

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

## DISSERTATION

# **Charakterisierung chromosomaler Imbalancen in Adenokarzinomen der Lunge mit Hilfe der Comparativen genomischen Hybridisierung (CGH)**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Almut Goeze  
aus Wolfenbüttel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. PD Dr. med. I. Petersen  
2. PD Dr. med G. Thiel  
3. PD Dr. med. Gebhart

Datum der Promotion: 30.10.2000

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
1. Allgemeine Bemerkungen	1
2. Epidemiologie des Lungenkarzinomes	2
3. Klassifizierung der Lungenkarzinome	3
4. Therapie von NSCLC unterschiedlicher Stadien	6
5. Risikofaktoren für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms	8
6. Prognosefaktoren	10
7. Krebs als Genetische Erkrankung	11
<b>II. Zielsetzung und Aufgabenstellung</b>	<b>14</b>
<b>III. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
1. Allgemeine Bemerkungen	15
2. Tumorkollektiv	15
3. Einzelschritte der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)	18
3a. Extraktion der Tumor-DNA	18
3b. DNA-Konzentrationsmessung mit „GeneQuant“ Photometer	19
3c. Nick-Translation	20
3d. Chromosomenpräparation aus Blutlymphozyten eines gesunden Spenders	21
3e. Hybridisierung	22
3f. DNA-Nachweis (Detektion)	24
4. Bildaufnahme und rechnergestützte Auswertung	26
4a. Bildaufnahme am Fluoreszenzmikroskop	26
4b. Bildverarbeitung	27
<b>IV. Resultate</b>	<b>30</b>
1. Auswertung der Summenkaryogramme	30
2. Ergebnisse aller Primärtumoren	33
3. Vergleich von metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren	36
4. Primärtumoren und dazugehörige Metastasen	39

	<b>Seite</b>
<b>V. Diskussion</b>	<b>41</b>
1. Allgemeine Bemerkungen zu den Ergebnissen	41
2. Das Muster von Veränderungen von Adenokarzinomen der Lunge im Vergleich zu Veränderungen von Plattenepithelkarzinomen und Kleinzelligen Karzinomen der Lunge	42
3. Vergleich von Veränderungen in Adenokarzinomen der Lunge mit Adenokarzinomen anderer Lokalisationen	43
4. Häufige Deletionen mit bereits bekannten Tumorsuppressorgenen	44
5. Häufige Überrepräsentationen mit bereits bekannten Onkogenen	46
6. Unterschiede zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren	48
7. Aussicht	50
<b>V. Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>VI. Literaturangaben</b>	<b>53</b>
<b>VII. Abkürzungen</b>	<b>61</b>

## I. Einleitung

Krebserkrankungen haben bekanntermaßen eine große Bedeutung in der heutigen Zeit. Neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören sie heute zu den häufigsten Todesursachen. Dabei beeinflußt das immer bessere Verständnis der zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen der Zellen einen Großteil der onkologischen Praktiken in Krebsprävention, Diagnosestellung und Behandlung. Mit der Identifikation von zellulären Onkogenen und Tumorsuppressorgen vor über 20 Jahren wurde man sich darüber bewußt, daß Krebs vor allem eine genetische Erkrankung ist (*de Vita et al., 1997a*). Dabei geht man davon aus, daß es sich um eine Akkumulation von Veränderungen handelt, wobei vor allem Regulatorgene des Zellzyklus eine Rolle spielen: Bei Verlust von Tumor-Suppressor-Genen oder Vervielfältigung von Onkogenen ist der Zellzyklus gestört, woraus ein Tumorwachstum resultieren kann.

Unter allen Krebserkrankungen spielen die Lungenkarzinome eine große Rolle, bei Männern in der westlichen Welt sind es die häufigsten Tumoren, bei Frauen treten nur das Mammakarzinom, Colonkarzinom und Melanome häufiger auf. Während das Lungenkarzinom noch vor 100 Jahren selten war, hat es im Laufe unseres Jahrhunderts sprunghaft zugenommen. Der Altersgipfel liegt im höheren Alter.

Größter Risikofaktor ist das Rauchen, dadurch steigt das Risiko etwa um den Faktor 14. Außerdem wurden auch vermehrt Lungenkarzinome bei Uranbergarbeitern beobachtet (*Harley et al., 1992*). Ebenso kommt es bei der Verarbeitung von Pechsubstanzen, und durch Arsen, Asbest, Beryllium, Nickel, aromatische Aminene und Chromaten zum gehäuften Auftreten dieser Tumorart (*Heilmann et al., 1993*).

Die Lungentumoren werden aufgrund ihres unterschiedlichen biologischen Verhaltens und somit unterschiedlicher Behandlung und Prognose in zwei große Gruppen unterteilt: Kleinzellige Lungenkarzinome (small cell lung cancer; SCLC) werden den nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (non small cell lung cancer; NSCLC) gegenübergestellt. Die zweite Gruppe (NSCLC) wird nochmals in die Untergruppen Plattenepithel-Karzinome (squamous cell cancer (SCC), Adenokarzinome und Großzellige Karzinome unterteilt.

Die Adenokarzinome werden heute häufiger diagnostiziert als früher (*Caldwell et al., 1996; Fry et al., 1996*). Sie treten übermäßig häufig bei Frauen und bei Nichtrauchern auf und sind meist peripher lokalisiert. Histologisch formieren sie sich zu Drüsen und/oder produzieren Schleim. Sie entstehen wahrscheinlich aus dem Oberflächenepithel der Alveolen oder den mukösen Bronchialdrüsen. Die bronchioloalveolären Karzinome als Unterklasse des Adenokarzinoms entstehen wahrscheinlich aus Pneumozyten Typ II.

## **1. Epidemiologie des Lungenkarzinomes**

Das Lungenkarzinom ist in der westlichen Welt und damit auch in Deutschland die häufigste Krebserkrankung bei Männern. Bei Frauen sind nur das Mamma-, das Corpuskarzinom des Uterus, das Magenkarzinom und das Colon-bzw. Rektumkarzinom häufiger. Nach Daten des Robert-Koch-Institutes betrug der Anteil der Inzidenz von Lungenkrebs an allen Krebsarten 1995 bei den Männer 17,9% (das entspricht ca. 28900 Neuerkrankungen an Lungenkarzinomen), bei Frauen 4,7% (das entspricht ca. 8100 Neuerkrankungen).

Durch die hohe Malignität dieser Tumorart sowie der meist erst späten Entdeckung wegen langer Symptomarmut ist die Bedeutung dieser Tumorart hinsichtlich der Mortalität noch herausragender: 26,7% der Todesfälle durch Krebserkrankung bei Männern und 7,9% bei Frauen werden durch Lungentumoren hervorgerufen. Damit ist dies bei den Männern die häufigste Tumorart, bei Frauen die dritthäufigste Tumorart, die zum Tode führt. Die 5-Jahres-Überlebensrate insgesamt wird bei Männern mit weniger als 9% angegeben, bei Frauen liegt sie bei 17% (*Robert-Koch-Institut*), in den USA wird die 5JÜR mit 13% angegeben (*de Vita et al., 1997a*), womit das Lungenkarzinom zu den prognostisch ungünstigsten Formen bösartiger Neoplasien gehört.

Die altersspezifische Inzidenz hat den für viele Krebslokalisation typischen Verlauf mit einem stetigen Anstieg und einem Maximum der Erkrankungshäufigkeit zwischen dem 75. und 80. Lebensjahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren.

Während die Inzidenz bei Männern in Deutschland seit etwa 20 Jahren nahezu konstant bleibt bzw. ein rückläufiger Trend beginnt, steigt bei Frauen die Inzidenz mit einer jährlichen Zuwachsrate von etwa 3% an.

## **2. Klassifizierung der Lungenkarzinome**

Wie bereits erwähnt werden die Lungentumoren in zwei große Gruppen unterteilt: Kleinzellige Lungenkarzinome (small cell lung cancer; SCLC) werden den nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (non small cell lung cancer; NSCLC), mit den Untergruppen Plattenepithel (squamous cell cancer; SCC), Adeno- und Großzelligen Karzinomen gegenübergestellt.

Wie allen andere bösartigen Tumoren werden auch die Lungenkarzinome in eine TNM-Klassifikation eingeordnet, und einem histologischen Grading je nach Differenzierungsgrad unterworfen. Für die Prognose eines Tumors und zur Erstellung einer Behandlungsstrategie sind folgende Faktoren von Bedeutung: histologische Klassifizierung und Differenzierung (Grading) des Tumors sowie Stadienzugehörigkeit, bestimmt durch Größe, Lage, Ausbreitung und Metastasierungsgrad des Tumors.

## 2a. Histologische Einteilung der Lungen- und Pleuratumoren nach WHO

Die Adenokarzinome werden zu den bösartigen epithelialen Tumoren der Lunge gerechnet.

Ebenfalls zu dieser Gruppe gehören die Plattenepithelkarzinome, Kleinzelligen Lungenkarzinome, Großzelligen, Adenosquamösen Karzinome, Karzinome mit pleomorphen, sarcomatoiden oder sarcomatösen Elementen, Karzinoide, Karzinome des Speicheldrüsentyps und nicht klassifizierte Karzinome. Jede dieser Gruppen wird noch in weitere Untergruppen unterteilt. Dabei wird das Adenokarzinom in folgende Subtypen unterteilt:

-azinär

-papillär

-bronchioloalveolär

-muzinös

-nicht muzinös

-gemischt muzinös und nicht muzinös oder indeterminierter Zelltyp

-solides Adenokarzinom mit Muzin

-Adenokarzinom mit gemischten Untergruppen

-Varianten:

-hochdifferenziertes fetales Adenokarzinom

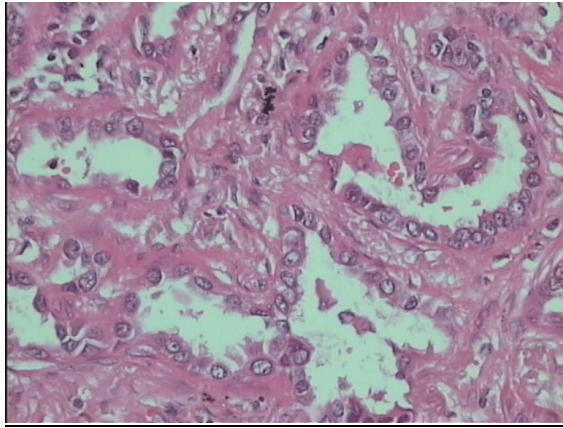
-muzinöses („kollides“) Adenokarzinom

-muzinöses Zystadenokarzinom

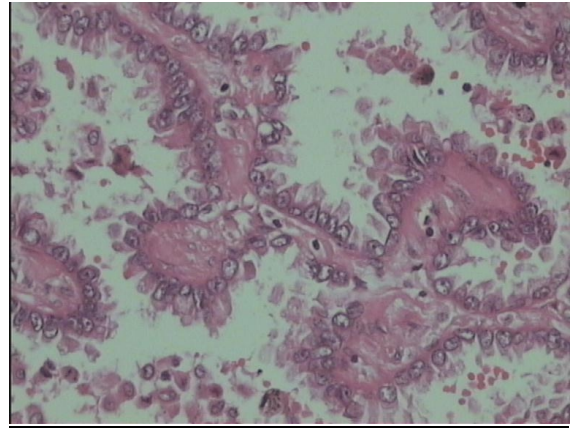
-Siegelzellring- Adenokarzinom

-klarzelliges Adenokarzinom

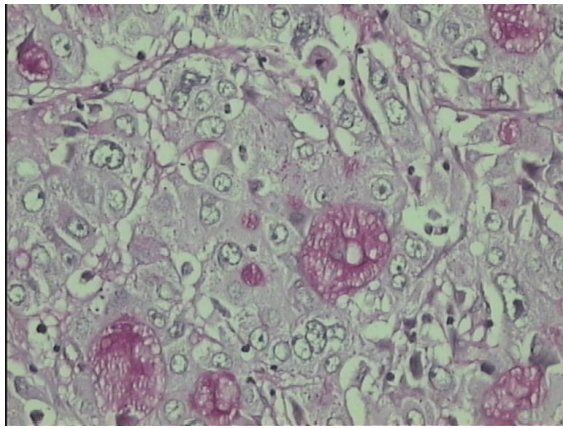
## Häufige histologische Formen des Adenokarzinoms der Lunge



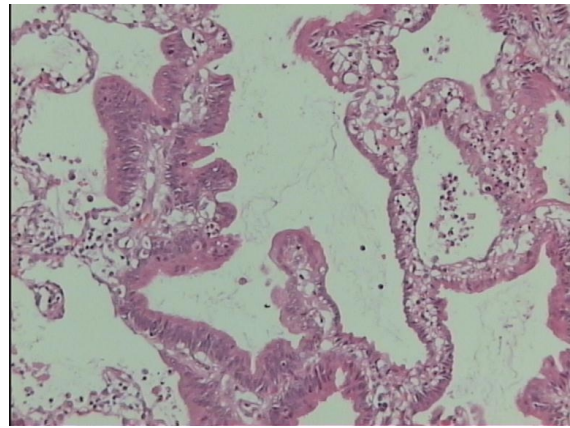
A: azinäres Adenokarzinom (HE)



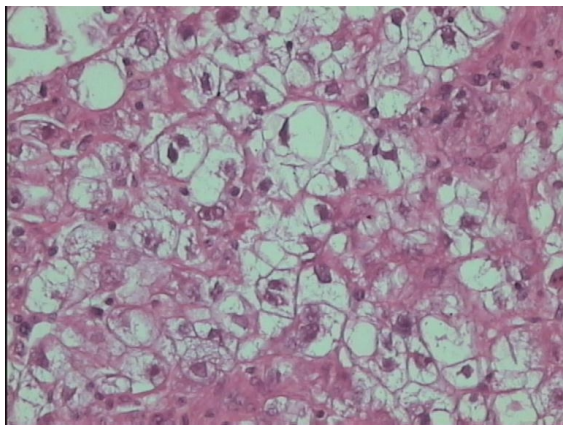
B: papilläres Adenokarzinom (HE)



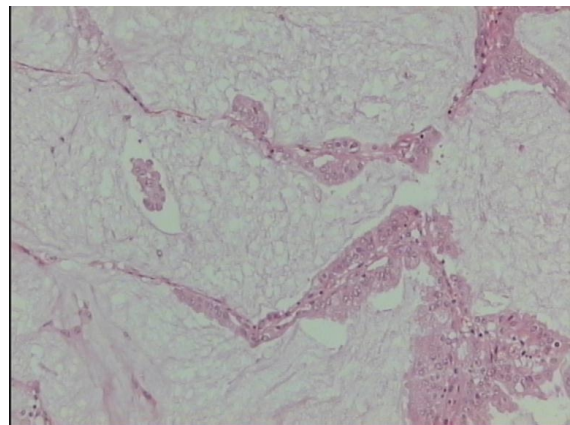
C: solides Adenokarzinom mit vornehmlich zytoplasmatischer Schleimbildung (PAS)



D: bronchioloalveoläres Karzinom (HE)



E: klarzellige Anteile in einem soliden Adenokarzinom (HE)



F: Adenokarzinom mit starker Schleimbildung (HE)

Häufig sind mehrere Differenzierungs- und Wachstumsformen in einem Tumor nachweisbar. Das bronchiolo-alveoläre Karzinom ist eine Sonderform des Adenokarzinoms und unterscheidet sich von anderen Adenokarzinomen im Ausbreitungs- und Metastasierungsmuster. Es wächst entlang der Alveolen und kleidet diese aus, durch Verschleppung der Tumorzellen über die Atemwege treten häufig Metastasen in der Lunge auf. Andere Adenokarzinome metastasieren dagegen vorwiegend hämatogen.

## **2b. Grading der Lungenkarzinome (NSCLC):**

Je nach Differenzierung der Tumorzellen werden Karzinome in verschiedene Grade eingeteilt, gut differenzierte Tumoren werden mit G1, Tumoren mit undifferenzierten Zellen mit G4 bezeichnet.

## **2c. TNM-Klassifikation bei Lungenkarzinomen**

Die Primärtumor-Klassifikation richtet sich in erster Linie nach der Tumorgöße, der Invasion in die Pleura oder Nachbarorgane sowie den Abstand zur trachealen Bifurkation. Adenokarzinome sind dabei vorwiegend peripher lokalisiert. Speziell werden unterschieden:

TX: Primärtumor wird nicht asserviert, oder Bestätigung des Vorhandenseins durch maligne Zellen im Sputum oder Bronchiallavage ohne Visualisierung durch Bildgebung oder Bronchoskopie

- T0: kein Hinweis auf Primärtumor
- T1: Tumor kleiner/gleich 3 cm in größter Ausdehnung, umgeben von Lunge oder Pleura visceralis, ohne bronchoskopischen Hinweis auf Invasion weiter proximal als Lobärbronchus (z.B. nicht in den Hauptbronchus)
- T2: Tumor mit irgendeinem der folgenden Kriterien: größer als 3 cm in größter Ausdehnung; involviert Hauptbronchus, mindestens 2 cm distal der Karina; Infiltriert Pleura visceralis; Ist assoziiert mit Atelektase oder obstruktiver Pneumonitis mit Ausdehnung bis zur Hilusregion, aber nicht die ganze Lunge involvierend
- T3: Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration irgendeiner der folgenden Strukturen:
- Brustwand, Diaphragma, Pleura mediastinalis, parietales Perikard; Tumor im Hauptbronchus weniger als 2 cm distal der Karina ohne Einbeziehung der Karina; Atelektase oder obstruktive Pneumonitis der gesamten Lunge

- T4: Tumor jeder Größe mit Infiltration irgendeiner der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Karina; Separate Tumorknoten im gleichen Lappen; Tumor mit malignem Pleuraerguß

Ein weiteres Kriterium zur Klassifikation eines Tumors ist das Lymphknotenstadium. Neben der groben Unterscheidung von Vorhandensein oder Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen (pN0/pT+) richtet sich die Unterteilung der Lymphknotenstadien nach deren Lokalisation:

- N0: keine Lymphknotenmetastasen
- N1: ipsilaterale bronchiale Lymphknotenmetastasen
- N2: ipsilaterale mediastinale, subkarinale Lymphknotenmetastasen
- N3: kontralaterale Lymphknotenmetastasen, bronchial, mediastinal, supraklavikulär

Von großer prognostischer Bedeutung ist das Auftreten von Metastasen. Dieser Aspekt geht folgendermaßen in die TNM-Klassifikation ein:

- M0: keine Fernmetastasen
- M1: Fernmetastasen

## 2d. Stadieneinteilung von Lungenkarzinomen

Basierend auf die TNM-Klassifikation wurde folgende klinische Stadieneinteilung festgelegt.

Die verschiedenen Stadien unterscheiden sich in Prognose und Behandlungsstrategie.

Okkultes Karzinom:	TX	N0	M0
Stadium 0:	Tis	N0	M0
Stadium IA:	T1	N0	M0
Stadium IB:	T2	N0	M0
Stadium IIA:	T1	N1	M0
Stadium IIB:	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA:	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Stadium IIIB:	jedes T	N3	M0
	T4	jedes N	M0
Stadium IV:	jedes T	jedes N	M1

### **3. Therapie von NSCLC unterschiedlicher Stadien**

#### **Stadium 0 (Carcinoma in situ)**

Das Carcinoma in situ sollte durch Operation heilbar sein, allerdings existiert eine hohe Inzidenz von Zweitkarzinomen, von denen viele nicht resektabel sind. Deshalb sollte die am wenigsten invasive Technik gewählt werden. Als Alternative für eine sorgfältig ausgewählte Gruppe von Patienten wird die endoskopische Phototherapie mit einem Hämatoporphyrin-Derivat beschrieben (*Furuse et al., 1993*).

#### **Stadium I**

Die Therapie der Wahl ist die Operation. Dabei wird in der Regel eine Lobektomie mit Lymphadenektomie durchgeführt. Prinzipiell besteht auch die Möglichkeit einer eingeschränkten Resektion (sog. atypische Resektion), bei der lediglich der Tumor entfernt wird. Beim Vergleich von Lobektomie mit eingeschränkter Resektion zeigte sich eine Verminderung der lokalen Rezidive bei Lobektomierten, aber keine signifikanten Unterschiede in der totalen Überlebenszeit (*Ginsberg et al., 1995*).

Bei Inoperabilität kann eine Strahlentherapie mit kurativem Ansatz in Erwägung gezogen werden. Dabei sollte eine Bestrahlung mit mindestens 6.000 cGy mit Megavoltage-Technik durchgeführt werden. Damit kann ein vergleichbares Ergebnis der 5JÜR wie mit einer operativen Therapie erreicht werden (*Noordijk et al., 1988*).

#### **Stadium II**

Auch im Stadium II ist die Therapie der Wahl die Operation. Dabei muß allerdings das Risiko der hohen postoperativen Mortalität bei Pneumektomie (5-8%) und Lobektomie (3-5%) mitbetrachtet werden.

Nichtoperable Patienten im Stadium II und ausreichender pulmonaler Reserve können für die Radiotherapie mit kurativem Ansatz geeignet sein (*Komaki et al., 1985*).

Viele operativ behandelte Patienten entwickeln regionale Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Eine adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin, Doxorubicin und Cyclophosphamid führte zu einer leichten Erhöhung der rezidivfreien Überlebenszeit vor allem im ersten postoperativen Jahr und einer Verlängerung der totalen Überlebenszeit (*Holmes, 1994*).

### **Stadium III**

Je nach klinischen Umständen kommt für Patienten mit Tumoren im Stadium IIIa die Strahlentherapie, Chemotherapie, Operation oder die Kombination dieser Möglichkeiten in Frage. Bei Patienten mit N2-Tumoren stellte sich die präoperative (neoadjuvante) Chemotherapie als effektiv heraus (*Rosell et al., 1994*).

Patienten mit Tumoren des Stadiums IIIb profitieren nicht von einer alleinigen Operation, ihnen wird am besten geholfen mit initialer Chemotherapie, Chemotherapie plus Bestrahlung oder alleiniger Bestrahlung.

Insgesamt zeigten Patienten im Stadium III bei einer Kombination von Radio- und Chemotherapie (Kombination auf Cisplatin-Basis) eine 10%ige Reduktion der Mortalität im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie (*Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group, 1995*).

### **Stadium IV**

Wichtigste Therapieform im Stadium IV ist die Chemotherapie. Kombinations-Chemotherapien auf Cisplatin- oder Carboplatinbasis zeigen objektive Rückbildungsraten (dabei einige wenige vollständige Rückbildungen). Dadurch profitieren die Patienten im Vergleich zu supportiver Pflege am meisten (*Souquet et al., 1993*).

Radiotherapie kann bei der symptom-orientierten Behandlung aufgrund der lokalen Invasion von NSCLC z.B. in Trachea, Oesophagus oder Knochen oder bei Gehirnmetastasen effektiv sein.

In vielen Fällen ist der palliative Einsatz von endobronchialer Lasertherapie und/oder Brachytherapie zur Behandlung von proximal obstruierenden Läsionen sinnvoll (*Miller et al., 1990*).

Weitere aktuelle Informationen zur Therapie von Lungenkarzinomen sind über die Internetseite [http://www.meds.com/pdq/nonsmallcell\\_pro.html](http://www.meds.com/pdq/nonsmallcell_pro.html) erhältlich.

## **4. Risikofaktoren für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms**

### **4a. Rauchen**

Das Rauchen, insbesondere Zigarettenrauchen, ist unumstritten der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms. Dabei geht man davon aus, daß bei den Männern ca. 80% der Lungenkarzinome diesem Karzinogen zuzuschreiben sind (*Minna et al., 1989*). Bei Frauen liegt die Rate mit ca. 75% etwas niedriger, der Anstieg des Lungenkarzinoms bei Frauen wird aber der Änderung des Rauchverhaltens zugeschrieben, da es heute mehr Raucherinnen als früher gibt.

Das relative Risiko liegt verglichen mit Nichtrauchern für alle Typen zusammengefaßt bei 13.4, die einzelnen Untergruppen sind unterschiedlich davon betroffen: Bei Großzellern liegt das relative Risiko bei 34.3, bei Plattenepithelkarzinomen bei 18.8, bei Kleinzelligen Lungenkarzinomen bei 14.3 und bei Adenokarzinomen bei 7.9 (*Barbone et al., 1997*).

In der Gruppe der Nichtraucher geht man davon aus, daß auch bei ihnen 1/3, wenn sie mit Rauchern zusammenwohnen, bzw. 1/4 in der Gesamtgruppe der Nichtraucher durch das Passivrauchen verursacht wird (*Wald, 1986*). Es wird angenommen, daß Passivraucher die gleichen chemischen Substanzen inhalieren, allerdings mit einem höheren Anteil von N-nitrosaminen und kleinerer Partikelgröße (*Hoffmann et al., 1993*).

Folgende Substanzen des Zigarettenrauches werden als Kanzerogene bzw. Mutagene betrachtet: Benzopyrene, Dibenzanthrazene, Nicotin, Tabak-spezifische Nitrosamine, Nickel, Cadmium und <sup>210</sup>Po als Partikel sowie Hydrazine und Vinylchlorid in der Gasphase.

Außerdem scheinen diese Inhaltsstoffe die Karzinomentstehung durch andere Substanzen wie Asbest oder Radon überproportional stark zu fördern (*Loebl et al., 1984*). Bei der Kombination von Rauchen und Asbest bzw. Radon besteht mehr als ein additives Lungenkarzinomrisiko.

### **4b. Berufsbedingte Risikofaktoren**

Durch folgende Substanzen steigt das Risiko der Entwicklung eines Lungenkarzinoms bei berufsbedingter Exposition auch ohne Rauchen: Asbest, Radon, Chlormethyläther, polyzyklische aromatische Hydrocarbonate, Chrom, Nickel und anorganische Arsen-Verbindungen (*Fraumeni et al., 1975; Fraumeni et al., 1982*). Weitere Substanzen erhöhen das Risiko bei starken Rauchern.

#### **4c. Ernährungsfaktoren**

Antioxidanzien wie die Vitamine C und E, Karotinoide oder Selen spielen in der Prävention der Krebsentstehung eine große Rolle. Sie fangen Radikale ab, die endo- oder exogen durch Tabakrauch, Lösungsmittel oder Umweltverschmutzung entstanden sind. Während Vitamin C und E sowie Karotinoide freie Radikale abfangen, ist Selen eine Komponente von antioxidativen Enzymen (*Dorgan et al., 1991*).

#### **4d. Weitere Risikofaktoren**

Menschen mit eingeschränkter Lungenfunktion (*Nomura, 1991*) zeigen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Auch die familiäre Prädisposition spielt eine gewisse Rolle (*Osann, 1991*).

### **5. Prognosefaktoren**

Nach Diagnosestellung ist es nötig, das Stadium der Erkrankung festzustellen, um so eine adäquate Therapie einleiten zu können. Das Hauptkriterium für die Prognose ist das klinische Stadium der Erkrankung, also Größe und Lage des Tumors sowie das Vorhandensein bzw. Fehlen von Lymphknoten- und Fernmetastasen.

Tumoren der Stadien I und II sowie operable Tumoren des Stadiums III haben dabei durch die Operation eine bessere Prognose als Tumoren, die operativ nicht oder nicht vollständig entfernt werden können. Während die 5-Jahres-Überlebensrate bei Tumoren des Stadiums I bei 60-80% liegt, sinkt diese bei Tumoren im Stadium IIIB und IV unter 5%.

Die histologischen Untergruppen haben ebenfalls einen Einfluß auf die Prognose, auch wenn dieser geringer ist als das Stadium. So haben Adenokarzinome, außer den T1 N0-Tumoren dieser Gruppe, insgesamt eine schlechtere Prognose als Plattenepithelkarzinome (*de Vita et al., 1997b*). Selbst bei kurativ angesetzten Operationen kann es zur Metastasierung kommen, und zwar bei Großzellern in 14%, bei Plattenepithelkarzinomen in 17%, bei Adenokarzinomen in 40% und bei Kleinzellern in 63% der Fälle, was häufig die schlechte Prognose der Adenokarzinome und der Kleinzeller bedingt.

Bei den nicht-resizierbaren Tumoren (Stadium III und IV) ist die 5JÜR sehr gering. Es wurde nach Prognosefaktoren vor Behandlungsbeginn gesucht. Folgende Faktoren wurden beschrieben (*de Vita et al., 1997c*):

- Aberrierende Gen-Expression:
- ras-Familie
  - myc-Familie
  - HER-2/neu (p185)
  - p53
- Tumor-assoziierte Antigene:
- Blutgruppenantigene
  - Antigen 43-9F
  - Serum CA 12
- Andersartige Faktoren:
- Tumorzell-DNA-Gehalt
  - Wachstumsfaktoren
  - Tumorzellproliferation (schlechte Prognose bei hoher Proliferation)
  - lösliche Interleukin-2-Rezeptoren
  - Tumor-Angiogenese-Faktor
  - Neuroendokrine Differenzierung
  - Verlust von Chromosom 3p

Zu vielen dieser Prognosefaktoren gibt es widersprüchliche Untersuchungsergebnisse. Mutationen von K-ras bei allen NSCLC und p53 bei Adenokarzinomen gelten als negative Prognosefaktoren mit verringerter Lebenserwartung (*Huang et al 1998*). Insgesamt sind die Publikationen bezüglich dieser neuen molekularen Marker jedoch widersprüchlich, insbesondere p53 als Prognosefaktor beim Lungenkarzinom ist noch höchst umstritten.

Hinsichtlich des DNA-Gehaltes einer Tumorzelle wurde eine geringere Überlebenszeit von Patienten mit aneuploiden Tumoren im Vergleich zu diploiden Tumoren beobachtet (*Zimmerman et al., 1987*). Bei Adenokarzinomen im Stadium I wurde eine geringere 5JÜR und gehäuftes Auftreten von Gehirnmetastasen bei Tumoren mit >30% abnormer DNA beobachtet (*Roberts et al., 1998*).

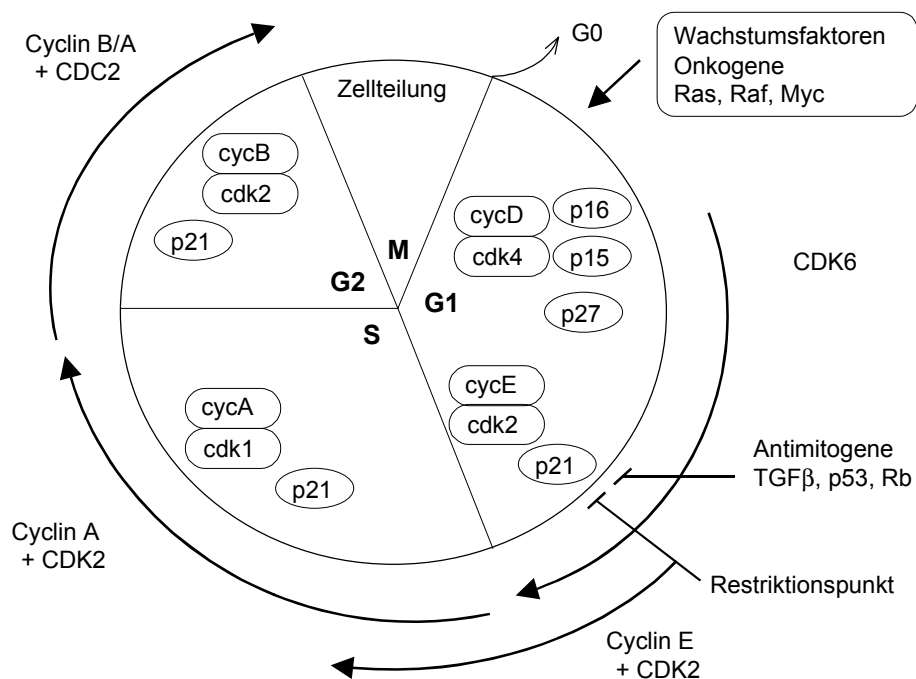
## 6. Krebs als genetische Erkrankung

Krebs kann als polygenetische Erkrankung betrachtet werden. Er wird verursacht durch Mutationen mehrerer Tumor-assoziiierterter Gene, wobei insbesondere Onkogene und Tumorsuppressorgene zu unterscheiden sind. Die Kanzerogenese ist ein Prozeß in mehreren Einzelschritten, erst die Addition mehrerer genetischer Veränderungen führt zur Entstehung eines manifesten Karzinoms. Auch in präneoplastischen Veränderungen wie Hyperplasien, Dysplasien oder Carcinomata in situ sind bereits genetische Veränderungen vorhanden. Dabei ist der Tumorphänotyp genetisch determiniert, es handelt sich um eine Störung und Deregulierung physiologisch aktiver oder mutierter Gene auf DNA-, RNA- und Proteinebene.

Ein Tumorwachstum entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen überschießender Proliferation und vermindertem Absterben von Tumorzellen, der Apoptose (programmierter Zelltod).

Onkogene, genauer Mutationen in Proto-Onkogenen, fördern die Tumorentstehung, während Tumorsuppressorgene sie verhindern. Dabei wirken Onkogene dominant, das heißt die Mutation eines Allels reicht aus zur Entfaltung der onkogenen Wirkung. Tumorsuppressorgene (TSG) wirken rezessiv, das heißt beide Allele eines TSGs müssen mutiert sein, damit es zur Tumorentstehung kommt.

Onkogene und Tumorsuppressor-Gene interagieren vielfach mit Proteinen des Zellzyklus. Die Abbildung zeigt Zusammenhänge im Zellzyklus: Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und deren Interaktion mit Tumorsuppressor-Genen und Onkogenen.



## 6a. Wichtige Onkogene

Protoonkogene, die Komponenten der Zellsignale zur Zyklusregulation kodieren, können in Lungentumoren abnormale Aktivität zeigen und als Onkogene wirken.

- eine Überrepräsentation von ERBB1 tritt vorwiegend bei NSCLC auf, eine Relation zu Tumor-Stadium und Differenzierung wird angenommen (*Cerny et al., 1986*).
- ERBB2 ist bei ca. 1/3 der NSCLC stark exprimiert, besonders in Adenokarzinomen (*Weiner et al., 1990*). Eine Expression von ERBB2 in Adenokarzinomen korreliert mit einer geringeren Überlebensrate.
- Zu der RAS-Gen-Familie gehören vor allem KRAS, HRAS und NRAS, welche durch verschiedene Punktmutationen aktiviert werden. Dieses ist vor allem bei Adenokarzinomen der Fall, und zwar in 20-30% der Fälle (*Richardson & Johnson., 1993*). 90% der Mutationen betreffen das Protoonkogen KRAS. Sie sind von klinischer Bedeutung, da sie sowohl für frühe als auch für fortgeschrittene Stadien eine schlechte Prognose bedeuten und so zu einem klinisch sinnvollen Prognosefaktor werden könnten (*Slebos et al., 1990; Mitsudomi et al., 1991; Rosell et al., 1994*).
- Aus der myc-Genfamilie ist c-MYC am häufigsten aktiviert, sowohl in NSCLC als auch in SCLC, wohingegen Abnormalitäten von N-MYC und L-MYC normalerweise nur in SCLC erscheinen.

## 6b. Tumorsuppressorgene

- Eines der wichtigsten und bekanntesten Tumorsuppressorgene ist das p53. In Lungenkarzinomen ist eine Kopie der entsprechenden chromosomalen Region 17p13 häufig verloren gegangen oder durch Mutation inaktiviert worden (*Greenblatt, 1994; Chiba et al., 1990*).
- Ein weiteres wichtiges Tumorsuppressorgen ist das Retinoblastoma-Gen (RB), welches auf dem Chromosomenabschnitt 13q14 lokalisiert ist. Aberration in Expression oder Funktion finden sich in über 90% SCLC und in 20-30% der NSCLC (*Xu et al., 1991; Hensel et al., 1990*).
- Weitere Regulatoren des Zellzyklus sind als Cykline bekannt, so z.B. das cyclin D1, sowie Zyklin-abhängige Kinasen wie CDK4. Das cyclin D1 inaktiviert die RB-Aktivität durch Stimulation der RB-Phosphorylierung mit Hilfe von CDK4, so daß in Tumoren mit normaler RB-Aktivität erhöhte Aktivität von cyclin D1 ebenfalls zur Inhibition von RB führen kann. Eine weitere Möglichkeit der RB-Inaktivierung ist der Wegfall von CDK-

Inhibitoren wie p16<sup>INK4</sup>, auch CDKN2 genannt, mit Lokalisation auf dem Chromosomenabschnitt 9p21, und das nahe davon gelegene p15<sup>INK4B</sup>. Diese beiden Gene sind in NSCLC häufig deletiert (*Okamoto et al., 1995*).

## **Zielsetzung und Aufgabenstellung**

### **1. Zielsetzung**

Zielsetzung meiner Arbeit war die Identifizierung chromosomaler Imbalancen beim Adenokarzinom der Lunge, die mit

- der Differenzierung und
- der Metastasierung dieser Tumoren assoziiert sind.

Dabei wurde besondere Aufmerksamkeit folgenden Fragen zugewandt:

- Gibt es ein spezifisches Muster von genetischen Veränderungen bei Adenokarzinomen der Lunge?
- Ist eine Abgrenzung der Adenokarzinome gegenüber anderen NSCLC möglich?
- Gibt es genetische Veränderungen, die einen Tumor zur Metastasierung befähigen?
- Finden sich genetische Veränderungen, die das erhöhte Potential zur Metastasierung von Adenokarzinomen gegenüber den anderen NSCLC erklären?

### **2. Aufgabenstellung**

Aus den in der Zielsetzung aufgestellten Fragen ergaben sich folgende Aufgabenstellungen:

- Untersuchung eines Kollektivs von Adenokarzinomen der Lunge mittels CGH, darunter Untersuchung von Autopsiefällen und Operationspräparaten
- Vergleich von Tumorgruppen (metastasierende versus nicht-metastasierende Karzinome)
- Analysen von Primärtumoren und Metastasen desselben Patienten

### III. Material und Methoden

Mit der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH), einer molekularzytogenetischen Methode, ist man in der Lage, einen Überblick über die genetischen Veränderungen eines Tumors auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene zu erlangen. Die detektierbaren Veränderungen werden dabei entweder als DNA-Gewinn oder DNA-Verlust klassifiziert. Dabei kann ein DNA-Gewinn auf eine Onkogen-Aktivierung, der DNA-Verlust dagegen auf Inaktivierung eines Tumorsuppressor-Gen hinweisen. Das maximale Auflösungsvermögen liegt dabei etwa in der Größenordnung einer chromosomalen Bande (*Petersen I et al., 1996*). Diese wiederum entspricht einem DNA-Gehalt von 10 Mio. Nukleotiden (10 Megabasen). DNA-Gewinne lassen sich gegenüber Deletionen besser nachweisen, da eine DNA-Sequenz mehrfach amplifiziert sein kann. Insbesondere wenn viele Kopien des Amplicons vorliegen, ist eine Auflösung etwa im Bereich von 100 Kilobasen möglich (*Kallioniemi, 1994*).

Die Durchführung der CGH gliedert sich in folgende Schritte: Präparation der genomischen Tumor- und Normal-DNA, DNA-Markierung mit Nick-Translation, Metaphasenpräparation, Hybridisierung, DNA-Nachweis und schließlich die Bildverarbeitung mit Untergliederung in Bildaufnahme und Bildauswertung.

#### 1. Tumorkollektiv

Zur Durchführung der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) wurde die benötigte Tumor-DNA aus tiefgefrorenem Material gewonnen, welches einerseits von Operationspräparaten, andererseits von Autopsiefällen stammte.

##### 1a. Primärtumoren aus Operationspräparaten

Lfd. Nr.	Code-Nr.	E-Nr.	Geschl.	Alter	Grade	Stage
1	L71	13233.95	m	71	II-III	pT2 pN1
2	L74	15718.95	m	66	III	pT3 pN2
3	L70	16972.95	m	66	III	pT1 pN0
4	L73	19936.95	m	59	II-III	pT2 pN1
5	L79	353.96	m	35	III	pT2 pN1
6	L134	947.96	f	49	II-III	pT1 pN2

Lfd. Nr.	Code-Nr.	E-Nr.	Geschl.	Alter	Grade	Stage
7	L135	2725.96	m	66	II	pT1 pN0
8	L136	2935.96	m	71	II	pT2 pN0
9	L137	3372.96	m	77	II	pT2 pN0
10	L148	8742.96	m	47	III	pT2 pN1
11	L152	9869.96	f	72	II	pT2 pN0
12	L65	10031.96	m	55	III	pT2 pN0
13	L67	10433.96	f	57	I	pT1 pN0
14	L68	10743.96	f	54	II	pT1 pN0
15	L69	11420.96	m	60	III	pT2pN0
16	L154	11562.96	f	57	II	pT2 pN0
17	L155	12007.96	m	61	II	pT2 pN0
18	L156	12256.96	f	76	I	pT2 pN0
19	L158	12425.96	f	68	II	pT1 pN0
20	L160	13188.96	f	55	II	pT1 pN0
21	L161	13300.96	m	70	II	pT1 pN0
22	L80	13319.96	m	55	III	pT2 pN2
23	L162	13378.96	m	63	II	pM1
24	L163	13705.96	m	74	II	pT2 pN0
25	L165	14424.96	f	62	II	pT1 pN2
26	L175	19388.96	m	51	III	pT2 pN2
27	L178	21234.96	m	62	II	pT2 pN0
28	L179	21255.96	m	70	III	pT2 pN0
29	L181	22360.96	m	62	II	pT4 pN0
30	L182	23440.96	m	42	II	pT2 pN2 pM1
31	L184	24208.96	m	62	III	pT2 pN2
32	L185	24430.96	m	60	II	pT1 pN0
33	L186	24402.96	m	54	III	pT1
34	L187	24600.96	w	63	II	pT1 pN0
35	L190	25890.96	m	66	III	pT3 pN1
36	L191	25901.96	m	71	III	pT2 pN0

Lfd. Nr.	Code-Nr.	E-Nr.	Geschl.	Alter	Grade	Stage
37	L192	26378.96	m	65	II-III	pT2 pN1
38	L194	26443.96	m	58	II	pT1 pN0
39	L198	27599.96	m	64	II	pT1 pN2
40	L199	495.97	f	58	II	pT2 pN1 pM1
41	L202	1450.97	m	60	III	pT2 pN1
42	L204	1592.97	m	54	II	pT2 pN2
43	L208	4150.97	w	62	II	pT1 pN1
44	L213	5328.97	w	53	II	pT2 pN0
45	L216	5835.97	w	65	III	pT2 pN0
46	L218	6058.97	m	60	III	pT2 pN2

## 2b. Autopsiefälle mit Primärtumoren und ggf. dazugehörigen Metastasen

Lfd. Nr.	Code	E.-Nr.	Geschl.	Alter	Grade	Stage	Metast. (bearb.)
A1	L81	1001-1,2,3	m	68	II	pT4N3M1	2, 3: Nieren bds.
A2	L82	1031-1	w	83	II	pT4N2M0	keine
A3	L85	1043-1	w	73	III	pT3N3M1	keine
A4	L89	1270-1	f	76	II	pT4N2M1	keine
A5	L114	129.1- 2, 3, 4, 7	m	62	III	pT1N3M1	2, 3, 4: Leber; 7: Knochen
A6	L107	13-1, 2, 4	m	55	II	pT4N2M1	2: Nebenniere; 4: Leber
A7	L115	273-1, 2, 4, 5, 6	m	69	III	pT4N3M1	2: Lymphkn.; 4, 5, 6: Leber
A8	L109	348-1, 2, 3, 5	w	61	II	pT3N2M1	2, 3: Leber; 5: Niere
A9	L110	368-1, 2, 3	m	80	II	pT2N2M1	2: Pons; 3: Großhirn
A10	L113	47-1, 4, 5	w	74	II	pT2N3M1	4: Lunge; 5: Knochen
A11	L93	51-1	m	66	II	pT4N3M1	keine

Lfd. Nr.	Code	E.-Nr.	Geschl.	Alter	Grade	Stage	Metast. (bearb.)
A12	L105	481-1, 3, 5, 6	m	64	III	pT4N3M1	3:Nebenniere; 5: Pons; 6: Kleinhirn
A13	L95	517-1,2	w	88	II	pT4N3M1	2: Großhirn
A14	L97	649-1, 4, 6	m	54	II	pT3N3M1	4: Lymphkn.; 6: Knochen

## 2. Einzelschritte der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)

### 2a. Extraktion der Tumor-DNA

Prinzip: Aus den tiefgefrorenen Tumorproben wurden dünne Gewebsschnitte gewonnen, wobei der erste und der letzte Schnitt für die Histologie gesichert wurde. Die Zellproteine wurden mit Proteinase K verdaut und dadurch die DNA freigelegt. Aus dem Digestionspuffer wurde diese freie DNA mit Hilfe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert, mit Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen, schließlich getrocknet und in Aqua dest. gelöst.

Procedere: Der erste Schritt zu DNA-Gewinnung aus den tiefgefrorenen Tumor-Proben erfolgte mit Hilfe des Cryotoms. Dabei wurden ca. 20 Schnitte mit etwa 30µm Dicke gewonnen und in ein Eppendorf-Tube mit 900µl Digestionspuffer aus 50mM Tris (pH 8.5), 1mol EDTA und 0.5% Tween 20 überführt.

Jeweils der erste und der letzte Schnitt (mit Schichtdicke 5-8µm) wurden auf ein Objektträger gegeben und zur HE-Färbung gegeben, damit die Anzahl der Tumorzellen in dem entsprechenden Gewebstück histologisch quantifiziert werden konnte.

Zur Freisetzung der DNA aus dem Zellverband wurde dem Digestionspuffer anschließend 30µl Proteinase K (aus einer 20mg/ml Stammlösung) hinzugefügt, der Verdau mit Hilfe dieses Enzyms erfolgte bei 50°C für ca. 20 Stunden. Bei Bedarf, also wenn danach noch Gewebsverband sichtbar war, erfolgte erneute Proteinase K-Zugabe und Verdau für einige Stunden.

Zur Extraktion der DNA wurden der Probe 900µl Phenol:Chloroform:Isoamoylalkohol hinzugefügt, die Probe gut durchmischt (10 Minuten im Schüttler) und anschließend 20 Minuten bei 14000 U/Minute zentrifugiert. Dabei löste sich die DNA in der oberen Phase, wohingegen die anderen Zellbestandteile im unteren Bereich zurückblieben.

Der Überstand mit der DNA wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und ein weiterer Extraktionsschritt mit Phenol:Chloroform:Isoamoylalkohol nach dem obigen Prinzip durchgeführt. Ein weiteres Mal wurde Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) eingesetzt.

Anschließend erfolgte die Fällung der gelösten DNA mit Hilfe von Isopropanol. Der Probe wurden 90µl 3M NaCl und 1000µl Isopropanol zugefügt und nach Mischung 30 Minuten bei minus 80°C gelagert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 4°C und 13000 U/Minute. Am Boden wurde ein aus DNA bestehendes Pellet sichtbar.

Die Lösung wurde dekantiert, das Pellet anschließend mit 300µl 70% Ethanol gewaschen, erneut wurde zentrifugiert und dekantiert und das Pellet getrocknet.

Zuletzt wurde die Tumor-DNA in 100µl Aqua ad iniectabile gelöst und anschließend die DNA-Konzentration photometrisch gemessen.

## **2b. DNA-Konzentrationsmessung mit „GeneQuant“ Photometer**

Prinzip: die unterschiedliche Lichtbrechung von Wasser im Vergleich zum Wasser mit gelöster DNA (bei einer Wellenlänge von 260nm) wurde ausgenutzt.

Procedere: Die Messung erfolgte in einer Verdünnung von 1: 20, es wurden 5µl Probe und 95µl aqua ad iniectabile benutzt und der Konzentrationswert der ursprünglichen DNA-Probe vom Gerät berechnet. Als Eichlösung wurde aqua ad iniectabile ohne weitere Zusätze eingesetzt.

Die Absorption für die DNA-Konzentration wurde bei 260nm gemessen, als Kontrolle der Reinheit der DNA-Probe wurde außerdem auch noch die Absorption bei 280nm gemessen, bei Ratio-Werten (Verhältnis Absorption bei 260nm / Absorption bei 280nm ) um 1,8 konnte von einer ausreichenden Reinheit der DNA-Probe ausgegangen werden.

Proben mit DNA-Konzentrationen von mindestens 150nm/µl und einem ausreichenden Grad an Reinheit wurden zur weiteren Bearbeitung benutzt.

## **2c. Nick Translation**

Prinzip: Die Nick-Translation diente der unterschiedlichen Markierung der Tumor- und der Normal-DNA.

Nach Behandlung mit DNase zum Erstellen von DNA-Einzelstrangbrüchen, sogenannten Nicks, wurden bei der Reparatur mit DNA-Polymerase Nukleotide in der Doppelstrang-DNA durch ähnliche mit der Haptene isotopisch markierte Nukleotide (Biotin bzw. Digoxigenin) ersetzt .

Außerdem wurden die DNA-Stränge fragmentiert, da für die weitere Verarbeitung DNA-Stränge von einer Länge von 100-500 Basenpaaren benötigt wurden.

Reagenzien: Für die Tumor-DNA wurde Biotin-dUTP als modifizierte Nukleotide, für normal-DNA Digoxigenin-dUTP (beide von Böhlinger-Mannheim) eingesetzt.

Weitere Reagenzien:

- DNTPs (normale Nukleotide): dATP, dCTP, dTP je 0.5mM, dTTP 0.1mM (Böhringer Mannheim)
- NT: Reaktionspuffer 10x: 0.5 M Tris pH 8, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mg/ml BSA
- β-ME (beta-Mercaptoethanol) 0.1M
- Enzyme: -DNase (3mg/ml) Böhringer Mannheim (Verdünnung mit H<sub>2</sub>O 1:2000)  
-Pol (Kornberg DNA Polymerase) Böhringer Mannheim
- EDTA 0.5M, pH 8.0
- SDS 20%

Procedere: Je Probe wurden 5µg DNA eingesetzt, die ursprüngliche DNA-Konzentration durch Zugabe von H<sub>2</sub>O so verdünnt, daß diese 5µg in dem 50µl umfassenden Probenansatz (davon 31µl DNA-Probe und H<sub>2</sub>O) vorhanden waren.

Es wurden je Probe je 5µl NT, β-ME, dNTPs sowie 2µl Biotin-dUTP, bzw. bei normal-DNA Digoxigenin-dUTP, und je 1µl der beiden Enzyme DNase und Polymerase zusammenpipetiert. Um einen vorzeitigen Beginn der Enzymreaktion zu verhindern, geschah dies auf Eis. Die Inkubation erfolgte für (zunächst) 30 Minuten im 15°C warmen Wasserbad.

Nach der Inkubationszeit wurde ausgetestet, ob bereits die optimale Fragmentlänge vorlag. Dazu wurden je Probe 5µl entnommen und mittels Agarosegel-Elektrophorese nach unterschiedlicher Fragmentlänge getrennt. Die Proben wurden während der Zeit bei -20°C gelagert, um die Enzymaktivität auszuschalten.

Wenn durch die Elektrophorese bestätigt wurde, daß die optimale Fragmentlänge vorlag, wurde die Reaktion endgültig gestoppt durch die Zugabe von 2.5µl EDTA und 2.5µl SDS.

Bei dem Vorliegen von noch zu langen Fragmenten wurden erneut Enzyme hinzugegeben und eine weitere Inkubation erfolgte. Beim Vorliegen von bereits zu kurzen Fragmenten wurde die Probe verworfen. Die Länge richtete sich nach dem Verteilungsmuster in der Elektrophorese.

## **2d. Chromosomenpräparation aus Blutlymphozyten eines gesunden Spenders**

Prinzip: Einem gesunden Spender wurde Blut entnommen und mit Heparin versetzt, welches dann als Kultur mit Zusatz von Antibiotika, L-Glutamin und Phythämagglutinin angesetzt wurde. Nach 72 Stunden wurden die Zellteilungen durch das Spindelzellgift Colcemid gestoppt. Das Serum wurde abgesaugt, die Erythrozyten schließlich hämolysiert durch Zugabe von 0.075 M KCl. Die verbleibenden Lymphozyten wurden mehrmals mit einem Fixativ aus Methanol:Eisessig = 3:1 gewaschen. Schließlich erfolgte das Auftropfen auf Objektträger, die für die Hybridisierung benötigt wurden.

Reagenzien: Für die Kultivierung von Blutlymphozyten in einer 250 ml Zellkulturflasche:

- 40ml RPMI Medium 1640 mit Penizillin/Streptomycin (zur Unterdrückung des Wachstums einer möglichen Begleitflora) und L-Glutamin
- 8ml steril filtriertes fötales Kälberserum (20% FKS)
- 400µl Phytohaemagglutinin (PHA, 1.2mg in 5ml Bidest gelöst; dieses übt einen Proliferationsreiz auf Lymphozyten aus)
- 2ml heparinisiertes Vollblut

Procedere: Die Kultur wurde für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 400µl (10µl/ml) des Zellgiftes Colcemid hinzugefügt, um die Lymphozyten, die sich nach dieser Zeit in der mitotischen Zellteilung befanden, in der Metaphase zu fixieren. Nach dem Transfer in 2 Röhrrchen mit 50ml Fassungsvermögen erfolgte eine weitere Inkubation für 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad.

Nach Zentrifugation bei 1000rpm für 10 Minuten wurde der Überstand abgesaugt (bis auf 5ml), das Pellet mit den Zellkernen resuspendiert und schließlich, zunächst tropfenweise, 35ml vorgewärmtes KCl (0.075M, 37°C) hinzugefügt (dadurch Hämolysse der Erythrozyten).

Anschließend erfolgte wiederum eine Inkubation für 25 Minuten bei 37°C im Wasserbad gefolgt von Zentrifugation, Absaugen des Überstandes bis auf 5ml und Resuspension des Pellets. Der nächste Schritt bestand in der langsamen Zugabe von zunächst 2ml Fixativ aus Methanol : Eisessig im Verhältnis 3:1, das restliche Auffüllen auf 40ml mit dem Fixativ konnte dann schneller erfolgen. Diese Waschphase (Inkubation, Zentrifugation, Absaugen des Überstandes, Resuspension des Pellets und schließlich Zugabe von Fixativ) wurde so lange durchgeführt (mindestens 3 mal), bis das Pellet richtig weiß war. Nachdem der Überstand nochmals abgesaugt worden ist, erfolgte dann der Transfer in 15ml Röhrrchen, in denen (diesmal mit 10ml Fixativ und Absaugen des Überstands bis auf 2ml) nochmals die oben beschriebenen Waschschrirte erfolgten.

Nachdem der Überstand nochmals bis auf 2ml abgesaugt und das Pellet gut resuspendiert wurde, konnte dann das Auftropfen auf Objektträger erfolgen (aus ca. 30cm Höhe, damit die Zellkerne platzten und die in der Metaphase befindlichen Chromosomen schön gespreitet zu liegen kommen konnten) und die Objektträger im Präparatekasten oder in 70%igem Ethanol bei 4°C gelagert werden. Oder das Auftropfen erfolgte erst später, dann wurde das Fixativ belassen und die Lagerung erfolgte bei -20°C.

## **2e. Hybridisierung**

Prinzip: Die unterschiedlich markierten DNA-Fragmente (Normal-DNA: Digoxigenin-markiert, Tumor-DNA: Biotin-markiert, jeweils Fragmente von ca. 100-500 Basenpaaren) wurden in gleichen Teilen gemischt und auf normale Metaphasenchromosomen hybridisiert, wo sie um homologe Bindungsstellen konkurrierten. Beim Überwiegen bestimmter DNA-Sequenzen in der Tumor-DNA (Amplifikationen), erfolgte die Bindung an die entsprechende chromosomale DNA häufiger im Vergleich zur Normal-DNA, beim Fehlen bestimmter Sequenzen (Verlust von genetischem Material im Tumor) erfolgte die Bindung seltener.

Procedere: Vor Beginn der eigentlichen Hybridisierung erfolgte zunächst die Fällung und Resuspendierung in Hybridisierungslösung. Anschließend erfolgte sowohl die Denaturierung der DNA-Fragmente als auch die der späteren Träger-Chromosomen zur Umwandlung von der doppelsträngigen DNA zur einsträngigen DNA. Bei der Vorhybridisierung des DNA-Fragmentgemisches erfolgte die Blockung der hochrepetitiven DNA-Abschnitte (vor allem der Centromer-Regionen) mit Hilfe von humane Cot1-DNA.

### *2eα. DNA Fällung und Resuspendierung in Hybridisierungslösung*

#### Reagenzien:

- 10µl Tumor-DNA (Biotin-markiert)
- -10µl Normalgewebs-DNA (Digoxigenin-markiert)
- -1µl salmon sperm DNA (Herring)
- -5,1µl 3M Natriumacetat
- -150µl 100% Ethanol
- -500µl 70% Ethanol (zum Waschen)
- -5µl Formamid
- -10µl Master mix (MM)

Procedere: Die ersten fünf Reagenzien wurden zusammenpipettiert, anschließend erfolgte die Lagerung der Proben für mindestens 30 Minuten im  $-80^{\circ}\text{C}$ -Freezer, danach die Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  bei max. Umdrehung für 25 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert, das entstandene Pellet mit  $500\mu\text{l}$  70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und das dabei entstandene Pellet dann nach erneuter Dekantierung des Überstandes luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Aufnahme in  $5\mu\text{l}$  Formamid, in das das Pellet bei  $37^{\circ}\text{C}$  gelöst wurde, und schließlich die Zugabe von  $10\mu\text{l}$  Master Mix (MM).

#### *2eβ. Denaturierung der genomischen DNA und Vorhybridisierung*

Procedere: Die im vorangegangenen Schritt gelöste DNA wurde für 5 Minuten bei  $77^{\circ}\text{C}$  denaturiert, danach kurz zentrifugiert und anschließend für mindestens 1 Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorhybridisiert.

#### *2eγ. Inspektion und Denaturierung der Chromosomen*

Reagenzien: - $120\mu\text{l}$  Denaturierungslösung aus 70% Formamid und 2xSSC

-Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90% und 100%) zur Entwässerung

Procedere: Die Objektträger mit den späteren Trägerchromosomen wurden im Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet und auf deren Qualität überprüft (ausreichende Anzahl von Metaphasen ohne Zytoplasmasaum und Schrumpfsartefakte, wenig nichtchromosomales Material im Bereich der Chromosomen) und die besten Bereiche ausgewählt und markiert.

Anschließend wurden  $120\mu\text{l}$  Denaturierungslösung sowie ein Deckglas aufgebracht. Die Denaturierung erfolgte bei  $77^{\circ}\text{C}$  für 60-70 Sekunden im Wärmeofen. Dann wurde das Deckglas entfernt und die Präparate wurden in Küvetten mit 70%, gefolgt von 90% und schließlich 100% Ethanol entwässert und anschließend luftgetrocknet.

#### *2eδ. Eigentliche Hybridisierung*

Procedere: Von der nach der Vorhybridisierung kurz zentrifugierten Hybridisierungslösung der genomischen DNA wurden je  $12\mu\text{l}$  auf die markierten Bereiche (1 oder 2 pro Objektträger) aufgebracht und mit einem  $18\times 18$  mm Deckglas abgedeckt, die Ränder wurden dabei mit rubber cement abgedichtet. Die endgültige Hybridisierung erfolgte dann bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 3 Tage, wobei die Objektträger in einer Metallschale mit Deckel im Wasserbad gelagert wurden.

## 2f. DNA-Nachweis (Detektion)

Prinzip: Nach der Hybridisierung wurden die nicht an die Trägerchromosomen gebundenen Bestandteile durch mehrere Waschkvorgänge vom Objektträger entfernt.

Die Hauptfunktion dieses Arbeitsschrittes war das Einbringen der unterschiedlichen Fluorochrome zur späteren Unterscheidung der Tumor- und Normal-DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden markierte Antikörper eingesetzt, wobei FITC-Avidin an Biotin, welches zur Markierung der Tumor-DNA benutzt wurde, anti Dig-Rhodamin dagegen an Digoxigenin, welches zur Markierung der Normalgewebs-DNA benutzt wurde, gebunden hat. Als drittes Fluorochrom wurde DAPI eingesetzt, welches die Chromosomen so einfärbte, daß sie später anhand unterschiedlicher Banden beim Karyotypisieren voneinander unterschieden werden konnten. Als Schutz wurden die Präparate am Ende mit DABCO-Lösung versehen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Reagenzien:

- Formamid / 2xSSC im Verhältnis 1:1
- 0.1xSSC
- 4xSSC / 0.1% Tween 20
- 3% BSA in 4xSSC / 0.1% Tween 20
- Fluorochrome:
  - DAPI (4.6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid) 0.2mg/ml 1:5000 mit H<sub>2</sub>O verdünnt (Lösung in Küvette)
  - Fluorescein-Avidin dcs (Vector Laboratories)
  - anti-Dig-Rhodamin (Stammlösung: 200µg/ml bidest, Boehringer Mannheim)
- Gebrauchslösung:
  - 8 µl Fluorescein-Avidin und 16 µl anti-Dig-Rhodamin auf 1 ml 3% BSA- Lösung

Procedere: Die Objektträger wurden 3x3 Minuten bei 37°C in einer Küvette mit Formamid / 2xSSC im Verhältnis 1:1, anschließend in neuer Küvette mit 0.1xSSC 3x3 Minuten bei 60°C gewaschen. Die Lagerung bis zum nächsten Schritt erfolgte in 4xSSC / 0.1% Tween 20.

Pro Objektträger wurden 125µl 3% BSA-Lösung aufgetragen, ein Deckglas aufgelegt, die anschließende Aufbewahrung für 15 Minuten erfolgte in feuchtem Milieu bei 37°C. Danach wieder Lagerung bis zum nächsten Schritt in 4xSSC / 0.1% Tween 20.

Ab dem nächsten Schritt erfolgte die weitere Verarbeitung in möglichst lichtarmer Umgebung.

Herstellung der Gebrauchslösung: Fluorochrome Fluorescein-Avidin und anti-Dig-Rhodamin wurden bei 13000rpm bei 4°C zentrifugiert, anschließend 8 bzw. 12µl in 1ml BSA-Lösung

gebracht.

Von der Gebrauchslösung wurden jeweils 125µl auf jeden Objektträger aufgebracht, anschließend wieder Abdeckung mit Deckglas und Lagerung für 15 Minuten bei 37°C im feuchten Milieu.

Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift: 3x3 Minuten bei 45°C in Küvette mit 4xSSC / 0.1% Tween 20.

Schließlich wurden die Objektträger für 5 Minuten in eine Küvette mit DAPI-Lösung gebracht und anschließend in Küvette mit H<sub>2</sub>O bidest überführt. Zum Abschluß wurde je Objektträger 35µl DABCO aufgetragen, die Präparate mit einem Deckglas abgedeckt und bis zur Bildaufnahme am Fluoreszenzmikroskop in einer Präparatmappe bei 4°C aufbewahrt.

### **3. Bildaufnahme und rechnergestützte Auswertung**

#### **3a. Bildaufnahme am Fluoreszenzmikroskop**

Zur Aufnahme der Metaphasenpräparate wurde benötigt: ein Fluoreszenzmikroskop mit einem 63er-Ölimmersionsobjektiv und selektiven Filtersätzen für DAPI, FITC und TRITC, eine CCD (charge coupled device)-Kamera und ein Rechner mit entsprechender Software.

Prinzip: Im Präparat wurde zunächst eine geeignete Metaphase aufgesucht. Dabei sollten die Chromosomen möglichst gut gespreitet sein, im Aufnahmeveld möglichst keine hellen Artefakte oder Kerne liegen, die Metaphasen nach Möglichkeit vollständig und ohne übereinanderliegende Chromosomen sein. Mit Hilfe eines rechnergestützten und mit einer CCD-Kamera ausgerüsteten Fluoreszenzmikroskops wurden nacheinander 3 monochrome Bilder aufgenommen, ein Bild pro Fluoreszenzkanal. Die Belichtungszeit richtete sich dabei nach der Signalintensität der einzelnen Fluorochrome. Die CCD-Kamera kodierte das Fluoreszenzsignal als Graustufenbild mit einer Größe von 768x768 Pixel, im Computer wurde das als TIFF-File gespeichert, wobei die Fluoreszenzintensität in 256 (8 bit) Graustufen quantifiziert wurde. Pro Präparat wurden 10-15 Metaphasen (jeweils mit 3 Bildern: FITC (repräsentiert Tumor-DNA), TRITC (repräsentiert Normal-DNA) und DAPI (zur späteren Identifizierung der Chromosomen) aufgenommen.

Folgende technische Ausrüstung wurde dabei benutzt:

Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axiophot mit einem 63er-Ölimmersionsobjektiv (Plan NEOFLUAR Ölobjektiv 63fach, N:A:1,25, Zeiss, Oberkochen) und selektiven Filtersätzen.

Filtersätze:

-für DAPI: Zeiss Filtersatz 02 (i.e. Excitation G365, Strahlenteiler FT 395, Emission LP 420)

-für FITC: Zeiss Filtersatz 10 (i.e. Excitation BP 450-490, Strahlenteiler FT 510, Emission LP 420)

-für TRITC: Chroma Filtersatz plus Excitation Filter des Zeiss Filtersatzes 15 (i.e. Excitation BP 546/12, Strahlenteiler FT 565, Emission BP 570-650)

-CCD-Kamera (charge coupled device-Camera): gekühlte CCD-Kamera Photometrics (Tucson, Arizona, USA)

-Rechner und Software: Computer der Firma Macintosh mit Softwareprogramm NU200 2.0

### **3b. Bildverarbeitung**

-3b $\alpha$ . Erstellung eines CGH-Karyogrammes (Programm: CGH)

-3b $\beta$ . Erstellung eines Summenkaryogrammes und Ratioprofils eines Falles (Programm: CGH eval)

-3b $\gamma$ . Erstellung von Superkaryogrammen und Histogrammen einer Tumorart (Programm: CGH super)

-3b $\delta$ . Vergleich von Histogrammen unterschiedlicher Subtypen einer Tumorart (Programm: CGH Java super)

Die CGH-Software wurde auf der Grundlage des AMBA-Systems und des Karyotypisierungsmoduls KARYOTYP (IBSB GmbH, Berlin) entwickelt und auf einem PC unter Windows implementiert (*Roth et al. 1996*).

*3b $\alpha$ . Erstellung eines CGH-Karyogrammes (Programm: CGH)*

Prinzip: die drei monochromen Bilder, die den drei Fluoreszenzarten DAPI zur Chromosomenidentifikation, FITC als Tumor-DNA präsentierend und TRITC als Normal-DNA präsentierend entsprachen, wurden übereinandergelegt, eine optische Verschiebung bei Bedarf korrigiert. Innerhalb der Metaphasen unterschiedlich starke Signale eines Fluorochromes (FITC bzw. TRITC) bedeutete ein Überwiegen dieses Fluorochromes an bestimmten Stellen. Durch die Berechnung des RATIO-Bildes (Darstellung des relativen Fluoreszenzprofils, berechnet aus

TRITC- und FITC-Bild) wurden die genetischen Veränderungen über eine Falschfarbendarstellung symbolisiert. DNA-Gewinn im Tumor wurde grün, Verlust genetischen Materials (dann entsprechend Überwiegen von Normal-DNA an der bestimmten Stelle) rot und eine gleichverteilte DNA blau dargestellt.

Mit Hilfe der DAPI-Darstellung wurde die Abgrenzung von Chromosomen zu Hintergrund festgelegt, anschließend sich eventuell berührende Chromosomen voneinander getrennt und die Chromosomen schließlich alle in ihrer Längsrichtung angeordnet. Die Karyotypisierung erfolgte mit Hilfe spezifischer Eigenschaften der Chromosomen im DAPI-Bild (Größe der Chromosomen, Verhältnis von langem zu kurzem Arm und spezifische Banding-Muster).

### *3bβ. Erstellung eines Summenkaryogramms und Ratioprofils eines Falles (Programm: CGH eval)*

Zur Unterdrückung von Rauscheffekten und lokalen Artefakten und um statistisch signifikante Aussagen zu erhalten, mußte über mehrere Metaphasen eines Falles gemittelt werden. Ziel dieses Arbeitsschrittes war die Mittelung von 10-15 inzwischen zu Karyogrammen sortierten Metaphasen eines Falles mit dem Ergebnis als sogenanntes Summenkaryogramm.

Prinzip: Die in den einzelnen Metaphasen zum Teil morphologisch sehr unterschiedlichen Chromosomen mußten zunächst einmal geometrisch transformiert werden, um dann homologe Chromosomen miteinander vergleichen zu können. Dazu wurde eine Achse durch jedes Chromosom gelegt und anschließend begradigt. Die vom Computer durchgeführten Vorgänge wurden nochmals kontrolliert, bei einer fehlerhaften Verlegung der Achse wurde das betreffende Chromosom von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Schließlich wurden die Chromosomen auf eine Einheitslänge und Einheitsbreite normiert, um dann mit den weiteren homologen Chromosomen des Falles zu einem „Einheitschromosom“ zusammengefaßt, welches die manifesten genetischen Veränderungen der entsprechenden Chromosomenklasse repräsentiert. Die gemeinsame Darstellung aller so ermittelten Einheitschromosomen erfolgte in einem CGH-Summenkaryogramm. Die Darstellung entspricht dabei der des RATIO-Profiles der Karyogramme der einzelnen Metaphasen: Amplifikationen im Tumor werden grün dargestellt, Deletionen rot und ein ausgewogenes Verhältnis erscheint blau. Dabei ist zu bemerken, daß die CGH als alleinige Untersuchungsmethode nur eine Aussage über die relative Veränderung der DNA-Kopienanzahl ermöglicht. Ein rein tetraploider Tumor würde beispielsweise in einer CGH-Analyse keine Veränderungen aufweisen.

*3bγ. Erstellung von Superkaryogrammen und Histogrammen einer Tumorart (Programm: CGH super)*

In diesem Programm wurden die Summenkaryogramme der einzelnen Fälle zu einem Superkaryogramm verarbeitet, um zu ermitteln, ob bestimmte Veränderungen spezifisch für bestimmte Tumorarten sind. Man erhielt ein Muster von genetischen Veränderungen der bearbeiteten Tumorart bzw. –untergruppe. Dabei wird in unserer Arbeitsgruppe ein statistisches Verfahren zur Festlegung der DNA-Imbalancen angewandt. Es beruht auf der Anwendung eines Student t-Test, um zu überprüfen, ob die Abweichung des Ratioprofils von dem Normalzustand, repräsentiert durch den Ratio-Wert 1.0, statistisch signifikant ist oder nicht (*Roth et al., 1996*).

*3bδ. Vergleich von Histogrammen unterschiedlicher Subtypen einer Tumorart (Programm CGH java super)*

Mit dem Programm CGH java super konnten zwei verschiedene Gruppen verglichen werden. Als Unterscheidungsmerkmal der Gruppen konnte beispielsweise die histologische Differenzierung (z.B. Adenokarzinom versus SCC) oder das Tumorstadium (nicht metastasierte versus metastasierte Tumoren) gewählt werden. Statistisch wurden die beiden Gruppen mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests verglichen.

## IV. Resultate

### 1. Auswertung der Summenkaryogramme

Die Erstellung eines Summenkaryogrammes erfolgte für jeden einzelnen Fall, unabhängig ob es sich dabei um einen Primärtumor oder eine Metastase handelte. Dazu wurde ein spezielles Computerprogramm zu Hilfe genommen, das die Chromosomen hinsichtlich der relativen Kopienzahl analysierte.

Als Deletion wurde dabei diejenigen Veränderungen erfaßt, die bei dem rechnergestützten System auf Grundlage des Student-t-Tests signifikant unter dem Ratio-Wert von 1.0 lagen, als Überrepräsentationen diejenigen Veränderungen, bei denen der Ratio-Wert von 1.0 signifikant überschritten wurde.

#### 1a. Beispielhafte Darstellung am Fall 517-1

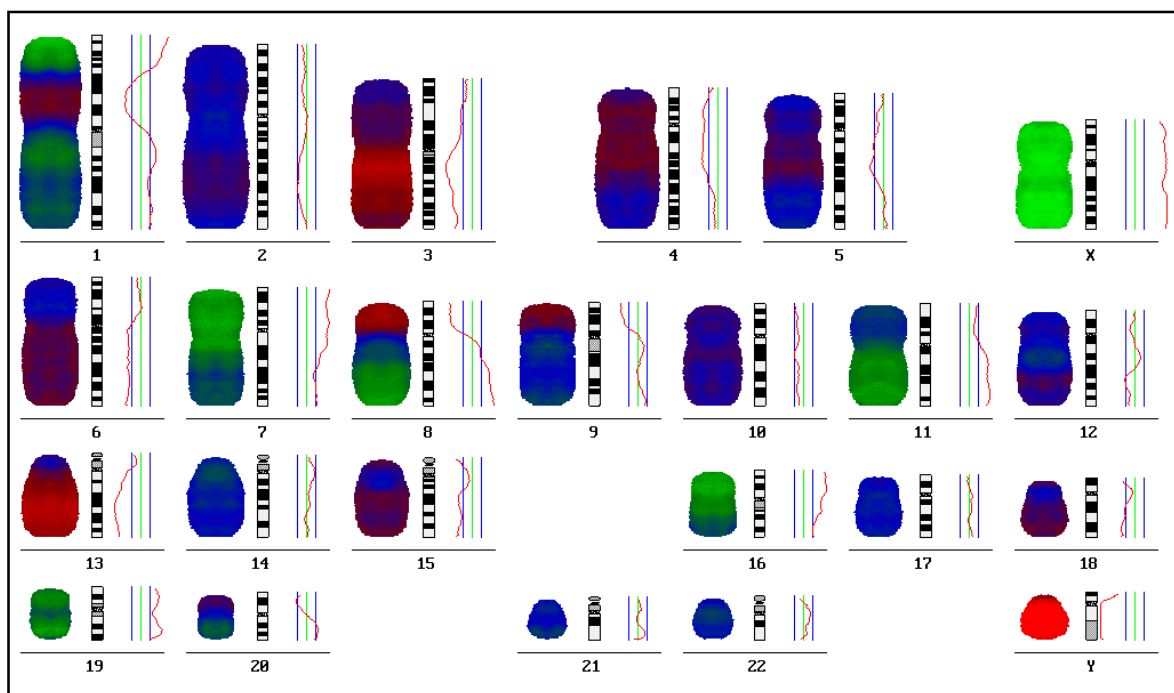


Abbildung 1a: Summenkaryogramm des Falles 517-1

In der Abbildung 1a ist das Ergebnis des Falles 517-1 als Summenkaryogramm dargestellt. Die Auswertung erfolgte nach Bearbeitung von 12 einzelnen Metaphasen des Falles. In der Darstellung werden Überrepräsentationen grün und Deletionen rot dargestellt. Rechts neben den Chromosomen sind die Fluoreszenz-Quotientenprofile dargestellt. Die mittlere (grüne) Linie kennzeichnet Gleichgewicht zwischen Tumor- und Normal-DNA, sie entspricht dem Ratiowert 1.0. Die linke Linie kennzeichnet die 50%-Monosomieschwelle (Ratiowert 0.75), die rechte

Linie die 50%-Trisomieschwelle (Ratiowert 1.25). Die rote Linie, das Ratioprofil, zeigt die Verteilung von Normal- zu Tumor-DNA in diesem Fall auf. Ausschläge des Profils nach links sind mit Deletionen, Ausschläge nach rechts mit DNA-Gewinnen assoziiert.

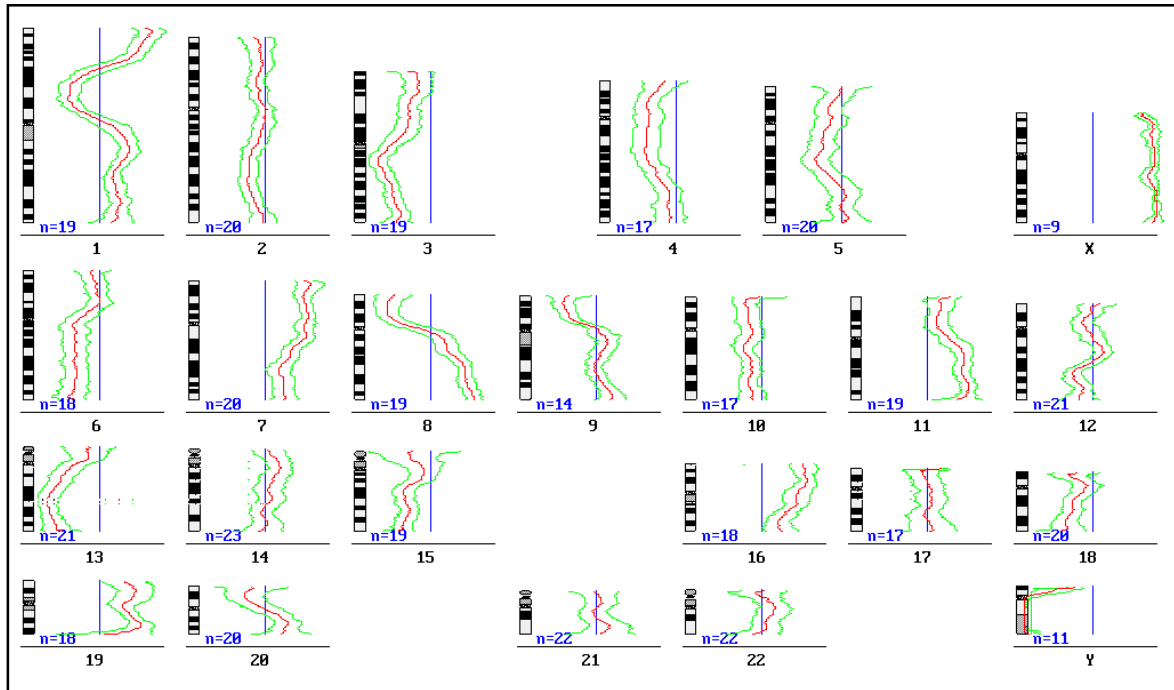


Abbildung 1b: statistische Darstellung des Falles 517-1

In Abbildung 1b erfolgt die Darstellung desselben Falles in der statistischen Form. Wie bei der vorherigen Darstellung werden die 50%-Monosomie- und Trisomieschwelle sowie Gleichgewicht zwischen Tumor- und Normal-DNA dargestellt. Dabei zeigt die rote Linie wiederum das Ratioprofil, die grünen Linien rechts und links davon geben das 99%-Konfidenzintervall an. Die n-Werte der einzelnen Chromosomen geben die jeweilige Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Chromosomen an.

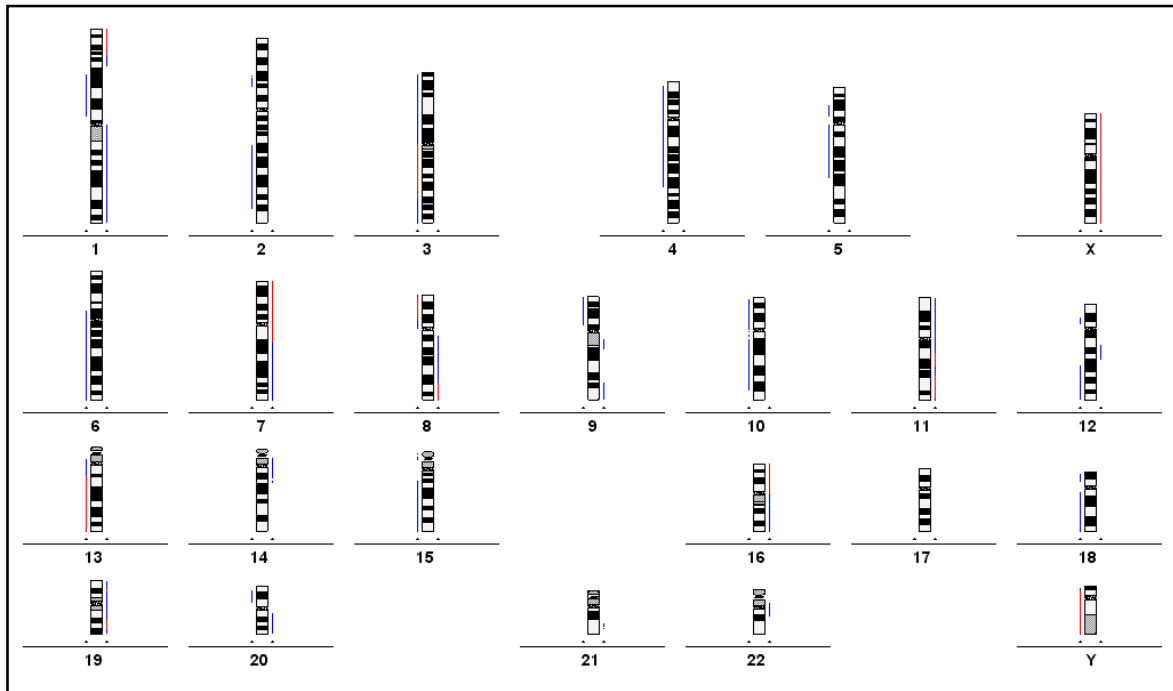


Abbildung 1c gibt dieselben Ergebnisse wie Abb. 1a und b wieder. Zur Darstellung wurde hier ein Linien-Diagramm gewählt, bei dem die Deletionen links und die DNA-Überrepräsentierungen rechts neben einem Chromosomenideogramm angezeigt werden. Dabei werden die Bereiche, in denen das Ratioprofil einschließlich seines Konfidenzintervalls den Schwellenwert 1 über- beziehungsweise unterschreitet, blau dargestellt, Bereiche, in denen auch der Schwellenwert von 0.5 unter- bzw. von 1.5 überschritten wird, werden rot dargestellt. Diese roten Bereiche bezeichnen wir als sogenannte pronounzierte DNA-Verluste ( $<0.5$ ) bzw. DNA-Gewinne (1.5). Sie entsprechen in der Regel Mehrfach-Deletionen bzw. Mehrfach-Amplifikationen.

#### Ergebnisse des Falles 517-1:

Der Fall 517-1 weist Deletionen auf folgenden Chromosomenabschnitten auf: 1p13-31, 2q22-36, 3, 4p, 4q11-26, 5q11.1-22, 6q, 8p, 9p, 12q21-qter, 13q, 15q15-qter, 18q und 20p. Amplifikationen zeigen sich auf folgenden Chromosomen: 1p33-pter und 1q (Maximum: 1q21-q24), 7, 8q, 9q33-qter, 11, 16, 19 und 20q.

## 2. Ergebnisse aller Primärtumoren

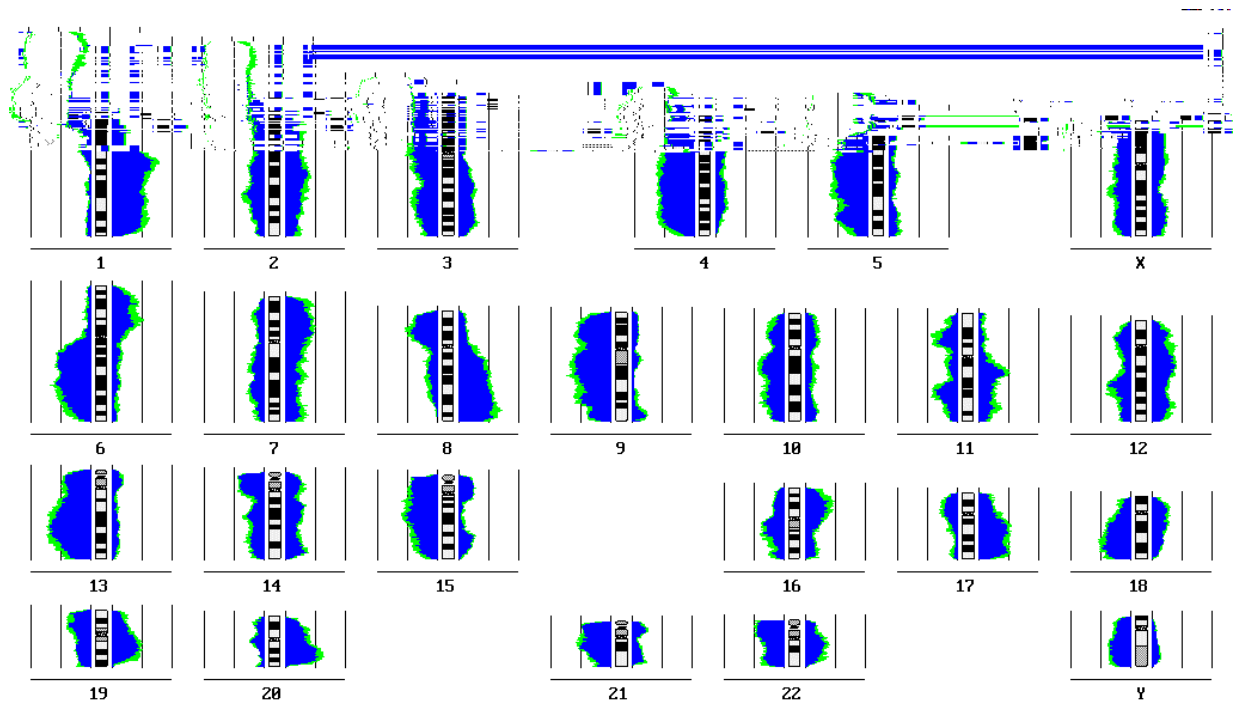


Abbildung 2: Histogramm von 60 Primärtumoren (Adenokarzinome der Lunge, davon 46 Biopsiefälle und 14 Autopsiefälle)

In Abbildung 2 werden die Ergebnisse aller 60 Primärtumoren als Histogramm dargestellt. Die genetischen Veränderungen sind in Form von Inzidenzkurven entlang der Chromosomenideogramme dargestellt. DNA-Verluste werden links vom Chromosom gezeigt, DNA-Zugewinne rechts. Die erste vertikale Linie vom Chromosomideogramm aus kennzeichnet die 50%-Marke. Wird diese überschritten, bedeutet dies, daß die entsprechende Veränderung in über 50% der bewerteten Tumoren vorliegt. Alterationen mit 99%iger Signifikanz nach dem Student-t-Test sind blau, jene mit 95%iger Signifikanz sind grün dargestellt. Durch die hohe Anzahl von repetetiver DNA und damit hoher Artefaktrate müssen die Zentromerregionen der Chromosomen 1, 9 und 16 von der Auswertung ausgeschlossen werden.

## 2a. Veränderungen, die in über 50% der Fälle auftraten

Folgende Veränderungen traten bei einem Konfidenzintervall von 99% in über 50% der Fälle auf:

<u>Deletionen:</u>	3p21-p24	(Maximum: 3p22-p21: 37 Fälle; 61,7%)
	3p12-p14	(Maximum: 3p13/12: 34 Fälle; 56,7%)
	4p14	(30 Fälle; 50,0%)
	4q13-q34	(Maximum: 4q26-q28: 38 Fälle; 63,3%)
	5q14-q23	(Maximum: 5q15: 32 Fälle; 53,3%)
	6q14-q24	(Maximum: 6q14: 35 Fälle; 58,3%; 6q16: 36 Fälle; 60,0%; 6q22: 36 Fälle; 60,0%)
	8p21	(30 Fälle; 50,0%)
	9p13-p23	(Maximum: 9p21-p13: 38 Fälle; 63,3%)
	9q12-q21	(Maximum: 9q12: 34 Fälle: 56,7% 9q21: 36 Fälle: 60,0%)
	13q14-q32	(Maximum: 13q21: 41 Fälle; 68,3% 13q31: 41 Fälle; 68,3%)
	15q21	(Maximum: 34 Fälle; 56,7%)
	18q22	(30 Fälle; 50,0%)
<u>Überrepräsentationen:</u>	1q21-q43	(Maximum: 1q22-q23: 44 Fälle; 73,3%)
	5p14-p15	(Maximum: 5p15.1-2: 35 Fälle; 58,3%)
	5p13	(Maximum: 33 Fälle; 55,0%)
	8q22-qter	(Maximum: 8q23-q24.1: 37 Fälle; 61,7%)
	11q13	(31 Fälle; 51,7%)
	17q21	(32 Fälle; 53,3%)
	17q24-q25	(31 Fälle; 51,7%)
	19q13.1	(30 Fälle; 50,0%)
	20q11.2-q13.2	(Maximum: 40 Fälle; 66,7%)

## 2b. Weitere häufige Veränderungen (>30%; <50%):

<u>Deletionen:</u>	1p31-p21	(Maximum 29 Fälle, 48,3%)
	2q22-q33	(Maximum 2q32: 20 Fälle; 33,3%)
	5q33	(28 Fälle; 46,7%)
	10p	(Maximum: 10p12: 18 Fälle; 30%)
	10q	(Maximum: 10q21: 24 Fälle; 40%)
	18q	(Maximum: 18q22: 30 Fälle; 50,0%)
	21p-q22	(Maximum: 28 Fälle; 46,7%)

<u>Überrepräsentationen:</u>	1p34-pter	(Maximum: 1p36.1: 25 Fälle; 41,7%)
	6p	(Maximum: 6p22: 21 Fälle; 35,0%; Maximum: 6p21.2: 27 Fälle; 45%)
	14	(Maximum: 14q32; 21 Fälle; 35,0%)
	15q23-24	(Maximum: 17 Fälle; 28,3%)
	18p11.2	(17 Fälle; 28,3%)
	19	(Maximum: 19q13.1: 30 Fälle; 50,0%)
	22q	(Maximum: 22p11.2: 25 Fälle; 41,7%)

## 2c. Chromosomenabschnitte, die auffällig selten eine Überrepräsentation aufwiesen:

3p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 10, 13 und 21

### 3. Vergleich von metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren

Die häufig schon frühe Metastasierung stellt ein großes Problem in der Gruppe der Adenokarzinome der Lunge dar. Um Hinweise auf Ursachen für die Metastasierung zu finden, diente unter anderem der Vergleich von Tumoren ohne Metastasen (Stadien N0M0) mit Tumoren, bei denen auch Metastasen gefunden wurden (Stadien N+ und /oder M+) bzw. mit Metastasen dieser Tumoren.

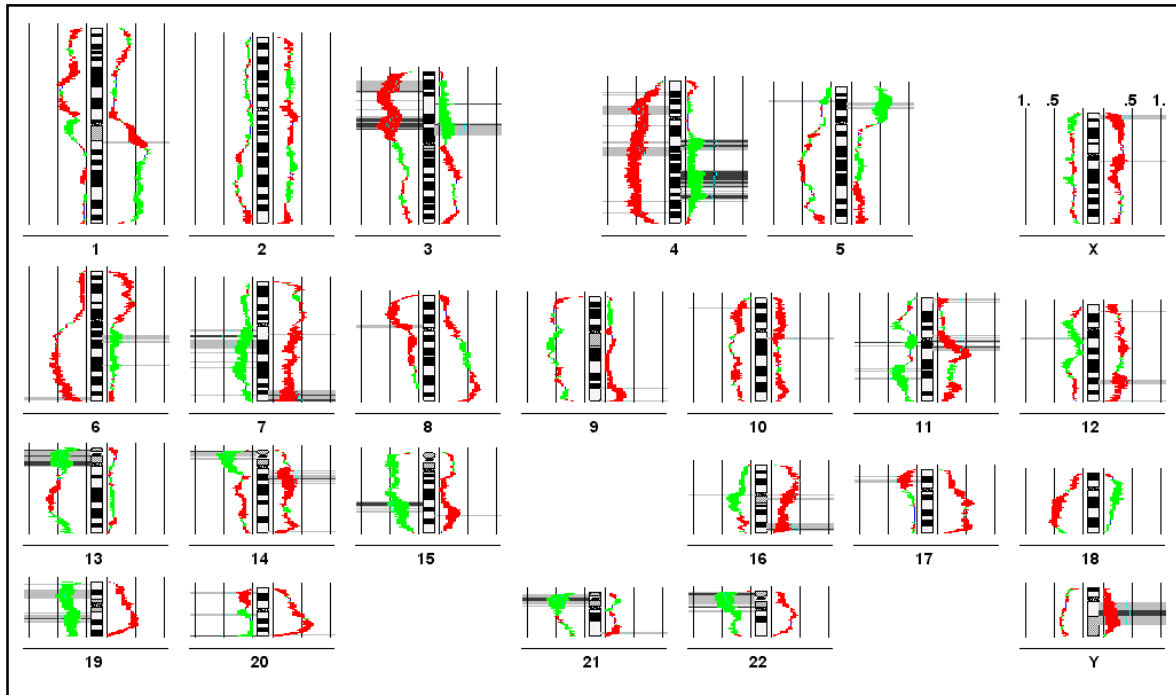


Abbildung 3a (oben) und 3b (unten): Differenzhistogramme N+ und/oder M+ versus N0M0

In Abbildung 3a wird ein Differenzhistogramm gezeigt, bei der die Gruppe der nicht metastasierten Primärtumoren (grün) mit der Gruppe der Metastasen (10 Fälle) und metastasierten Primärtumoren, von denen kein DNA-Material der Metastasen selbst vorlag (23 Fälle), also insgesamt 33 Fälle (rot), verglichen.

In Abbildung 3b wird die Gruppe der nicht-metastasierten Primärtumoren mit den metastasierten Primärtumoren verglichen. Es werden dieselben Fälle zugrundegelegt wie in Abb. 3a, es gehen lediglich bei den Fällen, bei denen auch Material von Metastasen vorlag, ebenfalls nur die Primärtumoren in den Vergleich ein. Dabei ähneln sich die Ergebnisse des Vergleichs, die Unterschiede treten jedoch beim Vergleich, in denen zum Teil Metastasen in die Auswertung eingehen, deutlicher hervor.

Ebenso wie beim Histogramm (s. Abb.2) werden DNA-Verluste und –Zugewinne links bzw. rechts vom Chromosomenideogramm als Inzidenzkurven dargestellt. Die weißen Bereiche zwischen Chromosomenideogramm und farbigen Bereichen zeigen die Anzahl der Veränderungen auf, die in beiden Tumoruntergruppen vorhanden sind, die farbigen Bezirke beziehen sich auf die Veränderungen, die im Vergleich zur anderen Tumorklasse vermehrt vorkommen (rot: in mehr % der Fälle Veränderungen in metastasierten Primärtumoren/Metastasen; grün: in mehr % der Fälle Veränderungen in nicht-metastasierten Primärtumoren). Dunkelgraue horizontale Balken geben die Bereiche an, in denen Unterschiede von 99% Signifikanz im  $\chi^2$ -Test zwischen den beiden Tumorklassen bestehen, hellgraue horizontale Balken die entsprechenden Bezirke mit 95% Signifikanz.

Der Abbildung liegen die Histogramme der beiden Unterklassen mit 99% Signifikanz-Grenzwert nach dem Student-t-Test zugrunde.

Folgende Unterschiede konnten zwischen den beiden Unterklassen auch beim Zugrundelegen anderer Auswertungsverfahren wie beispielsweise feste Schwellenwerte (0.75/1.25; 0.85/1.15; 0.9/1.1) oder andere statistische Parameter wie Gaussverteilung statt Students-test; Konfidenzintervall 95% statt 99%) ermittelt werden. Diese Auswertungsschemata sind auch zugänglich über unsere Internet-Seite <http://amba.charite.de/cgh>.

**3a. Veränderungen, die gehäuft bei metastasierten Primärtumoren/Metastasen auftraten:**

Deletionen: 3p22-p25  
4p13-p15.1  
8p  
17p12-p13  
20p12

Überrepräsentationen: 1q21  
11q12-q13  
14q11.1-q13  
15q24  
20q12-13.1

**3b. Veränderungen, die gehäuft bei nicht-metastasierten Primärtumoren auftraten:**

Deletionen: 19p13.1-p13.3

Überrepräsentationen: 3p12-p14  
4q26-q28  
5p14

#### 4. Primärtumoren und dazugehörige Metastasen

In zehn Fällen wurden aus Autopsiematerial jeweils der Primärtumor und bis zu 4 Metastasen analysiert. Als Beispiele dafür sollen der Fall 368 mit 2 Gehirnmetastasen und der Fall 481 mit einer Nebennierenmetastase und 2 Gehirnmetastasen stehen.

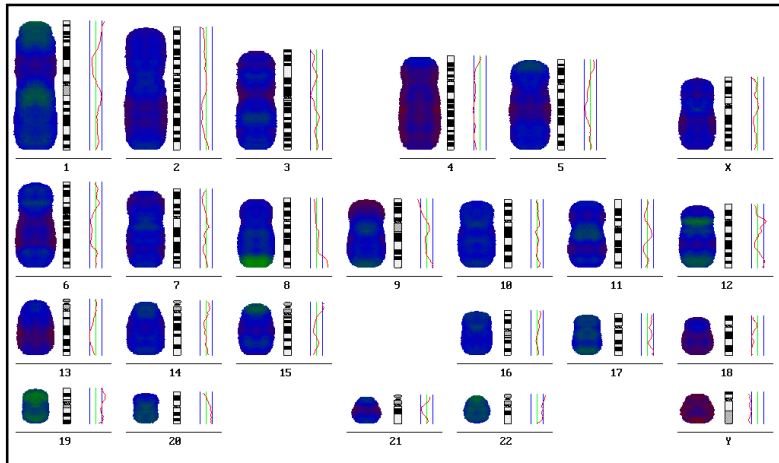


Abb. 4a

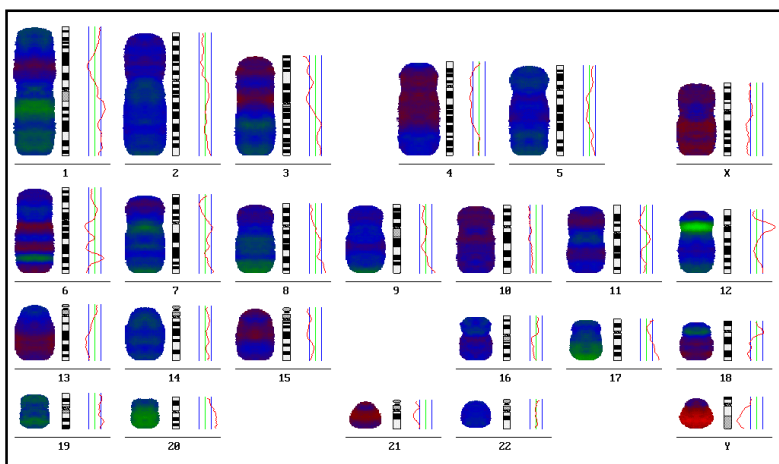


Abb. 4b

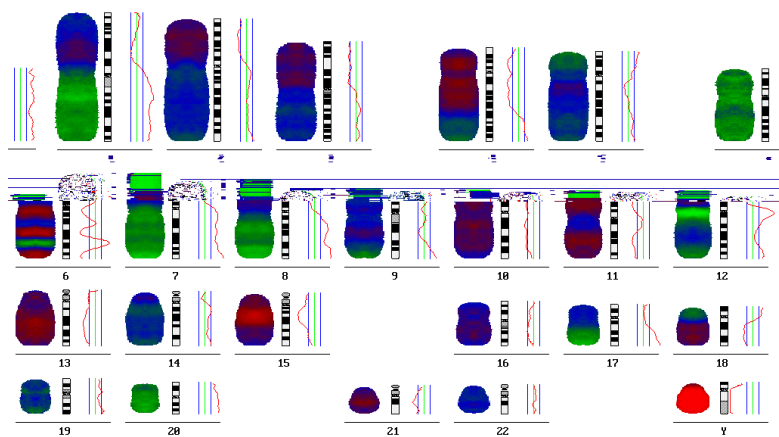


Abb. 4c

Abb. 4a-c: Summenkaryogramme des Falles 368 (a: Primärtumor; b: Metastase Pons; c: Großhirnmetastase)

Wie in Abbildung 4a-c zu sehen ist, in denen die Summenkaryogramme (Erklärung vom Aufbau eines Summenkaryogrammes siehe Erläuterungen zu Abbildung 1a) vom Primärtumor und den beiden Gehirnmastasen abgebildet sind, zeigen die Metastasen im Großen und Ganzen dasselbe Muster wie der Primärtumor. Allerdings treten die Veränderungen in den Summenkaryogrammen der Metastasen deutlicher hervor, und auch einige zusätzliche Veränderungen sind erkennbar, wie zum Beispiel die DNA-Überrepräsentation vom Chromosomenabschnitt 4q und 7q in der zweiten Metastase.

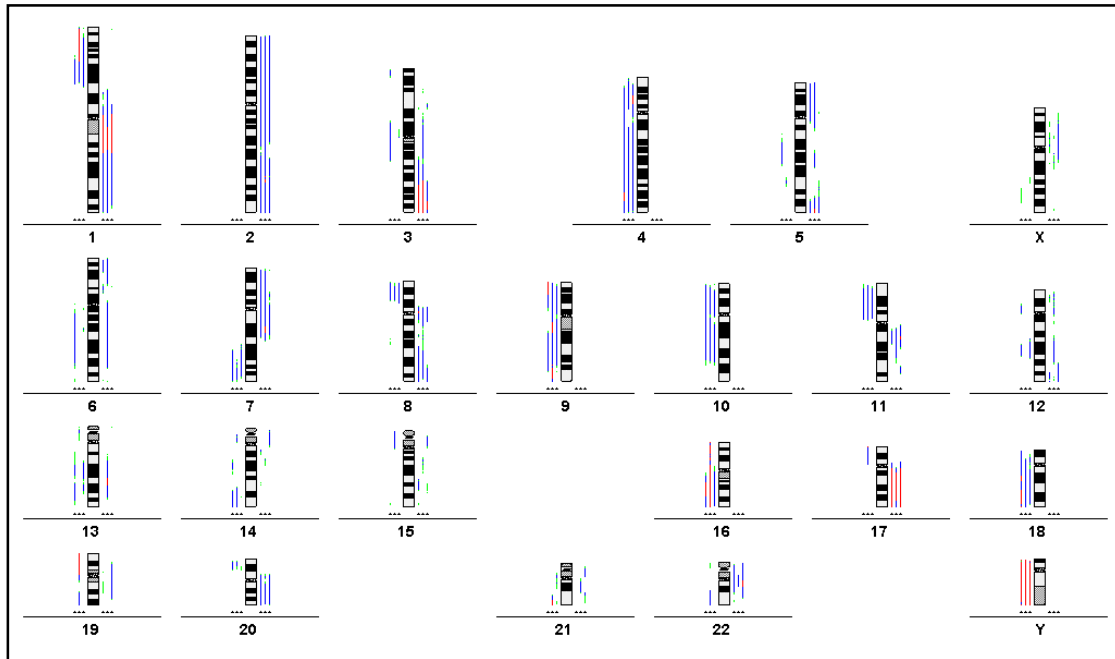


Abbildung 4d: Liniendiagramm des Falles 481 mit Primärtumor, Nebennierenmetastase, Großhirnmetastase und Kleinhirnmetastase

Abbildung 4d zeigt das Linien-Diagramm zum Fall 481. Dabei handelt es sich um den Primärtumor, eine Nebennierenmetastase und 2 Gehirnmastasen. In der ersten Position neben dem Chromosomenideogramm werden jeweils die Veränderungen des Primärtumors (1) gezeigt, dann folgt die Darstellung von den Veränderungen von Nebennierenmetastase (2), Großhirnmetastase (3) und Kleinhirnmetastase (4). Daraus folgt die Anordnung: 4, 3, 2, 1, Chromosomenideogramm, 1, 2, 3, 4. DNA-Verluste werden wiederum auf der linken Seite jedes Chromosomenideogrammes, DNA-Gewinne auf der rechten Seite dargestellt.

Auch bei dieser Darstellung ist zu erkennen, daß sich das Muster von Veränderungen in Primärtumor und Metastasen gleicht und nur leichte Unterschiede vorhanden sind. Das heißt, die CGH-Analyse weist eindeutig auf einen klonalen Ursprung der Tumoren hin.

## V. Diskussion

Die CGH (Comparative Genomische Hybridisierung) ist ein molekularzytogenetisches Verfahren, welches die umfassende Analyse eines Tumorgenoms auf Über- und Unterrepräsentationen von DNA-Abschnitten ermöglicht. Ziel dieser Untersuchungen ist es, eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp herzustellen und damit eine genetische Charakterisierung von Tumoren zu erreichen, die die morphologische Beschreibung ergänzt (*Roth et al., 1996*). Bereits 1997 umfaßte die Gesamtheit der CGH-Veröffentlichungen Daten von etwa 1500 Tumoren. Dabei lassen sich bereits einige genetische Aberrationen erkennen, die für bestimmte Tumortypen oder Stadien von Tumoren charakteristisch sind. Auf CGH-Daten basierend wurden bereits sechs neue Amplifikationen, ebenso wie ein Locus für ein Krebsprädisponierendes Syndrom entdeckt (*Forozan et al., 1997*).

Jeder einzelne Tumor hat sein spezifisches Muster von Veränderungen. Dabei gibt es bei der Gesamtheit der Tumoren Veränderungen, die besonders häufig vorkommen, und andere, die so gut wie nie beobachtet werden. Es handelt sich in jedem einzelnen Tumor um mehrere Veränderungen, die erst in der Summation zu einer Tumorentstehung führen. Einschränkend ist zu bemerken, daß es zwar keine Veränderung gibt, die bei 100% aller Adenokarzinome der Lunge auftritt, und ebenso keine Veränderung absolut spezifisch für das Adenokarzinom der Lunge ist, da sie auch in anderen Tumorarten auftreten kann. Dennoch läßt sich ein häufig wiederkehrendes Muster von Veränderungen nachweisen, die zumindest relativ typisch für das Adenokarzinom der Lunge ist. Einzelne Imbalancen scheinen dabei mit bestimmten morphologischen und biologischen Phänotypen assoziiert zu sein.

Insgesamt zeigten sich trotz der technisch schwierigeren Detektierbarkeit von DNA-Verlusten mehr Deletionen als Überrepräsentationen bei den untersuchten Adenokarzinomen. Dies kann ein Hinweis darauf sein, daß die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine wichtigere Rolle bei der Entstehung von Adenokarzinomen der Lunge spielt als das vermehrte Auftreten von Onkogenen.

Das ähnliche chromosomale Aberrationsmuster von Primärtumoren und den entsprechenden korrespondierenden Metaphasen zeigt die klonale Abstammung der Metastasen vom Primärtumor. Das deutlichere Hervortreten der Veränderungen in den Metastasen kann mit dem geringeren Anteil von Normalgewebe in der Metastase sowie dem Bestehen des Primärtumors aus mehreren Klonen, von denen nur ein Klon in der Metastase auftritt, erklärt werden. Zusätzliche Veränderungen in den Metastasen können durch genetische Instabilität der Tumorzellen auch nach dem vom Primärtumor getrennten Wachstum entstehen.

Da besonders bei den Lungentumoren die frühe Metastasierung ein großes Problem darstellt, besteht auch ein Interesse an den Veränderungen, die von dem lokalisierten Primärtumor zur Entstehung von Metastasen führt. Die Ergebnisse beim Vergleich von den nicht-metastasierten zu den metastasierten Primärtumoren bzw. Metastasen könnten einen Hinweis auf Genloci sein, die zur Tumorprogression führen.

### **1. CGH-Muster von Adenokarzinomen im Vergleich zu anderen Primärtumoren der Lunge**

Die für Adenokarzinome der Lunge typischen Veränderungen sind im Kapitel "Ergebnisse aller Primärtumoren" aufgeführt. Dazu gehören die Überrepräsentationen von 1q, 5p, 8q, 11q13, 17q, 19q und 20q und Deletionen auf den Chromosomenabschnitten 1p, 3p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 13q und 18q. Ein Großteil der Veränderungen ist dabei zwar nicht spezifisch für diesen histologischen Typ des Lungenkarzinoms, tritt aber gegenüber dem Plattenepithelkarzinom und Kleinzelligen Karzinomen deutlich häufiger auf.

Im Vergleich zeigten Adenokarzinome signifikant mehr Überrepräsentationen im Bereich der chromosomalen Bande 1q23 und Deletionen der Chromosomenabschnitte 3q, 9q, 10p13, 15q21-22, 19p13.3 und 19q13.2. Die Plattenepithelkarzinome dagegen zeigten einen signifikant höheren Anteil an DNA-Überrepräsentationen auf Chromosom 3q und Deletionen auf den Chromosomenabschnitten 12q13 und 2q36-37 (*Petersen I et al., 1997*). Die Daten der hier zitierten Arbeit bezüglich der Adenokarzinome waren auch Bestandteil der vorliegenden Dissertation. Vor allem die Überrepräsentation von 3q scheint besonders in Verbindung mit der Überrepräsentation von 12p13 eher zu einem Plattenepithel als zu einem Adenokarzinom zu führen. Die beschriebene Veränderung von 3q trat bei Adenokarzinomen nur in weniger als 40% der Fälle auf (Überrepräsentationen in bis zu 25%), wohingegen es bei Plattenepithelkarzinomen in weit über 50% der Fälle zu einer der häufigsten Veränderungen gehörte.

Die gemeinsamen Veränderungen von Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Lunge sind beispielsweise die DNA-Gewinne bei 8q24, 11q13 und 17q21. Korrespondierende Onkogene in diesen Loci sind c-myc-, cycD1- und ERBB2-.

Auch in Kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) gehörte die Überrepräsentation von 3q zu einer der häufigsten Veränderungen. Bei der Untersuchung von 22 Tumoren trat diese Veränderung in 15 Tumoren (68%) dieser Tumorart auf (*Petersen I et al., 1997b*). In allen SCLC dieser Arbeit war außerdem eine Deletion von 3p vorhanden, eine Veränderung, die auch in anderen Tumorarten häufig auftritt, z.B. in Plattenepithelkarzinomen der Lunge und HNSCC

(Head and neck squamous cell cancer) (*Speicher et al., 1995*). Dagegen spielt diese Veränderung bei Adenokarzinomen der Lunge eine weniger ausgeprägte Rolle, aber auch bei dieser Tumorart liegt in bestimmten Bereichen (3p21-22) eine Deletion in 62,7 % der Fälle vor.

Weitere wichtige Veränderungen in SCLC: Deletion von Chromosom 10q in 94% und von den Chromosomen 4q, 5q, 13q und 17p in 86% der Fälle. Während die Deletionen von 4q, 5q und 13q bei Adenokarzinomen ebenfalls in über 50% auftreten, sind Deletionen von 10q und 17p in dieser Tumorart weniger bedeutsam, sie treten nur in 30% der Fälle (10q, Max. 10q 21; 40%) bzw. 20% der Fälle (17p) auf.

## **2. Adenokarzinome der Lunge im Vergleich zu Adenokarzinomen anderen Ursprungs**

Um weitere Hinweise darauf zu bekommen, welche genetischen Veränderungen zur adenoiden Differenzierung führen, ist der Vergleich von Veränderungen in Adenokarzinomen verschiedener Lokalisationen von Bedeutung. Zu den entsprechenden Lokalisationen zählen neben der Lunge Prostata, Pankreas, Colon und Mamma.

Als häufigste gemeinsame Veränderung wurde ein DNA-Gewinn von 1q gefunden, auch in Adenokarzinomen der Prostata (*Cher et al., 1996*), des Colons (*Ried et al., 1996*) und der Mamma (*Ried et al., 1995*). Die bei der vorliegenden Studie gefundene Überrepräsentierung, vor allem im Bereich von 1q22-23, bei der es sich häufig auch um eine high-copy-Amplifikation handelte, könnte einen Hinweis darauf sein, daß sich in dieser Region ein Gen befindet, das zur Differenzierung von Tumoren zu Adenokarzinomen verschiedener Lokalisationen führt. In Plattenepithelkarzinomen der Lunge ist die Überrepräsentation von 1q mit Metastasierung assoziiert (*Petersen et al., 2000b*). Daher kann vermutet werden, daß diese Aberration mit dem höheren Potential der Adenokarzinome zur Metastasierung assoziiert ist. Eine weitere Veränderung, die auch bei den anderen Adenokarzinomen regelmäßig vorkommt, ist die Überrepräsentation des Chromosoms 20q. Dies wird sowohl für Adenokarzinome des Colons (*Ried et al., 1996*) als auch des Pankreas (*Mahlamaki et al., 1997*) erwähnt. Beim direkten Vergleich mit SCC (*Petersen I et al., 1997*) war diese Veränderung zwar nicht statistisch signifikant häufiger bei Adenokarzinomen, jedoch relativ häufiger bei dieser Tumorart, so daß nicht auszuschließen ist, daß auf diesem Chromosomenarm ein Gen beherbergt ist, das zur adenoiden Differenzierung von Tumoren führt.

Für Pankreaskarzinome wurden folgende Veränderungen durch verschiedene Studien identifiziert: Überrepräsentationen auf den Chromosomenarmen 8q, 11q, 12p, 17q und 20q sowie DNA-Verluste auf 9p, 15q und 18q. (*Solinas-Toldo et al., 1996; Malhamäki et al., 1997*).

Mit Ausnahme von Überrepräsentationen auf dem Chromosomenarm 12p sind dies alles Veränderungen, die auch bei der vorliegenden Studie häufig bei Adenokarzinomen der Lunge gefunden wurden.

### 3. Kandidatengene in häufig deletierten Regionen

Auf einigen der häufig von DNA-Verlusten betroffenen Chromosomenabschnitten sind bereits Tumorsuppressorgene bekannt.

Folgende Tumorsuppressorgene gehören dazu:

- **FHIT** ist auf dem Chromosomenabschnitt **3p14.2** lokalisiert. Dieser Bereich war in der vorliegenden Studie in etwa 50 % der Fälle betroffen. Seine Funktion ist noch nicht geklärt, aufgrund von häufigen Allelverlusten, homozygoten Deletionen und aberranten Transkripten stellt es jedoch ein Kandidatengene für die Tumorentstehung in der Lunge dar (*Sozzi et al 1996; Fong et al., 1997*).
- Eine wichtige Stellung beim Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus nimmt der p16-CyclinD1-CDK4-RB-Weg ein. Das **Retinoblastoma-Gen (RB)** ist auf dem Chromosomenabschnitt **13q14** lokalisiert, die häufig von einer Deletion betroffen ist. Es hat im normalen Zellzyklus eine wachstumssupprimierende Funktion durch Inhibition des Übergangs der G1- in die S-Phase. Aberration in Expression oder Funktion finden sich in über 90% von SCLC und in 20-30% der NSCLC (*Xu et al., 1991; Hensel et al., 1990*).
- Ein weiterer Faktor der Regulierung dieses Kontrollschrittes im Zellzyklus ist das p16<sup>INK4</sup>-Protein, das normalerweise als CDK-Inhibitor wirkt. Durch dessen Wegfall kommt es schließlich ebenfalls zu einer RB-Inaktivierung. Das Gen, das das Protein **p16** (auch **CDKN2** genannt) codiert, ist auf **9p21** lokalisiert, eine bei Adenokarzinomen ebenfalls häufig von DNA-Verlusten betroffene Region. P16<sup>INK4</sup>-Alterationen treten vor allem in NSCLC auf, bei Kleinzellern sind sie dagegen selten. Es wurden in 30-40% der NSCLC homozygote Deletionen bzw. Punktmutationen beschrieben (*Washimo et al., 1995; Shimizu et al., 1995*), fehlende Expression auf RNA-bzw. Proteinebene sogar in 30-70% (*Merlo et al., 1995*). Die gleichzeitige Inaktivierung von beiden Genen (RB und p16) ist ungewöhnlich, dagegen sind CyclinD1-Überexpressionen zusätzlich möglich.
- **p53**, das auf **17p13** lokalisiert ist, wird als eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene angesehen. Es kodiert ein Protein, das bei normaler Funktion die Zelle bei der Mitose so lange in der G1-Phase hält, bis die Zelle DNA-Reparaturen durchführen konnte. Sind diese

erfolgt, wird der Zellzyklus fortgesetzt, sind diese nicht möglich, mündet die Zelle in die Apoptose. Bei Störungen dieses Zyklus setzen auch Zellen mit DNA-Defekten die Zellteilung fort. In Lungenkarzinomen ist eine Kopie der entsprechenden chromosomalen Region häufig verloren gegangen oder durch Mutation inaktiviert worden (*Greenblatt et al., 1994*). Während Verluste von 17p in CGH-Untersuchungen von SCLC (*Petersen I et al., 1997a*) in einem hohen Prozentsatz auftraten, war dies dagegen bei den NSCLC wie den Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen nicht der Fall. Dies schließt jedoch Allelverluste nicht aus, die unter der durch CGH nachweisbaren Grenze von 10 Mio. Basenpaaren liegt. Außerdem haben auch die durch CGH nicht nachweisbaren Punktmutationen eine Bedeutung. Ist p53 in NSCLC von Mutationen betroffen, so geht das mit einer schlechteren Prognose mit geringerer Überlebensrate und aggressiverem Wachstum einher (*Huang et al 1998; Marchetti et al., 1998*). Interessanterweise fanden wir in metastasierten Adenokarzinomen eine höhere Inzidenz an 17p Deletionen, die auch statistisch signifikant mit der Metastasierung assoziiert waren.

#### 4. Kandidatengene in häufig überrepräsentierten Regionen

Für folgende bereits bekannte Genlokalisierungen von Onkogenen konnten in der vorliegenden CGH-Studie häufig Überrepräsentationen gefunden werden:

- **CycD1** ist auf **11q13** lokalisiert und ist eine Kinase, die über Hyper-Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins und daraus resultierender Freisetzung von Transkriptionsfaktoren die Replikation von S-Phase-Genen einleitet. Vor allem metastasierte (pN+/pM1) Adenokarzinome zeigten diese Veränderung, was auch mit Ergebnissen vereinbar ist, die diese Überrepräsentation mit einer schlechten Prognose assoziieren (*Tanaka et al., 1998; Betticher et al., 1996*).
- Das **c-MYC**-Gen ist auf dem Chromosomenabschnitt **8q24** lokalisiert. Es ist am normalen Zellwachstum und der Proliferation über die direkte Aktivierung von Genen der DNA-Synthese, vom RNA-Metabolismus und der Zellzyklus-Regulation beteiligt (*Grandori et al., 1997*). Während das **L-MYC**-(auf **1p32**) und das **N-MYC**-(auf **2p25**) Gen nur bei Kleinzellern eine Rolle spielen, spielt die Aktivierung von c-MYC sowohl bei SCLC als auch bei NSCLC eine Rolle. Dabei erfolgt die Aktivierung durch Amplifikation oder transkriptionelle Deregulation (*Krystal et al., 1988*).

- Ein weiteres wichtiges System ist das der ras-Genfamilie. Diese werden vor allem durch Mutationen aktiviert. Meist ist das **KRAS**-Gen, das auf dem Chromosomenabschnitt **12p11.2** lokalisiert ist, betroffen. Bei Adenokarzinomen in 20-30% der Fälle RAS-Moleküle durch Punktmutationen aktiviert, dabei ist das KRAS-Gen in 90% der Fälle betroffen (*Richardson et al., 1993*). Vor allem KRAS-Mutationen sind von klinischer Bedeutung, da sie sowohl für frühe als auch für fortgeschrittene Stadien eine schlechte Prognose bedeuten und so zu einem klinisch sinnvollen Prognosefaktor werden könnten (*Slebos et al., 1990; Mitsudomi et al., 1991; Rosell et al., 1994*). Desweiteren werden Systeme entwickelt, um diese Mutationen im Sputum von Patienten mit Tumoren mit dieser Veränderung nachzuweisen. In Zukunft könnte das zum Einsatz in der Frühdiagnose von Lungentumoren führen, auch wenn insgesamt kein besonders hoher Anteil der gesamten Anzahl von Lungentumoren von dieser Mutation betroffen ist (*Somers et al., 1998*).
- Eine weitere wichtige Familie von Protoonkogenen ist die ERBB-Genfamilie. Dabei handelt es sich um Gene, die für Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität kodieren. Die größte Bedeutung bei den Lungentumoren hat dabei **ERBB2** (auch **HER2/neu; p185**), das auf dem Chromosomenabschnitt 17q21 lokalisiert ist. Obwohl ERBB2-Amplifikationen relativ selten in Lungentumoren sind, ist es in mehr als einem Drittel der NSCLC, besonders in Adenokarzinomen, überexprimiert (*Weiner et al., 1990*). Die Bedeutung von ERBB2 wurde auch für die Tumorigenese von Brust- und Ovarialtumoren beschrieben.
- Ein weiteres Onkogen, dessen Bedeutung noch nicht vollständig geklärt ist, ist das **AIB1**, das auf dem Chromosomenabschnitt **20q12** lokalisiert ist. Es wurde zunächst in Brust- und Ovarialtumoren beschrieben, es handelt sich dabei um einen Steroid-Rezeptoren-Coaktivator (*Ansik et al., 1997*). Auch für Pankreastumoren wird eine Bedeutung dieses Genes diskutiert (*Ghadimi et al., 1999*). Die Bedeutung dieses Genes für Adenokarzinome verschiedener Lokalisationen, insbesondere der Lunge, wird sich noch herausstellen, da die entsprechende Gen-Lokalisation in Adenokarzinomen der Lunge jedoch häufig von DNA-Überrepräsentationen betroffen ist, ist eine Bedeutung auch für diese Tumorart nicht unwahrscheinlich.

## 5. Unterschiede zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren

Eines der wichtigsten Kriterien für die Prognose eines Tumors ist die Abwesenheit oder das Vorhandensein von Metastasen. Besonders bei Adenokarzinomen der Lunge bestehen häufig bereits bei Diagnosestellung Metastasen, oft sind dieses noch Mikrometastasen, die diagnostisch nicht erfaßt werden können. Daher besteht sicherlich auch klinisch ein Interesse daran, welche genetischen Veränderungen eines Tumors zur Metastasierung führen kann, um so verschiedene Patienten einer jeweils adäquaten Therapie zuzuführen und die Prognose für den einzelnen Patienten besser abschätzen zu können.

Bei der vorliegenden Studie wird versucht, durch Vergleich von nicht-metastasierten Primärtumoren mit metastasierten Primärtumoren und Metastasen Chromosomenbereiche zu erfassen, auf denen potentiell für die Metastasierung verantwortliche Tumorsuppressorgene oder Onkogene lokalisiert sind.

Allgemein ist zu sagen, daß insgesamt die Veränderungen bei den metastasierten Tumoren etwas häufiger sind als bei nicht-metastasierten. Das läßt sich in der Abbildung 3 daran erkennen, daß die Gesamtheit der roten Flächen (für Veränderungen, die bei metastasierten Tumoren überwiegen stehend) etwas größer ist als die der grünen Flächen (für Veränderungen, die bei nicht-metastasierten Tumoren überwiegen stehend). Außerdem sind häufig Chromosomenabschnitte, die bei der metastasierten Gruppe häufiger von Deletionen betroffen sind, bei der nicht-metastasierten Gruppe häufiger von Überrepräsentationen betroffen und umgekehrt. Optisch erkennbar zeigt sich deshalb oft eine rote Fläche auf der einen Seite und eine grüne Fläche auf der anderen Seite des Chromosomenideogramms. Beispiele hierfür sind das Überwiegen von metastasierten Tumoren bei Deletionen auf Chromosom 4q (rote Fläche), dagegen liegen bei Überrepräsentationen vorwiegend nicht-metastasierte Tumoren vor (grüne Fläche).

Eine Veränderung, die gehäuft bei den metastasierten Tumoren auftrat, ist die Deletion von 3p22-p25. Andere Arbeiten weisen darauf hin, daß besonders in Adenokarzinomen der Lunge LOH von verschiedenen Bereichen von 3p mit einer geringeren Überlebensrate einhergehen (*Mitsudomi et al., 1996*), was unter anderem auch auf einem höheren Potential zur Metastasierung begründet sein kann. Dabei wurde allerdings nur ein Teil des bei der vorliegenden Studie betroffenen Abschnittes betrachtet.

Eine weitere wichtige Deletion, die signifikant häufiger bei metastasierten als bei nicht-metastasierten Adenokarzinomen auftrat, ist auf dem Chromosomenabschnitt 17p12-p13, wo auch p53 lokalisiert ist. Insgesamt ist dieser Bereich in Adenokarzinomen der Lunge zwar nur relativ selten von einer Deletion betroffen, wenn er betroffen ist, handelt es sich jedoch meist um

metastasierte Tumoren bzw. um Metastasen. Für p53 steht weniger die Inaktivierung durch Deletion im Mittelpunkt der Forschung als vielmehr die Inaktivierung durch Mutationen. Ist p53 in NSCLC von Mutationen betroffen, so geht das mit einer schlechteren Prognose mit geringerer Überlebensrate und aggressiverem Wachstum einher (*Marchetti et al., 1998; Huang et al., 1998*). Inwieweit auch die Inaktivierung durch Deletion eine Rolle für Überlebensrate, Wachstumsaggressivität und Metastasierung eine Rolle spielt, wird sich in Zukunft noch zeigen. Ebenso war die Region 20p12 häufiger bei metastasierten Tumoren von Deletionen betroffen. Auch bei Plattenepithelkarzinomen des Halsbereiches (HNSCC) wurde in der Region 20p11-12 signifikant häufiger bei metastasierten als bei nicht-metastasierten Karzinomen eine Deletion gefunden (*Bockmühl et al., 1997*). Ob sich in diesem Bereich ein Tumorsuppressorgen befindet und welche Bedeutung es im Zellzyklus und bei der Metastasierung hat, wird anderen Studien vorbehalten bleiben.

Auch Überrepräsentationen traten auf bestimmten Chromosomenabschnitten signifikant häufiger bei metastasierten Tumoren bzw. Metastasen auf. Dazu gehörte z.B. die Region 11q12-q13, somit auch der Bereich, der CycD1 codiert. Wie bereits erwähnt, wurde diese Veränderung ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert (*Tanaka et al., 1998; Betticher et al., 1996*). Ob sich hinter den anderen von Überrepräsentationen betroffenen Regionen Onkogene verbergen und welche Bedeutung diesen von der Entwicklung eines nicht-metastasierenden zum metastasierenden Tumor zukommt, kann diese Studie nicht zeigen. Sie kann lediglich als Ansatz dienen, um nach Onkogenen und deren Bedeutung in den entsprechenden Bereichen, also 1q21, 14q11.1-q13, 5q24 und 20q12-13.1, zu suchen.

Folgende Regionen waren bei nicht-metastasierten Primärtumoren signifikant häufiger von einer Überrepräsentation betroffen: 3p12-p14, 4q26-q28 und 5p14. Häufiger von einer Deletion betroffen war Chromosom 19, insbesondere der Bereich 19p13.1-p13.3. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß durch noch unbekannte Mechanismen diese Veränderungen einen gewissen Schutz vor Metastasierung bieten.

## 6. Aussicht

### 6a. Die CGH in der genetischen Tumordiagnostik

Im Rahmen von Klonalitätsanalysen kann die Methode hilfreich zur Differenzierung zwischen einem Zweittumor und einem Tumorrezidiv sein. Im Falle eines Rezidivs würde sich das Muster an Veränderungen beim Vergleich der beiden Tumoren sehr ähneln, beim Auftreten eines Zweittumors würden sich die Muster in einem höheren Grad unterscheiden.

Ähnliches gilt für die Zuordnung von Metastase und Primärtumor. Wie gezeigt wurde, ist das Muster der Veränderungen in Primärtumor und Metastase sehr ähnlich. Bei einem Patienten mit zwei Primärtumoren unterschiedlicher Lokalisation kann diese Methode also hilfreich sein bei der Zuordnung der Metastase zu einem der beiden Tumoren. Außerdem wäre es gegebenenfalls möglich, zu unterscheiden, ob eine Metastase dem bekannten Primärtumor zuzuordnen ist, oder ob bei dem Patienten ein bisher unentdeckter Zweittumor vorliegt.

Die Hauptbedeutung liegt jedoch in der Möglichkeit, das gesamte Genom eines Tumors betrachten zu können und nicht nur punktuelle Veränderungen zu diagnostizieren. Wie bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde (*Petersen et al., 2000a; Petersen et al., 2000b, Schwendel et al., 1997*) und wie auch durch diese Arbeit gestützt, können CGH-Untersuchungen dazu beitragen, Kandidatenregionen für Gene zu identifizieren, die möglicherweise metastasierungs-relevante Gene beherbergen. Unsere Untersuchungen wie die anderer Arbeitsgruppen (z.B. *Gronwald et al 1997*) haben zu einem besseren Verständnis der genetischen Mechanismen im Rahmen der Metastasierung beigetragen.

Es ist daher anzunehmen, daß die CGH auch in Zukunft zu der Aufdeckung weiterer relevanter chromosomalen Imbalancen und damit zur Identifizierung neuer Tumor-assoziiertes Gene beitragen wird.

Die Methode ist inzwischen als Screening-Methode in der Krebsforschung etabliert (*Forozan et al., 1997*). Konzeptionell hat sie zudem den Weg eröffnet für die Entwicklung anderer "Genome-Scanning"-Methoden, wie z.B. der Microarray-Technologie, die ebenso auf der Co-Hybridisierung unterschiedlich Fluoreszenz-markierter Test- und Referenzproben basieren (*Brown & Botstein 1999; Pollack et al., 1999*).

Eine Aufnahme der CGH in die Routinediagnostik bleibt jedoch unwahrscheinlich, da diese Methode sehr arbeitsintensiv und zeitaufwendig ist. In Einzelfällen wurde jedoch gezeigt, daß die Methode durchaus zur Diagnosefindung beitragen kann, wie z.B. bei der Differenzierung von abnormalen Fällen von Mesotheliomen und Lungentumoren (*Bjorkqvist et al., 1998*).

## **6b. Weitere Untersuchungen**

Für einzelne der besonders häufig von Veränderungen betroffenen Regionen sind bereits Onkogene oder Tumorsuppressorgene bekannt, für die meisten chromosomalen Regionen trifft das jedoch nicht zu. Beispielsweise gilt dies für die sehr häufig von Überrepräsentationen betroffenen Regionen 1q21-q43, 5p14-p15, 17q24-q25 und 19q13.1. Es liegt die Vermutung nahe, daß in diesen Regionen entweder Onkogene oder aber andere Tumor-assoziierte Gene lokalisiert sind, deren Fehlfunktion mit einer erhöhten Kopienzahl des sie beherbergenden Chromosomenregion einher gehen. Um neue Kandidatengene zu identifizieren, haben wir kürzlich Bibliotheken differentiell exprimierter Gene in Lungenkarzinomen etabliert (*Petersen et al., 2000c*). Eines dieser Gene, die in der Kandidatenregion 1q24-q25 lokalisiert ist, konnten wir mittlerweile vollständig charakterisieren. Passend zu den CGH-Daten scheint die Überexpression des sogenannten humanen Calcyclin-bindenden Protein mit der Tumorprogression assoziiert zu sein (*Petersen et al., 2000d*). Die Charakterisierung vieler weiterer Gene, insbesondere auch der Tumorsuppressor-Gene, die in den häufig deletierten Regionen lokalisiert sind, steht jedoch noch aus. Die CGH Untersuchungen stellen dabei eine Basis für die Selektion der vielversprechenden Kandidatengene dar.

## V. Zusammenfassung

Das Adenokarzinom ist weltweit das häufigste nicht-kleinzellige Lungenkarzinom mit ansteigender Inzidenz insbesondere bei Frauen. Zur genetischen Analyse dieses Tumortyps haben wir 60 Fälle mittels der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) untersucht, dabei wurden 60 Primärtumoren und von 10 Fällen zusätzlich 23 Metastasen (pro Primärtumor max. 4 korrespondierende Metastasen) analysiert.

Die CGH ist eine Screening-Methode zur Detektion chromosomaler Imbalancen im Tumor-Genom. DNA-Gewinne und -Verluste werden dabei innerhalb des Tumors aufgedeckt und für jeden Tumor ein Muster chromosomaler Überrepräsentationen und Deletionen festgestellt. Dieses kann genutzt werden, um eine gegenüber der konventionellen Morphologie verfeinerten Tumorcharakterisierung durchzuführen.

Bei den 60 Primärtumoren wurden folgende Veränderungen in über 50% der Fälle beobachtet: Deletionen auf den Chromosomen 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 13q, 15q und 18q sowie Überrepräsentationen auf den Chromosomen 1q, 5p, 8q, 11q, 17q, 19q und 20q. Besonders häufig von Veränderungen waren folgende Chromosomenregionen betroffen: Deletionen auf 3p22-p21 (61,7% = 37 von 60 Fällen), 4q26-q28 (63,3%), 6q16 (60,0%), 6q22 (60,0%), 9p13-p21 (63,3%), 13q21 (68,3%) und 13q31 (68,3%) sowie Überrepräsentationen auf 1q22-q23 (73,3%), 8q23-q24.1 (61,7%) und 20q11.2-q13.2 (66,7%).

Beim statistischen Vergleich mittels  $\chi^2$ -Test von 24 nicht-metastasierten Primärtumoren mit der Gruppe von 23 metastasierten Primärtumoren und 10 Metastasen waren folgende Veränderungen statistisch signifikant mit Metastasierung verbunden: Deletionen von 3p22-p25, 4p13-p15.1 und 17p12-p13 sowie Überrepräsentationen von 1q21, 11q12-13, 14q11.1-q13, 15q24 und 20q12-13.1. DNA Gewinne auf Chromosom 1q sind ebenso bei Plattenepithelkarzinomen mit der Metastasierung assoziiert. Die Tatsache, daß die Überrepräsentation von 1q die häufigste Veränderung bei Adenokarzinomen ist, könnte erklären, weshalb Adenokarzinome gegenüber den Plattenepithelkarzinomen ein erhöhtes Metastasierungspotential aufweisen. Statistisch signifikant häufiger mit dem nicht-metastasierten Phänotyp assoziiert waren dagegen folgende Veränderungen: Deletion von 19p13.1-p13.3 und Überrepräsentationen von 3p12-p14, 4q26-q28 und 5p14. Die Analyse der Primärtumoren und ihrer korrespondierenden Metastasen konnten in jedem Fall einen klonalen Zusammenhang nachweisen.

Zusammenfassend sind Adenokarzinome der Lunge durch wiederkehrende Muster chromosomaler Veränderungen charakterisiert, die eine Korrelation zwischen Tumor-Genotyp und -Phänotyp ermöglichen.

## **VI. Literaturangaben**

Anzik SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Xin-Yuan G, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS (1997): AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast, and ovarian cancer. *Science*, 277: 965-968

Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G (1997): Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. *Chest*; 112(6): 1474-9

Betticher DC, Heighway J, Hasleton PS, Altermatt HJ, Ryder WD, Cerny T & Thatcher N (1996): Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*; 73: 294-300

Bjorkqvist AM, Tammilehto L, Nordling S, Nurminen M, Anttila S, Mattson K, Knuutila S (1998): Comparison of DNA copy number changes in malignant mesothelioma, adenocarcinoma and large-cell anaplastic carcinoma of the lung. *Br J Cancer*; 77 (2): 260-269

Bockmühl U, Petersen S, Schmidt S, Wolf G, Jahnke V, Dietel M, Petersen I (1997): Patterns of Chromosomal Alterations in Metastasizing and Nonmetastasizing Primary Head and Neck Carcinomas. *Cancer Res*, Dec 1; 57: 5213-5216

Brown PO, Botstein D (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*; 21(1 Suppl):33-7

Caldwell CJ, Berry CL (1996): Is the incidence of primary adenocarcinoma of the lung increasing? *Virchows Arch Dec*; 429(6): 359-363

Cerny T, Barnes DM, Hasleton P, Barber PV, Healy K, Gullick W, Thatcher N (1986): Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human lung tumours. *Br J Cancer*; 54: 265

Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs WB und Jensen RH (1996): Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping; *Cancer Res*. 56: 3091-

Chiba M, Takahashi T, Nau MM, et al., (1990): The mutations in the p53 gene are frequent in primary resected non-small cell lung cancer. *Oncogene*; 5: 1603

De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Hrsg.) (1997a): *Cancer-Principles & Practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> Edition, Vol.1, S. 858

De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Hrsg.) (1997b): *Cancer-Principles & Practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> Edition, Vol.1, S. 863

De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Hrsg.) (1997b): *Cancer-Principles & Practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> Edition, Vol.1, S. 875

Dorgan JF, Schatzkin A (1991): Antioxidant micronutrients in cancer prevention. *Hematol Oncol Clin North Am*; 5: 43

Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST, Rassool FV, Zimmermann PV, Giaccone G, Gazdar AF & Minna JD (1997): FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 57: 2256-2267

Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP (1997): Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet*; 13 (10): 405-409

Fraumeni JF Jr. (1975): Carcinogenesis: an epidemiological appraisal. *J Natl Cancer Inst*; 55: 1039

Fraumeni JF. Jr, Blott WJ (1982): Lung and pleura. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, Hrsg. *Cancer epidemiology and prevention*. Philadelphia: WB Saunders, 1982: 564

Fry WA, Menck HR, Winchester DP (1996): The National Cancer Data Base report on lung cancer. *Cancer*; 77 (9): 1947-55

Furuse K, Fukuoka M, Kato H, et al., (1993): A prospective phase II study on photodynamic therapy with photofrin II for centrally located early-stage lung cancer. *J Clin Oncol* 11(10): 1852-1857

Ghadimi BM, Schröck E, Walker RL, Wangsa D, Jauho A, Meltzer PS, and Ried T (1999): Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J of Pathol*, 154: 525-536

Ginsberg RJ, Rubinstein LV (1995): Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. *Annals of Thoracic Surgery* 60(5): 615-623

Grandori C & Eisenman RN (1997): Myc target genes. *Trends Biochem Sci*; 22: 177-181

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994): Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*; 54:4855

Gronwald J, Storkel S, Holtgreve-Grez H, Hadacz P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J, Cremer T (1997): Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites; importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *Cancer Res*. 57: 481-487

Harley NH (1992): Radon and daughters. In: Lippmann M, ed. *Environmental toxicants*. New York: Van Nostrand Reinhold: 520

Heilmann A, Steidl I (Hrsg.) (1993): *Ökologisches Stoffgebiet*. Neckarsulm, Stuttgart 1993, Jungjohann Verlagsgesellschaft S.253

Hensel CH, Hsieh CI, Gazdar Af, Johnson BE, Sakaguchi AY, Naylor SL, Lee WH, Lee EY (1990): Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer. *Cancer Res*; 50: 3067

Hoffman D, Haley NJ, Brunnemann KD, et al., (1983): Cigarette sidestream smoke: formation, analysis and model studies on the uptake by non-smokers. Presented at the US-Japan meeting on the etiology of lung cancer, Honolulu, March: 21

Holmes AC (1994): Surgical adjuvant therapy for stage II and stage III adenocarcinoma and large cell undifferentiated carcinoma. *Chest* 106(6 Suppl): 293S-296S

Huang CL, Taki T, Adachi M, Konishe T, et al., (1998): Mutations of p53 and K-ras genes as prognostic factors for non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*; 12(3): 553-63

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

Komaki R, Cox JD, Hartz AJ, et al., (1985): Characteristics of long-term survivors after treatment for inoperable carcinoma of the lung. *Am J Clin Oncol* 8(5): 362-370

Krystal GW, Birrer M, Way J, Nau M, Sausville E, Thompson C, Minna JD & Battey J (1988): Multiple mechanisms for transcriptional regulation of the myc gene family in small-cell lung cancer. *Mol Cell Biol*; 8: 3373-3381

Loeb LA, Ernster VL, Warner KE, et al., (1984): Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res*; 44: 5940

Mahlamaki EH, Hoglund M, Gorunova L, Karhu R, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Kallioniemi Op, Johansson B (1997): Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer; *Genes Chromosomes Cancer*: 20(4): 383-391

Marchetti A, Pellegrini S, Bertacca G, Buttitta F, Gaeta P, Carnicelli V, Nardini V, Griseri P, Chella A, Angeletti CA, Bevilacqua G (1998): FHIT and p53 gene abnormalities in bronchiloloalveolar carcinomas. Correlations with clinicopathological data and K-ras mutations. *J Pathol*, 184 (3): 240-246

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB & Sidransky D (1995): 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Med* 1: 686-692

Miller JJ, Phillips TW: Neodymium (1990):YAG laser and brachytherapy in the management of inoperable bronchogenic carcinoma. *Annals of Thoracic Surgery* 50(2): 190-196

Minna JD, Higgins GA, Glatstein EJ. Cancer of the lung. In: de Vita VT jr., Hellman S, Rosenberg SA, Hrsg. (1989): *Cancer-principles & Practice of Oncology*, 3rd Edition, Philadelphia: JB Lippincott, 1989: 597

Mitsudomi T, Steinberg SM, Oie HK, Mulshine JL, Phelps R, Viallet J, Pass H, Minna JD, Gazdar AF (1991): Ras gene Mutation in Non-small cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer Res*; 51: 4999

Mitsudomi T, Oyama T, Nishida K, Ogami A, Osaki T, Sugio K, Yasumoto K, Sugimachi K, Gazdar AF (1996): Loss of heterozygosity at 3p in Non-small cell lung cancer and its prognostic Implication. *Clin Cancer Res*; 2: 1185-1189

Nomura A. (1991): Prospective Study of pulmonary functioned lung cancer. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144(2): 307-11

Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group (1995): Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *Br Med J*, 311(7010): 899-909

Noordijk EM, Clement EP, Hermans J, et al., (1988): Radiotherapy as an alternative to surgery in elderly patients with resectable lung cancer. *Radiotherapy and Oncology* 13(2): 83-89

Okamoto A, Hussain SP, Jagiwar K, et al., (1995): Mutations in the p16INK4/MTS1/CDKN2, p15INK4B and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res*; 55: 1448

Osann KE. (1991): Lung cancer in women: the importance of smoking, family history of cancer, and medical history of respiratory disease. *Cancer Res.*, 51(18): 4893-7

Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel M, Ried T, Dietel M. (1997a): Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p; *Br. J. Cancer*, 75: 79-86

Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A, Langreck H, Gellert K, Reichel M, Just K, du Manoir S, Cremer T, Dietel M, Ried T (1997b): Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res*, 57: 2331-2335

Petersen I, Schwendel A, Bockmuehl U, Dietel M (1996): Die komparative genomische Hybridisierung. *Pathologie* 17: 333- 341

Petersen I, Hidalgo H, Petersen S, Pacyna-Gengelbach M, Schlüns K, Goeze A, Krebber B, Szymas J, von Deimling A (2000a): Chromosomal imbalances in brain metastases of solid tumors. *Brain Pathology*, 10: 395-401

Petersen S, Aninat-Meyer M, Schlüns K, Gellert K, Dietel M and Petersen I (2000b): Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *Br J Cancer*, 82: 65-73

Petersen S, Heckert C, Rudolf J, Schlüns K, Tchernitsa OI, Schäfer R, Petersen I (2000c): Gene expression profiling of advanced lung cancer. *Int J Cancer*, in press

Petersen S, Deutschmann N, Sers C, Dietel M, Petersen I (2000d): Amplification and overexpression of the gene encoding the human Calcyclin Binding Protein on chromosome 1q24-q25 in advanced lung carcinomas, Manuskript eingereicht.

Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO (1999): Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 23(1): 41-6

Richardson GE, Johnson BE (1993): The biology of lung cancer. *Semin. Oncology*; 20: 105

Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H, du Manoir S, Speicher MR, Schröck E, Latham C, Blegen H, Zetterberg A, Cremer T, et al. (1995): Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas; *Cancer Res.*; 55: 5415-5423

Ried T, Knutsen R, Steinbeck R, Blegen H, Schrock E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G (1996): Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 15: 234-245

Roberts HL, Komaki R, Allen P, El-Naggar AK (1998): Prognostic significance of DNA content in stage I adenocarcinoma of the lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 41(3): 573-8

Rosell R, Gomez-Codina J, Camps C, et al. (1994): A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 330(3): 153-158

Roth K, Wolf G, Dietel M und Petersen I (1996): Analysenprogramm zur quantitativen Erfassung chromosomaler Aberrationen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH). *Pathologe*, 17: 342-348

Shimizu T & Sekiya T (1995): Loss of heterozygosity at 9p21 loci and mutations of the MTS1 and MTS2 genes in human lung cancers. *Int J Cancer*, 63: 616-620

Slebos RJ, Kobbelaar RE, Dalesio O, et al. (1990): K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *New English Journal of Medicine*; 323: 561

Solinas-Toldo S, Wallrapp C, Müller-Pillasch F, Bentz M, Gress T, Lichter P (1996): Mapping of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, 56: 3803-3807

Somers VA, Pietersen AM, Theunissen PH, Thunnissen FB (1998): Detection of K-ras point mutations in sputum from patients with adenocarcinoma of the lung by point-EXACCT. *J Clin Oncol*, 16: 3061-3068

Souquet PJ, Chauvin F, Boissel JP, et al. (1993): Polychemotherapy in advanced non small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lancet* 342(8862): 19-21

Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, De

Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K & Croce CM (1996): The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85: 17-26

Speicher MR, Howe C, Crotty P, Du Manoir S, Costa J and Ward DC (1995): Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 55: 1010-1013

Tanaka H, Fujii Y, Hirabayashi H, Miyoshi S, Sakaguchi M, Yoon HE & Matsuda H (1998): Disruption of the RB pathway and cell-proliferative activity in non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer* 79: 111-115

Wald NJ, Nanchahal K, Thompson SG et al. (1986): Does Breathing other peoples smoke cause lung cancer?; *Br Med J*; 293: 1217

Washimi O, Nagatake M, Osada H, Ueda H, Koshikawa T, Seki T, Takahashi T & Takahashi T (1995): In vivo occurrence of p16 (MTS1) and p15 (MTS2) alterations preferentially in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 55: 514-517

Weiner DB, Nordberg J, Robinson R, Nowell PC, Gazdar A, Greene MI, Williams WV, Cohen JA, Kern JA (1990): Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.*; 50: 421

Xu HJ, Hu SX , Calgle PT, Moore GE, Benedict WF (1991): Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res*; 51: 2735

Zimmerman PV, Bint MH, Hawson GAT, et al. (1987): Ploidy as a prognostic determinant in surgically treated lung cancer. *Lancet*, 2(8558): 530-3

## VII. Abkürzungen

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	charge coupled device
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CGH	Comparative Genomische Hybridisierung
cGy	Kubik-Gray
DABCO	4,6-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetra-acetat
E.-Nr.	Eingangsnummer
ERBB2	Avian erythroblastic leukemia viral oncogene
FHIT	Fragile Histidino Triad-Genprodukt
FITC	Streptavidin-Fluoresceinisothiocyanat
GDP	Guanosintriphosphat
Geschl.	Geschlecht
Grb/GRB	Growth factor receptor-bound
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
LFD. Nr.	Laufende Nummer
M	Mol
mM	Millimol
myc	avian myelocytomatosis viral oncogene
NaCl	Natriumchlorid
NSCLC	Nichtkleinzellige Lungenkarzinome
PHA	Phythämagglutinin

ras	rat sarcoma viral oncogene
RB	Retinoblastoma-Gen
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCLC	Kleinzellige Lungenkarzinome
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	Son of sevenless
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Antidigoxigenin-Tetrarhodamin-Isothiocyanat
WHO	World-health-Organisation
5JÜR	5-Jahresüberlebensrate

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorliegende Arbeit „Charakterisierung chromosomaler Imbalancen in Adenokarzinomen der Lunge mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)“ von mir selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Diese Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die Anfertigung erfolgte unter ausschließlicher Verwendung der aufgeführten Literatur und Hilfsmittel.

Berlin, den 15.09.2000, Almut Goeze.