

Aus der Klinik und Poliklinik für Onkologie und Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin



DISSERTATION

Mikrosatellitenalterationen in der Serum-DNA bei Patienten mit  
Bronchialkarzinom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Norbert Bruhn  
aus Böel

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

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Loddenkemper  
2. Priv.-Doz. Dr. B. Brockmann  
3. Prof. Dr. K. Possinger

Datum der Promotion : 20. 10. 1999

**Schlagwörter:** Lungenkrebs, Mikrosatelliten Instabilität, Serum DNA, Polymerase Kettenreaktion

## **Zusammenfassung**

Die Bedeutung von Mikrosatellitenalterationen in malignen Tumoren ist trotz intensiver Forschungstätigkeit bisher nicht ausreichend geklärt. Bei Patienten mit einem hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinom-Syndrom (HNPCC) konnte aber ein möglicherweise kausaler Zusammenhang zwischen einer Keimbahnmutation der Gene, die an dem DNA-“mismatch“-Reparaturmechanismus beteiligt sind, und der Ätiologie dieser Erkrankung nachgewiesen werden. Der Nachweis von Mikrosatelliteninstabilitäten wird zur Identifizierung des HNPCC-Syndroms genutzt. Der Anteil nachgewiesener Mikrosatelliteninstabilitäten bei sporadischen Tumorerkrankungen ist deutlich niedriger als beim HNPCC-Syndrom. Die Mechanismen zur Entstehung von Mikrosatelliteninstabilitäten bei sporadischen Tumorerkrankungen sind bisher ungeklärt. Der gelungene Nachweis von Mikrosatellitenalterationen im Serum, Fäzes, Urin und Sputum von Tumorpatienten könnte das diagnostische Repertoire erweitern und möglicherweise die frühzeitige Erkennung von Tumorerkrankungen verbessern. Eine auf eine PCR basierende Methode zur Analyse von Mikrosatellitenalterationen in Tumor- und Serumproben wurde in dieser Arbeit etabliert. Drei Mikrosatellitenmarker (AR, ACTBP2, UT762) wurden bei der Untersuchung eingesetzt. Es wurden Tumor- und Serum-DNA mit der DNA von Lymphozyten verglichen und analysiert. Es wurden 43 Patienten mit Bronchialkarzinom untersucht, darunter 16 Patienten mit kleinzelligem und 27 Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom. Es wurden bei 5 von 16 (31 %) Patienten mit SCLC und bei 9 von 27 (33 %) Patienten mit NSCLC in mindestens einem Mikrosatellitenlocus eine Mikrosatelliteninstabilität oder ein LOH nachgewiesen. In der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden waren keine Mikrosatellitenalterationen nachweisbar.

Die unverändert sehr schlechte Prognose von Patienten mit Bronchialkarzinom unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung einer zuverlässigen und sensitiven Methode zur verbesserten Frühdiagnostik. Dazu wird es notwendig sein, weitere Mikrosatellitenmarker hinsichtlich ihrer Tumorsensitivität und -spezifität an einer ausreichenden Anzahl von Patienten zu testen und die prognostische Bedeutung von Mikrosatellitenalterationen bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom zu klären.

**Key Words:** Lung cancer; Microsatellite Instability; Serum DNA; Polymerase Chain Reaction (PCR)

## **Abstract**

*Background:* Despite intensive research efforts, the significance of microsatellite alterations in malignant tumors is not sufficiently understood. Since a possible causal connection between disease etiology and a germination mutation of the genes, involved in the mismatch repair mechanism, could be demonstrated in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), the detection of microsatellite instabilities may be used to identify the so-called HNPCC syndrome. While the amount of proven microsatellite instabilities in sporadic tumor diseases is significantly lower than in the HNPCC syndrome, the mechanisms generating these instabilities have not been clarified yet. Their successful measurement in serum, feces, urine, and sputum would extend the diagnostic repertory for tumor patients and possibly improve the early detection of neoplastic disease or its recurrence.

*Results:* In this thesis, a PCR-based method was established for the analysis of microsatellite alterations in tumor specimens and serum samples. Three microsatellite markers were employed, including AR, ACTBP2, and UT762. The DNA of tumors and serum was analyzed and compared with the DNA of lymphocytes. Specimens of 43 patients with bronchial carcinoma (16 small cell lung carcinoma (SCLC), 27 non-small cell lung carcinoma (NSCLC)) were examined. In 5 of the patients with SCLC (31%) and in 9 of those with NSCLC (33%) a microsatellite instability or a loss of heterozygosity (LOH) was demonstrated in at least one microsatellite locus. The controls, which included samples of serum and lymphocytes of 10 healthy volunteers, did not show any microsatellite alterations.

*Outlook:* The still poor prognosis of patients with bronchial carcinoma warrants further development of sensitive and reliable methods to improve early detection. Beyond this study, further microsatellite markers need to be tested in a sufficient number of patients with respect to sensitivity and specificity of tumor diagnosis. In addition, the prognostic significance of microsatellite alterations in tumor patients requires further investigation.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1. Epidemiologie .....	5
1.2. Neoplastische Transformation .....	5
1.3. Onkogene .....	7
1.4. Tumorsuppressorgene .....	8
1.5. Neoangiogenese .....	9
1.6. Repetitive DNA-Elemente .....	10
1.7. Postreplikative DNA-Reparatur und DNA-”Mismatch”-Reparatur .....	11
1.8. Postreplikative DNA-Reparatur beim erblichen nichtpolypösen Kolorektalkrebs (HNPCC) .....	13
1.9. Allgemeine Vorbemerkungen zur Mikrosatellitenalteration und Nomenklatur .	15
1.10. Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration. ....	16
1.10.1. Unterschiedliche Tumorentitäten .....	16
1.10.2. Inflammatorische Erkrankungen .....	18
1.10.3. Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC) .....	18
1.10.4. Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) .....	20
1.11. DNA im Blutplasma und -serum .....	23
1.12. Tumormarker .....	24
<b>2. Aufgabenstellung</b> .....	<b>25</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
3.1. Patienteneinschluß und Probengewinnung .....	27
3.2. Kontrollgruppe und Probengewinnung .....	27
3.3. Probenaufarbeitung .....	28
3.4. DNA-Isolation .....	28
3.5. Markierungsreaktion (Forward labeling reaction) .....	29
3.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	30
3.7. Lyophilisation .....	33
3.8. Polyacrylamidgelelektrophorese .....	33
3.9. Waschen und Trocknung des Polyacrylamidgels .....	34
3.10. Autoradiographie und Auswertungskriterien .....	34

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
4.1. Lyophilisation und Detektionsmethode .....	36
4.2. Resultate der PCR-Optimierungsversuche .....	36
4.3. Kontrollgruppe .....	39
4.4. Untersuchungen von Mikrosatelliten ohne Alterationen in der DNA von Patienten mit kleinzelligem und nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom .....	42
4.5. Mikrosatellitenalteration in der DNA von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom .....	43
4.6. Mikrosatellitenalteration in der DNA von Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom .....	48
4.6.1. NSCLC-Tumorstadium und histologische Klassifizierung .....	56
4.7. Ergebniszusammenfassung .....	57
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>58</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>68</b>

## Abkürzungsliste

A	Adenin
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bcl	B-Zell-Lymphom
bFGF	Basic fibroblasts growth factor
h-HCG	h-Humanes Choriongonadotropin
bHLH-ZIP	Basic-Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper (Reißverschluss)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
CA19-9 / CA125	Carbohydrate Antigen 19-9 / 125
CAT	Katalase
CDK-Inhibitor	Cyclinabhängige Proteinkinase-Inhibitor
CEA / AFP	Carcinoembryonales Antigen / Alpha-1-Fetoprotein
cM	Centi-Morgan
CRC	Colorectal cancer
CYFRA 21-1	Zytokeratinfragment 21-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
Erb	Erythroblastose
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangio-Pankreatographie
g	Gravitationskraft $9.81 \text{ m / s}^2$
G	Guanin
[(-P <sup>32</sup> )]ATP	(-Phosphor <sup>32</sup> / Adenosintriphosphat
GTP/GDP	Guanosin-Triphosphat / Diphosphat
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HLPC	High performance liquid chromatography
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV-16	Humanes Papilloma Virus 16
ITIH	Inter-"-trypsin inhibitor heavy chain
Kb	Kilo-Basenpaare
LOH	Loss of heterozygosity

MIN	Mikrosatelliteninstabilität
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS-Marker	Mikrosatelliten-Marker
Myc	Myelocytomatose
NSCLC	Non small cell lung cancer
NSE	Neuron-spezifische Enolase
P	Phosphor
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-ECGF	Platelet derived endothelial cell growth factor
RAS	Ratten-Sarkom-Viren
RB	Retinoblastom
RER	Replication error
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCLC	Small cell lung cancer
SINE / LINE	Short / Long interspersed repetitive elements
T	Thymin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
UICC	International Union against Cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor



# 1. Einleitung

## 1.1. Epidemiologie

Das Bronchialkarzinom ist in den westlichen Industrieländern der zweithäufigste maligne Tumor unter Frauen und Männern mit einer nach wie vor schlechten Prognose. Lungenkrebs verursacht die höchste Mortalitätsrate unter allen Krebsentitäten (1,2,4). In Deutschland beträgt die altersstandardisierte Sterberate bei Männern 50, bei den Frauen 8 Todesfälle pro 100.000 Personen (standardisiert nach der Segi-Weltbevölkerung) (3). Im letzten Jahrzehnt ist ein Anstieg der Inzidenz besonders bei Frauen festzustellen. Anteilsmäßig nimmt das Adenokarzinom unter den Bronchialkarzinomen zu. Der Lungenkrebs betrifft vor allem die Altersgruppe der 50 bis 80 jährigen Patienten. Das mediane Alter lag 1992 beim NSCLC bei 67,6 Jahren und beim SCLC bei 66,4 Jahren. Das relative 5-Jahres-Überleben beträgt beim SCLC abhängig vom Tumorstadium zwischen 19 % im Stadium I und 2 % im Stadium IV, beim NSCLC zwischen 42 % im Stadium I und 3 % im Stadium IV (4). Das Rauchen ist der wichtigste Risikofaktor für alle histologischen Typen des Bronchialkarzinoms. Mehr als 85 % aller Lungenkrebserkrankungen sind mit dem Tabakrauchen assoziiert (2). Durch langjähriges Rauchen ist die Suszeptibilität für die Entwicklung eines SCLC oder eines Plattenepithelkarzinoms (NSCLC) besonders ausgeprägt (5).

## 1.2. Neoplastische Transformation

Im Gegensatz zu normalen Zellen, ist das Verhalten von malignen Zellen charakterisiert durch:

- # Klonale Proliferation
- # Autonomes und unreguliertes Wachstum
- # Anaplasie
- # Metastasierung

Der Prozeß, in dessen Verlauf eine normale Zelle in eine diese Charakteristika aufweisende Zelle umgewandelt wird, bezeichnet man als neoplastische Transformation.

Genetische Veränderungen, die im Zusammenhang mit Malignität eine Rolle spielen, konnten im letzten Jahrzehnt mittels zytogenetischer und molekularbiologischer Untersuchungen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß vor allem Mutationen zweier Klassen von Genen eine zentrale Bedeutung in der Tumorentwicklung besitzen.

- # Protoonkogene (in der Regel dominant)
- # Tumorsuppressorgene (in der Regel rezessiv)

Neben diesen klassischen genetischen Veränderungen wurde in den letzten Jahren nachgewiesen, daß die maligne Transformation auch im Zusammenhang mit Defekten am postreplikativen DNA-Reparaturmechanismus steht. Führendes Merkmal ist bei dieser Form von Karzinomentstehung das Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität.

Protoonkogene sind normale Bestandteile der Erbanlage jeder Zelle. Punktmutation, Translokation oder Amplifikation / Überexpression können die Aktivierung eines Protoonkogens

verursachen.

Nach Knudsen bedingt erst der funktionelle Ausfall beider Allele eines Tumorsuppressorgens negative Auswirkungen auf die Regulation der Zellteilung (6). Funktionsschwächende oder inaktivierende Mutationen eines Tumorsuppressorgens und insbesondere partielle oder komplette Deletionen sind die führenden Merkmale der genetischen Alteration dieser Gruppe.

Die überwiegende Anzahl der Protoonko- und Tumorsuppressorgene kodieren Proteine, die eine wichtige Stellung in der Zellzyklusregulation, der Zelldifferenzierung und Signaltransduktion einnehmen. Die quantitative und qualitative Änderung der Genexpression an Schlüsselstellen des Genoms kann unkontrollierte Wachstumseigenschaften der betroffenen Zelle hervorbringen. Dabei ist allerdings zu bemerken, daß es der Verbindung mit zusätzlichen zelltypischen Eigenschaften bedarf, um durch die Ereignisse am Genom zu einer wirksamen neoplastischen Transformation zu kommen. Dieser Gedanke wird von der Beobachtung unterstützt, daß bei Keimbahnmutationen sich nur bestimmte Tumorentitäten bevorzugt entwickeln (7). Veränderungen der Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren und die Neoangiogenese sind von zentraler Bedeutung in der Tumorentwicklung bzw. für das Wachstum von soliden Tumoren und deren Metastasen (8-10).

Zur malignen Transformation und klonalen Proliferation reicht eine Mutation nicht aus. Das Mehrstufenmodell der Tumorigenese (11) beinhaltet nach heutigem Wissensstand bis zu 10 und mehr verschiedene genetische Alterationen, die notwendig sind, bis sich ein invasiv wachsendes Karzinom manifestiert (12). In den morphologisch definierten Entwicklungsstadien der Tumorigenese, beim Bronchialkarzinom sind das ausgehend vom normalen Bronchial- und Alveolarepithel, Hyper-, Meta- und Dysplasie, Carcinoma in situ und invasives Karzinom, kann parallel eine entsprechende Akkumulation von DNA-Veränderungen nachgewiesen werden (13). Die Frage, ob während der Tumorentwicklung Mutationen bestimmter Gene frühe Ereignisse sind, während andere Gene erst zu einem späteren Zeitpunkt mutieren, wurde bisher nicht geklärt.

Ob es tatsächlich zu einer unregulierten Proliferation mit den typischen Malignitätskriterien kommt, ist unter anderem abhängig von der individuellen Empfindlichkeit für bestimmte Kanzerogene und der genetischen Disposition. Verantwortlich für die individuelle Suszeptibilität ist z. B. die Effektivität der unterschiedlichen Reparaturmechanismen der Epithelzellen und ihre Fähigkeit zur Apoptose bei nicht mehr möglicher Korrektur der genetischen Schädigungen.

Keimbahnmutationen können eine frühzeitigere Manifestation von Tumoren verursachen, z.B. beim Li-Fraumeni-Syndrom (14), bei dem eine p53-Genmutation vererbt wird (7). Durch somatische Mutation bedingte Deletion oder Inaktivierung des zweiten p53-Allels erhöht das Risiko, daß sich z. B. ein Mammakarzinom oder ein Sarkom entwickelt (6,15). Hereditäre Tumorerkrankungen machen allerdings nur maximal 1 % der gesamten neoplastischen Erkrankungen aus (7) und sind bisher für Lungentumore nicht eindeutig nachgewiesen worden. Die langanhaltende Exposition gegenüber kanzerogenen Noxen, z.B. im Tabakrauch, kann zum Auslöser einer neoplastischen Transformation des Bronchial- und Alveolarepithels werden (16).

Das Auftreten von synchronen oder metachronen Zweittumoren (17,18) deutet darauf hin, daß es im gesamten betroffenen Bronchialsystem zu Akkumulationen von Genschädigungen kommt. In dem marginalen Gewebsareal eines Karzinoms und in nicht mit dem Karzinom in Verbindung stehenden Gewebsabschnitten sind verschiedene Stadien prämaligener Läsionen nachgewiesen worden. In einigen Untersuchungen wurde der Nachweis von gleichen DNA-Mutationsmustern (LOH-Nachweis im Bereich des Chromosomenabschnittes 9p) in multifokalen prämaligen Läsionen erbracht (LOH (loss of heterozygosity); Verlust eines kompletten Mikrosatellitenallels bei heterogener Ausprägung des Allelpaars) (19,20). Konsekutive DNA-Schädigung könnte dann die Entwicklung von differenten phänotypischen und histomorphologischen prämaligen Läsionen oder Tumoren im gesamten Bronchialsystem induzieren. Diskutiert wird, ob die Entstehung multifokaler Tumore in voneinander unabhängigen Ereignissen erfolgt oder ob Subklone monoklonalen Ursprungs sich zu entsprechenden Malignomen entwickeln (21,22). Innerhalb eines Primärtumors sind meist verschiedene Subklone nachzuweisen. Mikroskopisch zeigen Bronchialkarzinome öfters unterschiedliche histologische Differenzierung, z. B. Mischtumore mit plattenepithelartigen und kleinzelligen Anteilen. Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die beim Bronchialkarzinom bekannten relevanten Gene gegeben werden (8-10).

### **1.3. Onkogene**

#### **Myc-Onkogene**

Die Familie der myc-Gene kodieren für bestimmte nukleare Phosphoproteine, die zur Klasse der sogenannten bHLH-ZIP-Proteine (basic-Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper) gehören. Das Onkogen myc wurde zuerst bei der Untersuchung von Viren identifiziert, die in Hühnern Myelocytomatose, eine bestimmte Leukämie-Form, hervorrufen. Sie sind Transkriptionsfaktoren und inhibieren einerseits die Zelldifferenzierung, andererseits steigern sie die Proliferationstendenz. Zur Zeit kennt man jedoch noch nicht die Gene, deren Funktion direkt von den Myc-Proteinen reguliert werden. Beim SCLC sind in 10-25 % der untersuchten Tumorproben Amplifikation und in 80-90 % Überexpression des orthotopen (ohne Nachweis einer Translokation) zellulären c-myc-Gens nachgewiesen worden (23). Zudem konnte gezeigt werden, daß Patienten mit Überexpression und/oder Amplifikation des c-myc-Gens in den Tumorproben des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, an einem Tumor mit besonders niedriger Tumorverdopplungszeit und erhöhter Bestrahlungsresistenz erkrankt waren. Damit verbunden war ein signifikant verkürztes Überleben (24-26). Das Vorhandensein von n-myc-Genmutationen scheint ebenfalls mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit SCLC einherzugehen (27). Beim NSCLC spielen myc-Gen Aktivierungen kaum eine Rolle.

#### **RAS-Onkogene**

Die drei RAS-Protoonkogene (H-RAS1, K-RAS und N-Ras) kodieren Proteine mit ähnlichen Funktionen. Die Bezeichnung der Gene hängt mit der Entdeckungsgeschichte zusammen, die mit

der Untersuchung der Onkogene von Harvey- und Kirsten-Ratten-Sarkom-Viren eingeleitet wurde. Die Ras-Proteine sind mit der Plasmamembran assoziiert und dienen der Signaltransduktion von der Zelloberfläche in den Zellkern. Dabei bildet das Ras-Protein als Antwort auf ein Proliferationssignal einen Komplex mit GTP. Durch die verursachte Konformationsänderung werden nachgeschaltete Proteinkinasen aktiviert. Der inaktive Zustand wird über eine Hydrolyse von GTP zu GDP wieder erreicht. Die meisten RAS-Genmutationen betreffen die Codons 12, 13 und 61. Als Folge dieser Mutationen kann gebundenes GTP nicht oder nur sehr verzögert gespalten werden, so daß ein zeitlich verlängerter aktiver Zustand erhalten bleibt. Dadurch verstärkt sich das Signal für die Zellproliferation. Dies kann eine unregulierte Proliferation der betroffenen Zelle begünstigen. Bei den Adenokarzinomen (NSCLC) sind bis zu 30 % RAS-Genmutationen nachgewiesen. Die RAS-Genmutation gilt als ein negativer prognostischer Faktor beim Adenokarzinom (28,29). Beim SCLC spielen RAS-Genmutationen keine Rolle.

#### **C-erbB1 / c-erbB2 (auch unter der Bezeichnung: HER2, neu)**

Das Protoonkogen c-erbB-1 kodiert eine membrangebundene Tyrosinkinase, die einen Rezeptor für EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) darstellt. Beim Plattenepithelkarzinom konnte in einer Untersuchung eine Überexpressionsrate von 60-90 % nachgewiesen werden (8). Amplifikation und/oder Überexpression des c-erbB-2 Gens sind in etwa 30 % der untersuchten NSCLC-Fällen nachgewiesen und gelten als prognostisch ungünstiger Faktor (30).

#### **Bcl-2 (B-Zell-Lymphom)**

Das bcl-2-Gen (Chromosomabschnitt 18q21) kodiert ein Protein, das z. B. die durch natürliche oder strahleninduzierte Hydroxyl-Radikale ausgelöste Apoptose blockieren kann. Dies erfolgt durch eine Komplexbildung mit dem Bax-Protein, welches als Homodimer die Apoptose steigert. Entgegen dem Mutationsmechanismus beim follikulären Lymphom, der Translokation t(14,18), werden bei 20 % der NSCLC-Tumoren eine erhöhte Expression des Bcl-2-Proteins gefunden. Vor allem bei über 60-jährigen Patienten ist der erhöhte Bcl-2-Proteinnachweis mit einer besseren Prognose verbunden (31). Bei kleinzelligen Lungentumoren ist in bis zu 65 % der Fälle eine erhöhte bcl-2-Genexpression zu beobachten (32).

### **1.4. Tumorsuppressorgene**

#### **p53-Tumorsuppressorgen**

Die p53-Genmutation ist die häufigste genetische Veränderung bei einer ganzen Anzahl von Tumorentitäten. Etwa 80 % der SCLC- und 50 % der NSCLC-Tumore haben eine solche Mutation (10). P53-Mutationen wurden auch in prämaligen dysplastischen Läsionen nachgewiesen (33). Die normale Funktion des auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 liegenden Gens besteht u. a. in der Erhaltung der Genomstabilität. Wird das Genom geschädigt, kommt es zu einer Zunahme des p53-Proteins. Dieses nukleare Phosphoprotein besitzt eine

zentrale Domäne für die spezifische Bindung an DNA. Bindestellen liegen z. B. im Bereich des Promotors des CDK-Inhibitors p21 und den Genen der DNA-Reparaturenzyme. Eine Zunahme des p53-Proteins löst die Expression der genannten Gene aus. Über das p21-Protein wird temporär und reversibel eine Blockade des Zellzyklus ausgelöst, und ermöglicht damit der Zelle die Genomschädigung zu korrigieren. Bei irreparablen Schädigungen tritt der programmierte Zelltod (Apoptose) ein. In Zellen, in denen funktionelles p53-Protein fehlt, können sich weitere DNA Schädigungen akkumulieren und so zur malignen Transformation beitragen. Bei Lungenkarzinomzellen sind sehr oft G zu T-Transversionen nachzuweisen, wobei ein Zusammenhang mit Benzpyren aus dem Zigarettenrauch vermutet wird (16). Mutationen im p53-Gen sind über weite Bereiche im Gen verteilt, zeigen aber sogenannte “hot spots”, die oft die DNA-Bindungsdomänen des Proteins betreffen.

### **Retinoblastom-Tumorsuppressorgen**

In fast 100 % der SCLC-Tumorproben sind LOH's des rb-Gens (Chromosomabschnitt 13q14) nachzuweisen, jedoch nur in 30 % der NSCLC-Tumorproben (10). In der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus bilden RB-Proteine und E2F-Proteine (E2-Faktor) Komplexe. Die gebildeten Proteinkomplexe hemmen die Expression von Zellzyklus-Genen, die die E2F-Bindestelle in ihrem Promotor-Bereich tragen. Durch Phosphorylierung des RB-Proteins wird das E2F-Protein freigesetzt. Das E2F-Protein kann nun die Transkription von Genen mit E2F-Bindestelle einleiten. Mutationen beider Retinoblastomallele führen zu einem gestörten Zellzyklus und Steigerung der Zellproliferationsrate. Im Gegensatz zu den kleinzelligen Bronchialkarzinomen, zeigten Untersuchungen von NSCLC-Tumorproben häufiger eine Überexpression des Cyclin D1-Gens als den Verlust von funktionsfähigem RB-Protein. Beide Mutationen führen zur Dysregulation des sogenannten “checkpoint” im G<sub>1</sub>-Zellzyklus, d. h. die betroffene Zelle beginnt mit der Vorbereitung einer DNA-Replikation und dem Eintreten in die S-Phase (34).

### **1.5. Neoangiogenese**

Unter Neoangiogenese versteht man die Bildung neuer Gefäße aus bestehenden Gefäßen, während bei der Vasculogenese neue Gefäße aus Vorläuferzellen (Angioblasten) hervorgehen. Die Angiogenese ist z. B. Bestandteil der normalen Wundheilung, aber auch ein entscheidender Faktor für das Wachstum von Tumoren und deren Metastasen. Die Neoangiogenese ist ein sehr frühes Ereignis bei Plattenepithelkarzinomen. Gezeigt wurde dies in der Epidermis einer transgenen Maus mit HPV-16 Onkogen tragenden Basalzellen. Schon im hyperplastischen Stadium sind diskrete dermale Gefäßneubildungen zu erkennen. Während des dysplastischen Stadiums zeigt sich eine ausgeprägte Neoangiogenese (35). Durch ein verändertes Genexpressionsmuster der Tumorzellen, werden diese in die Lage versetzt, die Initiierung und Unterhaltung einer tumoreigenen Gefäßversorgung zu induzieren (36). Dabei werden angiogene Substanzen freigesetzt, die unter anderem das Einwachsen von Endothelzellen bewirken und Fibroblasten zur Bildung einer angiogenen Interzellulärmatrix veranlassen. Wichtige

Aktivatoren der Angiogenese sind u. a. VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblasts growth factor) und PD-ECGF (platelet derived endothelial cell growth factor). VEGF ist u. a. verantwortlich für die gesteigerte Permeabilität der Mikrogefäße in der Umgebung der Tumorzellen. Die dadurch verursachte Extravasation zirkulierender Blutplasmaproteine ist ein erster Schritt zur Tumorstromagenerierung (Tumorstromabestandteile: Interstitielle Flüssigkeit z. B. Plasmaexsudat, Fibrinogen/Fibrin usw., Strukturproteine, Proteoglykane und Glykosaminoglykane, Blutgefäße und korpuskuläre Bestandteile z. B. Fibroblasten, Histiozyten usw.). Darüber hinaus hat VEGF eine mitogene Wirkung auf Endothelzellen (37). Fibroblasten synthetisieren und sezernieren Stromabestandteile, z. B. Kollagen, Hyaluron, Tenascin und Fibronectin. Das veränderte Interzellulärmilieu trägt zur Einwanderung von weiteren Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen bei. Die Ausformung von röhrenartigen Strukturen und die korrespondierende Schlingenbildung ermöglichen den Beginn der tumoreigenen Blutzirkulation (38). Alle Stadien von Adenokarzinomen der Lunge zeigten eine positive Korrelation zwischen Gefäßdichte des Tumors und Rückfallrate nach operativer Therapie (39). Eine Untersuchung von 253 NSCLC-Tumorproben erbrachte den Hinweis, daß eine hohe Mikroblutgefäßdichte in den Tumorproben mit einer schlechten Prognose verbunden ist (40).

### **1.6. Repetitive DNA-Elemente**

Im Eukaryonten-Genom liegen Gene oft weit voneinander entfernt, getrennt durch genfreie DNA. Zwischen den Genen kommen repetitive DNA-Elemente vor. Mehr als 20 % des gesamten Human-Genoms ist aus vielfach wiederholten DNA-Abschnitten zusammengesetzt. Ungefähr die Hälfte davon besteht aus den verstreuten SINE- und LINE-Abschnitten (short/long interspersed repetitive elements), die andere Hälfte aus Satelliten-DNA. SINE-Abschnitte bestehen aus 100-500 Basenpaare. Mehrere Familien von SINE-Abschnitten sind bekannt. Bei Säugetieren ist die Alu-Familie am besten untersucht. LINE-Abschnitte bestehen aus 6000-7000 Basenpaaren. Die Funktion von SINE- und LINE-Abschnitten ist nicht bekannt. Satelliten-DNA besteht aus kurzen hintereinandergeschalteten DNA-Abschnitten. Im Bereich der Chromosomen-Centromere befinden sich AT-reiche Sequenzen, zusätzlich befinden sich dort GGAAT-Wiederholungen. Besonders im Subtelomer-Bereich liegen Minisatelliten, bestehend aus Kopien von DNA-Abschnitten aus 16-64 Basenpaaren. Mikrosatelliten bestehen aus sehr einfachen Sequenzwiederholungen wie z. B. AC, GAG oder AAAG. Mikrosatelliten kommen weitverstreut im Genom vor.

### **Mikrosatellitenpolymorphismus**

Mikrosatelliten-DNA besteht aus 10-50 Kopien von Folgen aus 1-6 Basenpaaren. Mikrosatelliten mit AC-Dinukleotid-Folgen kommen, im Genom verteilt, durchschnittlich einmal pro 30 Kb Genomabschnitt vor. Tri- und Tetranukleotidwiederholungen sind etwas seltener, aber ebenfalls weitverbreitet im gesamten Genom. Auf dem X-Chromosom kommen

durchschnittlich alle 300-500 Kb Tri- oder Tetranukleotidwiederholungssequenzen vor. Eine große Anzahl von Mikrosatelliten sind hochpolymorph. Polymorph bedeutet, daß das maternale und das paternale Allel unterschiedlich lange Mikrosatellitensequenzen besitzen. Der Vererbungsmodus des Längenpolymorphismus ist kodominant, entsprechend den Vererbungsregeln nach Mendel. Aufgrund der Heterogenität und des ubiquitären Vorkommens im Genom sind Mikrosatelliten als DNA-Marker zur Genomanalyse sehr gut geeignet und werden dazu auch intensiv genutzt. Sind die flankierenden DNA-Sequenzen bekannt, können diese Abschnitte in der Polymerase-Kettenreaktion mit entsprechenden Startermolekülen (Primern) nachgewiesen werden. Dementsprechend finden Mikrosatellitenmarker Anwendung bei Bevölkerungsanalysen bzw. bei evolutionsbiologischen Fragestellungen und bei der Identifizierung einzelner Individuen, z. B. beim Paternitätsnachweis oder forensischen Problemstellungen (41).

### **1.7. Postreplikative DNA-Reparatur und DNA-„Mismatch“-Reparatur**

Untersuchungen von Replikationsfehlern wurden anfänglich an Prokaryonten (Wildtyp) durchgeführt. Während der Replikation werden falsch eingebaute Nukleotide durch die 3'-5'-Exonuklease erkannt und entfernt. Die 3'-5'-Exonuklease erkennt Falschpaarungen aufgrund der veränderten DNA-Geometrie. Falsch eingebaute Nukleotide lösen häufiger als korrekt eingebaute Nukleotide ihre Wasserstoffbrücken zu den Nukleotiden im Matrizenstrang. Die 3'-5'-Exonuklease funktioniert auch in Normalzellen nicht fehlerfrei, so daß Falschpaarungen („Mismatches“) in der replizierten DNA bestehen bleiben. Pro- und eukaryontische Zellen besitzen die Fähigkeit mit Hilfe des postreplikativen DNA-Reparatursystems, der sogenannten „Mismatch-Reparatur“, diese Mutationen zu korrigieren.

#### **Postreplikative DNA-Reparatur bei Prokaryonten**

Ein Modell zur Funktionsweise und zum Zusammenspiel der beteiligten Reparaturenzyme stellte Modrich (42) anhand des Reparatursystems bei *E. coli* vor. Im Genom von *E. coli* trägt Adenin in der Nukleotidfolge GATC eine Methylgruppe. Die Methylierung erfolgt während der Replikationsphase etwas verzögert am neusynthetisierten Strang, so daß parentaler und neusynthetisierter Strang sich unterscheiden und damit der möglicherweise fehlerhaft synthetisierte neue Strang eindeutig von den Reparaturenzymen erkennbar ist. „Mismatches“ und sogenannte Heteroduplex-DNA (ungepaarte Nukleotide im DNA-Strang) bis zu einer Anzahl von 4 Nukleotiden werden vom postreplikativen Reparatursystem erkannt. Bedingung ist eine GATC-Basensequenz in der Nähe des Replikationsfehlers. Liegen zwischen „Mismatch“ und GATC-Basensequenz über 2 Kb, so nimmt die Effektivität der Reparaturfunktion ab. Heteroduplex-DNA-Bereiche mit einer größeren Anzahl von ungepaarten Nukleotiden werden von diesem System nicht erkannt. Das MutS-Protein erkennt und bindet an der fehlerhaften Position. Die Funktion des MutL-Proteins ist noch unklar, möglicherweise dient das MutL-Protein zur Herstellung einer Interaktion zwischen MutS- und MutH-Protein. Das MutH-Protein

erkennt und bindet an die GATC-Sequenz und bewirkt einen Schnitt des nichtmethylierten Stranges in der Nähe des GATC-Sitzes. Die Helikase II entwindet den geschnittenen Strang und die Exonuklease I baut den überhängenden Strang ab. Über eine Neusynthese wird die Lücke geschlossen. Die letzte fehlende Phosphodiesteraseverbindung wird durch eine Ligase geschlossen.

Levinson und Gutman (43) zeigten in ihren Untersuchungen, daß dieses Reparatursystem Leserastermutationen (frame-shifts) sehr effektiv korrigieren kann. Leserastermutationen treten häufig dann auf, wenn einer der beiden DNA-Stränge Lücken aufweist, wie z. B. in der Umgebung der Replikationsgabel, bei Reparaturprozessen oder bei Rekombinationen. Die zentrale Annahme dabei ist, daß Basenpaare verrutschen und dadurch ungepaarte Nukleotide auftreten können. Dadurch können entweder Insertionen oder Deletionen entstehen. Eine nachfolgende Replikation des Primerstranges führt zu einer Elongation, wenn die ungepaarten Basen sich im Primerstrang befinden. Eine Deletion tritt auf, wenn die ungepaarten Basen sich im parenteralen Strang befinden. Bei Einschränkung der Funktion des "Mismatch"-Reparatursystems, untersucht bei *E. coli* Mutanten mit *mutL*- und *mutS*-Gendefekten, stieg die Anzahl von Leserasterverschiebungen in CA/TG-Wiederholungssequenzen um das 13-fache an. Es wurde gezeigt, daß das untersuchte Reparatursystem über 90 % der in den Untersuchungen vorgekommenen Leseraster-Mutationen erkannte und korrigierte (43).

### **Postreplikative DNA-Reparatur bei Hefen**

Es wird vermutet, daß ein Stottern bzw. Rutschen der DNA-Polymerase (polymerase slippage) bzw. ein Verrutschen der DNA-Stränge (strand slippage) während der Replikation von einfachen repetitiven DNA-Sequenzen das Auftreten von DNA-"Mismatches" und Heteroduplex-DNA verursacht (44,45). *PMS1*, *MLH1* und *MSH2* wurden als verantwortliche Gene für das Mismatch-Reparatur-System in *S. cerevisiae* identifiziert. Strand et al. (44) zeigten, daß Mutationen in einem dieser Gene zu einem 100 bis 700-fachen Ansteigen der Instabilität in GT-repetitiven Sequenzen der Hefe-DNA führt. Mutationen, die die Korrekturfunktion der DNA-Polymerase (3'-5'-Exonuklease Aktivität) betreffen, haben einen geringeren Effekt auf die Stabilität der repetitiven Elemente. Aufgrund dieser Ergebnisse vermuteten Strand et al., daß die normale Funktion der DNA-Polymerase eine sehr hohe Rate von "slippage"-Ereignissen aufweist (44). New et al. (46) identifizierten bei *S. cerevisiae* ein weiteres Gen, *MSH3*, welches als Homolog zum *mutS*-Gen von *E. coli* angesehen werden kann. Es scheint jedoch eine weniger bedeutende Rolle im postreplikativen Reparatursystem zu spielen.

Untersuchungen von *PMS1*-Genmutationen bei *S. cerevisiae* zeigten, daß das *PMS1*-Genprodukt eine wichtige Rolle in der Korrektur von Heteroduplex-DNA spielt (47).



## **1.8. Postreplikative DNA-Reparatur beim erblichen nichtpolypösen Kolorektalkrebs (HNPCC)**

Beim HNPCC-Syndrom (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) zeigten Untersuchungen, daß diese Erkrankung bei fast 90 % der Fälle mit Mikrosatelliteninstabilitäten assoziiert ist (48). Vogelstein et al. (49) konnten bereits 1989 bei dem Vergleich von 56 Kolontumorproben mit entsprechendem Normalgewebe in fünf Karzinomproben zusätzliche DNA-Fragmente nachweisen, die im Vergleich zu Normalzellen eine variable Anzahl von Wiederholungssequenzen enthielten. Thibodeau et al. (50) berichten über Mikrosatelliteninstabilität in  $(CA)_n$ -Sequenzen bei überwiegend proximal lokalisierten Kolonkarzinomen. Gleichzeitig stellten Aaltonen et al. (51) einen Zusammenhang zwischen RER<sup>+</sup> (replication error positive) Status und der Pathogenese des familiär vererbten kolorektalen Karzinoms her. Tumore mit Alterationen in einfachen repetitiven Sequenzen, beobachtet als Veränderung in der Länge von Mikrosatellitensequenzen in der Tumor-DNA im Vergleich zur Normal-DNA des gleichen Individuums, werden als RER<sup>+</sup> bezeichnet. Bei der Untersuchung zeigte die überwiegende Mehrheit der familiär bedingten Kolonkarzinome (86 %) eine ausgeprägte Mikrosatelliteninstabilität, während die untersuchten sporadischen Kolontumore einen deutlich niedrigeren Anteil (16 %) hatten. Ionov et al. (52) konnten zur gleichen Zeit Veränderungen in AT-reichen Sequenzen und anderen einfachen Sequenzwiederholungen beim Kolonkarzinom zeigen. Sie schätzten, daß mehr als 100.000 solcher Mutationen im Genom einer solchen Tumorzelle vorkommen. Es wurde vermutet, daß diese Art von Mutationen im Zusammenhang mit einer erblicher Prädisposition und einer reduzierten Fähigkeit der DNA-Reparatur stand.

Peltomäki et al. (53) konnten durch Kopplungsanalyse nachweisen, daß ein für das HNPCC-Syndrom verantwortliches Gen mit dem Marker D2S123 assoziiert ist. D2S123 liegt 5 cM distal vom Marker D2S5, dessen Lage auf dem Chromosomabschnitt 2p15-16 bestimmt wurde (Die Einheit der biologischen Genkarte ist die Rekombinationsfrequenz, angegeben in Prozent und wird oft als centi-Morgan bezeichnet).

Lindblom et al. (54) konnten ein zweites Gen (Chromosomabschnitt 3p21-23) lokalisieren, das ebenfalls mit dem HNPCC-Syndrom assoziiert ist.

Zeitgleich konnten Fishel et al. (55) und Leach et al. (56) ein Gen sequenzieren, das als eines der verantwortlichen Gene für das HNPCC-Syndrom angesehen wurde. Aufgrund der nachgewiesenen Homologie mit dem MSH-Gen von *S. cerevisiae*, wurde es als hMSH2-Gen bezeichnet. Es befindet sich im Bereich des Chromosomabschnittes 2p21-22. Damit war es möglich zu überprüfen, ob Mitglieder von Familien mit HNPCC-Syndrom eine Keimbahnmutation im hMSH2-Gen tragen und ob die entsprechenden Tumore zusätzlich von somatischen Mutationen im zweiten Allel betroffen sind. Eine Keimbahnmutation und eine zusätzliche somatische Mutation konnten dann auch tatsächlich in entsprechenden Tumorgewebsproben nachgewiesen werden. Das Ergebnis zeigte, daß Mutationen des hMSH2-Gens für einen Teil der HNPCC-Erkrankungen verantwortlich sein könnten. Das humane Genhomolog, hMLH1, wurde von Bronner et al. (57) sequenziert und auf Mutationen bei

HNPCC-Familien untersucht. Das hMLH1-Gen wurde auf dem Chromosomabschnitt 3p21.3-23 lokalisiert. Eine Punktmutation konnte im kodierenden Abschnitt des hMLH1-Gens bei vier Mitgliedern einer Familie nachgewiesen werden, die überproportional von Kolonkarzinomen betroffen war. Sequenzierung und Mutationsanalyse von hPMS1 und hPMS2, zwei Genhomologe vom PMS1-Gen bzw. mutL-Gen, zeigten, daß auch diese beiden Gene an dem HNPCC-Syndrom beteiligt sind (58).

Festzuhalten bleibt, daß die Mikrosatelliteninstabilität beim HNPCC-Syndrom eine Dysfunktion der DNA-Replikation oder der DNA-Reparatur reflektiert. Bisher wurden vier Gene identifiziert (hMLH1, hMSH2, hPMS1 und hPMS2), deren Mutation für das HNPCC-Syndrom verantwortlich sein könnten. Dabei ist das Gen hMLH1 in ca. 30 % und das Gen hMSH2 in ca. 60 % der Fälle mit HNPCC-Syndrom mutiert (59). Betroffene Familienmitglieder von HNPCC-Familien tragen Keimbahnmutationen in einem Allel eines Reparaturgens. Der Erwerb einer somatischen Mutation im zweiten Allel führt aufgrund des gestörten Reparatursystems zur genomischen Instabilität. Die Mikrosatelliteninstabilität reflektiert in diesem Sinne einen Mutatorphänotyp, d. h. Mutationen in bestimmten Genen (z. B. DNA-Reparaturgene) verursachen ein Anwachsen der Mutationsfrequenz im gesamten Genom und initiieren eine Kaskade von weiteren Mutationen, was letztendlich zu einer größeren genomischen Instabilität führt (60). Es ist zu vermuten, daß ein defektes postreplikatives DNA-Reparatursystem auch DNA-Schäden an kritischen Stellen des Genoms, z. B. Tumorsuppressorgene und Protoonkogene, nicht mehr ausgleichen kann und damit eine mögliche Tumorentwicklung begünstigt.

Die Bedeutung der Mikrosatelliteninstabilität in der Pathogenese sporadischer Tumore und die Ursache zur Entstehung der Mikrosatelliteninstabilität bei sporadischen Tumoren ist dagegen bisher nicht ausreichend geklärt (61-64). Die Häufigkeit des RER<sup>+</sup> Phänotyps ist bei sporadischen Tumorerkrankungen deutlich niedriger als beim HNPCC-Syndrom. In den nächsten Abschnitten folgt ein Überblick über die Mikrosatellitenalteration von nicht mit dem HNPCC-Syndrom assoziierten Tumorerkrankungen. Die deutlich unterschiedliche Mikrosatelliteninstabilitätsfrequenz zwischen HNPCC-Syndrom und sporadischen Tumorerkrankungen deutet auf unterschiedliche pathogenetische Mechanismen hin.

### **1.9. Allgemeine Vorbemerkungen zur Mikrosatellitenalteration und Nomenklatur**

Die Bezeichnung Mikrosatellitenalteration wird für zwei unterschiedliche Formen von genetischen Mutationen verwendet. Einerseits für die Mikrosatelliteninstabilität (MIN) und andererseits für das Auftreten von Verlusten eines kompletten Mikrosatellitenallels, ein sogenanntes LOH (loss of heterozygosity). Unter der Bezeichnung Mikrosatelliteninstabilität wird das Auftreten von Deletionen oder Insertionen einiger Basenpaare in den untersuchten Mikrosatelliten subsumiert. Der Ausdruck RER<sup>+</sup> (**r**eplication **e**rror) wird synonym zum Ausdruck MIN verwendet. Weitere Akronyme wurden und werden nach wie vor verwendet, z.B. MSI (**M**ikrosatelliten**i**nstabilität), USM (**u**biquitous **s**omatic **m**utations) und MMP (**M**ikrosatelliten-**M**utator-**P**hänotyp) (65).

Beide Arten von Mikrosatellitenalteration können mit der gleichen Untersuchungsmethode nachgewiesen werden. Wichtig bei LOH-Untersuchungen ist die Heterogenität (informative Fälle) der untersuchten Allele, um den Verlust eines Allels nachweisen zu können. Bei homozygoter Ausprägung (nicht informative Fälle) ist der Nachweis eines LOH's naturgemäß nicht möglich, weil gleich lange DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese nicht aufgetrennt werden und deshalb nur eine Bande sich darstellt. Die Analyse der Studien über Mikrosatellitenalterationen bei sporadischen Tumorerkrankungen ergibt ein heterogenes Bild. Die Vergleichbarkeit ist durch Verwendung einer unterschiedlichen Anzahl und Art von Mikrosatellitenmarkern eingeschränkt. Die Ergebnisinterpretation wird durch die nicht immer gegebene Trennung, auf der einen Seite die Fälle mit einem nachgewiesenen LOH und auf der anderen Seite die Fälle mit einer nachgewiesenen Mikrosatelliteninstabilität, erschwert. Die Definition für einen positiven Mikrosatelliteninstabilitätsnachweis variiert ebenfalls. Einige Autoren fordern für einen positiven Mikrosatelliteninstabilitätsnachweis mindestens zwei der untersuchten Mikrosatellitenloci mit einer Veränderung (Deletion oder Insertion von einigen Basenpaaren), während anderen Autoren der Nachweis einer Veränderung an einem der untersuchten Mikrosatellitenloci ausreicht.

1998 wurde auf einem internationalen Arbeitsgruppentreffen des nationalen Krebsinstituts der USA Leitlinien für die Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität bei kolorektalen Karzinomen festgelegt (65). Für andere Tumorentitäten sollen ebenfalls Richtlinien erarbeitet werden, so daß zu hoffen ist, daß dann zukünftig die Vergleichbarkeit von Mikrosatellitenuntersuchungen erleichtert wird und verwendete Begriffe einer eindeutigen Definition unterliegen.

## 1.10. Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration

### 1.10.1. Unterschiedliche Tumorentitäten

Neben den Studien zur Mikrosatellitenalteration beim Bronchialkarzinom, wurden auch andere Tumorentitäten untersucht, um die Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen dokumentieren zu können. Eine Auswahl der wichtigsten Studien der letzten Jahre wird in diesem Kapitel vorgestellt, am Ende des Kapitels folgt ein tabellarischer Überblick.

In der Studie von Nawroz et al. (66) wird Serum-DNA, zusätzlich zur üblichen Tumor-DNA, untersucht. Insgesamt 5/21 (24 %) der untersuchten Plattenepithelkarzinome der Hals- und Kopfgregion (HNSCC - head and neck squamous cell carcinoma) zeigten eine MIN, davon drei mit entsprechendem Befund im ebenfalls untersuchten Serum. Bei 18/21 (86 %) der Tumorproben konnte ein LOH nachgewiesen werden. In fünf Fällen konnte dies auch in der Serum-DNA nachgewiesen werden. Ein Nachweis von Mikrosatellitenalterationen im Serum korrelierte mit dem späteren Auftreten von Fernmetastasen ( $p=0,015$ ) (66).

Dams et al. (67) konnten bei 5/10 (50 %) der untersuchten Glioblastome und bei keinem der Astrozytome eine Mikrosatelliteninstabilität nachweisen. Ein LOH wurde bei drei Glioblastomen beobachtet.

In der Arbeit von Gleeson et al. (68) wurden 17 Oesophaguskarzinome, die auf dem Boden einer Barrett-Metaplasie entstanden waren, auf Mikrosatelliteninstabilität untersucht. Dabei konnte in allen untersuchten Fällen eine Alteration nachgewiesen werden. Es wurden insgesamt 139 MS-Loci untersucht. Die Rate der veränderten Mikrosatelliten war bei 16 Karzinomproben sehr niedrig (1-10 %), während bei einer Probe ein hoher Anteil von 45 % registriert wurde.

MacDonald et al. (69) berichteten über den Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität bei 16/46 (35 %) der untersuchten hepatozellulären Karzinome (HCC). In 12 Proben konnte auch im normalen angrenzenden Lebergewebe eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden.

Mironov et al. (70) untersuchten 22 primäre Magenkarzinome. RER<sup>+</sup> waren 5/22 (23 %) der Tumorproben. Die zusätzliche Untersuchungen des p53- und Connexin-32-Gens ergaben keinen Hinweis, daß die genomische Instabilität der Tumorzellen, reflektiert durch den Nachweis von Mikrosatellitenveränderungen, Punktmutationen des p53-Gens oder des Connexin-32-Gens begünstigt.

Mao et al. (71) untersuchen Urinsediment-DNA auf Mikrosatellitenalterationen, um die Sensitivität dieser Untersuchungsmethode zur Erkennung einer Blasen tumor Erkrankung mit der konventionellen zytologischen Untersuchung vergleichen zu können. In einer Vorauswahl wurden 10 für Detektion von Mikrosatelliteninstabilitäten beim Blasen tumor geeignete MS-Marker berücksichtigt. Es konnten 19 von 20 (95 %) Patienten mit bekanntem Blasenkarzinom durch die Mikrosatellitenanalyse identifiziert werden, während mit der Zytologie nur in 9 von 18 (50 %) Fällen maligne Zellen im Urinsediment nachweisbar waren (71).

**Tabelle 1 Mikrosatellitenalteration - Übersicht**

<b>Autoren / Jahr (Referenz)</b>	<b>Tumor- Entität</b>	<b>Fallzahl [n]</b>	<b>Probenart</b>	<b>MIN [%]</b>	<b>LOH [%]</b>	<b>Marker (Chromosom)</b>
Riesinger et al. 93 (72)	Endometriu m-karzinom	36	Tumor	17	k. A.	71 Marker
Duggan et al. 94 (73)	Endometriu m-karzinom	45	Tumor	20	k. A.	Mfd27, Mfd41, Mdf47 (5,17,6)
Helland et al. 97 (74)	Endometrium Zervixkarz.	82 20	Tumor Tumor	6 30	k. A. k. A.	8 Marker (3,5,8,10,11,17)
Wooster et al. 94 (75)	Mamma Sarkom Gehirntumor Ovarialtumor	104 18 54 20	Tumor Tumor Tumor Tumor	11 11 2 10	k. A. k. A. k. A. k. A.	vWFa / b, DM, c-myc und 8 Marker (2,16,17,X)
Dams et al. 95 (67)	Gliom	16	Tumor	37		17 Marker (1,5,8,11,13,15,X)
Peltomäki et al. 93 (76)	Kolon Magen Endometrium Lunge	243 33 22 87	Tumor Tumor Tumor Tumor	17 18 22 2	k. A. k. A. k. A. k. A.	8 Marker (1,3,5,8,10, 11,13,17)
Mironow et al. 94 (70)	Magen	22	Tumor	23	k. A.	10 Marker (1,5,12,13,17,18,X)
Gleeson et al. 96 (68)	Oesophagus	17	Tumor	100	k. A.	139 Marker
MacDonald et al. 98 (69)	HCC	46	Tumor	35	20	16 Marker
Nawroz et al. 96 (66)	HNSCC	21 21	Tumor Serum	24 14	86 24	12 Marker (3p,9p,14,17p,21)
Mao et al. 96 (71)	Blase	20	Urinsedi- ment	45	80	10 Marker

Abkürzungen: MIN, Mikrosatelliteninstabilität; LOH, Verlust der Heterozygotie;  
k. A., keine Angaben

### **1.10.2. Inflammatorische Erkrankungen**

Wie schon an einigen vorhergehenden Stellen angeführt, sind Mikrosatellitenalterationen auch in nichtmalignen oder prämaligen Geweben nachweisbar. Brenntnall et al. (77) konnten bei allen untersuchten Patienten (5/5 (100 %)) mit Pankreatitis eine MIN im sezernierten Pankreassaft, gewonnen durch ERCP, nachweisen. Im Vergleich hierzu, zeigten 2/5 (40 %) Patienten mit Pankreaskarzinom eine MIN im untersuchten Pankreassaft. Drei gesunde Personen mit normalem Pankreas blieben ohne Nachweis einer MIN in den entnommenen Pankreassaftproben. Eingesetzt wurden die Marker D2S123/136, D3S1067, D5S107, D6S87, D8S255, D10S197, D11S904, D17S261/361/787 und D18S34 (Chromosom 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 17 und 18). Brenntnall et al. (78) untersuchten in einer anderen Arbeit die Kolonschleimhaut von Patienten mit Colitis ulcerosa. 5/10 (50 %) der Proben mit nicht dysplastischer Mukosa zeigten eine MIN, mit hochgradiger Dysplasie 46 % (6/13). In keiner Kolonschleimhautprobe mit ischämischer und infektiöser Colitis (7 Patienten) konnte eine MIN nachgewiesen werden. Eingesetzt wurden die Marker D2S119/123/136, D3S1067, D5S346, D6S87, D8S255, D13S175, D17S87/261, p53 (intron 1) und D18S34/35 (Chromosom 2, 3, 5, 6, 8, 13, 17 und 18).

### **1.10.3. Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)**

Mao et al. (79) untersuchten zehn in Paraffin eingebettete Proben von kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit insgesamt fünf Markern verschiedener Tri- oder Tetranukleotidwiederholungen (repeats), der Vergleich erfolgte mit der DNA aus Normalzellen der entsprechenden Personen. Insgesamt wiesen 5 von 10 (50 %) Proben eine Mikrosatelliteninstabilität in mindestens einem untersuchten Locus auf. Von den 5 eingesetzten Markern besaßen die Marker AR, ACTBP2 und UT762 einen Anteil von 40 %/20 %/40 % am Nachweis von Mikrosatelliteninstabilitäten. Die Untersuchung von über 300 Tumorproben, einschließlich SCLC, NSCLC, Urothelkarzinome und Basalzell- und Plattenepithelkarzinome der Haut, mit Markern für Dinukleotidsequenzen, erbrachte einen Anteil von 0,7 % MIN.

Merlo et al. (80) konnten bei 15/33 (45 %) SCLC-Tumorproben eine MIN nachweisen. Es wurden bei dieser Untersuchung ausschließlich Marker für Dinukleotidsequenzen eingesetzt. Jede Tumorprobe wurde unter Verwendung von durchschnittlich 23 Mikrosatellitenmarkern untersucht.

Chen et al. (81) untersuchten 21 SCLC-Tumorproben mit den drei Mikrosatellitenmarkern AR, ACTBP2 und UT762. Die Untersuchung wurde auf die Plasma-DNA der entsprechenden Patienten ausgedehnt und mit normalen Blutlymphozyten-DNA verglichen. Insgesamt konnten bei 16/21 (76 %) (Tumor-DNA) und bei 15/21 (71 %) (Plasma-DNA) der untersuchten Patienten Mikrosatellitenalterationen nachgewiesen werden. Mit dem Marker AR konnten in 38 %, ACTBP2 in 28 % und UT762 in 52 % der Patienten eine Mikrosatellitenalteration detektiert werden. MIN konnte bei 57 %, LOH in 33 % der Patienten nachgewiesen werden. In einem Fall gelang der LOH-Nachweis nur in der Tumor-DNA, nicht aber in der Plasma-DNA. In einem anderen Fall konnte nur in der Plasma-DNA ein LOH nachgewiesen werden. MIN kam ebenfalls

bei einer geringen Anzahl entweder nur in der Tumor-DNA oder nur in der Plasma-DNA vor. Bei allen anderen untersuchten Patienten mit Veränderungen war eine Mikrosatelliteninstabilität in beiden Untersuchungskompartimenten nachweisbar. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bisherigen Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

**Tabelle 2**

**Mikrosatellitenalteration - Kleinzelliges Bronchialkarzinom**

<b>Autoren / Jahr (Referenz)</b>	<b>Fallzahl [n]</b>	<b>Probenart</b>	<b>MIN [%]</b>	<b>LOH [%]</b>	<b>Marker (Chromosom)</b>
Mao et al. 94 (79)	10	Tumor	50	n. u.	D14S50 (14) AR (X), FGA(4) ACTBP2 (6) UT762 (21)
Merlo et al. 94 (80)	33	Tumor	45	n. u.	23 Marker (1-3,5,6,9,13,17)
Chen et al. 96 (81)	21 21	Tumor Plasma	52 48	29 29	AR (X) ACTBP2 (6) UT762 (21)
Hurr et al. 96 (82)	5	Tumor	20	100	8 Marker (3p12 - 3p26)
Pylkkanen et al. 97 (83)	6	Tumor	0	67	16 Marker (1p,3p,5q,8p,9p, 10p,11p,13q,17q)

Abkürzungen: MIN, Mikrosatelliteninstabilität; LOH, Verlust der Heterozygotie  
n. u., nicht untersucht

#### **1.10.4. Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)**

Shipman et al. (84) untersuchten 28 NSCLC-Tumorproben. Als Vergleichsmaterial diente normales Lungengewebe der entsprechenden Patienten. Ziel der Untersuchung war, die LOH-Frequenz von Chromosom 11 im Bereich p15-q23 mit insgesamt 11 MS-Markern zu bestimmen. Die höchste LOH-Frequenz mit jeweils 18/28 (64 %) Tumorproben wurden mit den Markern D11S941E und D11S935 (11p13) nachgewiesen. Die Frequenz der untersuchten 11p Alleldeletionen war nicht signifikant assoziiert mit klinisch-pathologischen Parametern (TNM-Stadium, Alter, Geschlecht, Raucherstatus). Im CAT-Locus wurde ein LOH in 18/19 (95 %) der untersuchten Tumor-DNA-Proben mit informativen Mikrosatelliten nachgewiesen.

Sekine et al. (85) untersuchten 18 NSCLC-Tumorproben von Patienten, die sich einer chirurgischen Therapie unterzogen hatten und jünger als 40 Jahre waren. Die Untersuchung umfaßte zusätzlich eine Vergleichsgruppe von Patienten mit einem Alter von über 60 Jahren. Bei 7/18 (39 %) aus der Gruppe der unter Vierzigjährigen zeigte sich eine MIN in den untersuchten Mikrosatellitenloci, während der Anteil bei den über Sechzigjährigen 11 % betrug. Der Mikrosatelliteninstabilitätsnachweis wurde als positiv eingeordnet, wenn mindestens zwei der sechs untersuchten Mikrosatellitenloci eine Expansion oder Kontraktion aufwiesen.

Suzuki et al. (86) untersuchten 9 Patientinnen mit NSCLC, die mindestens 3 Verwandte mit Krebserkrankungen in der Familienanamnese hatten. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 28 Patientinnen mit NSCLC zusammen, die keine Verwandten mit Krebserkrankungen in der Familienanamnese hatten. Bei 6/9 (67 %) Patientinnen der erstgenannten Gruppe und bei 5/28 (18 %) Patientinnen der Kontrollgruppe wurde eine Mikrosatelliteninstabilität ( $p=0.011$ ) in den Tumorproben nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter zwischen MIN-positiver und MIN-negativer Gruppe konnte nicht festgestellt werden.

Fong et al. (87) untersuchten 108 NSCLC-Tumorproben und wiesen bei 7 (6,5 %) Proben eine MIN nach. In allen 7 Tumoren mit MIN wurden hohe LOH-Raten gefunden, z. B. in den untersuchten Mikrosatellitensequenzen der Chromosomenarme 11p (57 %), 8p (66 %), 9p (83 %) und 17p (100 %). Zusätzlich hatten 2/7 Proben eine K-ras-Mutation und 3/7 Proben eine p53-Mutation.

Ryberg et al. (88) fanden eine MIN bei 29/137 (21 %) Patienten mit NSCLC. Im Vergleich zum AR-Marker war die nachgewiesene Mikrosatelliteninstabilitätsrate unter der Verwendung von Markern für Dinukleotidwiederholungssequenzen zwei- bis dreimal höher (ohne Signifikanzangabe). Untersucht wurde der Chromosomenabschnitt 3p21-24 und das X-Chromosom. Eine MIN war häufiger bei Patienten unter 50 Jahren (38 %) als bei älteren Patienten (19 %) ( $p=0,051$ ) nachzuweisen.

Thiberville et al. (89) berichteten über 72/86 (84 %) Patienten mit einem LOH des untersuchten Chromosomenabschnittes 3p21-22. Die Mikrosatellitenanalyse ergab bei 2/86 (2,4 %) Patienten den Nachweis einer MIN. Neben dem Tumorstadium und der histologischen Klassifizierung, konnten keine weiteren prognostischen Faktoren nachgewiesen werden. Der Nachweis der MIN wurde mit zwei Markern für Dinukleotidwiederholungssequenzen, den Markern ITIH1, ITIH3



und an einer PolyTC-Sequenz im Intron 17 des ITIH1-Gen durchgeführt.

Pifarré et al. (90) konnten bei 42/64 (66 %) NSCLC-Tumorproben eine MIN und bei 23/64 (36 %) Tumorproben ein LOH nachweisen. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen RER<sup>+</sup>-Status und LOH-Status, K-ras- oder p53-Mutationen nachgewiesen. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug bei Patienten mit Stadium I und RER-Status 80 %, bei Patienten mit RER<sup>+</sup>-Status 26 % (p=0,005).

Froudarakis et al. (91) untersuchten 20 bronchoskopisch gewonnene Tumor- und Normalmukosaproben von Patienten mit NSCLC mit 10 Markern für Mikrosatellitensequenzen der Chromosomenarme 17p, 17q, 9p und 9q. Bei 16/20 (80 %) der untersuchten Tumorproben konnte eine Mikrosatellitenalteration, bei 6/20 (30 %) eine MIN und 5/20 (25 %) ein LOH nachgewiesen werden. Fünf Tumorproben zeigten eine MIN und ein LOH. Keine Korrelation wurde zwischen LOH/MIN-Nachweis und Tumorstadium bzw. histologischem Subtyp gefunden.

Shridar et al. (92) untersuchten mit 16 MS-Markern die Chromosomenabschnitte 3p, 3q, 11p, 11q, 13q und das X-Chromosom bei 34 Patienten mit NSCLC. Bei 13/38 (34 %) der Tumorproben zeigte sich eine MIN und bei 11/38 (29 %) ein LOH. Untersucht wurden Mikrosatellitensequenzen des Chromosomenarmes 3p.

Pylkkanen et al. (83) untersuchten 16 Dinukleotidwiederholungssequenzen auf den Chromosomenabschnitten 1p, 3p, 5q, 8p, 9p, 10p, 11p, 13q und 17q. Die Tumorproben von 93 Patienten mit Bronchialkarzinom setzten sich aus 87 NSCLC- und 6 SCLC-Proben zusammen. Keine der Tumorproben zeigte eine MIN (0/93), aber 24/87 (28 %) der NSCLC-Proben zeigten ein LOH. Ein LOH konnte in 4/6 (67 %) der SCLC-Proben nachgewiesen werden. Die höchste LOH-Rate wurde im Bereich des Chromosomenabschnitts 3p nachgewiesen (6 eingesetzte Marker).

Miozzo et al. (93) untersuchten 53 Tumorproben und 42 histologisch normale Bronchialmukosaproben von 51 Patienten mit einem Lungentumor. Darunter waren 43 Fälle mit NSCLC, 5 Fälle mit SCLC und 5 weitere Fälle mit Lungentumor ohne nähere Angabe zur histologischen Subklassifizierung. Bei 7 Patienten waren die gleichen Alterationen im Tumor und in der normalen Bronchialschleimhaut nachzuweisen. Zusätzlich konnten in 3 von 5 untersuchten Sputumproben eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die bisherigen Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen.

**Tabelle 3****Mikrosatellitenalteration - Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom**

<b>Autoren / Jahr (Referenz)</b>	<b>Fallzahl [n]</b>	<b>Probenart</b>	<b>MIN [%]</b>	<b>LOH [%]</b>	<b>Marker (Chromosom)</b>
Mao et al. 94 (79)	23	Tumor	9	k. A.	9 Marker (4,6,12,14,19,21,X)
Shridhar et al. 94 (92)	38	Tumor	34	29 siehe Text	16 Marker (3p,3q,11p,11q, 13q,X)
Fong et al. 95 (87)	108	Tumor	6,5	siehe Text	6 Marker (1p,2p,8p,9p,18q)
Ryberg et al. 95 (88)	137	Tumor	21	k. A.	D3S647/D3S966 (3) D3S1286/D3S1289 (3) AR (X)
Tiberville et al. 95 (89)	86	Tumor	2,4	84	D3S1007/D3S1339 (3) ITI1/3 (3p)
Miozzo et al. 96 (93)	53 5 42	Tumor* Sputum Bronchial- mukosa	32 60 36	k. A. k. A. k. A.	D3S1339 (3p) D3S1340 (3p) D3S1351 (3p) AR (X)
Wieland et al. 96 (94)	49 30	Tumor Tumor	29	43	7 Marker (3p,5q) 3 Marker (3p21)
Sekine et al. 97 (85)	18 9	Tumor Tumor	39 11	11 0	D2S123 (2) D3S659/ D3S966(3) D5S346 (5) WT1/TP53 (17)
Pifarré et al. 97 (90)	64	Tumor	66	36	8 Marker (2p,3p)
Pylkkanen et al. 97 (83)	87	Tumor	0	28	16 Marker (1p,3p,5q,8p,9p,10p, 11p,13q,17q)
Shipman et al. 98 (84)	28	Tumor	11	siehe Text	7 Marker (11p)
Suzuki et al. 98 (86)	28 9	Tumor Tumor	18 67	50 33	(2p,3p,5q,11p,17p)

<b>Autoren / Jahr (Referenz)</b>	<b>Fallzahl [n]</b>	<b>Probenart</b>	<b>MIN [%]</b>	<b>LOH [%]</b>	<b>Marker (Chromosom)</b>
Froudarakis et al. 98 (91)	20	Tumor	30	25	10 Marker (17p,17q,9p,9q)
Sánchez-Céspedes 98 (95)	22 22	Tumor Serum	0 9	54 23	D3S1038 (3) D3S1611 (3) D3S1067 (3) D3S1284 (3)

Abkürzungen: MIN, Mikrosatelliteninstabilität; LOH, Verlust der Heterozygotie;  
k. A., keine Angaben; \*, 43 NSCLC-, 5 SCLC- und 5 nicht  
näher klassifizierte Lungentumorproben

### **1.11. DNA im Blutplasma und -serum**

Unter Verwendung eines Radioimmunoassays konnten Leon et al. (96) freie DNA im Serum von Tumorpatienten in einer Konzentration von  $180 \pm 38$  ng/ml (Mittelwert) nachweisen. 50 % der Patienten befanden sich in einem Bereich von 0 bis 50, der andere Teil der Gruppe in einem Bereich von 50 bis 5000 ng/ml DNA. Zwischen der DNA-Konzentration im Serum und der Tumorgröße oder der Tumorlokalisierung bestand keine Korrelation. Bei Patienten mit einer metastasierten Tumorerkrankung bestand signifikant häufiger ein höherer DNA-Spiegel als bei Patienten mit einer Tumorerkrankung ohne Nachweis von Metastasen ( $209 \pm 39$  ng/ml versus  $100 \pm 30$  ng/ml,  $p < 0,02$ ). Nach einer Bestrahlungstherapie wurde eine Abnahme der DNA-Konzentration im Serum bei Patienten mit Lymphomen, Lungen-, Ovarial- und Uterustumoren um 66 bis 90 % gemessen. Bei Brust- und Kolontumoren sowie bei Gliomen konnte nur eine Abnahme von 16 bis 33 % registriert werden. Im allgemeinen korrelierte die Abnahme der DNA-Konzentration mit einem Rückgang klinischer Symptome. Umgekehrt war ein Anstieg oder ein unveränderter DNA-Spiegel verbunden mit einem schlechten Therapieansprechen (96). Shapiro et al. (97) untersuchten 386 Patienten mit benignen und malignen gastrointestinalen Erkrankungen. Patienten mit benignen Erkrankungen hatten eine DNA-Konzentration von  $118 \pm 14$  ng/ml, während Patienten mit malignen Erkrankungen einen Mittelwert von  $412 \pm 63$  ng/ml aufwiesen ( $p < 0,001$ ). Stroun et al. (98) konnten bei Patienten mit malignen Grunderkrankungen nachweisen, daß die DNA im Plasma aus Fragmenten in der Größe von 21 Kb bis weniger als 0,5 Kb bestand und daß die DNA in Doppelsträngen vorlag. In einer weiteren Arbeit von Stroun et al. (99) konnte der Nachweis erbracht werden, daß die extrahierte Plasma-DNA auch aus den malignen Zellen stammte.

Untersuchungen von Plasma- bzw. Serum-DNA zum Nachweis von Mikrosatellitenalterationen wurden bisher durchgeführt von:

1. Chen et al. (81) bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom
2. Sánchez-Céspedes et al. (95) bei Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom
3. Nawroz et al. (66) bei Patienten mit Tumoren der Kopf / Halsregion
4. Goessl et al. (100) bei Patienten mit Nierenzellkarzinom.

Zum Nachweis von K-ras bzw. N-ras Mutationen wurde Plasma-DNA von Patienten mit Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom, myelodysplastischen Syndrom und akuter myeloischer Leukämie verwendet (101-103). In allen Studien konnte die prinzipielle Eignung von Plasma- bzw. Serum-DNA zur Mutationsanalyse nachgewiesen werden.

### **1.12. Tumormarker**

Substanzen, die auf eine Tumorerkrankung hinweisen, werden als Tumormarker bezeichnet. Solche Substanzen treten häufig aufgrund des veränderten Stoffwechsels der transformierten Zellen auf. Man unterscheidet zwischen zellulären (Hormonrezeptoren beim Mammakarzinom) und humoralen Tumormarkern. Neben einer Reihe frei im Serum zirkulierender Substanzen, die vom Tumor induziert werden, z. B. Enzyme, Akute-Phase-Proteine, Stoffwechselprodukte u. a., hat insbesondere der Nachweis tumorassoziierter Antigene einen hohen Stellenwert erlangt. Hierunter finden sich u. a. onkofetale Antigene wie CEA und AFP und durch monoklonale Antikörper definierte Tumorantigene (CA19-9, CA125, u. a.). Hormone, z. B. das  $\beta$ -HCG, sind ebenfalls als Marker geeignet. Die Anforderungen an einen nutzbringenden Tumormarker sind an folgende Eigenschaften gebunden: Hohe Tumorspezifität (um gesunde Personen von erkrankten Personen unterscheiden zu können), Organspezifität, Korrelation der Höhe des Markers mit den einzelnen Tumorstadien, Anzeige von Veränderungen beim Tumorpatienten unter Therapie, prognostische Aussagekraft und hohe Sensitivität (besonders in der Frühdiagnostik).

Beim Bronchialkarzinom werden zur Zeit nur die Neuron-spezifische Enolase (NSE), das karzinoembryonale Antigen (CEA) und das lösliche Zytokeratinfragment 21-1 in der klinischen Praxis genutzt. Hohe NSE-Serumspiegel sprechen für ein kleinzelliges Bronchialkarzinom; der Abfall während oder nach Therapie für die Wirksamkeit der gewählten Therapiestrategie. Letzteres gilt auch für das CEA und CYFRA 21-1 für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom. Der Nachweis von tumorassozierten genetischen Alterationen im Serum könnte die Früherkennung und die Therapieverlaufskontrolle verbessern. Ob der Nachweis von Mikrosatellitenalterationen als Tumormarker zur frühzeitigen Detektion von Tumorerkrankungen geeignet ist, kann nur durch entsprechende Studien geklärt werden.

## 2. Aufgabenstellung

Die unverändert sehr schlechte Prognose von Patienten mit Bronchialkarzinom unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung einer zuverlässigen und sensitiven Methode zur verbesserten Frühdiagnostik. Die frühzeitige Erkennung der Tumorerkrankung ist von evidenter Bedeutung, weil das Tumorstadium bei der Diagnosestellung nach wie vor zu den wichtigsten Prognosefaktoren gehört. Die hohe Morbidität und Mortalität des Bronchialkarzinoms in der Bevölkerung der westlichen Industrienationen demonstriert die herausragende epidemiologische Bedeutung, vor allem auch unter Berücksichtigung der überproportional ansteigenden Inzidenz in dem letzten Jahrzehnt.

In den Arbeiten von Chen et al. (81) und einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Sánchez-Céspedes et al. (95) wurde gezeigt, daß Veränderungen im Genom von Tumorzellen bei kleinzelligen und nichtkleinzelligen Bronchialtumoren auch in der zirkulierenden DNA im Serum bzw. Plasma detektierbar sind. Beide Studien zeigen, daß es auch ohne belastende invasive Verfahren, z.B. Tumorbiopsieentnahme, möglich ist Mutationen der DNA von Bronchialtumoren nachzuweisen. Allerdings ist es bisher noch notwendig, einen Vergleich mit der DNA aus Tumorbiopsaten vorzunehmen. In einer prospektiven Studie von Mulcahy et al. (101) gelang der Nachweis von K-ras Mutationen durch die Untersuchung von DNA im Plasma bei vier Patienten mit Symptomen einer Pankreaserkrankung. Die endgültige Diagnose Pankreaskarzinom wurde erst nach weiteren 5 bis 14 Monaten gestellt. Die im Plasma nachgewiesenen Mutationen stimmten mit den später gefundenen Mutationen aus den Tumorzellen überein. Voraussetzung zum Nachweis von Mutationen ist eine ausreichende Tumor-DNA-Menge im Blut. Diese Studie demonstrierte, daß der Nachweis von Mutationen in der Plasma-DNA die Frühdiagnostik einer Tumorerkrankung verbessern kann. Die prognostische Bedeutung von Mikrosatellitenalterationen wurden in den beiden nachfolgend angeführten Studien untersucht. Thibodeau et al. (50) untersuchten 86 Patienten mit kolorektalem Karzinom der Stadien A bis D (nach Dukes). Nach chirurgischer Therapie überlebten Patienten mit Mikrosatelliteninstabilitätsnachweis an zwei oder mehr Mikrosatellitenloci signifikant länger als Patienten mit Mikrosatelliteninstabilitätsnachweis an nur einem Locus oder mit keiner nachgewiesenen Mikrosatelliteninstabilität ( $p=0,02$ ). Pifarré et al. (90) untersuchten 33 Patienten mit NSCLC Stadium I. Die 5-Jahres-Überlebensrate war nach chirurgischer Therapie bei Patienten mit einem RER<sup>+</sup> Status 26 %, bei den Patienten mit RER<sup>-</sup> Status 80 % ( $p=0,005$ ). Die heterogenen Ergebnisse der beiden Studien zeigen, daß die Frage, ob der Nachweis von Mikrosatellitenalterationen ein prognostisch günstiger oder prognostisch ungünstiger Faktor ist, bisher nicht ausreichend beantwortet werden kann. Das heterogene Ergebnis könnte aber auch die Folge des Einflusses entitätsspezifischer Eigenschaften sein.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- # Methodenetablierung zum Nachweis von Mikrosatellitenalterationen in Serum- / Plasma-DNA
- # Pilotstudie zur Identifizierung der Patienten mit Bronchialkarzinom, die eine Mikrosatellitenalteration aufweisen
- # Bestimmung der Häufigkeit einer Mikrosatellitenalteration beim Bronchialkarzinom unter Verwendung der drei in dieser Studie eingesetzten Mikrosatellitenmarker

Ein weiterer Aspekt des Gesamtprojektes ist die Frage, ob unter den zur Zeit gängigen Therapiemodalitäten eine Mikrosatellitenalteration einen prognostischen Parameter für den Erfolg einer entsprechenden Therapie darstellt. Weiterhin soll untersucht werden, ob das Phänomen Mikrosatellitenalteration durch Behandlung der Patienten stabil nachweisbar bleibt. Hierzu wurde und wird eine umfangreiche Serum- und Plasmaprobenbank angelegt, um "follow up" Untersuchungen an Patienten mit nachgewiesener Mikrosatellitenalteration durchführen zu können. Auch soll geprüft werden, ob beim NSCLC bestimmte Stadien und histologische Subklassifizierungen mit Mikrosatellitenalterationen assoziiert sind.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Patienteneinschluß und Probengewinnung**

Es wurde zur Dokumentation der Patientendaten und der entnommenen Proben ein Datenformblatt erstellt. Eingeschlossen wurden Patienten mit diagnostiziertem Bronchialkarzinom vor Therapiebeginn. Die untersuchten Tumorproben wurden bronchoskopisch gewonnen. War eine bronchoskopische Materialgewinnung nicht möglich oder nicht zumutbar, dann wurden Tumorzellen aus in Paraffin eingebetteten histologischen Präparaten entnommen. Die Auswahl und Markierung der Tumorareale erfolgte durch einen Pathologen. Den Patienten wurden zwei Blutproben zu je 10 ml aus einer peripheren Armvene entnommen. Für die geplanten Verlaufsuntersuchungen im Rahmen des Gesamtprojektes werden in einem zumutbaren Zeitintervall weitere Blutproben entnommen. Alle frisch gewonnenen Tumorproben wurden bis zur Aufarbeitung im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-75^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Es konnten für diese Arbeit 29 Patienten aus der Lungenheilstation Beelitz eingeschlossen werden. 14 Patienten wurden aus der onkologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik II der Charité in Berlin rekrutiert.

Mikroskopisch ausgewählte Tumorareale aus in Paraffin eingebetteten Schnittpräparaten wurden bei zwei Patienten mit SCLC und bei sechs Patienten mit NSCLC verwendet. Bei einem Patienten mit SCLC wurde die verwendete Tumorprobe aus einer Lymphknotenmetastase gewonnen. Unter den 43 untersuchten Tumorproben waren 16 Proben kleinzellige Bronchialkarzinome und 27 Proben nichtkleinzellige Bronchialkarzinome. Die Proben der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome setzten sich aus 7 Adenokarzinomen, 16 Plattenepithelkarzinomen und 4 großzelligen Karzinomen zusammen.

#### **3.2. Kontrollgruppe und Probengewinnung**

Es wurden insgesamt 10 gesunde Probanden, die in der Anamnese keine Tumorerkrankung aufwiesen, in die Kontrollgruppe eingeschlossen.

Jedem Proband wurden zwei Blutproben zu je 10 ml aus einer peripheren Armvene entnommen.

#### **3.3. Probenaufarbeitung**

- # Serum wurde gewonnen, indem das Nativblut bis zum Ablauf der Spontangerinnung, mindestens 30 Minuten, stehen gelassen wurde. Es folgte das Zentrifugieren der Probe für 10 Minuten bei  $1500 \times g$ . Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Probenröhrchen gefüllt.
- # Zur Blutprobengerinnungshemmung wurde für die zweite Probe Natrium-Zitrat- oder EDTA-Zusatz verwendet. Es folgte das Zentrifugieren der Probe für 10 Minuten bei  $200 \times g$ . Der Überstand wurde abpipettiert und nochmal für 10 Minuten bei  $1500 \times g$  zentrifugiert. Dadurch werden sämtliche zellulären Bestandteile aus dem Plasma entfernt.

Die nicht sofort analysierten Serum- und Plasmaproben wurden bei ca. -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

### **Dichtegradientenzentrifugation**

Die zellulären Bestandteile aus dem EDTA- / Zitratblut wurden zur Gewinnung mononukleärer Zellen im Verhältnis 1:1 mit Natriumchloridlösung (0,9 %) verdünnt. Die Probe wurde vorsichtig auf einen aus 10 ml Ficoll-Paque® (Pharmacia Biotech, Schweden) bestehenden Kompartiment aufgeschichtet. Eine Vermischung der ungefähr im Verhältnis 1:2 (Ficoll : Blut und Kochsalzlösung) aufgeschichteten Kompartimente muß vermieden werden. Die nachfolgende Zentrifugation der Probe für 30 Minuten bei 400 x g (Raumtemperatur) führte zur Trennung der einzelnen zellulären Komponenten. Dabei bildet sich am Boden eine Schicht aus mit Ficoll aggregierten Erythrozyten, direkt darüber eine Schicht aus Granulozyten und eine Interphaseschicht zwischen Ficoll-Paque und Plasma. Weil die Lymphozyten eine relativ niedrige Dichte besitzen, sammeln sie sich zusammen mit einigen Thrombozyten und Monozyten in der Interphasezone an. 95 % der Zellen in der Interphasezone sind Lymphozyten. Die Lymphozyten wurden mit einer Pasteur-Pipette aufgenommen und in eine isotonische Kochsalzlösung gewaschen. Erneutes Zentrifugieren für 10 Minuten bei 200 x g führte zu einer Pelletbildung. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit ca. 500 µl isotonischer Kochsalzlösung in ein Probenröhrchen überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt, 1 Minute bei 120 x g, wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Lymphozytenpellet bis zur Aufarbeitung im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -75°C aufbewahrt.

### **3.4. DNA-Isolation**

#### **Protokoll der DNA-Isolation von in Paraffin eingebetteten und fixierten Tumorproben**

Die Tumorareale auf den Objektträgern wurden von einem Pathologen unter lichtmikroskopischer Kontrolle markiert. Die gekennzeichneten Areale wurden mit einer sterilen Einmal-Skalpellklinge abgeschabt. Durch die Zugabe von 3 ml Xylol wurde das Paraffin extrahiert. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit Äthanol (70 %) gewaschen und zentrifugiert, anschließend der Alkohol dekantiert und das Pellet bei einer Temperatur von 37°C getrocknet. Äthanol dient der Entfernung noch verbliebener Reste des Xylols. Die Inkubation bei 37°C führt zu einer Evaporation des Alkohols.

Die nächsten Schritte entsprechen dem Vorgehen bei der Isolierung der DNA aus den bronchoskopisch gewonnenen Biopsaten. Alle Zentrifugationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Isolierung der DNA wurden Säulen der Firma Qiagen verwendet. Diese Säulen enthalten eine Siliziummembran zur Bindung von Nukleinsäuren. Entsprechend dem Protokoll für Gewebeproben (QIAamp® Tissue Kit) ergab sich folgender Versuchsablauf:



1. Zugabe von 180 µl Lysepuffer (ATL), 20 µl Proteinase K (20 mg/ml), Inkubation für 12 Stunden bei 55°C, gelegentlich mischen
2. Zugabe von 20 µl gekochte RNase A (20 mg/ml), mischen, 2 Minuten inkubieren
3. Zugabe von 200 µl Lysepuffer (AL), mischen, 60 Minuten inkubieren bei 70°C
4. Zugabe von 210 µl Äthanol (96-100 %), mischen
5. Beladen der QIAamp®-Säule mit der Probe, Zentrifugation 1 Minute bei 6500 x g
6. Waschen mit je 500 µl Pufferlösung (AW), Zentrifugation 1 Minute bei 6500 x g
7. Waschen mit je 500 µl Pufferlösung (AW), Zentrifugation 3 Minuten bei 20000 x g
8. Im 70°C warmen Wasserbad Elutionspuffer erwärmen und je Säule 200 µl dazugeben, 1 Minute inkubieren, dann Zentrifugation 1 Minute bei 6500 x g

Die DNA-haltige Pufferlösung wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Lymphozyten- und Serumproben wurden nach dem Protokoll für Blut- und Körperflüssigkeiten aufgearbeitet (QIAamp® Blood Kit). Dieses Protokoll entspricht dem oben beschriebenen Protokoll ab Schritt 2. Außerdem muß Schritt 3 durch die Zugabe von Proteinase K ergänzt werden. Bei der DNA-Isolierung der Serumproben müssen außerdem, entsprechend dem Probenvolumen, die einzelnen Reaktionsschritte angepaßt werden. Die Menge an Lysepuffer und Äthanol muß proportional der zusätzlichen Probenmenge gesteigert werden, bei Proteinase K reicht eine drei- bis vierfache Steigerung aus. Aufgrund der limitierten Aufnahmefähigkeit der benutzten Säule von Qiagen, muß Schritt 5 je nach Menge entsprechend wiederholt werden. Eingesetzt wurden zwischen 1-4 ml Serum bzw. Zitratplasma.

Die benutzten Säulen haben laut Herstellerangaben (Qiagen GmbH, Deutschland) eine DNA-Bindungskapazität von bis zu 100 µg.

### 3.5. Markierungsreaktion (Forward labeling reaction)

Bei der Markierungsreaktion wird eine radioaktive (- Phosphatgruppe des Adenosintriphosphat an das 5'-OH Ende des eingesetzten Oligonukleotids von der T4-Polynukleotid-Kinase übertragen. Bei allen Markierungsreaktionen wurde [<sup>-32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol) als Donator eingesetzt (Amersham International).

Reaktionszusammensetzung für einen 25 µl Ansatz

- # 15 µl Aqua dest.
- # 1 µl Primer (AR, ACTBP2, UT 762) (sense) 100 pmol/µl
- # 5 µl 5 X Forward Reaction Buffer, GibcoBRL
- # 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase 10 U, GibcoBRL
- # 3 µl [<sup>-32</sup>P] ATP

Reaktionsbedingungen: 60 Minuten Inkubation bei 37°C, danach erfolgte für 10 Minuten bei 65°C die Enzymaktivierung.

Ein 25 µl Markierungsansatz wurde für 10-25 PCR-Ansätze eingesetzt.

### 3.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### Das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR ist es möglich, kleinste Mengen spezifischer DNA-Abschnitte nachzuweisen. Mitte der achtziger Jahre wurde die PCR-Methode von Saiki et al. (104) eingeführt und danach ständig verbessert und erweitert. Das grundlegende Prinzip der PCR ist nach wie vor gültig. Basis des Verfahrens ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Ein Prototyp der verwendeten DNA-Polymerasen ist die Taq-Polymerase von *Thermus aquaticus*. Der Einsatz von thermostabilen Polymerasen ermöglichte es, den Prozeß der Amplifizierung der Ausgangs-DNA zu automatisieren. Unter Verwendung von im Überschuß vorhandenen Oligonukleotid-Primern und den vier Nukleotiden (dNTP) kann die DNA-Polymerase neue komplementäre DNA-Stränge synthetisieren, indem Nukleotide an das 3'-Ende der Primer angeheftet werden. Die entstandenen DNA-Syntheseprodukte werden bei 94°C denaturiert. Dann folgt ein neuer Zyklus mit der Hybridisierung von Oligonukleotid-Primern und der Synthese der DNA-Stränge. Nach 20 Zyklen erhält man von einem DNA-Molekül ausgehend infolge einer exponentiellen Kettenreaktion ca. 1 Million ( $2^{20}$ ) Kopien. Genetisches Material, welches nur in Spuren vorhanden ist, kann mit Hilfe der PCR einer molekularbiologischen Analyse zugänglich gemacht werden.

Zur Darstellung der PCR-Produkte wurden Agarose- und nichtdenaturierende PAA-Gele verschiedener Konzentrationen verwendet. Als Detektionsverfahren wurden Ethidiumbromid- und Silbernitratfärbungen benutzt.

Getestet wurden: DNA-Polymerasen von Perkin-Elmer, Appligene und Promega A, B  
Tetramethylammoniumchlorid (TMAC)-Konzentration von 30-70 mmol/l  
Hybridisierungstemperatur von 55-65°C bei den drei in dieser Studie benutzten Primern (Startermolekülen)  
MgCl<sub>2</sub>-Konzentration zwischen 1-5 mmol/l  
Dimethylsulfoxid ( DMSO, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO), Glycerol, bovines Serumalbumin (BSA), Ammoniumsulfat (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) und Formamid als PCR-Zusatz zur Steigerung der Effektivität und Spezifität der Amplifikation  
Primer-Qualität

Bei einer Temperatur von 94°C wurden die Probenansätze in den PCR-Automaten eingesetzt (hot start). Durch eine eingebrachte Paraffinschicht wurde der Ansatz in zwei Kompartimente unterteilt. Die Trennung der Kompartimente wird erst durch das Schmelzen der Paraffinschicht aufgehoben. Alle notwendigen Bestandteile der PCR werden dadurch erst nach dem Schmelzen der Paraffinschicht zusammengeführt. Folgende PCR-Bedingungen wurden für alle drei Mikrosatellitenprimer angewendet: Initial 3 Minuten denaturieren bei 94 °C, dann 1 Minute denaturieren bei 94 °C, 1 Minute hybridisieren bei 59 °C und 1 Minute synthetisieren (Extension) bei 72 °C für 35 Zyklen. Zum Schluß folgte ein zusätzlicher Syntheseschritt für

5 Minuten bei 72 °C. Eingesetzt wurde der Thermocycler PTC-100 von der MJ Research, Inc.. Die Kühlung und Heizung des Gerätes arbeitet nach dem Prinzip des Peltier-Effektes.

Untersucht wurden insgesamt drei Mikrosatellitenabschnitte auf den Chromosomen 6, 21 und dem X-Chromosom.

### **Charakterisierung der untersuchten Mikrosatelliten und der benutzten Primersequenzen**

#### **Androgenrezeptorgen (90 Kb) (AR)**

- # ( CAG )<sub>19</sub> CAA Trinukleotidsequenz, Chromosom X q11-12
- # Primer sense ( 5' A 3' )  
TCC GCG AAG TGA TCC AGA AC
- # Primer antisense ( 5' A 3' )  
CTT GGG GAG AAC CAT TCT CA
- # Länge des Amplifikationsproduktes ca. 180 bp

#### **Humanes $\beta$ -Aktin-Pseudogen ( HUMACTBP2 )**

- # ( AAAG )<sub>11</sub> AAAAAG ( AAAG )<sub>15</sub> Tetranukleotidsequenz, Chromosom 6
- # Primer sense ( 5' A 3' )  
AAT CTG GGC GAC AAG AGT GA
- # Primer antisense ( 5' A 3' )  
ACT TCT CCC CTA CCG CTA TA
- # Länge des Amplifikationsproduktes zwischen 233 und 323 bp

#### **UT 762**

- # ( AAAG )<sub>n</sub> Tetranukleotidsequenz, Chromosom 21
- # Primer sense ( 5' A 3' )  
GTC AGT ATT ACC CTG TTA CCA
- # Primer antisense ( 5' A 3' )  
GTT GAG GAT TTT TGC ATC AGT
- # Länge des Amplifikationsproduktes ca. 290 bp

Alle drei Primerpaare wurden von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH hergestellt und gereinigt (HPLC). Die Konzentration betrug 100 pmol/ $\mu$ l.

## PCR-Ansatz

#	Unteres Kompartiment	10 µl
#	Oberes Kompartiment	15 µl
#	Paraffin	15-20 µl

Das autoklavierte und gereinigte Paraffin wurde im Wasserbad auf 85 °C erhitzt, so daß es im flüssigen Zustand auf das untere Kompartiment aufgeschichtet werden konnte. Nach der Abkühlung und der Aushärtung des Paraffins konnte das obere Kompartiment aufgefüllt werden. Tetramethylammoniumchlorid (TMAC 3 mol/l) wurde nur in PCR-Ansätzen zur Amplifikation des Mikrosatellitenlocus UT762 eingesetzt. Die verwendete Konzentration betrug 30 mmol/l. Tetramethylammoniumchlorid steigert die Ausbeute und die Spezifität des PCR-Produktes (105, 106). Der PCR-Ansatz wurde auf 25 µl Gesamtvolumen mit Aqua dest. und DNA-Probe (1-8 µl) aufgefüllt.

Das obere Kompartiment enthielt: Reaktionspuffer (60 % der eingesetzten Menge)  
Aqua dest.  
DNA-Probe

Das untere Kompartiment enthielt: Reaktionspuffer (40 % der eingesetzten Menge)  
Magnesium-Chlorid  
Primer (unmarkiert/antisense) und Primer (markiert/sense)  
dNTP-Mix  
Taq DNA Polymerase

Die verwendete Promega Taq DNA-Polymerase wurde isoliert aus *Thermus aquaticus* YT 1 (Promega Corporation, Madison, USA). Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Stammlösungen, eingesetzten Volumina und Endkonzentrationen im PCR-Reaktionsansatz.

**Tabelle 4**

### Zusammensetzung der PCR und eingesetzte Endkonzentrationen

Stammlösung	Volumen	Endkonzentration
Magnesium-Chlorid (MgCl <sub>2</sub> ) 25mmol/l	1,5 µl	1,5 mmol/l
10X Reaktionspuffer (Promega, MgCl <sub>2</sub> frei)	2,5 µl	1X Reaktionspuffer
Taq DNA Polymerase Promega B 5 u/µl	0,1 µl	0,02 u/µl
Primer (unmarkiert) 100 pmol/µl	0,5 µl	2 pmol/µl
Primer (markiert) 4 pmol/µl	1-2,5 µl	0,16-0,4 pmol/µl
dNTP-Mix 100 mmol/l	0,5 µl	2 mmol/l

### 3.7. Lyophilisation

Um die Konzentration der PCR-Produkte zu erhöhen, wurde nach Beendigung der PCR eine Lyophilisation vorgenommen. Ein wichtiger Arbeitsschritt in der Vorbereitung ist die sorgfältige Entfernung des Paraffins, da auch kleinere Rückstände eine vollständige Lyophilisation beeinträchtigen können. Das Paraffin bildet im gehärteten Zustand einen auf dem PCR-Produkt aufliegenden Block, welcher unter Verwendung einer Pipettenspitze entfernt werden kann. Eine vollständige Lyophilisation wurde nach 12 Stunden erreicht. Das Prinzip der Lyophilisation besteht darin, daß das Wasser in Form von Wasserdampf unter Vakuum entzogen wird. Das Vakuum wird mittels Saugpumpe erzeugt (Temperatureinstellung 37°C in der Zentrifuge, Modell Univapo 150 H).

### 3.8. Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Separation der PCR-Produkte wurde eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt (107). Die Vorlaufphase betrug eine Stunde, dabei wurden Temperaturen von 50°C bis 55°C erreicht. Bei 70 Watt Leistung war eine Laufzeit von 2,5 bis 5 Stunden notwendig, um eine gute Auftrennung der Amplifikationsprodukte zu erreichen.

#### Zusammensetzung des Gels: Ansatzvolumen 80 ml

#	8,0 ml	10 X Trisborat (0,9 mol/l) - EDTA (0,02 mol/l) - Puffer (TBE), (Endkonzentration 1 X TBE)
#	25,6 ml	Formamid (HCONH <sub>2</sub> ) Firma Merck®, (Endkonzentration 32 %)
#	14,0 ml	Acrylamidlösung 38 %, Bisacrylamid 2 % Firma Roth®, (Endkonzentration 7 %)
#	11,0 ml	Aqua dest.
#	26,9 g	Harnstoff (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Firma Roth®, (Endkonzentration 5,6 mol/l)
#	80,0 µl	Tetramethylethylendiamin (TEMED, C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ) Firma Sigma®
#	200 µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS) 25 % ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) Firma Roth®

Polyacrylamid entsteht durch radikalische Polymerisation von Acrylamid. Es bilden sich lineare Polyacrylamidfäden. Das N,N'-Methylenbisacrylamid ermöglicht eine Quervernetzung zu einem dreidimensionalen Maschenwerk. TEMED katalysiert die Bildung von Radikalen aus dem Ammoniumpersulfat, die wiederum die radikalische Kettenreaktion an den Acrylamid-Monomeren initiieren und dadurch die Polymerisationskette starten. Nach dem vollständigen Auflösen des Harnstoffes und der Zugabe von TEMED und APS wird die Lösung gefiltert. Um eine ausreichende Polymerisation zu erreichen, sollte vor der Benutzung des Gels mindestens eine Stunde abgewartet werden. Die Gelgröße betrug 42 x 34 cm. Nach der Vorwärmphase des Gels wurden alle vorgeformten Aufnahmeschlitze (slots) mit 1 X TBE gespült. Das maximale

Probenvolumen betrug 7-8 µl. Nicht benutzte Aufnahmeschlitze wurden mit Ladepuffer aufgefüllt.

### **Vorbereitung des lyophilisierten PCR-Produktes**

Der Ladepuffer bestand aus 1 X TBE (Trisborat 0,09 mol/l, EDTA 0,002 mol/l), Formamid, Glycerol, Xylene-Cyanol und Bromphenolblau. Das lyophilisierte PCR-Produkt wurde in 10 µl Ladepuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen wird eine Denaturierung der Doppelstrang-DNA durchgeführt (3 Minuten bei 95°C). Danach erfolgt ein sofortiges Kühlen mit Eiswasser. Zur Detektion wurden in der Regel für die Tumor- und Lymphozyten-DNA 0,5-3 µl aufgetragen, während bei den Serum-DNA-Proben oft die maximale Aufnahmekapazität der Gelschlitze genutzt werden mußte.

### **3.9. Waschen und Trocknung des Polyacrylamidgels**

Das Waschen des Gels dient der Entfernung des Formamids. Ein hoher Formamidanteil verhindert das Trocknen des Gels. Die Waschlösung setzt sich zusammen aus: 3,2 l Aqua dest., 600 ml Methanol (CH<sub>3</sub>OH >99,8 %) und 200 ml Essigsäure (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> >99,5 %). Der Waschvorgang sollte mindestens 15 Minuten andauern, darf aber nicht zu lange ausgedehnt werden, da sonst ein Verlust von DNA eintreten kann. Danach wurde das Gel auf ein vorgeschchnittenes Filterpapier transferiert, mit Saran-Folie abgedeckt und in den Gelrockner gelegt (Biorad Modell 583). Die Gelrocknung beansprucht mindestens eine Stunde bei 80°C.

### **3.10. Autoradiographie und Auswertungskriterien**

Nach der Gelrocknung wurde die Saranfolie entfernt. Zur Bestimmung der notwendigen Expositionszeit wurde die Zerfallsrate im Bereich der spezifischen Banden mit einem β-Detektor abschätzt. Zur Autoradiographie wurden Filmtaschen ohne Verstärkerfolien verwendet. Es wurden Monitorfilme der Größe 35,6 x 43,2 cm der Fotochemischen Werke GmbH benutzt. In der Regel waren Expositionszeiten von 12 bis 24 Stunden notwendig, in einzelnen Fällen aber auch bis zu einer Woche. Die Filmentwicklung erfolgte in einem Vollautomaten (Kodak). Die spezifischen Allelbanden der Tumor- und Serumproben wurden mit denen der Lymphozytenproben verglichen. Bei fehlenden oder überladenen Banden wurde der Versuch mit adaptierten Probenvolumina wiederholt und / oder die Expositionszeit verlängert bzw. verkürzt. Ergaben sich danach keine auswertbaren Ergebnisse, so wurde eine neue PCR mit adaptierten DNA-Probenmengen angesetzt.

## **Auswertung**

- # Ein LOH lag dann vor, wenn ein Allelsignal auf weniger als 50 % reduziert war oder vollständig verloren gegangen war
  
- # MIN lag vor, wenn eine zusätzliche Bande bzw. Banden im Bereich der spezifischen Allele auftraten oder wenn ein Verschieben (shift) eines Allelsignals nachweisbar war

Bandenlage und Allelsignalstärke der Tumor- und Serum-DNA wurden mit dem Bandenmuster der Lymphozyten-DNA verglichen, zusätzlich wurde der Vergleich beider Allelsignale innerhalb einer Probe als Kriterium herangezogen. Alle Analysen wurden visuell vorgenommen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Lyophilisation und Detektionsmethode**

Zahlreiche Vorversuche zur Evaluation der Detektionssensitivität von Färbungen mit Ethidiumbromid oder Silbernitrat zeigten, daß insbesondere der Nachweis von spezifischen PCR-Produkten aus den Serum- und Plasma-DNA-Proben mit einer nicht ausreichenden Nachweisempfindlichkeit verbunden war. Das Autoradiographieverfahren mit  $^{32}\text{P}$  ist den oben genannten Detektionsverfahren hinsichtlich der Sensitivität deutlich überlegen und wurde deshalb für alle Mikrosatellitenuntersuchungen benutzt. Ein weiterer Vorteil beinhaltet die Möglichkeit, durch variieren der Expositionszeiten eine bessere Abbildungsqualität der zu vergleichenden spezifischen Banden zu erreichen.

Bei einzelnen Proben, besonders waren Serum- und Plasmaproben betroffen, konnte durch die PCR keine ausreichende Menge an spezifischen Produkten für den Gelauftrag (max. 7-8  $\mu\text{l}$ ) gewonnen werden. Deshalb wurde nach Beendigung der PCR eine Lyophilisation durchgeführt, um eine Reduzierung des Endvolumens des PCR-Ansatzes zur Erhöhung der Konzentration des spezifischen PCR-Produktes zu erreichen. Das Anfangsvolumen von 35  $\mu\text{l}$  wurde durch die Lyophilisation und der nachfolgenden Zugabe von Ladepuffer auf 10  $\mu\text{l}$  reduziert. Durch die Lyophilisation konnte die Signalintensität der durch Autoradiographie nachgewiesenen spezifischen Banden erhöht werden.

### **4.2. Resultate der PCR-Optimierungsversuche**

#### **TMAC- und Magnesiumchloridkonzentration**

Die optimale TMAC-Konzentration für PCR-Ansätze mit dem Marker UT762 betrug 30 mmol/l.  $\text{MgCl}_2$  wurde nach Austestung in einer Konzentration von 1,5 mmol/l in allen PCR-Ansätzen eingesetzt. Es wurden weitere Zusätze zur Erhöhung der Spezifität und Ertragsausbeute der DNA-Polymerase getestet, wie BSA, DMSO, Glycerol, Formamid und Ammoniumsulfat. Keine der weiteren Zusätze verbesserte die Versuchsergebnisse. Vor allem BSA und Glycerol führen zur Beeinträchtigung des Lyophilisationsprozesses.

#### **Hybridisierungstemperatur und -zeit**

Für alle drei Mikrosatellitensonden wurde eine Temperaturspanne von 55-65°C (annealing-Temperatur in der PCR-Reaktion) ausgetestet. Eine Temperatur von 59°C erbrachte für alle drei Mikrosatellitensonden ein ausgewogenes Ergebnis. Die Verkürzung der Hybridisierungszeit von einer Minute auf bis zu 30 Sekunden erbrachte keine Vorteile, so daß die Hybridisierungszeit von einer Minute belassen wurde.

#### **Primerqualität**

Nach anfänglichen Qualitätsproblemen wurden nur noch HPLC-gereinigte Primer für die Untersuchungen eingesetzt.



### **Taq DNA-Polymerasen**

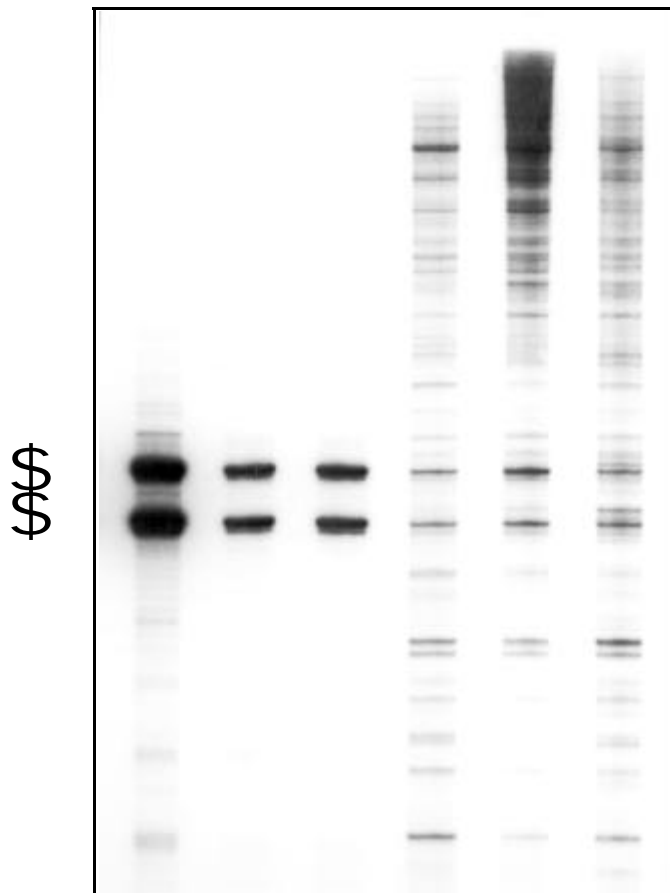
Es wurden insgesamt vier Taq DNA-Polymerasen unterschiedlicher Hersteller ausgetestet. Als Ergebnis kann zusammengefaßt werden, daß in dieser Untersuchung die Polymerase von Perkin Elmer weniger effektiv war im Vergleich zu den Polymerasen von Promega und Appligene. Im Vergleich der Enzyme von Appligene und Promega (in Lagerpuffer A und B), zeigte Promega B mit den eingesetzten Markern AR und ACTBP2 eine größere Ausbeute an spezifischen PCR-Produkten. Beim Marker UT762 war der Ertrag an spezifischen PCR-Produkten zwischen den Polymerasen von Appligene und Promega vergleichbar. Die beiden untersuchten Taq-Polymerasen von Promega unterscheiden sich in den unterschiedlichen Bestandteilen der Lagerpuffer (Bezeichnung A bzw. B). Aufgrund dieser Vorversuche wurde für die Mikrosatellitenuntersuchungen ausschließlich die Taq DNA-Polymerase von Promega im Lagerpuffer B benutzt.

Abbildung 1 zeigt exemplarisch den Vergleich der PCR-Produkte nach Amplifikation mit der Taq-Polymerase von Perkin Elmer und Promega B.

18 ng DNA aus Plasma-, Lymphozyten- und Tumorproben des gleichen Patienten, wurde für jeden PCR-Ansatz (Marker ACTBP2) eingesetzt. Das Ergebnis der Polyacrylamidgелеlektrophorese zeigte, daß die Taq-Polymerase von Promega B unter den Versuchsbedingungen (siehe unter Kapitel Material und Methoden) eine größere Spezifität besaß, was an den deutlich geringeren Anteil an unspezifischen Banden erkennbar war. Der Ertrag an spezifischer amplifizierter DNA war ebenfalls deutlich höher als in den Ansätzen mit der Taq-Polymerase von Perkin-Elmer.

**5**  
**(SCLC)**

**P L T P L T**



**ACTBP2**

**Abb. 1**

Patient 5 mit kleinzelligem Bronchialkarzinom. Von links nach rechts: Spur 1 bis 3 Amplifikationsprodukte der Taq-Polymerase von Promega, Spur 4 bis 6 Amplifikationsprodukte der Taq-Polymerase von Perkin Elmer. Der Mikrosatellitenlocus ACTBP2 wurde amplifiziert aus: P, Plasma-DNA; L, Lymphozyten-DNA; T, Tumor-DNA; Spezifische Banden, siehe Pfeile.

### 4.3. Kontrollgruppe

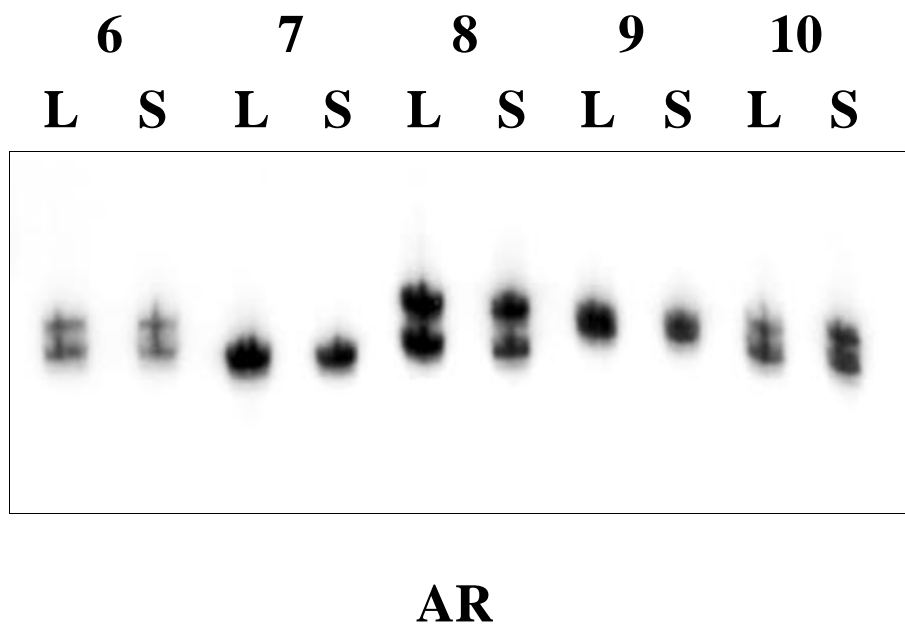
Bei keinem der zehn gesunden Probanden konnte eine Mikrosatellitenalteration (LOH und MIN) in den drei untersuchten Mikrosatellitenloci nachgewiesen werden. Die Kontrollgruppe setzt sich aus sechs Männern und vier Frauen zusammen. Der Altersmittelwert betrug 33,4 Jahre (Bereich 23-53). Untersucht wurden Blutlymphozyten- und Serum / Plasmaproben. Es gelang bei allen Proben der autoradiographische Nachweis spezifischer Banden in guter Abbildungsqualität. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse der Kontrollgruppe. Repräsentative Resultate der Mikrosatellitenanalyse sind in den Abbildungen 2, 3 und 4 dargestellt.

**Tabelle 5**

#### **Kontrollgruppe; Mikrosatellitenanalysen der Lymphozyten- und Serum / Plasma-DNA**

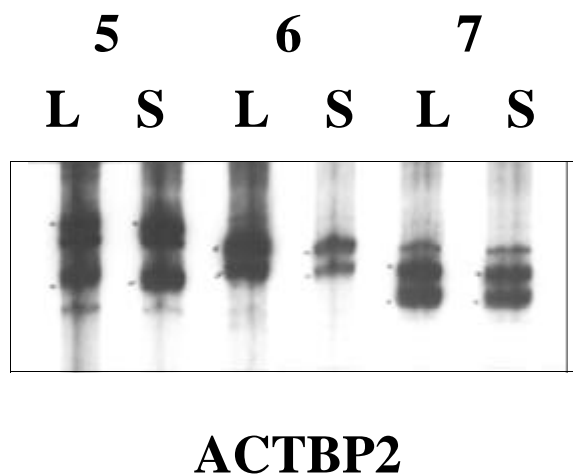
<b>Prob. Nr.</b>	<b>Alter [Jahre]</b>	<b>m/w</b>	<b>AR / ACTBP2 / UT762</b>
<b>1</b>	35	m	k. N. LOH/MIN
<b>2</b>	25	m	k. N. LOH/MIN
<b>3</b>	48	m	k. N. LOH/MIN
<b>4</b>	31	m	k. N. LOH/MIN
<b>5</b>	24	m	k. N. LOH/MIN
<b>6</b>	52	w	k. N. LOH/MIN
<b>7</b>	53	m	k. N. LOH/MIN
<b>8</b>	26	w	k. N. LOH/MIN
<b>9</b>	47	w	k. N. LOH/MIN
<b>10</b>	23	w	k. N. LOH/MIN

Abkürzungen: Prob., Proband; m, männlich; w, weiblich; k. N., kein Nachweis; LOH, Verlust der Heterozygotie; MIN, Mikrosatelliteninstabilität



**Abb. 2**

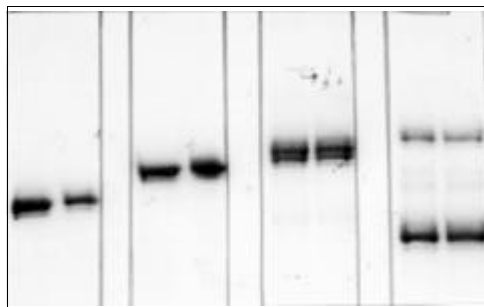
Probanden 6 - 10. Der Mikrosatellitenlocus AR wurde amplifiziert aus: L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA. Der Vergleich der spezifischen Banden zwischen Lymphozyten- und Serumprobe zeigt, daß keine Mikrosatellitenalterationen nachweisbar sind.



**Abb. 3**

Probanden 5 - 7. Der Mikrosatellitenlocus ACTBP2 wurde amplifiziert aus: L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA. Der Vergleich der spezifischen Banden zwischen Lymphozyten- und Serumprobe zeigt, daß keine Mikrosatellitenalterationen nachweisbar sind.

**6      7      8      9**  
**L S   L S   L S   L S**



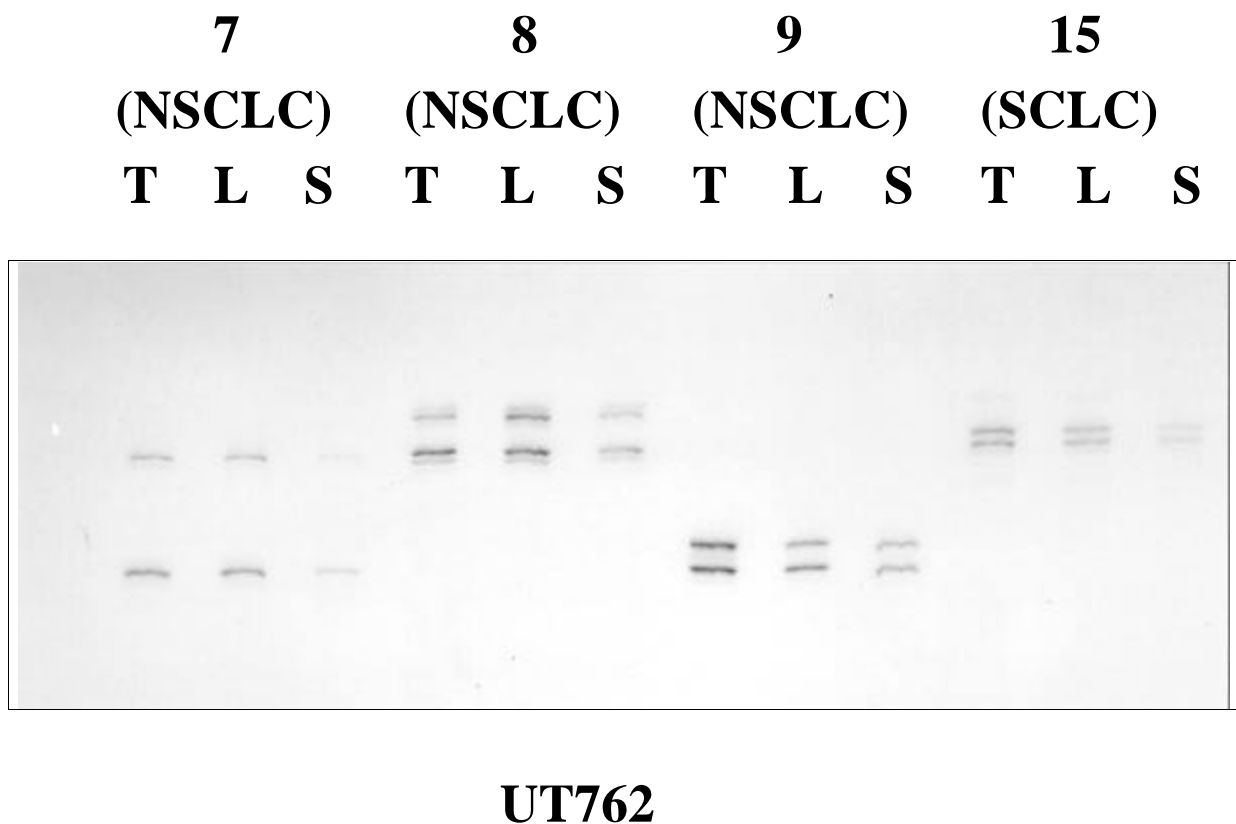
**UT762**

**Abb. 4**

Probanden 6 - 9. Der Mikrosatellitenlocus UT762 wurde amplifiziert aus: L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA. Der Vergleich der spezifischen Banden zwischen Lymphozyten- und Serumprobe zeigt, daß keine Mikrosatellitenalterationen nachweisbar sind.

#### 4.4. Untersuchungen von Mikrosatelliten ohne Alterationen in der DNA von Patienten mit kleinzelligem und nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom

Abbildung 5 dokumentiert repräsentativ einige Beispiele des amplifizierten Mikrosatellitenlocus UT762 ohne Nachweis einer Mikrosatellitenalteration in der Tumor-, Lymphozyten- und Serum-DNA von Patienten mit kleinzelligem oder nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom.



##### Abb. 5

Der Mikrosatellitenlocus UT762 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA. Der Vergleich der spezifischen Banden zwischen Tumor-, Lymphozyten- und Serumprobe (Pat. 7-9 (NSCLC) und Pat. 15 (SCLC)) zeigt, daß keine Mikrosatellitenalterationen nachweisbar sind.

#### **4.5. Mikrosatellitenalteration in der DNA von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom**

Es wurden sechzehn Patienten mit fortgeschrittenem kleinzelligem Bronchialkarzinom untersucht (Staging n = 16 (100 %) ED (extended disease)). Der Altersmittelwert betrug 62,7 Jahre (Bereich 43-76). Alle Patienten waren langjährige Raucher, der Mittelwert betrug 39 Packungsjahre (Bereich 10-80; n = 13).

Definition Packungsjahre: Tägliche Zigarettenkonsummenge angegeben in Packungen multipliziert mit der Anzahl der Jahre in denen geraucht wurde.

#### **Untersuchungsergebnis**

Bei fünf Patienten (31 %) konnten Veränderungen in mindestens einem Mikrosatellitenlocus nachgewiesen werden. Der Altersmittelwert bei den Patienten mit Veränderungen betrug 66,2 Jahre (Bereich 57-76), bei den Patienten ohne Mikrosatellitenalteration 61,1 Jahre (Bereich 43-76). In Tabelle 6 wird der Anteil der eingesetzten Marker bzw. Mikrosatellitenloci an den nachgewiesenen Alterationen dargestellt. Mit einem Anteil von 19 % war der Marker UT762 am häufigsten an positiven Befunden (LOH oder MIN) beteiligt.

**Tabelle 6**

#### **Nachweis von LOH / MIN; differenziert nach Markern**

<b>Entität</b>	<b>n</b>	<b>AR</b>		<b>ACTBP2</b>		<b>UT762</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>SCLC</b>	16	2	12.5	2	12.5	3	19

In der Tabelle 7 sind die untersuchten Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom aufgeführt und ihre klinischen Daten und die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen zusammengefasst.

Drei Patienten (Nr. 1, 10 und 13) zeigten eine Mikrosatelliteninstabilität (19 %), zwei Patienten (Nr. 3 und 12) dagegen einen Verlust der Heterozygotie (13 %). Zwei Patienten (Nr. 10 und 12) hatten in mehr als einem Mikrosatellitenlocus eine Alteration. Bei zwei (Nr. 3 und 12) von fünf Patienten mit Veränderungen, gelang der identische Nachweis einer Alteration in der Tumor- und Serumprobe.

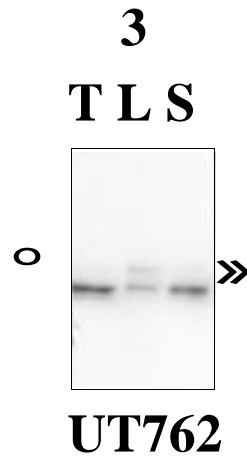
Die Abbildungen 6 bis 11 zeigen eine Auswahl an Mikrosatellitenveränderungen in den untersuchten Proben.

**Tabelle 7 Klinische Daten und Mikrosatellitenanalysen bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom**

Pat. Nr.	Alter [Jahre]	m/w	Raucher	py	Staging	AR		ACTBP2		UT762	
						Tumor	Serum	Tumor	Serum	Tumor	Serum
1*	72	m	ja	20	ED	MIN	-	-	-	-	-
2*	55	m	ja	k. A.	ED	-	-	-	-	-	-
3	57	m	ja	35	ED	-	-	-	-	LOH	LOH
4 <sup>m</sup>	51	w	ja	30	ED	-	-	-	-	-	-
5	76	w	ja	k. A.	ED	-	-	-	-	-	-
6	59	w	ja	40	ED	-	-	-	-	-	-
7	69	m	ja	10	ED	-	-	-	-	-	-
8	76	m	ja	26	ED	-	-	-	-	-	-
9	63	m	ja	45	ED	-	-	-	-	-	-
10	76	m	ja	k. A.	ED	-	MIN	-	-	-	MIN
11	59	m	ja	40	ED	-	-	-	-	-	-
12	67	m	ja	60	ED	-	-	LOH	LOH	LOH	-
13	59	m	ja	30	ED	-	-	-	MIN	-	-
14	43	m	ja	20	ED	-	-	-	-	-	-
15	65	m	ja	75	ED	-	-	-	-	-	-
16	56	m	ja	80	ED	-	-	-	-	-	-

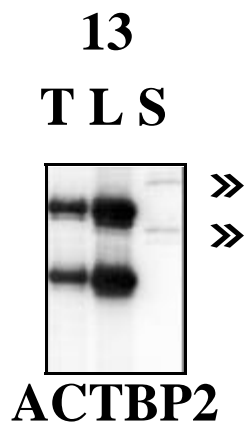
Abkürzungen: Pat., Patienten; \*In Paraffin eingebettete Tumorprobe; <sup>m</sup> Lymphknotenmetastase; m, männlich; w, weiblich; py, Packungsjahre; ED, extended disease; LOH, Verlust der Heterozygotie; MIN, Mikrosatelliteninstabilität; k. A., keine Angaben





**Abb. 6**

Patient 3 (SCLC) zeigt einen Verlust der Heterozygotie in der Tumor- und Serum-DNA. Der Mikrosatellitenlocus UT762 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA. Der Vergleich zwischen den spezifischen Banden der Tumor-, Lymphozyten- und Serumprobe zeigt eine deutlich schwächere Signalintensität der oberen Banden der Tumor- und Serum-DNA (siehe Pfeile).



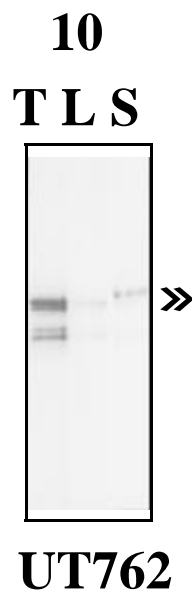
**Abb. 7**

Patient 13 (SCLC) zeigt eine Expansion beider Allele in der Serum-DNA (siehe Pfeile). Der Mikrosatellitenlocus ACTBP2 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



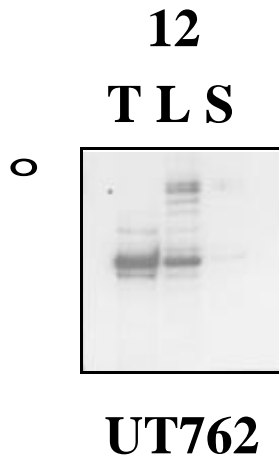
**Abb. 8**

Patient 10 (SCLC) zeigt eine Kontraktion des amplifizierten Mikrosatellitenlocus in der Serum-DNA (siehe Pfeil). Der Mikrosatellitenlocus AR wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



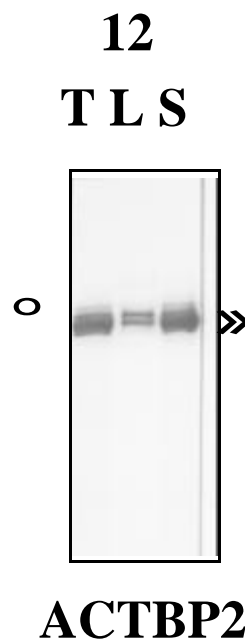
**Abb. 9**

Patient 10 (SCLC) zeigt eine zusätzliche Bande in der Serum-DNA (siehe Pfeil). Der Mikrosatellitenlocus UT762 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



**Abb. 10**

Patient 12 (SCLC) zeigt ein LOH in der Tumor-DNA. Die in der Lymphozyten- und Serum-DNA vorhandene obere Bande fehlt in der Tumor-DNA. Der Mikrosatellitenlocus UT762 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



**Abb. 11**

Patient 12 (SCLC) zeigt einen Verlust der Heterozygotie in der Tumor- und Serum-DNA. Die oberen Banden der Tumor- und Serum-DNA haben eine deutlich geringere Signalintensität als die unteren Banden der gleichen Spur. Die beiden Banden der Lymphozyten-DNA zeigen dagegen eine gleich starke Signalintensität. Der Mikrosatellitenlocus ACTBP2 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.

#### 4.6. Mikrosatellitenalteration in der DNA von Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom

Es wurden 27 Patienten (24 Männer und 3 Frauen) mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom untersucht. Der Altersmittelwert betrug 62,8 Jahre (Bereich 39-76). 21 Patienten (78 %) waren Raucher und eine Patientin Nichtraucherin. Bei fünf Patienten (18 %) waren keine anamnestischen Angaben zum Raucherstatus zu ermitteln. Der Packungsjahremittelwert betrug 43 (Bereich 15-60; n = 21).

##### Untersuchungsergebnis

Bei neun Patienten (33 %) konnten Veränderungen in mindestens einem Mikrosatellitenlocus nachgewiesen werden. Der Altersmittelwert bei den Patienten mit Veränderungen betrug 63,5 Jahre (Bereich 39-71). Der Altersmittelwert bei den Patienten ohne Veränderungen betrug 62,4 Jahre (Bereich 41-73). In Tabelle 8 wird der Anteil der eingesetzten Marker bzw. Mikrosatellitenloci an den nachgewiesenen Alterationen dargestellt. Mit einem Anteil von 15 % war der Marker UT762 am häufigsten an positiven Befunden (LOH oder MIN) beteiligt.

**Tabelle 8**

#### Nachweis von LOH/MIN; differenziert nach Markern

Entität	n	AR		ACTBP2		UT762	
		n	%	n	%	n	%
NSCLC	27	3	11	3	11	4	15

In den Tabellen 9a und 9b sind die untersuchten Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom aufgeführt und ihre klinischen Daten und die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen dargestellt.

Sechs Patienten (Nr. 4, 6, 11, 13, 15, und 17) zeigten eine Mikrosatelliteninstabilität (22 %) und vier Patienten (Nr. 4, 20, 23 und 26) einen Verlust der Heterozygotie (15 %). Ein Patient (Nr. 4) zeigte eine MIN in der Tumorprobe (Marker AR) und ein LOH in der Tumor- und Serumprobe (Marker UT762). Bei 7 von 9 Patienten (78 %) gelang der identische Nachweis einer Alteration in der Tumor- und Serumprobe. Zwei Patienten (Nr. 11 und 17) zeigten eine MIN in der Serumprobe, nicht dagegen in der Tumorprobe.

Die Abbildungen 12 bis 21 zeigen eine Auswahl an Mikrosatellitenveränderungen in den untersuchten Proben.

**Tabelle 9a Klinische Daten und Mikrosatellitenanalysen bei Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom**

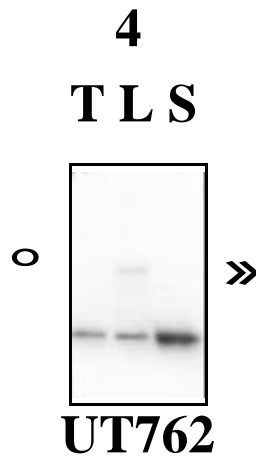
Pat. Nr.	Alter [Jahre]	m/w	Raucher	py	Histologie	Staging	G	AR		ACTBP2		UT762	
								Tumor	Serum	Tumor	Serum	Tumor	Serum
1*	76	m	k. A.	k. A.	SCC	T4 N2 M0	3	-	-	-	-	-	-
2*	69	w	k. A.	k. A.	AC	T2 N1 Mx	2	-	-	-	-	-	-
3*	57	m	ja	60	AC	T2 N0 M0	3	-	-	-	-	-	-
4*	69	m	k. A.	k. A.	AC	T3 N0 M0	3	MIN	-	-	-	LOH	LOH
5*	63	m	k. A.	k. A.	AC	T2 N0 M1	1	-	-	-	-	-	-
6*	39	w	k. A.	k. A.	AC	T2 N0 M1	1	-	-	-	-	MIN	MIN
7	54	w	nein	0	AC	T4 N0 M0	3	-	-	-	-	-	-
8	73	m	ja	50	SCC	T2 N2 M0	2	-	-	-	-	-	-
9	65	m	ja	20	SCC	T2 N0 M0	2-3	-	-	-	-	-	-
10	67	m	ja	15	SCC	II	2	-	-	-	-	-	-
11	68	m	ja	60	LCC	III a	2	-	-	-	-	-	MIN
12	45	m	ja	60	LCC	III a	1	-	-	-	-	-	-
13	61	m	ja	40	SCC	IV	2	MIN	MIN	-	-	-	-
14	69	m	ja	50	SCC	k. A.	k. A.	-	-	-	-	-	-

Abkürzungen: Pat., Patienten; \*In Paraffin eingebettete Tumorprobe; m, männlich; w, weiblich; py, Packungsjahre; SCC, Plattenepithelkarzinom; AC, Adenokarzinom; LCC, großzelliges Karzinom; Staging nach UICC/AJCC; G, grading; LOH, Verlust der Heterozygotie; MIN, Mikrosatelliteninstabilität; k. A.; keine Angaben

**Tabelle 9b Klinische Daten und Mikrosatellitenanalysen bei Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom**

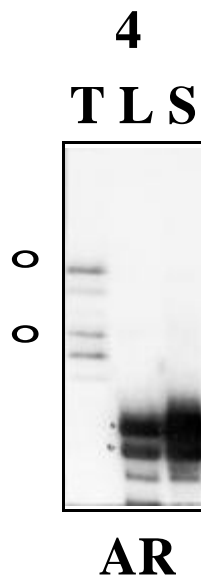
Pat. Nr.	Alter [Jahre]	m/w	Raucher	py	Histologie	Staging	G	AR		ACTBP2		UT762	
								Tumor	Serum	Tumor	Serum	Tumor	Serum
15	63	m	ja	30	AC	III b	2	MIN	MIN	-	-	-	-
16	66	m	ja	30	SCC	III a	2	-	-	-	-	-	-
17	67	m	ja	45	SCC	III b	2	-	-	-	MIN	-	-
18	58	m	ja	60	SCC	IV	2	-	-	-	-	-	-
19	41	m	ja	60	LCC	IV	2	-	-	-	-	-	-
20	68	m	ja	40	SCC	III b	2	-	-	-	-	-	-
21	68	m	ja	40	SCC	IV	2	-	-	LOH	LOH	-	-
22	59	m	ja	40	SCC	IV	2	-	-	-	-	-	-
23	66	m	ja	30	LCC	IV	2	-	-	LOH	LOH	-	-
24	60	m	ja	40	SCC	IV	2	-	-	-	-	-	-
25	66	m	ja	53	SCC	k. A.	2	-	-	-	-	-	-
26	71	m	ja	30	SCC	T2N1M0	2	-	-	-	-	LOH	LOH
27	68	m	ja	50	SCC	T2N3M0	2	-	-	-	-	-	-

Abkürzungen: Pat., Patienten; m, männlich; w, weiblich; py, Packungsjahre; SCC, Plattenepithelkarzinom; AC, Adenokarzinom; LCC, großzelliges Karzinom; Staging nach UICC/AJCC; G, grading; LOH, Verlust der Heterozygotie; MIN, Mikrosatelliteninstabilität; k. A.; keine Angaben



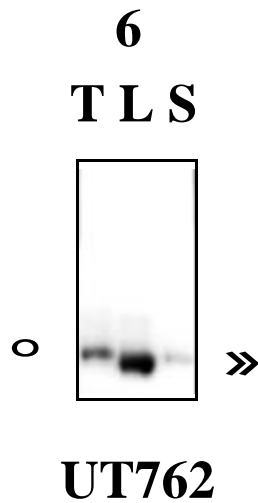
**Abb. 12**

Patient 4 (NSCLC) zeigt einen Verlust der Heterozygotie in der Tumor- und Serum-DNA. Der Vergleich zwischen den spezifischen Bandenmustern der Tumor-, Lymphozyten- und Serum-DNA läßt das Fehlen der oberen Bande in der Tumor- und Serum-DNA erkennen (siehe Pfeile). Der Mikrosatellitenlocus UT762 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



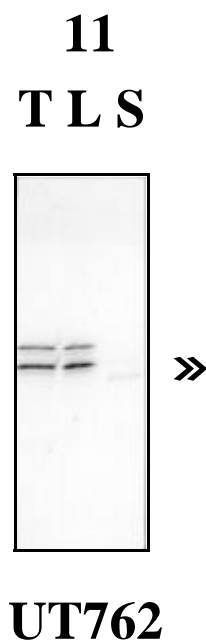
**Abb. 13**

Patient 4 (NSCLC) zeigt eine Expansion des amplifizierten Mikrosatellitenlocus in der Tumor-DNA (siehe Pfeile). Der Mikrosatellitenlocus AR wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



**Abb. 14**

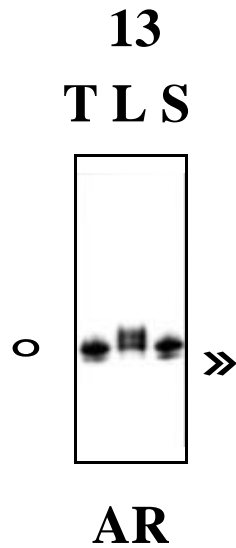
Patient 6 (NSCLC) zeigt eine Expansion des amplifizierten Mikrosatellitenlocus UT762 in der Tumor- und Serum-DNA. Der Mikrosatellitenlocus UT762 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



**Abb. 15**

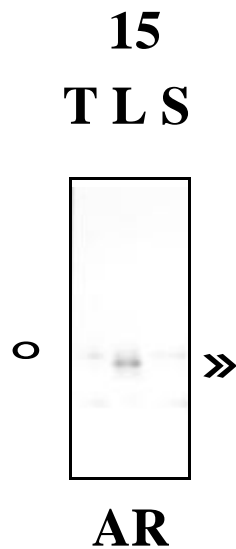
Patient 11 (NSCLC) zeigt eine Kontraktion eines Allels in der Serum-DNA (siehe Pfeil). Der Mikrosatellitenlocus UT762 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.





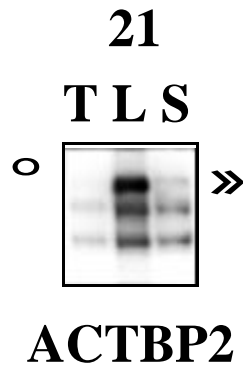
**Abb. 16**

Patient 13 (NSCLC) zeigt eine Kontraktion des amplifizierten Mikrosatellitenlocus AR in der Tumor- und Serum-DNA. Der Mikrosatellitenlocus AR wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



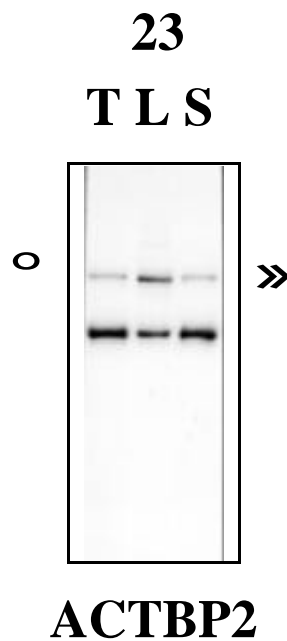
**Abb. 17**

Patient 15 (NSCLC) zeigt eine Expansion des amplifizierten Mikrosatellitenlocus AR in der Tumor- und Serum-DNA (siehe Pfeile). Der Mikrosatellitenlocus AR wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



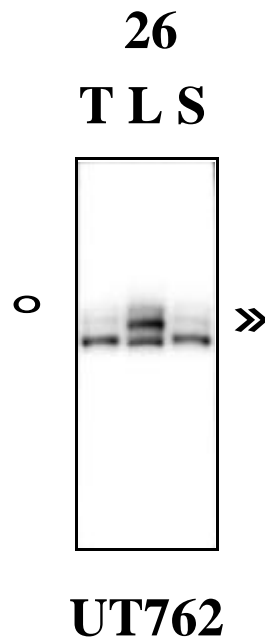
**Abb. 18**

Patient 21 (NSCLC) zeigt einen Verlust der Heterozygotie in der Tumor- und Serum-DNA. Der Vergleich zwischen den Bandenmustern der amplifizierten Tumor-, Lymphozyten- und Serum-DNA läßt eine reduzierte Signalintensität in den oberen Banden der Tumor- und Serumprobe (siehe Pfeil) erkennen. Der Mikrosatellitenlocus ACTBP2 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



**Abb. 19**

Patient 23 (NSCLC) zeigt einen Verlust der Heterozygotie in der Tumor- und Serum-DNA. Der Vergleich zwischen den Bandenmustern der amplifizierter Tumor-, Lymphozyten- und Serum-DNA läßt eine reduzierte Signalintensität in den oberen Banden der Tumor- und Serum-DNA (siehe Pfeil) erkennen. Der Mikrosatellitenlocus ACTBP2 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.



**Abb. 20**

Patient 26 (NSCLC) zeigt einen Verlust der Heterozygotie in der Tumor- und Serum-DNA. Der Vergleich zwischen den Bandenmustern der amplifizierter Tumor-, Lymphozyten- und Serum-DNA läßt eine reduzierte Signalintensität in den oberen Banden der Tumor- und Serum-DNA (siehe Pfeil) erkennen. Der Mikrosatellitenlocus UT762 wurde amplifiziert aus: T, Tumor-DNA; L, Lymphozyten-DNA; S, Serum-DNA.

#### 4.6.1. NSCLC-Tumorstadium und histologische Klassifizierung

Eine statistisch prüfbare Aussage über den möglichen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Mikrosatellitenalterationen und den Kriterien NSCLC-Tumorstadium und histologische Klassifizierung ist aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich bzw. nicht sinnvoll. Von den siebenundzwanzig untersuchten Patienten hatten sieben ein Adenokarzinom, sechzehn ein Plattenepithelkarzinom und vier ein großzelliges Karzinom.

Insgesamt zeigten

# 3 von 7 Patienten (43 %) mit einem Adenokarzinom (AC),

# 4 von 16 Patienten (25 %) mit einem Plattenepithelkarzinom (SCC) und

# 2 von 4 Patienten (50 %) mit einem großzelligem Karzinom (LCC)

in mindestens einem Mikrosatellitenlocus eine MIN und/oder ein LOH.

Das Ergebnis zeigt einen höheren prozentualen Anteil von Mikrosatellitenalterationen bei den untersuchten Patienten, die an einem Adenokarzinom oder an einem großzelligem Karzinom erkrankt waren. Die Beziehung zwischen der histologischen Subklassifizierung und dem Nachweis von Mikrosatellitenalterationen in den drei untersuchten Mikrosatellitenloci wird in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10**

#### **Der Nachweis von LOH / MIN, differenziert nach Markern und NSCLC-Entitäten**

Entität	n	%	AR		ACTBP2		UT762	
			n	%	n	%	n	%
AC	7	26	2	29	0	0	2	29
SCC	16	59	1	6	2	12,5	1	6
LCC	4	15	0	0	1	25	1	25
NSCLC	27	100						

Abkürzungen: AC, Adenokarzinom; SCC, Plattenepithelkarzinom; LCC, großzelliges Karzinom; NSCLC, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom

Am häufigsten konnten im Tumorstadien III a und IV eine Veränderung nachgewiesen werden. Im Stadium I zeigte sich an den bei uns untersuchten Patienten keine Veränderung der untersuchten Mikrosatellitenloci. Aufgrund der sehr niedrigen Fallzahl sind keine statistischen Aussagen möglich. Für zwei Patienten (14 und 25) ohne nachgewiesenem LOH / MIN in den untersuchten DNA-Proben, fehlten Angaben zum Tumorstadium. Tabelle 11 gibt einen Überblick.

**Tabelle 11**

**NSCLC: Tumorstadienverteilung und  
Nachweis von Mikrosatellitenalterationen**

<b>3</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>IIIa</b>	<b>IIIb</b>	<b>IV</b>
<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>25 (100)</b>	2 (8)	3 (12)	5 (20)	6 (24)	9 (36)
<b>MIN/LOH</b>	0 (0)	1 (33)	2 (40)	2 (33)	4 (44)

Die unterste Reihe zeigt die Verteilung der Mikrosatellitenalterationen in Beziehung zum Tumorstadium nach UICC/AJCC.

**4.7. Ergebniszusammenfassung**

Die Mikrosatellitenuntersuchung an 43 Patienten mit Bronchialkarzinom ergab, daß vierzehn Patienten (33 %) eine Mikrosatellitenalteration aufwiesen. Fünf von sechzehn Patienten (31 %) mit kleinzelligem Bronchialkarzinom zeigten eine Alteration. Unterteilt nach Art der Mikrosatellitenalteration zeigten 19 % eine MIN und 13 % ein LOH. Neun von siebenzwanzig Patienten (33%) mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom zeigten eine Alteration. Unterteilt nach Art der Mikrosatellitenalteration zeigten 22 % eine MIN und 15 % ein LOH.

## 5. Diskussion

An *E. coli* Mutanten mit *mutL*- und *mutS*-Gendefekten konnte gezeigt werden, daß Fehler während der Replikation gehäuft im Bereich von CA/TG-Wiederholungssequenzen auftraten (Leserasterverschiebungen) (43). Auch Mutationen in den für das Mismatch-Reparatursystem in *S. cerevisiae* verantwortlichen Genen (*PMS1*, *MLH1* und *MSH2*) führen zu einem Ansteigen der Instabilität in GT-repetitiven Sequenzen (44). Diese Ergebnisse zeigen, daß Störungen in der Funktion des Mismatch-Reparatursystems oder der postreplikativen DNA-Reparatur zu einem Ansteigen der Instabilität von Mikrosatelliten führen können. Beim HNPCC-Syndrom konnte erstmalig gezeigt werden, daß Mutationen von Genen, die für das DNA-Reparatursystem eine wichtige Funktion besitzen (*hMLH1*, *hMSH2*, *hPMH1* und *hPMH2*), bei der Entstehung dieser Erkrankung eine herausragende Rolle spielen. Die durch die Mutation beider Allele eines Gens des DNA-Reparatursystems verursachte Mikrosatelliteninstabilität reflektiert einen Mutatorphänotyp, d. h. Mutationen in bestimmten Genen (z. B. DNA-Reparaturgene) verursachen ein Anwachsen der Mutationsfrequenz im gesamten Genom und initiieren eine Kaskade von weiteren Mutationen, was letztendlich zu einer größeren genomischen Instabilität führt (60). Eine Mikrosatelliteninstabilität konnte bei fast 90 % der Fälle mit HNPCC-Syndrom in der DNA von Tumorzellen nachgewiesen werden (48). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß der Ausgangspunkt dieser Erkrankung eine Keimbahnmutation in einem der verantwortlichen Gene für das DNA-Reparatursystem ist, und daß der Erwerb einer somatischen Mutation im zweiten Allel des betroffenen Gens zur genomischen Instabilität führt. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, daß weitere erworbene Mutationen durch das ineffektive DNA-Reparatursystem nicht mehr oder nicht vollständig beseitigt werden, so daß es zur Akkumulation von DNA-Schädigungen im Genom kommt, die zur neoplastischen Transformation der betroffenen Zellen führen können. Sind dabei Gene betroffen, die Proteine kodieren, welche eine wichtige Stellung in der Zellzyklusregulation, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation oder der Signaltransduktion einnehmen, kann dies zur Krebsentstehung mit beitragen (8-10,108). Das gehäufte Auftreten von Kolonkarzinomen und anderen, mit dem HNPCC-Syndrom assoziierten Tumoren, vor dem fünfzigsten Lebensjahr demonstriert den Stellenwert des DNA-Reparatursystems in der Erhaltung der genomischen Stabilität. Das Phänomen Mikrosatelliteninstabilität wurde auch in zahlreichen Untersuchungen bei unterschiedlichen sporadischen Tumorentitäten nachgewiesen. Im Gegensatz zum hohen Anteil von Mikrosatelliteninstabilität beim HNPCC-Syndrom zeigen sporadische kolorektale Tumore in nur ca. 17 % eine Mikrosatelliteninstabilität (76). Karzinome der Organe des weiblichen Reproduktionsapparates (Endometrium-, Zervix-, Ovarial- und Mammakarzinom) zeigen ebenfalls nur in 6 bis 30 % der untersuchten Fälle eine Mikrosatelliteninstabilität (72- 76). Tumore des Gastrointestinaltraktes (Oesophagus- und Magenkarzinome) hatten in bis zu 33 % eine Mikrosatelliteninstabilität (68, 69, 76).

Die Bedeutung der Mikrosatelliteninstabilität in der Pathogenese sporadischer Tumor-

erkrankungen und die Ursache der Entstehung einer Mikrosatelliteninstabilität bei sporadischen Tumoren ist bisher nicht ausreichend geklärt (61-64). Eine Mutation in den für die DNA-Reparatursysteme verantwortlichen Genen, in Analogie zur Situation beim HNPCC-Syndrom, wurde bisher nur in einem geringen Anteil sporadischer kolorektaler Tumore mit MIN nachgewiesen, so daß zu vermuten ist, daß zusätzlich noch andere, bisher unbekannt pathogenetische Mechanismen, zur Entstehung einer Mikrosatelliteninstabilität beitragen (62). Mikrosatellitenalterationen (MIN und LOH) stellen per se Mutationen dar. Durch die neoplastische Transformation kann eine monoklonale Expansion der Zelle ausgelöst werden, so daß eine vorhandene Mikrosatellitenalteration auf den entstehenden Klon nachweisbar ist. Deswegen ist der Nachweis von Mikrosatellitenalterationen (LOH und MIN) aus der DNA von histopathologischen Proben gleichzusetzen mit dem Nachweis von neoplastischen Zellpopulationen, die möglicherweise als neue Marker zur Krebserkennung dienen könnten (79). Andererseits konnten Mikrosatelliteninstabilitäten auch in nichtmalignen oder prämaligen Geweben nachgewiesen werden. So wurden im sezerniertem Pancreassaft von Patienten mit Pancreatitis von Brenntnall et al. (77) in allen untersuchten Proben eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen. Brenntnall et al. diskutieren die Möglichkeit einer Übersättigung des DNA-Mismatch-Reparaturenzymsystems durch den bei entzündlichen Erkrankungen nachgewiesenen Anfall von hochreaktiven und mutagen wirkenden Radikalen. Die mit einer akuten oder chronischen Pancreatitis assoziierte Bildung von Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale verursachen oxidative DNA-Schäden. So kann unter oxidativem Stress eine hohe Anzahl von DNA-Schädigungen entstehen, deren Korrektur zu einer Übersättigung des intakten DNA-Reparatursystems führen kann. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß es sich tatsächlich um neoplastische Zellen eines okkulten Pancreaskarzinoms mit Mikrosatellitenalterationen handelt. In einer weiteren Arbeit der gleichen Erstautorin (78) waren in 46 bis 50 % der untersuchten Proben von Patienten mit Colitis ulcerosa Mikrosatellitenalterationen nachweisbar. Diese Veränderungen sind jedoch nicht in den Proben von Patienten mit ischämischer und infektiöser Kolitis nachweisbar gewesen. Die Autoren spekulieren, daß die chronische Entzündung bei Colitis ulcerosa ebenfalls zu einer Übersättigung des DNA-Reparatursystems führt und als Folge eine Akkumulation von Mutationen in den betroffenen Zellen entsteht. Diese Daten deuten daraufhin, daß der Nachweis einer Mikrosatellitenalteration nicht ausschließlich tumorspezifisch erscheint. Andererseits gilt die Colitis ulcerosa als prädisponierend für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms, so daß der Nachweis von MIN eine möglicherweise prognostische Bedeutung besitzen könnte. Die bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Studien geben darauf allerdings keine Antwort, so daß die Bedeutung von MIN bei entzündlichen Erkrankungen ungelöst bleibt.

Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom wurde in drei wichtigen Untersuchungen eine Mikrosatelliteninstabilität in 45 bis 52 % der untersuchten Tumorproben nachgewiesen (79-81). Auch beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom wurden in den letzten Jahren eine größere Anzahl von Studien zur Mikrosatelliteninstabilität durchgeführt (79,83-95). In 14 Studien aus

den Jahren 1994 bis 1998 wurden insgesamt 779 Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom untersucht. Bei 154 Patienten (20 %) konnte eine Mikrosatelliteninstabilität in den untersuchten Tumorproben nachgewiesen werden. In den Einzelstudienresultaten lag der Anteil an nachgewiesener Mikrosatelliteninstabilität zwischen 0 und 67 %. Die große Differenz der Einzelstudienresultate ist möglicherweise durch die erhebliche Varianz der Anzahl der untersuchten Fälle, der Anzahl und Art der eingesetzten Mikrosatellitenmarker und der Lokalisation der untersuchten Mikrosatellitensequenzen zu erklären.

Auch die Patienteneinschlusskriterien scheinen einen Einfluß auf die Anzahl von untersuchten Tumorproben mit nachgewiesener Mikrosatelliteninstabilität zu haben. So verglichen Sekine et al. (85) 18 NSCLC-Tumorproben von Patienten, die sich einer chirurgischen Therapie unterzogen hatten und jünger als 40 Jahre waren mit 9 NSCLC-Tumorproben von Patienten im Alter von über 60 Jahren. Dabei konnte gezeigt werden, daß in der Gruppe der unter Vierzigjährigen 39 %, in der Gruppe der über Sechzigjährigen 11 % eine Mikrosatelliteninstabilität aufwiesen. Zusätzlich konnte festgestellt werden, daß bei der Gruppe der jüngeren Patienten mit MIN, wesentlich häufiger mehrere Mikrosatellitenloci (bei fünf Patienten über die Hälfte der untersuchten Mikrosatellitenloci, 6 Marker) von Veränderungen betroffen waren. Sekine et al. diskutierten eine mögliche Beeinträchtigung des DNA-Reparatursystems bei den jüngeren Patienten, die eine hohe Mikrosatelliteninstabilitätsfrequenz, ähnlich der Frequenz von Mikrosatelliteninstabilität bei der Mehrzahl der Patienten mit HNPCC-Syndrom, aufwiesen. Sie vermuteten, daß es eher genetische Faktoren als Umwelteinflüsse sind, die das Auftreten von Bronchialkarzinomen bei jüngeren Erwachsenen determinieren.

Suzuki et al. (86) unterteilten in ihrer Studie die Untersuchungsgruppe nach folgendem Kriterium: In der einen Gruppe wurden 9 Patientinnen mit NSCLC eingeschlossen, die mindestens 3 Verwandte ersten Grades mit Krebserkrankungen in der Familienanamnese besaßen, in die andere Gruppe 28 Patientinnen ohne Verwandte mit Krebserkrankungen. 6 / 9 (67 %) der erstgenannten Gruppe und 5/28 (18 %) der zweiten Gruppe zeigten in den untersuchten Tumorproben eine Mikrosatelliteninstabilität ( $p=0,01$ ). Suzuki et al. berichteten, daß ein vermuteter genetischer Mechanismus, der die Verbindung zwischen familiärer Häufung von Malignomerkrankungen und dem Auftreten von Mikrosatelliteninstabilitäten erklären könnte, bisher nicht nachgewiesen ist.

In den Untersuchungen von Ryberg et al. (88) wurde eine Mikrosatelliteninstabilität häufiger bei Patienten unter 50 Jahre (38 %) als bei älteren Patienten (19 %) ( $p=0,051$ ) nachgewiesen. In der Mehrzahl der Untersuchungen zur Mikrosatelliteninstabilität bei Bronchialkarzinomen konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter zwischen MIN-positiver und MIN-negativer Gruppen festgestellt werden.

Auch der Aufbau der untersuchten repetitiven Sequenz hat einen Einfluß auf die Höhe der nachgewiesenen Mikrosatelliteninstabilität. So konnten Mao et al. (79) nur in 0,7 % der untersuchten Fälle eine MIN unter dem ausschließlichen Einsatz von Markern für Dinukleotidwiederholungssequenzen nachweisen. In der Untersuchung wurden über 300 Tumorproben,



einschließlich SCLC, NSCLC, Urothelkarzinome und Basalzell- und Plattenepithelkarzinome der Haut untersucht. Im Gegensatz dazu konnte unter dem Einsatz von Markern für Tri- und Tetranukleotidwiederholungssequenzen beim kleinzelligen Bronchialkarzinom eine Mikrosatelliteninstabilität von 50 % nachgewiesen werden. Die Anzahl der eingesetzten Mikrosatellitenmarker erhöht nicht zwangsläufig die Rate der nachgewiesenen Mikrosatelliteninstabilität. So konnten zwar Gleeson et al. (68) unter dem Einsatz von 139 Markern bei der Untersuchung von 17 Oesophaguskarzinomproben in allen Fällen eine MIN nachweisen, aber eine Studie von Reisinger et al. (72) ergab unter dem Einsatz von 71 Markern in der Untersuchung von 36 Endometriumkarzinomen nur eine Rate von 17 % MIN. Auch die Daten zur Untersuchung von Mikrosatelliteninstabilität beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom bestätigen diesen Sachverhalt (83, 90). Eine mögliche Schlußfolgerung wäre, daß Mutationen in den Mikrosatelliten bei sporadischen Tumorerkrankungen nicht gleichmäßig über das Genom verteilt vorhanden sind, sondern bestimmte chromosomale Abschnitte bevorzugt werden. Beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom konnten Pifarré et al. (90) eine relativ hohe Rate von 66 % MIN in den untersuchten Abschnitten 2p und 3p nachweisen.

### **Der Einfluß der Materialgewinnung und Aufarbeitung von Untersuchungsproben auf den Nachweis von Mikrosatellitenalterationen**

LOH-Untersuchungen erfordern einen Mindestanteil (50 %) an Tumorzellen in den zu untersuchenden Proben, während eine Mikrosatelliteninstabilität auch bei einem kleineren Tumorzellanteil nachweisbar bleibt. In der Studie von Mao et al. (79) wurden zur Frage der Sensitivität ihrer verwendeten Methode Verdünnungsreihen durchgeführt. Eine in den Tumor-DNA nachgewiesene neue Allelbande (shift) konnte bei Verdünnung mit der entsprechenden Lymphozyten-DNA noch in einer Verdünnungsstufe von 1 zu 200 bzw. 1 zu 1000 nachgewiesen werden, d. h. das mit dieser Methode potentiell eine neoplastische Zelle unter 200-1000 Normalzellen detektierbar ist. Die Mikrodissektion von Tumorzellverbänden aus den histologisch gewonnenen Präparaten ist eine Möglichkeit den Anteil von Nichttumorzellen zu reduzieren und damit die Sensitivität des Nachweises von Mikrosatellitenalterationen zu verbessern. Die Untersuchung von Serum- und Plasma-DNA zum Nachweis von Mikrosatellitenalterationen läßt diese Möglichkeit natürlicherweise nicht zu. Damit der Anteil an DNA aus nicht neoplastischen Zellen möglichst gering gehalten wird, ist auf eine sorgfältige Präparation der Serum- und Plasmaproben zu achten. Blutzellen sollten sich nicht mehr in den verwendeten Proben befinden, da deren DNA ein LOH der im Serum befindlichen Tumor-DNA maskieren könnte. Die Auswertungskriterien zur Untersuchung von Tumor- und Serumproben berücksichtigen diesen Umstand. Da ein gewisser Anteil an Normalzellen z. B. Bindegewebszellen oder Endothelzellen in den für diese Untersuchung benutzten Biopsien (Zungenbiopsie) enthalten sind, wurde ein LOH dann angenommen, wenn ein Allelsignal auf weniger als 50 % reduziert ist oder im Idealfall vollständig fehlt. Eine Mikrosatelliteninstabilität liegt dann vor, wenn eine zusätzliche Bande bzw. Banden im Längenbereich der spezifischen Allele aufgetreten

sind. Die verbleibenden Normalbanden beider Allele entstehen durch Normal-DNA und durch Tumorzellklone, die keine Mutation in der untersuchten Mikrosatellitensequenz aufweisen. Ein mehr als fünfzigprozentiger Anteil von Normalzellen kann in den untersuchten Tumorproben ein LOH maskieren. Das Auftreten von Subklonen im Tumorgewebe kann dazu führen, daß ein LOH oder eine Mikrosatelliteninstabilität, die nur in einem bestimmten Zellklon vorhanden sind, nicht in allen entnommenen Tumorproben nachzuweisen sind. Bei zwei Patienten (11 und 17) mit NSCLC war eine MIN nur in den Serumproben nachweisbar, nicht aber in den untersuchten Tumorproben. Bei zwei Patienten (10 und 13) mit SCLC war ebenfalls nur die MIN in den Serumproben nachzuweisen. Bei den obengenannten Patienten wurden Tumorproben zur DNA-Isolierung benutzt, die durch Zangenbiopsie während einer Bronchoskopie gewonnen wurden. Dadurch könnte in den gewonnen Proben nur geringe Mengen an Tumorzellen enthalten sein, so daß die Menge an spezifischer DNA nicht ausreicht, um eine Mikrosatellitenalteration nachzuweisen. Durch die Zangenbiopsie werden nur relativ kleine Bezirke des Tumors erfaßt, so daß möglicherweise nur bestimmte Tumorzellsubklone in dem Biopsat enthalten sind, die nicht die entsprechende Mikrosatellitenalteration aufweisen. Dies könnte zu einem fehlenden Nachweis der Mikrosatellitenalteration des Tumors führen. Bei Patient 1 mit SCLC wurde eine MIN nur im Tumor nachgewiesen, jedoch nicht im Serum. Bei Patient 12 mit SCLC konnte ein LOH nur im Tumor, nicht im Serum nachgewiesen werden. Auch bei Patient 4 mit NSCLC wurde in der Tumor-DNA, nicht jedoch in der Serum-DNA eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen. Das Fehlen einer entsprechenden Veränderung in der Serum-DNA könnte in der nicht ausreichend freigesetzten Menge an Tumor-DNA in den Blutkreislauf begründet sein. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die im Serum befindliche Tumor-DNA von anderer im Blut zirkulierender DNA, die aus nichttumorösen untergegangenen Zellen stammt, maskiert wird (81). Zur Zeit ist nicht geklärt, wie der Mechanismus der Freisetzung von Tumorzell-DNA verläuft. Sollte es ein diskontinuierlicher Vorgang sein, so hat der Zeitpunkt der Serumprobengewinnung einen großen Einfluß auf die Menge und Qualität der Tumorzell-DNA im Blut. Aus diesem Grund ist eine häufige Blutprobenabnahme zu verschiedenen Zeitpunkten zu empfehlen. Von neun Patienten mit NSCLC konnte bei sieben Patienten eine übereinstimmende Veränderung der untersuchten Mikrosatelliten in den untersuchten Tumor- und Serumproben festgestellt werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Leistungsfähigkeit der benutzten Methodik trotz der oben beschriebenen Einschränkungen. Zusammenfassend kann folgendes Fazit gezogen werden:

Der Nachweis von Mikrosatellitenalterationen ist abhängig von:

- # Im Tumor: Der absoluten Menge der Tumorzellen, dem Anteil an Normalzellen und dem Vorhandensein von Subklonen in der zu untersuchenden Tumorprobe.
- # Im Plasma/Serum: Der Menge an Tumor-DNA in der Serumprobe, die vom Zeitpunkt der Blutprobenabnahme abhängen kann, der Menge an gelöster DNA aus anderen untergegangenen Zellen im Blut und dem Volumen der entnommenen Blutprobe.

Beide Punkte begrenzen die Ausgangsmenge der Tumor- und Serum-DNA für die weiteren notwendigen Analyseschritte.

Eine mikroskopische Auswahl von Tumorbezirken aus histologischen Schnittpräparaten sollte zu einer deutlichen Steigerung der Tumorzellausbeute führen. In dieser Arbeit wurden bei 8 Patienten Proben aus histologischen Präparaten (in Paraffin eingebettet) für die Tumor-DNA-Gewinnung mit einbezogen. Zwei Patienten (Nr.4 und 6, NSCLC) hatten eine Veränderungen in der Serum-DNA, die auch in den entsprechenden Tumor-DNA nachgewiesen werden konnte. In keinem Fall war ein Nachweis in der Serum-DNA mit einem fehlenden Nachweis in der entsprechenden Tumor-DNA verbunden.

### **Kleinzelliges Bronchialkarzinom**

Von den 16 Patienten mit SCLC hatten fünf Patienten (31 %) eine Mikrosatellitenalteration. Chen et al. (81) konnten unter Verwendung der gleichen Mikrosatellitenmarker in 76 % (16/21 Patienten) eine Mikrosatellitenalteration feststellen. Die von Chen et al. angewandte Methodik, Materialgewinnung und -verarbeitung ist mit unserer Untersuchung vergleichbar. Die Untersuchungsgruppe bei Chen et al. bestand aus Patienten mit ED (extended disease) (16 Patienten) und Patienten mit LD (limited disease) (5 Patienten), während in unserer Untersuchung alle Patienten ein kleinzelliges Bronchialkarzinom im Stadium ED hatten. Chen et al. konnten keinen Unterschied hinsichtlich dem Auftreten einer Mikrosatellitenalteration zwischen diesen beiden Tumorausbreitungsstadien feststellen, so daß dieser Umstand nicht geeignet ist, den Unterschied in der Rate der nachgewiesenen Mikrosatellitenalteration zu erklären. Es ist zu vermuten, daß vor allem die geringe Fallzahl beider Studien die voneinander abweichenden Ergebnisse bedingen. Beide Studien bestätigen die Eignung von Plasma- bzw. Serumproben zum Nachweis von Tumorzell-DNA zur Analyse von Mikrosatelliten. Mao et al. (79) konnten unter Verwendung der gleichen Markern in 50 % (5/10 Patienten) der untersuchten Patienten mit SCLC eine Mikrosatelliteninstabilität nachweisen. Unter Verwendung von 23 Mikrosatellitenmarkern konnten Merlo et al. (80) in 45 % (15/33 Patienten) der untersuchten Patienten mit SCLC eine Mikrosatelliteninstabilität nachweisen. Aufgrund der deutlich höheren Anzahl und abweichenden Lokalisation der untersuchten Mikrosatellitenloci, ist eine direkte Vergleichbarkeit nicht gegeben.

### **Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom**

Neun von siebenundzwanzig der von uns untersuchten Patienten (33 %) mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom zeigten eine Alteration der untersuchten Mikrosatellitenloci. Unterteilt nach Art der Mikrosatellitenalteration zeigten 22 % eine MIN und 15 % ein LOH. Besonders der Anteil der Mikrosatelliteninstabilität wird von den insgesamt 14 Studien aus den Jahren 1994 bis 1998 mit insgesamt 779 untersuchten Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom bestätigt. Bei 154 Patienten (20 %) konnte dort eine Mikrosatelliteninstabilität in den untersuchten Tumorproben nachgewiesen werden. Der Anteil von LOH-Nachweisen scheint

jedoch stärker von den untersuchten Chromosomenabschnitten abzuhängen. So berichten Thiberville et al. (89) über den Nachweis von 84 % LOH bei insgesamt 86 Patienten mit NSCLC unter Einsatz der Mikrosatellitenmarker D3S1007 und D3S1339 und den Markern ITIH1 / 3 (Chromosomenabschnitt 3p21-22). Sánchez-Céspedes et al. (95) konnten ebenfalls eine Rate von 54 % LOH in den Tumorproben von insgesamt 22 Patienten mit NSCLC unter Verwendung der Mikrosatellitenmarker D3S1038, D3S1611, D3S1067 und D3S1284 (Chromosomenabschnitt 3p) nachweisen. Shipman et al. (84) berichten über eine LOH-Frequenz von 64 % unter Verwendung der Marker D11S941E und D11S935 (Chr. 11). 95 % der informativen Mikrosatelliten zeigten am CAT-Locus ein LOH. Die zitierten Untersuchungen verdeutlichen die Abhängigkeit des LOH-Nachweises von der Auswahl der zu untersuchenden Chromosomenabschnitte. Sánchez-Céspedes et al. (95) haben als erste Untersuchungsgruppe auch Serumproben von Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom untersucht. Es wurden in 6 von 22 Fällen (28 %) eine Mikrosatellitenalteration, d. h. entweder ein "Shift" oder ein LOH, nachgewiesen. In unserer Untersuchung waren in 9 von 27 Fällen (33 %) eine Mikrosatellitenalteration in der Serum-DNA von Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom nachzuweisen. Beide Ergebnisse sind damit bezüglich der Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen in der Serum-DNA bei Patienten mit NSCLC vergleichbar.

#### **Mikrosatellitenanalysen von Serum- und Plasma-DNA bei anderen Tumorentitäten**

In zwei weiteren Arbeiten wurden Serum- bzw. Plasmaproben bei Patienten mit anderen Tumorentitäten untersucht. Nawroz et al. (66) konnte in den Serumproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Kopf- und Halsregion einen Anteil von 29 % Mikrosatellitenalterationen nachweisen. Goessl et al. (100) konnten bei einer Untersuchung von 40 Patienten mit einem Nierenzellkarzinom bei 26 (65 %) Patienten eine Mikrosatellitenalteration in der Plasma-DNA nachweisen. 25 Patienten zeigten ein LOH und nur ein Patient hatte ein MIN in der untersuchten Plasma-DNA. Sie benutzten für ihre Untersuchung vier Mikrosatellitenmarker (Chromosomenabschnitt 3p). Die Arbeit von Goessl et al. verdeutlicht, daß die Auswahl der zu untersuchenden Chromosomenabschnitte eine herausragender Bedeutung für die Mikrosatellitenanalyse hat. Beide Untersuchungen bestätigen ebenfalls die grundsätzliche Eignung von Blutproben als Untersuchungsmedium zum Nachweis von spezifischen Mikrosatellitenalterationen der Tumor-DNA bei Patienten mit soliden Neoplasien.

#### **Prognostische Bedeutung molekularbiologischer Veränderungen beim Bronchialkarzinom**

Die prognostische Bedeutung des Nachweises von molekularbiologischen Veränderungen in der Tumor-DNA bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom ist noch nicht geklärt. Bisher werden keine molekularbiologischen Nachweismethoden routinemäßig in der klinischen Praxis verwendet. Trotz der nachgewiesenen Bedeutung von Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen für die Tumorentstehung, konnte für das Bronchialkarzinom bisher kein molekularbiologischer Marker für ein Screening bzw. eine Frühdiagnostik, Prognose, Therapieverlauf und -kontrolle eine klinisch relevante Bedeutung erlangen. Das Alter, der

Allgemeinzustand, die Tumorentität und vor allem das Tumorausbreitungsmuster und das Auftreten von Fernmetastasen sind nach wie vor die wichtigsten Prognosefaktoren beim Bronchialkarzinom. Einzelne Hinweise auf die prognostische Bedeutung von genetischen Veränderungen konnten in einigen experimentellen Studien herausgearbeitet werden. So scheint das Vorhandensein von n-myc- und c-myc-Genmutationen mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit SCLC einherzugehen (24-27). Die RAS-Genmutation ist assoziiert mit einer negativen Prognose bei Adenokarzinomen des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (28, 29). Die Amplifikation und/oder Überexpression des c-erbB-2 Gens ist ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (30). Mit einer besseren Prognose scheint der erhöhte Nachweis des Bcl-2-Proteins bei über sechzigjährigen Patienten mit NSCLC assoziiert zu sein (31).

Ergebnisse zur prognostischen Bedeutung von Mikrosatellitenalterationen wurden bisher in nur zwei Studien für sporadische Tumorerkrankungen nachgewiesen. Thibodeau et al. (50) zeigten, daß nach einer chirurgischer Therapie, Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, signifikant länger überlebten, wenn eine Mikrosatelliteninstabilität nicht oder in höchstens einem Locus nachweisbar war ( $p=0,02$ ). Pifarré et al. (90) konnten in ihrer Untersuchung nachweisen, daß Patienten mit einem NSCLC Stadium I nach chirurgischer Therapie länger überlebten, wenn eine Mikrosatelliteninstabilität nachweisbar war ( $p=0,005$ ). Beide Studien verdeutlichen allerdings, daß nicht geklärt ist, ob das Auftreten einer Mikrosatelliteninstabilität tatsächlich als günstig oder ungünstig zu bewerten ist. Um diese Frage beantworten zu können, sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen und längeren Beobachtungszeiträumen notwendig. Das heterogene Ergebnis könnte aber auch der Ausdruck des Einflusses entitätsspezifischer Eigenschaften sein.

Die vorliegende Arbeit dokumentiert die erfolgreiche Methodenetablierung zum Nachweis von Mikrosatellitenalterationen in Serum- und Tumor-DNA von Patienten mit Bronchialkarzinom. Wir konnten demonstrieren, daß in der Kontrollgruppe keine Mikrosatellitenalterationen nachweisbar waren. Von insgesamt 43 untersuchten Patienten mit einem Bronchialkarzinom konnten bei 14 Patienten (33 %) Mikrosatellitenalterationen nachgewiesen werden. Die angelegte umfangreiche Serum- und Plasmabank ermöglicht es, im Rahmen des geplanten Gesamtprojektes, weitere "follow up" Untersuchungen bei den Patienten mit nachgewiesenen Alterationen durchzuführen, um festzustellen, ob die dokumentierten Mikrosatellitenalterationen unter Behandlung einer Veränderung unterliegen oder stabil nachweisbar bleiben. Ein weiterer Aspekt des Gesamtprojektes erörtert die Frage, ob unter den zur Zeit gängigen Therapiemodalitäten eine Mikrosatellitenalteration einen prognostischen Parameter für den Erfolg einer entsprechenden Therapie darstellt. Die Frage, ob eine Assoziation von Mikrosatellitenalterationen mit einem bestimmtem NSCLC-Tumorstadium oder einer histologischen Subklassifizierung vorliegt, konnte aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht beantwortet werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch keine Tendenzen erkennen.

Die hohe Sensitivität der Polymerasekettenreaktion ist ein wichtiger Vorteil der in dieser Untersuchung etablierten Methodik. Die Möglichkeit einer Multiplex-PCR zur gleichzeitigen Untersuchung mehrerer Mikrosatellitenmarker sollte zu einer Zeit- und Kostenersparnis führen. Sie läßt weiterhin die Möglichkeit offen, ein ganzes "Panel" an Mikrosatellitenmarkern in einem

Untersuchungsgang einzusetzen, um die Aussagekraft der Untersuchung zu erhöhen. Der Nachweis von Tumor-DNA-Mutationen im Serum eröffnet eine weniger invasive Möglichkeit zur Gewinnung und zum Nachweis von Tumor-DNA. Zur Abschätzung der Prognosewertigkeit und der Frage der Tumorsensitivität und -spezifität von Mikrosatellitenalterationen, wird es notwendig sein, eine wesentlich größere Anzahl von Patienten zu untersuchen. Die unverändert sehr schlechte Prognose von Patienten mit Bronchialkarzinom unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung einer zuverlässigen und sensitiven Methode zur verbesserten Frühdiagnostik.

## 6. Zusammenfassung

Die Bedeutung von Mikrosatellitenalterationen in malignen Tumoren ist trotz intensiver Forschungstätigkeit bisher nicht ausreichend geklärt. Bei Patienten mit einem hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinom-Syndrom (HNPCC) konnte aber ein möglicherweise kausaler Zusammenhang zwischen einer Keimbahnmutation der Gene, die an dem DNA-“mismatch“-Reparaturmechanismus beteiligt sind, und der Ätiologie dieser Erkrankung nachgewiesen werden. Der Nachweis von Mikrosatelliteninstabilitäten wird zur Identifizierung des HNPCC-Syndroms genutzt. Der Anteil nachgewiesener Mikrosatelliteninstabilitäten bei sporadischen Tumorerkrankungen ist deutlich niedriger als beim HNPCC-Syndrom. Die Mechanismen zur Entstehung von Mikrosatelliteninstabilitäten bei sporadischen Tumorerkrankungen sind bisher ungeklärt. Der gelungene Nachweis von Mikrosatellitenalterationen im Serum, Fäzes, Urin und Sputum von Tumorpatienten könnte das diagnostische Repertoire erweitern und möglicherweise die frühzeitige Erkennung von Tumorerkrankungen verbessern. Eine auf eine PCR basierende Methode zur Analyse von Mikrosatellitenalterationen in Tumor- und Serumproben wurde in dieser Arbeit etabliert. Drei Mikrosatellitenmarker (AR, ACTBP2, UT762) wurden bei der Untersuchung eingesetzt. Es wurden Tumor- und Serum-DNA mit der DNA von Lymphozyten verglichen und analysiert. Es wurden 43 Patienten mit Bronchialkarzinom untersucht, darunter 16 Patienten mit kleinzelligem und 27 Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom. Es wurden bei 5 von 16 (31 %) Patienten mit SCLC und bei 9 von 27 (33 %) Patienten mit NSCLC in mindestens einem Mikrosatellitenlocus eine Mikrosatelliteninstabilität oder ein LOH nachgewiesen. In der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden waren keine Mikrosatellitenalterationen nachweisbar.

Die unverändert sehr schlechte Prognose von Patienten mit Bronchialkarzinom unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung einer zuverlässigen und sensitiven Methode zur verbesserten Frühdiagnostik. Dazu wird es notwendig sein, weitere Mikrosatellitenmarker hinsichtlich ihrer Tumorsensitivität und -spezifität an einer ausreichenden Anzahl von Patienten zu testen und die prognostische Bedeutung von Mikrosatellitenalterationen bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom zu klären.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Wingo PA**, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 1995; 45:8-30
2. **Mannino DM**, Ford E, Giovino GA, Thun M. Lung cancer deaths in the United States from 1979 to 1992: an analysis using multiple-cause mortality data. *Int J Epidemiol* 1998; 27:159-166
3. **Becher H**. Epidemiologie des Bronchialkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung des Passivrauchens. *Onkologe* 1995; 1:417-423
4. **Fry WA**, Menck HR, Winchester DP. The national cancer data base report on lung cancer. *Cancer* 1996; 77:1947-55
5. **Jedrychowski W**, Becher H, Wahrendorf J, Basa-Cierpialek Z, Gomola K. Effect of tobacco smoking on various histological types of lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 118:276-282
6. **Knudsen GA**. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90:10914-10921
7. **Fearon ER**. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; 278:1043-1050
8. **Kern JA**, Filderman AE. Oncogenes and growth factors in human lung cancer. *Clinics In Chest Medicine* 1993; Volume 14; 1:31-41
9. **Greenblatt MS**, Harris CC. Molecular genetics of lung cancer. *Cancer Surveys Volume 25: Genetics and Cancer: A Second Look* 1995; 25:293-313
10. **Gazdar AF**. The molecular and cellular basis of human lung cancer. *Anticancer Research* 1994; 13:261-268
11. **Fearon ER**, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:757-767
12. **Renan MJ**., How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinog.* 1993; 7:139-146
13. **Schuermann M**. Zytogenetische und molekularbiologische Grundlagen in der Entwicklung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms. *Onkologe* 1995; 1:424-428
14. **Li FP**, Fraumeni JF. Rhabdomyosarcoma in children: Epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J. Natl. Cancer Inst.* 1969; 43:1365-1373
15. **Malkin D**., Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250:1233-1238
16. **Greenblatt MS**, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 1994; 55:4855-4878
17. **Shikhani AH**, Matanoski GM, Jones MM, Kashima HK, Johns ME. Multiple primary malignancies in head and neck cancer. *Arch. Otolaryngol. Head & Neck Surg.* 1986;



18. **Heyne KH**, Lippman SM, Lee JJ, Lee JS, Hong WK. The incidence of second primary tumors in long-term survivors of small cell lung cancer. *J Clin Onco* 1992; 10:1519-24
19. **Hung JY**, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD, Gazdar AF. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *J. Am. Med. Assoc.* 1995; 273:558-563
20. **Kishimoto Y**, Sugio K, Hung JY, Virmani AK, McIntire DD, Minna JD, Gazdar AF. Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small-cell lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995; 87: 1224-1229
21. **Bedi G**, Westra W, Gabrielson, Koch W, Sidransky D. Multiple head and neck tumors: evidence for clonal origin. *Cancer Res.* 1996; 56:2484-2487
22. **Califano J**, Van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996; 56:2488-2492
23. **Viallet J**, Minna JD. Dominant oncogenes and tumor suppressor genes in the pathogenesis of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 2:225-232
24. **Johnson BE**, Battey J, Linnoila I, Becker KL, Makuch RW, Snider RH, Carney DN, Minna JD. Changes in the phenotype of human small cell lung cancer cell lines after transfection and expression of the c-myc proto-oncogene. *J Clin Invest* 1986; 78:525-532
25. **Johnson BE**, Ihde DC, Makuch RW, Gazdar AF, Carney DN, Oie H, Russell E, Nau MM, Minna JD. Myc family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course. *J Clin Invest* 1987; 79:1629-1634
26. **Johnson BE**, Brennan JF, Ihde DC, Gazdar AF. Myc family DNA amplification in tumors and tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1992; 13:39-43
27. **Funa K**, Steinholtz L, Nou E, Bergh J. Increased expression of N-myc in human small cell lung cancer biopsies predicts lack of response to chemotherapy and poor prognosis. *Am J Clin Pathol* 1987; 88:216-220
28. **Rodenhuis S**, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992;52:2665-2669
29. **Mitsudomi T**, Steinberg SM, Oie HK, Mulshine JL, Phelps R, Viallet J, Pass H, Minna JD, Gazdar AF. Ras gene mutations in small cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer Res* 1991; 51:4999-5002
30. **Tateishi M**, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 1991; 27:1372-1375
31. **Pezzella F**, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, Harris A, Gatter K, Mason DY. Bcl-2 protein in non small cell lung carcinoma. *New Engl J Med* 1993;

329:690-694

32. **Müller KM**, Junker K, Wiethage T. Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome: Morphologie, Tumorregression, Molekularpathologie. *Onkologie* 1995; 1:429-440
33. **Sundaresan V**, Ganly P, Hasleton P, Rudd R, Sinha G, Bleehen NM, Rabbitts P. P53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene* 1992; 7:1989-1997
34. **Schauer IE**, Siriwardana S, Langan TA, Sclafani RA. Cyclin D1 overexpression vs retinoblastoma inactivation: implications for growth control evasion in non small cell and small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:7827-7831
35. **Hanahan D**, Folkman J. Pattern and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-364
36. **Martiny-Baron G**, Marmé D. VEGF-mediated tumour angiogenesis: a new target for cancer therapy. *Current Opinion in Biotechnology* 1995; 6:675-680
37. **Dvorak HF**, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *A J Pathol* 1995; 146:1029-1039
38. **Yeo TK**, Dvorak HF. Tumor stroma. *Diagnostic Immunopathology. Second Edition* 1995; 685-697
39. **Yamazaki K**, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S, Nakajima I, Isobe H, Inoue K, Kawakami Y. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* 1994; 74:2245-2250
40. **Fontanini G**, Bigini D, Vignati S, Basolo F, Mussi A, Lucchi M, Chine S, Angeletti CA, Harris AL, Bevilacqua G. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non- small cell lung cancer. *J Pathol* 1995; 177:57-63
41. **Koreth J**, O'Leary JJ, McGee J. Microsatellites and PCR genomic analysis. *J Pathol* 1996; 178:239-248
42. **Modrich P**. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* 1991; 25:229-253
43. **Levinson G**, Gutman GA. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 1987; 15(13):5323-5338
44. **Strand M**, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 1993; 365:274-276
45. **Kunkel TA**. Slippery DNA and diseases. *Nature* 1993; 365:207-208
46. **New L**, Liu K, Crouse GF. The yeast gene MSH3 defines a new class of eukaryotic MutS homologues. *Mol Gen Genet* 1993; 239:97-108
47. **Bishop DK**, Williamson MS, Fogel S, Kolodner RD. The role of heteroduplex correction in gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 1987; 328: 362-364
48. **Aaltonen LA**, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT,

- Watson P, Tallqvist G, Juhola M, Sistonen P, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B, De la Chapelle A. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994; 54:1645-1648
49. **Vogelstein B**, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:207-210
  50. **Thibodeau SN**, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-819
  51. **Aaltonen LA**, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, De la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812-816
  52. **Ionov Y**, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic repeated sequences reveal a new mechanismism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363:558-561
  53. **Peltomäki P**, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, Petersen GM, Hamilton SR, de la Chapelle A, Vogelstein B. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993; 260:810-812
  54. **Lindblom A**, Tannergard P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* 1993; 5:279-282
  55. **Fishel R**, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75:1027-1038
  56. **Leach FS**, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lathi M, Guan XY, Zhang J, Meltzer PS, Yu JW, Kao FT, Chen DJ, Cerosaletti KM, Fournier REK, Todd S, Lewis T, Leach RJ, Naylor SL, Weissenbach J, Mecklin JP, Järvinen H, Petersen GM, Hamilton SR, Green J, Jass J, Watson P, Lynch HT, Trent JM, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75:1215-1225
  57. **Bronner CE**, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergard P, Bollag RJ, Godwin AR, Ward DC, Nordenskjöld M, Fishel R, Kolodner R, Liskay RM. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368:258-261
  58. **Nicolaides NC**, Papadopoulos N, Liu B, Wei Y, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Dunlops MG, Hamilton SR, Petersen GM, De la Chapelle A, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371:75-80
  59. **Service RF**. Stalking the start of colon cancer. *Science* 1994; 263:1559-1560
  60. **Loeb LA**. Microsatellite instability: Marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*

1994; 54:5059-5063

61. **Marra G**, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1114-1125
62. **Eshleman JR**, Markowitz SD. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Current Science in Oncology* 1995; 7:83-89
63. **Rüschoff J**, Bocker T, Schlegel J, Stumm G, Hofstaedter F. Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. *Virchows Archiv* 1995; 426:215-222
64. **Peltomäki P**. Microsatellite instability and hereditary non-polyposis colon cancer. *Journal of Pathology* 1995; 176:329-330
65. **Boland CR**, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58:5248-5257
66. **Nawroz H**, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature Medicine* 1996; 2(9):1035-1037
67. **Dams E**, Van de Kelft EJZ, Martin JJ, Verlooy J, Willems PJ. Instability of microsatellites in human gliomas. *Cancer Res* 1995; 55:1547-1549
68. **Gleeson CM**, Sloan M, McGuigan JA, Ritchie AJ, Weber JL, Russell SEH. Ubiquitous somatic alterations at microsatellite alleles occur infrequently in barrett's-associated esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996; 56:259-263
69. **MacDonald GA**, Greenson JK, Saito K, Cherian SP, Appelman HD, Boland CR. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at DNA mismatch repair gene loci occurs during hepatic carcinogenesis. *Hepatology* 1998; 28:90-97
70. **Mironov NM**, Aguelon MA, Potapova GI, Omori Y, Gorbunov OV, Klimenkov AA, Yamasaki H. Alterations of (CA)<sub>n</sub> DNA repeats and tumor suppressor genes in human gastric cancer. *Cancer Res* 1994; 54:41-44
71. **Mao L**, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, Sidransky D. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996; 271:659-662
72. **Riesinger JI**, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53:5100-5103
73. **Duggan BD**, Felix JC, Muderspach LI, Tourgeman D, Zheng J, Shibata D. Microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:1216-21
74. **Helland Å**, Børresen AL, Peltomäki P, Hektonen M, Kristensen GB, Nesland JM, De la Chapelle A, Lothe RA. Microsatellite instability in cervical and endometrial carcinomas. *Int. J. Cancer* 1997; 70:499-501
75. **Wooster R**, Cleton-Jansen AM, Collins N, Mangion J, Cornelis RS, Cooper CS,

- Gusterson GA, Ponder BAJ, Von Deimling A, Wiestler OD, Cornelisse CJ, Devilee P, Stratton MR. Instability of short tandem repeats in human cancers. *Nature genetics* 1994; 6:152-156
76. **Peltomäki P**, Lothe RA, Aaltonen A, Pylkkänen L, Nyström-Lathi M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, Brøgger A, Børresen AL, De la Chapelle A. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53:5853-5855
  77. **Brenntall TA**, Chen R, Lee JG, Kimmey MB, Bronner MP, Haggitt RC, Kowdley KV, Hecker LM, Byrd DR. Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatis adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer Res* 1995; 55:4264-4267
  78. **Brenntall TA**, Crispin DA, Bronner MP, Cherian SP, Hueffed M, Rabinovitch PS, Rubin CE, Haggitt RC, Boland CR. Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 1996; 56:1237-1240
  79. **Mao L**, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc. Natl. Sci. USA* 1994; 91:9871-9875
  80. **Merlo A**, Mabry M, Gabrielson E, Vollmer R, Baylin SB, Sidransky D. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54:2098-2101
  81. **Chen XQ**, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nature Medicine* 1996; 2(9):1033-1035
  82. **Hurr K**, Kemp B, Silver SA, El-Naggar AK. Microsatellite alteration at chromosome 3p loci in neuroendocrine and non-neuroendocrine lung tumors. *American J of Pathology* 1996; 149:613-620
  83. **Pyllkanen L**, Karjalainen A, Anttilla S, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K. No evidence of microsatellite instability and loss of heterozygosity in primary resected lung cancer. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30(2):217-23
  84. **Shipman R**, Schraml P, Colombi M, Ludwig CU. Allelic deletion at chromosome 11p13 defines a tumour suppressor region between the catalase gene and D11S935 in human non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol* 1998; 12:107-111
  85. **Sekine I**, Yokose T, Ogura T, Suzuki K, Nagai K, Kodama T, Mukai K, Nishiwaki Y, Esumi H. Microsatellite instability in lung cancer patients 40 years of age or younger. *Jpn. J. Cancer Res.* 1997; 88:559-563
  86. **Suzuki K**, Ogura T, Yokose T, Sekine I, Nagai K, Kodama T, Mukai K, Nishiwaki Y, Esumi H. Microsatellite instability in female non-small-cell lung cancer patients with familial clustering of malignancy. *British J Cancer* 1998; 77(6):1003-1008
  87. **Fong KM**, Zimmerman PV, Smith PJ. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55:28-30

88. **Ryberg D**, Lindstedt BA, Zienolddiny S, Haugen A. A hereditary genetic marker closely associated with microsatellite instability in lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55:3996-3999
89. **Thiberville L**, Bourguignon J, Metayer J, Bost F, Diarra-Mehrpour M, Bignon J, Lam S, Martin JP, Nouvet G. Frequency and prognostic evaluation of 3p21-22 allelic losses in non-small-cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 1995; 64:371-377
90. **Pifarré A**, Rosell R, Monzó M, De Anta JM; Morena I, Sánchez JJ, Ariza A, Mate JL, Martínez E, Sánchez M. Prognostic value of replication errors on chromosomes 2p and 3p in non-small-cell lung cancer. *British J Cancer* 1997; 75(2):184-189
91. **Froudarakis ME**, Sourvinos G, Fournel P, Bouros D, Vergnon JM, Spandidos DA, Siafakas NM. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at Chromosomes 9 and 17 in non-small-cell lung cancer. *Chest* 1998; 113(4):1091-1094
92. **Shridar V**, Siegfried J, Hunt J, Alonso M, Smith DI. Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small-cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54:2084-2087
93. **Miozzo M**, Sozzi G, Musso K, Pilotti S, Incarbone M, Pastorino U, Pierotti MA. Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res* 1996; 56:2285-2288
94. **Wieland I**, Ammermüller T, Böhm M, Totzeck B, Rajewsky MF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at the hMLH1 locus on Chromosome 3p21 occur in a subset of nonsmall cell lung carcinomas. *Oncology Research* 1996; 8:1-5
95. **Sánchez-Céspedes M**, Monzó M, Rosell R, Pifarré, Calvo R, López-Cabrerizo MP, Astudillo J. Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small-cell lung cancer patients. *Annals of Oncology* 1998; 9:113-116
96. **Leon SA**, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37:646-650
97. **Shapiro B**, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51:2116-2120
98. **Stroun M**, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987; 23(6):707-712
99. **Stroun M**, Anker P, Maurice PA, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46:318-322
100. **Goessl C**, Heicappell R, Münker R, Anker P, Stroun M, Krause H, Müller M, Miller K. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer res.* 1998; 58:4728-4732
101. **Mulcahy HE**, Lyautey J, Lederrey C, Chen X, Anker P, Alstead EM, Ballinger A, Farthing MJG, Stroun M. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clinical Cancer Res* 1998; 4:271-275
102. **Anker P**, Lefort F, Vasioukhin F, Lyautey J, Lederrey C, Chen X, Stroun M, Mulcahy HE, Farthing MJ. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 1997; 112:1114-1120
103. **Vasioukhin F**, Anker P, Maurice PA, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations

- of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British J Haematology* 1994; 86:774-779
104. **Saiki RK**, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354
  105. **Hung T**, Mak K, Fong F. A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(16):4953
  106. **Chevet E**, Lemaître G, Katinka MD. Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23(16):3343-3344
  107. **Litt M**, Hauge X, Sharma V. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: Some causes and cures. *BioTechniques* 1993; 15(2):280-284
  108. **Weinberg RA**. How cancer arises. *Scientific American* 1996; Sept.:32-40

## Lebenslauf

**Name** Bruhn  
**Vorname** Norbert  
**Geburtsdatum** 04.12.1962  
**Geburtsort** Böel

### Schulbildung

**1968 - 1972** Grundschule Thumbby und Süderbrarup  
**1972 - 1978** Realschule Süderbrarup - Kreis Schleswig-Flensburg  
**1981 - 1982** Fachoberschule - Schwerpunkt Elektrotechnik - Berlin  
**1982** Fachhochschulreife  
**1983 - 1986** Berlin-Kolleg  
**1986** Hochschulreife

### Berufsausbildung

**1978 - 1981** Ausbildung zum Büroinformationselektroniker  
**1981** Gesellenprüfung vor dem Landesprüfungsausschuß in Lübeck

### Hochschulausbildung

**1987 - 1993** Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin  
**12.1993** Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Ärztliche Tätigkeit

**01.1995 - 04.1995** Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinische Humanpharmakologie der Schering AG Berlin, Leitung Dr. med. Seifert  
**04.1995 - 10.1996** Arzt im Praktikum an der Abteilung für Innere Medizin des Evangelisch-Freikirchlichen Krankenhauses Rüdersdorf bei Berlin, Chefarzt Dr. sc. med. H. Oppermann, Subspezialist für Gastroenterologie  
**10.1996** Erteilung der Approbation als Arzt, Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales in Berlin  
**11.1996 - 10.1998** Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinische Humanpharmakologie der Schering AG Berlin, Leitung Dr. med. Seifert  
Ärztliche Betreuung von Probanden in Phase I Studien  
**11.1996** Beginn der vorliegenden Dissertation an der Klinik für Onkologie und Hämatologie der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Ltd. Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. K. Possinger  
**02.1999** Weiterbildungsassistentenarzt an der Abteilung für Innere Medizin des Kreiskrankenhauses Freyung in Niederbayern, Chefarzt Dr. med. Reichenberger, Subspezialist für Gastroenterologie  
**06.1999** Weiterbildungsassistentenarzt, Onkologische Klinik im Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, Schloßbergklinik Oberstaufen / Allgäu, Chefarzt Dr. med. K. Zellmann



## Publikationen

- 1997** Does lung function testing predict long term pulmonary outcome in BMT patients?  
Th. Beinert<sup>1</sup>, E. Holler<sup>2</sup>, H-G. Mergenthaler<sup>1</sup>, M. Fleischhacker<sup>1</sup>, F. Flath<sup>1</sup>, N. Bruhn<sup>1</sup>, C. Vogelmeier<sup>3</sup>, J. Behr<sup>3</sup>, C. Wolff<sup>2</sup>, V. Budach<sup>4</sup> and H-J. Kolb<sup>2</sup>  
Med.II <sup>1</sup> und Strahlentherapie <sup>4</sup> der Charité, Humboldt Universität zu Berlin, und Abt. für Innere Medizin III <sup>2</sup> und Innere Medizin I <sup>3</sup>, Klinikum Großhadern, Universität München  
ASCO Annual Meeting May 17-20, 1997, Denver, Colorado
- 1997** Quality Monitoring, Standardized Documentation and Management with a Computerized System in Oncology  
Th. Beinert<sup>1</sup>, M. Dubiel<sup>1</sup>, H.-G. Mergenthaler<sup>1</sup>, M. Fleischhacker<sup>1</sup>, N. Bruhn<sup>1</sup>, G. Dingeldein<sup>1</sup>, I. Novopashenny<sup>2</sup>, M.B. Wischnewsky<sup>2</sup>, K. Possinger<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Humboldt Universität, Medizinische Klinik II, Charité, Berlin, Germany  
<sup>2</sup>Universität Bremen, Abteilung für Künstliche Intelligenz, Bremen, Germany  
Medical Informatics Europe '97, C. Pappas et al. (Eds.) IOS Press, 1997; 43:611-615
- 1998** Grippeschutzimpfung bei Patienten mit malignen Systemerkrankungen.  
T. Beinert<sup>1</sup>, T.G. Werner, H.-G<sup>1</sup>. Mergenthaler<sup>2</sup>, O. Sezer<sup>1</sup>, N. Bruhn<sup>1</sup>, M. Fleischhacker<sup>1</sup>, K. Possinger<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup> Humboldt Universität, Medizinische Klinik II, Charité, Berlin  
<sup>2</sup> Katharinenhospital Stuttgart, Klinik für Onkologie  
In press Onkologie

## **Erklärung an Eides Statt**

Ich erkläre an Eides Statt, daß die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 27. April 1999

Herrn Prof. Dr. Possinger danke ich für die Ermöglichung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Fleischhacker gebührt mein Dank für die hervorragende Betreuung und den wertvollen Anregungen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Petersen, Institut für Pathologie, für die Beurteilung der Schnittpräparate und Frau Dr. Oehm, Lungenheilanstalt Beelitz, für die Bereitstellung der Tumor- und Serumproben.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Onkologie und Hämatologie, die durch ihre Unterstützung zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.