

Genetik von Karzinomen des Respirationstraktes:

Korrelation Genotyp - Phänotyp

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Iver Petersen

geboren am 26.09.1963 in Flensburg

Präsident: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. Manfred Dietel

Berlin, den 26.10.1998

Gutachter:

1. Prof. Dr. M. Dietel
2. Prof. Dr. K.-M. Müller
3. Prof. Dr. T. Cremer

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Zusammenfassung der publizierten Forschungsergebnisse	
1. Einleitung und Fragestellung	4
2. Material und Methoden	9
a) Tumorkollektive	9
b) Zusammenstellung tumorbiologischer Methoden	9
c) Molekulare Zytogenetik - CGH	11
d) Molekulargenetik - SSCP, direkte DNA Sequenzierung, LOH	14
e) Telepathologie	20
3. Ergebnisse	
a) Methodische Beiträge - CGH Summen-/Superkaryogramme/Histogramme	22
b) Korrelation zwischen chromosomalen Imbalanzen und Histotypen	
G1 und G3 Plattenepithelkarzinome des HNO-Bereiches	25
Kleinzellige Bronchialkarzinome	26
Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome	28
Klonalität bei morphologischer Tumorerogenität	29
c) Genetische Veränderungen in Assoziation mit der Metastasierung	
HNO-Plattenepithelkarzinome	32
Bronchialkarzinome	33
Chromosomale Mechanismen im Rahmen der Tumorprogression	37
d) Tabellarische Übersicht der chromosomalen Imbalanzen	40
4. Diskussion und Ausblick	41
5. Literaturverzeichnis	47
6. Abkürzungen	51
7. Danksagung	52
8. Erklärung über Eigenständigkeit der Arbeit	54
9. Curriculum vitae und Bibliographie	55

II. Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Methodische Arbeiten einschließlich Übersichtsartikel

- i. Direct DNA sequencing following SSCP analysis
- ii. Use of non-radioactive detection in SSCP, direct DNA sequencing and LOH analysis
- iii. Die Komparative Genomische Hybridisierung: Eine Screeningmethode in der genetischen Tumordiagnostik
- iv. Analyseprogramm zur quantitativen Erfassung chromosomaler Aberrationen mittels Komparativer Genomischer Hybridisierung (CGH)
- v. Image analysis for Comparative Genomic Hybridization (CGH) based on a karyotyping program for Windows
- vi. Telemicroscopy via the Internet

Inhaltliche Arbeiten

- vii. p53 mutations in primary human lung carcinomas and their metastases
- viii. Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by Comparative Genomic Hybridization
- ix. Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p
- x. Primary small cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations
- xi. Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung
- xii. Distinct patterns of chromosomal alterations in high and low grade head and neck squamous cell carcinomas
- xiii. Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and non-metastasizing primary head and neck carcinomas
- xiv. Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer
- xv. Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumor progression and the metastatic phenotype
- xvi. Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung

1 Einleitung und Fragestellung

Karzinome des oberen und unteren Respirationstraktes haben bei weitem die höchste Inzidenz aller Malignome des Menschen. Sie nehmen in der großen Mehrzahl der Fälle ihren Ausgang vom Oberflächenepithel und weisen insbesondere bezüglich der Ätiologie große Gemeinsamkeiten auf. Entscheidendes Kanzerogen ist dabei der Zigarettenrauch, der über die Inhalation auf den gesamten Respirationstrakt wirkt. Als Mutagen schädigt es direkt das Genom der Epithelzellen beispielsweise durch die Bildung von DNA-Addukten des Benzpyrens (*Denissenko et al. 1996*). Bei den Karzinomen der Kopf-Hals-Region kommt als wichtigstes Co-Kanzerogen der Alkohol hinzu. Die Wirkung beruht vornehmlich auf höherprozentigem Äthanol, der zur lokalen Reizung und Schädigung des Epithels führt. Dies wiederum verursacht einen Proliferationsstimulus mit vermehrter Zellteilung und gesteigerter DNA-Synthese, die über Replikationsfehler mit einer erhöhten Mutationsrate verbunden ist.

Entsprechend dem die Atemwege auskleidenden Epithel handelt es sich bei den Karzinomen des oberen Respirationstraktes vornehmlich um Plattenepithelkarzinome. Demgegenüber zeigen die Karzinome der Lunge eine größere histologische Vielfalt. Neben Plattenepithelkarzinomen treten vornehmlich in der Lungenperipherie Adenokarzinome auf. Zusammen mit den Großzelligen Karzinomen, die histogenetisch sowohl Ähnlichkeiten mit den Adenokarzinomen als auch den Plattenepithelkarzinomen zeigen können, bilden sie die Gruppe der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome. Von dieser Gruppe, die ca. 80% aller malignen Lungentumoren ausmacht, muß das kleinzellige Bronchialkarzinom abgegrenzt werden.

Es tritt häufig ohne längeres Prodromalstadium auf und neigt zu einer frühzeitigen Metastasierung, die unbehandelt rasch zum Tode führt. Jedoch ist es durch das initial gute Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie in der Regel möglich, eine Remission zu erzielen. Sie bietet dem Patienten eine zusätzliche Lebensspanne von

etwa 6 bis 12 Monaten, die es zumindest erlaubt, die eigenen Lebensverhältnisse und die der Angehörigen zu ordnen.

In Tab. 1 sind die wichtigsten klinisch-pathologischen Parameter von Karzinomen des oberen und unteren Respirationstraktes zusammengefaßt.

Tab. 1: Karzinome der Lunge und der Kopf-Hals-Region im Vergleich

	HNO	Lunge
Inzidenz	~30 auf 100.000	~70 auf 100.000
Ätiologie	Nikotinabusus (Kofaktor Alkohol im HNO-Bereich)	
Alter / Geschl	Männer > Frauen / ~60. Lebensjahr	
Histotypen	SCC	Adeno ~ SCC > SCLC > LCLC
Verteilung	Mundhöhle > Larynx / Hypopharynx > Oropharynx	zentral (v.a. SCC / SCLC) > peripher (v.a. Adeno / LCLC)
Biologie	LK-Metastasen: obere → mittlere → untere jug. Gruppe)	Hämatogene Metastasen: Leber > Knochen > NN > ZNS ... Heterogenität, Paraneoplasien
Therapie	Chirurgie (auch Laser) Radiotherapie	NSCLC: falls mögl. Chirurgie +/- Radio-/Chemotherapie SCLC: Chemo- / Radiotherapie
Hauptproblem	Lokalrezidiv	Systemische Disseminierung
Prognose	~60% Überleben (Larynx > Oropharynx/Mundhöhle)	~15% Gesamtüberleben, nur ~35-40% aller T1/ T2-Karzinome~ nach "kurativer" Therapie

zusammengestellt aus DeVita et al. 1997

Generell müssen bei der klinisch-pathologischen Klassifikation von Karzinomen zwei Aspekte berücksichtigt werden. Neben dem morphologischen Phänotyp ist das biologische Verhalten des Tumors bzw. einzelner Tumorzellen zu unterscheiden. Letzteres prägt den klinischen Verlauf der Erkrankung. Das Hauptproblem ist zumeist die Metastasierung. Sie entscheidet in der Regel über das Schicksal eines Patienten.

Morphologischer und biologischer Phänotyp sind häufig miteinander assoziiert. So neigen das kleinzellige Bronchialkarzinom, wie bereits erwähnt, sehr stark zur Metastasierung. Weitere Beispiele sind die paraneoplastischen Syndrome, welche oft an einen bestimmten Histotyp gekoppelt sind. Eine Übersicht gibt Tab. 2

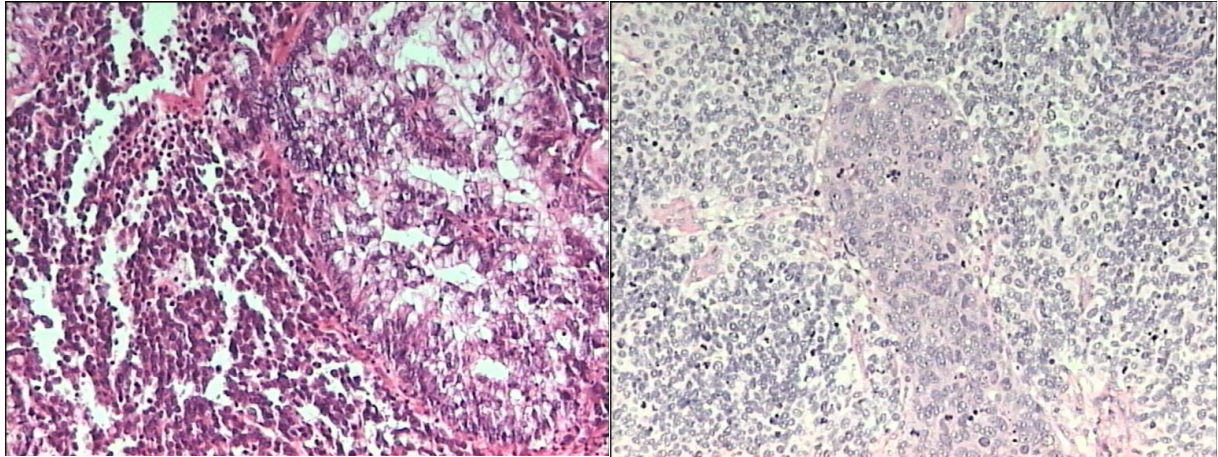
Tab. 2: Paraneoplasien in Assoziation mit Bronchialkarzinom-Histotypen

Paraneoplasie	Tumortyp
Cushing Syndrom (ACTH)	SCLC, Karzinoid
Karzinoid-Syndrom	Karzinoid, SCLC
Hyponatriämie (ADH)	SCLC
Hyperparathyreoidismus (PTH, PTHrP)	SCC
Gynäkomastie (HCG)	Alle Typen
Trommelschlägelfinger und hypertrophe pulmonale Osteoarthropathie (Pierre-Marie-Bamberger-Syndrom)	unabhängig vom Typ, v.a. durch Nähe zur Pleura bestimmt
Mentale Syndrome (toxische Konfusions- Psychosen)	SCLC
Kortikale cerebrale Degeneration	Alle Typen
Enzephalomyelitis	SCLC
Sensorische Neuropathie	SCLC
Myopathisches-myasthenisches Syndrom (Lambert-Eaton-Syndrom)	SCLC
Störungen der Hämostase	Alle, bei Adeno gehäuft

adaptiert nach Rosai 1996

Die Histologie hat entscheidend zum Verständnis und zur Klassifikation von Tumoren beigetragen. Zudem ist sie in der Lage, rein deskriptiv, biologische Phänotypen zu definieren, wie beispielsweise intraepitheliales Wachstum, Lymph- und Blutgefäß-

invasion. Problematisch für eine definitive histologische Klassifizierung ist die Tumorerogenität, die insbesondere bei Lungenkarzinomen oft zu beobachten ist (Müller & Fisseler-Eckhoff 1989). Zwei Beispiele für intratumorale Heterogenität sind in Abb. 1 dargestellt. Sie zeigen ein Plattenepithel- und ein Adenokarzinom der Lunge, welche zusätzlich eine Komponente mit kleinzelliger Differenzierung aufweisen.



A

B

Abb. 1: Beispiele für die morphologische Tumorerogenität von Bronchialkarzinomen (A) Adenokarzinom, (B) Plattenepithelkarzinom, jeweils mit SCLC-Anteil

Der morphologischen Klassifikation sind Grenzen gesetzt, die durch die Auflösung der Methode bedingt sind. Sie betreffen insbesondere Fragestellungen, die sich aus der zugrundeliegenden genetischen Verschlüsselung der Zellen ergeben.

So ist bei einigen Tumoren der histogenetische Ursprung noch nicht geklärt. Für das kleinzellige Bronchialkarzinom wird z.B. angenommen, daß es sich aus neuroendokrinen Vorläuferzellen des Bronchialtraktes, den sog. Kulchitsky Zellen, entwickelt. Die Tatsache, daß morphologische Übergangsformen, wie in Abb. 1 dargestellt, existieren, läßt jedoch an dieser Hypothese zweifeln. Ebenso sind als Stammzellen "normale" proliferationsaktive Epithelien vorstellbar, die erst im Rahmen der malignen Transformation eine neuroendokrine Differenzierung annehmen.

Eine klinisch relevante Aufgabe für den Pathologen ist die Beurteilung des biologischen Verhaltens eines Tumors, d.h. dessen Aggressivität, das Potential zur Metastasierung oder das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie. Antworten zu diesen Fragen lassen sich in der Regel nicht aus dem histologischen Bild ablesen. Sie bedürfen des Verständnisses der Biologie und dabei an ersten Stelle der ihr zugrundeliegenden genetischen Läsionen. Ziel ist es daher, zusätzlich zur histologischen Beurteilung von Tumoren, Methoden zu erarbeiten, die einen Überblick über das maligne Potential eines Tumors geben, also prädiktiv sind, und somit auf die Wahl der Therapiekonzepte einwirken können.

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die Erarbeitung von Korrelationen zwischen Phäno- und Genotyp von Karzinomen des Respirationstraktes.

2 Material und Methoden

2.a Tumorkollektive

Die Arbeiten basieren auf insgesamt drei Tumorkollektiven. Zum einen wurden Proben von Autopsien, die an der Pathologie der Charité, dem Pathologischen Institut der Christians-Albrecht-Universität Kiel und dem Departement für Pathologie der Universität Zürich durchgeführt wurden, untersucht. Tumor- und Normalgewebeproben wurden in der Regel tiefgefroren. Dieses Kollektiv wurde insbesondere für die Analyse der hämatogenen Metastasierung von Lungenkarzinomen mit herangezogen, indem synchrone Primär- und Sekundärtumoren untersucht werden konnten.

Bei den weiteren Kollektiven handelt es sich um Resektate von Patienten mit einem Karzinom der Kopf-Hals-Region und der Lunge, die an der Charité operiert wurden. In enger Zusammenarbeit mit den chirurgischen Kollegen, in der HNO-Klinik insbesondere mit Frau Dr. Bockmühl und in der Allgemeinen Chirurgie mit Herrn Prof. Gellert, wurden über einen Zeitraum von drei Jahren, von fast jedem Patienten Gewebe vom Primärtumor, etwaigen Metastasen und konstitutionellem Normalgewebe frisch asserviert. Zudem wurden von den meisten Tumoren Primärkulturen angelegt, die in bisher 8 Fällen zur Etablierung einer Tumorzelllinie führten.

2.b Zusammenstellung tumorbiologischer Methoden

Eine Übersicht über einige Methoden, die in der Tumorgenetik und -biologie Anwendung finden, ist in Abb. 2 dargestellt. Generell lassen sich dabei Techniken, die DNA- bzw. RNA untersuchen von Protein-analytischen Verfahren abgrenzen. Die auf den Nukleinsäuren basierenden Methoden werden in der Tumorgenetik angewandt. Die phänotypische Charakterisierung findet dagegen vornehmlich auf der Proteinebene statt.

Tumorgenetik

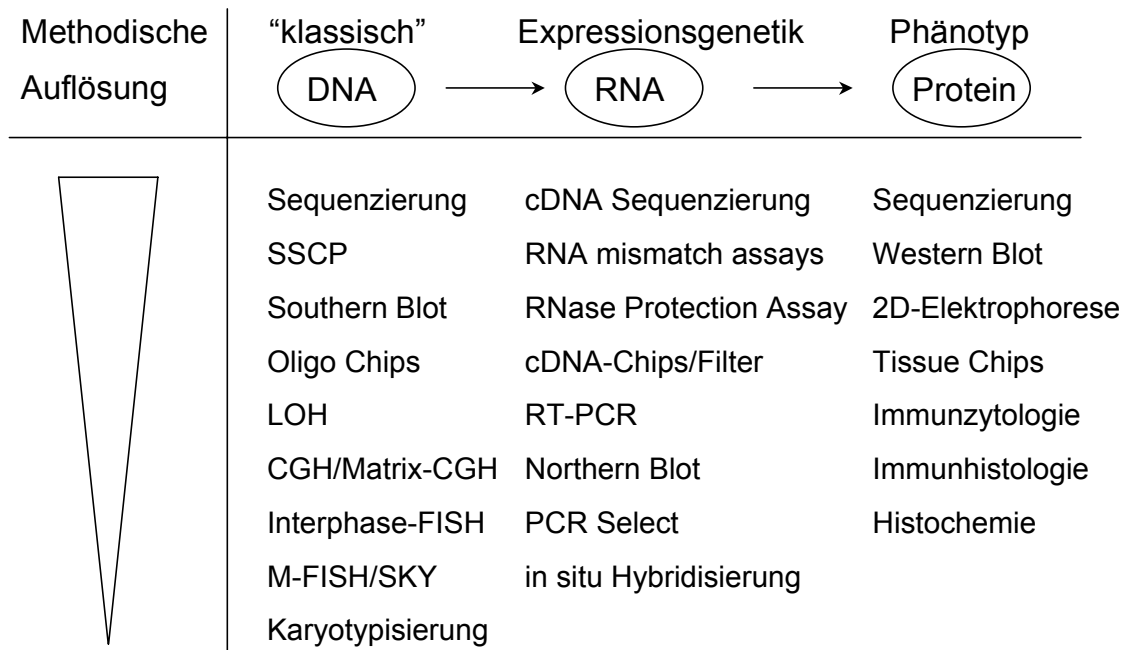


Abb. 2: Methoden in der Tumorforschung mit schematischer Darstellung des relativen Auflösungsvermögens.

Auf alle Verfahren, die in Abb. 2 aufgeführt sind, soll in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden. Wichtig ist jedoch, daß man sich bei der Anwendung einer bestimmten Methode über deren Vor- und Nachteile und insbesondere das jeweilige Auflösungsvermögen im Klaren ist. Um einen Überblick über Veränderungen auf chromosomaler Ebene zu erlangen, sind klassische zytogenetische Verfahren, wie die G- und R-Bänderung anwendbar. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist ebenfalls dafür einsetzbar, gehört allerdings mit verbesserter Auflösung bereits zu den molekularzytogenetischen Verfahren. Dabei ist zu beachten, daß einzelne Techniken, wie z.B. die CGH, insbesondere zur Detektion von DNA-Über- und Unterrepräsentierungen sowie Amplifikationen dient. Zur Erkennung von Translokationen und Rearrangements müssen weitere Methoden, z.B. die M-FISH

(multiplex-FISH, 24-Farben-FISH), eingesetzt werden (*Speicher et al. 1996*). Mit zunehmender Sensitivität des Verfahrens lassen sich Veränderungen auf Gen- und auf Nukleotid-Ebene erfassen, insbesondere mittels SSCP-Analysen und DNA-Sequenzierung. Dabei sollte man jedoch immer die untergeordnete Funktion eines Gens im Gesamtsystem beachten, was insbesondere bei der Erarbeitung von Vorstellungen über die Entstehung multigener Erkrankungen von Bedeutung ist.

Insgesamt läßt sich bemerken, daß es sinnvoll ist, sich von Übersichtsverfahren zu Methoden mit erhöhter Sensitivität vorzuarbeiten. Nur durch die Kombination von mehreren Techniken läßt sich die Frage von komplexen Veränderungen, wie sie in Tumoren zu finden sind, klären.

Zu einzelnen Techniken wurden eigene methodische Beiträge geleistet. Auf diese soll im folgenden genauer eingegangen werden.

2.c Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH ist eine molekularzytogenetische Methode, die 1992 erstmalig von Anne & Olli Kallioniemi aus der Arbeitsgruppe von Dan Pinkel an der Universität San Francisco publiziert wurde (*Kallioniemi et al. 1992*) und fast zeitgleich in den Arbeitsgruppen von Thomas Cremer und Peter Lichter in Heidelberg entwickelt wurde (*Du Manoir et al. 1993*). Die Methode ist schematisch in Abb. 3 dargestellt.

Sie beruht auf der Hybridisierung von Tumor- und Normal-DNA auf normale Chromosomenmetaphasen, die aus Blutlymphozyten präpariert werden. Dabei werden beide Genome zunächst mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert gefärbt und in gleichen Mengenanteilen zusammen mit einem Überschuß an humaner Cot1-DNA auf die Chromosomen hybridisiert.

Die Cot1 DNA dient dabei der Absättigung hochrepetitiver DNA Sequenzen im Bereich des Heterochromatins. Repetitive DNA-Abschnitte, wie sie z.B. im Bereich der

Chromosomenzentromeren vorkommen, haben eine unterschiedliche Hybridisierungskinetik im Vergleich zu einmalig vorkommenden Sequenzen und verursachen ohne Zugabe von Cot1 DNA ein sehr starkes Fluoreszenzsignal, welches die digitale Bildauswertung beeinträchtigen würde.

Die Genome binden quantitativ an ihre entsprechenden Bindungsstellen auf den Chromosomen. Im Tumor relativ weniger vorkommende Sequenzen führen zur stärkeren Hybridisierung von Normal-DNA in diesem Bereich, das Fluoreszenzsignal des Normalgenoms überwiegt. Im umgekehrten Fall einer DNA-Überrepräsentierung oder Amplifikation bindet entsprechend mehr Tumor-DNA und die Fluoreszenz des Tumorgenoms überwiegt. Durch die Aufnahme unterschiedlicher Bilder am Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Farbfiltern und einer anschließenden quantitativen Auswertung der Fluoreszenzsignale entlang der Chromosomen, können die DNA-Imbalancen eines Tumors berechnet werden. Das Ergebnis kann dann in Form eines Ratio-Profiles dargestellt werden, wobei Ausschläge nach links einer Deletion und Ausschläge nach rechts einer DNA-Überrepräsentierung entsprechen.

Mit Hilfe des von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Programms kann die Darstellung zusätzlich in Form eines CGH-Summenkaryogramms erfolgen, bei dem die Veränderungen durch Falschfarben kodierte, gemittelte Chromosomen dargestellt werden. Die rote Farbe entspricht dabei einer Deletion, grün einer DNA-Überrepräsentierung und blau einer Gleichverteilung beider Genome, d.h. mittels CGH ist keine Imbalance detektierbar.

Das genaue Prinzip der Methode der Comparativen Genomischen Hybridisierung ist detailliert in dem beiliegenden Übersichtsartikel "Die komparative genomische Hybridisierung - eine Screeningmethode in der genetischen Tumordiagnostik" dargestellt. Erklärungen zur Bildverarbeitung im Rahmen der CGH können dem Artikel

”Analyseprogramm zur quantitativen Erfassung chromosomaler Aberrationen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH)” entnommen werden. Die Algorithmen, die bei unserem CGH-Programm angewandt werden, sind dem Artikel ”Image analysis for Comparative Genomic Hybridization based on a karyotyping program for Windows” aufgeführt.

Die Protokolle für die präparativen Schritte können insbesondere der Publikation ”Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p” entnommen werden und sind auch über die Internet-Seite unserer Arbeitsgruppe (<http://amba.charite.de/cgh>) abrufbar.

2.d Molekulargenetische Methoden

SSCP-Analyse

Die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis, SSCP) dient der Detektion von DNA-Mutationen auf Nukleotid-Ebene. Dabei wird ein maximal 500 bp langes DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Die Fragmente werden anschließend denaturiert und auf einem hochauflösenden Polyacrylamid-Gel unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt.

SSCP = **S**ingle**s**trand**C**onformation**P**olymorphism

1. "Heisse" PCR (mit radioaktivem Nukleotid)
2. Denaturierung des Amplifikationsproduktes
3. Auftrennung auf Polyacrylamid Gel
4. Autoradiographie

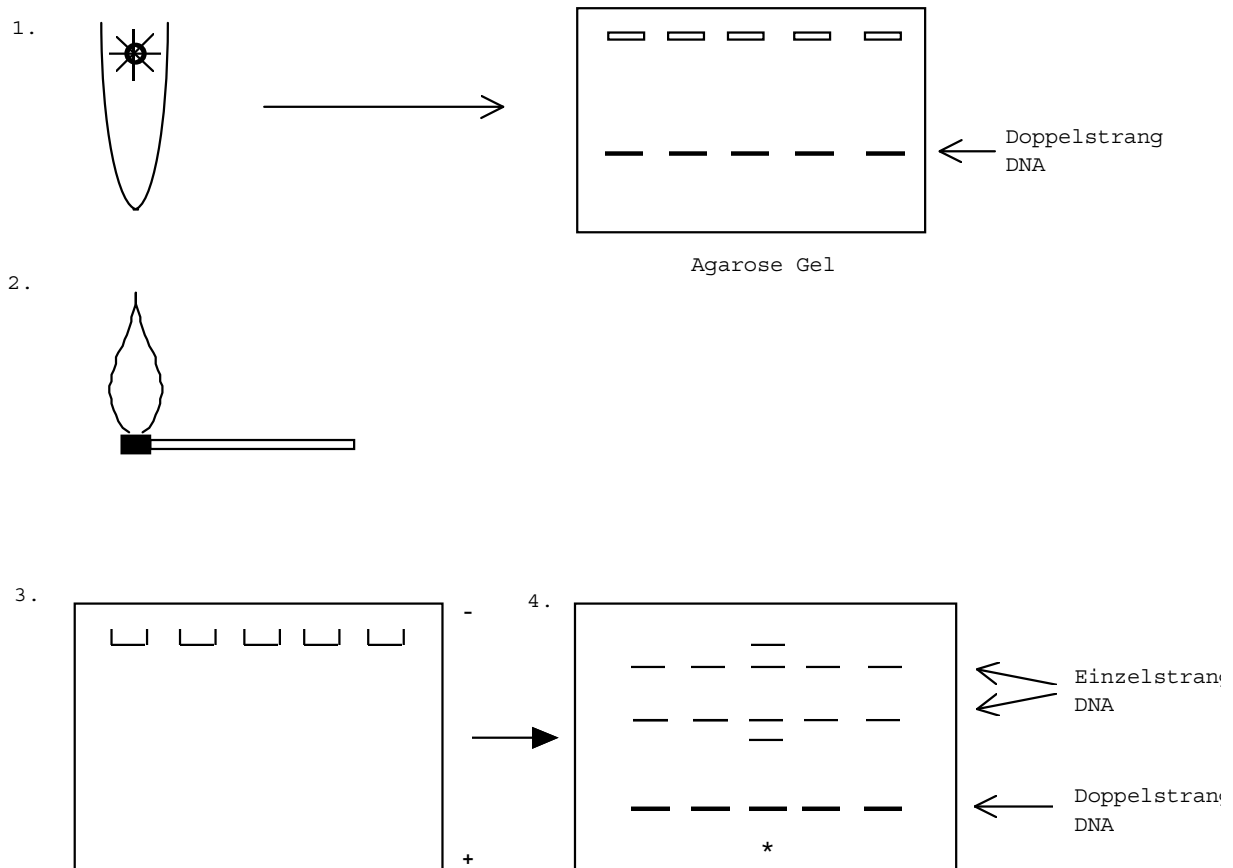


Abb. 3: Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP).

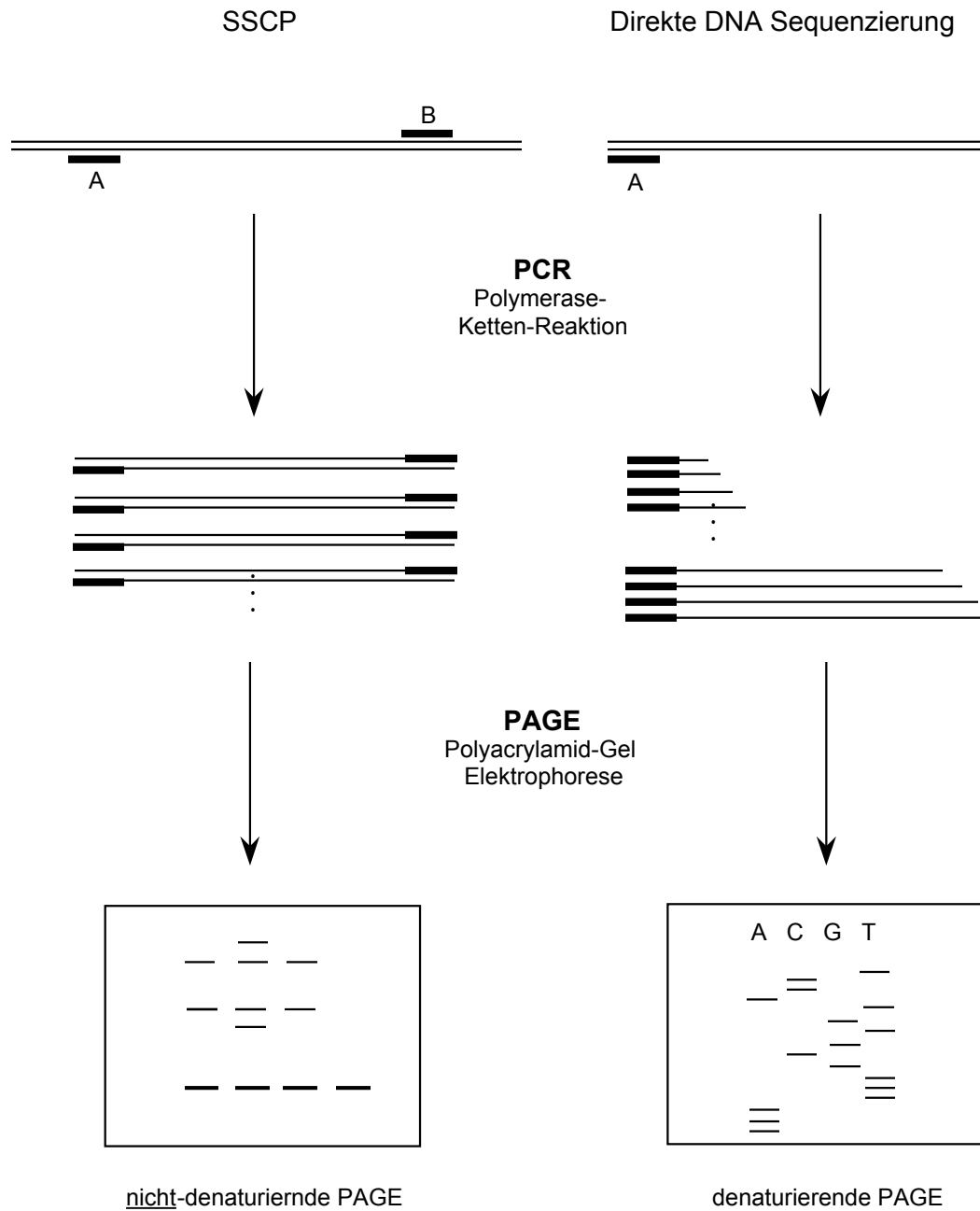
Das Laufverhalten des Fragmentes resultiert aus der Konformation des DNA

Stranges, die wiederum durch die Basenabfolge bestimmt ist. Eine Mutation im DNA-Fragment führt zu einer Konformationsänderung und resultiert in einem etwas abgeänderten Migrationsverhalten innerhalb des Gel, was in einem veränderten Bandenmuster gegenüber den nicht-mutierten Fragmenten zum Ausdruck kommt (siehe mit * markierte Probe in Abb. 3).

Die SSCP wird als Screeningmethode für eine schnelle Untersuchung möglichst vieler Tumorproben eingesetzt. Diejenigen Proben, die in der SSCP Analyse ein suspektes Bandenmuster aufweisen, werden dann sequenziert zur Bestätigung und genauen Bestimmung der Mutation.

Die klassische Form der radioaktiven SSCP-Analyse wurde in zwei eigenen Arbeiten angewandt (*Petersen et al. 1993, Reichel et al. 1994*). Es wurde zudem ein nicht-radioaktives Verfahren (*Petersen et al. 1996*) entwickelt, das neben der SSCP- auch für die LOH-Analyse und die direkte DNA Sequenzierung eingesetzt werden kann ("Use of non-radioactive detection in SSCP, direct DNA sequencing and LOH analysis"). Es beruht darauf, daß einerseits bei den drei Verfahren mittels Amplifikation DNA Fragmente generiert werden, die über die Markierung des PCR Primers einheitlich gekennzeichnet werden können, und andererseits diese Fragmente über Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Dies ist für die SSCP-Analyse und das direkte Sequenzieren schematisch in Abb. 4 wiedergegeben.

Durch die Verwendung des Haptens Biotin bei der Primermarkierung und den Einsatz eines Kapillarblotverfahrens zum Transfer der DNA auf eine Nylonmembran, konnte der Detektionsschritt bei den drei Verfahren vereinheitlicht werden. Die Visualisierung der DNA erfolgte über einen Avidin-Alkalische Phosphatase-Enzymassay, der über einen Substratumsatz entweder zur Bildung eines Farbniederschlags oder zur Chemilumineszenz führt.



A, B = Biotin-markierte Primer

Abb. 4: Vergleich zwischen SSCP-Analyse und direkter DNA Sequenzierung

Direkte DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung dient der Entschlüsselung des genetischen Codes, also der Nukleotidabfolge in der DNA. Diese Methode kann zum einen angewandt werden zur Erkennung noch unbekannter Gensequenzen, zum anderen lassen sich Mutationen in bereits bekannten Genen nachweisen. Als DNA Matrize werden häufig PCR Produkte eingesetzt. Entsprechende Sequenzierungsprotokolle bezeichnet man als direkte DNA Sequenzierung. Sie werden bevorzugt zur Detektion von Mutationen in bereits bekannten Sequenzen eingesetzt.

Problematisch bei der DNA Sequenzierung ist der Leserahmen, d.h. der Bereich in dem die Basenabfolge erfaßt werden kann. Dabei gibt es einerseits Limitationen bezüglich sehr langer Sequenzen, andererseits kann aber auch die Lesbarkeit in der Nähe des Sequenzierprimers erschwert sein. Letzteres Problem konnte durch die Entwicklung eines besonderen Protokolls umgangen werden (siehe Artikel "Direct DNA sequencing following SSCP analysis"). Es beruht im Prinzip auf der Einführung eines separaten Reaktionsschrittes, bei dem ein radioaktives Nukleotid eingebaut wird, das in der Sequenz gerade auf den Primer folgt (*Petersen et al. 1993, Reichel et al. 1994, Petersen et al. 1994*).

Von der direkten Sequenzierung sind Verfahren zu unterscheiden, bei denen das DNA Fragment vorher in einen Plasmidvektor kloniert und in Bakterien zur Vermehrung eingeschleust wurde. Als Primer wird hierbei eine Sequenz im Randbereich der Klonierungsstelle benutzt. Diese Methode eignet sich insbesondere zur Bestimmung von unbekanntem Sequenzen und findet beispielsweise Anwendung bei der automatischen DNA Sequenzierung im Rahmen von Genomforschungsprojekten.

Unabhängig von der Generierung der DNA-Matrize erfolgt häufig auch im Rahmen der

Sequenzierungsreaktion eine Amplifikation mittels PCR. Entsprechende Protokolle werden als "Cycle Sequencing" bezeichnet.

Detaillierte Reaktionsschritte sind in den oben aufgeführten Publikationen nachlesbar.

LOH-Analyse

Die "loss of heterozygosity" (LOH)-Analyse basiert auf der Untersuchung von polymorphen genetischen Markern des menschlichen Genoms. Es werden heutzutage vor allem sogenannte Mikrosatelliten-Polymorphismen, bei dem sich die Allele durch die Anzahl kurzer repetitiver Sequenzen unterscheiden, verwendet. Hat ein Patient verschiedene Allele von seiner Mutter und seinem Vater vererbt, d.h. im Falle der Heterozygotie, kann durch den Vergleich beider Allele in Tumor- und Normal DNA eines Individuums eine Deletion entsprechend dem sogenannten Heterozygotie-Verlust (LOH) festgestellt werden. Dies ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.

Mikrosatelliten-Polymorphismen finden sich über das gesamte Genom verteilt und ihre relative Anordnung entlang der Chromosomen ist über Kopplungsanalysen geklärt. Der Nachweis von Allelverlusten kann damit zur Lokalisation von Tumorsuppressorgenen benutzt werden. Dies geschieht durch die Untersuchung möglichst vieler Marker an möglichst vielen Tumoren im Rahmen sogenannter Allelotypisierungsstudien. Dabei ist es möglich, kleine DNA Verluste aufzuspüren und eine Karte ("deletion mapping") aufzustellen mit minimalen Regionen interstitieller Deletionen (*Petersen et al. 1998a*).

Ein ähnliches Prozedere wird auch eingesetzt, um andere Krankheitsgene - zum Beispiel solche, die eine bestimmte Erbkrankheit hervorrufen - zu lokalisieren. Dabei wird über Kopplungsanalysen untersucht, ob innerhalb der betroffenen Familien ein Marker oder Allel mit dem Krankheitsphänotyp segregiert.

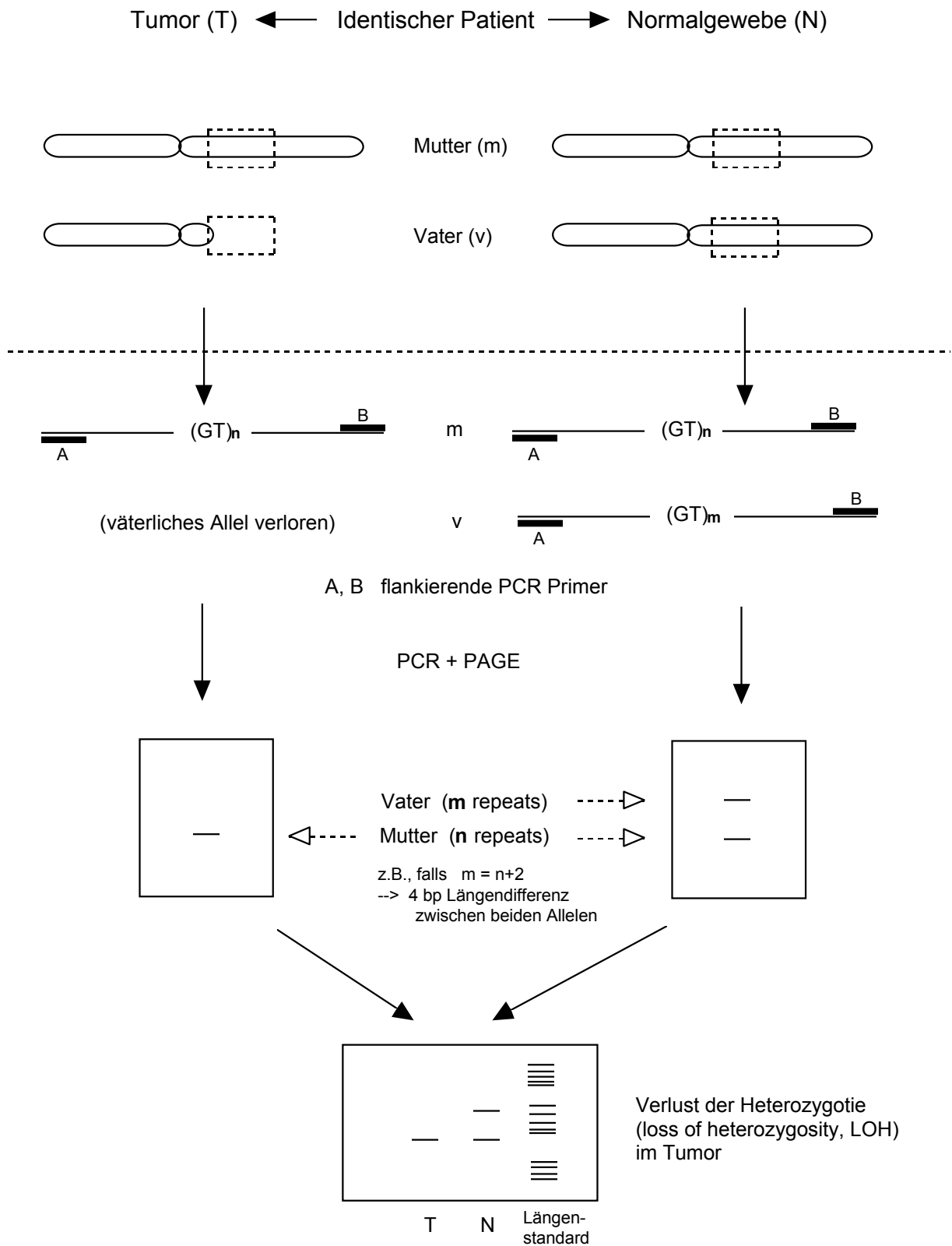


Abb. 5: Schema der LOH-Analyse

2.e Telepathologie

Tumorbiologische Untersuchungen sind wesentlich abhängig von einer korrekten pathologisch-anatomischen Diagnose. Zudem ist es in vielen Fällen unabdingbar, daß das untersuchte Gewebe von einem Pathologen auf seine Reinheit, d.h. bei Tumorproben beispielsweise die Kontamination mit Normalgewebe (Stroma, Entzündungsinfiltrate), begutachtet wird. Allzu häufig wird dies jedoch nicht genügend berücksichtigt. So basiert sicherlich das Urteil einiger CGH-Studien, die über einen hohen Anteil an Tumoren ohne Veränderungen berichten, darauf, daß ein Teil der Fälle zuviel Normalgewebe aufwies.

Andererseits muß angemerkt werden, daß es für Wissenschaftler in Grundlagenfächern, die nicht einem Krankenhaus angeschlossen sind, häufig schwierig sein kann, einen entsprechenden pathologischen Service zu erlangen. Für diese Kollegen kann unsere Neuentwicklung auf dem Gebiet der Telemikroskopie hilfreich sein ("Telemicroscopy via the Internet"). Es beschreibt erstmalig die Fernsteuerung eines automatischen Mikroskops über einen konventionellen Internet-Browser (*Wolf et al. 1998a, Wolf et al. 1998b*). Der Vorteil im Vergleich zu früheren Telemikroskopiesystemen liegt darin, daß jeder Internetteilnehmer ein möglicher Konsultationspartner für eine mikroskopische Beurteilung werden kann. Die früheren Systeme stellten nur 2-Punkt-Lösungen dar, d.h. es konnten in der Regel nur 2 kompatible Systeme miteinander kommunizieren. Mittlerweile haben wir auch eine Version entwickelt, die ohne ein automatisches Mikroskop funktioniert und daher sehr viel preisgünstiger ist.

Die Web-Seite unseres Telemikroskops ist in Abb. 6 dargestellt.

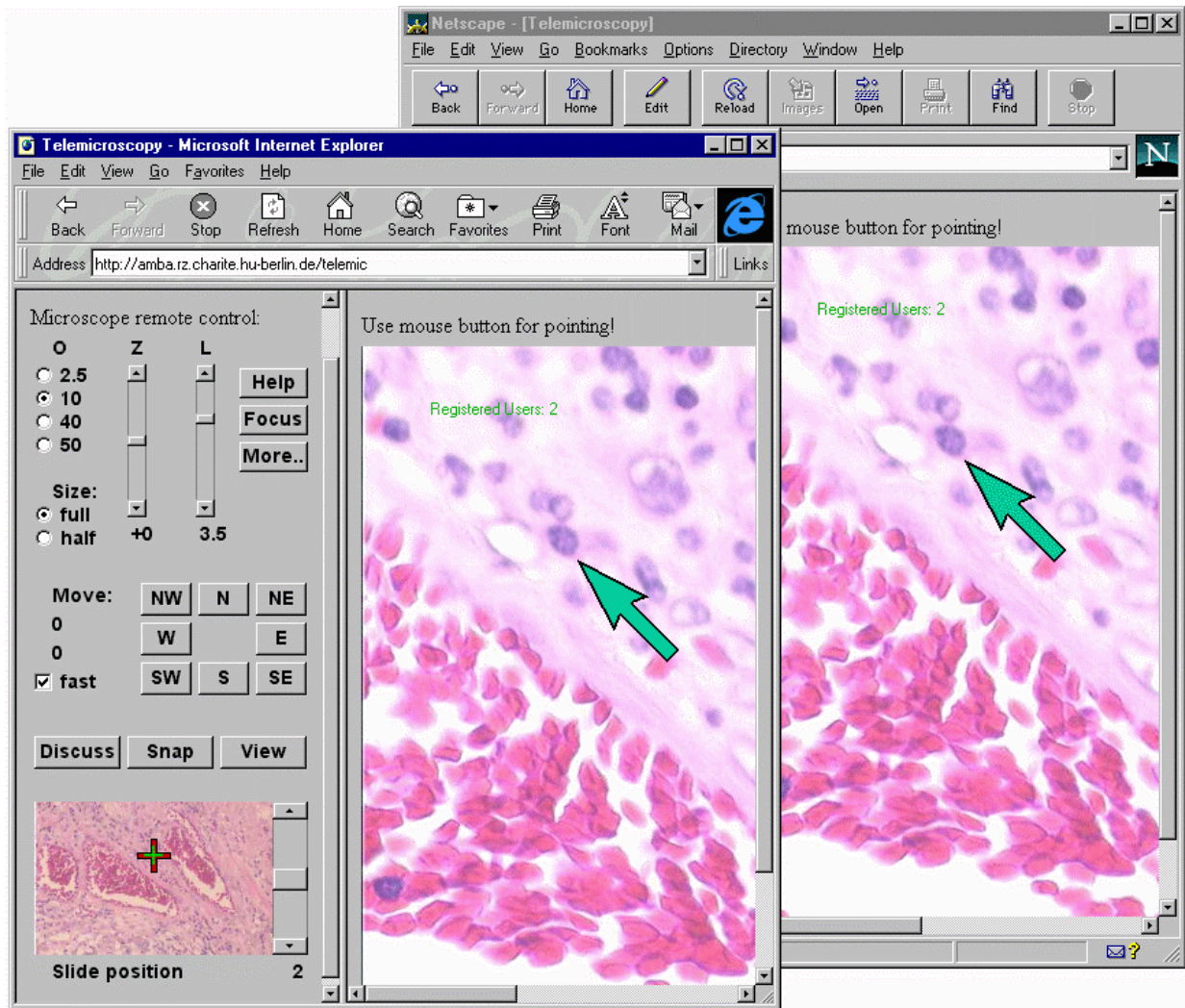


Abb. 6: WWW-Seite des Telemikroskops. Der Zugang ist möglich über einen Internet-Browser mit Java-Support auf der Web-Seite <http://amba.charite.de/telemic>.

3 Ergebnisse

3.a Methodische Beiträge - CGH Summen-/Superkaryogramme/Histogramme

Das Ergebnis einer CGH-Untersuchung wird bei allen Auswerteprogrammen durch das sogenannte mittlere Ratio-Profil dargestellt (Abb. 7a). In dieses mittlere Profil fließen sämtliche Profile der gleichen Chromosomen aus mehreren aufgenommenen Metaphasen eines Falles ein. Die Einzelprofile errechnen sich anhand der Fluoreszenzintensitäten von Tumor- und Normal-DNA, die entlang der Chromosomenachse bestimmt werden. Zusätzlich zum Profil wird das Ergebnis häufig auch in Form einer Strich- oder Graphdarstellung wiedergegeben (Abb. 7b).

Zusätzlich zur Profil- und Strichdarstellung kann in der von uns entwickelten CGH-Software ("Analyseprogramm zur quantitativen Erfassung chromosomaler Aberrationen mittels Komparativer Genomischer Hybridisierung (CGH)" und "Image analysis for Comparative Genomic Hybridization (CGH) based on a karyotyping program for Windows") das Ergebnis in Form gemittelter Ratio-Chromosomen dargestellt werden. Wir bezeichnen es als CGH-Summenkaryogramm (Abb. 7a).

Um gemeinsame Veränderungen von Tumoren einer bestimmten Gruppe (z.B. einer histologischen Entität) zusammenzufassen, können die Summenkaryogramme der einzelnen Fälle in einem CGH-Superkaryogramm übereinandergelegt werden (ausführlich erklärt in der Arbeit "Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p"). Es repräsentiert typische chromosomale Imbalancen einer Tumorgruppe aufgrund der Tatsache, daß durch die Superposition zufällige Veränderungen unterdrückt und nur diejenigen sichtbar bleiben, die in einer größeren Anzahl der Fälle (Abb. 7c). Diese Auswertung ist insbesondere von Vorteil, wenn in einer Gruppe nur wenige Fälle vorhanden sind.

Während die Summen- und Superkaryogramme im wesentlichen nur neue

Darstellungsformen sind, lassen sich mit den Histogrammen weitergehende statistische Auswertungsmöglichkeiten realisieren (Abb. 7e). Sie werden vor allem dann sinnvoll, wenn die Fallzahlen groß genug sind, d.h. ab etwa 20 Tumoren. Die Histogrammdarstellung läßt sich von der klassischen Strichdarstellung (Abb. 7) ableiten, bei der die Einzelveränderungen anhand von Strichen beiderseits der Chromosomenideogramme zusammengefaßt werden. Diese Darstellung erfolgte manuell und war mit entsprechenden Fehlern behaftet. Zur Erstellung der Histogramme werden die Veränderungen in Form einzelner Striche automatisch an einer bestimmten Stelle aufsummiert und im Verhältnis zu der Gesamtanzahl der Fälle gesetzt. Daraus ergibt sich eine Verteilung der chromosomalen Imbalanzen als Inzidenzkurve links und rechts der Chromosomenideogramme. Ausschläge auf der rechten Seite entsprechen einer Überrepräsentation, Ausschläge auf der linken Seite DNA-Verlusten. Die Inzidenz läßt sich anhand der Hilfslinien ablesen. Der Maximalwert von 100% wird erreicht, falls alle Tumoren an einer bestimmten chromosomalen Region einen DNA-Gewinn oder -Verlust aufweisen.

Die Histogrammdarstellung hat mehrere Vorteile gegenüber der konventionellen Strichdarstellung. Erstens kann so das Ergebnis einer sehr großen Anzahl von Fällen graphisch dargestellt werden. Dies ist bei der Strichdarstellung schon allein aufgrund des Platzmangels nicht möglich. Zweitens zeigt es in übersichtlicher Form, wo und wie häufig eine Tumorgruppe DNA-Gewinne und -Verluste aufweist. Dritter und wichtigster Punkt ist die Tatsache, daß sich erstmals phänotypisch unterschiedliche Tumorgruppen über das gesamte Chromosomenkomplement statistisch miteinander vergleichen lassen (Abb. 7f). Es ist damit ein ideales Werkzeug, um signifikante Unterschiede zwischen Tumorgruppen zu erarbeiten und somit Korrelationen zwischen dem Geno- und Phänotyp aufzudecken.

Die nähere Beschreibung der Erstellung von Histogrammen und Differenzhistogrammen

ist den Arbeiten "Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung" und "Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and non-metastasizing primary head and neck carcinomas" zu entnehmen.

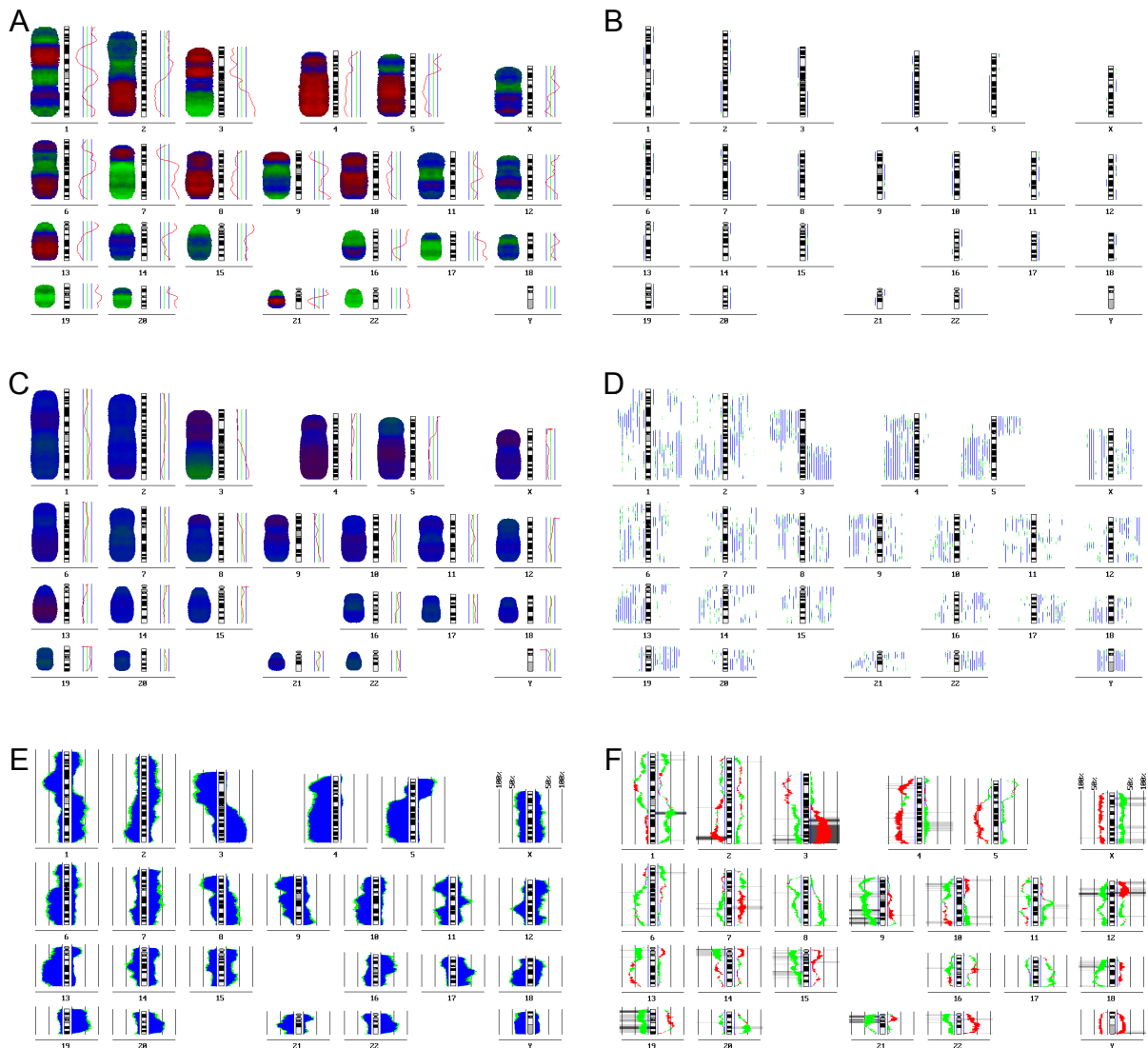


Abb. 7: Darstellungs- und Auswertungsformen bei der CGH-Analyse. (A) CGH-Summen-karyogramm mit Ratio-Profil, (B) Strichdarstellung eines Falles, (C) Superkaryogramm mehrerer Tumoren einer Gruppe, (D) Strichdarstellung, (E) Histogramm, (F) Differenzhistogramme mit statistischem Vergleich zweier Tumorguppen.

3.b Korrelation der genetischen Veränderungen mit den Histotypen

Gut und schlecht differenzierte Plattenepithelkarzinome des HNO-Bereiches

In der ersten CGH Studie über Plattenepithelkarzinome des HNO-Traktes wurden insgesamt 30 Tumoren analysiert. Davon war die Mehrzahl mäßig differenziert und nur insgesamt 3 Tumoren eindeutig gut (G1) und 5 schlecht differenziert (G3). Wir benutzten den Ansatz der CGH-Superkaryogramme, um solche Veränderungen aufzudecken, die mit einer guten bzw. schlechten Tumordifferenzierung verbunden waren. Das Ergebnis ist in Abb. 8 dargestellt.

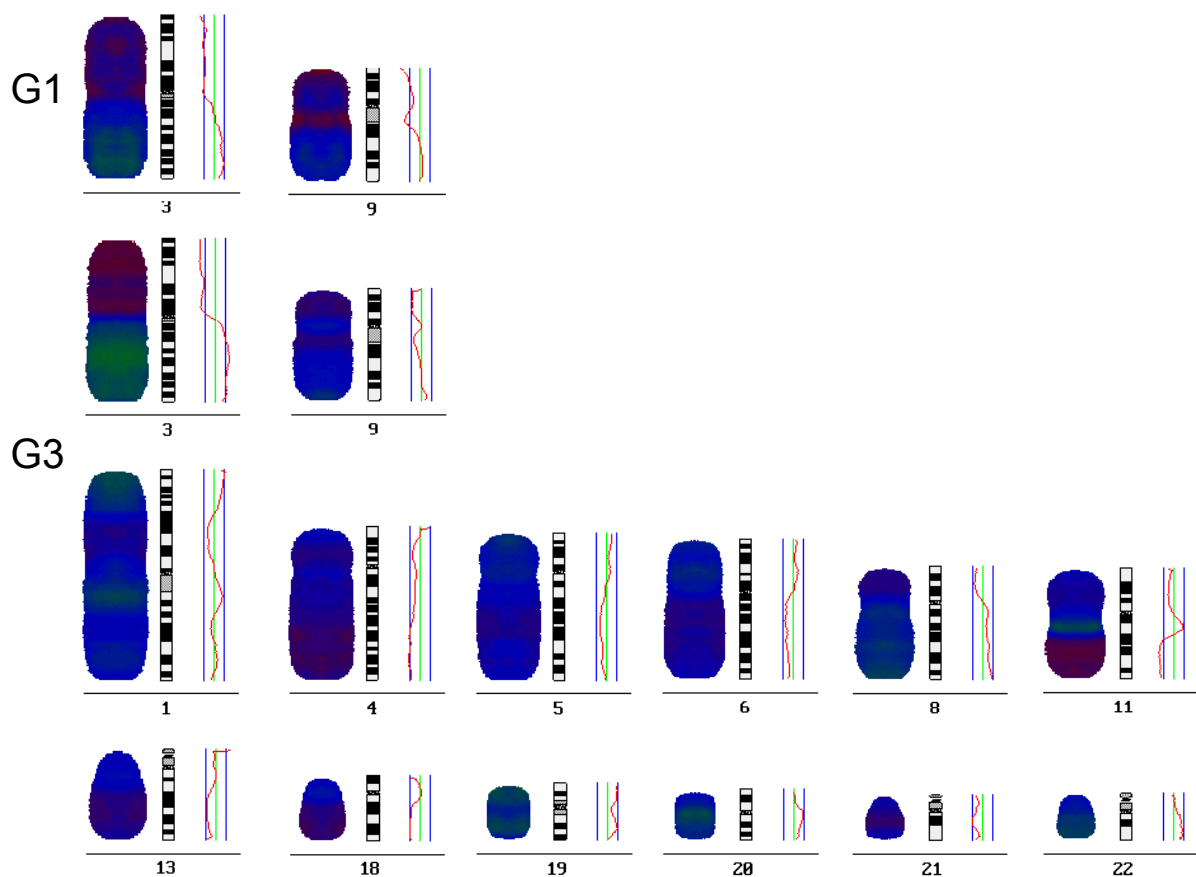


Abb. 8: Vergleich zwischen hochdifferenzierten (G1) und wenig differenzierten (G3) Plattenepithelkarzinomen der HNO-Region

Die Analyse zeigte, daß die G1 Tumoren lediglich Deletionen auf Chromosom 3p und 9p sowie Überrepräsentationen auf Chromosom 3q aufwiesen. Demgegenüber zeigten die G3-Karzinome auf diesen beiden Chromosomen ähnliche Veränderungen.

Zusätzlich traten jedoch multiple weitere Aberrationen auf, u.a. Deletionen auf 8p, 11q, 13q, 18q, 21q und Überrepräsentierungen auf 8q, 11q13, 19, 20 und 22.

Kleinzellige Bronchialkarzinome

Es wurden insgesamt 3 Studien über kleinzellige Karzinome durchgeführt (Ried *et al.* 1994, Petersen *et al.* 1997a, Schwendel *et al.* 1997). Die erste, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Thomas Cremer in Heidelberg angefertigt wurde ("Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by Comparative Genomic Hybridization") zeigte bereits ein wiederkehrendes Muster von Veränderungen. In der Beurteilung wurde neben häufigen Deletionen der Chromosomenarme 3p, 5q, 10q, 13q, 17p insbesondere auf DNA-Überrepräsentationen auf 3q, 5p, 8q, 17q und distinkte Amplifikationen der chromosomalen Banden 1p32, 2p23, 7q11.2, 8q24, 13q33-34 und 19q13.1 hingewiesen. In einer zweiten Studie mit einer erweiterten Fallzahl kleinzelliger Bronchialkarzinome ("Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p") konnte gezeigt werden, daß Deletionen insgesamt häufiger vorkommen und damit aller Wahrscheinlichkeit nach eine größere Bedeutung für die Biologie dieses Tumors haben als DNA-Überrepräsentationen. Das Auftreten von Verlusten der Chromosomenarme 3p, 4q, 5q, 10q, 13q und 17p ist sehr charakteristisch. Als Einzelveränderung treten sie in über 85%, simultan in über 50% der Tumoren auf. Die Deletion von Chromosom 10q war mit 94% die zweithäufigste Läsion nach dem Chromosom 3q-Verlust mit 100%. Diese typischen Veränderungen sind auch im Superkaryogramm der 22 analysierten Karzinome sichtbar (Abb. 9). Interessanterweise weisen die kleinzelligen Karzinome in der Regel große Deletionen eines gesamten Chromosoms oder Chromosomenarms auf.

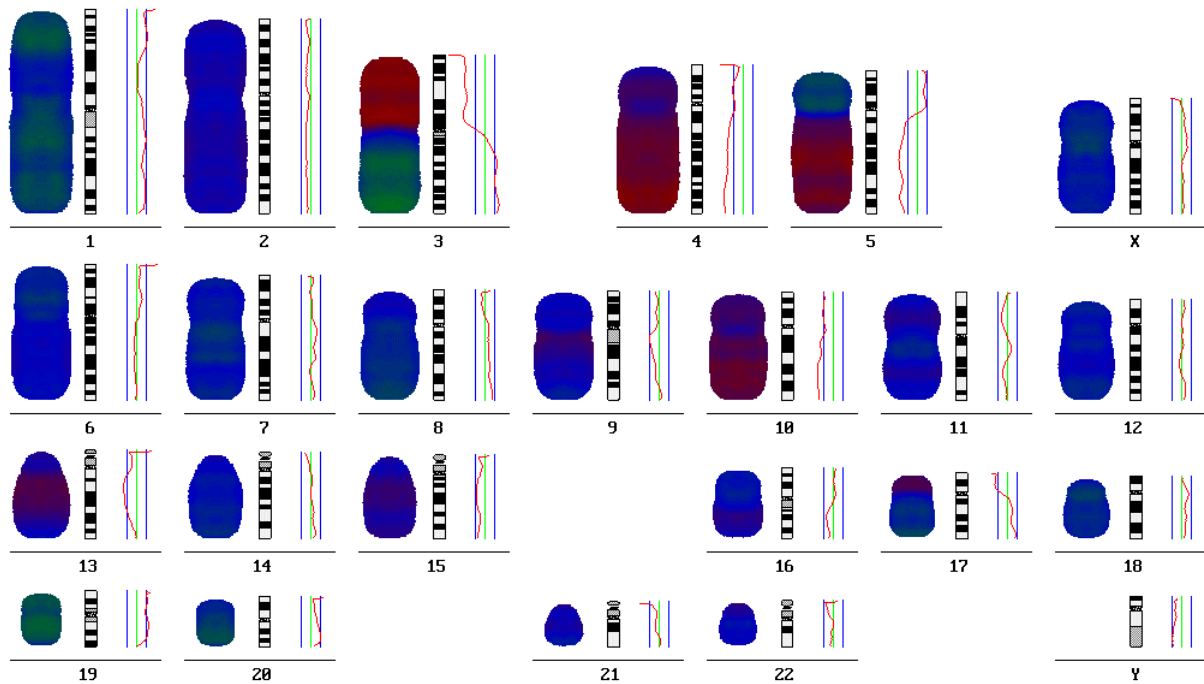


Abb. 9: CGH-Superkaryogramm von 22 kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Typische Deletionen zeigen sich auf den Chromosomen 3p, 4q, 5q, 10q, 13q und 17p.

Eine dritte Studie über den Vergleich von Primärtumoren und Metastasen ("Primary small cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations") konnte diese Ergebnisse bestätigen. Insbesondere liess sich bei den 10 untersuchten Fällen immer ein klonaler Zusammenhang zwischen dem Primärtumor und seinen Metastasen feststellen (siehe auch unten).

Adeno- und Plattenepithelkarzinome der Lunge

Es wurde eine erste Studie an nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen publiziert, die insgesamt 25 Plattenepithel- und 25 Adenokarzinome beinhaltete ("Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung"). Sie zeigte, dass sie ebenfalls durch ein Muster rekurrenter Veränderungen charakterisiert sind. Ähnlich wie das kleinzellige Karzinom haben nicht-kleinzellige Karzinome häufig Deletionen der Chromosomen 3p, 4q, 5q und 13q. Deletionen von Chromosom 10q treten deutlich seltener auf. Zusätzlich lassen sich Deletionen der Chromosomenarme 6q, 8p, 9p, 18q und 21q beobachten. DNA-Überrepräsentationen zeigen sich in beiden Gruppen bei der chromosomalen Bande 11q13. Adenokarzinome zeigten sehr viel häufiger Überrepräsentationen des Chromosomenarms 1q, während bei Plattenepithelkarzinomen typischerweise Amplifikationen des distalen Chromosomenarms 3q auftraten.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Analyse mittels Histogrammen und statistische Vergleiche über Differenzhistogrammen und Chi-Quadratstest angewandt (Abb. 10). Dabei zeigte sich, daß die Überrepräsentation der chromosomalen Bande 1q23 und die Deletionen auf den Chromosomen 9q22 und 19 signifikant mit der adenoiden Differenzierung assoziiert waren, während der Verlust auf Chromosom 2q36-37 und Amplifikationen auf Chromosom 3qter signifikant mit der plattenepithelialen Differenzierung korrelierte.

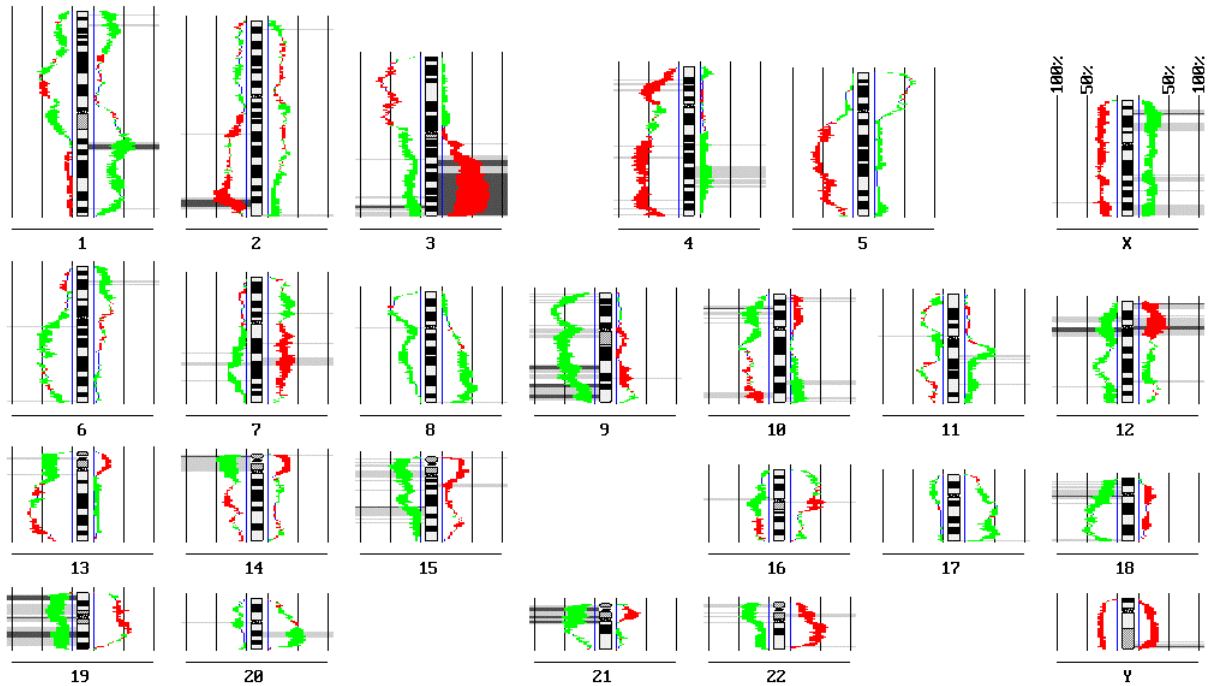


Abb. 10: Differenzhistogramm von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge. Die grünen und roten Bereiche entsprechen respektive dem Überschuß der Veränderungen in der Gruppe der Adeno- bzw. der Plattenepithelkarzinome. Der weiße Bereich zwischen den farbigen Arealen und der 0%-Inzidenzlinie repräsentiert die Veränderungen, die in beiden Tumorgruppen auftreten. Mittels χ^2 -Test wurde die Differenz der Veränderungen auf Signifikanz untersucht (hellgrau 95%, dunkelgrau 99% Signifikanz).

Morphologische Tumorerogenität mit Übergang SCC → SCLC

Es wurden bisher in einem Fall unterschiedliche Areale eines morphologisch heterogenen Tumors untersucht. Es handelt sich um den Fall, dessen Histologie in Abb. 1 dargestellt ist. Der Primärtumor ließ überwiegend eine plattenepitheliale Differenzierung erkennen. Daneben fanden sich auch Areale mit kleinzelliger Differenzierung. Immunhistologisch ließen sich in diesen Arealen die neuroendokrinen Marker Chromogranin und Synaptophysin nachweisen, während der plattenepitheliale Anteil negativ war. Eine synchrone Metastase zeigte eine rein kleinzellige Differenzierung. Es wurde mit Hilfe der CGH der Primärtumor als auch die kleinzellige Metastase untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 11 dargestellt.

Beide Tumoren lassen einen klonalen Zusammenhang erkennen, was bedeutet, daß der eine Tumoranteil aus dem anderen hervorgegangen sein muß. Die genetische Analyse unterstützt damit die Bewertung der Morphologie, die einen Übergang zwischen beiden Differenzierungen nahe legt, und nicht das Vorliegen eines genetischen unabhängigen Kollisionstumors. Da der Primärtumor überwiegend plattenepithelial differenziert war, ist es sehr wahrscheinlich, daß sich das kleinzellige Karzinom aus dem Plattenepithelkarzinom entwickelt hat.

Für die Entstehung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen. Einerseits kann es sich auf dem Boden eines nicht-kleinzelligen Karzinom entwickeln, was einer Dedifferenzierung und der Transformation zu einem maligneren Phänotyp gleichkommt. Andererseits kann es de novo ohne morphologisch faßbare Vorläuferläsion entstehen. Letzteres ist zweifelsfrei sehr viel häufiger. Das kleinzellige Bronchialkarzinom zeigt damit sowohl bezüglich der genetischen Veränderungen als auch der Entstehungsmechanismen Parallelen zum Glioblastoma multiforme. Dieses weist auch typischerweise Deletionen des Chromosom 10 auf. Es kann entweder direkt oder durch maligne Transformation eines low grade Astrozytoms entstehen, wobei die erste Variante sehr viel häufiger ist.

Die mögliche Transformation eines NSCLC in ein SCLC unterstützt zudem die Hypothese, daß es vermutlich nicht eine neuroendokrinen Stammzelle sondern eher eine proliferationsaktive epitheliale Zelle ist, aus der sich das kleinzellige Karzinom entwickelt.

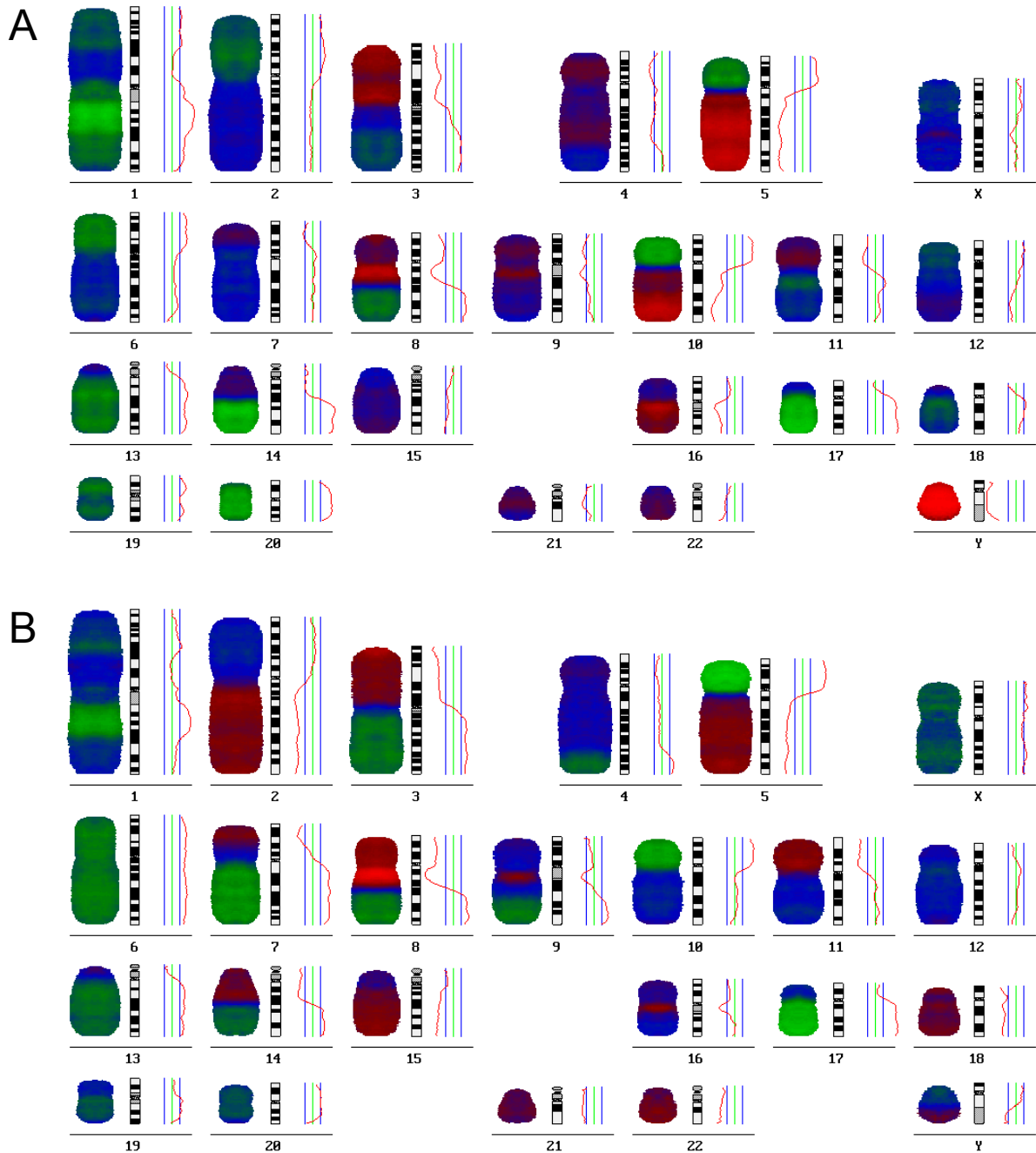


Abb. 11: CGH-Ergebnisse eines morphologisch heterogenen Lungentumors mit SCC- und SCLC-Differenzierung. (A) Tumoranteil aus dem Primärtumor mit vornehmlich plattenepithelialer Differenzierung, (B) rein kleinzellige Lungenmetastase. Aufgrund des großen Anteils ähnlicher Veränderungen (siehe Chromosomen 1, 3, 5, 8, 11, 13, 14, 15, 17, 21, 22) läßt sich ein klonaler Zusammenhang postulieren. Die Profile der Chromosomen 2, 4 und 20 zeigen eine Verschiebung, die durch numerische Aberrationen (Chromosomengewinn bzw. -verlust) erklärt werden kann.

3.c Genetische Veränderungen in Assoziation mit der Metastasierung

HNO-Plattenepithelkarzinome

In einer ersten Studie wurden metastasierende und nicht-metastasierende Primärtumoren der Kopf-Hals-Regionen miteinander verglichen ("Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and non-metastasizing primary head and neck carcinomas"). Dabei wurden zwei Gruppen von Tumoren gebildet. Eine Gruppe umfaßte Karzinome, die trotz fortgeschrittenem Primärtumorstadium keine Lymphknotenabsiedlungen zeigten, während diese bei der zweiten Gruppe in jedem Fall nachweisbar waren. Der Vergleich mittels Differenzhistogramm ist in Abb. 12 dargestellt.

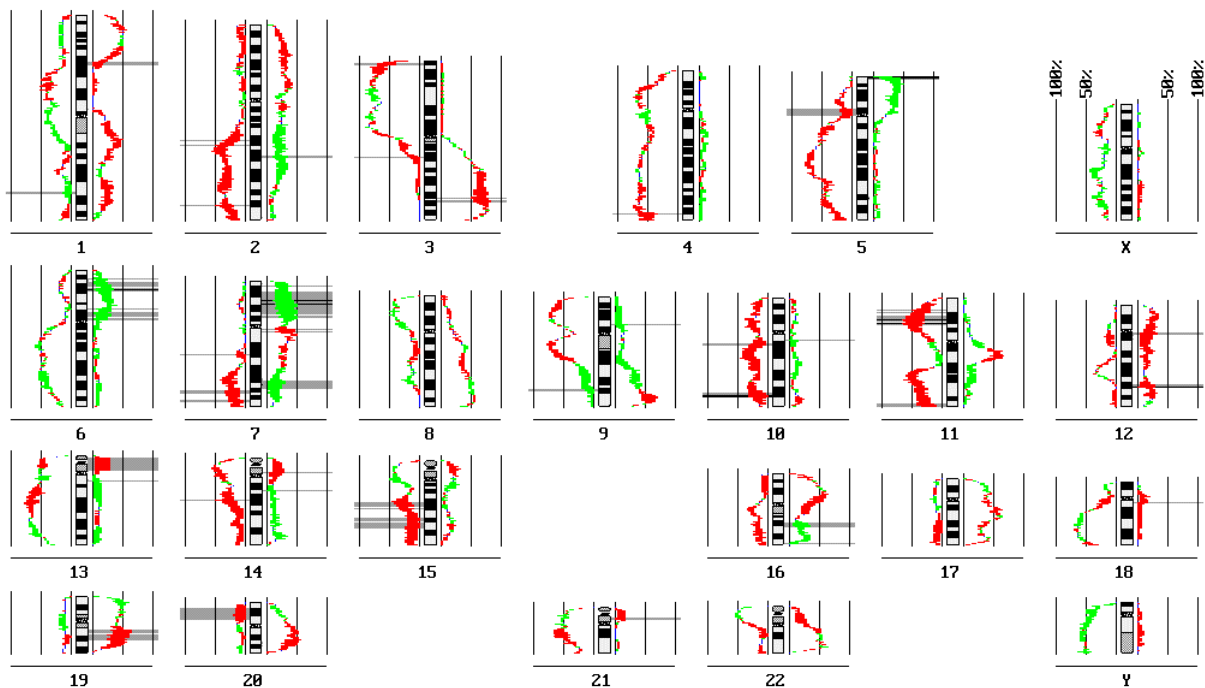


Abb. 12: Differenzhistogramm von primären HNO-Plattenepithelkarzinomen. Grüne Areale repräsentieren die pN0-Tumoren, rote die pN+ Karzinome. Veränderungen, die signifikant mit der Metastasierung assoziiert werden konnten, ließen sich auf den Chromosomenarmen 10q und 11p nachweisen.

Bronchialkarzinome - Vergleich von SCLC Primärtumoren und Metastasen

Es wurde eine erste CGH-Arbeit über den Vergleich von Primärtumoren und Metastasen publiziert (*Schwendel et al. 1997*). Dabei wurden insgesamt die Fälle von 10 Patienten untersucht. Neben dem Primärtumor wurden bis zu drei unterschiedliche Metastasen pro Fall analysiert. Dabei war in jedem Fall ein klonales Verhältnis zwischen den Tumoren eines Patienten mit der CGH nachweisbar, d.h. in allen 10 Fällen überwog die Zahl der gemeinsamen gegenüber denjenigen der unterschiedlichen Veränderungen.

Es ließen sich zwar zusätzliche Alterationen feststellen, jedoch keine, die gegenüber den Primärtumoren signifikant häufiger auftrat und somit für die Metastasierung verantwortlich gemacht werden konnte. Diese Beobachtung ist insofern nicht verwunderlich, da das kleinzellige Karzinom ein primär hochmaligner Tumor ist, der zum Zeitpunkt der Diagnose in der Regel bereits metastasiert hat. Somit sollten die genetischen Alterationen, die die Metastasierung vermitteln, bereits im Primärtumor nachweisbar sein. Es wurden Unterschiede sowohl zwischen Primärtumor und Metastasen als auch innerhalb der Metastasen eines Patienten beobachtet, was die hohe genetische Instabilität dieses Tumortyps belegt.

LOH-Analyse von SCLC und NSCLC der Lunge

In mehreren Einzelfällen von Plattenepithelkarzinomen zeigten die CGH-Ergebnisse, daß in den Metastasen häufig ein Verlust auf Chromosom 10q auftrat, der in den Primärtumoren nicht oder nicht so ausgeprägt nachweisbar war. Wir führten daraufhin eine erste LOH-Studie an insgesamt 79 Bronchialkarzinomen (SCLC, metastasierte und nicht-metastasierte SCC und weitere NSCLC) durch ("Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumor progression and the metastatic phenotype"). Dabei zeigten sich signifikant häufiger Allelverluste auf Chromosom 10q in der Gruppe der metastasierten Plattenepithelkarzinome. Allelverluste waren

ebenfalls in 91% (20/22) der kleinzelligen Karzinome detektierbar, wobei interessanterweise der einzige nicht-metastasierte Tumor keinen Allelverlust aufwies. Die Allelotypisierung von 3 Karzinomen ist beispielhaft in Abb. 13 wiedergegeben. Diese Arbeit konnte belegen, daß Allelverluste auf Chromosom 10q mit der Tumorprogression und der Metastasierung assoziiert sind.

Da die metastasierten Plattenepithelkarzinome gehäuft interstitielle Deletionen aufwiesen, wurde eine zweite Studie angeschlossen, in der lediglich dieser Tumortyp analysiert wurde ("Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung"). Diese Studie umfasste zwar weniger Fälle, dafür wurde aber eine sehr viel größere Anzahl von DNA-Polymorphismen untersucht.

Es gelang insgesamt drei minimale Regionen interstitieller Deletionen aufzudecken, die jeweils als Kandidatenregionen für Tumorsuppressorgene gewertet werden können. In den beiden Arbeiten (*Petersen et al. 1998a*, *Petersen et al. 1998b*) wurden zudem die bereits identifizierten Kandidatengene MXI1 und PTEN/MMAC1 untersucht. Beide zeigten keine Mutationen, so daß noch unbekannte Gene die Tumorprogression und Metastasierung vermitteln müssen.

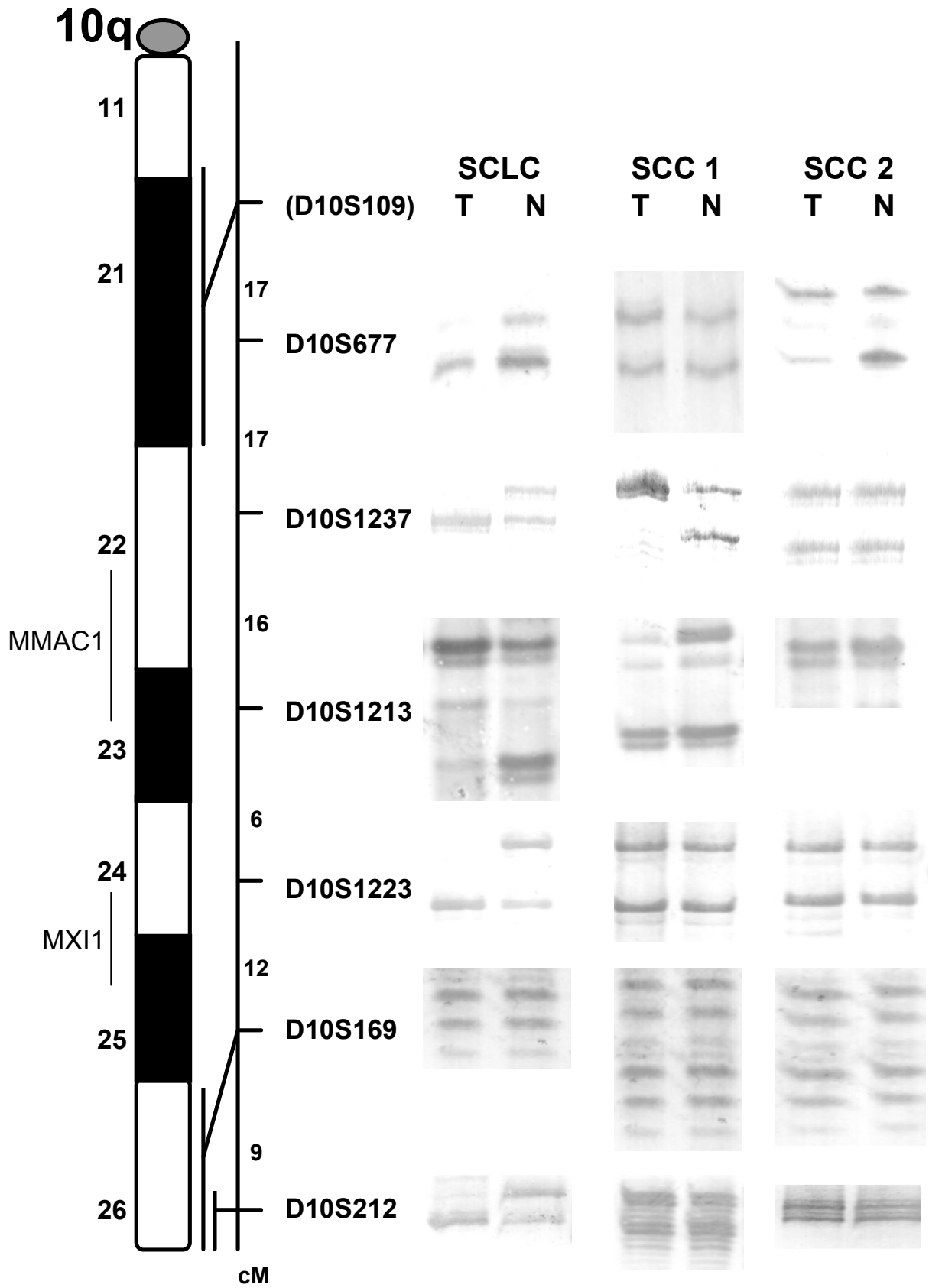


Abb. 13: Chromosom 10q-Allelotyp von einem kleinzelligen Karzinom und zwei Plattenepithelkarzinomen (pM1) der Lunge. Das kleinzellige Karzinom zeigt typischerweise Allelverluste aller informativer Marker, während die Plattenepithelkarzinome lediglich interstitielle Deletionen aufweisen.

CGH an pM0 und pM1 Plattenepithelkarzinomen der Lunge

Mittlerweile konnte auch eine CGH-Untersuchung an metastasierten und nicht-metastasierten Plattenepithelkarzinomen der Lunge abgeschlossen werden. Die Studie umfaßte insgesamt 50 Fälle, davon je 25 im Stadium pM0 und pM1. Bei den metastasierten Tumoren wurden zusätzlich 16 synchrone Fernmetastasen untersucht.

Der Vergleich beider Gruppen mittels Differenzhistogramm ist in Abb. 14 dargestellt. Die vorherrschende rote Farbe zeigt eindeutig, daß die Tumoren im Rahmen der Metastasierung zusätzliche Veränderungen akkumulieren.

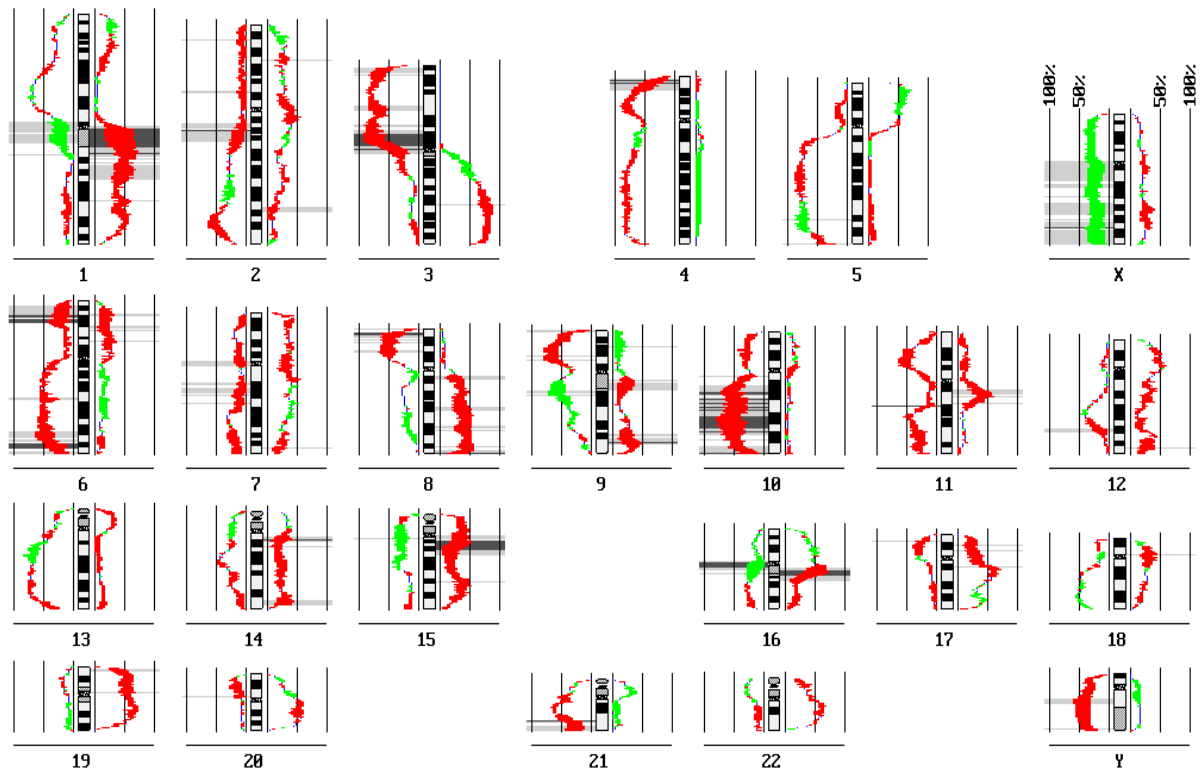


Abb. 14: Differenzhistogramm von pM0 und pM1 Plattenepithelkarzinomen der Lunge. Signifikant mit der Metastasierung assoziierte Veränderungen sind auf den Chromosomen 1q, 3p, 4p, 6, 8p, 8q und 10q lokalisiert.

Es wurden für mehrere Chromosomen signifikante Veränderungen angezeigt, was gut mit der Tatsache korreliert, daß die Metastasierung ein komplexer Vorgang ist, bei dem multiple Mechanismen zusammenspielen. Da im Gegensatz zu den HNO-Tumoren (vgl. Abb. 12) in der Gruppe der pM1-Tumoren vornehmlich Metastasen analysiert wurden, zeigen sich sehr viel mehr Veränderungen, die mit der Metastasierung assoziiert sind.

Chromosomale Mechanismen im Rahmen der Tumorprogression

In der Arbeit über pM0 und pM1-Tumoren konnte wiederum - wie auch bei den kleinzelligen Karzinomen - in jedem Fall ein klonaler Zusammenhang zwischen dem Primärtumor und den Metastasen nachgewiesen werden. Dies ist aus Abb. 15a ersichtlich, die die CGH-Ergebnisse eines primären Plattenepithelkarzinoms sowie

zweier synchroner Lebermetastasen zeigt. Die eine Metastase war 25 mm groß, die zweite maß lediglich 10 mm. Es kann daher angenommen werden, daß die größere Metastase vor der kleineren Metastase entstanden ist. Zudem deuten die Untersuchungsergebnisse auf spezifische Mechanismen chromosomaler Veränderungen hin, die offenbar während der Tumorprogression auftreten. Sie sind ebenfalls in Abb. 15 dargestellt.

Interessanterweise zeigen die Beispiele von Chromosom 6q und 8 (Abb. 15a), daß sich Deletionen im Rahmen der Tumorprogression offenbar ausdehnen können. Weitere Mechanismen sind aus Abb. 15b ablesbar, die jeweils die Profile eines Primärtumor und seiner Metastase für ein spezielles Chromosom zeigen. Wie das Beispiel für Chromosom 1 zeigt, kann offenbar die DNA Überrepräsentation eines ganzen Chromosomenarms zu einem kleineren Amplicon verringert werden. Die Veränderungen können sich intensivieren, wie beispielsweise bei Chromosom 8 von einer einfachen Überrepräsentation zu einer Mehrkopien-Amplifikation. Schließlich zeigt das Profil von Chromosom 10, daß kleinen Läsionen bei der Generierung größerer DNA-Imbalancen offenbar eine Trigger-Funktion zukommt.

Dieser Beobachtung kommt insofern große Bedeutung zu, da sie darauf hinweist, daß auch kleinere Abweichungen des Profils von Chromosomen, die metastasierungsrelevante Gene beherbergen, für die Prognose des Patienten entscheidend sein können.

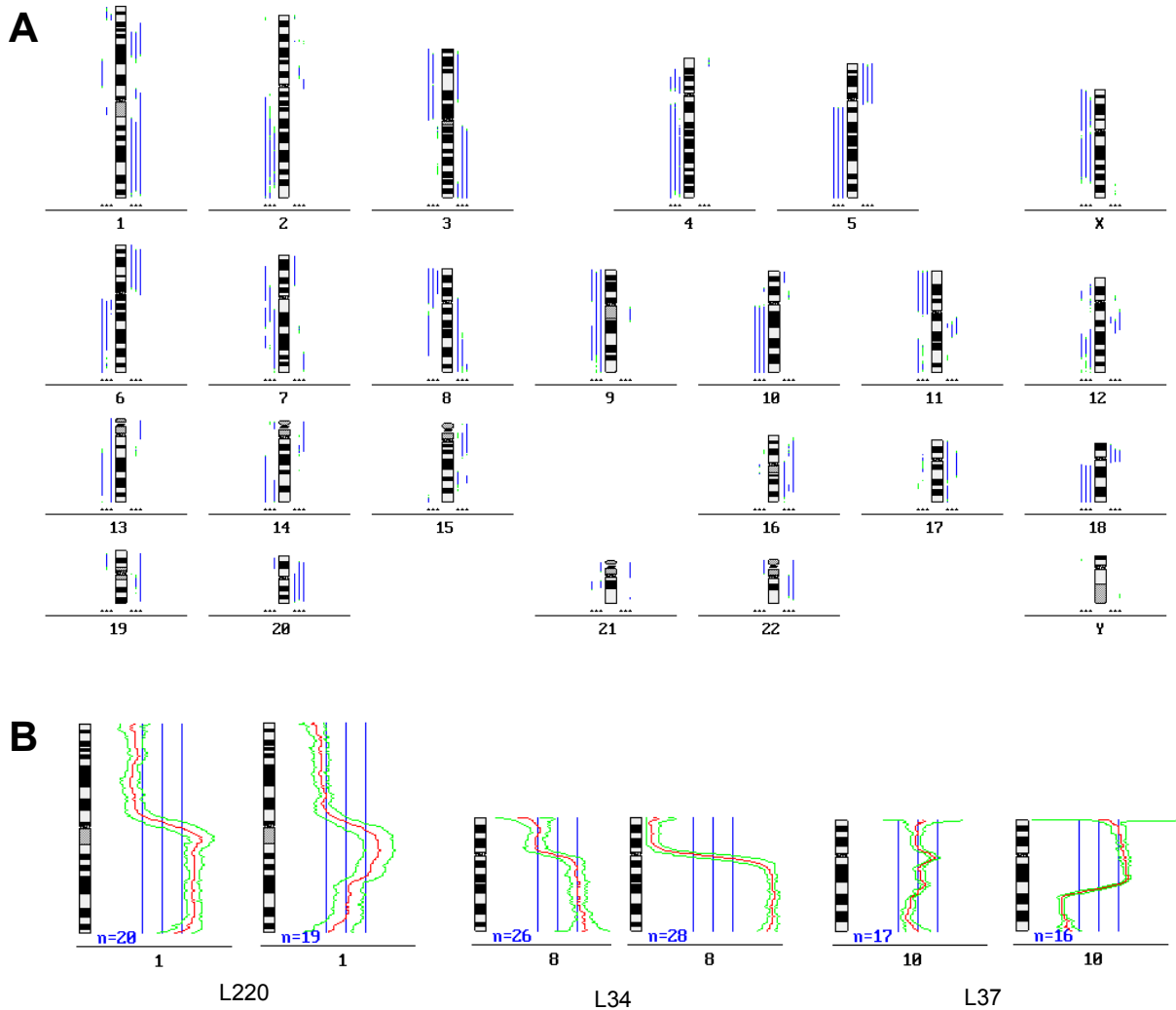


Abb. 15: Mechanismen chromosomaler Veränderungen im Rahmen der Tumorprogression. (A) CGH-Strichdarstellung eines Primärtumors (Striche in der indizierten Position nahe am Chromosomenideogramm) und einer großen und kleineren Lebermetastase (Striche in der mittleren und äußeren Position). (B) Profile von Primärtumor und je einer Metastase für drei Chromosomen mit metastasierungsrelevanten Loci. Mögliche Mechanismen sind die Ausdehnung kleiner interstitieller Deletionen (siehe Chromosom 6q und 8 in A), die Verdichtung größerer Überrepräsentierungen zu kleineren Amplicons (Chromosom 1 in B), die Intensivierung von Veränderungen (Chromosom 8 in B) und eine Trigger-Funktion kleinerer Defekte für die Generierung größerer (Chromosom 10 in B).

3.d Tabellarische Übersicht der chromosomalen Imbalanzen

Tabelle Chromosomale Imbalanzen von Karzinomen des Respirationstraktes

	DNA Verluste	DNA Verluste
HNSCC	1p, 3p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p 11q21, 13q, 18q, 21q	1pter, 3q, 5p, 8q, 11q13, 16p, 17q, 19q, 20q, 22
G1	3p, 9p	3q
G3	3p, 4q, 8p, 9p, 11q21-qter, 13q, 18q, 21q	1pter, 3q, 11q13, 19, 22q
pN0		5p, 6p, 7p
pN+	7q, 10q21, 10q25-q26, 11p13-p14, 11q21-qter, 15q	19q13 5p, 8q, 11q13, 16p, 17q,
NSCLC (Adeno & SCC)	1p, 3p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 11q21, 13q, 18q, 21q	19q, 20q, 22q 1q23
Adeno	3q, 9q, 19	3q21-22, 3q24-qter, 12p
SCC	2q36-37	3q21-22, 3q24-qter, 12p
pM1	3p12, 4p16, 6p22-p24, 6q24-q27, 8p23, 10q21-q24, 10q26, 21q22	1q21-q25, 8q, 9q34, 11q13, 15q11-q13
SCLC	3p, 4q, 5q, 10q, 13q, 15q, 17p	3q, 5p, 19q13, 20q

Abkürzungen: Adeno, Adenokarzinom; HNSCC, HNO SCC; G1, gut differenziert; G3, wenig differenziert; pN0, nicht-metastasiert; pN+, LK-positive HNSCC; NSCLC, Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome; SCC, Plattenepithelkarzinome; SCLC, kleinzellige Bronchialkarzinome

4 Diskussion und Ausblick

Korrelation von CGH und molekulargenetischen Untersuchungen

Die molekularzytogenetischen Daten, die durch die CGH gewonnen wurden, weisen chromosomale Regionen aus, die Tumor-assoziierte Gene beherbergen können. Viele der aufgestellten Korrelationen zwischen Genotyp und Phänotyp sind neu und waren bisher unbekannt. Es stellen sich daher unmittelbar die Fragen, wie zuverlässig einerseits die aufgestellten Korrelationen sind und inwieweit sie andererseits mit Läsionen bekannter Tumorsuppressor-Gene und Onkogene vereinbar sind.

Zur ersten Frage läßt sich feststellen, daß die von uns erhobenen LOH- und CGH-Daten sehr gut miteinander kompatibel waren, was insbesondere durch die ausgedehnten Allelotypisierungsstudien für Chromosom 10q belegt wurde (*Petersen et al. 1997a, Bockmühl et al. 1997, Petersen et al. 1998a, Petersen et al. 1998b*). Ein Beispiel für die Korrelation gibt Abb. 16.

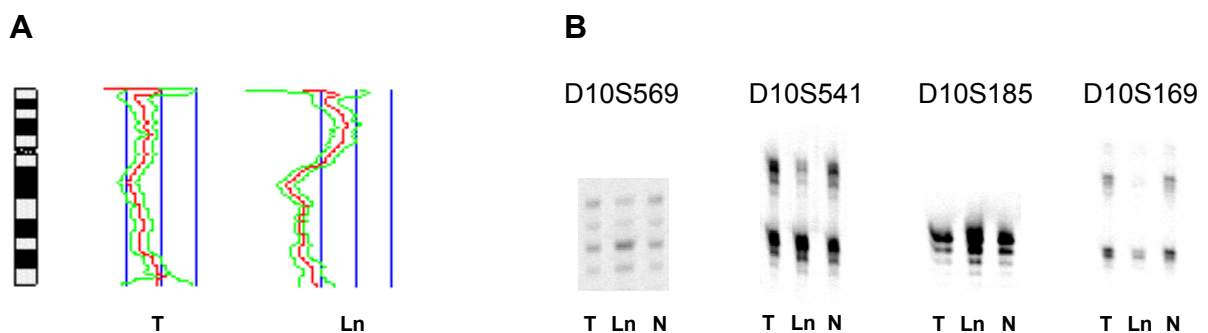


Abb. 16: Korrelation zwischen CGH und LOH-Daten. (A) CGH Profil von Chromosom 10 eines primären Plattenepithelkarzinoms (T) der Kopf-Hals-Region und seiner synchronen Lymphknotenmetastase (Ln). (B) Allelmuster derselben Proben einschließlich Normalgewebe (N) für vier Marker auf Chromosom 10q (D10S569 zentromerisch → D10S659 telomerisch). Das CGH-Profil des Primärtumors läßt zentromerisch an eine Deletion denken, es erreicht jedoch nicht den 0.75 Ratio-Schwellenwert. Demgegenüber weist die Metastase einen Verlust des gesamten Chromosomenarms auf. Dazu passend zeigen sich eindeutige Allelverluste in der Metastase, während sich diese im Primärtumor nicht nachweisen lassen.

Bezüglich der zweiten Frage haben wir bisher keinen Vergleich unserer CGH-Befunde mit den Mutationen in bekannten Krebs-assoziierten Genen durchgeführt. Es lassen sich jedoch die Ergebnisse gut mit publizierten Daten in Einklang bringen. Bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen beispielsweise entspricht die Inzidenz der Deletionen im Bereich der chromosomalen Banden 17p13 und 13q14 in etwa der Häufigkeit an Mutationen im p53 bzw. Rb1 Tumorsuppressor-Gen (*Sameshima et al. 1992, Kelley et al. 1995*). Die chromosomale Deletion ist somit sehr wahrscheinlich mit der Inaktivierung des korrespondierenden Tumorsuppressor-Gens verbunden. Entsprechendes gilt für den DNA Gewinn der chromosomalen Bande 11q13 und der Amplifikation bzw. des Cyclin D1 Proto-Onkogen. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß das Muster der chromosomalen Imbalancen mit der Aktivierung bzw. Inaktivierung spezifischer Onko- und Anti-Onkogene verbunden ist

Die Untersuchungen an gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen lassen sich sehr gut mit einem Progressionsmodell von HNO-Karzinomen in Einklang bringen, das von der Gruppe um David Sidransky an der Johns-Hopkins-Universität in Baltimore (USA) aufgestellt wurde (*Califano et al. 1996*). Sie fanden in frühen Tumorstadien und dysplastischen Vorläuferläsionen vor allem Allelverluste auf den Chromosomen 9p und 3p, d.h. genau diejenigen Veränderungen, die wir in den hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinomen nachweisen konnten. In fortgeschrittenen Tumorstadien wurden beispielsweise Deletionen auf den Chromosomen 11q, 13q, 14q, 6p, 8, 4q beobachtet sowie die Inaktivierungen der Tumorsuppressor-Gene p53, Rb1 und Amplifikationen von Cyclin D1. Diese Veränderungen zeigen Übereinstimmungen mit den CGH Ergebnissen der wenig differenzierten HNSCC. Andererseits weisen die CGH-Daten weitere Läsionen aus wie Deletionen auf 4p, 6q, 18q, 21q als auch Überrepräsentierungen von 1pter, 17, 19, 20q und 22q, die vermutlich ebenso in der Tumorprogression von Bedeutung sind (*Bockmühl et al. 1996*).

Die Tatsache, daß Deletionen auf Chromosom 10q mit der Metastasierung von Bronchialkarzinomen verbunden sind, waren unbekannt. Sie paßt jedoch gut zu der Beobachtung, daß diese Läsion in anderen soliden Tumoren mit der Tumorprogression assoziiert ist (*von Deimling et al. 1992, Rempel et al. 1993, Gray et al. 1995*). Diese Vergleiche sollen exemplarisch zeigen, daß durch die umfassende Analyse des Genoms mit der CGH neue und wichtige genetische Veränderungen aufgedeckt werden konnten. Trotz ihres limitierten Auflösungsvermögens hat sich die CGH als Screeningmethode gegenüber den traditionellen molekulargenetischen Untersuchungen bewährt. Ziel einer weitergehenden Analyse muß aber die Definition der zugrundeliegenden genetischen Läsionen sein.

Charakterisierung der zugrundeliegenden genetischen Läsionen

Traditionelle Verfahren zur Identifizierung neuer Kandidatengene sind sehr arbeits- und zeitaufwendig. Durch die Untersuchung differentiell exprimierter Gene kann diese Suche möglicherweise entscheidend erleichtert werden. Diese neuen Techniken erlauben es, innerhalb weniger Wochen Genbibliotheken zu erstellen, beispielsweise durch den Vergleich von Zelllinien (Karzinomzellen versus normale Epithelien) oder Geweben (Dysplasie versus Normalepithel), die durch Mikrodissektion gewonnen werden. In den USA wird dieser Ansatz zur Zeit in grossem Umfang durchgeführt im Rahmen des sogenannten "Cancer Gene Anatomy Project" (CGAP), das vom National Cancer Institute (NCI) gefördert wird (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap/>)

Eine weitere Entwicklung, die die Tumorcharakterisierung und -diagnostik möglicherweise revolutionieren wird, ist die Chip- und Filter-Technologie. Sie beruht darauf, daß (Teil-) Sequenzen vieler Gene in geordneter Weise auf eine Trägermatrix aufgebracht werden. Diese Matrix kann beispielsweise ein speziell beschichteter Objektträger sein oder eine Membran. Bei den Oligonukleotid-Chips werden in der Regel nur kurze Fragmente aufgebracht. Es erfolgt dann eine Hybridisierung von DNA

oder RNA auf diese Matrix. Ähnlich zur CGH erfolgt diese Hybridisierung häufig zusammen mit einer Referenz-DNA/RNA sowie mit Fluoreszenz-markierten Proben. Insofern hat die CGH einen wichtigen konzeptionellen Beitrag zu der Entwicklung dieser Verfahren geleistet.

Mit Hilfe der DNA/RNA-Chips können DNA-Imbalancen, Expressionsunterschiede aber auch DNA-Punktmutationen in bekannten Genen nachgewiesen werden. Sie besitzen prinzipiell ein sehr viel höheres Auflösungsvermögen als die CGH und haben ihr gegenüber insbesondere das Potential zur Automatisierung. Einschränkend muß jedoch festgestellt werden, daß noch technischen Schwierigkeiten bestehen. So können zwar bereits mehrere hundert bis tausend Gene auf einen Chip aufgebracht werden, eine komplette Analyse aller Gene mit einem Chip ist jedoch bisher nicht möglich. Für die Matrix-CGH (*Solinas-Toldo et al. 1997*) als Beispiel einer Chip-Technologie, die in der Lage ist, DNA-Imbalancen zu detektieren, besteht eine Schwierigkeit darin, daß für vereinzelte Chromosomenabschnitte keine Bibliotheken benachbarter DNA-Fragmente vorhanden sind. Mit der Entschlüsselung sämtlicher Gene im Rahmen des menschlichen Genomprojektes, ist es jedoch nur eine Frage der Zeit bis diese Lücken geschlossen sein werden. Auch ist zu erwarten, daß für die technischen Probleme Lösungen gefunden werden können.

Eine weitere Schwierigkeit ist die Datenauswertung. Es müssen geeignete Computerprogramme entwickelt werden, die in der Lage sind, die ungeheure Datenmenge, die sich bei der Analyse eines Tumors ergeben, zu analysieren und zu gewichten, d.h. zu klassifizieren. Wie solche Klassifikationsalgorithmen aussehen müßten, ist noch weitestgehend unklar, sie müßten jedoch zunächst an gut charakterisierten Tumorkollektiven ausgetestet werden. Zudem wird es vermutlich notwendig sein, am Anfang eine limitierte Anzahl von Parametern zu verwenden bevor mehrere tausend Gene berücksichtigt werden können. Insofern könnte die CGH auch

hier als relativ einfaches Modell einer umfassenden genetischen Tumoranalyse möglicherweise Hilfestellung geben.

Aufgrund des limitierten Auflösungsvermögen (*Bentz et al. 1998*) kann die CGH zwar keine spezifischen Gendefekte aufdecken, hat sich aber bereits als sehr hilfreich bei der Identifizierung neuer Kandidatenregionen und Kandidatengene erwiesen. Das Auffinden und vor allem die Charakterisierung neuer Tumor-assoziiertes Gene schreitet zwar schnell voran, sie wird aber noch mehrere Jahre oder Jahrzehnte in Anspruch nehmen. Dies liegt vor allem darin begründet, daß zwar mittlerweile Methoden zur Verfügung stehen, die es erlauben, viele Tumoren in relativ kurzer Zeit auf Mutationen zu untersuchen. So erscheinen in der Regel innerhalb weniger Monate nach der Veröffentlichung eines neuen Kandidatengens Publikationen, die entweder die ursprünglichen Befunde bestätigen oder manchmal auch widerlegen. Andererseits bedarf es zur funktionellen Charakterisierung dieser Mutationen immer noch sehr aufwendiger Methoden, deren Durchführung häufig mehrere Jahre in Anspruch nimmt.

Genetische Tumorklassifikation

Das Ziel einer umfassenden Tumorgenomanalyse muß letztlich die Entwicklung einer genetischen Klassifikation sein. Sie sollte nicht primär deskriptiv wie die bisherige morphologische Klassifikation sein, sondern prädiktiv das biologische Verhalten eines Tumors vorhersagen können. Die CGH Untersuchungen weisen darauf hin, daß eine solche Klassifikation möglich ist. Eine CGH Analyse ausgewählter Fälle ist bereits heute sinnvoll. Obwohl eher zweifelhaft ist, ob die CGH jemals Methode der Wahl für eine genetische Routineanalyse werden wird, weist sie doch auf die reale Möglichkeit einer genetischen Klassifikation hin.

Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms und der Entwicklung neuer Verfahren stehen uns nie dagewesene Mittel in der genetischen Forschung zur Verfügung. Es wird sehr spannend sein, mit ihnen alte Fragen der Medizin zu beantworten und neue aufzuwerfen. Damit einher geht die Verpflichtung, sie verantwortungsvoll zum Wohle des Patienten einzusetzen. Der Arzt und Forscher sollte sich stets über die Grenzen seines Wissens und Handels im Klaren sein. Diese Schwierigkeit drückte Viktor McKusick im Rahmen seiner Rede anlässlich der Verleihung der Ehrendoktorwürde an der Züricher Universität 1990 so aus:

”We are all slaves of our methods.”

Literaturverzeichnis

Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P (1998) Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21:172-175

Bockmühl U, Schwendel A, Dietel M, Petersen I (1996) Distinct patterns of chromosomal alterations in high and low grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Research* 56: 5325-5329

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 Research* 57: 5213-5216.

Bockmühl U, Wolf G, Schmid S, Schwendel A, Jahnke V, Dietel M, Petersen I (1998) Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head and Neck* 20: 145-151

Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., and Sidransky, D. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. *Cancer Res.*, 56: 2488-2492, 1996.

Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996 Oct 18;274(5286):430-2

deVita VT, Hellmann S, Rosenberg SA (1997) *Cancer: Principle and Practice of Oncology*, 5. Ausgabe, Vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia & New York, USA.

du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T.(1993) Detection of complete and partial chromosome gain and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 90: 590-610.

Gray IC, Phillips SMA, Lee SJ, Neoptolemos JP, Weissenbach J, Spurr NK (1995) Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res* 55: 4800-4803

Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D

(1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821.

Kelley MJ, Nakagawa K, Steinberg SM, Mulshine JL, Kamb A, Johnson BE (1995). Differential inactivation of CDKN2 and Rb protein in non-small-cell and small-cell lung cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 756-761

Müller KM, Fisseler-Eckhoff A (1989) What's new in lung tumor heterogeneity? *Path Res Pract* 184: 108-115

Petersen I, Ohgaki H, Ludeke BI, Kleihues P (1993) *p53* mutations in phenacetin-associated human urothelial carcinomas. *Carcinogenesis* 14: 2119-2122

Petersen I, Ohgaki H, Ludeke B, Kleihues P (1994) Direct DNA sequencing following SSCP analysis. *Analytical Biochemistry* 218: 478-479

Petersen I, Reichel M, Dietel M (1996) Use of non-radioactive detection in SSCP, direct DNA sequencing and LOH analysis. *Journal of Clinical Pathology* 49: M118-M121

Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, 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. *British Journal of Cancer* 75: 79-85

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 Research* 57: 2331-2335

Petersen S, Rudolf J, Bockmühl U, Gellert K, Wolf G, Dietel M, Petersen I (1998a) Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung. *Oncogene* 17: 449-454

Petersen S, Wolf G, Bockmühl U, Gellert K, Dietel M, Petersen I (1998b) Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumor progression and metastatic phenotype. *British Journal of Cancer* 77: 270-276

Reichel MB, Ohgaki H, Petersen I, Kleihues P (1994) *p53* mutations in primary human

lung tumors and their metastases. *Molecular Carcinogenesis* 9: 105-109

Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK and Rosenblum ML (1993) Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res* 53: 2386-2392

Ried T, Petersen I, Holtgreve-Grez H, Speicher MR, Schröck E, du Manoir S, Cremer T (1994) Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Research* 54: 1801-1806

Rosai J (1996) Ackerman's Surgical Pathology. 8. Ausgabe, Vol. 1. Mosby, St. Louis, USA.

Roth K, Wolf G, Dietel M, Petersen I. (1997) Image analysis for Comparative Genomic Hybridization (CGH) based on a karyotyping program for Windows. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 19: 461-474

Sameshima Y, Matsuno Y, Hirohashi S, Shimosato Y, Mizoguchi H, Sugimura T, terada M, Yokota J (1992). Alterations of the p53 gene are common and critical events for the maintenance of malignant phenotypes in small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 7: 451-457

Schwendel A, Langreck H, Reichel MB, Schröck E, Ried T, Dietel M, Petersen I (1997) Comparative Genomic Hybridization reveals a common pattern of genetic changes in primary small cell lung carcinomas and their metastases. *International Journal of Cancer* 74: 86-93

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997 Dec;20(4):399-407

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-375

von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yasargil MG and Wiestler OD (1992) Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 77: 295-301

Wolf G, Petersen D, Dietel M, Petersen I (1998a) Telemicroscopy via Internet. *Nature* 391: 613-614.

Wolf G, Petersen I, Dietel M (1998b) Microscope remote control by an Internet browser. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 20: 127-132

Abkürzungen

CGH,	Comparative Genomische Hybridisierung
G1,	Gut differenziert
G3,	Wenig differenziert
HNSCC,	Plattenepithelkarzinom des HNO-Bereichs (head and neck squamous cell carcinoma)
LCLC,	Großzelliges Bronchialkarzinom (large cell lung carcinoma)
LOH,	Heterozygotie-Verlust (Loss of heterozygosity)
NSCLC,	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non-small cell lung carcinoma)
SCC,	Plattenepithelkarzinom (squamous cell carcinoma)
SCLC,	Kleinzelliges Lungenkarzinom (small cell lung carcinoma)
SSCP,	Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism analysis)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern, Maren und Dr. med. Heinrich Petersen, für Ihre Liebe, Zuwendung und Unterstützung danken. Gewissenhaftes und sorgfältiges Arbeiten ist sicherlich nicht nur eine Frage von Genen sondern auch der Erziehung. Meinem Vater danke ich für die Vermittlung so mancher Erfahrung aus seinem eigenen Berufsleben, unter anderem der, daß man der medizinischen Lehrmeinung nicht immer blindlings vertrauen sollte.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Paul Kleihues danke ich ebenso wie den vielen ehemaligen Züricher Kollegen, unter anderem Hiroko Ohgaki, Andreas von Deimling, Oliver Brüstle und Otmar Wiestler für entscheidende Impulse aus dieser Zeit. Sie sind noch an einigen Publikationen dieser Habilitationsschrift ablesbar.

Der Arbeitsgruppe gilt mein besonderer Dank, ohne ihre Unterstützung wären die meisten der vorliegenden Arbeiten nicht möglich gewesen. In Kiel waren beteiligt Gesine Heinemann als MTA und Stefan Lange als Doktorand. An der Charité waren bzw. sind aktiv Martina Bimmler, Nicole Deutschmann, Almut Richter, Christa Schütze, Jacqueline Rudolf, Manuela Pacyna-Gengelbach, Cordula Heckert, Dagmar Seiler als MTA oder Laborantin, die Doktoranden Thomas Hartmann, Holger Langreck, Roland Psille, Torwalt Gaigal, Almut Goeze, Sven Schmid, Blend Krebber, Marco Aninat Meyer, Friedhart Paul, Zsuzsanne Thäsler, Alfredo Hidalgo.

Hervorheben möchte ich meine Frau Simone Petersen, die als Biochemikerin neue Ideen und Impulse eingebracht hat und in den letzten Jahren neben Ihren eigenen Projekten das Labor hervorragend geleitet hat.

Nachdrücklich danken möchte ich auch Dr. Günter Wolf, der es als Physiker und Informatiker in besonderer Weise verstand, Programme für die Bildanalyse und Datenauswertung zu erstellen sowie wichtige konzeptionelle Beiträge leistete. Ebenso

danke ich Dr. Karl Roth und Dr. Karsten Schlüns. Die enge Verzahnung von experimenteller Forschung und Computerwissenschaft in der Arbeitsgruppe war gegenseitig außerordentlich fruchtbar.

Eine weitere entscheidende Stütze der Arbeit war die enge Zusammenarbeit mit den klinischen Kollegen. Frau Dr. Ulrike Bockmühl hat es geschafft, neben der Arbeit im Operationssaal und auf der Station, selbst im Labor tätig zu sein und einen sehr engen wissenschaftlichen Austausch bei der Analyse der HNO-Tumoren zu gewährleisten. Für die gute Zusammenarbeit bei den Untersuchungen der Lungentumoren möchte ich besonders Herrn Prof Dr. Klaus Gellert danken. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Janusz Syzmas und Herrn Prof. Dr. Volker Jahnke für die Bereitstellung von Probenmaterial und die wissenschaftliche Kollaboration.

Enge wissenschaftliche Kontakte bestanden zwischen der ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Cremer in Heidelberg, vor allem Thomas Ried, Evelin Schröck und Michael Speicher. Ohne sie wäre die Etablierung der CGH am Institut für Pathologie der Charité nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich bei allen Kollegen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, und die ich vergessen habe, namentlich zu erwähnen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Deutschen Krebshilfe, der Berliner Krebsgesellschaft, der Monika Kutzner-Stiftung und der Forschungskommission der Charité möchte ich für ihre Förderung danken.

Last but not least gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Manfred Dietel. Durch seine langjährige, großzügige Unterstützung ist die vorliegende Arbeit erst möglich geworden. Die offene, sachbezogene und erfrischende Diskussion am Institut für Pathologie verbunden mit der Bereitstellung notwendiger Mittel und der Schaffung eines angenehmen Arbeitsklimas sind auf das Engste mit seiner Person verknüpft und

der ideale Nährboden für ein erfolgreiches wissenschaftliches Arbeiten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt wurde und daß die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben wurden.

Berlin, den 26.10.1998

Curriculum vitae und Bibliographie

- 1963 geb. am 26.9. in Flensburg als Sohn von Dr. med. Heinrich Petersen und seiner Frau Maren Petersen, geb. Christiansen
- 1969-73 Grundschule Jürgenschule Flensburg
- 1973-82 Gymnasium Goethe-Schule Flensburg, allgemeine Hochschulreife
- 1982 Beginn des Studiums an der Universität Hamburg im Fach Physik
- 1983 Aufnahme des Medizinstudiums in Hamburg
- 1985 Medizinische Vorprüfung (Physikum)
- 1986 Vordiplom in Physik, 1. Abschnitt des medizinischen Staatsexamens
- 1988 Studienaufenthalt in Paris (Université Pierre et Marie Curie), Abschluß zweier Kurse in Biophysik (biophysique membranaire et moleculaire)
- 1988 2. Abschnitt des med. Staatsexamens
- 1988/89 Praktisches Jahr in der Schweiz und in Italien
- 1989 3. Abschnitt des medizinischen Staatsexamens
- 1990/91 AiP am Institut für Neuropathologie (Direktor Prof. P. Kleihues) des Departements Pathologie der Universität Zürich:

Anfertigung der Doktorarbeit ("Ausschluß von *ras* Mutationen bei der Entstehung von Phenazetin-induzierten Urothelkarzinomen")
- 1991/92 Approbation, 13-monatige Assistenzarztstätigkeit am Institut für klinische Pathologie der Universität Zürich (Direktor Prof. Dr. Ph. Heitz)
- 1992-94 von 8/92 bis 5/94 wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pathologie der Universität Kiel (Direktor Prof. Dr. M. Dietel)
- 1994 Wechsel an das Institut für Pathologie der Charité (Prof. Dr. M. Dietel)
- 1996 seit 26.7.96 verheiratet mit Simone Petersen, geb. Bräuer
- 1998 Facharzt für Pathologie, Vortragsreise über CGH nach China (Hongkong, Kanton, Shanghai, Beijing), Beginn der Habilitation

Mitgliedschaften

Internationale Akademie für Pathologie

American Association for Cancer Research

Deutsche Gesellschaft für Pathologie

Deutsche Krebsgesellschaft

Berliner Krebsgesellschaft

Berliner Gesellschaft für Pathologie

Originalarbeiten

1. von Deimling A, Eibl RH, Ohgaki H, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Kleihues P, Chung RY, Wiestler OD, Seizinger BR.
p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma
Cancer Research (1992) 52: 2987-2990
2. von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR.
Evidence of a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas
Cancer Research (1992) 52: 4277-4279
3. von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Höll T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yasargil MG, Wiestler OD, Seizinger BR.
Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme
Journal of Neurosurgery (1992) 77: 295-301
4. Petersen I, Ohgaki H, Ludeke BI, Kleihues P
p53 mutation in phenacetin-induced urothelial carcinomas
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. (1993) 77: 252-255
5. von Deimling A, Louis DN, Menon AG, von Ammon K, Petersen I, Ellison D, Wiestler OD, Seizinger BR.

- Deletion on the long arm of chromosome 17 in pilocytic astrocytoma
Acta neuropathologica (1993) 86: 81-85
6. Brüstle O, Petersen I, Radner H, Höll T, Plate KH, Kleihues P, Wiestler OD
Complementary tumor induction in neural grafts exposed to *N*-ethyl-*N*-nitrosourea
and an activated *myc* gene
Carcinogenesis (1993) 14: 1715-1718
 7. Petersen I, Ohgaki H, Ludeke BI, Kleihues P.
p53 mutations in phenacetin-associated human urothelial carcinomas
Carcinogenesis (1993) 14: 2119-2122
 8. Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Höll
T, Wiestler OD, Kleihues P.
Mutations of the *p53* tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous
system
Molecular Carcinogenesis (1993) 8: 74-80
 9. Reichel MB, Ohgaki H, Petersen I, Kleihues P.
p53 mutations in primary human lung tumors and their metastases
Molecular Carcinogenesis (1994) 9: 105-109
 10. Petersen I, Ohgaki H, Ludeke B, Kleihues P.
Direct DNA sequencing following SSCP analysis
Analytical Biochemistry (1994) 218: 478-479
 11. Ried T, Petersen I, Holtgreve-Grez H, Speicher MR, Schröck E, du Manoir S,
Cremer T.
Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by
comparative genomic hybridization
Cancer Research (1994) 54: 1801-1806
 12. Kleihues P, Ohgaki H, Eibl RH, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Höll
T, von Deimling A, Wiestler OD
Type and frequency of *p53* mutations in tumors of the nervous system and its
coverings.
Recent Results Cancer Res. (1994) 135: 25-31

13. Bockmühl U, Petersen I, Dietel M
"Loss of heterozygosity" (LOH) bei Plattenepithelkarzinomen des Larynx.
Laryngo-Rhino-Otologie (1996) 75: 48-52
14. Petersen I, Reichel M, Dietel M
Use of non-radioactive detection in SSCP, direct DNA sequencing and LOH
analysis
Journal of Clinical Pathology. (1996) 49: M118-M121
15. Wick W, Petersen I, Schnitzler R, Wolfarth B, Lenartz D, Bierhoff E, Hümmerich J,
Stangl AP, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A
Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with
progression to metastatic stage in breast cancer.
Oncogene (1996) 12: 973-978
16. Bockmühl U, Petersen I, Schwendel A, Dietel M.
Genetisches Screening von Kopf-Hals-Karzinomen mittels der Komparativen
Genomischen Hybridisierung (CGH).
Laryngo-Rhino-Otologie. (1996) 75: 408-414
17. Bockmühl U, Schwendel A, Dietel M, Petersen I
Distinct patterns of chromosomal alterations in high and low grade head and neck
squamous cell carcinomas.
Cancer Research (1996) 56:5325-5329
18. Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried
T, Dietel M.
Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on
chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p.
British Journal of Cancer (1997) 75: 79-85
19. Schwendel A, Langreck H, Reichel MB, Schröck E, Ried T, Dietel M, Petersen I.
Comparative Genomic Hybridization reveals a common pattern of genetic changes
in primary small cell lung carcinomas and their metastases.
International Journal of Cancer. (1997) 74: 86-93
20. Roth K, Wolf G, Dietel M, Petersen I.
Image analysis for Comparative Genomic Hybridization (CGH) based on a

karyotyping program for Windows

Analytical and Quantitative Cytology and Histology (1997) 19: 461-474

21. Saretzki G, Hoffmann U, Röhlke P, Psille R, Gaigal T, Keller G, Höfler H, Löning T, Petersen I, Dietel M.

Identification of Allelic Losses in Benign, Borderline, and Invasive Epithelial Ovarian Tumors and Correlation with Clinical Outcome

Cancer (1997) 80: 1241-1249

22. 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.

Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung

Cancer Research (1997) 57: 2331-2335

23. Szymas J, Wolf G, Kowalczyk D, Nowak S, Petersen I.

Olfactory Neuroblastoma: Detection of Genomic Imbalances by Comparative Genomic Hybridization

Acta Neurochirurgica (1997) 139: 839-844

24. Bockmühl U, Petersen S, Schmidt S, Wolf G, Jahnke V, Dietel M, Petersen I.

Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas

Cancer Research (1997) 57: 5213-5216.

25. Bockmühl U, Wolf G, Schmid S, Schwendel A, Jahnke V, Dietel M, Petersen I.

Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer

Head and Neck (1998) 20: 145-151

26. Petersen S, Wolf G, Bockmühl U, Gellert K, Dietel M, Petersen I.

Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumor progression and metastatic phenotype

British Journal of Cancer (1998) 77: 270-276

27. Wolf G, Petersen D, Dietel M, Petersen I.

Telemicroscopy via Internet

Nature (1998) 391:613-614

28. Wolf G, Petersen I, Dietel M.

Microscope remote control by an Internet browser

Analytical and Quantitative Cytology and Histology (1998) 20: 127-132

29. Petersen S, Rudolf J, Bockmühl U, Gellert K, Wolf G, Dietel M, Petersen I

Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung

Oncogene (1998) 17: 449-454

30. Schwendel A, Richard F, Langreck H, Kaufmann O, Lage H, Winzer KJ, Petersen I, Dietel M.

Chromosome alterations in breast carcinomas: frequent involvement of DNA losses including chromosomes 4q and 21q.

Br J Cancer 1998 Sep;78(6):806-11

31. Ullmann R, Schwendel A, Klemen H, Wolf G, Petersen I, Popper HH.

Unbalanced chromosomal aberrations in neuroendocrine lung tumors as detected by comparative genomic hybridization.

Hum Pathol 1998 Oct;29(10):1145-9

32. Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, Petersen I, Dietel M, Fryer A, Strange RC [Effect of gene polymorphism on detoxifying glutathione-S-transferase enzymes on chromosomal stability of squamous epithelial carcinomas in the area of the head-neck].

Laryngorhinootologie 1998 Apr;77(4):201-6

33. Roland Eils, Uhrig S, Saracoglu K, Sätzler K, Bolzer A, Petersen I, Chassery JM, Ganser M, Speicher MR.

An optimized and fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH)

Cancer Genetics and Cytogenetics, in press

Übersichtsarbeiten

1. Petersen I, Schwendel A, Bockmühl U, Dietel M.
Die Komparative Genomische Hybridisierung - eine Screeningmethode in der genetischen Tumordiagnostik.
Pathologe (1996) 17: 333-341
2. Roth K, Wolf G, Dietel M, Petersen I.
Analyseprogramm zur quantitativen Erfassung chromosomaler Aberrationen mittels Komparativer Genomischer Hybridisierung (CGH)
Pathologe (1996) 17: 342-348
3. Petersen I, Bockmühl U, Petersen S, Wolf G, Dietel M.
Comparative Genomische Hybridisierung an Bronchialkarzinomen und ihren Metastasen
Verh. Dtsch. Ges. Path. (1997) 81: 297-305
4. Petersen I, Bockmühl U, Petersen S, Wolf G, Dietel M.
Patterns of chromosomal imbalances in carcinomas of the respiratory tract
Proceedings of the 3rd European Conference on Gene Therapy (1998) in press

Review-Tätigkeit für wissenschaftliche Zeitschriften

1. British Journal of Cancer
2. International Journal of Cancer
3. Virchow's Archiv