen Zugewinne auf 5q auf, wohingegen kein Plattenepithelkarzinom diese Aberration zeigte. Auch die Signifikanz dieses Unterschieds konnte durch die Adjustierung nicht bestätigt werden ( $p = 0,028$ ;  $p \text{ adj.} = 0,41$ ).

Parameter		Adenokarzinome	Plattenepithelkarzinome	p-Wert
<b>Geschlecht männlich</b>	Häufigkeit	19 (76 %)	50 (91 %)	0,15
<b>Alter</b>	Median (Spannweite)	65,8 (45,5 – 81,0)	66,9 (44,4 – 79,3)	0,82
<b>pT</b>		2 (1 - 3)	2 (1 - 4)	0,08
<b>pN</b>		0 (0 - 2)	0 (0 - 2)	0,17
<b>Grading</b>		2 (1 - 3)	2 (2 - 3)	0,43
<b>UICC-Stadium</b>		2 (1 - 5)	2 (1 - 6)	0,65
<b>Zugewinne</b>		3 (0 - 15)	4 (0 - 16)	0,22
<b>Verluste</b>		0 (0 - 8)	2 (0 - 15)	0,07
<b>Amplifikationen</b>		0 (0 - 1)	0 (0 - 6)	<b>0,01</b>
<b>Gesamtveränderungen</b>		4 (0 - 23)	8 (0 - 30)	0,11

Tabelle 39: Vergleich der klinischen Parameter zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten.

### 3. Ergebnisse

Chromosomale Aberration	Adenokarzinome		Plattenepithelkarzinome		p-Wert	Adj. p-Wert
	absolut	relativ	absolut	relativ		
1q+	12	48 %	18	33 %	0,22	0,81
2p+	3	12 %	16	29 %	0,16	0,68
2q-	0	0 %	7	13 %	0,092	0,49
3p-	2	8 %	24	44 %	<b>0,0017</b>	0,062
3q+	2	8 %	32	58 %	<b>0,000019</b>	<b>0,0014</b>
4p-	1	4 %	11	20 %	0,092	0,49
4q-	1	4 %	15	27 %	<b>0,016</b>	0,30
5q-	2	8 %	16	29 %	<b>0,045</b>	0,44
5q+	3	12 %	0	0 %	<b>0,028</b>	0,41
6q-	6	24 %	4	7 %	0,063	0,47
7q+	2	8 %	16	29 %	<b>0,045</b>	0,44
8q+	11	44 %	13	24 %	0,11	0,56
9p-	4	16 %	17	31 %	0,18	0,75
10q-	0	0 %	7	13 %	0,092	0,49
11q+	1	4 %	12	22 %	0,054	0,44
13q-	2	8 %	19	35 %	<b>0,014</b>	0,30
16p+	5	20 %	4	7 %	0,13	0,60
18p+	0	0 %	7	13 %	0,092	0,49
20q+	2	8 %	11	20 %	0,21	0,81
21q-	0	0 %	8	15 %	0,052	0,44

Tabelle 40: Vergleich der Häufigkeit chromosomaler Aberrationen von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen. Die Tabelle zeigt die genetischen Veränderungen, die sich zwischen den Tumorentitäten am stärksten unterscheiden. Die vollständige Tabelle befindet sich im Anhang (Tabelle 48).

### 3.3.2 Vergleich von Kurz- und Langzeitüberlebenden

Um herauszufinden, ob einzelne genomische Aberrationen häufiger bei Kurz- oder Langzeitüberlebenden auftreten, wurden die CGH-Ergebnisse der beiden Gruppen miteinander verglichen.

Dabei zeigte sich, dass Zugewinne auf dem Chromosomenarm 12q häufiger bei Kurzzeitüberlebenden anzutreffen waren (siehe Tabelle 41). Nach der Adjustierung war der Unterschied jedoch nicht signifikant ( $p = 0,03$ ;  $p \text{ adj.} = 0,91$ ).

Bei einigen weiteren Aberrationen waren Häufungen zu erkennen. Zugewinne auf 1q und 5p waren jeweils bei 16 Langzeitüberlebenden (40 %) und gleichzeitig nur bei 3 Kurzzeitüberlebenden zu finden (15,8 %). Die Relevanz dieser Verteilung konnte statistisch jedoch nicht bestätigt werden ( $p = 0,08$ ;  $p \text{ adj.} = 0,91$ ). Verluste auf dem Chromosomenarm 18q waren mit 27,5 % häufiger im Genom von Langzeitüberlebenden als von Kurzzeitüberlebenden (5,3 %) entstanden. In fast gleicher Häufigkeit überwogen Zugewinne auf dem Chromosomenarm 7q, die mit 25 % im Vergleich zu 5,3 % häufiger im Genom von Langzeitüberlebenden detektiert wurden. Die Unterschiede von 18q- und 7q+ waren jedoch ebenfalls nicht signifikant.

Chromosomale Aberration	Kurzzeitüberlebende mit Aberration		Langzeitüberlebende mit Aberration		p-Wert	Adj. p-Wert
	absolut	relativ	absolut	relativ		
1p+	2	10,5 %	0	0 %	0,1	0,91
1q+	3	15,8 %	16	40 %	0,08	0,91
5p+	3	15,8 %	16	40 %	0,08	0,91
6q+	3	15,8 %	1	2,5 %	0,09	0,91
7q+	1	5,3 %	10	25 %	0,09	0,91
12q+	5	26,3 %	2	5 %	<b>0,03</b>	0,91
18q-	1	5,3 %	11	27,5 %	0,08	0,91

*Tabelle 41: Statistischer Vergleich der chromosomalen Aberrationen von Kurz- und Langzeitüberlebenden. Aufgeführt sind die Aberrationen, die sich zwischen den beiden Gruppen am stärksten unterschieden. Den Vergleich aller Aberrationen zeigt Tabelle 49 im Anhang.*

### 3.4 Auswirkungen einzelner Aberrationen auf die Überlebenszeit

Um die Frage beantworten zu können, ob einzelne Aberrationen ein kürzeres oder längeres Überleben des Patienten verursachen, wurde überprüft, ob sich die 5-Jahres-Überlebensrate aller Patienten mit einer chromosomalen Aberration von der Überlebensrate aller anderen Patienten unterscheidet (siehe Tabelle 42).

Die chromosomalen Veränderungen 5p-, 7q-, 19p- und 19q- waren mit einem signifikant verlängerten Überleben assoziiert. Nach der Adjustierung war der Überlebensvorteil jedoch nur noch für Verluste auf 5p und 7q signifikant. Außerdem ist zu beachten, dass die genannten Veränderungen jeweils nur in einem Tumor auftraten.

### 3. Ergebnisse

Die Aberrationen 1p+ und 20p- wurden in 3 bzw. 2 Tumoren detektiert und waren mit einem verlängerten Überleben assoziiert ( $p = 0,01$ ;  $p \text{ adj.} > 0,05$ ). Die in 9 Tumorgenomen gefundenen Zugewinne auf 12q waren mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert (25 % 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit). Diese Häufung zeigte eine Tendenz zur Signifikanz, die nach der Adjustierung jedoch nicht bestätigt wurde ( $p = 0,06$ ;  $p \text{ adj.} = 0,64$ ). Patienten, in deren Tumorgenom die häufigen Veränderungen 5p+ (22 Fälle) und 1q+ (24 Fälle) gefunden wurden, hatten mit 61,9 % bzw. 60,9 % eine höhere 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit als die Vergleichsgruppen (43,2 % und 42,9 %). Dieser Unterschied im Überleben war jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Weitere auffällige Aberrationen waren die häufigen Veränderungen 4q- und 17q+, die im Vergleich zum Kollektiv eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit zeigten, allerdings ohne dabei das Signifikanzniveau zu erreichen.

Chromosomale Aberration	Fälle ohne Aberration	Fälle mit Aberration	5-JÜ ohne Aberration	5-JÜ mit Aberration	p-Wert	Adj. p-Wert
1p+	67	3	51,1 %	100 %	<b>0,01</b>	0,13
1q+	46	24	42,9 %	60,9 %	0,14	0,74
4q-	55	15	53,3 %	33,3 %	0,1	0,74
5p-	69	1	49,6 %	100 %	<b>0,0001</b>	<b>0,0037</b>
5p+	48	22	43,2 %	61,9 %	0,07	0,67
7q-	69	1	49,6 %	100 %	<b>0,0001</b>	<b>0,0037</b>
11q+	59	11	45,3 %	70 %	0,15	0,74
12q+	61	9	52 %	25 %	0,06	0,64
17q+	59	11	53,1 %	27,3 %	0,14	0,74
19p-	69	1	49,6 %	100 %	<b>0,02</b>	0,24
19q-	69	1	49,6 %	100 %	<b>0,02</b>	0,24
20p-	68	2	50,3 %	100 %	<b>0,01</b>	0,13
20p+	64	6	51,2 %	20 %	0,17	0,74
21q+	68	2	50,4 %	50 %	0,11	0,74

Tabelle 42: Auszug aus der Korrelation von Einzelarmveränderungen mit der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit. Die vollständigen Daten sind in Tabelle 50 im Anhang aufgeführt.

### 3.5 Onkogenetische Bäume

In die Berechnung der onkogenetischen Bäume wurden alle Aberrationen einbezogen, die mit einer Häufigkeit von über 20 % in den Tumoren einer Entität gefunden wurden. Dieses Kriterium wurde von 5 Aberrationen der Adenokarzinome und von 14 Aberrationen in der Gruppe der Plattenepithelkarzinome erfüllt.

Im onkogenetischen Baum der Adenokarzinome stellen sich die Aberrationen in Form von 3 Ästen dar (siehe Abbildung 15). 5p+ liegt isoliert als Einzelast vor, während die anderen beiden Äste aus je 2 Aberrationen gebildet werden. Dabei ist die früh auftretende Aberration 1q+ mit 6q- und die ebenfalls früh auftretende Aberration 8q+ mit 17q+ assoziiert.

Der onkogenetische Baum der Plattenepithelkarzinome ist wegen der größeren Zahl von häufigen Aberrationen komplexer als der Baum der Adenokarzinome (siehe Abbildung 16). Die genetischen Veränderungen verteilen sich ebenfalls auf 3 Äste, die allerdings feiner verzweigt sind.

Ein Ast wird, wie schon bei den Adenokarzinomen beobachtet, von 5p+ gebildet. Die Zugewinne auf 5p treten hier gemeinsam mit Zugewinnen auf 2p auf.

Der 2. Ast zeichnet sich dadurch aus, dass sich 13q- und 8p- frühzeitig separieren. Nachdem sich auch 9p- abspaltet, verbleibt die häufige Aberration 3p-, die eng mit 4q- und 5q- verbunden ist.

Im 3. Ast trennt sich die Aberration 1q+ frühzeitig ab. Übrig bleibt die am häufigsten aufgetretene Aberration 3q+, die mit 7q+ und 11q+ in einem Zweig sowie mit 18q- und 8q+ in einem weiteren Zweig assoziiert ist.

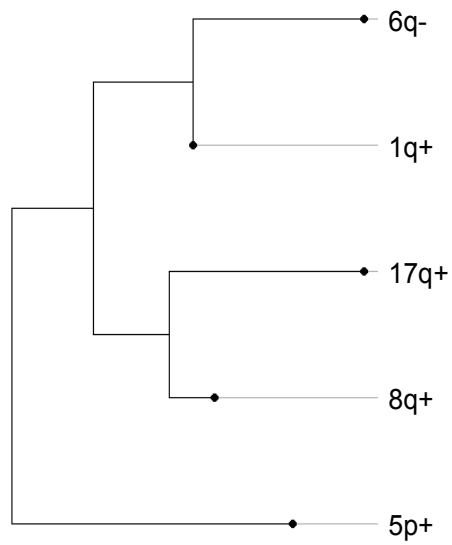


Abbildung 15: Onkogenetischer Baum der Adenokarzinome.

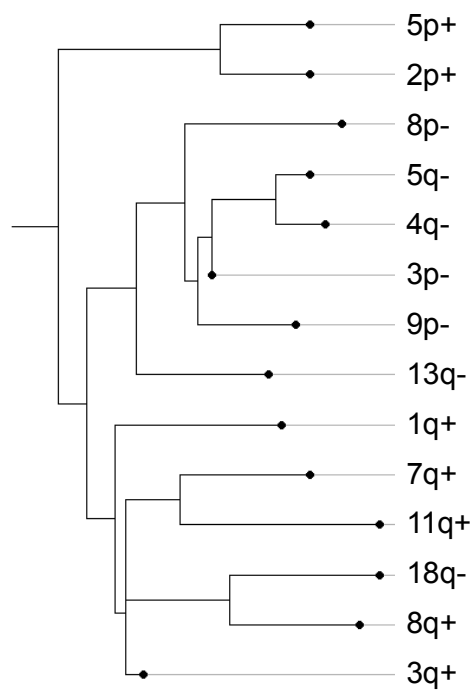


Abbildung 16: Onkogenetischer Baum der Plattenepithelkarzinome.

## 4. Diskussion

### 4.1 Epidemiologie

#### 4.1.1 Gesamtkollektiv

Ziel bei der Rekrutierung des Gesamtkollektivs war es, einen repräsentativen Ausschnitt der Lungenkrebspatienten zu erhalten. Die Beschränkung auf Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten sollte eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Tumoren gewährleisten.

Der Anteil der weiblichen Lungenkrebspatienten lag mit 23 % bei den Adenokarzinompatienten höher als bei den Plattenepithelkarzinompatienten mit 10 %. Dieser Unterschied war jedoch zu erwarten, da Frauen stärker zu Adenokarzinomen als zu Plattenepithelkarzinomen neigen [Brambilla et al. 2001].

Zum Zeitpunkt der Operation betrug das Durchschnittsalter dieses Kollektivs etwa 65 Jahre und lag damit 3 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter in Deutschland [RKI 2006]. Grundsätzlich unterscheidet sich das Gesamtkollektiv dieser Studie von den Lungenkrebspatienten, die der Berechnung des RKI zugrunde lagen, durch die Beschränkung auf Patienten, bei denen eine potenziell kurative Operation durchgeführt wurde. Patienten, die in hohem Alter wegen Multimorbidität, schlechtem Allgemeinzustand oder unzureichender Lungenfunktion nicht operiert werden konnten, wurden also nicht in diese Studie aufgenommen, was das niedrigere Durchschnittsalter erklären könnte.

Bei der Verteilung der Patienten auf die UICC-Stadien fällt das Stadium IIa auf, da dieses Stadium mit nur 13 Patienten (5 %) im Vergleich zu anderen Stadien unterrepräsentiert ist. Nach der verwendeten 6. Edition der TNM-Klassifikation fallen nur die Patienten mit Primärtumoren unter 3 cm Durchmesser in dieses Stadium, die trotz des geringen Tumordurchmessers bereits lymphogene Metastasen aufweisen. Die generell geringe Fallzahl der Patienten, die diese Kriterien erfüllen, wurde bereits von Pfannschmidt et al. (2006) beschrieben und stellt keine Besonderheit dieser Studie dar.

Bei der Darstellung der Überlebenszeiten der Patienten in einer Kaplan-Meier-Kurve wiesen die Adenokarzinompatienten mit 41 % eine geringere 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit auf als die Plattenepithelkarzinompatienten mit 57 %. Dieser Unterschied war statistisch gesehen

jedoch nicht signifikant. Die Bedeutung der Tumorentität für die Prognose der Patienten bleibt weiterhin unklar, da auch in Veröffentlichungen mit großen Patientenkollektiven widersprüchliche Ergebnisse zu finden sind. Van Rens et al. (2000) beschrieben Überlebensvorteile für Plattenepithelkarzinompatienten, wohingegen Goya et al. (2005) signifikant längere Überlebenszeiten für Patienten mit Adenokarzinomen ermittelten.

### **4.1.2 CGH-Kollektiv**

Da Patienten mit der histologisch gleichen Krebserkrankung stark variierende Überlebenszeiten aufweisen, stellte sich die Frage nach der Ursache für den unterschiedlichen klinischen Verlauf. Die Hypothese, dass die Eigenschaften des Tumors und damit der klinische Verlauf größtenteils genetisch determiniert sind, führte zum Konzept dieser Studie. Aufgrund des hohen finanziellen und zeitlichen Aufwands war es nicht möglich, das gesamte Kollektiv mit der CGH zu untersuchen. Die Selektion von Kurz- und Langzeitüberlebenden war die Konsequenz der Hypothese, da diese beiden Patientengruppen die größten Unterschiede im klinischen Verhalten der Erkrankung aufwiesen.

Da mit der Laborarbeit begonnen wurde, bevor das Follow-up vollständig abgeschlossen war, bildete sich eine kleine Gruppe von Patienten, deren Tumoren mit der CGH untersucht wurden, die nach der Definition allerdings keine Kurz- oder Langzeitüberlebenden waren. Dieses Mittelfeld stellte jedoch keine Einschränkung der Methode dar, weil alle Patienten, die nach Abschluss des Follow-up als Kurz- oder Langzeitüberlebende identifiziert wurden, der CGH-Untersuchung zugeführt wurden. Für den statistischen Vergleich zwischen Kurz- und Langzeitüberlebenden wurden also wie geplant alle Patienten untersucht, die den beiden Gruppen zugeordnet werden konnten. Darüber hinaus konnten die CGH-Ergebnisse der Patienten aus dem Mittelfeld in die anderen statistischen Auswertungen eingebracht werden.

Durch die Auswahl von Kurz- und Langzeitüberlebenden im CGH-Kollektiv blieb das Durchschnittsalter und die Geschlechterverteilung nahezu konstant. Auch die Verteilung auf die UICC-Stadien änderte sich nur unwesentlich. Die geringe Anzahl von Patienten im Stadium IIa beruhte, wie schon in Abschnitt 4.1.1 diskutiert, auf dem generell kleinen Teil der Lungenkrebspatienten, die in dieses Stadium fallen.



### 4.2 CGH-Ergebnisse

Für den Großteil der untersuchten Patienten konnte mit Hilfe der CGH eine genaue Darstellung über alle quantitativen genomischen Aberrationen im Genom der Tumoren erzeugt werden.

Der relativ hohe zeitliche Aufwand für die Untersuchung rechtfertigt sich, wenn man die CGH mit anderen Analyseverfahren vergleicht. Von der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), bei der mit spezifischen DNS-Sonden zuvor festgelegte DNS-Abschnitte nachgewiesen werden können, unterscheidet sich die CGH, weil mit ihr das gesamte Genom einer Gewebeprobe unspezifisch auf DNS-Verluste und -Zugewinne untersucht wird.

Mit einer konventionellen zytogenetischen Untersuchung, bei der ebenfalls das gesamte Genom einer Zelle untersucht wird, können neben quantitativen Aberrationen auch qualitative Aberrationen wie beispielsweise Translokationen festgestellt werden. Voraussetzung für diese Methode ist jedoch die Kultivierung der zu untersuchenden Zellen. Die CGH hat demgegenüber den großen Vorteil, dass man mit ihr sowohl Frischgewebe als auch paraffinfixiertes Gewebe untersuchen kann. Dadurch war es in dieser Studie möglich, das Tumorgewebe von Patienten zu untersuchen, das bereits bis zu 10 Jahre lang archiviert war.

Ein Nachteil der konventionellen CGH ist die Heterogenität der Gewebeprobe. Verschiedene Zellklone mit verschiedenen genomischen Aberrationen können nebeneinander in einem Tumor vorkommen. Auch können Zellen des körpereigenen Immunsystems, die keine chromosomalen Veränderungen aufweisen, den Tumor infiltrieren. Bei der Untersuchung einer heterogenen Gewebeprobe kann das Ergebnis dadurch verwässert werden. Daher wurde fixiertes Tumorgewebe auch nur mit der CGH untersucht, wenn im korrespondierenden HE-Schnitt eine hohe Dichte an Tumorzellen gefunden wurde. Trotzdem ist die Heterogenität der Gewebeprobe eine mögliche Erklärung dafür, dass bei 14 der 80 Tumoren keine genomische Veränderung gefunden wurde.

Inzwischen wurde mit der Mikrodissektion eine Technik entwickelt, bei der die Tumorzellen einer Gewebeprobe unter dem Mikroskop ausgewählt werden und für die CGH ausschließlich das selektierte Areale verwendet wird. Dadurch wird die Heterogenität der Probe verringert und die Reinheit der Tumor-DNS steigt [Cardoso et al. 2004].

Ziel dieser Studie war es, die chromosomalen Aberrationsmuster zu untersuchen, die eine große Bedeutung für das klinische Verhalten der Bronchialkarzinome haben. Für den Nachweis dieser Art von genomischen Veränderungen ist die CGH sehr gut geeignet, da häufig große Bereiche eines Chromosoms von Zugewinnen oder Verlusten betroffen sind. Nicht selten ist ein ganzes Chromosom betroffen, was zur Folge hat, dass die Zahl der Chromosomen im Genom der

Malignome stark variiert [Petersen 2010]. Um Aberrationen mit der CGH zu erkennen, müssen sie eine Größe von mehreren Megabasenpaaren aufweisen. Das erklärt, warum die Methode zur Beurteilung der Beschaffenheit einzelner Gene ungeeignet ist. In dieser Studie wurden die chromosomalen Aberrationen bandengenau ermittelt. Der größte Teil der gefundenen Zugewinne und Verluste betraf jedoch einen ganzen Chromosomenarm. Bei einem weiteren großen Teil der gefundenen Veränderungen war ein Chromosomenarm mit Ausnahme einiger weniger Banden betroffen und nur ein kleiner Teil der Aberrationen beschränkten sich auf eine Chromosomenbande. Daher wurden in der statistischen Auswertung die Chromosomenarme miteinander verglichen, auf denen Zugewinne oder Verluste gefunden wurden.

### 4.2.1 CGH-Ergebnisse der Adenokarzinome

Die Untersuchung der Adenokarzinome offenbarte 51 verschiedene genomische Veränderungen, von denen 6 mit einer Häufigkeit von mindestens 20 % auftraten. Alle Adenokarzinome, in denen genomische Imbalancen festgestellt wurden, wiesen mindestens eine dieser 6 häufigsten Veränderungen auf. Damit könnten diese Aberrationen grundsätzliche Eigenschaften der Tumoren beeinflussen. Denkbar wäre beispielsweise, dass diese Aberrationen Auswirkungen auf die histologischen Differenzierungsvarianten haben, die sich bei dieser Tumorentität stark unterscheiden.

Um die Relevanz der einzelnen Aberrationen bewerten zu können, wurden die 15 häufigsten Aberrationen mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen (siehe Tabelle 43). Es zeigt sich, dass der Großteil der Ergebnisse von den anderen Studien gestützt wird und die einzelnen Aberrationen in ähnlicher Häufigkeit gefunden werden konnten, obwohl die Zahl der untersuchten Adenokarzinome dieser Studie ( $n = 25$ ) im Verhältnis zu den genannten Studien relativ klein war. Die Reihenfolge der Häufigkeit einzelner Aberrationen und damit ihre Relevanz, wird in den anderen Studien nicht einheitlich beschrieben. Die grundsätzliche Übereinstimmung wird allerdings daran sichtbar, dass die drei häufigsten Aberrationen dieser Studie, auch die drei häufigsten Veränderungen der anderen Studien sind.

Nur die Veränderungen 16p+, 5q+ und 8p+, die in bis zu 20 % der Patienten dieses Kollektivs gefunden wurden, konnten nicht von den anderen Studien bestätigt werden. Fong Y et al. (2010) erwähnen jedoch nur Aberrationen, die in mindestens 25 % der Fälle gefunden wurden. Auch die beiden anderen Studien geben nur Auskunft über häufige und statistisch interessante Aberrationen [Sy et al. 2004; Weir et al. 2007]. Unklar bleibt also, ob diese Aberrationen von den anderen Arbeitsgruppen nicht gefunden wurden oder aufgrund von geringerer Häufigkeit in

der Veröffentlichung nicht erwähnt wurden. Um die Bedeutung dieser Aberrationen zu klären, wäre es wünschenswert, in einer prospektiven Studie neben dem Anteil der Patienten mit häufigen Veränderungen auch den Anteil der Patienten mit seltenen Veränderungen zu erfassen.

<b>Adenokarzinome</b>				
<b>Chromosomale Aberration</b>	<b>Relative Häufigkeit der Aberrationen in %</b>			
	<b>Diese Studie (n = 25)</b>	<b>Weir et al. (n = 371)</b>	<b>Fong Y et al. (n = 77)</b>	<b>Sy et al. (n = 34)</b>
1q+	48	52	39	42
2p+	12	17	-	3
5p+	32	60	43	42
5q+	12	-	-	-
6p+	16	26	29	12
6q-	24	31	-	-
8p-	16	41	35	15
8p+	12	-	-	-
8q+	44	43	35	51
9p-	16	43	27	6
9q-	12	35	34	-
12p+	16	-	-	18
16p+	20	-	-	-
17q+	24	35	-	21
18q-	16	39	-	-

*Tabelle 43: Vergleich der häufigsten chromosomalen Aberrationen der Adenokarzinome mit den Ergebnissen anderer Studien. Modifiziert nach Weir et al. (2007); Fong Y et al. (2010); Sy et al. (2004).*

#### **4.2.2 CGH-Ergebnisse der Plattenepithelkarzinome**

In den 55 untersuchten Plattenepithelkarzinomen wurden 71 verschiedene Aberrationen gefunden, von denen alle Chromosomen in mindestens einem Fall betroffen waren. Diese breite Streuung der chromosomalen Veränderungen deutet darauf hin, dass es eine hohe Instabilität im Genom der Tumoren gibt. Aberrationen, die nur in einzelnen Tumoren vorkommen, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht für die Entwicklung zu Plattenepithelkarzinomen oder für Unterschiede in der Differenzierung verantwortlich, da diese Tumoreigenschaften von einem

großen Teil der Tumoren repräsentiert werden. Vielmehr ist es möglich, dass sich diese unspezifischen Aberrationen im Genom etablieren können, solange sie nicht den Progress des Tumors verhindern. Eine Erklärung für ihr Auftreten könnte die Exposition gegenüber Tabakrauch sein, da die Kanzerogene im Rauch unspezifisch über Jahre auf das gesamte Genom einwirken und die Entstehung von genomischen Veränderungen fördern, wie es für Adenokarzinome beschrieben wurde [Sy et al. 2003].

Neben den unspezifischen Veränderungen wurden 16 aberrierte Chromosomenarme mit einer Häufigkeit von mindestens 20 % in den Plattenepithelkarzinomen gefunden. Um zu zeigen, dass diese Veränderungen im Genom keine zufälligen Häufungen dieser Studie sind, wurden die Veränderungen, wie schon bei den Adenokarzinomen, mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen (siehe Tabelle 44).

In diesem Vergleich konnten die chromosomalen Aberrationen der Plattenepithelkarzinome durch Ergebnisse von Sy et al. (2004) und Boelens et al. (2009) zum großen Teil gestützt werden. Die beiden anderen Studien beziehen sich jedoch auf verhältnismäßig kleine Patientenkollektive. Die Aberrationen auf Chromosom 3 stellten die häufigsten Veränderungen bei Plattenepithelkarzinomen dar und konnten ebenfalls von den anderen Studien bestätigt werden. Insgesamt konnten 14 der 15 häufigsten Aberrationen in mindestens einer der beiden anderen Untersuchungen gefunden werden. Verluste auf 18q wurden jedoch weder von Sy et al. (2004) noch von Boelens et al. (2009) beschrieben.

Auf die Bedeutung der einzelnen Aberrationen wird im Kapitel 4.3 näher eingegangen.

<b>Plattenepithelkarzinome</b>			
<b>Chromosomale Aberration</b>	<b>Relative Häufigkeit der Aberrationen in %</b>		
	<b>Diese Studie (n = 55)</b>	<b>Sy et al. (n = 35)</b>	<b>Boelens et al. (n = 34)</b>
1q+	27	43	-
2p+	29	39	12
3p-	44	25	53
3q+	58	86	94
4p-	20	-	41
4q-	27	29	41
5p+	29	54	53
5q-	29	-	68
7q+	29	43	-
8p-	27	43	41
8q+	24	43	18
9p-	31	29	44
11q+	22	36	-
13q-	35	29	-
18q-	22	-	-

*Tabelle 44: Vergleich der häufigsten chromosomalen Aberrationen der Plattenepithelkarzinome mit den Ergebnissen anderer Studien. Modifiziert nach Sy et al. (2004) und Boelens et al. (2009).*

## 4.3 Gruppenvergleiche

### 4.3.1 Vergleich von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen

Im Vergleich der klinischen Parameter beider Patientengruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Damit waren die Voraussetzung für einen unverfälschten Vergleich der beiden Gruppen gegeben.

Um die Zahl der falsch positiven Ergebnisse zu reduzieren und damit die Validität der Ergebnisse zu erhöhen, wurden die p-Werte mit der FDR adjustiert. Diesen Qualitätsstandard setzten auch Weir et al. (2007) ein, um die Ergebnisse zu beurteilen. Die anderen bereits

erwähnten Studien verzichteten auf ein vergleichbares Vorgehen [Fong Y et al. 2010; Sy et al. 2004; Boelens et al. 2009].

Der Vergleich der genomischen Veränderungen auf den einzelnen Chromosomenarmen zwischen beiden Tumorentitäten ergab bei Plattenepithelkarzinomen signifikant häufiger Zugewinne auf dem Chromosomenarm 3q. Diese Zugewinne wurden bereits von Brass et al. (1996) beschrieben und von weiteren Arbeitsgruppen als Unterscheidungsmerkmal zwischen den Karzinomtypen bestätigt [Petersen et al. 1997; Luk et al. 2001].

Der Ort des Zugewinns wird im Bereich 3q24 – qter beschrieben. Genauer wird vermutet, dass die Veränderung den Tumorprogress beschleunigt, wenn 3q26 einen Zugewinn enthält. Die dieser chromosomalen Veränderung zugrunde liegenden Gene sind vermutlich *hTR* und *SKI-like* [Pelosi et al. 2007]. Das *hTR*-Gen kodiert für die RNS-Untereinheit der menschlichen Telomerase, die in der Tumorigenese nachweislich verstärkt exprimiert wird [Guilleret et al. 2002]. Das *SKI-like*-Gen kodiert für ein Protein, welches Teil der Signalkaskade von TGF- $\beta$  ist [Sarker et al. 2005]. Ein weiteres Gen, welches verdächtigt wird, eine Rolle in der Tumorigenese der Plattenepithelkarzinome zu spielen, ist *PI3K*. In Plattenepithelkarzinomen und ihren Vorläuferläsionen korrelieren die Überexpression des Gens mit den Zugewinnen auf 3q, was die Bedeutung von *PI3K* in der Tumorigenese unterstreicht [Woenkhaus et al. 2002].

Da diese Aberration nur in 8 % der Adenokarzinome, jedoch in 58 % der Plattenepithelkarzinome gefunden wurde, scheint dieser Schritt in der Tumorigenese spezifisch für Plattenepithelkarzinome zu sein. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die beschriebenen Gene zur Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen führen, wenn sie zum Zeitpunkt der malignen Entartung verstärkt exprimiert werden.

Eine weitere Beobachtung im Vergleich von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen dieser Studie ist, dass Plattenepithelkarzinome in 44 % der Fälle Verluste auf 3p aufwiesen. Adenokarzinome hingegen zeigten diese Verluste nur in 8 % der Fälle. Dieser Unterschied war mit einem adjustierten p-Wert von 0,06 knapp nicht signifikant.

Der Verlust auf 3p ist in der Literatur als ein entscheidender Schritt in der Kanzerogenese beschrieben. Grundsätzlich können Verluste auf 3p allerdings in allen Karzinomtypen gefunden werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Verluste auf 3p in Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu Adenokarzinomen häufiger sind und größere Areale des Chromosomenarms betreffen [Wistuba et al. 2000].

Die Erkenntnisse von Wistuba et al. (2000) sind mit den Ergebnisse dieser Studie vereinbar, da Aberrationen, die größere Areale betreffen, leichter mit der CGH gefunden werden. Die Auswirkungen eines Verlustes auf 3p erklären sich wahrscheinlich durch eine Deaktivierung

oder Deletion von Tumorsuppressorgenen, die in diesem Bereich liegen und die Zelle vor Entartung schützen.

Das *FHIT*-Gen, welches in seiner Funktion als Tumorsuppressorgen nicht nur der Tumorigenese entgegenwirkt, fördert darüber hinaus in seiner Abwesenheit die Invasivität und die Aggressivität von Tumoren. Es konnte gezeigt werden, dass bei Inaktivität des *FHIT*-Gens Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) und Vimentin überdurchschnittlich stark exprimiert werden. MMPs können mit ihrer enzymatischen Aktivität die Basalmembran durchbrechen und spielen mit Vimentin, einem Intermediärfilament, eine wesentliche Rolle bei der Migration und der Invasion von malignen Zellen epithelialen Ursprungs [Joannes et al. 2010].

Analog zu den beobachteten Verlusten auf 3p in dieser Studie konnten Croce et al. (1999) einen Verlust der Expression von FHIT signifikant häufiger in Plattenepithelkarzinomen als in Adenokarzinomen detektieren. Der Verlust von FHIT führt allerdings bei beiden Tumorentitäten zu einer signifikant schlechteren Prognose und kommt deshalb zum einen als prognostischer Marker und zum anderen als Ansatz für eine therapeutisches Vorgehen in Frage [Huebner und Croce 2003].

Weitreichende Auswirkungen könnten die Verluste auf 3p in der Region 3p21.3 haben, in der eine Häufung von Genen beschrieben wurde, die der Entstehung von Tumoren entgegenwirken. Unter anderem sind die Tumorsuppressorgene *FUS1*, *SEMA3B* und *SEMA3F* in dieser Bande lokalisiert [Lerman und Minna 2000; Hesson et al. 2007].

Das Tumorsuppressorgen *FUS1* wirkt proapoptotisch und kann die Proliferation von Tumorzellen hemmen. In 82 % aller NSCLC konnte eine geringe oder gar keine Expression des Tumorsuppressorgens festgestellt werden. Im Einklang mit der größeren Zahl an Deletionen auf 3p in den Plattenepithelkarzinomen dieser Studie wurde von Prudkin et al. (2008) eine niedrigere Fus1-Expressionsrate in Plattenepithelkarzinomen als in Adenokarzinomen gefunden. In ersten Versuchen konnte durch die Transfektion von Fus1-Nanopartikeln in NSCLC-Zellen die Expression von Fus1 wieder hergestellt werden, was eine erneute Sensibilität der Zellen gegenüber Thyrosinkinase-Inhibitoren und die Induktion von Apoptose zur Folge hatte [Ji und Roth 2008]. Die Ergebnisse der ersten klinischen Studien werden zeigen, ob dieser Ansatz Anwendung in der Lungenkrebstherapie finden kann.

*SEMA3B* und *SEMA3F* sind ebenfalls Tumorsuppressorgene, die in Plattenepithelkarzinomen unterdurchschnittlich stark exprimiert werden [Fujii et al. 2002]. Eine Erklärung für die niedrige Expressionsrate könnten Deletionen sein, auch wenn in anderen Studien gezeigt wurde, dass neben genetischen auch epigenetische Veränderungen zu einer Inaktivierung dieser Gene führen [Potiron et al. 2009].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass auf den beiden aberrierten Chromosomenarmen, die in dieser Studie häufiger in Plattenepithelkarzinomen als in Adenokarzinomen gefunden wurden, Gene lokalisiert sind, die die Eigenschaften der Tumoren relevant beeinflussen können. Warum diese Aberrationen gehäuft in Plattenepithelkarzinomen vorkommen und bei Adenokarzinomen kaum eine Bedeutung haben, bleibt ungeklärt.

### 4.3.2 Vergleich von Kurz- und Langzeitüberlebenden

Nachdem die Ergebnisse dieses statistischen Vergleichs mit der FDR adjustiert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den Aberrationen von Kurz- und Langzeitüberlebenden. Die Bedeutung der genetischen Veränderungen, die große Unterschiede in den Ergebnissen beider Gruppen aufwiesen ohne dabei das Signifikanzniveau zu erreichen, soll hier trotzdem diskutiert werden.

Zugewinne auf dem Chromosomenarm 12q konnten in dieser Studie häufiger bei Kurzzeitüberlebenden (26,3 %) als bei Langzeitüberlebenden (5 %) gefunden werden ( $p = 0,03$ ;  $p \text{ adj.} = 0,91$ ). Mehrere Arbeitsgruppen konnten die Aberration ebenfalls in malignen Lungentumoren finden [Berrieman et al. 2004; Job et al. 2010].

Das *MDM2*-Gen auf 12q15 wird verdächtigt, für die kurze Überlebenszeit der betroffenen Patienten verantwortlich zu sein [Bernheim et al. 2008; Weir et al. 2007]. Das Genprodukt von *MDM2* steuert die Aktivität von p53. Es blockiert die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor und beschleunigt seinen Abbau [Vassilev et al. 2004]. P53 ist ein wichtiges Tumorsuppressorgen und kann das Tumorwachstum effektiv hemmen. Die Tatsache, dass es in über 50 % aller menschlichen Tumoren inaktiviert ist, unterstreicht seine Bedeutung für die Entwicklung von Tumoren. Diese Inaktivierung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Am häufigsten wird das Gen, das auf 17p13.1 lokalisiert ist, durch direkte Mutation ausgeschaltet. Die Inaktivierung von p53 durch Überexpression seines Antagonisten MDM2 ist jedoch eine weitere Möglichkeit für Krebszellen, sich vor Apoptose zu schützen, und damit Basis für die Entstehung einer Krebserkrankung [Yi 2006]. Allein durch die Reduktion der MDM2-Wirkung könnten diese Zellen wieder zur Apoptose befähigt werden. Dieser Mechanismus ist das Ziel von MDM2-Antagonisten, deren Wirksamkeit zurzeit untersucht wird [Wilkening et al. 2007; Klein und Vassilev 2004].

Ein weiteres Gen, das für die schlechte Prognose der Patienten mit 12q+ verantwortlich sein könnte, ist die *CDK4*. Dieses Gen ist auf 12q14.1 lokalisiert und reguliert den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase. Eine Überexpression der CDK4 konnte von Wu et al. (2011)



in vielen Tumoren beobachtet werden und war mit einem signifikant kürzeren Überleben der Patienten assoziiert. Möglicherweise wurde auch in den Tumoren dieser Studie durch Zugewinne auf 12q die Expression der CDK4 gesteigert und dadurch eine kürzere Überlebenszeit der betroffenen Patienten verursacht.

Welches der beiden Gene bei den Patienten mit Zugewinnen auf 12q in dieser Studie häufiger verändert war und die kurze Überlebenszeit verursachte, ist anhand der Ergebnisse dieser Studie nicht zu klären, da die Expressionsrate der verdächtigen Gene nicht untersucht wurde. Die Frage, ob eines der beiden Gene als prognostische Marker oder Angriffspunkt für neue Therapiestrategien eingesetzt werden könnte, kann ebenfalls erst durch weiterführende Studien beantwortet werden.

Im Vergleich zwischen Kurz- und Langzeitüberlebenden fielen außerdem Zugewinne auf 1q auf, die besonders häufig im Genom von Langzeitüberlebenden (40 %) detektiert wurden und nur in 16 % der Kurzzeitüberlebenden auffindbar waren ( $p = 0,08$ ;  $p \text{ adj.} = 0,91$ ). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre das Vorhandensein von Tumorsuppressorgenen auf 1q, die durch eine verstärkte Expression das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen. Diese Vermutung kann durch andere Studien bisher nicht bestätigt werden. Vielmehr wurden Zugewinne auf 1q mit schlechteren Überlebensraten assoziiert und das Vorhandensein von Onkogenen postuliert [Tai et al. 2004]. Beispielsweise ist das *COX-2*-Gen auf diesem Chromosomenarm lokalisiert und im Fall einer übermäßigen Expression mit einem schlechten Überleben assoziiert [Achiwa et al. 1999]. Um das lange Überleben der Patienten mit Zugewinnen auf 1q in dieser Studie zu erklären, muss man davon ausgehen, dass neben Genen, die mit einer kurzen Überlebenszeit assoziiert sind, auch Gene auf 1q lokalisiert sind, die ein längeres Überleben der Patienten ermöglichen. Da es sich bei 1q um den längsten Chromosomenarm im menschlichen Genom handelt, scheint diese Koinzidenz durchaus möglich zu sein.

Die Aberration 5p+ zeigte ebenfalls eine größere Häufigkeit bei Langzeitüberlebenden. Da die Assoziation von 5p+ mit längerem Überleben noch deutlicher beim Vergleich der Chromosomenarmveränderungen auffiel, wird sie in Abschnitt 4.3.3 diskutiert.

Verluste auf dem Chromosomenarm 18q konnten in 28 % der Langzeitüberlebenden und nur in 5 % der Kurzzeitüberlebenden detektiert werden ( $p = 0,08$ ;  $p \text{ adj.} = 0,91$ ). Nach Erkenntnissen von Weir et al. (2007) handelt es sich bei dieser Aberration generell um ein häufiges Ereignis in malignen Lungentumoren. Die Beobachtung von Pan et al. (2005), dass 18q- besonders häufig bei Adenokarzinomen zu finden ist, kann durch die Ergebnisse dieser

Studie nicht bestätigt werden, da die Verluste in 16 % der Adenokarzinome und sogar in 22 % der Plattenepithelkarzinome aufgetreten sind.

Tan et al. (2003) konnten zeigen, dass die Expression des auf 18q lokalisierten Gens *Cables*, dessen Genprodukt ein Bestandteil des Zellzyklus ist, mit Verlusten auf diesem Chromosomenarm korreliert. Die Expression von *Cables* im Tumorgewebe ging in der Untersuchung von Tan et al. (2003) jedoch nicht mit einer veränderten Überlebenszeit einher.

Mit *BCL-2* liegt ein weiteres Gen auf 18q, das eine Bedeutung in der Entstehung von Lungenkrebs hat. Eine hohe Expressionsrate von *Bcl-2* ging in einer Studie von Martin et al. (2003) mit einer erhöhten Überlebensrate einher.

Warum die in dieser Studie gefundenen Verluste auf 18q jedoch häufiger in Langzeitüberlebenden gefunden wurden, kann weder durch die Funktion von *Cables* noch durch *Bcl-2* erklärt werden. In einer Studie von Fong KM et al. (1995) konnte keine Auswirkung von 18q- auf die Überlebenszeit der untersuchten Patienten festgestellt werden, so dass eine zufällige Häufung in den Ergebnissen dieser Studie nicht ausgeschlossen werden kann.

### **4.4 Auswirkungen einzelner Aberrationen auf die Überlebenszeit**

Beim Vergleich der Überlebenszeit von Patienten, die eine Einzelarmveränderung aufwiesen, mit der Überlebenszeit von Patienten ohne die jeweilige Aberration, zeigte sich, ob die Aberration ein kürzeres oder längeres Überleben der Patienten bewirkte. Verluste auf 5q, 7q, 19p und 19q waren mit einem längeren Überleben assoziiert. Sie wurden jedoch jeweils nur in einem Tumorgenom gefunden. In bis zu 3 Fällen konnten die Aberrationen 1p+, 20p- und 21q+ detektiert werden. Damit waren die genannten Aberrationen nur in weniger als 5 % der Tumorgenome vertreten. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse als Ursache für eine kurze bzw. lange Überlebenszeit der betroffenen Patienten ist dadurch sehr gering. Deshalb werden sie hier nicht diskutiert.

Die Veränderung 12q+ ist im Gegensatz dazu statistisch gesehen interessanter, da sie in den Tumoren von 9 Patienten gefunden wurde, die mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 25 % eine deutlich schlechtere Prognose hatten, als Patienten ohne die Aberration mit 52 % ( $p = 0,06$ ;  $p \text{ adj.} = 0,64$ ). Dies bestätigen auch die Ergebnisse des Vergleichs von Kurz- und Langzeitüberlebenden und unterstreicht die Relevanz dieser Aberration. Die Bedeutung und der Mechanismus, über den sich die Aberration auswirkt, wurden in Abschnitt 4.3.2 diskutiert.

Ein Zugewinn auf 5p lag in 22 Tumorgenomen dieser Studie vor und definiert eine Gruppe, die mit 61,9 % eine höhere 5-Jahres-Überlebensrate hatte als die Fälle ohne 5p+ (43,2 %). Obwohl der Unterschied nicht das Signifikanzniveau erreichte ( $p = 0,07$ ;  $p \text{ adj.} = 0,67$ ) soll eine mögliche Bedeutung dieser Aberration diskutiert werden, da Auswirkungen der Zugewinne auf 5p in der Tumorigenese bereits beschrieben wurden.

5p15.33 ist der Genort der *hTERT*, die für die katalytische Komponente der Telomerase kodiert und in bis zu 80 % der NSCLC überexprimiert wird [Van Dyke et al. 2009]. Es besteht die Vermutung, dass die erhöhte Aktivität des Gens in Tumoren durch die Verlängerung der Telomere zur Unsterblichkeit der Zellen führt [Weir et al. 2007]. Zhu et al. (2006) konnten zeigen, dass die Überexpression der *hTERT* und die Unsterblichkeit der Tumorzellen mit einer niedrigen Überlebensrate der betroffenen Patienten einhergeht. Entgegen der Beobachtung von Zhu et al. (2006) waren Zugewinne auf 5p bei den Patienten dieser Studie mit einem längeren Überleben assoziiert. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in dieser Studie aus Zugewinnen auf 5p keine Überexpression der *hTERT* resultierte, sondern andere Veränderungen auf genetischer Ebene einhergingen. Weitere Zugewinne auf 5p15.31 und 5p14.3 wurden bereits als häufige Aberrationen beschrieben. Die betroffenen Gene und ihre Bedeutung sind aber noch ungeklärt [Weir et al. 2007].

Patienten, deren Tumoren Verluste auf dem Chromosomenarm 4q aufwiesen, hatten mit 33 % eine niedrigere 5-Jahres-Überlebensrate als die Patienten ohne diese Verluste (53,3 %). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Wegen ihrer Bedeutung im onkogenetischen Baum der Plattenepithelkarzinome wird die Aberration jedoch in Abschnitt 4.3.4 diskutiert.

Wie schon beim Vergleich zwischen Kurz- und Langzeitüberlebenden, war die Aberration 1q+ mit einem längeren Überleben der Patienten assoziiert. Der Unterschied zwischen der Überlebenszeit von Patienten mit und ohne dieser Einzelarmveränderung war jedoch nicht signifikant. Zur Bedeutung dieser Aberration siehe Abschnitt 4.3.2.

### 4.5 Onkogenetische Bäume

Beim Vergleich der onkogenetischen Bäume von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen fällt die deutlich stärkere Verästelung bei den Plattenepithelkarzinomen auf. Zurückzuführen ist sie darauf, dass bei Plattenepithelkarzinomen eine größere Zahl an Aberrationen mit einer Häufigkeit von mindestens 20 % detektiert wurden. Ursächlich für dieses Ergebnis könnte eine größere genetische Instabilität der Plattenepithelkarzinome sein. Beim Vergleich der beiden Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass Plattenepithelkarzinome eine größere

Anzahl an Verlusten, Zugewinnen, Amplifikationen und Gesamtveränderungen aufwiesen als Adenokarzinome. Statistisch war dieser Unterschied jedoch nur für die Zahl der Amplifikationen signifikant ( $p = 0,01$ ).

Beim Vergleich der beiden onkogenetischen Bäume fallen die Aberrationen 1q+, 5p+ und 8q+ auf, da sie in beiden Bäumen vertreten sind. Wie in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 gezeigt wurde, konnten die genannten Zugewinne auch von anderen Autoren in beiden Tumorentitäten gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich bei den Aberrationen um Veränderungen, die unabhängig von der Tumorentität, spezifisch für maligne Lungentumoren sind. Eventuell sind diese Veränderungen aber auch unspezifische Merkmale von malignen Tumoren unabhängig vom Gewebe, aus dem sie hervorgehen.

Die Zugewinne auf 1q und 5p bildeten in beiden onkogenetischen Bäumen eigene Äste, die nicht mit einer erhöhten genetischen Instabilität assoziiert waren. Die Bedeutung von 1q+ (siehe Abschnitt 4.3.2) und 5p+ (siehe Abschnitt 4.3.3) wurde bereits diskutiert.

Neben den Auswirkungen einzelner Aberrationen auf die Entwicklung von Lungentumoren gibt es auch Aberrationen, die gehäuft zusammen auftreten und die in ihrer Gesamtheit Einfluss auf die Tumorigenese nehmen. Höglund et al. (2004) konnten 3 verschiedene Gencluster im Genom der Bronchialkarzinome identifizieren, von denen eines durch die Aberration 3p- charakterisiert wurde.

Verluste auf 3p wurden auch in den Ergebnissen dieser Studie gefunden. Der onkogenetische Baum der Plattenepithelkarzinome offenbarte mit 4q- und 5q- darüber hinaus zwei weitere Aberrationen, die häufig in Verbindung mit 3p- auftraten. Die Annahme von Höglund et al. (2004), chromosomale Cluster seien unabhängig vom histologischen Typ in Lungentumoren zu finden, können die Daten dieser Studie nicht bestätigen, da der onkogenetische Baum der Adenokarzinome kein vergleichbares Cluster zeigt.

Im Folgenden wird die Bedeutung der Aberrationen des beobachteten Cluster genauer erörtert. Die Auswirkungen der Verluste auf 3p wurden bereits in Abschnitt 4.3.1 diskutiert.

Verluste auf 4q konnten ebenfalls mit der Entstehung von Lungenkrebs in Verbindung gebracht werden. Mit Hilfe von CGH-Untersuchungen zeigten Petersen et al. (1997), dass 4q- zu den häufigen Veränderungen im Genom von NSCLC-Patienten gehört. In einer Studie von Wrage et al. (2009) konnte die Aberration mit einer frühen Mikrometastasierung assoziiert werden. Verluste auf 4q waren signifikant häufiger mit Mikrometastasen im Knochenmark verbunden, wohingegen Patienten ohne Mikrometastasen keine Verluste oder sogar Zugewinne in dieser Region zeigten. In ähnlicher Häufigkeit wie bei den Mikrometastasen konnten Verluste auf 4q auch in Hirnmetastasen nachgewiesen werden [Wrage et al. 2009]. Wenn sich diese Ergebnisse

bewahrheiten und Tumoren mit Verlusten auf 4q zu früher Metastasierung neigen, so ist es wahrscheinlich, dass mit der frühen Metastasierung auch eine schlechte Prognose verbunden ist. Diese These ist mit den Ergebnissen dieser Studie vereinbar, da betroffene Patienten eine geringere 5-Jahres-Überlebensrate aufwiesen (siehe Abschnitt 4.3.3).

Die Indikation zur Operation in kurativer Intention wird nur gestellt, wenn eine Metastasierung klinisch ausgeschlossen ist oder operativ beherrscht werden kann. Falls zum Operationszeitpunkt der Patienten mit dieser Aberration bereits Mikrometastasen vorhanden waren, würde es den früheren Progress des Tumorleidens erklären. Wäre zum Operationszeitpunkt bereits eine klinisch okkulte Hirnmetastase vorhanden, so würde es ebenfalls den geringen Operationserfolg erklären, da Hirnmetastasen durchschnittlich ein Jahr nach der Erstdiagnose des Tumors erkannt werden und trotz adäquater Therapie innerhalb von 4 Monaten zum Tod des Patienten führen [Ricciardi und de Marinis 2010].

Es wäre wünschenswert, die Erkenntnisse von Wrage et al. (2009) und den prognostischen Wert der Verluste auf 4q in weiteren Studien zu überprüfen und gegebenenfalls eine Strategie gegen die schlechte Prognose zu entwickeln. Möglich wäre es zum Beispiel, das Tumorgewebe nach der Operation auf Aberrationen zu untersuchen und betroffene Patienten individuell zu therapieren. Vorstellbar wäre beispielsweise eine prophylaktische Hirnbestrahlung der Patienten, wie sie aus der Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms bekannt ist.

Neben 3p- und 4q- wurde das Gencluster durch Verluste auf 5q geprägt. Von Boelens et al. (2009) und Chujo et al. (2002) wurde 5q- im Genom von Bronchialkarzinomen detektiert. Weir et al. (2007) haben *PDE4D* als ein mögliches Tumorsuppressorgen auf 5q beschrieben. Das Genprodukt von *PDE4D* ist die Phosphodiesterase 4D, ein Enzym, das in den Zellen der Atemwege für den Abbau von cAMP („Cyclic adenosine monophosphate“) verantwortlich ist.

Mit *APC* wurde ein weiteres Gen auf 5q entdeckt, das als Tumorsuppressorgen wirkt und an der Tumorigenese beteiligt ist [Ding et al. 2008]. *APC* ist ein Bestandteil des Wnt-Signalweges („Wingless-type MMTV integration site“) und bewirkt den Abbau von  $\beta$ -Catenin. Bei Inaktivität des Gens kann  $\beta$ -Catenin intrazellulär kumulieren und als Transkriptionsfaktor für Onkogene wie zum Beispiel MYC wirken [Ohgaki et al. 2004]. Die Patienten dieser Studie, bei denen 5q- im Tumorgenom gefunden wurde, hatten eine geringere 5-Jahres-Überlebensrate als die Patienten ohne diese Aberration. Der Unterschied in der Überlebenszeit erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau (siehe Tabelle 50 im Anhang).

Ob die beiden Tumorsuppressorgene durch die Veränderungen auf 5q betroffen sind, kann zu diesem Zeitpunkt nur vermutet werden. Eine Expressionsanalyse der beschriebenen Gene könnte bei der Klärung dieser Frage helfen.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Erkenntnisse dieser Studie

In dieser retrospektiven Studie wurden aus den 237 an Lungenkrebs operierten Patienten des Gesamtkollektivs 80 ausgewählte Fälle mit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) auf Veränderungen im Genom untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt der Studie lag auf der Suche nach genomischen Veränderungen, welche die Überlebensrate der Patienten beeinflussen.

Zusammenfassend konnten die CGH-Ergebnisse dieser Studie die für NSCLC typischen Aberrationen bestätigen. Darüber hinaus zeigten die Adenokarzinome Zugewinne auf 16p, 5q und 8p. Diese 3 Veränderungen im Genom der untersuchten Adenokarzinome und Verluste auf 18q im Genom der Plattenepithelkarzinome konnten in 12 – 22 % der Tumoren detektiert werden. Sie wurden jedoch nicht von vergleichbaren Studien beschrieben.

Beim Vergleich der beiden Tumorentitäten wurden mehr Zugewinne auf 3q, häufigere Verluste auf 3p und mehr Amplifikationen in Plattenepithelkarzinomen als in Adenokarzinomen gefunden. Eine Vielzahl von Genen wurde bereits auf den beiden auffälligen Chromosomenarmen beschrieben, die teilweise prognostische Relevanz für das Überleben der Patienten haben. Die verschiedene Entwicklung der beiden Tumorentitäten und ihre morphologischen Unterschiede konnten mit den chromosomalen Imbalancen jedoch nicht erklärt werden.

Der statistische Vergleich zwischen Kurz- und Langzeitüberlebenden zeigte keine signifikanten Unterschiede der CGH-Ergebnisse. Dennoch war die Aberration 12q+ häufiger im Genom von Kurzzeitüberlebenden und 1q+, 5p+ sowie 18q- häufiger im Genom von Langzeitüberlebenden zu finden.

Die Analyse der Auswirkungen einzelner Aberrationen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der betroffenen Patienten zeigte ergänzend, dass Zugewinne auf 12q mit einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate und Zugewinne auf 5p mit einer hohen 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert waren. Auch in dieser Analyse erreichten die beiden Ergebnisse jedoch nicht das Signifikanzniveau. Verluste auf 5p und 7q waren im Vergleich zwar mit einer signifikant besseren Prognose assoziiert, wegen der geringen Häufigkeit und der damit verbundenen geringen Aussagekraft wurden die beiden Aberrationen, genauso wie andere seltene Aberrationen, nicht tiefergehend betrachtet.

Die Darstellung der häufigen Aberrationen in onkogenetischen Bäumen ergab Hinweise auf eine größere genetische Instabilität der Plattenepithelkarzinome, die durch die größere Zahl an Amplifikationen bei dieser Tumorentität gestützt wird.

Zugewinne auf 1q, 5p und 8q waren in beiden onkogenetischen Bäumen zu finden und könnten daher ein allgemeines Merkmal von malignen Lungentumoren sein.

Ein in der Literatur beschriebenes Gencluster, das durch Verluste auf 3p gekennzeichnet war, konnte im onkogenetischen Baum der Plattenepithelkarzinome gefunden werden. 3p- trat in den Tumoren dieser Studie häufig zusammen mit den Aberrationen 4q- und 5q- auf.

Um die Bedeutung der Aberrationen im Einzelnen und die Auswirkungen ihrer Kombination auf den Verlauf der Erkrankung zu klären, sind weitere Studien nötig.

Im onkogenetischen Baum der Adenokarzinome konnte kein vergleichbares Gencluster gefunden werden.

### **5.2 Kritische Betrachtung**

Grundlage für das Konzept dieser Studie war die retrospektive Untersuchung des vorhandenen Patientenkollektivs. In der Datenbank wurden alle relevanten Patientendaten und Untersuchungsergebnisse frühzeitig erfasst und sorgfältig verwaltet, so dass es keine fehlenden Daten gab, die die retrospektive Betrachtung behindert hätten.

Für die Untersuchung der Tumorgenome wurde die CGH ausgewählt. Vorteil dieser Methode war es, mit einer Untersuchung das gesamte Genom einer Gewebeprobe analysieren zu können und dabei den gegebenen finanziellen und zeitlichen Rahmen einzuhalten. Die Methode ist bereits seit 1992 etabliert und hat sich für die Untersuchung von Tumoren bewährt. Der Einsatz dieser Methode ist allerdings auf das Erkennen von quantitativen Veränderungen im Genom beschränkt. Im Gegensatz zu Verlusten und Zugewinnen konnten Inversionen oder Translokationen mit der CGH-Untersuchung nicht erkannt werden. Um ein verlässliches Ergebnis zu erhalten, war die Auswahl der Gewebeprobe der entscheidende, erste Schritt der Untersuchung. Mit steigender Heterogenität der Gewebeprobe steigt die Gefahr, ein verfälschtes Ergebnis zu erhalten. Um eine gleichbleibende Qualität im Laufe dieser Studie zu gewährleisten, wurde die Auswahl aller Tumorproben von demselben erfahrenen Pathologen durchgeführt. Auch die Interpretation der Ideogramme, die individuell unterschiedlich ausfallen könnte, wurde ausschließlich von einem Team in gleicher Zusammensetzung durchgeführt.

Die Auflösung der CGH, die eine Beurteilung der Veränderungen chromosomaler Banden zulässt, Aberrationen einzelner Gene jedoch nicht detektieren kann, stellte eine weitere methodische Einschränkung dar.

Um die Aussagekraft dieser Studie zu erhöhen, wäre eine größere Zahl an untersuchten Tumoren wünschenswert gewesen. Besonders eine größere Zahl an Adenokarzinomen wäre interessant gewesen. Da mehr als doppelt so viele Plattenepithelkarzinome wie Adenokarzinome untersucht wurden, reichte die Zahl der untersuchten Tumoren dieser Entität aus, um größer zu sein als bei vergleichbaren Studien.

Aus statistischer Sicht wäre es auch wünschenswert gewesen, das Gesamtkollektiv auf genetische Veränderungen zu untersuchen und nicht nur eine Auswahl von Patienten mit kurzer oder langer Überlebenszeit für die CGH zu selektieren. Da jedoch ein finanzieller und zeitlicher Rahmen eingehalten werden sollte, gewährleistete die Auswahl von Kurz- und Langzeitüberlebenden eine starke Kontrastierung und damit ein hohes Maß an Information pro untersuchtem Tumor.

Über das Kollektiv der operierten Patienten hinaus wäre es interessant, auch die große Gruppe der Lungenkrebspatienten zu untersuchen, die sich bereits zum Zeitpunkt der Diagnose in einem inoperablen Stadium befinden. Möglicherweise finden sich in den Tumoren dieser Gruppe genetische Veränderungen, die für besonders schnellen Progress der Erkrankung oder frühe Metastasierung verantwortlich sind ähnlich wie bei den Kurzzeitüberlebenden dieser Studie.

### **5.3 Ausblicke**

Ziel der Lungenkrebsforschung ist es, die Mechanismen der Tumorigenese besser zu verstehen und Ansätze für ein therapeutisches Vorgehen zu finden. In den Ergebnissen dieser Studie wurden Hinweise darauf gefunden, dass einzelne Aberrationen ein kurzes oder langes Überleben der Patienten bewirken können. Die Aufgabe kommender Studien wird es sein, durch ergänzende Methoden die Verbindung der genomischen Veränderungen zu Veränderungen im Genexpressionsmuster der Tumorzellen herzustellen. Erst dann wird sich zeigen, ob die betroffenen Gene Angriffspunkte für neue Therapiestrategien bieten können.

Die Untersuchung des Genoms von Lungentumoren hat in den letzten Jahren bereits zu einem stetig wachsenden Wissen über die Mechanismen der Tumorigenese auf zellulärer und genetischer Ebene geführt. Neue Therapiestrategien konnten etabliert werden, die noch vor wenigen Jahren undenkbar waren. Da die Therapieansätze auf genetischer Ebene das Überleben der Patienten bisher jedoch nur um einige Monate verlängern konnten, müssen weitere



Anstrengungen für ein besseres Verständnis der Erkrankung unternommen werden. Nur dann kann in den nächsten Jahren das Ziel erreicht werden, Patienten individuell und kausal an den der Krankheit zugrundeliegenden Funktionsstörungen zu behandeln und damit ihre Prognose zu verbessern.

**6. Anhang: Tabellen 45 - 50**

Patientennummer	Alter und Geschlecht	UICC-Stadium	Zugewinne	Verluste
1	70 m	1a	1q, 2p, 8q23qter, 17q	-
2	70 m	1a	1p32pter, 8q22qter, 16q, 20p	-
3	77 m	1a	1q, 5p14q21, 16p11p12, 17q	8p12pter
4	76 m	1a	5p	-
5	60 w	1a	1q	-
6	68 m	1a	1q, 6p21pter, 8q24qter, 19q	20p
7	78 m	1a	5p, 15q21qter, 20q11q12	-
8	50 m	1b	-	13q
9	62 m	1b	1q, 6p, 7, 8q	3, 6q, 8p12pter, 9, 13q
10	62 m	1b	1q, 2, 6p21pter, 8q23qter	4q32qter, 6q, 9p
11	72 m	1b	-	-
12	66 m	1b	1q, 5p, 8p, 8q24qter, 17q	3p, 5q, 6q16q21, 9p13pter, 11p, 11q22qter, 17p, 18q
13	72 m	1b	1q, 5pterq14, 8q21q24, 12p, 16p, 17q, 19p, 21q	6q16q21, 8pterq13, 9, 11p, 18q
14	76 m	2a	-	-
15	66 m	2a	16, 22q	-
16	61 m	2a	1p31pter, 1q12q25, 2p22pter, 3q, 5q22q32, 6pterq16, 8p12qter, 12q13q24, 14q, 16p, 17q, 20	4p11p15, 5q11q15, 6q21qter, 8p21pter, 11q23qter, 12p12pter, 15q, 18q21qter
17	78 m	2b	5p, 8q24qter	-
18	79 w	2b	8q22qter, 17q	1p36pter, 17p, 19p13pter, 19q13qter
19	52 m	2b	-	-
20	44 m	2b	3q26q26, 8, 10p, 12, 14q11q21	9q13q21
21	57 m	3a	5p, 12p, 16p	14q22qter, 16q, 22q
22	66 w	3a	1q, 5p, 7p, 7q11q31, 11q12q23, 12, 20p	-
23	63 w	3a	1q	1p21p31, 6q12q24, 18q
24	67 w	3a	-	-
25	46 w	3a	1q	-

Tabelle 45: Bandengenaue CGH-Ergebnisse der Adenokarzinome.

## 6. Anhang: Tabellen 45 - 50

Patienten- nummer	Alter und Geschlecht	UICC- Stadium	Zugewinne	Verluste
26	75 m	1a	-	-
27	80 m	1a	1q21q25, 2p22pter, 5p, 7q11q21, 7q22qter, 8q13q21, 8q23qter, 11q, 14q, 15q15q24	-
28	66 m	1a	X	-
29	75 m	1a	1q41qter, 3q, 5p, 10p, 12p	3p, 4q, 5q, 9, 13q14qter, 18q, 21q
30	77 m	1a	1q, 2p13pter, 3q13qter, 5p, 7p11p11	-
31	58 m	1a	5p, 20q11q12	-
32	74 m	1a	-	-
33	65 m	1a	7p21pter, 12, 14q31qter, 17q, 19	3p, 4q23qter, 5q, 9, 10q, 11p, 13q
34	72 m	1a	13q34qter	-
35	63 m	1b	1q, 2p16p21, 3q, 5p, 7pterq31, 8q21qter, 12p, 14q11q24, 17q23qter, 18p, 20p12qter, 22q	2q34qter, 18q
36	71 w	1b	-	-
37	59 m	1b	1, 2p23q31, 3q22qter, 5p, 6p11p21, 7q	-
38	64 m	1b	2p13p23, 3q23qter, 5p, 8q, 14q	-
39	50 m	1b	-	-
40	62 m	1b	3q24qter, 4q12q21, 5p, 6p21p21, 8q, 9q, 11pterq14, 12p, 14q11q11, 15q	-
41	70 m	1b	1q12q31, 2p, 3q25qter, 4p15q33, 6p12p21, 6q14qter, 7q, 8p12qter, 10p, 11q12q14, 12pterq23, 15q14q24, 17q, 18q	3p, 9p13pter, 10q22qter, 11q22qter, 13q11q31, 14q, 16, 17p, 20, 21q
42	75 m	1b	3q, 4q11q13, 7q11q31, 11q13q14, 20q11q13	3p, 8p21pter, 9pterq22, 10q25qter, 11q23qter, 13q, 16q, 17pterq12, 20q13qter, 22q13qter
43	65 m	1b	4p11p13, 5p, 7q, 11q12q13, 16p	6q16qter, 11p12pter, 13q, 15q, 18q
44	67 m	1b	3q27qter, 7p11q11, 19q12q13	-
45	64 m	1b	3q, 6q24qter, 12p, 12q23qter,	3p, 4, 5q, 8p22pter, 9,

## 6. Anhang: Tabellen 45 - 50

			16p, 20	11p15pter, 13q
46	61 m	1b	3q, 4q21q28, 8q, 6p	3p, 4q31qter, 5q, 9p21pter, 10q, 14q, 16q, 18q
47	74 m	1b	1q25qter, 2p13p21, 2q11q34, 3q26qter, 5p, 8q, 18q11q11, 20q, 22q11q12	2q35qter, 3p, 4q13qter, 5q, 8p21pter, 10q21q21, 11q21qter, 13q
48	74 m	1b	-	-
49	52 m	1b	-	-
50	71 m	1b	1q41qter, 2p14pter, 2q11q14, 3p24pter, 3q21qter, 5p, 8p11p12, 8q, 10p, 11q12q14, 11q22q23, 12q14q15, 18p, 19q, 20q, Xq26qter	1p13p31, 3p12p23, 4, 5q13qter, 9, 11p14pter, 13q21q21, 18q, 21q
51	81 m	1b	1p21p36, 1q12q31, 3q, 4p13q13, 5p, 6, 17q, 18q, 20q, 21q, Xq26qter	3p, 4q22qter, 5q, 7, 10q, 16q11q13
52	70 m	1b	3q21qter, 18p	3p12p24, 4q31q34, 5q11q23, 8p12pter, 11q14qter, 13q, 18q, 20p
53	64 m	1b	2p14pter, 3q22qter, 5p, 8p21qter, 17q22qter, 20	2q32qter, 3p, 4q24qter, 5q, 6p22pter, 7p13pter, 8p22pter, 9, 12p11p11, 14q, 15q, 18q, 21q
54	64 w	2a	1q, 3q, 6p, 7pterq11, 8p11p12	3p, 4p15p16, 4q22q26, 4q31qter, 5q11q31, 8p22pter, 8q13q21, 9p13pter, 13q, 17p, 18q
55	74 m	2a	1q, 2p13pter, 3q, 5p, 6q, 8q21qter, 11q13q13, 12q13q15, 16q, 18q11q21, 19q13q13	1p13p21, 3p, 6p23pter, 8p22pter, 8q12q13, 9p21pter, 11p, 11q24qter, 18q22qter
56	72 m	2a	1q21q31, 1q41qter, 2p14pter, 2q, 3q, 7, 13q11q14, 16p13pter, 20p	1p13p31, 1p35pter, 3p, 4p, 4q26qter, 8p21pter, 9p13pter, 13q22qter, 15q11q23, 17p
57	57 w	2a	1q, 3q22qter, 6p22pter, 8q21qter, 14q24qter	1p13p22, 2q37qter, 7p13pter, 8pterq13, 11q14qter, 12p, 12q24qter, 18q
58	53 m	2a	3q	1p36pter
59	64 m	2b	2pterq33, 3q11q21, 3q26qter, 8p11p12, 11q13q14, 12pterq22, Xq27qter	1p11p32, 1p35pter, 2q35qter, 3p, 4pterq32, 5q, 6p21pter, 6q, 8p21pter, 11q23qter, 13q, 17p, 21q

## 6. Anhang: Tabellen 45 - 50

60	66 m	2b	-	-
61	59 m	2b	20q	13q14q22
62	67 m	2b	3q, 7q11q31, 17q	3p, 5q, 9p
63	60 m	2b	1q31q31, 1q41q42, 3q26qter, 7q11q31, 8p11p12, 11q13q13, 15q24qter, 16q, 18p11p11, 18q21q21, 22q	3p21pter, 3q13q13, 4p, 4q27qter, 5q14qter, 6p22pter, 8p21pter, 8q12q21, 9p21pter, 11p14pter, 13q12q13, 13q22qter
64	68 m	2b	-	-
65	77 m	2b	3q26qter, 20, 22q	3p, 13q
66	76 m	2b	2p11p12, 3q22qter, 5p, 7p, 11q13q14, 14q, 15q13q21	1p, 2q34q35, 3p12pter, 4p15pter, 8p12pter, 9p21pter, 21q22qter
67	65 m	2b	-	-
68	65 w	2b	3q23qter, 7pterq21, 11p11q13, 14q21q24, 18p, 19q	3p, 4p14pter, 5q12q31, 6q15qter, 9p21pter, 18q, 21q
69	51 m	2b	17q11q21	-
70	73 m	2b	1q21q22, 3q12q23, 6p21p22, 7pterq33, 11q12q14, 14q22qter, 17q11q21, 20q11q11	3p12p13, 6p23pter, 6q12q25, 13q
71	62 m	2b	1q42qter, 2p13p16, 3q23qter, 6p12p21, 7q11q21, 8p11p12, 12p, 16p, 19	3p, 4p, 5q11q23, 8p12pter, 9p, 10q, 11p14pter, 13q
72	45 w	2b	3q26qter, 7q11q21, 8q24qter, 9q, 12p, 12q12q13	1p21p31, 3p, 4
73	59 m	3a	3q26q28	-
74	54 m	3a	-	9p
75	61 m	3a	2p13p21, 5p	-
76	69 m	3a	2p15p21, 10p	-
77	60 m	3a	-	-
78	69 m	3a	16q, 18p	1p21p31, 5p, 13q12q22
79	62 m	3b	1q41qter, 6p22pter, 8p11p12, 18p	13q
80	67 m	3b	1q21q22, 3q22qter, 7q, 8p12qter, 9pterq13, 10p, 12p, 14q11q12, 22q11q13	1p, 2q34qter, 3p, 4, 5q, 8p21pter, 18q, 21q

Tabelle 46: Bandengenaue CGH-Ergebnisse der Plattenepithelkarzinome.

<b>Adenokarzinome</b>		
<b>Chromosomen- arm</b>	<b>Häufigkeit</b>	
	<b>absolut</b>	<b>relativ</b>
1p+	2	8 %
1p-	2	8 %
1q+	12	48 %
1q-	0	0 %
2p+	3	12 %
2p-	0	0 %
2q+	0	0 %
2q-	0	0 %
3p+	0	0 %
3p-	2	8 %
3q+	2	8 %
3q-	1	4 %
4p+	0	0 %
4p-	1	4 %
4q+	0	0 %
4q-	1	4 %
5p+	8	32 %
5p-	0	0 %
5q+	3	12 %
5q-	2	8 %
6p+	4	16 %
6p-	0	0 %
6q+	1	4 %
6q-	6	24 %
7p+	2	8 %
7p-	0	0 %
7q+	2	8 %
7q-	0	0 %
8p+	3	12 %
8p-	4	16 %
8q+	11	44 %
8q-	1	4 %

<b>Plattenepithelkarzinome</b>		
<b>Chromosomen- arm</b>	<b>Häufigkeit</b>	
	<b>absolut</b>	<b>relativ</b>
1p+	2	4 %
1p-	10	18 %
1q+	15	27 %
1q-	0	0 %
2p+	16	29 %
2p-	0	0 %
2q+	4	7 %
2q-	7	13 %
3p+	1	2 %
3p-	24	44 %
3q+	32	58 %
3q-	1	2 %
4p+	3	5 %
4p-	11	20 %
4q+	5	9 %
4q-	15	27 %
5p+	16	29 %
5p-	1	2 %
5q+	0	0 %
5q-	16	29 %
6p+	10	18 %
6p-	6	11 %
6q+	3	5 %
6q-	3	5 %
7p+	8	15 %
7p-	3	5 %
7q+	16	29 %
7q-	1	2 %
8p+	9	16 %
8p-	15	27 %
8q+	13	24 %
8q-	4	7 %

6. Anhang: Tabellen 45 - 50

9p+	0	0 %
9p-	4	16 %
9q+	0	0 %
9q-	3	12 %
10p+	1	4 %
10p-	0	0 %
10q+	0	0 %
10q-	0	0 %
11p+	0	0 %
11p-	2	8 %
11q+	1	4 %
11q-	2	8 %
12p+	4	16 %
12p-	1	4 %
12q+	3	12 %
12q-	0	0 %
13q+	0	0 %
13q-	2	8 %
14q+	2	8 %
14q-	1	4 %
15q+	1	4 %
15q-	1	4 %
16p+	5	20 %
16p-	0	0 %
16q+	1	4 %
16q-	1	4 %
17p+	0	0 %
17p-	2	8 %
17q+	6	24 %
17q-	0	0 %
18p+	0	0 %
18p-	0	0 %
18q+	0	0 %
18q-	4	16 %
19p+	1	4 %

9p+	1	2 %
9p-	17	31 %
9q+	3	5 %
9q-	6	11 %
10p+	4	7 %
10p-	0	0 %
10q+	0	0 %
10q-	7	13 %
11p+	2	4 %
11p-	7	13 %
11q+	12	22 %
11q-	7	13 %
12p+	10	18 %
12p-	2	4 %
12q+	7	13 %
12q-	1	2 %
13q+	2	4 %
13q-	19	35 %
14q+	10	18 %
14q-	3	5 %
15q+	5	9 %
15q-	3	5 %
16p+	4	7 %
16p-	1	2 %
16q+	3	5 %
16q-	4	7 %
17p+	0	0 %
17p-	5	9 %
17q+	8	15 %
17q-	1	2 %
18p+	7	13 %
18p-	0	0 %
18q+	5	9 %
18q-	12	22 %
19p+	2	4 %

6. Anhang: Tabellen 45 - 50

19p-	1	4 %	19p-	0	0 %
19q+	1	4 %	19q+	6	11 %
19q-	1	4 %	19q-	0	0 %
20p+	3	12 %	20p+	5	9 %
20p-	1	4 %	20p-	2	4 %
20q+	2	8 %	20q+	11	20 %
20q-	0	0 %	20q-	2	4 %
21q+	1	4 %	21q+	1	2 %
21q-	0	0 %	21q-	8	15 %
22q+	1	4 %	22q+	5	9 %
22q-	1	4 %	22q-	1	2 %
Xp+	0	0 %	Xp+	1	2 %
Xp-	0	0 %	Xp-	0	0 %
Xq+	0	0 %	Xq+	4	7 %
Xq-	0	0 %	Xq-	0	0 %

*Tabelle 47: Liste der veränderten Chromosomenarme von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.*



## 6. Anhang: Tabellen 45 - 50

Chromosomen- arm	Adenokarzinome		Plattenepithelkarzinome		p-Wert	Adj. p-Wert
	absolut	relativ	absolut	relativ		
1p-	2	8 %	10	18 %	0,32	0,85
1p+	2	8 %	2	4 %	0,59	1,00
1q-	0	0 %	0	0 %	-	-
1q+	12	48 %	18	33 %	0,22	0,81
2p-	0	0 %	0	0 %	-	-
2p+	3	12 %	16	29 %	0,16	0,68
2q-	0	0 %	7	13 %	0,092	0,49
2q+	1	4 %	5	9 %	0,66	1,00
3p-	2	8 %	24	44 %	<b>0,0017</b>	0,062
3p+	0	0 %	1	2 %	1,00	1,00
3q-	1	4 %	1	2 %	0,53	1,00
3q+	2	8 %	32	58 %	<b>0,000019</b>	<b>0,0014</b>
4p-	1	4 %	11	20 %	0,092	0,49
4p+	0	0 %	3	5 %	0,55	1,00
4q-	1	4 %	15	27 %	<b>0,016</b>	0,30
4q+	0	0 %	5	9 %	0,32	0,85
5p-	0	0 %	1	2 %	1,00	1,00
5p+	8	32 %	16	29 %	0,80	1,00
5q-	2	8 %	16	29 %	<b>0,045</b>	0,44
5q+	3	12 %	0	0 %	<b>0,028</b>	0,41
6p-	0	0 %	5	9 %	0,32	0,85
6p+	4	16 %	10	18 %	1,00	1,00
6q-	6	24 %	4	7 %	0,063	0,47
6q+	1	4 %	4	7 %	1,00	1,00
7p-	0	0 %	3	5 %	0,55	1,00
7p+	2	8 %	9	16 %	0,49	1,00
7q-	0	0 %	1	2 %	1,00	1,00
7q+	2	8 %	16	29 %	<b>0,045</b>	0,44
8p-	4	16 %	14	25 %	0,40	0,99
8p+	3	12 %	9	16 %	0,74	1,00
8q-	1	4 %	4	7 %	1,00	1,00
8q+	11	44 %	13	24 %	0,11	0,56
9p-	4	16 %	17	31 %	0,18	0,75

6. Anhang: Tabellen 45 - 50

9p+	0	0 %	1	2 %	1,00	1,00
9q-	3	12 %	6	11 %	1,00	1,00
9q+	0	0 %	3	5 %	0,55	1,00
10p-	0	0 %	0	0 %	-	-
10p+	1	4 %	5	9 %	0,66	1,00
10q-	0	0 %	7	13 %	0,092	0,49
10q+	0	0 %	0	0 %	-	-
11p-	2	8 %	7	13 %	0,71	1,00
11p+	0	0 %	2	4 %	1,00	1,00
11q-	2	8 %	7	13 %	0,71	1,00
11q+	1	4 %	12	22 %	0,054	0,44
12p-	1	4 %	2	4 %	1,00	1,00
12p+	4	16 %	10	18 %	1,00	1,00
12q-	0	0 %	1	2 %	1,00	1,00
12q+	3	12 %	7	13 %	1,00	1,00
13q-	2	8 %	19	35 %	<b>0,014</b>	0,30
13q+	0	0 %	2	4 %	1,00	1,00
14q-	1	4 %	3	5 %	1,00	1,00
14q+	2	8 %	10	18 %	0,32	0,85
15q-	1	4 %	3	5 %	1,00	1,00
15q+	1	4 %	5	9 %	0,66	1,00
16p-	0	0 %	1	2 %	1,00	1,00
16p+	5	20 %	4	7 %	0,13	0,60
16q-	1	4 %	4	7 %	1,00	1,00
16q+	2	8 %	3	5 %	0,65	1,00
17p-	2	8 %	5	9 %	1,00	1,00
17p+	0	0 %	0	0 %	-	-
17q-	0	0 %	1	2 %	1,00	1,00
17q+	6	24 %	8	15 %	0,35	0,89
18p-	0	0 %	0	0 %	-	-
18p+	0	0 %	7	13 %	0,092	0,49
18q-	4	16 %	12	22 %	0,76	1,00
18q+	0	0 %	5	9 %	0,32	0,85
19p-	1	4 %	0	0 %	0,31	0,85
19p+	1	4 %	2	4 %	1,00	1,00

6. Anhang: Tabellen 45 - 50

19q-	1	4 %	0	0 %	0,31	0,85
19q+	1	4 %	6	11 %	0,42	1,00
20p-	1	4 %	2	4 %	1,00	1,00
20p+	3	12 %	5	9 %	0,70	1,00
20q-	0	0 %	2	4 %	1,00	1,00
20q+	2	8 %	11	20 %	0,21	0,81
21q-	0	0 %	8	15 %	0,052	0,44
21q+	1	4 %	1	2 %	0,53	1,00
22q-	1	4 %	1	2 %	0,53	1,00
22q+	1	4 %	5	9 %	0,66	1,00
Xp-	0	0 %	0	0 %	-	-
Xp+	0	0 %	1	2 %	1,00	1,00
Xq-	0	0 %	0	0 %	-	-
Xq+	0	0 %	4	7 %	0,30	0,85

*Tabelle 48: Statistischer Vergleich der chromosomalen Aberrationen von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.*

## 6. Anhang: Tabellen 45 - 50

Chromosomen -arm	Kurzzeitüberlebende mit Aberration		Langzeitüberlebende mit Aberration		p-Wert	Adj. p-Wert
	absolut	relativ	absolut	relativ		
1p-	4	21,1 %	4	10 %	0,42	1,00
1p+	2	10,5 %	0	0 %	0,10	0,91
1q-	0	0 %	0	0 %	-	-
1q+	3	15,8 %	16	40 %	0,08	0,91
2p-	0	0 %	0	0 %	-	-
2p+	4	21,1 %	9	22,5 %	1,00	1,00
2q-	1	5,3 %	3	7,5 %	1,00	1,00
2q+	1	5,3 %	2	5 %	1,00	1,00
3p-	6	31,6 %	12	30 %	1,00	1,00
3p+	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
3q-	0	0 %	2	5 %	1,00	1,00
3q+	7	36,8 %	17	42,5 %	0,78	1,00
4p-	2	10,5 %	4	10 %	1,00	1,00
4p+	2	10,5 %	1	2,5 %	0,24	1,00
4q-	5	26,3 %	6	15 %	0,31	1,00
4q+	2	10,5 %	3	7,5 %	0,65	1,00
5p-	1	5,3 %	0	0 %	0,32	1,00
5p+	3	15,8 %	16	40 %	0,08	0,91
5q-	5	26,3 %	9	22,5 %	0,75	1,00
5q+	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
6p-	1	5,3 %	2	5 %	1,00	1,00
6p+	2	10,5 %	7	17,5 %	0,70	1,00
6q-	1	5,3 %	5	12,5 %	0,65	1,00
6q+	3	15,8 %	1	2,5 %	0,09	0,91
7p-	1	5,3 %	1	2,5 %	0,54	1,00
7p+	1	5,3 %	5	12,5 %	0,65	1,00
7q-	1	5,3 %	0	0 %	0,32	1,00
7q+	1	5,3 %	10	25 %	0,09	0,91
8p-	3	15,8 %	9	22,5 %	0,73	1,00
8p+	3	15,8 %	6	15 %	1,00	1,00
8q-	0	0 %	5	12,5 %	0,16	1,00
8q+	5	26,3 %	13	32,5 %	0,77	1,00

## 6. Anhang: Tabellen 45 - 50

9p-	3	15,8 %	13	32,5 %	0,22	1,00
9p+	0	0 %	0	0 %	-	-
9q-	3	15,8 %	5	12,5 %	0,70	1,00
9q+	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
10p-	0	0 %	0	0 %	-	-
10p+	2	10,5 %	3	7,5 %	0,65	1,00
10q-	3	15,8 %	4	10 %	0,67	1,00
10q+	0	0 %	0	0 %	-	-
11p-	2	10,5 %	7	17,5 %	0,70	1,00
11p+	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
11q-	3	15,8 %	5	12,5 %	0,70	1,00
11q+	2	10,5 %	7	17,5 %	0,70	1,00
12p-	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
12p+	5	26,3 %	6	15 %	0,31	1,00
12q-	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
12q+	5	26,3 %	2	5 %	<b>0,03</b>	0,91
13q-	6	31,6 %	11	27,5 %	0,77	1,00
13q+	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
14q-	1	5,3 %	2	5 %	1,00	1,00
14q+	2	10,5 %	5	12,5 %	1,00	1,00
15q-	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
15q+	1	5,3 %	4	10 %	1,00	1,00
16p-	1	5,3 %	0	0 %	0,32	1,00
16p+	1	5,3 %	5	12,5 %	0,65	1,00
16q-	2	10,5 %	3	7,5 %	0,65	1,00
16q+	2	10,5 %	3	7,5 %	0,65	1,00
17p-	3	15,8 %	3	7,5 %	0,38	1,00
17p+	0	0 %	0	0 %	-	-
17q-	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
17q+	5	26,3 %	5	12,5 %	0,27	1,00
18p-	0	0 %	0	0 %	-	-
18p+	2	10,5 %	4	10 %	1,00	1,00
18q-	1	5,3 %	11	27,5 %	0,08	0,91
18q+	2	10,5 %	3	7,5 %	0,65	1,00
19p-	1	5,3 %	0	0 %	0,32	1,00

6. Anhang: Tabellen 45 - 50

19p+	1	5,3 %	2	5 %	1,00	1,00
19q-	1	5,3 %	0	0 %	0,32	1,00
19q+	1	5,3 %	4	10 %	1,00	1,00
20p-	2	10,5 %	0	0 %	0,10	0,91
20p+	2	10,5 %	1	2,5 %	0,24	1,00
20q-	1	5,3 %	1	2,5 %	0,54	1,00
20q+	2	10,5 %	6	15 %	1,00	1,00
21q-	2	10,5 %	2	5 %	0,59	1,00
21q+	1	5,3 %	1	2,5 %	0,54	1,00
22q-	0	0 %	2	5 %	1,00	1,00
22q+	0	0 %	4	10 %	0,29	1,00
Xp-	0	0 %	0	0 %	-	-
Xp+	0	0 %	1	2,5 %	1,00	1,00
Xq-	0	0 %	0	0 %	-	-
Xq+	2	10,5 %	2	5 %	0,59	1,00

*Tabelle 49: Statistischer Vergleich der chromosomalen Aberrationen von Kurz- und Langzeitüberlebenden.*

## 6. Anhang: Tabellen 45 - 50

Chromosomen- arm	Fälle ohne Aberration	Fälle mit Aberration	5-JÜ ohne Aberration	5-JÜ mit Aberration	p-Wert	Adj. p-Wert
1p-	60	10	50,4 %	40 %	0,42	0,87
1p+	67	3	51,1 %	100 %	<b>0,01</b>	0,13
1q+	46	24	42,9 %	60,9 %	0,14	0,74
2p+	54	16	46,6 %	56,2 %	0,41	0,87
2q-	64	6	48,8 %	50 %	0,79	0,93
2q+	65	5	49,6 %	40 %	0,76	0,93
3p-	47	23	53,9 %	39,1 %	0,29	0,87
3p+	69	1	48,1 %	100 %	0,40	0,87
3q-	68	2	48,9 %	50 %	0,79	0,93
3q+	40	30	48,1 %	50 %	0,85	0,93
4p-	61	9	49,6 %	44,4 %	0,53	0,93
4p+	67	3	49,6 %	33,3 %	0,34	0,87
4q-	55	15	53,3 %	33,3 %	0,1	0,74
4q+	65	5	49,6 %	40 %	0,74	0,93
5p-	69	1	49,6 %	100 %	<b>0,0001</b>	<b>0,0037</b>
5p+	48	22	43,2 %	61,9 %	0,07	0,67
5q-	53	17	51,5 %	41,2 %	0,40	0,87
5q+	69	1	49,6 %	100 %	0,63	0,93
6p-	66	4	48,8 %	50 %	0,84	0,93
6p+	59	11	49,6 %	45,5 %	0,67	0,93
6q-	62	8	50,4 %	37,5 %	0,75	0,93
6q+	66	4	50,3 %	25 %	0,18	0,74
7p-	67	3	49,6 %	33,3 %	0,55	0,93
7p+	62	8	48 %	57,1 %	0,86	0,93
7q-	69	1	49,6 %	100 %	<b>0,0001</b>	<b>0,0037</b>
7q+	54	16	47,7 %	53,3 %	0,64	0,93
8p-	56	14	48,7 %	50 %	0,97	0,98
8p+	59	11	47,8 %	54,5 %	0,96	0,98
8q-	65	5	46,4 %	80 %	0,35	0,87
8q+	48	22	52,8 %	40,9 %	0,77	0,93
9p-	51	19	49,6 %	47,4 %	0,92	0,97
9p+	69	1	49,6 %	100 %	0,44	0,87
9q-	61	9	51,3 %	33,3 %	0,45	0,87

## 6. Anhang: Tabellen 45 - 50

9q+	67	3	49,6 %	33,3 %	0,82	0,93
10p+	64	6	48,8 %	50 %	0,98	0,98
10q-	63	7	49,6 %	42,9 %	0,77	0,93
11p-	61	9	46,2 %	66,7 %	0,23	0,87
11p+	68	2	48,9 %	50 %	0,80	0,93
11q-	62	8	47 %	62,5 %	0,46	0,87
11q+	59	11	45,3 %	70 %	0,15	0,74
12p-	68	2	48,9 %	50 %	0,81	0,93
12p+	56	14	53,1 %	30,8 %	0,24	0,87
12q-	69	1	48,1 %	100 %	0,38	0,87
12q+	61	9	52 %	25 %	0,06	0,64
13q-	52	18	46,4 %	55,6 %	0,82	0,93
13q+	69	1	48,1 %	100 %	0,38	0,87
14q-	66	4	52 %	25 %	0,17	0,74
14q+	61	9	47,9 %	55,6 %	0,62	0,93
15q-	68	2	48,9 %	50 %	0,84	0,93
15q+	65	5	46,4 %	80 %	0,17	0,74
16p-	69	1	49,6 %	100 %	0,17	0,74
16p+	64	6	50,4 %	33,3 %	0,87	0,93
16q-	65	5	51,2 %	20 %	0,27	0,87
16q+	65	5	49,6 %	40 %	0,73	0,93
17p-	64	6	48,8 %	50 %	0,48	0,89
17q-	69	1	48,1 %	100 %	0,38	0,87
17q+	59	11	53,1 %	27,3 %	0,14	0,74
18p+	63	7	47,9 %	57,1 %	0,80	0,93
18q-	55	15	45,9 %	60 %	0,35	0,87
18q+	65	5	48 %	60 %	0,64	0,93
19p-	69	1	49,6 %	100 %	<b>0,02</b>	0,24
19p+	67	3	49,6 %	33,3 %	0,76	0,93
19q-	69	1	49,6 %	100 %	<b>0,02</b>	0,24
19q+	64	6	47,2 %	66,7 %	0,33	0,87
20p-	68	2	50,3 %	100 %	<b>0,01</b>	0,13
20p+	64	6	51,2 %	20 %	0,17	0,74
20q-	68	2	48,8 %	50 %	0,98	0,98
20q+	60	10	47 %	60 %	0,45	0,87



6. Anhang: Tabellen 45 - 50

21q-	63	7	51,2 %	28,6 %	0,38	0,87
21q+	68	2	50,4 %	50 %	0,11	0,74
22q-	68	2	48,9 %	50 %	0,70	0,93
22q+	64	6	48,8 %	50 %	0,68	0,93
Xp+	69	1	48,1 %	100 %	0,85	0,93
Xq+	66	4	48,8 %	50 %	0,35	0,87

*Tabelle 50: Korrelation von Einzelarmveränderungen mit der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit.*

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, Kuroishi T, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Sugiura T, Mitsudomi T, Takahashi T (1999): Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 5, 1001-1005
  
- [2] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997): A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921
  
- [3] Apte SS, Mattei MG, Olsen BR (1995): Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX $\delta$ . *Genomics* 26, 592-594
  
- [4] Bains MS (1991): Surgical treatment of lung cancer. *Chest* 100, 826-837
  
- [5] Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G (1997): Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. *Chest* 112, 1474-1479
  
- [6] Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM (2003): Initial evaluation of the patient with lung cancer: Symptoms, signs, laboratory tests and paraneoplastic syndromes. *Chest* 123, 97S-104S
  
- [7] Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG (1998): Aberrant methylation of p16INK4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11891-11896
  
- [8] Berard J, Laboune F, Mukuna M, Masse S, Kothary R, Bradley WEC (1996): Lung tumors in mice expressing an antisense RAR $\beta$ 2 transgene. *FASEB J* 10, 1091-1097
  
- [9] Bernheim A, Toujani S, Saulnier P, Robert T, Casiraghi O, Validire P, Temam S, Menard P, Dessen P, Fouret P (2008): High-resolution array comparative genomic hybridization analysis of human bronchial and salivary adenoid cystic carcinoma. *Lab Invest* 88, 464-473

- [10] Berrieman HK, Ashman JNE, Cowen ME, Greenman J, Lind MJ, Cawkwell L (2004): Chromosomal analysis of non-small-cell lung cancer by multicolour fluorescent in situ hybridisation. *Br J Cancer* 90, 900-905
- [11] Blackburn EH (1991): Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-572
- [12] Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, Plescia J, Dohi T, Altieri DC (2003): Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: Initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res* 9, 2683-2692
- [13] Boelens MC, Kok K, van der Vlies P, van der Vries G, Sietsma H, Timens W, Postma DS, Groen HJM, van den Berg A (2009): Genomic aberrations in squamous cell lung carcinoma related to lymph node or distant metastasis. *Lung Cancer* 66, 372-378
- [14] Bordoni R (2008): Consensus conference: Multimodality management of early- and intermediate-stage non-small cell lung cancer. *Oncologist* 13, 945-953
- [15] Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH (2003): A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. *Cancer Res* 63, 1727-1730
- [16] Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y (2001): The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18, 1059-1068
- [17] Brass N, Ukena I, Remberger K, Mack U, Sybrecht GW, Meese EU (1996): DNA amplification on chromosome 3q26.1-q26.3 in squamous cell carcinoma of the lung detected by reverse chromosome painting. *Eur J Cancer* 32A, 1205-1208
- [18] Brennan J, O'Connor T, Makuch RW, Simmons AM, Russell E, Linnoila RI, Phelps RM, Gazdar AF, Ihde DC, Johnson BE (1991): Myc family DNA amplification in 107 tumors and tumor cell lines from patients with small cell lung cancer treated with different combination chemotherapy regimens. *Cancer Res* 51, 1708-1711

- [19] Breuer RHJ, Postmus PE, Smit EF (2005): Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration* 72, 313-330
- [20] Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Muir S, Keith WN (2000): Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2, 197-201
- [21] Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicens S, Szczésna A, Juhász E, Esteban E, Molinier O, Brugger W, Melezínek I et al. (2010): Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: A multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 11, 521-529
- [22] Cardoso J, Molenaar L, de Menezes RX, Rosenberg C, Morreau H, Möslein G, Fodde R, Boer JM (2004): Genomic profiling by DNA amplification of laser capture microdissected tissues and array CGH. *Nucleic Acids Res* 32, e146
- [23] Carrasco RA, Stamm NB, Marcusson E, Sandusky G, Iversen P, Patel BKR (2011): Antisense inhibition of survivin expression as a cancer therapeutic. *Mol Cancer Ther* 10, 221-232
- [24] Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P, Minna JD (2004): Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11432-11437
- [25] Chujo M, Noguchi T, Miura T, Arinaga M, Uchida Y, Tagawa Y (2002): Comparative genomic hybridization analysis detected frequent overrepresentation of chromosome 3q in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 38, 23-29
- [26] Croce CM, Sozzi G, Huebner K (1999): Role of FHIT in human cancer. *J Clin Oncol* 17, 1618-1624
- [27] Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K, Pfeifer GP (2005): The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: An update. *Histol Histopathol* 20, 645-663

- [28] Danner BC, Didilis VN, Wiemeyer S, Stojanovic T, Kitz J, Emmert A, Füzesi L, Schöndube FA (2010): Long-term survival is linked to serum LDH and partly to tumour-LDH5 in NSCLC. *Anticancer Res* 30, 1347-1352
- [29] DeCamp MM, Mentzer SJ, Swanson SJ, Sugarbaker DJ (1997): Malignant effusive disease of the pleura and pericardium. *Chest* 112, 291S-295S
- [30] Detterbeck FC, Jantz MA, Wallace MA, Vansteenkiste J, Silvestri GA (2007): Invasive mediastinal staging of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 132, 202-220
- [31] Devesa SS, Shaw GL, Blot WJ (1991): Changing patterns of lung cancer incidence by histological type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1, 29-34
- [32] Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM (2005): International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 117, 294-299
- [33] Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, Morgan MB et al. (2008): Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069-1075
- [34] Doll R (1955): Mortality from lung cancer in asbestos workers. *Br J Ind Med* 12, 81-86
- [35] Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90, 590-610
- [36] El-Bayoumy K, Iatropoulos M, Amin S, Hoffmann D, Wynder EL (1999): Increased expression of cyclooxygenase-2 in rat lung tumors induced by the tobacco-specific nitrosamine 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanone: The impact of a high-fat diet. *Cancer Res* 59, 1400-1403

- [37] Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, Oprandi B, Buttitta F, Barassi F, Santambrogio L, Coggi G, Bosari S (2003): Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer. *J Pathol* 200, 620-626
- [38] Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J et al. (1995): The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241
- [39] Fernandez-Garcia I, Ortis-de-Solorzano C, Montuenga LM (2008): Telomeres and telomerase in lung cancer. *J Thorac Oncol* 3, 1085-1088
- [40] Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ (1995): Tumor progression and loss of heterozygosity at 5q and 18q in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 55, 220-223
- [41] Fong Y, Lin YS, Liou CP, Li CF, Tzeng CC (2010): Chromosomal imbalances in lung adenocarcinomas with or without mutations in the epidermal growth factor receptor gene. *Respirology* 15, 700-705
- [42] Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentiis M, De Placido S, Basolo F, Angeletti CA, Bevilacqua G (1997): Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: A prospective study. *J Natl Cancer Inst* 89, 881-886
- [43] Forgacs E, Biesterveld EJ, Sekido Y, Fong K, Muneer S, Wistuba II, Milchgrub S, Brezinschek R, Virmani A, Gazdar AF et al. (1998): Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene* 17, 1557-1565
- [44] Fujii T, Dracheva T, Player A, Chacko S, Clifford R, Strausberg RL, Buetow K, Azumi N, Travis WD, Jen J (2002): A preliminary transcriptome map of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 62, 3340-3346
- [45] Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, Takamoto S, Murakami Y (2003): Promotor methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer* 107, 53-59

- [46] Funai K, Yokose T, Ishii G, Araki K, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A (2003): Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 27, 978-984
- [47] Gaur P, Bielenberg DR, Samuel S, Bose D, Zhou Y, Gray MJ, Dallas NA, Fan F, Xia L, Lu J et al. (2009): Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 15, 6763-6770
- [48] Gazzeri S, Gouyer V, Vour'ch C, Brambilla C, Brambilla E (1998): Mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 16, 497-504
- [49] GEKID und RKI: Krebs in Deutschland. 5. Auflage; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert-Koch-Institut, Saarbrücken 2006
- [50] Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M (2008): Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis* 11, 31-39
- [51] Ginsberg RJ, Rubinstein LV (1995): Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 60, 615-623
- [52] Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM et al. (2010): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie* 64, e1-e164
- [53] Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L (2007): The IASLC lung cancer staging project: Proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2, 706-714

- [54] Goya T, Asamura H, Yoshimura H, Kato H, Shimokata K, Tsuchiya R, Sohara Y, Miya T, Miyaoka E (2005): Prognosis of 6644 resected non-small cell lung cancers in Japan: A Japanese lung cancer registry study. *Lung Cancer* 50, 227-234
- [55] Grondin SC, Liptay MJ (2002): Current concepts in the staging of non-small cell lung cancer. *Surg Oncol* 11, 181-190
- [56] Guilleret I, Yan P, Guillou L, Braunschweig R, Coindre JM, Benhattar J (2002): The human telomerase RNA gene (hTERC) is regulated during carcinogenesis but is not dependent on DNA methylation. *Carcinogenesis* 23, 2025-2030
- [57] Gunawan B, von Heydebreck A, Sander B, Schulten HJ, Haller F, Langer C, Armbrust T, Bollmann M, Gašparov S, Kovač D et al. (2007): An oncogenetic tree model in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) identifies different pathways of cytogenetic evolution with prognostic implications. *J Pathol* 211, 463-470
- [58] Hara H, Yamashita K, Shinada J, Yoshimura H, Kameya T (2001): Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34, 219-226
- [59] Hatcher J, Dover DC (2003): Trends in histopathology of lung cancer in Alberta. *Can J Public Health* 94, 292-296
- [60] Herbst RS, Sun Y, Eberhardt WEE, Germonpré P, Saijo N, Zhou C, Wang J, Li L, Kabbinnavar F, Ichinose Y (2010): Vandetanib plus docetaxel versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer (ZODIAC): A double-blind, randomised, phase III trial. *Lancet Oncol* 11, 619-626
- [61] Hesson LB, Cooper WN, Latif F (2007): Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster. *Oncogene* 26, 7283-7301
- [62] Higgins ITT, Mahan CM, Wynder EL (1988): Lung cancer among cigar and pipe smokers. *Prev Med* 17, 116-128



- [63] Hirayama T (1983): Passive smoking and lung cancer: Consistency of association. *Lancet* 322, 1425-1426
- [64] Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW (1995): Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 87, 895-902
- [65] Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Mitelman F (2004): Statistical dissection of cytogenetic patterns in lung cancer reveals multiple modes of karyotypic evolution independent of histological classification. *Cancer Genet Cytogenet* 154, 99-109
- [66] Hoffmann D, Hoffmann I (1997): The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* 50, 307-364
- [67] Huebner K, Croce CM (2003): Cancer and the FRA3B/FHIT fragile locus: It's a HIT. *Br J Cancer* 88, 1501-1506
- [68] Ishida T, Yano T, Maeda K, Kaneko S, Tateishi M, Sugimachi K (1990): Strategy for lymphadenectomy in lung cancer three centimeters or less in diameter. *Ann Thorac Surg* 50, 708-713
- [69] Jackman DM, Johnson BE (2005): Small-cell lung cancer. *Lancet* 366, 1385-1396
- [70] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ (2006): Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56, 106-130
- [71] Ji L, Roth JA (2008): Tumor suppressor FUS1 signaling pathway. *J Thorac Oncol* 3, 327-330
- [72] Joannes A, Bonnomet A, Bindels S, Polette M, Gilles C, Burlet H, Cutrona J, Zahm JM, Birembaut P, Nawrocki-Raby B (2010): Fhit regulates infiltration of lung tumor cells. *Oncogene* 29, 1203-1213

- [73] Job B, Bernheim A, Beau-Faller M, Camilleri-Broët S, Girard P, Hofman P, Mazières J, Toujani S, Lacroix L, Laffaire J et al. (2010): Genomic aberrations in lung adenocarcinoma in never smokers. *PloS One* 5, e15145
- [74] Junker K (2006): Aktuelle morphologische Diagnostik bösartiger Lungentumoren. *Pathologe* 27, 90-98
- [75] Junker K, Petersen I (2009): Kleinzelliges Lungenkarzinom. Pathologie und Molekularpathologie. *Pathologe* 30, 131-140
- [76] Junker K, Gumprich T, Müller KM (1997): Diskontinuierliche Lymphknotenmetastasen („skipping“) bei bösartigen Lungentumoren. *Chirurg* 68, 596-600
- [77] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821
- [78] Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 231-243
- [79] Kirchoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C (1998): Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 31, 163-173
- [80] Klein C, Vassilev LT (2004): Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer. *Br J Cancer* 91, 1415-1419
- [81] Knösel T, Yu Y, Stein U, Schwabe H, Schlüns K, Schlag PM, Dietel M, Petersen I (2004): Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with chromosomal gain at the cyclooxygenase-2 locus and decreased patient survival in advanced colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum* 47, 70-77

- [82] Kok K, Osinga J, Carritt B, Davis MB, van der Hout AH, van der Veen AY, Landsvater RM, de Leij LFMH, Berendsen HH, Postmus PE et al. (1987): Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *Nature* 330, 578-581
- [83] Kreuzer M, Müller KM, Brachner A, Gerken M, Grosche B, Wiethage T, Wichmann HE (2000): Histopathologic findings of lung carcinoma in german uranium miners. *Cancer* 89, 2613-2621
- [84] Kreuzer M, Jöckel KH, Wichmann HE, Straif K (2006): Rauchen, Passivrauchen und Krebserkrankungen. *Onkologie* 12, 1094-1105
- [85] Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, et al. (2001): TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 27, 427-430
- [86] Landegent JE, Jansen in de Wal N, Dirks RW, Baas F, van der Ploeg M (1987): Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 77, 366-370
- [87] Langer PR, Waldrop AA, Ward DC (1981): Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6633-6637
- [88] Lantuéjoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J, Brambilla E (2003): Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol* 200, 336-347
- [89] Leid M, Kastner P, Chambon P (1992): Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* 17, 427-433

- [90] Lerman MI, Minna JD (2000): The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: Identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. *Cancer Res* 60, 6116-6133
- [91] Li Jie, Zhang Z, Dai Z, Plass C, Morrison C, Wang Y, Wiest JS, Anderson MW, You M (2003): LOH of chromosome 12p correlates with Kras2 mutation in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 22, 1243-1246
- [92] Li Jing, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R et al. (1997): PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947
- [93] Loeb LA, Ernster VL, Warner KE, Abbotts J, Laszlo J (1984): Smoking and lung cancer: An overview. *Cancer Res* 44, 5940-5958
- [94] Luk C, Tsao MS, Bayani J, Shepherd F, Squire JA (2001): Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 125, 87-99
- [95] Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, Meert AP, Steels E, Vallot F, Verdebout JM et al. (2003): Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: A systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 89, 55-64
- [96] Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Haller A, Lothaire P, Meert AP, Noel S et al. (2005): The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: A systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 92, 131-139
- [97] Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, Murakami Y (2002): The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 277, 31014-31019

- [98] Mitelman F: ISCN 1995 An international system for human cytogenetic nomenclature. S. Karger, Basel 1995
- [99] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y et al. (2009): Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361, 947-957
- [100] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA (2008): Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 83, 584-594
- [101] Motoi N, Szoke J, Riely GJ, Seshan VE, Kris MG, Rusch VW, Gerald WL, Travis WD (2008): Lung adenocarcinoma: Modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlation between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol* 32, 810-827
- [102] Mountain CF (1997): Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 111, 1710-1717
- [103] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13, 9-22
- [104] NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group (2008): Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 26, 4617-4625
- [105] Ohgaki H, Kros JM, Okamoto Y, Gaspert A, Huang H, Kurrer MO (2004): APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. *Cancer Lett* 207, 197-203

- [106] Ohno H, Fukuhara S, Takahashi R, Mihara KI, Sugiyama T, Dor S, Uchino H, Toyoshima K (1987): C-myc and bcl-2 genes located on 18q21.3 in a follicular lymphoma cell line carrying a t(14;18) chromosomal translocation. *Int J Cancer* 39, 785-788
- [107] Osada H, Takahashi T (2002): Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* 21, 7421-7434
- [108] Pal SK, Figlin RA, Reckamp K (2010): Targeted therapies for non-small cell lung cancer: An evolving landscape. *Mol Cancer Ther* 9, 1931-1944
- [109] Pan H, Califano J, Ponte JF, Russo AL, Cheng KH, Thiagalingam A, Nemani P, Sidranski D, Thiagalingam S (2005): Loss of heterozygosity patterns provide fingerprints for genetic heterogeneity in multistep cancer progression of tobacco smoke-induced non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 65, 1664-1669
- [110] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005): Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108
- [111] Patel MP, Masood A, Patel PS, Chanan-Khan AA (2009): Targeting the Bcl-2. *Curr Opin Oncol* 21, 516-523
- [112] Pelosi G, Del Curto B, Trubia M, Nicholson AG, Manzotti M, Veronesi G, Spaggiari L, Maisonneuve P, Pasini F, Terzi A et al. (2007): 3q26 amplification and polysomy of chromosome 3 in squamous cell lesions of the lung: A fluorescence in situ hybridization study. *Clin Cancer Res* 13, 1995-2004
- [113] Petersen I (2010): Morphologische und molekulare Pathologie des Lungenkarzinoms. *Pathologie* 31, 204-210
- [114] Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A, Langreck H, Gellert K, Reichel M, Just K et al. (1997): Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 57, 2331-2335

- [115] Pfannschmidt J, Muley T, Hoffmann H, Bülzebruck H, Dienemann H (2006): Stadienabhängige Prognose nach lokal kompletter Resektion des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. *Dtsch Med Wochenschr* 131, 2643-2648
- [116] Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, Sause W, Smith TJ, Baker S, Olak J, Stover D, Strawn JR, Turrisi AT et al. (2004): American society of clinical oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: Update 2003. *J Clin Oncol* 22, 330-353
- [117] Phillips DH (2002): Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* 23, 1979-2004
- [118] Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Vynnyshenko I, Park K, Yu CT, Ganul V et al. (2009): Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): An open-label randomised phase III trial. *Lancet* 373, 1525-1531
- [119] Pisters KMW, Evans WK, Azzoli CG, Kris MG, Smith CA, Desch CE, Somerfield MR, Brouwers MC, Darling G, Ellis PM et al. (2007): Cancer care ontario and american society of clinical oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non-small-cell lung cancer guideline. *J Clin Oncol* 25, 5506-5518
- [120] Port JL, Kent M, Altorki NK (2002): Early lung cancer detection and treatment strategies. *Surg Oncol* 11, 191-199
- [121] Potiron VA, Roche J, Drabkin HA (2009): Semaphorins and their receptors in lung cancer. *Cancer Lett* 273, 1-14
- [122] Prudkin L, Behrens C, Liu DD, Zhou X, Ozburn NC, Bekele BN, Minna JD, Moran C, Roth JA, Ji L et al. (2008): Loss and reduction of Fus1 protein expression is a frequent phenomenon in the pathogenesis of lung cancer. *Clin Cancer Res* 14, 41-47

- [123] Ricciardi S, de Marinis F (2010): Multimodality management of non-small cell lung cancer patients with brain metastases. *Curr Opin Oncol* 22, 86-93
- [124] Riely GJ, Marks J, Pao W (2009): KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6, 201-205
- [125] Rigby PWJ, Diekmann M, Rhodes C, Berg P (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113, 237-251
- [126] RKI: Gesundheit in Deutschland (Gesundheitsberichterstattung des Bundes). Robert-Koch-Institut, Berlin 2006
- [127] Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, Socinski MA (2010): Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: Is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol* 28, 4769-4777
- [128] Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M (2009): Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 361, 958-967
- [129] Saccomanno G, Huth GC, Auerbach O, Kuschner M (1988): Relationship of radioactive radon daughters and cigarette smoking in the genesis of lung cancer in uranium miners. *Cancer* 62, 1402-1408
- [130] Sánchez-Alcázar JA, Bradbury DA, Pang L, Knox AJ (2003): Cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non-small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. *Lung Cancer* 40, 33-44
- [131] Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH (2006): Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355, 2542-2550



- [132] Santos ES, Blaya M, Raez LE (2009): Gene expression profiling and non-small-cell lung cancer: Where are we now? *Clin Lung Cancer* 10, 168-173
- [133] Sarker KP, Wilson SM, Bonni S (2005): SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor- $\beta$  responses. *J Biol Chem* 280, 13037-13046
- [134] Schaefer-Prokop C (2010): Konventionelle und CT-Diagnostik des Bronchialkarzinoms. *Radiologe* 50, 675-683
- [135] Schnedl W, Mikelsaar AV, Breitenbach M, Dann O (1977): DIPI and DAPI: Fluorescence banding with only negligible fading. *Hum Genet* 36, 167-172
- [136] Seute T, Leffers P, ten Velde GPM, Twijnstra A (2008): Detection of brain metastases from small cell lung cancer. *Cancer* 112, 1827-1834
- [137] Shepherd FA, Pereira JR, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R et al. (2005): Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353, 123-132
- [138] Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, Chansky K, Shaikh Z, Goldstraw P (2007): The international association for the study of lung cancer lung cancer staging project: Proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2, 1067-1077
- [139] Sherr CJ (1996): Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677
- [140] Silvestri GA, Gould MK, Margolis ML, Tanoue LT, McCrory D, Toloza E, Detterbeck F (2007): Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 132, 178-201
- [141] Sobin LH, Wittekind C: TNM classification of malignant tumours. 6. Auflage; Wiley-Liss, New York 2002

- [142] Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN (1997): Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 14, 1013-1021
- [143] Soria JC, Lee HY, Lee JI, Wang L, Issa JP, Kemp BL, Liu DD, Kurie JM, Mao L, Khuri FR (2002): Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* 8, 1178-1184
- [144] Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U et al. (1996): The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85, 17-26
- [145] Spira A, Ettinger DS (2004): Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med* 350, 379-392
- [146] Spiro SG, Gould MK, Colice GL (2007): Initial evaluation of the patient with lung cancer: Symptoms, signs, laboratory tests and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2<sup>nd</sup> edition). *Chest* 132, 149S-160S
- [147] Stahel RA, Ginsberg R, Havemann K, Hirsch FR, Ihde DC, Jassem J, Karrer K, Maurer LH, Osterlind K, Van Houtte P (1989): Staging and prognostic factors in small cell lung cancer: A consensus report. *Lung Cancer* 5, 119-126
- [148] Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998): Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39
- [149] Steelman LS, Bertrand FE, McCubrey JA (2004): The complexity of PTEN: Mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets* 8, 537-550
- [150] Stiewe T (2007): The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 7, 165-168

- [151] Stinchcombe TE, Socinski MA (2009): Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6, 233-241
- [152] Suen HC, Meyers BF, Guthrie T, Pohl MS, Sundaresan S, Roper CL, Cooper JD, Patterson GA (1999): Favorable results after sleeve lobectomy or bronchoplasty for bronchial malignancies. *Ann Thorac Surg* 67, 1557-1562
- [153] Sy SMH, Wong N, Mok TSK, Tsao MS, Lee TW, Tse G, Blackhall FH, Johnson PJ, Yim AP (2003): Genetic alterations of lung adenocarcinoma in relation to smoking and ethnicity. *Lung Cancer* 41, 91-99
- [154] Sy SMH, Wong N, Lee TW, Tse G, Mok TSK, Fan B, Pang E, Johnson PJ, Yim A (2004): Distinct patterns of genetic alterations in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Eur J Cancer* 40, 1082-1094
- [155] Taeger D, Fritsch A, Wiethage T, Johnen G, Eisenmenger A, Wesch H, Ko Y, Stier S, Muller KM, Bruning T et al. (2006): Role of exposure to radon and silicosis on the cell type of lung carcinoma in german uranium miners. *Cancer* 106, 881-889
- [156] Tai ALS, Yan WS, Fang Y, Xie D, Sham JST, Guan XY (2004): Recurrent chromosomal imbalances in nonsmall cell lung carcinoma: The association between 1q amplification and tumor recurrence. *Cancer* 100, 1918-1927
- [157] Tamura K, Zhang X, Murakami Y, Hirohashi S, Xu HJ, Hu SX, Benedict WF, Sekiya T (1997): Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 74, 45-49
- [158] Tan D, Kirley S, Li Q, Ramnath N, Slocum HK, Brooks JS, Wu CL, Zukerberg LR (2003): Loss of Cables protein expression in human non-small cell lung cancer: A tissue microarray study. *Hum Pathol* 34, 143-149
- [159] Thomas M, Gatzemeier U, Goerg R, Matthiessen W, Morr H, Schönfeld N, Ukena D, Stamatis G (2000): Empfehlungen zur Diagnostik des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie* 54, 361-371

- [160] Toulouse A, Morin J, Dion PA, Houle B, Bradley WEC (2000): RAR $\beta$ 2 specificity in mediating RA inhibition of growth of lung cancer-derived cells. *Lung Cancer* 28, 127-137
- [161] Travis WD, Travis LB, Devesa SS (1995): Lung Cancer. *Cancer* 75, 191-202
- [162] Travis WD, Brambilla E, Mueller-Hermelink HK, Harris CC: WHO classification of tumors, pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. IARC Press, Lyon 2004
- [163] Uchino K, Ito A, Wakayama T, Koma Y, Okada T, Ohbayashi C, Iseki S, Kitamura Y, Tsubota N, Okita Y et al. (2003): Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 98, 1002-1007
- [164] Vakiani E, Solit DB (2011): KRAS and BRAF: Drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol* 223, 219-229
- [165] Van Dyke AL, Cote ML, Wenzlaff AS, Abrams J, Land S, Iyer P, Schwartz AG (2009): Chromosome 5p region SNPs are associated with risk of NSCLC among women. *J Cancer Epidemiol* 2009, 242151
- [166] Van Rens MTM, de la Revière AB, Elbers HRJ, van den Bosch JMM (2000): Prognostic assessment of 2,361 patients who underwent pulmonary resection for non-small cell lung cancer, stage I, II and IIIa. *Chest* 117, 374-379
- [167] Van Schil PE (2001): Surgery for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34, S127-S132
- [168] Varella-Garcia M (2009): Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell Adh Migr* 4, 100-106

- [169] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C et al. (2004): In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848
- [170] Vineis P, Airoidi L, Veglia F, Olgiati L, Pastorelli R, Autrup H, Dunning A, Garte S, Gormally E, Hainaut P et al. (2005): Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ* 330, 277-281
- [171] Volm M, Koomägi R, Mattern J (1997): Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer* 74, 64-68
- [172] Von Heydebreck A, Gunawan B, Füzesi L (2004): Maximum likelihood estimation of oncogenetic tree models. *Biostatistics* 5, 545-556
- [173] Wald NJ, Nanchahal K, Thompson SG, Cuckle HS (1986): Does breathing other people's tobacco smoke cause lung cancer? *BMJ* 293, 1217-1222
- [174] Wang Y, Minoshima S, Shimizu N (1993): Precise mapping of the EGF receptor gene on the human chromosome 7p12 using an improved fish technique. *Jpn J Hum Genet* 38, 399-406
- [175] Watson WL, Berg JW (1962): Oat cell lung cancer. *Cancer* 15, 759-768
- [176] Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, Beroukhim R, Lin WM, Province MA, Kraja A, Johnson LA et al. (2007): Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450, 893-898
- [177] Weiss W (1999): Asbestosis: A marker for the increased risk of lung cancer among workers exposed to asbestos. *Chest* 115, 536-549
- [178] Wetmur JG (1975): Acceleration of DNA renaturation rates. *Biopolymers* 14, 2517-2524

- [179] WHO: International classification of diseases for oncology; 3. Auflage; World Health Organization, Genf 2000
- [180] Wilkening S, Bermejo JL, Hemminki K (2007): MDM2 SNP309 and cancer risk: A combined analysis. *Carcinogenesis* 28, 2262-2267
- [181] Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW, Garner HR, McKey B, Latif F et al. (2000): 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* 60, 1949-1960
- [182] Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH (2002): TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 94, 2511-2519
- [183] Woenkhaus J, Steger K, Werner E, Fenic I, Gamerdinger U, Dreyer T, Stahl U (2002): Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol* 198, 335-342
- [184] Wrage M, Ruosaari S, Eijk PP, Kaifi JT, Hollmén J, Yekebas EF, Izbicki JR, Brakenhoff RH, Streichert T, Riethdorf S et al. (2009): Genomic profiles associated with early micrometastasis in lung cancer: Relevance of 4q deletion. *Clin Cancer Res* 15, 1566-1574
- [185] Wu A, Wu B, Guo J, Luo W, Wu D, Yang H, Zhen Y, Yu X, Wang H, Zhou Y et al. (2011): Elevated expression of CDK4 in lung cancer. *J Transl Med* 9, 38
- [186] Wynder EL, Muscat JE (1995): The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology. *Environ Health Perspect* 103(Suppl 8), 143-148
- [187] Xu XC (2007): Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor- $\beta$  in cancer. *Cancer Lett* 253, 14-24

- [188] Yan TD, Black D, Bannon PG, McCaughan BC (2009): Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27, 2553-2562
- [189] Yi S (2006): P53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer. *Mol Carcinog* 45, 409-415
- [190] Yokoi K, Kamiya N, Matsuguma H, Machida S, Hirose T, Mori K, Tominaga K (1999): Detection of brain metastasis in potentially operable non-small cell lung cancer: A comparison of CT and MRI. *Chest* 115, 714-719
- [191] Yoshimi I, Ohshima A, Ajiki W, Tsukuma H, Sobue T (2003): A comparison in the incidence rate of lung cancer by histological type in the Osaka cancer registry, Japan and in the surveillance, epidemiology and end results program, USA. *Jpn J Clin Oncol* 33, 98-104
- [192] Yoshino I, Yohena T, Kitajima M, Ushijima C, Nishioka K, Ichinose Y, Sugimachi K (2001): Survival of non-small cell lung cancer patients with postoperativ recurrence at distant organs. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 7, 204-209
- [193] Zhu CQ, Cutz JC, Liu N, Lau D, Shepherd FA, Squire JA, Tsao MS (2006): Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 94, 1452-1459

---

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die am Zustandekommen dieser Dissertation beteiligt waren.

Für die Möglichkeit, unter seiner Leitung als Doktorand zu arbeiten, möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dipl.-Phys. F.A. Schöndube, herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Bernhard Danner, für seine uneingeschränkte Unterstützung meiner Tätigkeit als Doktorand und die Korrektur meiner Manuskripte. Vom ersten bis zum letzten Tag des Projektes haben mich seine guten Ratschläge in zahlreichen Gesprächen motiviert und inspiriert. Damit hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lázsló Füzési für seine vielen hilfreichen Ratschläge bei Planung, Durchführung und Auswertung dieser Studie. Seine Beurteilungen als Pathologe und seine Erfahrung mit der CGH waren für meine Arbeit besonders wertvoll.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Bastian Gunawan, Frau Christina Enders, Frau Judith Wolf-Sálgó, Frau Ina Dückmann und Frau Stefanie Schwager, die mich bei der Durchführung der Laborarbeit in allen Belangen unterstützt haben.

Für seine Unterstützung bei der Datenauswertung und für die Klärung der vielen statistischen Fragen, die mich bei der Auswertung der Daten beschäftigten, bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Klaus Jung.