

Aus dem Institut für Immunologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilian-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

**Die lymphogene Metastasierung beim Bronchialkarzinom:  
Analyse von Genomstruktur und Proteasenexpression bei  
Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilian Universität zu München



vorgelegt von  
Nicole Wendler

München  
2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Klein

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Andreas Jung  
Prof. Dr. Horst Günther Rau

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Christoph Klein

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2009

Für  
David, Joshua und Sarah

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Das Bronchialkarzinom	6
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	6
1.1.2	Histopathologische Klassifizierung	7
1.1.3	Diagnostik, Prognose und Therapie des Bronchialkarzinoms	8
1.1.4	Genetische Veränderungen beim Bronchialkarzinom	11
1.2	Disseminierung und Metastasierung	14
1.2.1	Die minimale residuale Tumorerkrankung	14
1.2.2	Die Bedeutung der Proteasen	15
1.3	Ziel der Studie	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	18
2.2	Material	19
2.3	Patientenkollektiv	24
2.4	Kooperationen	24
2.5	Primärtumoren	26
2.5.1	Anfertigung von Kryoschnitten	26
2.5.2	Lasermikrodissektion	26
2.6	Einzelzellen	27
2.7	Methode zur Isolation von DNA und mRNA	27
2.7.1	Vorbereitung der Dynal-Beads	29
2.7.2	Isolation der mRNA	29
2.7.3	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	33
2.7.4	Isolation der DNA	33
2.8	Hybridisierungen und Datenerhebung	36
2.8.1	Hybridisierung von cDNA Filterarrays zur Expressionsanalyse	36
2.8.2	Comparative genomische Hybridisierung zur Analyse des Genoms	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	Isolierung disseminierter Tumorzellen aus Lymphknoten und Knochenmark	47
3.2	Einfluss klinisch-pathologischer Parameter auf das Überleben	50
3.3	Analyse der Lymphknoten-Metastasierung	57

3.4	Etablierung der Mikrodissektion für DNA und RNA Isolation.....	59
3.5	Genomische Charakterisierung.....	62
3.5.1	Identifikation spezifischer Aberrationen bei Primärtumoren .....	64
3.5.2	Identifikation spezifischer Aberrationen bei Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten.....	69
3.6	Charakterisierung der Genexpression .....	74
3.6.1	Vergleichende Expressionsanalyse der Primärtumoren .....	76
3.6.2	Vergleichende Expressionsanalyse von Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten .....	80
3.7	Chromosomale Zuordnung der Proteasen und ihrer Inhibitoren .....	87
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
4.1	Detektion und Frequenz disseminierter Tumorzellen.....	90
4.2	Prognostische Bedeutung lymphogener und hämatogener Disseminierung..	93
4.3	Genetischer Ursprung und Heterogenität disseminierter Tumorzellen und ihrer Primärtumoren .....	96
4.4	Die Analyse der Genexpression.....	100
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>134</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>136</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Bronchialkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Bronchialkarzinom zählt in der Bundesrepublik Deutschland zu der dritthäufigsten Krebserkrankung und ist mittlerweile für mehr Sterbefälle verantwortlich als Brust-, Darm-, Leber- und Bauchspeicheldrüsenkrebs. Allein in Deutschland erkrankten im Jahr 2000 nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts etwa 32.000 Männer und 10.400 Frauen an Lungentumoren und die Tendenz ist steigend. Die meisten Patienten sind zwischen 50 und 70 Jahren alt. Das Durchschnittsalter der an Lungenkrebs erkrankten Menschen liegt bei Mitte 60, wobei das Erkrankungsrisiko mit dem Alter zunimmt. Laut Statistischem Bundesamt verstarben im Jahr 1999 in Deutschland 37.615 Patienten an einem Bronchialkarzinom, darunter 28.192 Männer und 9.423 Frauen. Lungenkrebs stellt damit bei Männern die häufigste, bei Frauen die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache dar (Robert Koch Institut, [www.rki.de](http://www.rki.de)).

Als Grund für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms gilt bei mindestens 85% der Fälle der Konsum von Tabak (Sekido et al. 1998). Die Welt-Gesundheits-Organisation schätzt, dass bis zum Jahr 2025 weltweit jährlich 10 Millionen Menschen an den Folgen ihres Tabakkonsums sterben werden (Smith & Glynn, 2000). Aufgrund veränderter Rauchgewohnheiten lässt sich seit Mitte der 80er Jahre beobachten, dass die Zahl der weiblichen Todesfälle zunimmt, wohingegen sie bei Männern leicht zurückgeht. Nach aktuellen Umfragen rauchen in Deutschland von der über 18-jährigen Bevölkerung derzeit 28% der Frauen und 37% der Männer.

Neben dem Tabakrauch verursachen aber auch andere Schadstoffe in der Atemluft, wie zum Beispiel Chrom-, Cadmium- oder Arsenverbindungen Lungenkrebs. Anders als beispielsweise bei Brustkrebs gibt es beim Bronchialkarzinom noch keine Hinweise auf die Vererbung spezieller Krebsgene. Die einzige Möglichkeit, die äußerst aggressiven Bronchialkarzinome zu heilen, liegt in deren früher Erkennung und der sofortigen chirurgischen Behandlung. Meist jedoch haben Lungentumoren bereits eine gefährliche Größe erreicht, bevor sie überhaupt diagnostiziert werden und die Patienten Symptome zeigen. Die Chance, nach der Diagnosestellung die nächsten fünf Jahre zu überleben, liegt - seit den letzten 25 Jahren unverändert - bei nur 14% (Robinett & John, 2000).

### 1.1.2 Histopathologische Klassifizierung

Bei den Bronchialkarzinomen handelt es sich um hochmaligne Lungentumoren, die alle über einen gemeinsamen Differenzierungsweg aus normalem Epithel entstehen (Sekido et al. 1998). Sie werden nach ihrem histopathologischen Erscheinungsbild in vier Typen (I-IV) unterteilt:

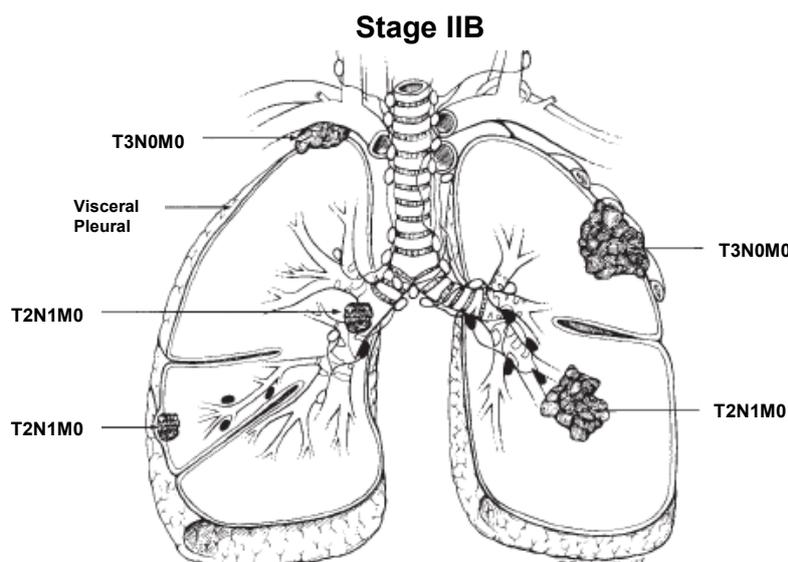
<b>SCLC</b> (small cell lung cancer)	<b>NSCLC</b> (non-small cell lung cancer)
<b>Kleinzelliges Bronchialkarzinom</b>	<b>Plattenepithelkarzinom</b>  <b>Adenokarzinom</b> - Azinäres Adenokarzinom - Papilläres Adenokarzinom - Bronchiolo-alveoläres Karzinom - Solides Karzinom mit Schleimbildung  <b>Großzelliges Bronchialkarzinom</b> - großzelliges neuroendokrines Karzinom - klarzelliges Karzinom - basaloides Karzinom - lymphoepitheliales Karzinom

20-25% aller Bronchialkarzinome sind kleinzellige Bronchialkarzinome (Sekido et al. 1998). Dabei handelt es sich um hochmaligne Lungentumoren aus Zellen, die Reste einer neuroendokrinen Differenzierung aufweisen. Der Tumor wächst sehr rasch und metastasiert schon früh in seiner Entwicklung sowohl hämatogen als auch lymphogen.

Von den drei Untergruppen der NSCLCs sind die früh hämatogen metastasierenden Adenokarzinome mittlerweile am häufigsten. Sie metastasieren vor allem ins Gehirn, die Nebennieren, die Leber und das Skelett. Meist sind Gehirnmastasen die erste klinische Manifestation. Im Vergleich zu Patienten mit einem Adenokarzinom haben Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom eine bessere Prognose, da diese relativ langsam wachsen und relativ spät in ihrer Entwicklung metastasieren. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen sie meist einen lokalen Tumor auf und nur vereinzelt finden sich Metastasen in den hilären Lymphknoten. Hämatogene Metastasen sind zu diesem Zeitpunkt selten. Bei Plattenepithelkarzinomen steht fest, dass sie in erster Linie durch das Rauchen verursacht werden. Die früh metastasierenden, großzelligen Bronchialkarzinome bilden mit 10% die seltenste Gruppe innerhalb der Bronchialkarzinome. Sie stellen keine einheitliche Tumorkategorie dar, sondern setzen sich aus entdifferenzierten Plattenepithel- und Adenokarzinomen zusammen. In den meisten Lungenkarzinomen lassen sich verschiedene histopathologische Anteile nachweisen.

### 1.1.3 Diagnostik, Prognose und Therapie des Bronchialkarzinoms

Eine eindeutige Diagnose kann nur durch die Ausdehnung des Tumors und dessen genaue histologische Einteilung gestellt werden. Neben einer ausführlichen klinischen Anamnese und körperlichen Untersuchung werden bildgebende Verfahren, wie beispielsweise ein Röntgenbild des Thorax zur Beurteilung herangezogen. Für das Staging der Tumore stellt eine Thorax-Computertomographie die beste Methode dar. Weitere häufig eingesetzte Untersuchungsmethoden sind die Thoraxsonographie, die Sputumzytologie und die Bronchoskopie. Zusätzlich liefert eine Basislaboruntersuchung wichtige Informationen über Gerinnung, Blutbild, Leber- und Nierenwerte. Außerdem kann eine Vielzahl von Tumormarkern im Serum bestimmt werden. Diese sind für die Diagnostik allerdings weder ausreichend spezifisch noch sensitiv, können aber bei der näheren Einteilung des histologischen Typs hilfreich sein und sind für die Verlaufskontrolle nach Resektion des Primärtumors und den weiteren Therapieplan unverzichtbar. Die vier wichtigsten serologischen Tumormarker sind der Zytokeratinmarker CYFRA 21-1, das karzinoembryonale Antigen (CEA), die neuronenspezifische Enolase (NSE) und das Pro-Gastrin releasing Peptide (ProGRP). Ein postoperativer Markerabfall ist beispielsweise als Zeichen für das vollständige Entfernen des Tumors, bzw. für das Ansprechen auf eine Chemotherapie zu sehen. Im umgekehrten Fall kann das Ausbleiben dieses Abfalls ein Hinweis auf Metastasierung, einen Residualtumor oder Therapieversagen sein. Ein vorzeitiger Wiederanstieg nach kurativer Resektion spricht in der Regel für ein Tumorrezidiv (Manual des Tumorzentrums München, Tumoren der Lunge und des Mediastinums, Hauck et al. 2003).



**Abbildung 1.1: Stadium IIB mit Tumoren größer als 3 cm oder mit anderen T2 typischen Merkmalen, wie dem Befall peribronchialer und/oder hilärer Lymphknoten, aus C.F. Mountain, The International System for Staging Lung Cancer, 2000.**

**Tabelle 1.2: Klinische TNM-Klassifikation.****T Primärtumor**

<b>Tx</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden, oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei) <sup>a</sup>
<b>T2</b>	Tumor mit einem der folgenden Kennzeichen hinsichtlich Größe oder Ausbreitung Tumor mehr als 3 cm in größter Ausdehnung Tumor mit Befall des Hauptbronchus, 2 cm oder weiter distal der Carina Tumor infiltriert viszerale Pleura assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
<b>T3</b>	Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: Brustwand (einschließlich Tumoren des Sulcus superior), Zwerchfell, mediastinale Pleura, parietales Perikard, oder Tumor im Hauptbronchus weniger als 2 cm distal der Carina, aber Carina selbst nicht befallen, oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge
<b>T4</b>	Tumor jeder Größe mit Infiltration einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina; oder Tumor mit malignem Pleuraerguss <sup>b</sup>

**N Regionäre Lymphknoten**

<b>Nx</b>	Regionäre Lymphknoten (LK) können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen LK und/oder in ipsilateralen Hilus-LK (einschließlich einer direkten Ausbreitung des Primärtumors)
<b>N2</b>	Metastasen in ipsilateralen, mediastinalen und/oder subkranialen LK
<b>N3</b>	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären LK

**M Metastasen**

<b>Mx</b>	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

<sup>a</sup> Seltener, sich oberflächlich ausbreitender Tumor jeder Größe mit einer nur auf die Bronchialwand begrenzten Infiltration wird auch dann, wenn er sich weiter proximal ausdehnt, als T1 klassifiziert. <sup>b</sup> Die meisten Pleuraergüsse bei BK sind durch den Tumor verursacht. Soweit die maligne Genese durch mehrfache zytologische Untersuchungen oder zuverlässiger thorakoskopisch ausgeschlossen wurde, kann der Tumor als T1, T2 oder T3 eingestuft werden (Manual: Tumoren der Lunge und des Mediastinums, Hauck et al. 2003; nach C.F. Mountain, The International System for Staging for Lung Cancer, 2000).

Die histopathologische Einteilung in Stadien (TNM-Staging, „Tumor-Node-Metastasis“) erfolgt nach C.F. Mountain (1997). Sie dient der Prognose und Therapieplanung und wird in der Regel bei allen Patienten standardmäßig durchgeführt. Dabei werden die Größe und Ausdehnung des Tumors (T), das Fehlen oder Vorhandensein und die Verbreitung von regionären Lymphknotenmetastasen (N), und das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (M) dokumentiert (Tab. 1.2, Tab. 1.3, Abb. 1.1). Bei NSCLC-Patienten steht ein fortgeschrittenes Tumorstadium im direkten Zusammenhang mit einem kürzeren Überleben (Mountain 1997).

**Tabelle 1.3: Stadiengruppierung nach TNM** (nach C.F. Mountain, The International System for Staging Lung Cancer, 2000).

<b>Stadien</b>	<b>TNM</b>		
<b>Stage 0</b>	Carcinoma in situ		
<b>Stage IA</b>	T1 N0 M0		
<b>Stage IB</b>	T2 N0 M0		
<b>Stage IIA</b>	T1 N1 M0		
<b>Stage IIB</b>	T2 N1 M0		
	T3 N0 M0		
<b>Stage IIIA</b>	T3 N1 M0		
	T1 N2 M0	T2 N2 M0	T3 N2 M0
<b>Stage IIIB</b>	T4 N0 M0	T4 N1 M0	T4 N2 M0
	T1 N3 M0	T2 N3 M0	T3 N3 M0
	T4 N3 M0		
<b>Stage IV</b>	jedes T jedes N M1		

Auch andere Faktoren, wie das Auffinden disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark oder Fernmetastasen in anderen Organen, die Überexpression verschiedener Markergene oder die Angiogenese haben einen prognostischen Einfluss auf das Überleben. Die Angiogenese, d.h. die Ausbildung eines den Tumor versorgenden Gefäßbettes, spielt eine große Rolle beim Wachstum des Tumors und der Metastasierung. Ohne die Versorgung durch Blutgefäße kann er eine Größe von 1 bis 2 mm<sup>3</sup> nicht überschreiten. Mit zunehmender Gefäßdichte im Tumor verschlechtern sich die Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf und die Überlebensdauer von NSCLC-Patienten (Fontanini et al. 1997, Fidler 2002).

Das Therapieverfahren wird abhängig von der Histologie und dem Stadium des Bronchialkarzinoms gewählt. Als Therapiemöglichkeiten stehen die operative Entfernung des Primärtumors, eine primäre Chemotherapie, eine lokale Strahlentherapie und/oder palliative Therapieformen zur Auswahl. Die operative Behandlung des Bronchialkarzinoms bietet bei etwa 30% der Erkrankten eine Chance auf Heilung (Manual des Tumorzentrum München, Tumoren der Lunge und des Mediastinums, Präuer et al. 2003).

Bei dem Großteil der Patienten wird allerdings zum Zeitpunkt der Diagnose ein fortgeschrittenes Stadium festgestellt, bei dem sich eventuell bereits Fernmetastasen gebildet haben oder der Primärtumor aufgrund der Größe nicht mehr vollständig herausgeschnitten werden kann. Besteht keine Möglichkeit zur Operation, wird unabhängig vom Tumorstadium eine Strahlen- oder eine Radio-Chemotherapie angewandt. Ist der Tumor noch klein (Stadium I) und operabel erfolgt nach der Operation meist keine adjuvante Therapie. Bei operablen Tumoren im Stadium II unterscheidet man zwischen R0- (vollständig entfernter Tumor) und R1-/R2-Resektion (mikro-/makroskopisch sichtbare Reste von Tumorgewebe). Eine Nachbestrahlung oder eine Radio-Chemotherapie wird nur nach R1-/R2-Resektion durchgeführt. Für Primärtumoren im Stadium IIIA ist das Standardvorgehen die Resektion des Primärtumors und eine postoperative Bestrahlung. Im Stadium IIIB besteht

nur in günstigen Fällen (T4N0) die Möglichkeit zur Operation. Im Stadium IV werden heutzutage meist Kombinationen aus verschiedenen Chemotherapien ausgewählt (Manual des Tumorzentrums München, Tumoren der Lunge und des Mediastinums, Huber & Schalhorn, 2003). Zusätzlich sollten unabhängig vom Stadium und dem Allgemeinzustand des Patienten immer auch palliative Therapien angeboten werden. Diese dienen dazu die Durchgängigkeit der zentralen Atemwege zu gewährleisten, beinhalten aber auch eine Schmerztherapie, eine adäquate Ernährung oder eine patientenorientierte psychologische Betreuung (Manual des Tumorzentrums München, Tumoren der Lunge und des Mediastinums, Hautmann et al. 2003).

Seit gezeigt werden konnte, dass die 5-Jahres Überlebensrate durch eine adjuvante Chemotherapie um 4,1% zunimmt, gewinnen postoperative adjuvante Therapien immer mehr an Bedeutung (Arriagada et al. 2004). Diese Studie zeigte allerdings auch, dass 95,9% der Patienten von dieser adjuvanten Chemotherapie nicht profitierten und durch die toxischen Nebenwirkungen noch zusätzlich gesundheitlich beeinträchtigt wurden. Eine präoperative (neoadjuvante) Therapie wird in der Regel besser toleriert als eine postoperative (adjuvante) Therapie. Sie wird oft früher begonnen und erzielt meist eine Verkleinerung des Tumors bis zum Zeitpunkt der Operation (Blum 2004, Rosell et al. 1994, Depierre et al. 2002, Roth et al. 1994). Da die Patienten, die von der entsprechenden Behandlung profitierten, nicht durch übliche Staging Methoden identifiziert werden können, werden dringend neue diagnostische Methoden benötigt, mit denen auch eine präoperative Untersuchung von Tumorzellen möglich wird.

#### **1.1.4 Genetische Veränderungen beim Bronchialkarzinom**

Das Wissen über die molekulare Entstehung von Lungenkrebs, wie zum Beispiel dem Einfluss von Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen (TSG) und DNA-Reparatur-Genen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Als Hauptursache für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms gelten ohne Zweifel die im Tabakrauch enthaltenen Tumorpromotoren und Kanzerogene. Viele dieser Substanzen werden erst im Körper als Kanzerogen aktiv und können Addukte mit der Zell-DNA bilden. Es kommt zu somatischen Mutationen im respiratorischen Epithel der Lunge. In einer frühen Phase der Karzinombildung findet man vor allem Allelverluste auf den Chromosomen 3p, 9p, 17p, 5q und 13q (Roland & Rudd 1998). Durch den Verlust des Wildtyp Allels kommt es zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie zum Beispiel Rb (13q14) und p53 (17p13, „two hit model“, Knudson 1971). Bei allen histologischen Typen der Bronchialkarzinome findet man an der chromosomalen Region für p53 eine heterozygote Deletion. Häufig tritt diese Inaktivierung kombiniert mit einer Punktmutation im verbleibenden Allel auf (Sekido et al. 1999). An der Entwicklung eines Lungenkarzinoms sind unter anderem Onkogene aus der

MYK- und RAS-Familie beteiligt, zu deren Aktivierung es meist durch Punktmutationen, Genamplifikation oder Rearrangements kommt (Gazdar 1994; Vogelstein & Kinzler 1993; Kohno & Yokota 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder der RAS-Genfamilie (KRAS, HRAS und NRAS) bei 30-40% der Adenokarzinome und 15-20% aller nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome, aber nur selten bei kleinzelligen Karzinomen, aktiviert sind. Eine Genamplifikation bei einem Mitglied der MYK-Familie, die in verschiedenen Zelllinien und Tumoren festgestellt werden konnte (Richardson et al. 1993) korreliert mit einer schlechteren Prognose für die Patienten. Neuere Untersuchungen belegen, dass auch der Verlust des Tumorsuppressor-Gens PTEN für die Patienten eine schlechtere Prognose bedeutet. Es wird vermutet, dass PTEN beim NSCLC durch Methylierung des Promotors verloren geht (Soria et al. 2002). Der Funktionsverlust führt zu einer Zunahme in der AKT-Aktivität und dadurch zur Unterdrückung der Apoptose (Cantley & Neel 1999). Darüber hinaus verhindert funktionelles PTEN über die negative Regulation des Phosphoinositol 3-Kinase/AKT Reaktionsweges die Tumorbildung und blockiert über die verminderte Phosphorylierung von FAK (=„focal adhesion kinase“) die Invasion und Metastasierung (Gautam et al. 2003).

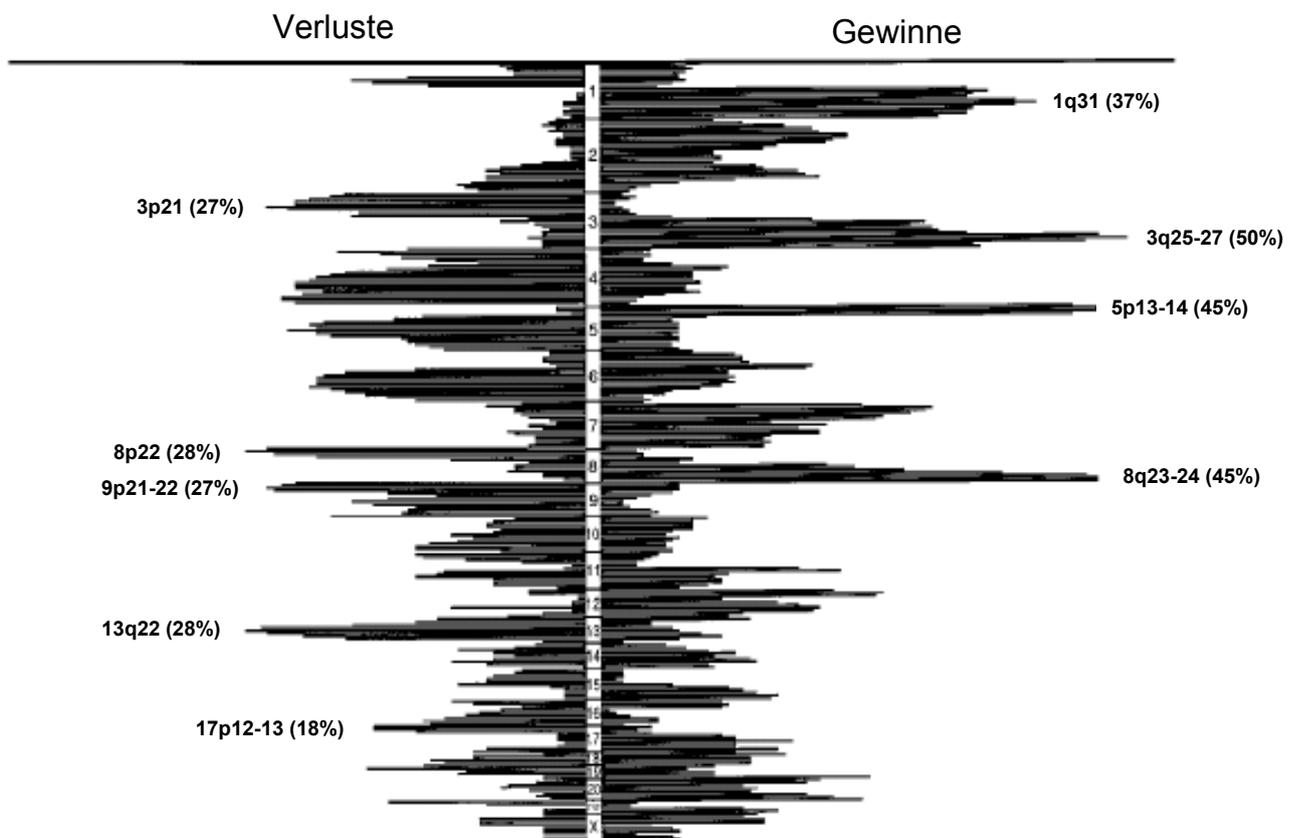
Genomische Veränderungen, die durch unkontrollierte und fehlerhafte Zellteilungen entstehen und sich in Tumorzellen ansammeln, führen zum Verlust oder Gewinn von genetischem Material. Mittlerweile stehen verschiedenste Techniken zur Verfügung, mit denen sich diese Veränderungen analysieren lassen. 1960 wurde von K. Patau erstmals eine Methode beschrieben, mit der der Karyotyp auf Deletionen und Translokationen untersucht werden kann (Denver-Conference, 1960). Bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH, Pinkel et al. 1986) und Multiplex FISH (Speicher et al. 1996; Eils et al. 1998) sind Metaphasen aus dem zu untersuchenden Material nötig, was bei soliden Tumoren aber oft nicht möglich ist.

Zwei der meist verwendeten Methoden zur direkten Untersuchung von Tumor-DNA sind die LOH („Loss of Heterozygosity“) und die CGH („Comparative Genomic Hybridisation“). Bei der LOH-Analyse handelt es um die Darstellung von Deletionen durch den Verlust polymorpher DNA-Marker (Dracopoli & Fogh 1983; Meltzer et al. 1991; Weissenbach et al. 1992; Thibodeau et al. 1993). Mit dieser Methode lassen sich auch kleinere Deletionen oder Punktmutationen identifizieren, allerdings benötigt man für den sicheren Vergleich auch Normalgewebe des gleichen Patienten. Die CGH erlaubt die Analyse genomischer DNA im direkten Vergleich mit einer Referenz-DNA (Kallioniemi et al. 1992; du Manoir et al. 1993; Joos et al. 1993; Kallioniemi et al. 1994b). Die gleichzeitige Hybridisierung unterschiedlich fluoreszenz-markierter DNA (Probe und Referenz) auf Metaphasen von gesunden Spendern und die anschließende Auswertung, bei der nach digitaler Aufnahme die Intensitätsunterschiede der beiden hybridisierten Proben gemessen werden, ermöglicht die

Darstellung von Deletionen und Amplifikationen mit einer Auflösung von 10-20 Mb. Verwendung findet diese Methode bei verschiedenen Krankheiten mit bekannten genetischen Veränderungen wie beispielsweise Trisomien, aber vor allem bei der Untersuchung von Tumoren und deren Vorstufen. Die Identifikation von Aberrationen, die mit der malignen Progression bzw. mit dem Metastasierungspotenzial eines Tumors in Zusammenhang gebracht werden können, ist eine mögliche Anwendung der Methode (Schmidt-Kittler et al. 2003).

Mittlerweile existiert eine ganze Reihe von Studien, die sich mit genomischen Veränderungen beim Bronchialkarzinom (SCLC und NSCLC) beschäftigt haben. Bei Untersuchungen des Karyotyps konnten bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen Verluste auf den Chromosomen 9p, 3p, 6q, 8p, 9q, 13q, 17p, 18q, 19p, 21q, 22q und Gewinne auf den Chromosomen 7, 1q, 3q, 5p, 11q, 22q festgestellt werden (Testa et al. 1994; Feder et al. 1998). LOH-Analysen ergaben in 50% der NSCLC-Patienten Verluste von 3p (Sekido et al., 2001). Es wird vermutet, dass es sich dabei um eine frühe genetische Veränderung bei der Ausbildung der Krankheit handelt.

### Genomische Veränderungen bei NSCLC



**Abbildung 1.2: Genomische Veränderungen nach CGH bei 166 NSCLC-Patienten aus insgesamt vier Studien** (aus BR Balsara, JR Testa, 2002). Verluste sind für jedes Chromosom links, Gewinne rechts dargestellt und mit der prozentualen Häufigkeit der Fälle versehen.

B.R. Balsara und J.R. Testa (2002) fassten die Ergebnisse der CGH-Untersuchungen aus insgesamt 4 verschiedenen Studien mit insgesamt 166 NSCLC-Patienten zusammen (Bjorkqvist et al. 1998; Luk et al. 2001; Pei et al. 2001; Petersen et al. 1997). Dabei zeigte sich, dass alle NSCLC Untergruppen immer wieder Amplifikationen auf 1q (q21-31), 3q (q26-qter, q13, q28-qter), 5p (p13-14), 7q (q11.2), 8q (23-qter, q24), 8p (p11-12), 12p (p12) und 19q (q13.1-13.2) und Deletionen auf 3p, 8p, 7p, 4q, 5q, 13q aufwiesen (Abb. 1.2).

Beim Vergleich von Plattenepithelkarzinomen (SCC) mit Adenokarzinomen (ADC) konnten Gewinne auf 1q22-32 häufiger bei ADCs als bei SCCs und Gewinne auf 12p und 20p13 und Verluste auf 2q, 3q24 und 4q häufiger bei SCCs als bei ADCs detektiert werden. Außerdem korreliert bei ADCs ein Gewinn auf 20q13 mit einer erhöhten Invasivität und bei SCCs ein Gewinn auf 7q und 8q mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem positivem Lymphknotenbefall (Petersen et al. 1997, Bjorkqvist et al. 1998; Pei et al. 2001, Luk et al. 2001).

## **1.2 Disseminierung und Metastasierung**

Verlassen einzelne Tumorzellen den Zellverband des Primärtumors spricht man von Disseminierung. Bei der Metastasierung wachsen die gestreuten Tumorzellen in den Zielorganen zu Tochtergeschwulsten aus. Bei einem Bronchialkarzinom metastasieren die Zellen je nach Tumortyp primär lymphogen über die Lymphgefäße in die regionalen Lymphknoten oder hämatogen über das Blut in Leber, Niere, Gehirn oder Knochen.

### **1.2.1 Die minimale residuale Tumorerkrankung**

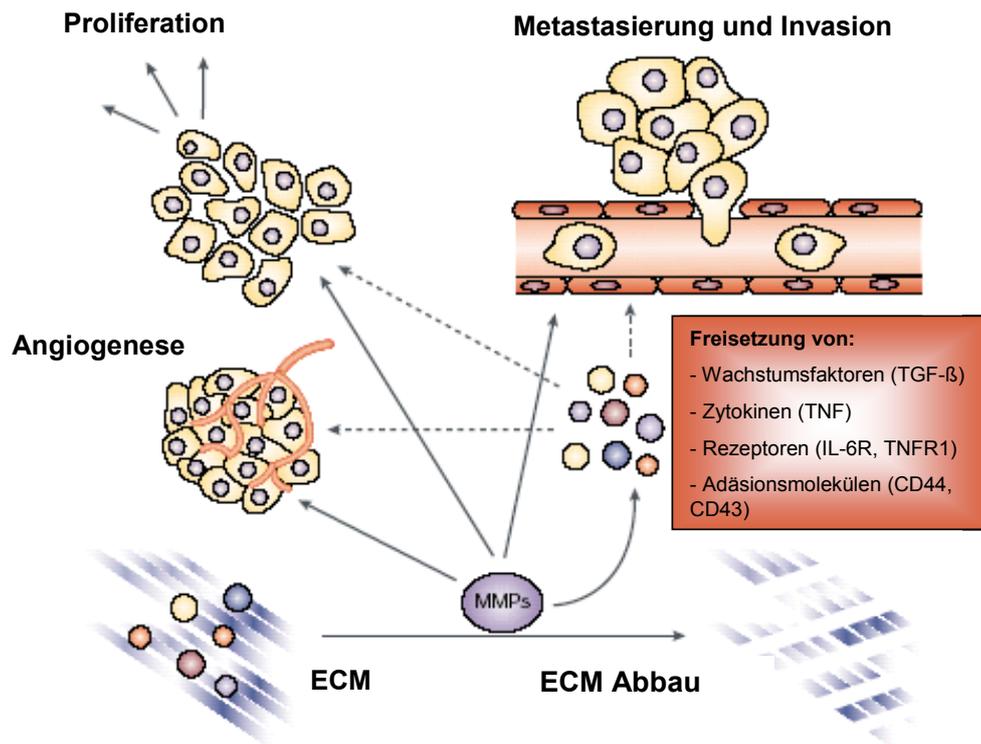
Man spricht von einer minimal residualen Tumorerkrankung (MRD) wenn sich nach der vollständigen chirurgischen Resektion des Primärtumors einzelne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark oder Lymphknoten nachweisen lassen, d.h. wenn noch ein Rest der Erkrankung vorhanden ist. Diese frühe Disseminierung wird als Ursache für häufig auftretende Rezidive angesehen, was dazu führt, dass noch immer 50% der kurativ behandelten Patienten sterben (Petersen et al. 2000). Bekannt sind diese disseminierten Tumorzellen auch unter den Namen ITC („isolated-tumor-cells“, Hermanek et al. 1999), CTC („circulating tumor cells“, Marth et al. 2002) oder OTC („occult-tumor cells“, Gerber et al. 2001). Sie stellen eventuell Vorläuferzellen bei der Entwicklung zu Mikrometastasen (<2 mm Durchmesser oder <50 Zellen) oder Metastasen dar (Klein 2000).

Der Nachweis dieser Zellen erfolgt in der Regel mit Hilfe immunzytochemischer Methoden. Dabei werden disseminierte Tumorzellen aus den Lymphknoten der Patienten, die routinemäßig für das Staging entnommen werden (Gonzalez-Stawinski et al. 2003; Passlick 2003; Choi et al. 2003) und disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark, das durch eine Knochenmarkspunktion gewonnen wird (Passlick et al. 1999), über monoklonale Antikörper gegen Epithel-spezifische Proteine isoliert.

Bei der Assoziation von disseminierten Zellen mit der Prognose muss man zwischen disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und Tumorzellen im Lymphknoten unterscheiden. Mittlerweile konnte vor allem beim Mammakarzinom gezeigt werden, dass das Auffinden disseminierter Tumorzellen im Knochenmark mit einem schlechteren Verlauf korreliert (Pantel & Brakenhoff 2004; Braun et al. 2005). Allerdings wird vor allem hier der Einfluss der Operation des Primärtumors und dadurch eingeschwemmter epithelialer Zellen in die Blutbahn auf den Nachweis falsch positiver Tumorzellen im Knochenmark diskutiert. Bei disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten konnten Passlick et al. zeigen, dass bei NSCLC-Patienten das Auffinden dieser Zellen in frühen Tumorstadien mit einem schlechten Verlauf korreliert (Passlick et al. 1999; Passlick & Pantel 2000). Bis heute ist allerdings der pathologische Befund der Lymphknoten der wichtigste Parameter bei der Beurteilung der Krankheit und bei der Abschätzung der Prognose für Patienten ohne Fernmetastasierung.

### **1.2.2 Die Bedeutung der Proteasen**

Von großer Bedeutung bei der Tumorentstehung, der Disseminierung und Metastasierung sind die Proteasen. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen, deren katalytische Funktion die hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen von Proteinen ist. Die Einteilung erfolgt abhängig von ihrem Angriffsort in Endopeptidasen und Exopeptidasen. Endopeptidasen spalten innerhalb der Peptidkette, meist spezifisch nach bestimmten Aminosäuren, Exopeptidasen spalten immer einzelne Aminosäuren vom Kettenende her ab. Man spricht von Aminopeptidasen, wenn vom N-terminalen Ende und von Carboxypeptidasen, wenn vom C-terminalen Ende abgespalten wird. Folgende Gruppen von Proteasen sind mittlerweile bekannt: Matrix-Metalloproteinasen (MMP), ADAMs, Serin-, Cystein-, Aspartat- und Threonin-Proteasen. Ihre Aufgaben sind vielseitig, so spalten sie im Magen Proteine aus der Nahrung in ihre für den Körper verwertbaren Aminosäuren auf und spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Hormonen und einer Reihe zellulärer Prozesse, wie beispielsweise der Homeostase und der Apoptose. Beim programmierten Zelltod ist die proteolytische Aktivität der Caspasen ein zentrales Element (Thornberry & Lazebnik 1998). Des Weiteren sind Proteasen auch über die Aktivierung von Zelladhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren, Rezeptortyrosinkinasen oder anderen Proteasen an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, die wichtige Stationen bei der Krebsentstehung, wie beispielsweise die Invasion, Metastasierung und Angiogenese steuern. Sie helfen bei der Disseminierung der Zellen vom Primärtumor und der Infiltration anderer Organe indem sie die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix (ECM) abbauen. Von Bedeutung bei diesen Prozessen sind neben den Cathepsinen und Serin-Proteasen vor allem die Matrix-Metalloproteinasen (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3: Bedeutung der MMPs für Tumorwachstum, Metastasierung und Invasion.** MMPs bewirken durch Interaktion mit Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM) und Integrinen das Wachstum der Tumorzellen, fördern die Angiogenese und regulieren die Invasion und Migration durch den Abbau von strukturellen Bestandteilen der ECM, wie zum Beispiel der Spaltung von Laminin-5 (aus Nature Reviews Cancer, Rao 2003).

Aufgrund ihrer Bedeutung bei der Tumorentstehung und der Disseminierung wurde das Interesse, Proteasen und ihre Inhibitoren für neue Therapien einzusetzen, in den letzten Jahren immer größer. Untersuchungen an verschiedenen Tumortypen konnten zeigen, dass beispielsweise durch die Inhibition bestimmter Proteasen oder auch durch deren Aktivierung die Invasion unterdrückt (Suzuki et al. 2003; Kajiyama et al. 2003), das Wachstum der Tumorzellen gesteigert (Demers et al. 2005) oder die Angiogenese reduziert (Wada et al. 2003) werden kann. Im Vordergrund stehen dabei die Matrix Metalloproteinasen (MMP), eine Gruppe aus mehr als 20 Endopeptidasen, die als inaktive Zymogene von Tumorzellen und Stromazellen gebildet und von anderen Proteasen und ihren Inhibitoren (TIMP, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass beim NSCLC eine Korrelation zwischen der Expression von MMPs oder deren Inhibitoren mit dem Tumorstadium und der Prognose existiert (Nelson et al. 2000). Außerdem korreliert die Expression von MMP-11 signifikant mit dem Befall von Lymphknoten (Delebecq et al. 2000). In einer Reihe von klinischen Studien wurde mittlerweile versucht die Enzymaktivität der MMPs mit Hilfe verschiedener Inhibitoren zu blockieren und dadurch Einfluss auf die damit verbundenen Prozesse zu nehmen. Allerdings blieb der gewünschte Erfolg bis heute aus, da entweder die Bindung nicht spezifisch, bzw. stabil genug war oder schwerwiegende toxische Nebenwirkungen nicht verhindert werden konnten (Hidalgo & Eckhardt 2001).

### 1.3 Ziel der Studie

In der hier vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel des sehr früh metastasierenden nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms die frühe hämatogene und lymphogene Metastasierung im Detail analysiert werden. Hierfür wurden von 124 NSCLC-Patienten bei denen keine Fernmetastasen diagnostiziert wurden (M0) die Lymphknoten und Knochenmarkpunktate nach disseminierten Tumorzellen durchsucht und isoliert. Anhand der Überlebensdaten sollte der Einfluss dieser disseminierten Tumorzellen für den weiteren Krankheitsverlauf untersucht werden. Des Weiteren sollten anhand einer Analyse von genomischen Aberrationen und proteolytischen Ereignissen disseminierte Tumorzellen aus den Lymphknoten und deren dazugehörige Primärtumoren miteinander verglichen und die lymphogene Metastasierung näher untersucht werden.

Für die gleichzeitige Analyse von Genom und Transkriptom wurde ein Protokoll zur Isolation der mRNA und DNA aus nur einer Zelle verwendet (Klein et al. 2002). Zusätzlich zu den disseminierten Tumorzellen sollten mit dieser Methode verschiedene Areale der entsprechenden Primärtumoren dieser Patienten mikrodisektiert werden. Für die Laser-Mikrodisektion musste ein Protokoll ausgearbeitet werden, das die weitere Isolation von geringen RNA und DNA Mengen mit der hier verwendeten Methode möglich macht. Es mussten die maximal nötige Zellzahl, die Größe der mikrodisektierten Areale, die Behandlung der Gewebeschnitte und Färbungen mit verschiedenen Reagenzien und Inkubationszeiten ausgetestet werden. Für die Analyse der Expression sollten alle Proben, disseminierte Einzelzellen und mikrodisektierte Areale der Primärtumoren mit einem extra angefertigten cDNA Array untersucht werden. Mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) wurden die gleichen Proben auch im Hinblick auf genomische Veränderungen untersucht. Eine Expressionsanalyse der disseminierten Einzelzellen aus den Lymphknoten wurde bereits von Sabine Schilling im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt (Titel: Proteasenexpression einzelner disseminierter Tumorzellen aus Lymphknoten und Knochenmark von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit könnten dazu beitragen, Unterschiede zwischen hämatogener und lymphogener Metastasierung aufzudecken und einen charakteristischen Genotyp von disseminierten Einzelzellen aus den Lymphknoten, bzw. den dazugehörigen Primärtumoren zu identifizieren. Durch die Analyse verschiedener Areale innerhalb eines Primärtumors kann eventuell ein „metastasiogenes“ Areal identifiziert werden, das in seinen Expressions- und Aberrationsmustern den disseminierten Zellen aus dem Lymphknoten ähnlich ist. Außerdem könnte die Identifikation von Proteasen, die zum einen mit dem Überleben der Patienten korrelieren und zum anderen typisch für disseminierte Tumorzellen oder Primärtumoren sind, dazu beitragen, eine Gruppe von Risikomarkern und damit verbunden, einen neuen, für jeden Patienten individuellen Therapieansatz zu erstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Formelgrößen wurden mit dem international gebräuchlichen SI-Einheiten und chemische Elemente gemäß ihrer Bezeichnung im Periodensystem abgekürzt. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wurde gemäß dem Duden verfahren.

A	Adenin
BCIP	5-Bromo-4-chloroindol-3-ol Dihydrogenphosphatester Mono-p-toluidiniumsalz
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyxy Spiro {1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro) tricyclo [3.3.1.1] decan}-4-yl)phenyl phosphate 3,7
DAPI	4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dig	Digoxigenin
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein
G	Guanin
g	Beschleunigung ( <i>gravity</i> , $g=9,81 \text{ m/s}^2$ )
h	Stunde ( <i>hour</i> )
min	Minute(n)
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
MOPC	Mouse Oocyte Plasmocytom
NBT	p-Nitroblue-tetrazoliumchlorid
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PBS	Phosphatebuffer-Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonucleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase

SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde(n)
SSC	Salins-Sodiumcitrat
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)
T	Thymin
Upm	Umdrehungen pro Minute

## 2.2 Material

### Geräte

Cytospinzentrifuge Cytospin2	Shandon
Kamera (CGH)	Photometrix
Elektronische Präzisionswaage	Sartorius Laboratory
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Entwicklermaschine – Compact 35	Airclean 200
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMXA-RF8
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Heizplatte	Bachofer
Horizontal Gel Electrophoresis System	Gibco BRL
Hybridisierungsofen Shake `n` Stack	Hybraid
Invertmikroskop	Leica DM IRB
Kryotom	Leica Jung Frigocut 2800 E
Lasermikroskop	P.A.L.M., Bernried
Medimaschine	Dako
Mikroskopop Labovert FS	Leitz
Mini-Zentrifuge	Costar
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc.
Robo Cycler Gradient 96	Stratagene
Roller/Mixer SRT 1	Stuart Scientific
Spannungsquelle (Agarose-Gel)	EPS 200, Pharmacia Biotech
Spektrometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Thermomixer 5436	Eppendorf
UV-Lampe	INTAS
Vortexgerät Type REAX 1 DR	Heidolph
Wasserbad Lauda MT/2	MGW

Verbrauchsmaterial

Deckgläschen	Langenbrinck
Falcon	Sarsted
Filmbox	Siemens
Glas-Küvetten	Roth, Karlsruhe
Haft-Objektträger	Micromet, München
Hybridisierungsröhren	Biometra
Kulturfläschchen (Cellstar)	Greiner
Medicons (50µm)	Dako
Nylonmembran	Sigma, Deisenhofen
Objektträger (Mattrand)	Langenbrinck
Pipetten	Gilson
Polyethylenmembran	P.A.L.M. Microlaser Technologies
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 200 µl	Thermo-Fast 96, Abgene
Transferpipetten	Sarsted
Scientific Imaging Film, Biomax ml	Kodak

Enzyme und Antikörper

A45-B/B3	Micromet, München
Anti-Dig-AP Fab (Dig Luminescent Detection Kit)	Roche, Mannheim
Anti-DIG-Flourescein	Roche, Mannheim
Avidin-Cy3.5	Roche, Mannheim
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
DNA-Polymerase I ( <i>E. coli</i> )	New England Biolabs, Frankfurt
DNase I	New England Biolabs, Frankfurt
Expand Long Template	Roche, Mannheim
Mse I 50 U/µl	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Pan
Terminale Desoxy Nucleotidyltransferase (TdT)	Amersham Pharmacia Biotech
Thermo Sequenase™ DNA Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim
Tru I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuclease H	Invitrogen, Karlsruhe
RT, Superscript II (200U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
RNase A	Roche, Mannheim

Kits

Dynalbeads mRNA DIRECT KIT	Dynal
Dig Luminescent Detection Kit	Roche, Mannheim
Expand™ Long Template Kit	Roche, Mannheim

Chemikalien

AB-Serum (10ml)	Biotest, Dreieich
Agarose GTG Seakem	Biozym, Hameln
ATP	Roche, Mannheim
BSA	Roche, Mannheim
CSPD = Chemiluminescence Substrate	Roche, Mannheim
Colcemid	Sigma, Deisenhofen
DAPI	Roche, Mannheim
dNTP	Fermentas
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Biosci., Freiburg
Dynalbeads Oligo(dT)25	Dynal
Dig Easy Hyb Granules	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-UTP	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP stabil	Roche, Mannheim
DNA-Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
0,1M DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merk, Darmstadt
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-Ethyl-9-Phenyl-Phenanthridinium Bromid)	Sigma, Deisenhofen
Eisessig 100%	Merk, Darmstadt
Ethanol unvergällt	JT Baker, Griesheim
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Ficoll-400	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Merk, Darmstadt
Hämatoxylinlösung (Mayer's)	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Herring-Sperm-DNA (10mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Human Cot-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Igepal	Sigma, Deisenhofen

---

Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Boeringer
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merk, Darmstadt
Molekulargewichtsstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Montagekleber (Fixogum)	Marabu, Tamm
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
OPA Plus	Amersham Biosci., Freiburg
Orange G	Sigma, Deisenhofen
PCR-Öl	Sigma, Deisenhofen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merk, Darmstadt
5X RT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend)	Merk, Darmstadt
SDS (Dodecylsulfat-Na-Salz)	Sigma, Deisenhofen
SYBR Gold	Molecular Probes, Leiden, NL
Thermo Sequenase Reaction Puffer	Amersham Biosci., Freiburg
Tissue Tek, O.C.T. Compound 4583	Miles
TLT, expand long template PCR system	Roche, Mannheim
Triton X-100	Roche, Mannheim
TRIS-ultra rein	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Sigma, Deisenhofen
Tween20	Sigma, Deisenhofen
RPMI ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Vectashield	Linearis, Hamburg
Wasser	Merk, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

Puffer

PBS (Phosphatbuffer-Saline):	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 mM NaCl 150 mM pH 7,4
SSC (Saline-Sodiumcitrat):	NaCitrat 15 mM NaCl 150 mM pH 7,4
TBE (Tris-Borat-EDTA Puffer):	Tris 89 mM Borat 89 mM EDTA 2 mM pH 8,3

Oligonucleotide und Primer

β-Aktin-5'	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA
β-Aktin-3'	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC
EF1α-5'	TGC CCC AGG ACA CAG AGA CT
EF1α-3'	CTG TGT CGG GGT TGT AGC CA
EGP 5':	GCG AGT GAG AAC CTA CTG
EGP 3':	CAC ATC AGC TAT GTC CAC ATC
CK 19-5'	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C
CK 19-3'	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG
CP2	TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC CCC CCC
LIB1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
ddMse11	TAA CTG ACA G-dideoxy C
Mse21	AGT GGG ATT CCG CAT GCT AGT
Mse12	TAA CTA GCA TGC
p53 exon2/3-5'	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
p53 exon2/3-3'	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA
p53 exon8/9-5'	AGG ACC TGA TTT CCT TAC TGC
p53 exon8/9-3'	GAG GTC CCA AGA CTT AGT AC
T7N8C	(CCC) <sub>5</sub> TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGN (N) <sub>7</sub>
T7TC	(CCC) <sub>5</sub> TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT (TTT) <sub>4</sub> TTV N

Die Oligonukleotide wurden von Metabion (München) synthetisiert.

### 2.3 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von April 1999 bis August 2001 wurden 128 Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) operiert und der Tumorgrad und das Stadium nach dem „International System for Staging Lung Cancer“ bestimmt (Mountain 1997). Histologisch konnte das Kollektiv in 57 Adenokarzinome (ADC), 55 Plattenepithelkarzinome (SQCC), 10 Großzellige Karzinome (LCC) und 6 Karzinome anderer Histologie unterteilt werden. Das Patientenkollektiv setzt sich aus 32 Frauen und 96 Männern im Alter zwischen 44 und 82 Jahren zusammen (durchschnittliches Alter: 64 Jahre).

Für alle 128 Patienten wurden die vollständigen Informationen über Tumorrückfall und Überleben zusammengestellt. Dabei wurden 124 Patienten mit Stadium M0 und 4 mit Stadium M1 diagnostiziert. 106 Primärtumoren konnten vollständig (R0) entfernt werden (16x R1 und 6x R2). Eine Übersicht über alle klinisch-pathologischen Parameter ist in Tabelle 2.1 aufgelistet.

### 2.4 Kooperationen

- Prof. Dr. Bernward Passlick, Dr. Wulf Siene  
Chirurgische Klinik, Klinikum Innenstadt, München  
Asklepios Fachkliniken, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie,  
München – Gauting
- Altana Pharma, Konstanz

Tabelle 2.1: Klinisch-pathologische Merkmale aller 128 Patienten.

<b>Anzahl der Patienten</b>	<b>128</b>	
<b>Durchschnittliches Alter</b> (Bereich)	64 (44-82)	
<b>Geschlecht</b>		
Männer	96	75%
Frauen	32	25%
<b>Tumor</b>		
T1	22	17,2%
T2	74	57,8%
T3	17	13,3%
T4	15	11,7%
<b>Lymphknoten</b>		
N0	63	49,2%
N1	28	21,9%
N2	29	22,7%
N3	3	2,3%
NX	5	3,9%
<b>Metastasierung</b>		
M0	124	96,9%
M1	4	3,1%
<b>Stadium</b>		
0	0	0
IA	15	11,7%
IB	37	28,9%
IIA	4	3,1%
IIB	25	19,5%
IIIA	28	21,9%
IIIB	15	11,7%
IV	4	3,1%
<b>Resektion</b>		
R0	106	82,8%
R1	16	12,5%
R2	6	4,7%
<b>Grad</b>		
G1, G2 (niedrig)	74	57,8%
G3, G4 (hoch)	40	31,3%
GX	14	10,9%
<b>Histologische Gruppen</b>		
Adenokarzinome	57	44,5%
Plattenepithelkarzinome	55	43%
Großzellige Karzinome	10	7,8%
Sonstige NSCLCs	6	4,7

## 2.5 Primärtumoren

Die Primärtumoren werden sofort nach Resektion in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit vorgekühltem Dimethylbutan für 2 min in flüssigem Stickstoff gehalten, eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

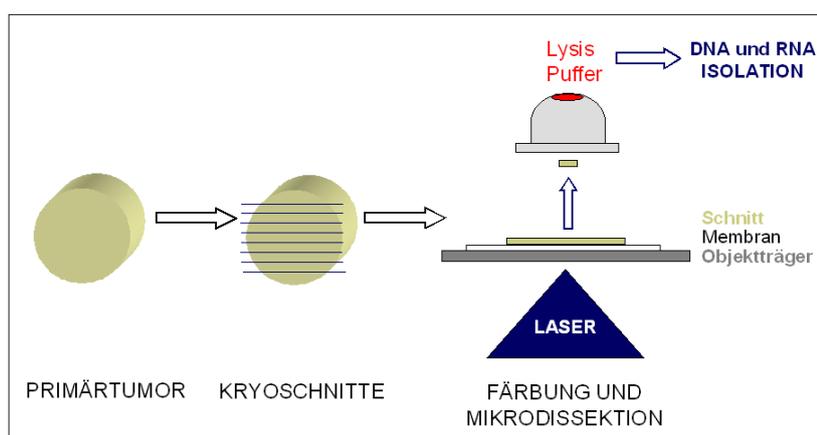
### 2.5.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Für die histologische Begutachtung werden  $5\ \mu\text{m}$  dicke Kryoschnitte angefertigt, auf einen Glasobjektträger übertragen, 15 min mit Aceton fixiert und 45 sec mit Meyer's Hämatoxylin gefärbt. Nach 30 min in Leitungswasser wird der Schnitt für 2 min mit Eosin 0,1% gefärbt, 1 min in  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gewaschen, in 70%, 90% und 100% Ethanol dehydriert und 15 min in Xylol fixiert.

Für die Mikrodissektion des Primärtumors werden ebenfalls  $5\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt, auf eine Polyethylenmembran auf dem Glasobjektträger gelegt und gefärbt. Allerdings müssen die Färbebedingungen für die Mikrodissektion verändert werden, da auch RNA aus den Zellen isoliert werden soll. Aus diesem Grund wird die Inkubation mit Hämatoxylin auf 30 sec reduziert und nur maximal fünf Minuten in Leitungswasser gebläut. Die Eosin Gegenfärbung entfällt, da bei diesem Schritt auch die DNA geschädigt wird. Die weiteren Dehydrierungsschritte werden wie gewohnt durchgeführt. Die Behandlung mit Xylol entfällt ebenfalls. Die Schnitte werden anschließend bei  $37^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

### 2.5.2 Lasermikrodissektion

Für die Mikrodissektion und das Katapultieren der Gewebestücke wird das PALM Microbeam System (Bernried) verwendet.



**Abbildung 2.1: Durchführung der Lasermikrodissektion.** Die  $5\ \mu\text{m}$  dicken Kryoschnitte aus dem Primärtumor werden auf eine Polyethylenmembran übertragen, gefärbt und getrocknet. Mit dem Laser werden max.  $10000\ \mu\text{m}^2$  große Areale herausgeschnitten, mit einem Laserimpuls hoch katapultiert und von einem darüber angebrachten Tubendeckel in Lysispuffer aufgefangen.

Ein mikrodisssektiertes Areal besteht jeweils aus 3-5 Stücken, von denen jedes nicht größer als  $10000 \mu\text{m}^2$  ist. Nach dem Herauslasern der Tumorzellen wird mit Hilfe eines Laserimpulses jedes Stück nach oben katapultiert und im Deckel des Reaktionsgefäßes, in den zu Beginn  $5 \mu\text{l}$  Lysispuffer (Dyna) pipettiert werden, aufgefangen. Anschließend überprüft man am Mikroskop, ob sich die Stücke im Deckel des Reaktionsgefäßes befinden und zentrifugiert kurz ab.

Das PALM Laser-Mikrodisssektionsmikroskop wurde von Altana Pharma zur Verfügung gestellt.

## 2.6 Einzelzellen

Für die folgende Studie wurden, wenn möglich, Lymphknoten und/oder Knochenmark der Patienten gesammelt und mit Hilfe von histologischen Markern auf epitheliale Einzelzellen hin untersucht. Bei 22 Lymphknoten und 9 Knochenmark-Punktaten war eine Untersuchung nicht möglich. Die Isolation der einzelnen disseminierten Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten wurde von Sabine Schilling im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

## 2.7 Methode zur Isolation von DNA und mRNA

Die mikrodisssektierten Zellareale des Primärtumors, bzw. die isolierten disseminierten epithelialen Einzelzellen werden zuerst in LiDS-haltigem Lyse-Puffer (Dyna) lysiert. Bei der mRNA-Isolierung macht man sich den Poly-A-Schwanz der mRNA zu Nutze, über den das Molekül an das Oligo-dT(25)-Nukleotid der paramagnetischen Beads der Firma Dynal gebunden wird. An einem Magneten kann die mRNA von der DNA und dem Zelldebris getrennt werden. Nach mehreren Waschschritten, bei denen die DNA, die sich in den Überständen befindet, gesammelt werden kann, werden die Reagenzien für die cDNA-Synthese zugegeben (Abb. 2.1). Zunächst lässt man bei Raumtemperatur die cDNA-Synthese-Primer binden (Klein et al. 2002). Die verwendeten Primer weichen von dem veröffentlichten Protokoll ab. Bei den Primern handelt es sich um den T7N8C Primer und den T7TC Primer jeweils mit einer  $7 \mu\text{M}$  Endkonzentration.

### Verwendete Primer:

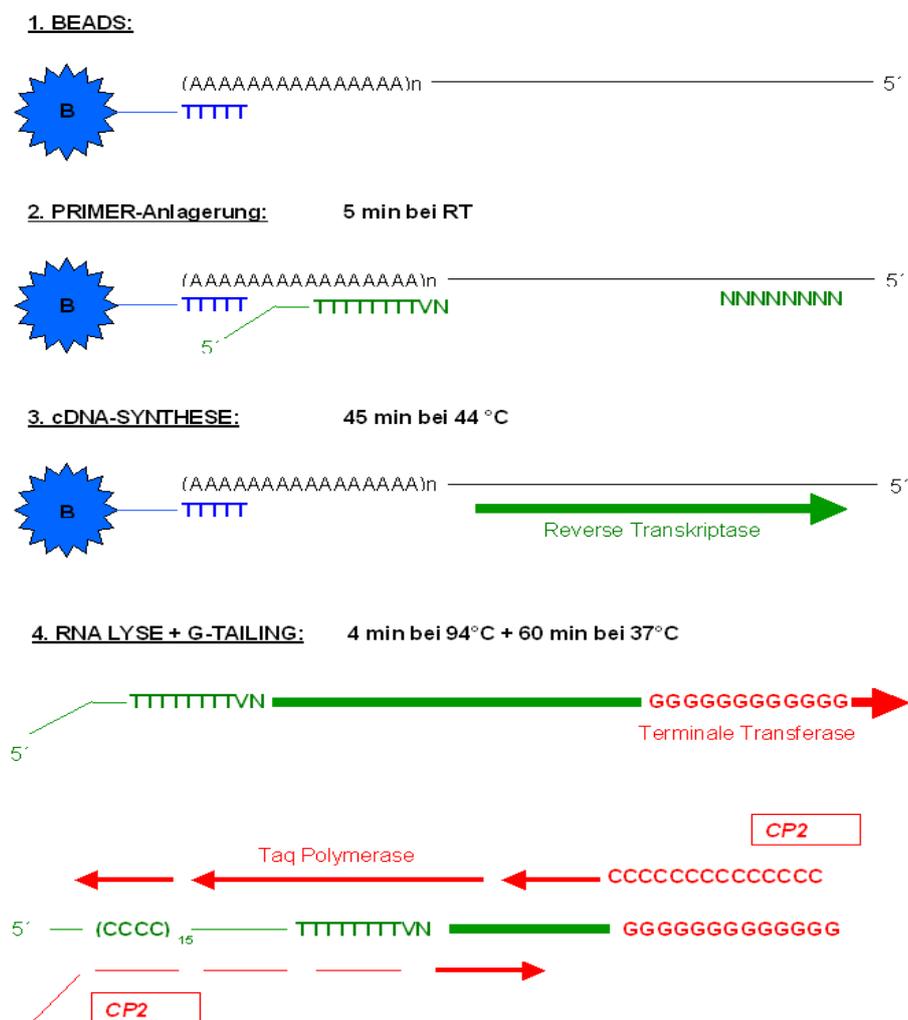
T7N8C:        5'- (CCC)<sub>5</sub> TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGN (N)<sub>7</sub> -3'  
(N = A, C, G oder T)

T7TC:        5'- (CCC)<sub>5</sub> TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT (TTT)<sub>4</sub> TTV N-3'  
(V = A, G, oder C)

Der T7TC-Primer lagert sich durch die VN-Nucleotide an das 5'-Ende des PolyA-Schwanzes an. Der T7N8C-Primer bindet mit seinen acht N-Nucleotiden zufällig an die mRNA. Ausgehend von diesen Primern, startet die Reverse Transkriptase die cDNA-Synthese. Nach

der Denaturierung der RNA/cDNA Hybridmoleküle bei 94°C liegt nur noch einzelsträngige cDNA vor.

Im nächsten Schritt folgt das G-Tailing. Die Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) besitzt die Eigenschaft am 3'-Ende von einzelsträngiger DNA mit sehr hoher Effizienz und von doppelsträngiger DNA mit deutlich niedrigerer Effizienz unspezifisch Desoxynucleotide anzuhängen, dass heißt, sie braucht dazu keine Matrizen. Auf diese Weise erhält man durch Anbieten nur eines der vier Nucleotide einen homopolymeren Schwanz variabler Länge. In diesem Fall werden der TdT nur G-Nucleotide zur Verfügung gestellt, die diese dann am 3'-Ende der cDNA anhängt. Die Terminale Transferase muss anschließend inaktiviert werden. Der Einbau der G-Nucleotide endet aufgrund sterischer Gegebenheiten nach etwa 15-30 Basen.



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Methode zur Isolation der mRNA mit reverser Transkription und globaler Amplifikation der cDNA.** Nach Bindung der mRNA an die Beads (Schritt 1) befindet sich die DNA im Überstand und kann ebenfalls isoliert werden.

Die cDNA Amplifikation erfolgt mittels PCR. Die verwendeten Primer binden dabei im ersten Zyklus an das von der terminalen Transferase angefügte G-Ende und im zweiten Zyklus an die neu entstandene G(15)-Sequenz, die zur Poly-C-Sequenz der cDNA-Synthese Primer

komplementär ist (Abb. 2.1). In den folgenden Zyklen findet eine exponentielle Amplifikation statt. Um Kontaminationen der Proben und dem Abbau der RNA vorzubeugen, wird die Herstellung der primären Amplifikate in einem separaten und unter weitgehend RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

### 2.7.1 Vorbereitung der Dynal-Beads

Für ein mikrodisektiertes Areal werden 20 µl, für eine Einzelzelle 10 µl Beads verwendet. Nachdem die Probe 1:1 mit LiDS-Waschpuffer gemischt und an den Magneten gegeben wurde, wird der Überstand vorsichtig abgenommen. Die paramagnetischen Beads werden ein zweites Mal mit 20 µl LiDS-Waschpuffer gewaschen, an den Magneten gegeben und der Überstand erneut abgenommen. Die gewaschenen Beads werden in 22 µl Lysispuffer (Dynal) aufgenommen und anschließend auf Eis gestellt.

### 2.7.2 Isolation der mRNA

Die Bindung der RNA an die Beads erfolgt während 30 min unter langsamer Rotation bei Raumtemperatur. Anschließend kann die RNA mit Hilfe der Beads an einem Magneten isoliert werden. Die Reaktionsgefäße werden in einen speziellen Ständer mit Magnet gestellt. Nach ungefähr 1 min haben alle Beads/RNA an den Magneten gebunden. Die DNA befindet sich dann im Überstand und wird in einem silaniserten Tube gesammelt. Damit die DNA möglichst restlos isoliert werden kann, wird erneut mit 20 µl cDNA-Waschpuffer+Igepal gewaschen, die Probe an den Magneten gegeben und der DNA-Überstand in das silanierte Tube überführt. Es muss darauf geachtet werden, dass beim Waschen keine Beads mitgenommen werden. Die Beads mit der daran gebundenen RNA werden in 20 µl cDNA-Waschpuffer/Tween aufgenommen, in ein frisches Tube pipettiert, an den Magneten gegeben und der Überstand in das silanierte Tube überführt. Die Beads werden ein letztes Mal mit 20 µl cDNA-Waschpuffer/Igepal resuspendiert, an den Magneten gegeben und auf Eis gestellt. Zuerst werden MIX 1 und 2 für die cDNA Synthese (3.1.2.1.) hergestellt, bevor schließlich der letzte Überstand abgenommen und erneut in das silanierte Tube überführt wird.

<u>cDNA-Waschpuffer:</u>	Endkonzentration	Stocklösung
	50 mM Tris/HCl	500 µl 1M, pH 8
	75 mM KCl	750 µl 1M
	10 mM DTT	100 µl 1M
	0,25% Igepal	25 µl 100%
oder	0,50% Tween	50 µl 100%
		mit DEPC H <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen

### 2.7.2.1 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese wird unter Rotation in einem Hybridisierungssofen durchgeführt, damit die Partikel, an die die mRNA gebunden ist, nicht sedimentieren. Der Hybridisierungssofen inklusive Hybridisierungsröhrchen muss vor Beginn auf 44°C vorgeheizt werden.

Zu den Beads/RNA werden jeweils 10 µl von Mix 1 pipettiert und bei RT für einige Minuten stehen gelassen, damit sich die cDNA-Synthese Primer anlagern können. Mix 2 wird zunächst ohne die Reverse Transkriptase (RT, Superscript) angesetzt. Diese wird erst vor Zugabe von ebenfalls 10 µl Mix 2 dazu pipettiert. Anschließend werden die Proben auf Eis gestellt. Die cDNA-Synthese läuft bei 44°C für 45 min bei langsamer Rotation. Dazu werden die Proben an den vorgeheizten Gläsern des Hybridisierungssofens befestigt.

<u>MIX 1 (1x):</u>	5x RT-Puffer	2,0 µl
	0.1M DTT	1,0 µl
	Igepal 10%	0,5 µl
	H <sub>2</sub> O	0,5 µl
	Primer	6,0 µl
<u>Primer:</u>	1 vol T7N8C (200µM) + 1 vol T7TC (100µM)	
<u>MIX 2 (1x):</u>	5x RT-Puffer	2,0 µl
	0.1M DTT	1,0 µl
	10mM dNTP	1,0 µl
	H <sub>2</sub> O	5,0 µl
	RT, SSII	1,0 µl

### 2.7.2.2 3'-Tailing

Für das Tailing wird die PCR-Maschine (MJ, Peltier Thermal Cycler) auf 94°C vorgeheizt. Es muss darauf geachtet werden, dass nach der cDNA-Synthese keine Beads mehr an der Gefäßwand kleben. Die Beads werden einmal in 20 µl Tailing-Waschpuffer gewaschen, jeweils 10 µl Tailing-Mix zu den Beads pipettiert und gut resuspendiert.

<u>Tailing-Waschpuffer:</u>	Endkonzentration	Stocklösung
	50mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500 µl 1M, pH 7
	1mM DTT	10 µl 1M
	0,25% Igepal	25 µl 100%
	mit DEPC H <sub>2</sub> O. auf 10 ml auffüllen	

<u>TAILING-MIX (1x):</u>	40 mM MgCl <sub>2</sub>	1,0 µl
	1 mM DTT	1,0 µl
	2 mM dGTP	1,0 µl
	200 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 µl
	H <sub>2</sub> O	6,5 µl

Damit die Probe nicht verdampft, wird sie mit 40 µl PCR-Öl überschichtet und 4 min bei 94°C in einer PCR-Maschine (MJ) inkubiert. Anschließend kommen die Proben direkt auf Eis. Pro Reaktionsgefäß werden 0,8 µl TdT (14 U/µl) zugegeben, gemischt und im MJ für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der terminalen Transferase erfolgt bei 70°C für 5 min in der PCR-Maschine.

### 2.7.2.3 PCR

Es werden jeweils 35 µl pro Tube von PCR-Mix 1 unter das Öl pipettiert und in die PCR-Maschine gestellt. Die Probe wird bis auf 78°C erhitzt, dann wird das Programm angehalten. 5,5 µl von PCR-Mix 2 werden möglichst zügig direkt zu den Proben in der Maschine gegeben. Nach der letzten Probe wird die Pause aufgehoben („Hot-start“).

<u>PCR-MIX 1 (1x):</u>	Puffer 1 BM, Expand Long Template	4,0 µl
	20% Formamid	7,5 µl
	H <sub>2</sub> O	24,0 µl
<u>PCR-MIX 2 (1x):</u>	24 µM CP <sub>2</sub> -Primer	2,5 µl
	10 mM dNTP	1,75 µl
	TLT (Polymerase, 3,5U/µl)	1,5 µl
<u>CP<sub>2</sub> Primer:</u>	5'-TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC CCC CCC -3'	

<u>PCR-Programm:</u>	1.	78°C	0:30
	2.	94°C	0:15
	3.	65°C	0:30
	4.	68°C	2:00
	5.	zurück zu 2.	19 Zyklen
	6.	94°C	0:15
	7.	65°C	0:30
	8.	68°C	2:30 + 10sec/Zyklus
	9.	zurück zu 6.	20 Zyklen
	10.	68°C	7:00
	11.	04°C	∞

### 2.7.2.4 PCR zur Kontrolle der Probenqualität

Von jeder Probe wird eine Kontroll-PCR mit  $\beta$ -Aktin, EF1- $\alpha$  und EGP durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Proben für die Hybridisierung auf die Filterarrays geeignet waren, wenn die PCR mindestens für  $\beta$ -Aktin und EF1- $\alpha$  positiv war.

#### Verwendete Primer:

- $\beta$ -Aktin 5': 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA -3'
- $\beta$ -Aktin 3': 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC -3'
- EGP 5': 5'-GCG AGT GAG AAC CTA CTG -3'
- EGP 3': 5'-CAC ATC AGC TAT GTC CAC ATC -3'
- EF1- $\alpha$  5': 5'-TGC CCC AGG ACA CAG AGA CT -3'
- EF1- $\alpha$  3': 5'-CTG TGT CGG GGT TGT AGC CA -3'

<u>PCR-MIX:</u>	H <sub>2</sub> O	7,25 $\mu$ l
	10x PCR-Puffer	1,0 $\mu$ l
	3'-Oligonucleotid (8 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
	5'-Oligonucleotid (8 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
	BSA	0,25 $\mu$ l
	Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	0,1 $\mu$ l
	Probe	1,0 $\mu$ l

<u>10 x PCR-Puffer:</u>	500 mM KCl
	100 mM Tris HCl pH 8,5
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM jedes dNTPs

<u>PCR-Programm:</u>	1.	94°C	2:00	
	2.	58°C	0:30	
	3.	72°C	0:20	
	4.	94°C	0:40	
	5.	58°C	0:30	
	6.	72°C	0:20	4.-6. 14 Zyklen
	7.	94°C	0:40	
	8.	58°C	0:30	
	9.	72°C	0:20	7.-9. 45 Zyklen
	10.	94°C	0:40	
	11.	58°C	0:30	

12. 72°C 0:20
13. 6°C ∞

Die PCR wird im Robocycler Gradient96 der Firma Stratagene durchgeführt.

### 2.7.3 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die verwendete Gelkonzentration beträgt 1,5 % Agarose in 1x TBE. SYBR Gold (Verdünnung 1:1600) wird mit dem Probenlaufpuffer Dye im Verhältnis 1:2 gemischt. Davon werden jeweils 3 µl SYBR-Dye-Mix zu jedem PCR-Produkt dazugeben und auf das Gel aufgetragen. Als Marker pipettiert man 4 µl SYBR Gold (1:1600) zu 10 µl 1kb-Marker (Ladder). Durch Anlegen einer Spannung von 100-150 V bei 400 mA und einer Laufzeit von 30-60 min (je nach gewünschter Auftrennung) werden die PCR-Produkte im Horizontal-Gelelektrophorese-System aufgetrennt. Anschließend kann das Gel auf dem UV-Transilluminator und mit Hilfe einer Kamera photographiert und das Bild digital gespeichert werden.

#### 10 x TBE pH 8,0

890 mM Tris/HCl  
890 mM Borsäure  
20 mM EDTA

#### SYBR Gold

Verdünnung 1:1600 in DMSO

#### Probenpuffer (=Dye)

25% Ficoll-400  
0,3% w/v Orange-G  
in 1x TBE lösen

### 2.7.4 Isolation der DNA

Nachdem die mRNA an die paramagnetischen Beads gebunden hat (siehe 2.7.2), kann die DNA aus den Überständen der Waschschriffe in silanisierten Reaktionsgefäßen gesammelt werden.

#### 2.7.4.1 Fällung der DNA und Waschen der Pellets

Den Überständen wird je 1 µl Glycogen zugegeben und die DNA mit jeweils 80 µl 100% Ethanol über Nacht gefällt. Die gefällte Probe wird für 45 min bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert, die Überstände vorsichtig bis auf 10 µl abgenommen und mit 170 µl 70% EtOH aufgefüllt. Das Pellet wird für 10 min auf dem Schüttler gewaschen, anschließend bei RT für 10 min bei 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Dieser Waschschriff wird noch zwei Mal wiederholt. Zum Schluss wird der Überstand vorsichtig komplett abgenommen und das Pellet unter dem Abzug getrocknet.

### 2.7.4.2 PK-Verdau

Zu jedem Ansatz pipettiert man 4,5  $\mu$ l Proteinase K-Mix und lässt die Probe für 10 min bei 40°C im Heizblock schütteln bis sich das Pellet gelöst hat. Der Proteinase K Verdau läuft für 10 h bei 42°C in der PCR-Maschine. Nachdem das zelluläre Protein entfernt ist, wird die Aktivität der Proteinase K durch 10 min bei 80°C gestoppt.

<u>Proteinase K-Mix:</u>	OFA	0,5 $\mu$ l
	Tween 10%	0,13 $\mu$ l
	Igepal 10%	0,13 $\mu$ l
	Proteinase K (10 mg/ml)	0,26 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	3,5 $\mu$ l

### 2.7.4.3 Mse-Adapter-PCR

Zu der PK verdauten Probe pipettiert man 0,25  $\mu$ l Mse I (50 U/ $\mu$ l) und 0,25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Der Verdau läuft bei 37°C für 3 h und wird zum Schluss bei 65°C für 5 min inaktiviert. Das Restriktionsenzym MseI (Schnittstelle: T▼TAA) fragmentiert die DNA, wodurch 5'-TA Überhänge entstehen, an die ein Adapter aus den Oligonucleotiden LIB1 und ddMse11 ligiert werden kann. Parallel zum Mse I-Verdau werden die Adapter aneinander gebunden. Für das Adapter-Annealing-Programm wird im MJ ein Gradient von 65°C bis 15°C für je 1 min pro Temperaturschritt programmiert.

<u>Adapter-Mix:</u>	OFA Plus Puffer	0,5 $\mu$ l
	LIB 1 100 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
	ddMSE11 100 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	1,5 $\mu$ l

Die Ligation der nun durch Basenpaarung miteinander verbundenen Adapter läuft über Nacht in der PCR-Maschine bei 15°C. Zu der MseI verdauten Probe pipettiert man jeweils 5  $\mu$ l Ligations-Mix.

<u>Ligations-Mix:</u>	Adapter	3 $\mu$ l
	ATP 10 mM	1 $\mu$ l
	T4-DNA-Ligase (5 U)	1 $\mu$ l

Für die nun folgende primäre PCR wird zu der an den Adapter ligierten Zelle 40  $\mu$ l PCR-Mix zugegeben. Im letzten Schritt der PCR werden die Adapter-Enden aufgefüllt, wodurch komplementäre Bindungsstellen für den LIB1 Primer entstehen. Das Amplifikat kann

anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden und dient als Ausgangsmaterial für alle nun folgenden Untersuchungen.

<u>PCR-Mix:</u>	Expand-Long-Template Puffer 1	3 $\mu\text{l}$
	dNTPs 10 mM	2 $\mu\text{l}$
	Expand-Long-Template PoMix (3,5 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
	H <sub>2</sub> O	35 $\mu\text{l}$

<u>PCR-Programm:</u>	1.	68°C	3 min
	2.	94°C	40 sec
	3.	57°C	30 sec
	4.	68°C	1 min 30 sec +1 sec/Zyklus
	5.	zu 2.	14 mal
	6.	94°C	40 sec
	7.	57°C	30 sec +1°C/Zyklus
	8.	68°C	1 min 45 sec +1 sec/Zyklus
	9.	zu 6.	7 mal
	10.	94°C	40 sec
	11.	65°C	30 sec
	12.	68°C	1 min 53 sec +1 sec/Zyklus
	13.	zu 10.	21 mal
	14.	68°C	3 min 40 sec

#### 2.7.4.4 Kontroll-PCR

Zur Qualitätskontrolle der Proben aus 2.7.4.3 wird eine Kontroll-PCR (siehe 2.7.2.4) mit Primerpaaren für CK 19 (Zytokeratin), p53 Exon 2/3 und Exon 8/9 und eine Elektrophorese (2.7.3) durchgeführt.

#### Verwendete Primer:

- CK 19-5': GAA GAT CCG CGA CTG GTA C
- CK 19-3': TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG
- p53 exon2/3-5': GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
- p53 exon2/3-3': CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA
- p53 exon8/9-5': AGG ACC TGA TTT CCT TAC TGC
- p53 exon8/9-3': GAG GTC CCA AGA CTT AGT AC

Eine gute Probenqualität zeigt sich durch positive PCR-Ergebnisse bei allen 3 verwendeten Primerpaaren. Es stellte sich heraus, dass eine positive spezifische PCR für eine

erfolgreiche CGH völlig ausreichend ist. Von dem primären PCR-Produkt wird 0,5 µl pro Ansatz zugegeben.

## 2.8 Hybridisierungen und Datenerhebung

Es existieren eine Vielzahl von Möglichkeiten RNA und DNA zu hybridisieren. In diesem Fall soll die RNA, bzw. cDNA nicht-radioaktiv markiert und auf selbsthergestellte Filter-Arrays hybridisiert werden. Bei der CGH wird unterschiedlich markierte Kontroll-DNA und Referenz-DNA auf Metaphasen hybridisiert.

### 2.8.1 Hybridisierung von cDNA Filterarrays zur Expressionsanalyse

Bei der Hybridisierung versucht man immobilisierte DNA auf einer Nylon- oder Nitrocellulosemembran mit Hilfe einer markierten Sonde, die an die membrangebundene DNA bindet, nachzuweisen. Mit Hilfe eines spezifischen enzymgekoppelten Antikörpers, der an die markierte Sonde bindet, kann das Ergebnis visualisiert werden.

#### 2.8.1.1 Markierung der primären PCR Produkte

Bei dem hier verwendeten nicht-radioaktiven Nachweis wird die Sonde mit Digoxigenin (DIG) markiert. Das Digoxigenin ist über einen Spacer mit dem Nucleotid verbunden, durch den die Reportergruppe aus dem Rückrad der Nucleinsäure herausragt und von dem Digoxigenin-spezifischen Antikörper, an den das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist, erkannt werden kann. Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgt über 5'-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (CSPD=Chemiluminescence Substrate). Chemilumineszente Substrate emittieren Licht, das einen Röntgenfilm schwärzt.

<u>Markierungsmix (1x):</u>	Thermo Sequenase Reaction Puffer	2,5 µl
	1/7-dNTP-Mix	1,75 µl
	Formamid 20%	7,5 µl
	CP <sub>2</sub> Primer (24 µM)	5,0 µl
	Dig-UTP	2,5 µl
	Thermo-Sequenase (32 U/µl)	0,5 µl
	PCR-H <sub>2</sub> O	30,5 µl
	unverdünnte Probe	1,0 µl

<u>1/7-dNTP-MIX:</u>	CTP	5 µl
	GTP	5 µl
	ATP	5 µl
	TTP	4,2 µl
	H <sub>2</sub> O	30,8 µl

CP2-Primer: 5'-TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC CCC CCC -3'

<u>PCR-Programm:</u>			
1.	94°C	02:00	
2.	68°C	04:00	
3.	94°C	00:15	
4.	68°C	04:00	
5.	zu 3.	10 mal	
6.	94°C	00:15	
7.	68°C	04:00 + 10 sec/Zyklus	
8.	zu 6.	2 mal	
9.	68°C	07:00	
10.	04°C	∞	

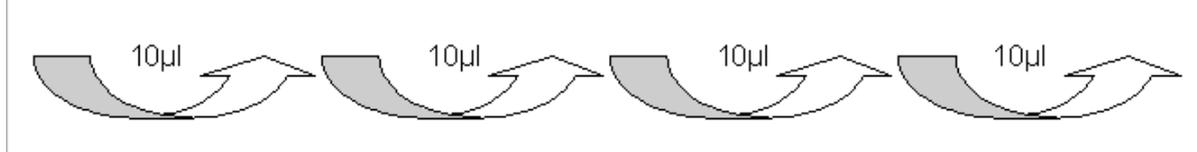
Die PCR wurde in der Perkin Elmer (PE) PCR-Maschine durchgeführt.

### 2.8.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Der DNA-Gehalt nach der Reamplifikation unterliegt Schwankungen. Da für die Filter-Hybridisierung eine definierte Menge an DNA benötigt wird, muss diese für jede Probe genau bestimmt werden. Mit Hilfe einer Ethidiumbromidplatte, einer Verdünnungsreihe und durch den Vergleich mit einer bekannten Standardkonzentration (Hering Sperm DNA, 10 mg/ml) wird die Konzentration der Probe bestimmt. Dazu löst man für ein 1,5%iges Agarosegel 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TBE. Nach dem Erhitzen gibt man 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zu 100 ml Agarose und gießt jeweils 10 ml in eine Petrischale.

**Tabelle 2.2: Herstellung einer Verdünnungsreihe.**

Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5
Konzentration 1/20	Konzentration 1/40	Konzentration 1/80	Konzentration 1/160	Konzentration 1/320
19 µl H <sub>2</sub> O +1 µl Probe	10 µl H <sub>2</sub> O			

Von jeder Verdünnung der Probe und der Kontroll-DNA wird jeweils 1 µl reihenweise auf eine Ethidiumbromid-Platte pipettiert. Nach dem Trocknen wird unter dem UV-Schirm die Konzentration bestimmt. Entsprechen die Intensitäten der Probenreihe der Kontrollreihe, so beträgt die Konzentration der Probe 1 µg/µl. Ist der erste Tropfen der Probe (1/20) zum

Beispiel gleich dem dritten Tropfen (1/80) der Kontrolle, so ergibt sich eine Konzentration von 0,25 µg/µl (= 1/80:1/20)

### 2.8.1.3 Herstellung der cDNA Filter-Arrays

Die Isolation und Amplifikation neuer Sonden und das Auftragen der Sonden auf die Nylonmembran wurden ausführlich in der Dissertation von Sabine Schilling beschrieben. Eine Übersicht über alle auf den Filter gespotteten cDNAs ist im Ergebnisteil unter 3.6 zu finden. Die detaillierte Arraymatrix ist im Anhang beigelegt (Abb. 7.2).

### 2.8.1.4 Gewinnung chromosomaler DNA aus E.coli und E.Coli-PBS Verdau

Unspezifische Bindungen können zu falsch-positiven Signalen führen. Um das zu verhindern wird ein verdautes E.coli-DNA/PBS-Gemisch beim der Prähybridisierung der Filter zugegeben. Hierfür setzt man über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler eine E.coli Kultur (100 ml) aus LB-Medium mit 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) pro ml Medium an. Die Bakterien werden durch 15-minütige Zentrifugation mit 4000 g bei 4°C pelletiert und in 10 ml Puffer R resuspendiert. Anschließend pipettiert man 200 µl RNAse- (10 mg/ml, pH 8), 200 µl Lysozym- (100 mg/ml, pH 8) und 450 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, pH 8) dazu, vortext und lässt alles bei 37°C über Nacht im Wasserbad inkubieren. Für die Extraktion der DNA gibt man 1 Vol Chloramphenicol (Roth) dazu, vortext und zentrifugiert das Protein ab. Die obere Phase, in der sich die DNA befindet wird vorsichtig abgenommen, in frische Röhrchen überführt und die DNA für ca. 1 min im Ultraschall geschert. Sobald die Viskosität der Lösung abnimmt, kann die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAc (pH 5,2) und 1 Vol Isopropanol bei -20°C für mindestens 1h gefällt werden. Nachdem die DNA (15.000 x g, 30 min, 4°C) pelletiert wurde, lässt man das Pellet lufttrocknen. Um die optische Dichte (OD) zu bestimmen nimmt man das Pellet in eine definierte Menge Wasser auf.

LB-Medium (pH 7):

Pepton	50 g
Hefe Extrakt	25 g
NaCl	50 g

Mit Aqua dest. auf 5 l auffüllen und autoklavieren.

Puffer R (pH 8):

EDTA (50 mM)	1,861 g
TRIS (50 mM)	0,6055 g
Tween20 (5%)	500 µl
Triton X-100 (5%)	500 µl

mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

<u>Verdau:</u>	E.coli/PBS (100 µg/ml)	1 ml
	NT-Puffer	100 µl
	DNase (3 mg/ml)	1 µl

5 -10 min bei 15°C verdauen und zur Kontrolle 5 µl mit 3 µl Dye/Sybr auf ein Gel auftragen.

<u>10x NT-Puffer (Nick-Translationspuffer):</u>	0,5 M Tris/HCl (pH 7,5)
	0,1 M MgSO <sub>4</sub>
	1 mM DTT
	500 µg/ml BSA

### 2.8.1.5 Prähybridisierung und Hybridisierung der Filter

#### Prähybridisierung:

Zuerst werden 6 ml Dig Easy Hyb-Lösung auf 45°C erwärmt. Von dieser Lösung füllt man 5 ml in eine Hybridisierungsröhre, gibt die vorher in 2x SSC eingelegten Filter dazu und lässt die Filter bei langsamer Rotation im Hybridisierungssofen bei 45°C drehen. Zu der restlichen 1 ml Dig Easy Hyb-Lösung pipettiert man vorher verdautes pBS-E.coli-DNA Gemisch (100 µg/ml Endkonzentration), das bei 95°C für 5 min denaturiert und zum Filter dazugeben wird. In diesem Schritt werden unspezifische nicht humane Sequenzen abgedeckt. Die Prähybridisierung läuft über Nacht bei 45°C im Hybridisierungssofen unter Rotation weiter.

#### Hybridisierung:

Die Hybridisierung der Filter wird ebenfalls in Hybridisierungsröhren durchgeführt, die in dem Hybridisierungssofen rotieren (beides von der Firma Hybraid). Dazu nimmt man 1 ml Prähybridisierungsmix ab und pipettiert Sonde (Endkonzentration 1 µg/ml) und Heringssperm DNA (50 ng/µl) dazu. Anschließend denaturiert man das Gemisch für 4 min bei 94°C, gibt es sofort wieder zum Filter und lässt es bei 45°C über Nacht weiterdrehen.

### 2.8.1.6 Entwicklung der Filter-Arrays

Die Entwicklung der Filter wird mit dem Dig Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids von Roche durchgeführt. Man beginnt mit einer Reihe von Waschschritten, die dazu dienen überschüssige Sonden zu entfernen und unspezifische Bindungen zu lösen. Zuerst werden alle Waschlösungen im Wasserbad auf 68°C erwärmt. Durch die Erhöhung der Temperatur wird die Stringenz erhöht. Die Hybridisierungslösung wird abgeschüttet und kann bei -20°C aufbewahrt und wieder verwendet werden. Indem man den Filter einige Male in 2x SSC + 0,1% SDS und anschließend kurz in 1x SSC + 0,1% SDS dreht wird die restliche Sonde abgewaschen. Anschließend lässt man den Filter in 0,5x SSC + 0,1% SDS für 15 min bei 68°C und dann erneut zwei Mal in 0,1x SSC + 0,1% SDS für 30 min bei 68°C im Ofen

drehen. Zum Schluss wird der Filter kurz in eine Schale mit Puffer 1 geben und wieder abgegossen.

#### 20x SSC:

175,3 g NaCl  
88,2 g Natriumcitrat  
mit 800 ml H<sub>2</sub>O auffüllen  
pH 7 einstellen  
auf 1l mit H<sub>2</sub>O auffüllen

#### 10% SDS:

100 g SDS (Dodecyl Sulfate Natrium-Salz)  
900 ml H<sub>2</sub>O bidest  
bei 68°C lösen  
pH 7,2 einstellen  
auf 1l mit H<sub>2</sub>O auffüllen

#### Waschlösungen:

- 2x SSC + 0,1% SDS:  
50 ml 20x SSC + 5 ml 10% SDS + 445 ml H<sub>2</sub>O
- 1x SSC + 0,1% SDS:  
25 ml 20x SSC + 5 ml 10% SDS + 470 ml H<sub>2</sub>O
- 0,5x SSC + 0,1% SDS:  
12,5 ml 20x SSC + 5 ml 10% SDS + 482,5 ml H<sub>2</sub>O
- 0,1x SSC + 0,1% SDS:  
2,5 ml 20x SSC + 5 ml 10% SDS + 492,5 ml H<sub>2</sub>O

#### Puffer 1:

Maleinsäure 4,64 g  
NaCl 3,50 g  
in 400 ml H<sub>2</sub>O lösen  
mit NaOH-Plättchen auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren

Um unspezifische Antikörperbindungen auf dem Filter zu blockieren gibt man 25 ml der vorher hergestellten Blockierungslösung auf den Filter und lässt diesen 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler langsam schaukeln.

#### 10% Block:

10 g blocking reagent (Milchpulver) mit 100 ml Puffer 1 mischen und zum Lösen in Intervallen von je 30 sek in der Mikrowelle erhitzen (max. 10x, ungefähr 3 min).

#### Blocking-Lösung:

5 ml 10%igen Block mit 45 ml Puffer 1 mischen.

Anschließend erfolgt die Bindung des Antikörpers (anti-Dig-AP), indem man 2,5 µl Antikörper-Lösung zu der Blockierungslösung pipettiert und für weitere 30 min bei Raumtemperatur schaukeln lässt. Überschüssige Antikörper werden durch zweimaliges Waschen des Filters in Puffer 1-Tween-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler entfernt. Die überschüssige Flüssigkeit lässt man abtropfen und legt den Filter auf eine saubere Folie. Nachdem man den CSPD-Mix auf Filter verteilt hat, schließt man die Folie ohne Luftblasen und lässt alles 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend tropft man die Flüssigkeit erneut ab und überführt den Filter in eine saubere Folie. Um die Alkalischen Phosphatase zu aktivieren legt man die Folie mit dem Filter für 15 min bei 37°C in den Ofen. Zum Schluss wird der Filter in einer Entwicklungsbox (Siemens) fixiert und ein Film (Scientific Imaging Film, Biomax, Kodak) aufgelegt. Dieser wird nach unterschiedlichen Entwicklungszeiten (zwischen 2 min und 1 h) durch einen neuen Film ersetzt. Die Entwicklung erfolgt in einer Entwicklermaschine (Compact 35, Airclean 200).

#### Puffer 1-Tween-Lösung:

500 ml Puffer 1 mit 1,5 ml Tween mischen.

Für die Nachweisreaktion wird der Ofen auf 37°C eingestellt und 990 µl Puffer 3 mit 10 µl CSPD (= Substrat für die Alkalische Phosphatase) gemischt. Der Filter wird zweimal kurz in Puffer 3 gewaschen.

#### Puffer 3:

5 ml Tris 1M, pH 9,5                      Tris    100 mM

5 ml NaCl 1M                                NaCl   100 mM

40 ml H<sub>2</sub>O

#### **2.8.1.7 Scannen der Filter und Auswertung der Filterdaten**

Die entwickelten Filter wurden mit dem Snapscan 1236s Scanner von Agfa mit einer Auflösung von 600 dpi eingescannt. Für die Bearbeitung wurde das Programm ScanWise (Agfa) verwendet. Anschließend wurde mit der ArrayVision Software (Imaging Research Inc) ausgewertet. Dabei wird ein auf den Filter angepasstes Raster der gespotteten cDNAs über den gescannten Filter gelegt, jeder Punkt danach ausgerichtet und als positiv bestätigt. Anhand von 3-5 ausgewählter Flächen (ohne Signalpunkte oder starke Schwärzung) wird der durchschnittliche Hintergrund berechnet und abgezogen. Die Signale werden im Verhältnis zu 6 Haushaltsgenen normalisiert, indem man diese gleich „1“ und den Hintergrund gleich „0“ setzt. Für jedes positiv gewertete Signal wird ein Wert gemessen, der in eine Excel Tabelle exportiert wird. Jedes Gen befindet sich zur Kontrolle zwei Mal auf dem Filter, so dass zum Schluss der Auswertung der Mittelwert dieser beiden Punkte berechnet werden muss.

## 2.8.2 Comparative genomische Hybridisierung zur Analyse des Genoms

Bei der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) werden mit Digoxigenin-11-dUTP markierte Tumor-DNA (Einzelzelle/mikrodissektiertes Areal aus Primärtumor) und Biotin-16-dUTP markierte Referenz-DNA (gesunder Spender) auf menschliche Metaphasen hybridisiert. Der Nachweis erfolgt mit Anti-Digoxigenin-FITC und Anti-Avidin-Rhodamin Antikörpern und kann am Mikroskop durch Messen der Intensitäten der einzelnen Fluorochrome ausgewertet werden.

### 2.8.2.1 Anfertigung von Metaphase-Objektträgern

Für eine Lymphozytenkultur wird zu 20 ml peripherem Blut eines gesunden Spenders 250 ml Kulturmedium für Lymphozyten gegeben, in 10 ml Kulturflaschen aufgeteilt und 3 Nächte bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert.

<u>Lymphozyten-Kulturmedium:</u>	250 ml RPMI Medium ohne L-Glutamin
	15% FCS
	Penicillin 200 U/ml
	Streptomycin 200 U/ml
	L-Glutamin 2 mM
	3 mg Phytohemagglutinin

Damit die Zellteilung in der Metaphase stoppt wird in jede Zellkulturflasche 100 µl Colcemidlösung (10 µg/ml) pipettiert und für eine Stunde weiter inkubiert. Die Kulturen werden in 15 ml Falkons überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend gibt man für 8 min bei 37°C 10 ml hypotone 75 mM KCl Lösung dazu. Die Zellen werden abzentrifugiert und in einem eiskalten Fixativ, einem Gemisch aus Methanol und Eisessig (7,5 ml Methanol, 2,5 ml Eisessig 100%) vorsichtig resuspendiert. Anschließend wäscht man die Zellen zwei Mal in 10 ml Fixativ und zentrifugiert erneut ab. Auf diese Weise werden die Reste der lysierten Erythrozyten entfernt. Nach diesem Schritt kann die Zellsuspension in 3 ml Fixativ bei -20°C für einige Monate aufbewahrt werden.

Bevor man die Zellen Auftropfen kann, müssen die Glasobjektträger über Nacht in Küvetten mit 100% EtOH gereinigt werden. Der Alkohol wird anschließend abgegossen und die Objektträger in kaltem destilliertem Wasser auf 4°C abgekühlt. Die in Methanol/Eisessig gelagerte Lymphozytenkultur wird mit einer Transferpipette aus einem Abstand von ca. 50 cm auf die Objektträger aufgetropft und auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet. Nasse Tücher, die vorher auf die Heizplatte gelegt werden erhöhen die Luftfeuchtigkeit und sollen so zu einer besseren Qualität der Metaphasen beitragen.

### 2.8.2.2 Markierung der PCR-Produkte

Bei der Markierung der primären PCR-Produkte werden die Desoxynucleotid-Derivate Digoxigenin-11-dUTP (Einzelzelle oder mikrodisektiertes Areal aus Primärtumor) und Biotin-16-dUTP (Referenz-DNA) bei der Reamplifikation eingebaut.

<u>Reamplifikations-Mix:</u>	Expand-Long-Template Puffer 1	4 µl
	LIB1 10 µM	6 µl
	7/8 dNTP-Mix	1,4 µl
	1 mM Biotin-dUTP (Referenz) oder 1 mM Digoxigenin-dUTP (Tumor)	1,75 µl
	Taq-Polymerase 5 U/µl	1 µl
	H <sub>2</sub> O	26,35 µl

<u>7/8 dNTP-Mix:</u>	8,75 mM	dTTP
	10 mM	dATP
	10 mM	dCTP
	10 mM	dGTP

Zu dem Markierungs-PCR-Mix wird 0,75 µl primäres PCR-Produkt als Template zugegeben.

<u>PCR-Programm:</u>	1.	94°C	1 min
	2.	60°C	30 sec
	3.	72°C	2 min
	4.	94°C	30 sec
	5.	60°C	30 sec
	6.	72°C	2 min + 20 sec/Zyklus
	7.	zu 4.	10 Zyklen

Nach der Reamplifikation wird der LIB1 Primer durch einen Restriktionsverdau mit Tru I (Isozym von Mse I, Schnittstelle entsprechend T▼TAA) entfernt. 2 µl Puffer R und 2 µl Tru I (50 U/µl) werden zu dem Reamplifikationsansatz (40 µl) pipettiert und für 2 bis 3 Stunden bei 65°C inkubiert.

### 2.8.2.3 Fällung markierter DNA

Die markierte Test- und Referenz-DNA (Pool aus normalen diploiden Zellen) wird über Nacht bei -20°C gefällt. Für ein mikrodisektiertes Areal aus dem Primärtumor ist der doppelte Ansatz markierter DNA nötig. Anschließend wird alles gut gevortext.

	<i>Einzelzelle</i>	<i>Primärtumor</i>
Dig markierte Referenz-DNA	40 µl	80 µl
Biotin markierte Test-DNA	40 µl	80 µl
Humane Cot1-DNA	80 µl	100 µl
Heringssperm DNA	10 µl	10 µl
Natrium Acetat 3M (pH 5,2)	17 µl	27 µl
kalter unvergällter 100% EtOH (-20°C, 2,5-faches Volumen)	400 µl	600 µl

#### **2.8.2.4 Vorbehandlung des Metaphasen-Spread-Objektträgers**

Die Metaphase-Objektträger (OT) werden parallel zur Herstellung des DNA-Hybridisierungsansatzes (siehe 2.8.2.5) vorbereitet. Zu Beginn werden die Objektträger unter dem Mikroskop nach geeigneten Auftragsflächen durchsucht und die Stellen markiert, an denen ausreichend Metaphasen zu finden sind. Die Objektträger werden kurz in 2x SSC gewaschen und zum Entfernen der RNA für 1h bei 37°C mit 200 µl RNase-Lösung (100 µg/ml in 2x SSC) inkubiert. Anschließend wird die RNase durch dreimaliges 5-minütiges Waschen in 2x SSC entfernt. Zu 100 ml 10 mM HCl (pH 2), die im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde, pipettiert man 50 µl Pepsin-Lösung (Stock: 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O). Abhängig von der Menge der Zytoplasmareste lässt man den Objektträger 2 bis 4 min in der Pepsin-HCl Lösung inkubieren. Durch zweimaliges Waschen in 1x PBS wird der Verdau gestoppt. Die OT's werden in 200 µl PFA-Lösung (50 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS mit 1% PFA) 5 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt fixiert das Chromatingerüst und stabilisiert die Chromosomenstruktur. In der aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min in 70%, 85%, 100%) werden die OT dehydriert. Die getrockneten Objektträger werden dann für 1 min 45 sec bis maximal 2 min in der auf 70°C vorgewärmten Formamidlösung (pH 7,1) denaturiert.

<u>Formamidlösung:</u>	100% Formamid	70 ml
	20x SSC	10 ml
	H <sub>2</sub> O	20 ml
	pH-Wert auf pH 7,1 einstellen.	

Die optimale Dauer der Denaturierung ist abhängig von der Kondensation der Chromosomen und der Intensität des Pepsinverdaus und muss individuell ausgetestet werden. Nach einer weiteren aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min in 70%, 85%, 100%) lässt man den OT trocknen und pipettiert anschließend die vorbereitete DNA-Probe (siehe 2.8.2.5) auf das vorher markierte Feld. Ein 18x18 mm großes Deckglas und Fixogum Montagekleber verschließen das Hybridisierungsfeld.

### 2.8.2.5 DNA-Hybridisierung auf Metaphasen

Die Herstellung des DNA-Hybridisierungsansatzes erfolgt parallel zur Vorbehandlung der Metaphase-Objektträger (siehe 2.8.2.4). Für den DNA-Hybridisierungsansatz wird die präzipitierte DNA bei 4°C für 45 min mit 14000 rpm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl unvergälltem 70% EtOH gewaschen und 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Alkohol wird vorsichtig abgenommen und das Pellet bei 37°C getrocknet. In 7 µl 100% deionisiertem Formamid im Heizblock bei 37°C für 45 min wird das Pellet unter Schütteln gelöst. Nachdem man 7 µl Master-Mix dazu pipettiert, lässt man die Probe erneut für 30 min bei 37°C schütteln.

Master-Mix:                    4x SSC  
    30% Dextran Sulfat

Die Probe wird erneut abzentrifugiert und 6 min im Heizblock bei 78°C denaturiert. Anschließend lässt man die Proben für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren. Bei diesem Schritt hybridisiert die Cot-1 DNA an die repetitiven Sequenzen der Test/Referenz-DNA. Die Proben werden noch kurz abzentrifugiert und können dann auf die vorbehandelten Metaphasen-Objektträger (siehe 2.8.2.4) aufgetropft und anschließend mit einem Deckglas abgedichtet werden. Die Hybridisierung erfolgt für 2-3 Nächte in einer feuchten Kammer bei 37°C.

### 2.8.2.6 Entwicklung der Objektträger

Alle verwendeten Lösungen müssen vor Beginn auf 42°C erwärmt werden. Nach Entfernen des Deckglases wird das Dextranulfat zwei Mal 5 min in 4x SSC auf dem Schüttler abgewaschen. Anschließend wird der Objektträger drei Mal bei 42°C in Formamid-Lösung und drei Mal in 1x SSC gewaschen. Dann wird in 1x PBS + 0,2% Tween gewaschen und die Proteinbindungsstellen für 45 min mit 1 ml 3% Superblock-Lösung blockiert. Zum Schluss taucht man den OT kurz in 1x PBS + 0,2% Tween, deckt ihn mit einem 24x55 mm Deckglas ab und inkubiert ihn für 45 min in einer feuchten Kammer im Dunkeln bei 37°C mit dem Antikörper-Mix. Nicht gebundene Fluorochrome werden durch dreimaliges Waschen für 5 min auf dem Schüttler in 4x SSC + 0,2% Tween entfernt. Abschließend werden die Chromosomen mit DAPI gefärbt, indem man für 2 min 1 ml DAPI-Lösung auf den OT gibt. Die in Wasser gespülten und getrockneten OT werden mit Vectashield H-1000 und großen Deckgläsern eingedeckelt.

<u>Formamidlösung:</u>	100% Formamid	150 ml
	20x SSC	30 ml
	H <sub>2</sub> O	120 ml
	pH-Wert auf pH 7,5 einstellen	
<u>3% Superblock-Lösung:</u>	1x PBS + 0,2% Tween (pH 8,5)	
	3% BSA Fraktion V	
	5% FCS	
<u>Antikörper-Mix:</u>	1% Superblock	180 µl
	Anti-Digoxigenin-FITC	20 µl
	Avidin-Rhodamin	2 µl
<u>1% Superblock-Mix:</u>	1x PBS + 0,2% Tween (pH 8,5)	
	1% BSA Fraktion V	
	5% FCS	
<u>DAPI-Lösung:</u>	4x SSC + 0,2% Tween	1 ml
	DAPI	10 µg

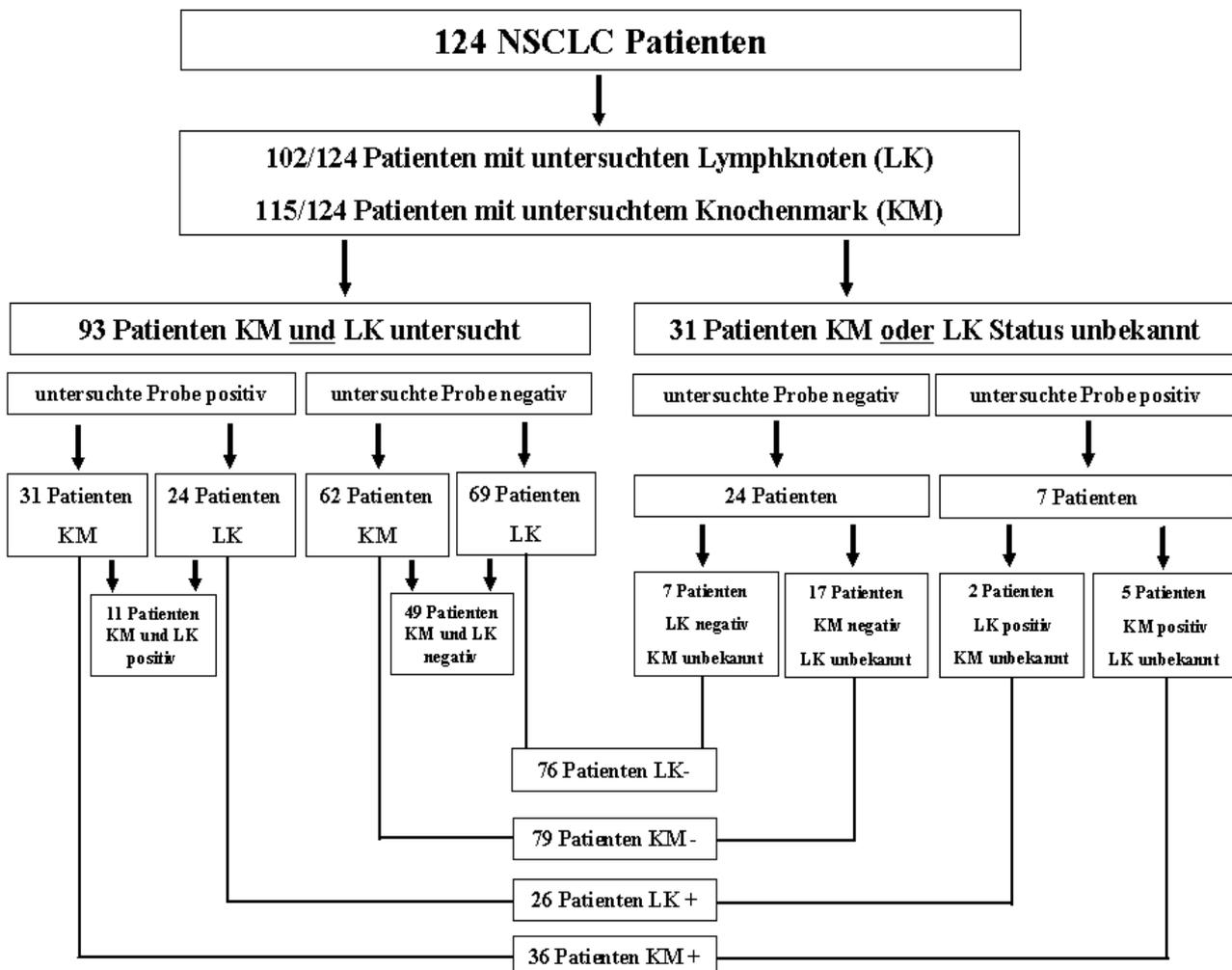
### 2.8.2.7 Auswertung der CGH

Alle bei der Auswertung der CGH verwendeten Geräte und die Software stammen von Leica. Die Aufnahmen der hybridisierten Metaphasen werden mit einem Fluoreszenzmikroskop, an das eine CCD-Kamera angeschlossen ist durchgeführt. mit Hilfe der Leica-QFISH Software werden zwischen 10 und 15 geeignete Metaphasen aufgenommen. Dazu werden die Fluoreszenzfilter für DAPI, FITC (Test-DNA) und Cy3.5 (Referenz-DNA) verwendet. Mit der Leica-QCGH Software können die photographierten Metaphasen nach der DAPI-Bänderung in ein Karyogramm sortiert werden. Nach der Normalisierung vergleicht die Software die Intensitäten der einzelnen Fluorochrome für jedes einzelne Chromosom. In einem Gesamt-CGH Profil wird dann der Mittelwert aller ausgewerteten Metaphasen einer Hybridisierung dargestellt. Bei einem Verhältnis der Intensitäten von FITC zu Cy3.5 von mehr als 1,25 handelt es sich um einen Gewinn, bei einem Verhältnis kleiner als 0,75 um einen Verlust eines Chromosomenabschnitts.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung disseminierter Tumorzellen aus Lymphknoten und Knochenmark

Von 1999 bis 2003 wurden Lymphknoten- und Knochenmarkproben von Bronchialkarzinompatienten aus der Asklepios Klinik (Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, München-Gauting) am Institut für Immunologie aufgearbeitet und auf disseminierte Tumorzellen durchsucht. Insgesamt wurden im Laufe dieser Jahre 128 Patienten untersucht, von denen in Zusammenarbeit mit Dr. Wulf Siene die klinisch-pathologischen Daten gesammelt wurden. Bei 124 dieser Patienten handelte es sich um M0-Patienten, das heißt um Patienten ohne Fernmetastasen. Von den insgesamt 124 NSCLC-Patienten konnten von 102 die Lymphknoten und von 115 Patienten das Knochenmark untersucht werden (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1: Patientenkollektiv.** Übersicht aller 124 untersuchten Proben aus Lymphknoten und Knochenmark.

Die Knochenmarkpunkttate und die Lymphknoten wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen die epithelialen Marker EpCAM und Zytokeratin (CK) nach disseminierten Zellen durchsucht. Es

wurden mindestens eine Million Zellen auf Adhäsions-Objektträger pipettiert und nach positiven Zellen durchsucht. Diese konnten dann mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert werden. Als Negativkontrolle wurde eine Färbung mit dem MOPC21-Isotyp durchgeführt. Beim Knochenmark kam es gelegentlich zur Gerinnung, was die Untersuchung der Probe verhinderte. Bei 93 Patienten konnten sowohl das Knochenmark, als auch die Lymphknoten nach disseminierten Tumorzellen durchsucht werden. Positive Zellen wurden bei 31 Patienten im Knochenmark ( $KM_{MRD+}$ ) und bei 24 Patienten im Lymphknoten ( $LK_{MRD+}$ ) gefunden. Von diesen Patienten waren 11 doppelt positiv ( $EZ_{MRD++}$ ), das heißt sowohl im Knochenmark, als auch im Lymphknoten wurden positive Zellen entdeckt. Bei 62 Patienten war das Knochenmark ( $KM_{MRD-}$ ), bei 69 Patienten die Lymphknoten ( $LK_{MRD-}$ ) frei von gefärbten Zellen. 49 dieser Patienten waren in beiden Organen ohne Nachweis disseminierter Tumorzellen ( $EZ_{MRD--}$ ). Bezieht man die Patienten mit ein, bei denen nur eines der beiden Kompartimente untersucht werden konnte ( $n = 31$ ), so wurden bei insgesamt 36 Patienten 115 disseminierte Tumorzellen im Knochenmark und bei 25 Patienten 102 disseminierte Zellen in den Lymphknoten gefunden. Bei 79 Patienten war das Knochenmark und bei 76 Patienten die untersuchten Lymphknoten negativ. Eine Übersicht aller klinisch-pathologischen Parameter unterteilt nach dem LK bzw. KM Status findet sich in Tabelle 3.1.

**Tabelle 3.1: Klinisch-pathologische Parameter aller Patienten im Vergleich der untersuchten Organe Lymphknoten und Knochenmark.**

	Alle	LK <sub>MRD</sub> <sup>+</sup>	LK <sub>MRD</sub> <sup>-</sup>	LK n.v.	KM <sub>MRD</sub> <sup>+</sup>	KM <sub>MRD</sub> <sup>-</sup>	KM n.v.
<b>Anzahl der Patienten</b>	124	25	77	22	36	79	9
<b>Geschlecht</b>							
Männer	94	21 22.3%*	61 64.9%	12 12.8%	26 27.7%	59 62.8%	9 9.6%
Frauen	30	4 13.3%	16 53.3%	10 33.3%	10 33.3%	20 66.7%	0
<b>Tumor</b>							
T1	22	4 18.2%	15 68.2%	3 13.6%	5 22.7%	15 68.2%	2 9.1%
T2	72	13 18.1%	45 62.5%	14 19.4%	20 27.8%	47 65.3%	5 6.9%
T3	17	5 29.4%	11 64.7%	1 5.9%	5 29.4%	10 58.8%	2 11.8%
T4	13	3 23.1%	6 46.2%	4 30.8%	6 23.1%	7 53.9%	0
<b>Lymphknoten</b>							
N0	63	7 11.1%	44 69.8%	12 19.1%	21 33.3%	39 61.9%	3 4.8%
N1	28	5 17.9%	20 71.4%	3 10.7%	6 21.4%	19 67.9%	3 10.7%
N2	27	11 40.7%	13 48.2%	3 11.1%	5 18.5%	19 70.4%	3 11.1%
N3	2	1 50.0%	0	1 50.0%	2 100.0%	0	0
NX	5	1 20.0%	1 20.0%	3 60.0%	2 40.0%	3 60.0%	0
<b>Metastasierung</b>							
M0	124	25 20.2%	77 62.1%	22 17.7%	36 29.0%	79 63.7%	9 7.3%
M1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Staging</b>							
0	0	0	0	0	0	0	0
IA	15	2 13.3%	11 73.3%	2 13.3%	5 33.3%	9 60.0%	1 6.7%
IB	37	3 8.1%	25 67.6%	9 24.3%	12 32.4%	24 64.9%	1 2.7%
IIA	4	0	3 75.0%	1 25.0%	0	3 75.0%	1 25.0%
IIB	25	4 16.0%	20 80.0%	1 4.0%	5 20.0%	17 68.0%	3 12.0%
IIIA	28	12 42.9%	12 42.9%	4 14.3%	6 21.4%	19 67.9%	3 10.7%
IIIB	15	4 26.7%	6 40.0%	5 33.3%	8 53.3%	7 46.7%	0
IV	0	0	0	0	0	0	0
<b>R-Klassifikation</b>							
R0	104	19 18.3%	68 65.4%	17 16.3%	29 27.9%	67 64.4%	8 7.7%
R1	13	3 23.1%	7 53.9%	3 23.1%	4 30.8%	9 69.2%	0
R2	7	3 42.9%	2 28.6%	2 28.6%	3 42.9%	3 42.9%	1 14.3%
<b>Grad</b>							
G1, G2 (niedrig)	72	18 25.0%	40 55.6%	14 19.4%	18 25.0%	50 69.4%	4 5.6%
G3, G4 (hoch)	38	5 13.2%	26 68.4%	7 18.4%	13 34.2%	20 52.6%	5 13.2%
GX	14	2 14.3%	11 78.6%	1 7.1%	4 28.6%	9 64.3%	1 7.1%
<b>Histologie</b>							
Adenokarzinom	55	14 25.5%	25 45.5%	16 29.1%	16 29.1%	37 67.3%	2 3.6%
Plattenepithelkarzinom	53	8 15.1%	40 75.5%	5 9.4%	15 28.3%	32 60.4%	6 11.3%
Großzelliges Karzinom	10	2 20.0%	7 70.0%	1 10.0%	4 40.0%	6 60.0%	0
Sonstige NSCLC	6	1 16.7%	5 83.3%	0	1 16.7%	4 66.7%	1 16.7%

LK<sub>MRD</sub><sup>+</sup>, Lymphknoten mit disseminierten Tumorzellen; LK<sub>MRD</sub><sup>-</sup>, Lymphknoten ohne disseminierte Tumorzellen; KM<sub>MRD</sub><sup>+</sup>, Knochenmark mit disseminierten Tumorzellen; KM<sub>MRD</sub><sup>-</sup>, Knochenmark ohne disseminierte Tumorzellen; n.v., nicht vorhanden. \* Um einen Vergleich zwischen den untersuchten Organen KM und LK zu ermöglichen, addieren sich die Werte der klinisch-pathologischen Parameter jeweils pro Zeile und untersuchtem Organ auf 100%. Lymphknotenstatus N0: **p=0,00186**.

### **3.2 Einfluss klinisch-pathologischer Parameter auf das Überleben**

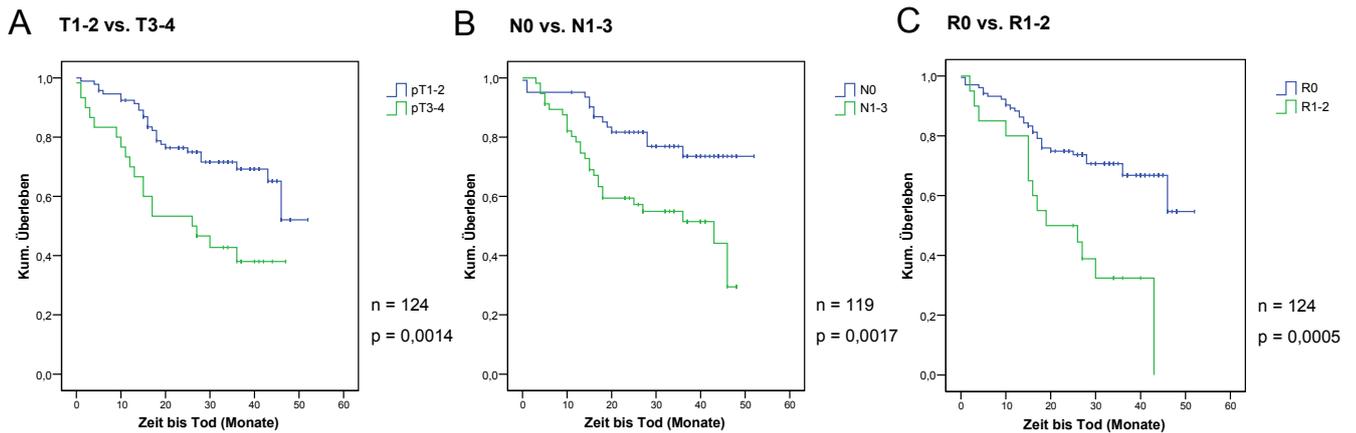
Verschiedene klinisch-pathologische Parameter, wie beispielsweise die Größe oder die Art des Tumors haben einen Einfluss auf das Überleben und den weiteren Krankheitsverlauf von NSCLC-Patienten. Mit den folgenden Überlebensanalysen sollte zum einen geklärt werden, ob das hier verwendete Kollektiv repräsentativ für NSCLC-Patienten ist und zum anderen, ob die pathologische Beurteilung, die Ergebnisse nach immunhistochemischer Färbung oder eine Kombination dieser Faktoren mehr prognostische Relevanz besitzen.

#### **Überlebensanalyse nach histopathologischen Parametern**

Die TNM-Klassifikation, mit der das genaue Stadium der Erkrankung anhand der Tumorgroße und -invasivität, dem Befall der Lymphknoten und der Metastasierung festgestellt wird, dient außerdem dazu eine Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf des Patienten zu geben. Ein weiterer wichtiger prognostischer Parameter ist der R-Status, der das Resektionsergebnis beschreibt. Mit R0 werden Tumore bezeichnet, die vollständig im Gesunden entfernt werden konnten, bei R1, bzw. R2 bleibt mikro- oder makroskopisch sichtbares Tumorgewebe zurück. Für NSCLC-Patienten mit großen, nicht vollständig resektierten Tumoren und mit Befall der regionalen Lymphknoten ist die Prognose deutlich schlechter als für Patienten in einem früheren Stadium der Erkrankung.

Nach dem Vergleich aller 124 Patienten bezüglich ihrer Tumorgroße und -invasivität ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen kleinen Primärtumoren im Stadium T1-2 und Primärtumoren im Stadium T3-4 ( $p=0,0014$ , Abb. 3.2 A). Keiner der Patienten mit T3-4 Tumoren überlebte mehr als 50 Monate. Zum gleichen Zeitpunkt waren von den Patienten mit T1-2 Tumoren noch 50% am Leben. Auch der pathologische Lymphknotenstatus (pN) hatte einen Einfluss auf das Überleben der Patienten ( $p=0,0017$ , Abb. 3.2 B). Vergleicht man Patienten mit und ohne Metastasen in den regionalen Lymphknoten ( $n=119$ , 5 Patienten ohne Angabe), überlebten Patienten bei denen die Lymphknoten frei von regionalen Metastasen waren (N0) deutlich länger als Patienten mit Lymphknotenmetastasen (N1-N3).

Da es sich bei den Patienten dieses Kollektivs ausschließlich um M0-Patienten handelt, konnte diesbezüglich keine Aussage getroffen werden.



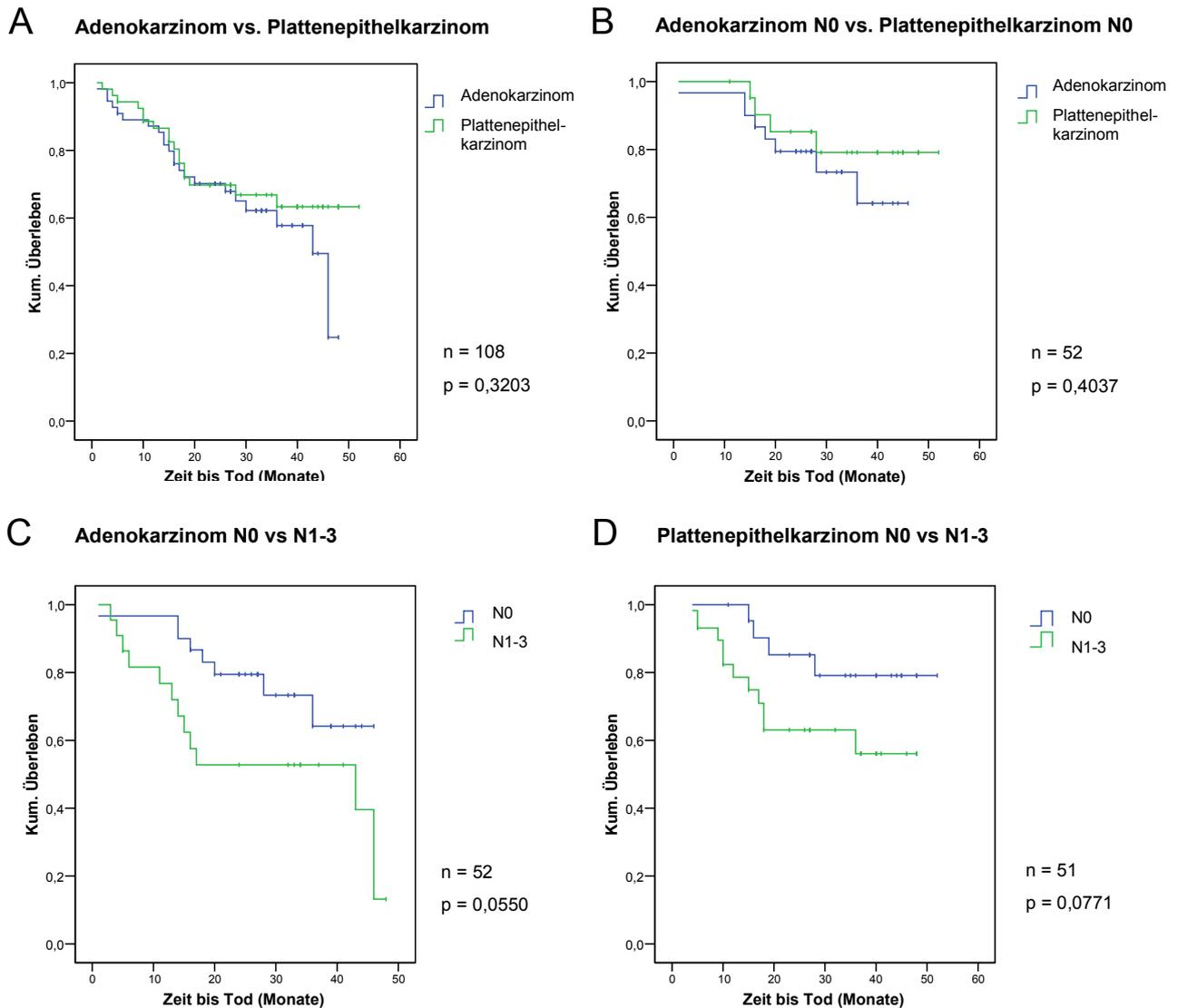
**Abbildung 3.2: Einfluss klinisch-pathologischer Parameter auf das Überleben aller M0-Patienten. A, Tumorstatus; B, Lymphknotenstatus; C, Resektion.**

War es dem Chirurgen möglich, den Tumor vollständig und im Gesunden zu entfernen (R0), erhöht sich die Überlebenszeit des Patienten signifikant ( $p=0,0005$ ). Keiner der Patienten mit R1 oder R2 überlebte mehr als 43 Monate, während zum gleichen Zeitpunkt von den R0-Patienten noch fast 70% lebten (Abb. 3.2 C).

Histologisch unterschiedliche Tumortypen unterscheiden sich möglicherweise auch in ihrer Biologie, Genetik und im Krankheitsverlauf. Das hier verwendete Patientenkollektiv besteht aus verschiedenen Tumortypen. Bei dem Großteil der 124 Patienten wurde entweder ein Adenokarzinom ( $n=55$ ) oder ein Plattenepithelkarzinom ( $n=53$ ) diagnostiziert. Bei 16 Patienten handelte es sich um Großzellige Bronchialkarzinome oder Bronchialkarzinome anderen Typs. Bezüglich des Überlebens konnte kein Unterschied zwischen Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom und Patienten mit einem Adenokarzinom festgestellt werden ( $p=0,3203$ , Abb. 3.3 A). Auch der Unterschied zwischen Patienten mit Plattenepithel- und Adenokarzinomen, ohne Befall der regionalen Lymphknoten (N0), war nicht signifikant ( $p=0,4037$ , Abb. 3.3 B).

Beim Vergleich des LK-Status der Patienten zeigte sich, dass sowohl bei den Adenokarzinomen ( $p=0,0550$ ) als auch bei den Plattenepithelkarzinomen ( $p=0,0771$ ) deutliche Unterschiede zwischen N0 und den Stadien N1-3 existieren (Abb. 3.3 C und D). Es starben deutlich mehr Patienten mit einem Lymphknotenstadium zwischen N1 und N3, als Patienten ohne Lymphknotenbefall (N0). Die beste Prognose hatten in diesem Kollektiv Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Lymphknotenstadium N0. Nach 45 Monaten lebten von diesen Patienten immer noch ca. 80%. Im Vergleich dazu waren es bei den Adenokarzinomen zu diesem Zeitpunkt ca. 65%.

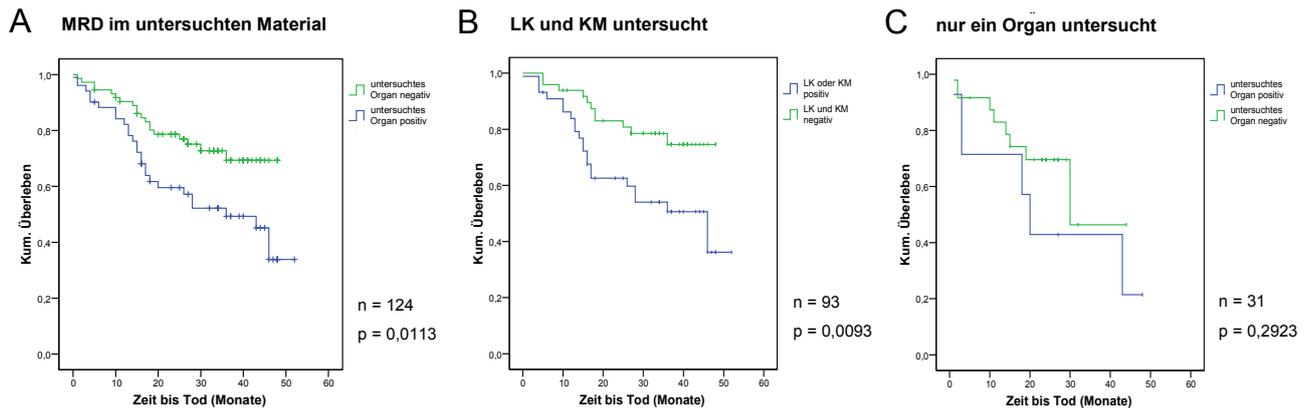
Anhand der prognostischen Parameter konnte gezeigt werden, dass das hier untersuchte Kollektiv repräsentativ für NSCLC-Patienten ist und dass in dem Kollektiv bezüglich des Überlebens keine Unterschiede zwischen Platten- und Adenokarzinomen existieren.



**Abbildung 3.3: Einfluss der beiden histologischen Hauptgruppen und dem Lymphknotenstatus auf das Überleben des Patientenkollektivs. A,** Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom; **B,** Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom ohne Befall der regionalen Lymphknoten (N0); **C,** Adenokarzinom mit und ohne Befall der regionalen Lymphknoten (bei drei Patienten N-Status unbekannt); **D,** Plattenepithelkarzinom mit und ohne Befall der regionalen Lymphknoten (bei zwei Patienten N-Status unbekannt).

### Überlebensanalyse nach immunocytochemischer Untersuchung

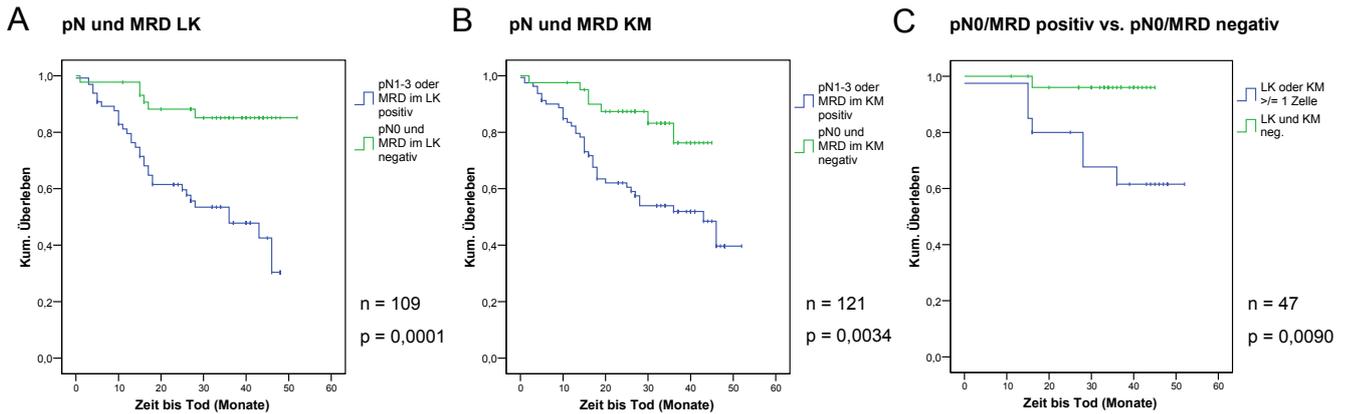
Mit Hilfe von anti-EpCAM, bzw. anti-CK Antikörpern ist es möglich disseminierte Tumorzellen epithelialen Ursprungs in Knochenmark, bzw. Lymphknoten nachzuweisen (minimal residual disease, MRD). Mit den folgenden Überlebensanalysen sollte geklärt werden, welchen Einfluss der immunhistochemische Nachweis dieser disseminierten Tumorzellen im untersuchten Material, d.h. in Lymphknoten oder Knochenmark auf das Überleben der Patienten hat. Von allen 124 Patienten konnte mindestens ein Organ immunhistochemisch untersucht werden. Bei 93 Patienten waren sowohl Knochenmark, als auch Lymphknoten für die Untersuchung vorhanden.



**Abbildung 3.4: Prognostischer Einfluss disseminierter Tumorzellen im untersuchten Material (Lymphknoten oder Knochenmark) auf das Überleben. A,** MRD im untersuchten Material aller 124 Patienten; **B,** Patienten mit untersuchtem Knochenmark und untersuchtem Lymphknoten (n=93); **C,** Patienten mit nur einem untersuchten Organ (n=31).

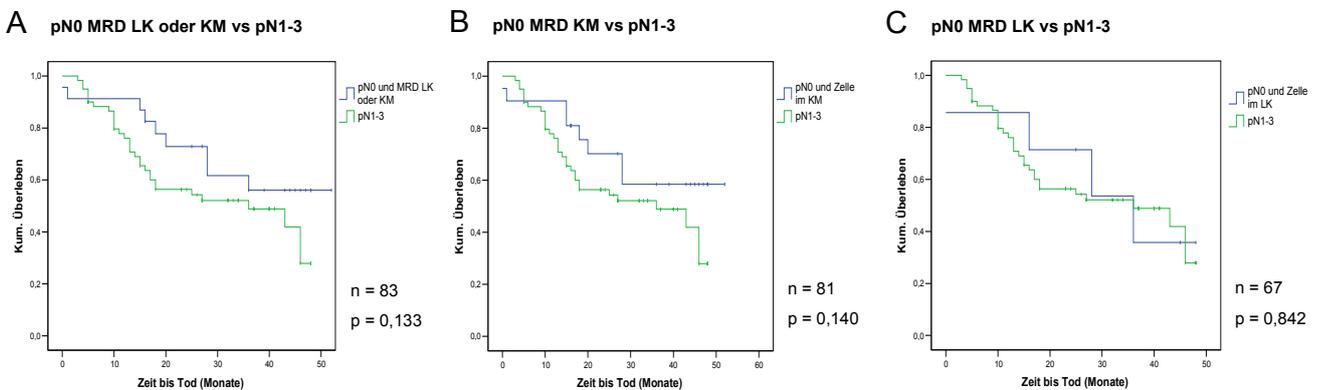
Ein signifikantes Ergebnis ließ sich bereits erkennen, wenn kein Unterschied zwischen disseminierter Tumorzelle aus dem Lymphknoten, bzw. aus dem Knochenmark gemacht wurde ( $p=0,0113$ , Abb. 3.4 A). Von Patienten mit MRD im untersuchten Material überlebten 50 Monate nach der Operation deutlich weniger, als Patienten ohne MRD. War die Untersuchung beider Organe möglich wurde der Unterschied noch deutlicher (Abb. 3.4 B,  $p=0,0093$ ,  $n=93$ ). Wurde im Knochenmark oder im Lymphknoten eine disseminierte Tumorzelle gefunden, so verkürzte sich die Zeit bis zum Versterben des Patienten. Beim Vergleich von Patienten bei denen jeweils nur ein Organ untersucht wurde, ergab sich bezüglich des Überlebens kein Unterschied (Abb. 3.4 C,  $p=0,2923$ ,  $n=31$ ).

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des pathologischen Lymphknotenstatus in Zusammenhang mit MRD im Knochenmark oder im Lymphknoten auf das weitere Überleben untersucht. Wurde das Ergebnis des Pathologen mit in die Auswertung einbezogen, d.h. das Lymphknotenstadium nach TNM Klassifikation ( $pN$ ), ergab sich für Patienten mit einem Hinweis auf Streuung, d.h. positiver Lymphknotenhistologie ( $pN1-3$ ) oder mit MRD, eine schlechtere Prognose, als für Patienten ohne jeden Hinweis auf Streuung, d.h. MRD und negativer Lymphknotenhistologie ( $pN0$ ). Dieses Ergebnis war unabhängig von der Lokalisation der disseminierten Tumorzellen (LK oder KM, Abb. 3.5 A und B). Allerdings hatte beim Vergleich von Patienten ohne Befall der regionalen Lymphknoten ( $pN0$ ) das Auffinden von disseminierten Tumorzellen in Knochenmark oder Lymphknoten einen negativen Einfluss auf das weitere Überleben. Patienten mit disseminierten Tumorzellen überlebten deutlich kürzer als Patienten ohne Tumorzellen (Abb. 3.5 C,  $p=0,0090$ ,  $n=47$ ). Das bedeutet, dass nur bei Patienten ohne pathologisch sichtbaren Befall der Lymphknoten die Tatsache, dass disseminierte Tumorzellen gefunden werden, einen Einfluss auf das Überleben besitzt. Bei Patienten mit befallenen Lymphknoten hat die histopathologische Beurteilung mehr Aussagekraft, als das Auffinden der disseminierten Tumorzellen.



**Abbildung 3.5: Relevanz disseminierter Tumorzellen bei Patienten ohne histopathologischen Befall der Lymphknoten.** **A**, MRD im Lymphknoten und histologischer Befund des Lymphknotens (pN); **B**, MRD im Knochenmark und histologischer Befund des Lymphknotens (pN); **C**, Patienten ohne Befall der regionalen Lymphknoten (pN0) und mit immunhistochemisch untersuchtem Lymphknoten und untersuchtem Knochenmark.

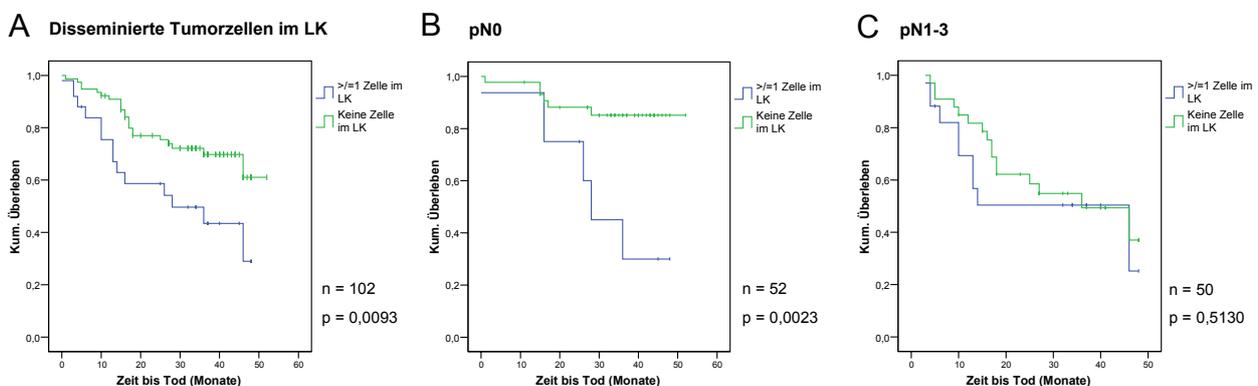
Im nächsten Schritt soll geklärt werden, ob der Effekt der disseminierten Tumorzellen auf das Überleben der Patienten, auf die Streuung oder das fortgeschrittene Wachstum des Tumors zurückzuführen ist. Hierfür wurden Patienten ohne eine pathologisch sichtbare Streuung in die regionalen Lymphknoten (pN0), aber mit disseminierten Tumorzellen in LK oder KM mit Patienten verglichen, bei denen eine Streuung in die Lymphknoten (pN1-3) festgestellt werden konnte. Bei den Patienten mit Befall der LK wurde vernachlässigt, ob disseminierte Tumorzellen in einem der untersuchten Organe gefunden wurden. Patienten ohne Befall der LK (pN0) aber mit disseminierten Tumorzellen in einem der untersuchten Organe zeigten bezüglich des Überlebens keine Unterschiede zu Patienten mit einem pathologisch sichtbaren Befall der LK (pN1-3). Diese Beobachtungen zeigten sich unabhängig von einer Unterteilung in MRD im Knochenmark oder MRD im Lymphknoten (Abb. 3.6 A-C).



**Abbildung 3.6: Einfluss disseminierter Tumorzellen auf das Überleben von Patienten ohne histopathologischen Befall der Lymphknoten im Vergleich zu Patienten mit Befall der Lymphknoten (pN1-3).** **A**, MRD in Lymphknoten oder Knochenmark von Patienten ohne Streuung in die Lymphknoten (pN0) und mit Streuung in die Lymphknoten (pN1-3); **B**, MRD im Knochenmark von Patienten ohne Streuung in die Lymphknoten (pN0) und mit Streuung in die Lymphknoten (pN1-3); **C**, MRD in Lymphknoten von Patienten ohne Streuung in die Lymphknoten (pN0) und mit Streuung in die Lymphknoten (pN1-3).

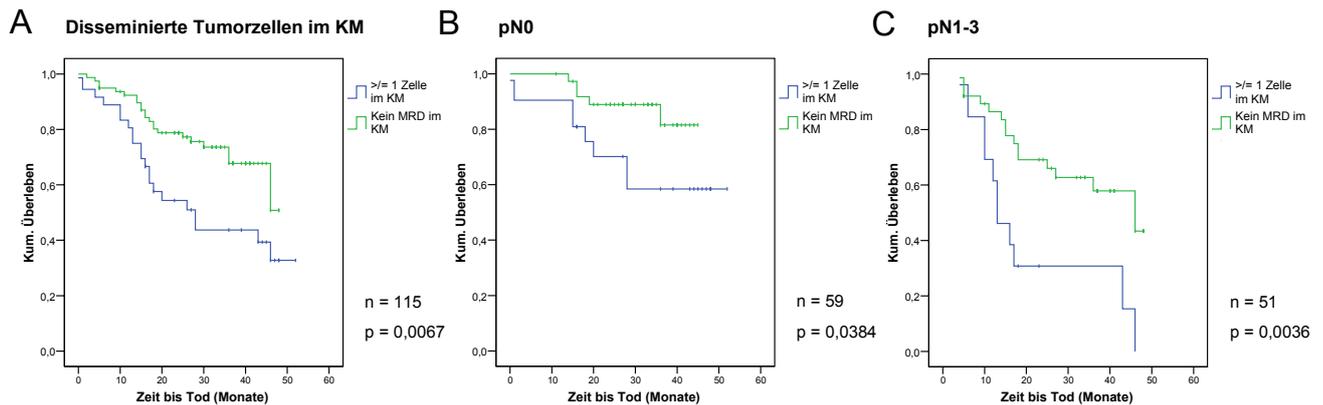
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dem untersuchten Kollektiv ein histologisch positiver Lymphknotenstatus (pN1-3) die gleiche Aussagekraft bezüglich des weiteren Überlebens der Patienten besitzt, wie die Tatsache, dass in Patienten ohne Streuung in die Lymphknoten (pN0) einzelne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark, bzw. im Lymphknoten gefunden wurden. Nur für Patienten ohne pathologischen Befall der Lymphknoten (pN0) besitzt das Feststellen einer minimalen residualen Erkrankung einen signifikanten prognostischen Wert.

Um zu klären, welcher Metastasierungsweg für NSCLC-Patienten von größerer Bedeutung für die weitere Prognose sein könnte, wurde im Folgenden der Einfluss disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark mit dem Einfluss disseminierter Tumorzellen aus den Lymphknoten auf das Überleben der Patienten verglichen. Insgesamt war es möglich von 102 der 124 Patienten die Lymphknoten und von 115 das Knochenmark auf disseminierte Tumorzellen hin zu untersuchen.



**Abbildung 3.7: Prognostischer Einfluss disseminierter Tumorzellen aus den Lymphknoten (LK) nach immunhistochemischer Untersuchung und Vergleich mit dem pathologischen N-Status. A,** disseminierte Tumorzellen im Lymphknoten aller untersuchten Patienten (n = 102); **B,** disseminierte Tumorzellen aus den Lymphknoten von Patienten mit Lymphknotenstadium pN0 (n = 52); **C,** disseminierte Tumorzellen aus den Lymphknoten von Patienten mit Lymphknotenstadium pN1-3 (n = 50).

Wurde bei den Patienten eine Tumorzelle im Lymphknoten entdeckt, so verschlechterte sich die Prognose signifikant (Abb. 3.7 A). Nach 40 Monaten lebten von diesen Patienten nur noch knapp 40%. Noch anschaulicher wurde die Bedeutung dieser Zellen, wenn die Patienten mit Stadium pN0 (Abb. 3.7 B) getrennt von den Patienten mit Stadium pN1-3 (Abb. 3.7 C) betrachtet wurden. Die Unterschiede zwischen pN0 Patienten mit einer disseminierten Tumorzelle und Patienten ohne Zelle waren deutlich signifikant (n=52, p=0,0023). Nach 40 Monaten lebten nur noch 30% der pN0 Patienten mit disseminierter Tumorzelle, von den pN0 Patienten ohne Tumorzelle allerdings noch ca. 85% (Abb. 3.7 B). Beim Vergleich von Patienten im Stadium pN1-3 waren diese Unterschiede nicht mehr festzustellen (Abb. 3.7 C; p=0,5130; n=50).



**Abbildung 3.8: Prognostischer Einfluss disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark (KM) nach immunohistochemischer Untersuchung und Vergleich mit dem pathologischen N-Status. A,** disseminierte Tumorzellen im Knochenmark aller untersuchten Patienten (n=115); **B,** disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit Lymphknotenstadium pN0 (n=59); **C,** disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit Lymphknotenstadium pN1-3 (n=51). Bei fünf Patienten war der pN-Status unbekannt.

Auch im Knochenmark bedeutete das Auffinden der disseminierten Tumorzellen eine für den Patienten signifikant schlechtere Prognose (Abb. 3.8 A). Nach 40 Monaten lebten von den Patienten mit einer disseminierten Zelle noch etwas über 40%, von den Patienten ohne MRD noch ca. 65%. Nach erneuter Trennung der pN0-Patienten (n=59) von den pN1-3 Patienten (n=51, bei 5 Patienten pN-Status unbekannt) waren die Unterschiede bei den pN0 Patienten mit untersuchtem Knochenmark allerdings weniger deutlich, als bei den pN0 Patienten mit untersuchtem Lymphknoten (Abb. 3.8 B, p=0,0384). Nach 40 Monaten lebten von Patienten mit einer disseminierten Tumorzelle im Knochenmark noch fast 60% (Patienten mit Zelle im LK nach 40 Monaten 30%), von den Patienten ohne Zelle ca. 80% (Patienten ohne Zelle im LK über 85%). Bei den Patienten mit untersuchtem Lymphknoten war es bei einem N-Stadium zwischen pN1 und pN3 für das Überleben nicht mehr ausschlaggebend, ob eine disseminierte Tumorzelle im Lymphknoten gefunden wurde oder nicht. Bei den Zellen aus dem Knochenmark konnten in diesem fortgeschrittenen Tumorstadium allerdings noch signifikante Unterschiede festgestellt werden (p=0,0036). Nach 40 Monaten lebten von den Patienten mit einer Tumorzelle im KM noch ca. 30%, von den Patienten ohne Zelle noch fast 60% (Abb. 3.8 C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Patienten das Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark unabhängig vom pathologischen Lymphknoten-Status ein Risiko für das Überleben darstellt. Allerdings waren disseminierte Tumorzellen in den Lymphknoten für den weiteren Verlauf der Krankheit nur ohne Befall der regionalen Lymphknoten (pN0) von Bedeutung. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei NSCLC-Patienten die lymphogene Metastasierung in einem frühen Stadium der Erkrankung einen stärkeren prognostischen Einfluss hat als die hämatogene Metastasierung. Dagegen scheint

die Metastasierung ins Knochenmark eher langfristig für den weiteren Verlauf von Bedeutung zu sein.

### 3.3 Analyse der Lymphknoten-Metastasierung

Im Rahmen dieser Arbeit wird die lymphogene Metastasierung beim Bronchialkarzinom näher untersucht. Hierfür wurden sowohl von disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten als auch von verschiedenen Arealen aus den dazugehörigen Primärtumoren der Patienten die RNA- und DNA mittels Array-Hybridisierung, bzw. CGH analysiert (Abb. 3.9). Das Ergebnis dieser Untersuchung sollte ein Datensatz von jedem Patienten, bestehend aus Genom und Transkriptom des Primärtumors und den dazugehörigen disseminierten Tumorzellen sein.

Insgesamt konnten 49 NSCLC-Patienten untersucht werden, wobei disseminierte Tumorzellen von 23 Patienten und mikrodisektierte Areale aus dem Primärtumor von 40 Patienten in die Analyse gingen. Eine erste Auswertung der Expression einzelner disseminierter Tumorzellen wurde bereits von Sabine Schilling im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt (Titel: Proteasenexpression einzelner disseminierter Tumorzellen aus Lymphknoten und Knochenmark von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom).

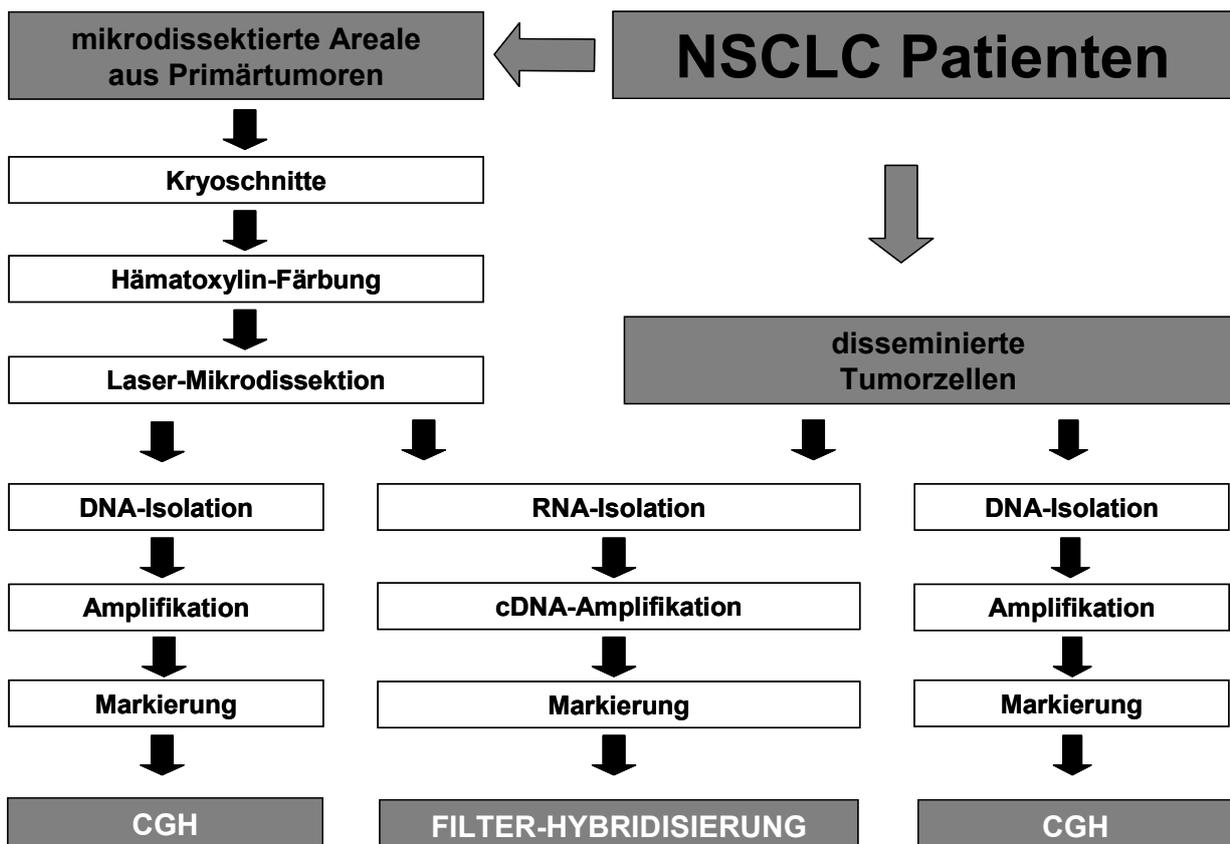


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des Projektplanes

Von 34 Arealen aus den LK-positiven Primärtumoren von insgesamt 14 Patienten und von 16 disseminierten Tumorzellen aus den dazugehörigen Lymphknoten von 13 Patienten konnte sowohl die DNA, als auch die RNA untersucht werden. Es war möglich einen kompletten Datensatz der CGH und Array Experimente von Primärtumor und disseminierten Tumorzellen für 13 Patienten zu erstellen.

**Tabelle 3.2: Auszug der klinisch-pathologischen Daten des Patientenkollektivs für den direkten Vergleich von Genom- und Transkriptomdaten und zur Analyse der lymphogenen Metastasierung**

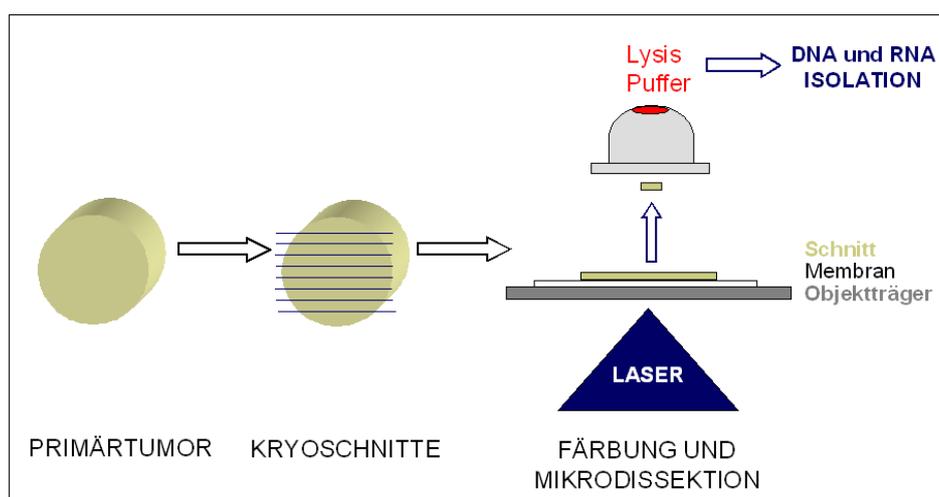
	Array			CGH		
	PT		TZ	PT		TZ
	MRD LK+	MRD LK-	MRD LK+	MRD LK+	MRD LK-	MRD LK+
<b>Anzahl</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>20</b>
<b>Tumor</b>						
T1	3	2	2	3	2	3
T2	7	9	7	8	7	11
T3	1	3	1	1	3	3
T4	3	0	3	3	0	3
<b>Lymphknoten</b>						
N0	2	7	1	3	5	5
N1	2	4	2	2	4	3
N2	8	3	8	8	3	10
N3	1	0	1	1	0	1
Nx	1	0	1	1	0	1
<b>Metastasierung</b>						
M0	13	13	12	14	11	19
M1	1	1	1	1	1	1
<b>R-Klassifikation</b>						
R0	10	12	9	11	10	15
R1	2	2	2	2	2	3
R2	2	0	2	2	0	2
<b>Grad</b>						
G1/G2	11	8	11	12	6	15
G3/G4	2	4	1	2	4	4
Gx	1	2	1	1	2	1
<b>Histologie</b>						
Adenokarzinom	10	5	9	10	5	13
Plattenepithelkarzinom	2	7	2	3	5	6
Großzelliges Karzinom	1	2	1	1	2	1

PT, Primärtumor; TZ, disseminierte Tumorzelle; MRD<sub>LK+</sub>, disseminierte Tumorzelle im Lymphknoten; MRD<sub>LK-</sub>, keine disseminierte Tumorzelle im Lymphknoten.

Zusätzlich zu den Patienten mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten wurden außerdem Patienten untersucht, bei denen sowohl die untersuchten Lymphknoten, als auch das Knochenmark frei von disseminierten Tumorzellen waren. Bei diesen so genannten doppelt negativen Patienten ( $EZ_{MRD}^{--}$ ) war die Erstellung eines kompletten Satzes von CGH und cDNA Arraydaten von 12 Primärtumoren möglich. Geringere Fallzahlen ergaben sich bei den Patienten mit positivem Knochenmark und negativem Lymphknoten und bei den Patienten mit nur einem untersuchten Organ. Die klinisch-pathologischen Daten dieser Patienten sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Eine detaillierte Übersicht der erfolgreich hybridisierten Proben nach Mikrodissektion und Isolation der DNA/RNA ist im Anhang in Abbildung 7.1 und Tabelle 7.1 aufgelistet.

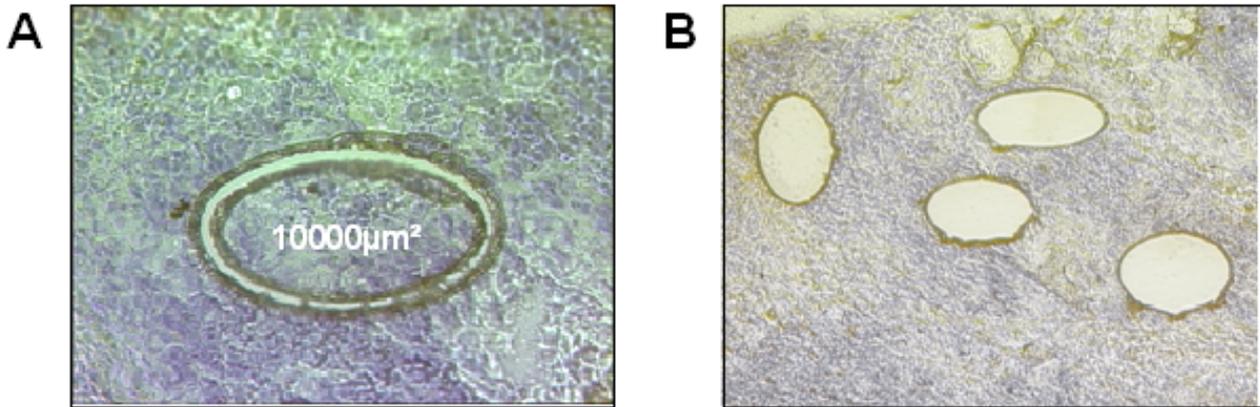
### 3.4 Etablierung der Mikrodissektion für DNA und RNA Isolation

Um den genetischen Ursprung zu untersuchen, bzw. den Genotyp und den Phänotyp disseminierter Tumorzellen mit verschiedenen Arealen aus ihren dazugehörigen Primärtumoren zu vergleichen, wurde eine Methode benötigt, die es ermöglicht verschiedene Areale innerhalb eines Tumors zu isolieren. Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion wurden zwischen zwei und fünf Proben aus verschiedenen Regionen des Tumors herausgeschnitten und anschließend sowohl die DNA, als auch die RNA isoliert. Für die kombinierte Analyse von Genom und Transkriptom aus den Zellen wurde ein bereits etabliertes Protokoll verwendet, das für Einzelzellen entwickelt wurde (Klein et al. 2002, Material und Methoden 2.6). Für die Färbung der Gewebeschnitte des Primärtumors und die anschließende Lasermikrodissektion musste ein Protokoll erarbeitet werden, bei dessen Durchführung die Qualität der Probe keinen Schaden nimmt und bei dem vor allem die empfindliche RNA nicht abgebaut wird.



**Abbildung 3.10: Lasermikrodissektion:** Die 5  $\mu\text{m}$  dicken Krieschnitte aus dem Primärtumor werden auf eine Polyethylenmembran übertragen, gefärbt und getrocknet. Mit dem Laser werden maximal 10000  $\mu\text{m}^2$  große Areale herausgeschnitten, mit einem Laserimpuls hoch katapultiert und von einem darüber angebrachten Tubedeckel in Lysispuffer aufgefangen.

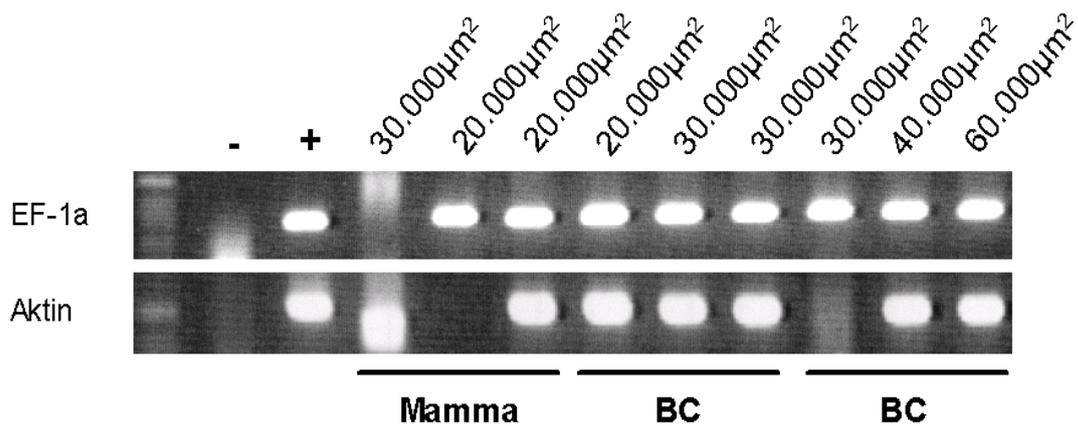
Zuerst wurden von den in flüssigem Stickstoff gefrorenen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Primärtumoren mit dem Kryostat  $5\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger mit Polyethylenmembranen aufgetragen, Hämatoxylin gefärbt und anschließend einzelne Zellareale mit dem PALM Laser Mikroskop ausgeschnitten (Abb. 3.10 und 3.11). Das PALM Lasermikroskop wurde von Altana Pharma zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 3.11: Lasermikrodissektion des Primärtumors:** Hämatoxylinfärbung eines Adenokarzinoms. **A**, gelasertes Areal mit einer Fläche von ca.  $10000\ \mu\text{m}^2$  vor dem Laserimpuls (Vergrößerung 40x) **B**, Übersichtsaufnahme von vier herausgeschnittenen und katapultierten Arealen mit einer Fläche von jeweils ca.  $10000\ \mu\text{m}^2$  (Vergrößerung 10x).

Es stellte sich heraus, dass für die Färbung der Zellen nur Meyers Hämatoxylin verwendet werden darf, da der pH-Wert für die Gewinnung und Stabilität der RNA entscheidend ist. Ist der pH-Wert zu alkalisch kommt es zur Degradierung der RNA. Des Weiteren mussten die einzelnen Färbeschritte verkürzt, bzw. ganz weggelassen werden (Material und Methoden 2.4.1). Bevor man mit dem Herausschneiden einzelner Areale aus dem Tumor beginnen konnte war es wichtig, dass die gefärbten Schnitte vollständig trocken waren, da es sonst durch den Laser zu einer Überhitzung des Schnittes kommen kann, wodurch ein Großteil der RNA zerstört wird. Außerdem sind sauberes Arbeiten mit RNase freien Reagenzien und sterilen Spitzen wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche RNA-Isolation.

Zu Beginn der Methodenetablierung wurde versucht, anhand der ersten 58 mikrodissektierten Proben aus den Primärtumoren von 14 NSCLC-Patienten die geringst mögliche, aber effektivste Zellzahl für die hier verwendete Methode festzulegen. Als Qualitätskontrolle wurde nach cDNA-Synthese eine PCR mit EF1-alpha und beta-Aktin durchgeführt (Abb. 3.12).



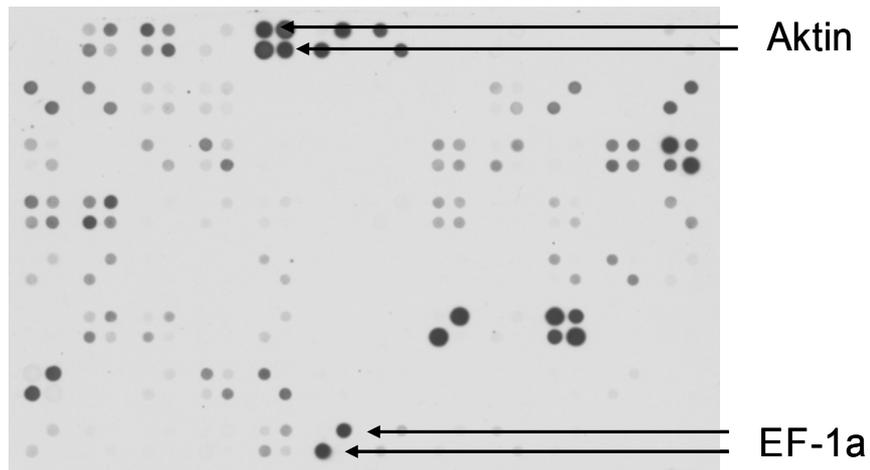
**Abbildung 3.12: Kontroll-PCR (EF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -Aktin) nach Mikrodisektion und cDNA Synthese.** Jeweils drei verschiedene Areale unterschiedlicher Tumore (1x Mammakarzinom = Mamma, 2x Bronchialkarzinom = BC) und unterschiedlicher Größe (zwischen 20000 und 60000  $\mu\text{m}^2$ ).

Es konnte gezeigt werden, dass für eine optimale Isolation der RNA/DNA und eine anschließende erfolgreiche Hybridisierung von cDNA (Abb. 3.13) und genomischer DNA mindestens zwischen zwei und fünf Areale mit jeweils 10000  $\mu\text{m}^2$  nötig sind. Die RNA eines 5  $\mu\text{m}$  dicken Schnittes mit einer Fläche von 10000  $\mu\text{m}^2$  entspricht in etwa 40 intakten Zellen. Alle weiteren Proben wurden dann nur noch in dieser Größenordnung gelasert. Eine weitere Bedingung für eine erfolgreiche Weiterverarbeitung der Proben war eine PCR, die zumindest für beta-Aktin positiv sein musste (Tab. 3.3).

**Tabelle 3.3: Ergebnisse der Kontroll-PCR nach Mikrodisektion und cDNA-Synthese in Abhängigkeit von der Größe.** Ergebnisse basieren auf 58 Proben von 14 NSCLC-Patienten.

Arealgröße ( $\mu\text{m}^2$ )	Probenanzahl (n=58)	EF1-alpha	beta-Aktin	EGP
10000	7	6 (86%)	4 (57%)	0 (0%)
20000	12	11 (92%)	7 (58%)	3 (25%)
30000	28	25 (89%)	15 (54%)	9 (32%)
50000	6	6 (100%)	6 (100%)	3 (50%)
100000	5	4 (80%)	3 (60%)	3 (60%)

**Kontrollfilter**  
40.000µm<sup>2</sup>



**Abbildung 3.13: Ergebnis nach Hybridisierung eines Areal (Größe 40000 µm<sup>2</sup>) auf cDNA-Filterarray.** Laborintern hergestellter Kontrollfilter mit ca. 190 gespotteten cDNAs (siehe Anhang Abb. 7.2). Die Ergebnisse der PCR konnten durch die Filterhybridisierung bestätigt werden. Als repräsentative Qualitätskontrolle wurden die Haushaltsgene beta-Aktin und EF1-alpha verwendet.

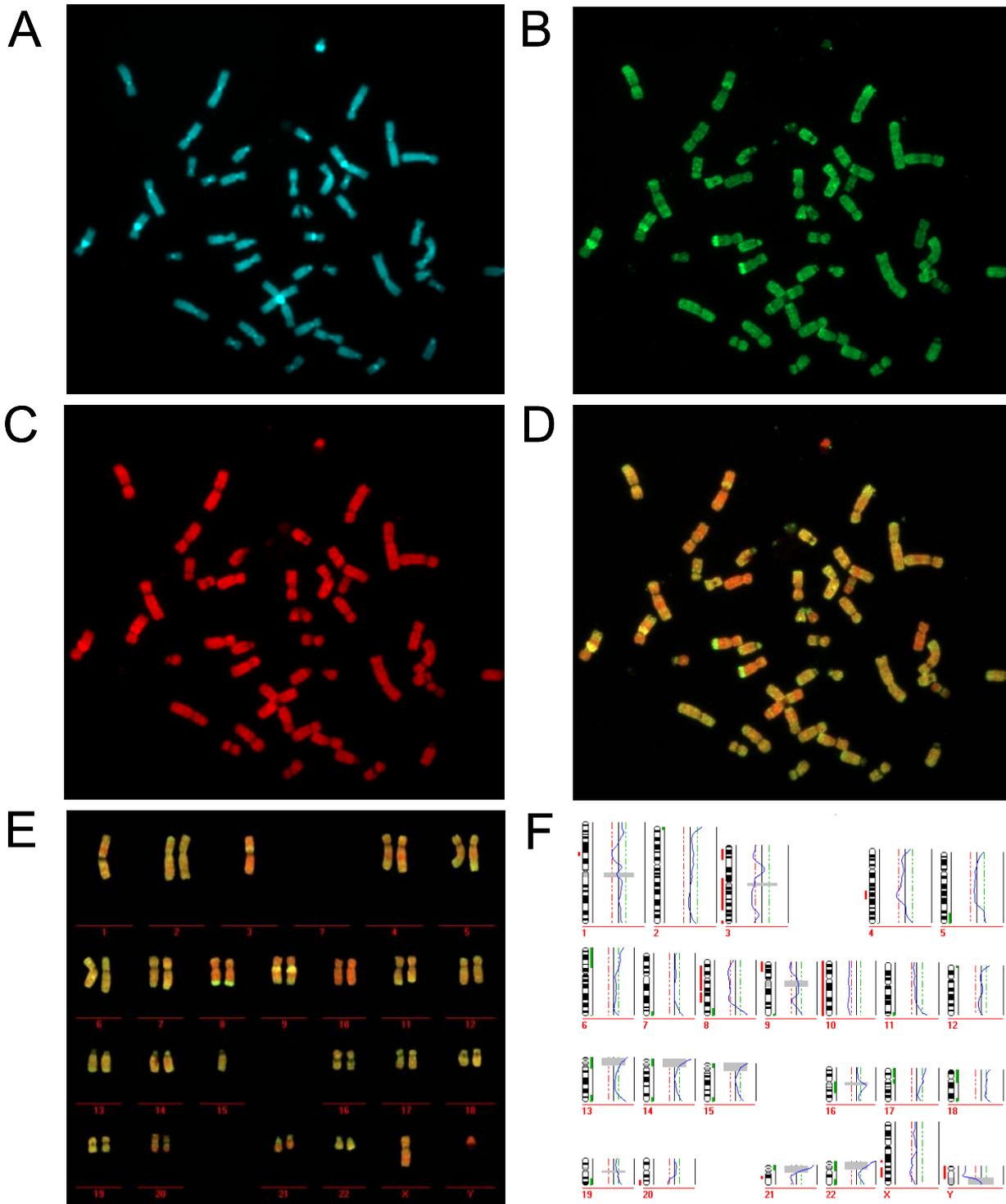
### 3.5 Genomische Charakterisierung

Für den genomischen Vergleich von verschiedenen Arealen aus den Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten von NSCLC-Patienten wurde die CGH verwendet. Mit ihr lassen sich, basierend auf dem quantitativen Vergleich von Tumor- und Referenz-DNA, numerische chromosomale Veränderungen größer als 10-20 Mb nachweisen. Das hier verwendete Protokoll wurde speziell für geringe DNA-Mengen, z.B. einzelne Tumorzellen etabliert (Klein et al. 1999).

Die Qualität der primären PCR-Produkte wurde mit Hilfe von Primern für spezifische Mse I-Fragmente kontrolliert. Hierfür wurden Primerpaare für p53 Exon2/3, p53 Exon8/9 und Cytokeratin 19 verwendet. Ein erfolgreiches CGH-Ergebnis ließ sich erzielen, wenn das primäre PCR-Produkt für mindestens eines der drei Produkte positiv war.

Die fluoreszenzmarkierten Proben wurden nach Hybridisierung auf humane Metaphasen photographiert und anschließend mit der dazugehörigen Software ausgewertet. Von jeder Metaphase wurden jeweils 3 Aufnahmen gemacht: DAPI, FITC und Cy3.5. Durch Übereinanderlagerung der Aufnahmen erhält man das typische Bild einer Metaphase mit Amplifikationen und Deletionen (Abb. 3.14 A). Anhand der DAPI-Bänderung wurden die Chromosomen anschließend zu einem Karyogramm sortiert. Die Software ermöglicht anhand der Fluoreszenzintensität die Berechnung der genauen Amplifikations, bzw. Deletionsrate und die graphische Darstellung eines Profils. Nach Auswertung einiger Metaphasen wurden alle Profile eines Tumores, bzw. einer Zelle miteinander verrechnet und ein Gesamtprofil erstellt. Dabei wurden Deletionen mit einem roten Balken links und Amplifikationen mit einem grünen Balken rechts neben den Chromosomen markiert (Abb. 3.14 B). Die Methode erlaubt den Vergleich verschiedener Tumoridentitäten, bzw. von Primärtumoren und disseminierten

Einzelzellen. Die CGH-Profile aller auswertbaren Proben sind im Anhang unter Abbildung 7.3 aufgeführt.

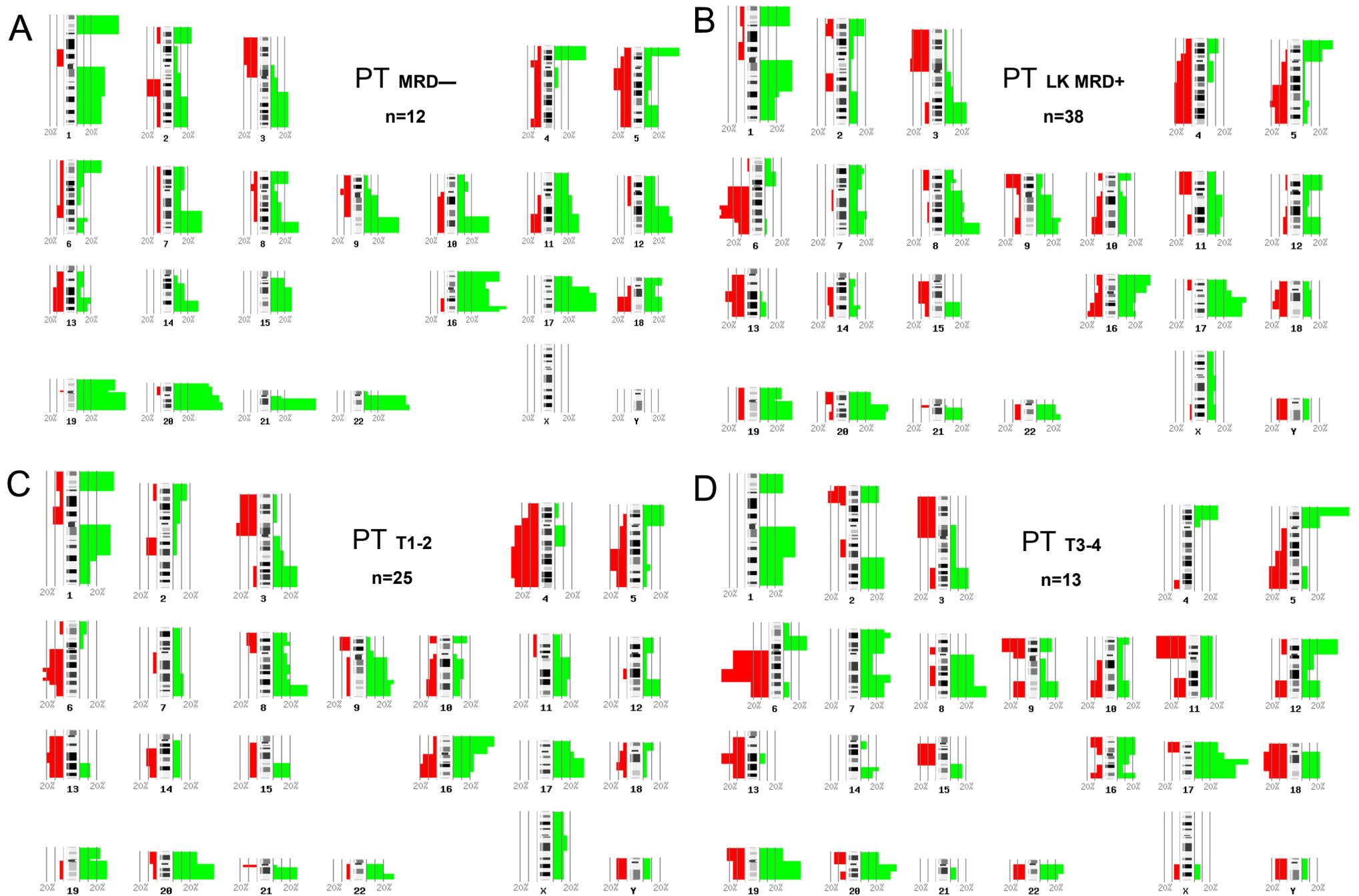


**Abbildung 3.14: Comparative Genomische Hybridisierung einer einzelnen disseminierten Tumorzelle aus dem Lymphknoten eines Adenokarzinompatienten (Patient SA EZ 5).** A, Aufnahme einer DAPI gefärbten Metaphase; B, Aufnahme einer Metaphase mit Cy3.5; C, Aufnahme einer Metaphase mit FITC; D, übereinandergelagerte Bilder von FITC und Cy3.5; E, sortiertes Karyogramm; F, Gesamtprofil mehrerer Metaphasen nach digitaler Auswertung.

### 3.5.1 Identifikation spezifischer Aberrationen bei Primärtumoren

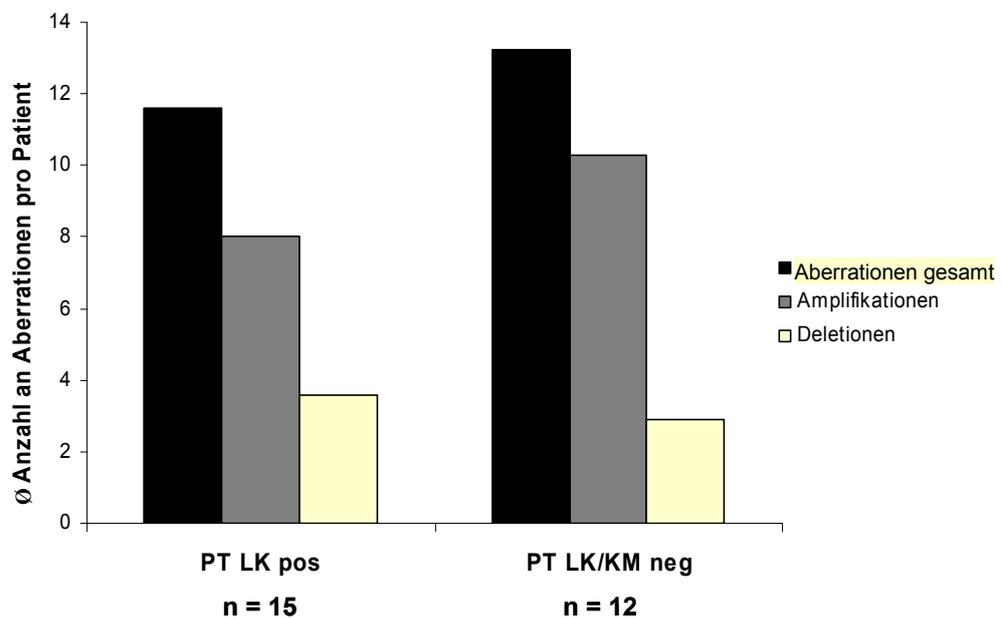
Zuerst sollte geklärt werden, ob sich anhand der genomischen Veränderungen Unterschiede zwischen Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten und Primärtumoren ohne disseminierte Zellen in Knochenmark und Lymphknoten erkennen lassen. Die Chromosomen wurden neben der Unterteilung in p- und q-Arm noch genauer in zwei bis drei Regionen pro Arm unterteilt (insgesamt  $n=87$ ). Unter [www.progenetix.de](http://www.progenetix.de) kann ein Gesamtideogramm erstellt werden, das die Veränderungen relativ zur Anzahl der Proben berechnet und graphisch darstellt. Dies erlaubt den Vergleich von Gruppen mit unterschiedlicher Probenanzahl. Chromosomen mit besonders vielen Deletionen/Amplifikationen, bzw. Unterschieden und Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Gruppen sind auf diese Weise deutlich zu erkennen (Abb. 3.15).

Alle mikrodisezierten Areale aus den Primärtumoren, sowohl ohne ( $PT_{MRD-}$ , Abb. 3.15 A) als auch mit disseminierten Tumorzellen ( $PT_{LK MRD+}$ , Abb. 3.15 B) in den dazugehörigen untersuchten Lymphknoten wiesen chromosomale Aberrationen auf. Nach dem Vergleich der Gesamthistogramme kann man erkennen, dass sich Primärtumoren mit und ohne Streuung in die regionalen Lymphknoten in ihren genomischen Veränderungen sehr ähnlich sind. Bei Patienten mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten zeigten sich allerdings auf den Chromosomen 6q, 11p, 15q und 16q vermehrt Deletionen (Abb. 3.15 B) und Patienten ohne disseminierte Tumorzellen auf den Chromosomen 10q und 14q deutlich mehr Amplifikationen. Durch eine weitere Unterteilung der LN-positiven Primärtumoren in Tumorstatus T1-2 und T3-4 sollten Veränderungen während einem frühen Stadium der Kanzerogenese von späteren Ereignissen getrennt werden. Auch die kumulativen Profile dieser beiden Gruppen waren sich sehr ähnlich. Tumoren im Stadium T1-2 wiesen Deletionen auf Chromosom 4 und Amplifikationen auf dem X-Chromosom und Chromosom 8p und 21 auf (Abb. 3.15 C), die bei Primärtumoren im fortgeschrittenen Stadium T3-4 nicht zu sehen waren. Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 und Amplifikationen auf 2q und 7p zeigten sich nur bei Primärtumoren im Stadium T3-4 (Abb. 3.15 D).



**Abbildung 3.15: Vergleich der Aberrationen bei den verschiedenen Untergruppen der untersuchten Primärtumoren (Seite 66).** **A**, doppelt negative Primärtumoren ( $PT_{MRD-}$ ,  $n=12$ ); **B**, Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten ( $PT_{LK+}$ ,  $n=38$ ); **C**, Primärtumoren mit T-Status T1-2 ( $n=25$  Proben von 11 Patienten); **D**, Primärtumoren mit T-Status T3-4 ( $n=13$  Proben von vier Patienten). Die äußeren Linien rechts und links von jedem Chromosom markieren Veränderungen, die bei 20% der Proben zu finden sind.

Da sich beim Vergleich der Gesamtprofile nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennen ließen, wurde außerdem die durchschnittliche Anzahl an Aberrationen pro Patient zwischen Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen ( $PT_{LK+}$ ) und ohne disseminierte Tumorzellen ( $PT_{MRD-}$ ) miteinander verglichen (Abb. 3.16). Von allen chromosomalen Veränderungen der verschiedenen Areale eines Primärtumors wurden die Mittelwerte gebildet und die p-Werte mittels t-Tests errechnet. Dabei wurden im Durchschnitt bei den Lymphknoten-positiven Primärtumoren geringfügig weniger Aberrationen als bei den doppelt negativen Primärtumoren detektiert ( $p=0,496$ ). Primärtumoren ohne disseminierte Tumorzellen wiesen mehr Amplifikationen auf als Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen. Auch bei den Deletionen war nur ein geringfügiger Unterschied zu erkennen. In keiner der drei Gruppen waren die Unterschiede signifikant.



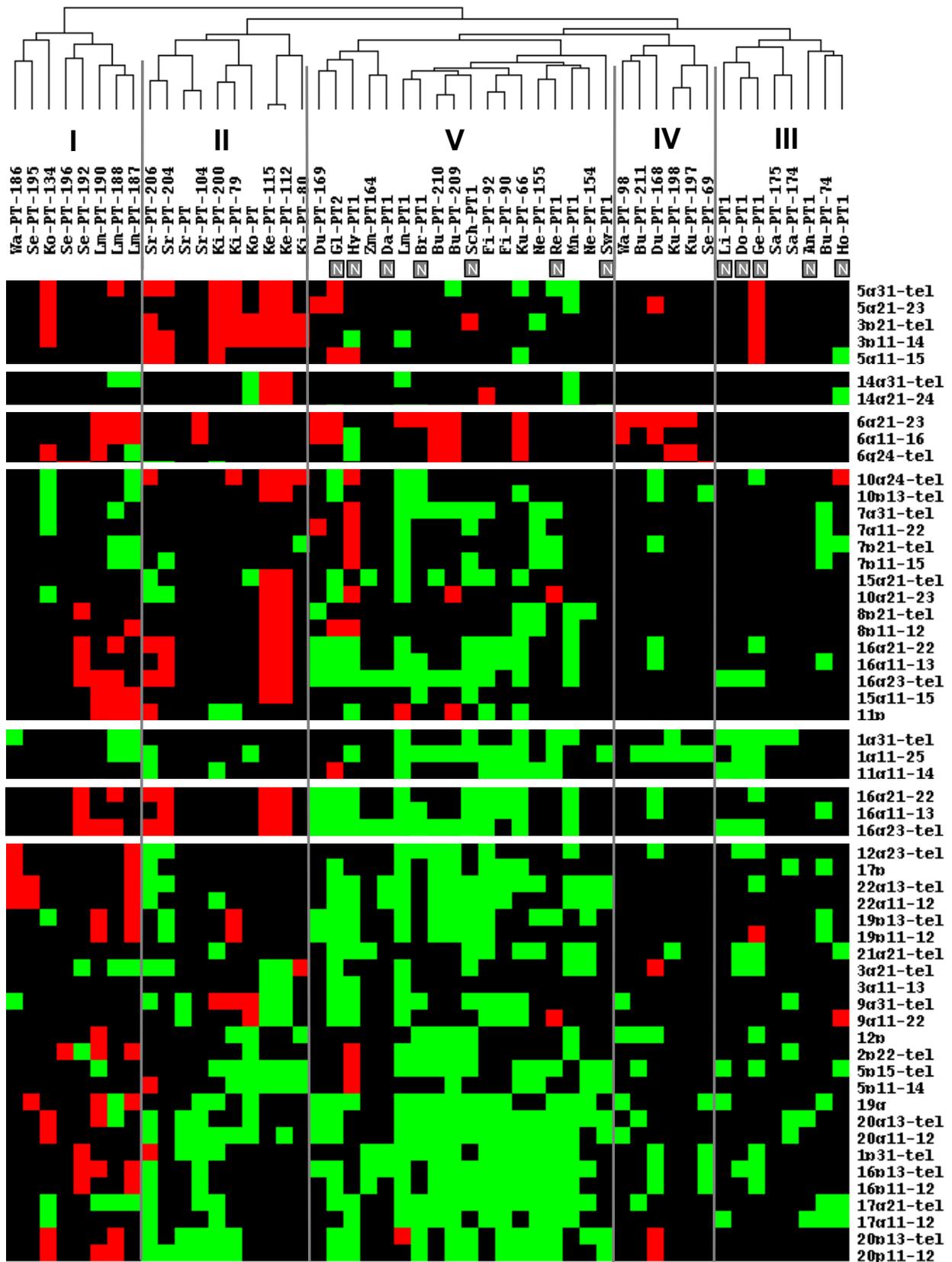
Summe aller Aberrationen	174,25	159
- Amplifikationen	119,65	124
- Deletionen	54,2	35

**Abbildung 3.16: Durchschnittliche Anzahl genomischer Veränderungen bei Lymphknoten-positiven Primärtumoren ( $PT_{LK+}$ ,  $n=15$ ) und doppelt negativen Primärtumoren ( $PT_{MRD-}$ ,  $n=12$ ).** Bei mehreren Arealen aus dem Primärtumor wurde der Mittelwert pro Patient gebildet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Aberrationen gesamt, Amplifikationen, Deletionen) festgestellt werden.

Mit der weiteren Unterteilung der Primärtumoren nach dem T-Status in T1-2 und T3-4 sollte untersucht werden, ob fortgeschrittene Tumore mehr chromosomale Aberrationen ansammeln als Tumore früheren Stadiums. Hier zeigten Patienten mit Tumoren im Stadium T3-4 tendenziell mehr chromosomale Veränderungen (13,6) als Tumore im Stadium T1-2 (10,9). Diese Tendenz war sowohl bei den Deletionen, als auch bei den Amplifikationen zu erkennen (siehe Anhang, Abb. 7.4). Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Gruppe der T3-4 Tumore nur aus vier und die Gruppe der T1-2 Tumore aus 11 Patienten besteht und sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben.

### **Ähnlichkeit von Primärtumoren mit und ohne disseminierte Tumorzellen**

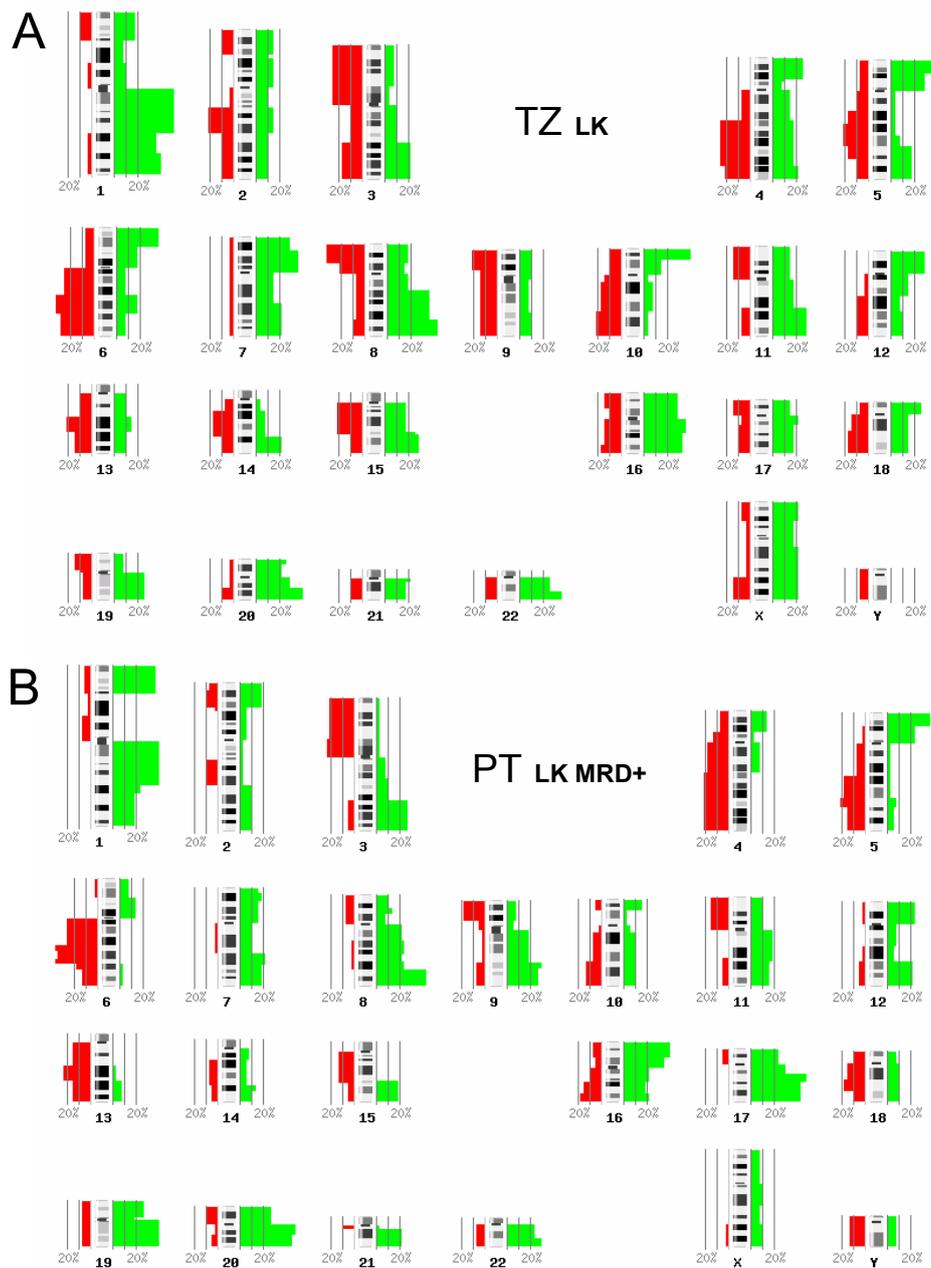
Eine hierarchische Clusteranalyse ermöglicht die graphische Darstellung von Ähnlichkeitsverhältnissen zwischen den einzelnen Proben (Eisen et al. 1998, <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Unterschiede in den chromosomalen Veränderungen und in der durchschnittlichen Anzahl der Aberrationen gering sind wurde des Weiteren untersucht, wie ähnlich sich Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten und Primärtumoren ohne disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark hinsichtlich ihrer genomischen Veränderungen sind und ob ein charakteristisches genomisches Muster für die jeweilige Gruppe vorhanden ist. In der Clusteranalyse war zu erkennen, dass sich Primärtumoren ohne disseminierte Tumorzellen (=doppelt negative PT, in Abb. 3.17 mit „N“ markiert) auf Level III und V beschränken. In diesen beiden Gruppen zeigten sich überwiegend Amplifikationen verschiedener Chromosomen, wie beispielsweise von Chromosom 1q31-tel, 7, 11q11-14 und 16q. Die anderen Level (I, II und IV), in denen ausschließlich Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen zu finden waren, kennzeichneten sich vor allem durch Deletionen auf den Chromosomen 3p, 5q und 16q. Zusammenfassend kann man sagen, dass sich trotz der geringen Unterschiede in den chromosomalen Aberrationen und in der Anzahl der Veränderungen Muster erkennen lassen, die eine Unterscheidung in Primärtumoren, mit und ohne disseminierten Tumorzellen möglich macht.



**Abbildung 3.17: Ähnlichkeitsanalyse von streuenden und nicht-streuenden Primärtumoren.** Dendrogramm und Ausschnitt aus der Clusteranalyse aller Areale aus Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen in den entsprechenden Lymphknoten (PT<sub>LK+</sub>, n=38, ohne Markierung) und aus Primärtumoren ohne disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark (PT<sub>M RD-</sub>, n=12, im Dendrogramm mit „N“ markiert). Level I-IV kennzeichnen die fünf Hauptarme des Dendrogramms. rot = Deletion, grün = Amplifikation.

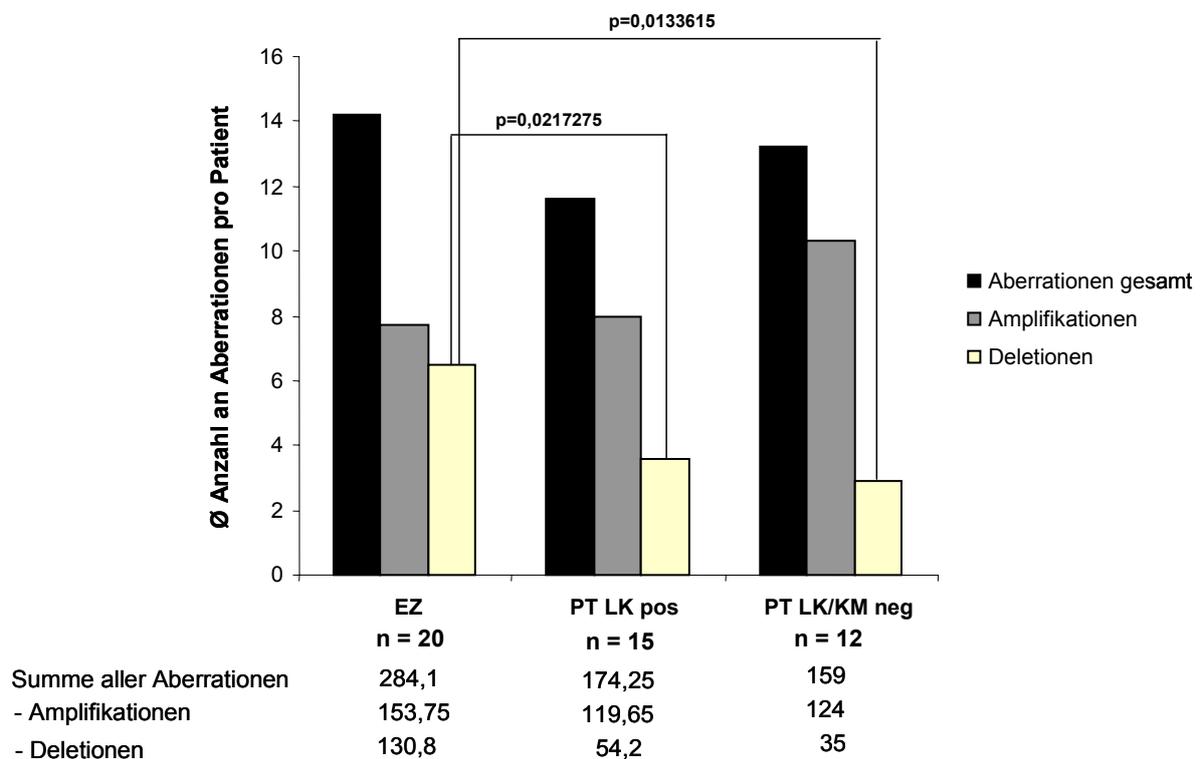
### 3.5.2 Identifikation spezifischer Aberrationen bei Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen mikrodissektierten Areale aus den Primärtumoren und ihre dazugehörigen disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten hinsichtlich ihrer genomischen Aberrationen miteinander verglichen. Unterschiede in den Gesamtprofilen von disseminierten Tumorzellen und den entsprechenden Primärtumoren zeigten sich nur in der vermehrten Amplifikation der Telomerregion von Chromosom 6p und 14q bei den Einzelzellen und der Telomerregion von Chromosom 1p und 17q bei den Primärtumoren (Abb. 3.18).



**Abbildung 3.18: Vergleich der Aberrationen von disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten und den dazugehörigen Primärtumoren. A, Gesamthistogramm aller disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten (TZ<sub>LK</sub>, n=26); B, Gesamthistogramm der Primärtumoren der entsprechenden Patienten (PT<sub>LK MRD+</sub>, n=38).**

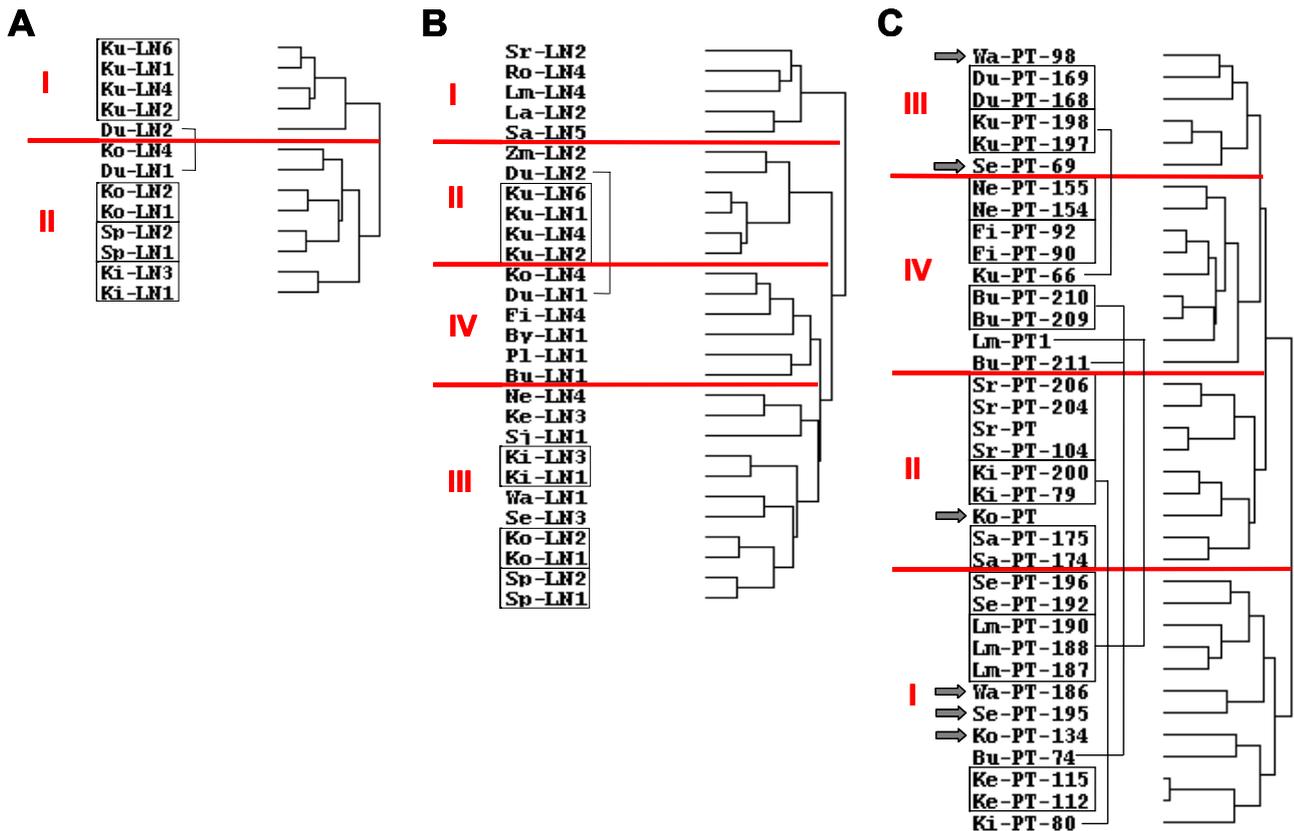
Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich in der Anzahl der Aberrationen Unterschiede zwischen Einzelzellen und ihren Primärtumoren erkennen lassen (Abb. 3.19). Es zeigte sich, dass disseminierte Tumorzellen im Durchschnitt mehr Aberrationen als ihre Primärtumoren aufwiesen. Für disseminierte Tumorzellen ergaben sich im Durchschnitt 14,2 chromosomale Veränderungen pro Zelle, für die dazugehörigen Primärtumoren 11,6 ( $p=0,186$ ). Nach der Trennung der Aberrationen in Deletionen und Amplifikationen konnte zwischen disseminierten Tumorzellen und Lymphknoten-positiven Primärtumoren bei den Deletionen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,022$ ). Dieser Unterschied war auch beim Vergleich der einzelnen Tumorzellen mit nicht-streuenden Primärtumoren zu sehen ( $p=0,013$ ).



**Abbildung 3.19: Durchschnittliche Anzahl genomischer Veränderungen bei einzelnen disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten (EZ, n=20), streuenden (PT LK pos, n=15) und nicht-streuenden Primärtumoren (PT LK/KM neg, n=12).** Bei mehreren Tumorzellen, bzw. Arealen aus dem Primärtumor wurde der Mittelwert pro Patient gebildet. Signifikante Unterschiede (t-Test) zeigen sich zwischen Deletionen bei EZ und PT LKpos ( $p=0,0217275$ ) und bei EZ und PT LK/KM neg ( $p=0,0133615$ ).

### Genomische Ähnlichkeit von Primärtumorarealen und ihren disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten

Die Clusteranalyse sollte zeigen, wie ähnlich die unterschiedlichen mikrodisezierten Areale der Primärtumoren untereinander, die verschiedenen disseminierten Tumorzellen eines Patienten untereinander, sowie Primärtumorareale und ihre entsprechenden disseminierten Tumorzellen zueinander sind (Abb. 3.20).



**Abbildung 3.20: Ähnlichkeitsanalyse der CGH-Daten von disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten und Primärtumorarealen.** **A**, Dendrogramm aller Patienten mit mehreren disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten; **B**, Dendrogramm aller disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten (LN, n=28); **C**, Dendrogramm aller mikrodisezierten Areale aus den Primärtumoren (PT, n=36). Die Kästchen kennzeichnen jeweils verschiedene Proben eines Patienten, die sich sehr ähnlich sind. Klammern markieren Areale eines Patienten, die in unterschiedlichen Armen zu finden sind. Mit Pfeilen sind Patienten hervorgehoben bei denen die Areale ausschließlich in unterschiedlichen Armen liegen. (Nomenklatur Bsp.: Sa-PT-175, Sa = Patienten Kürzel, PT = Primärtumor, 175 = Probennummer, LN = Lymphknoten).

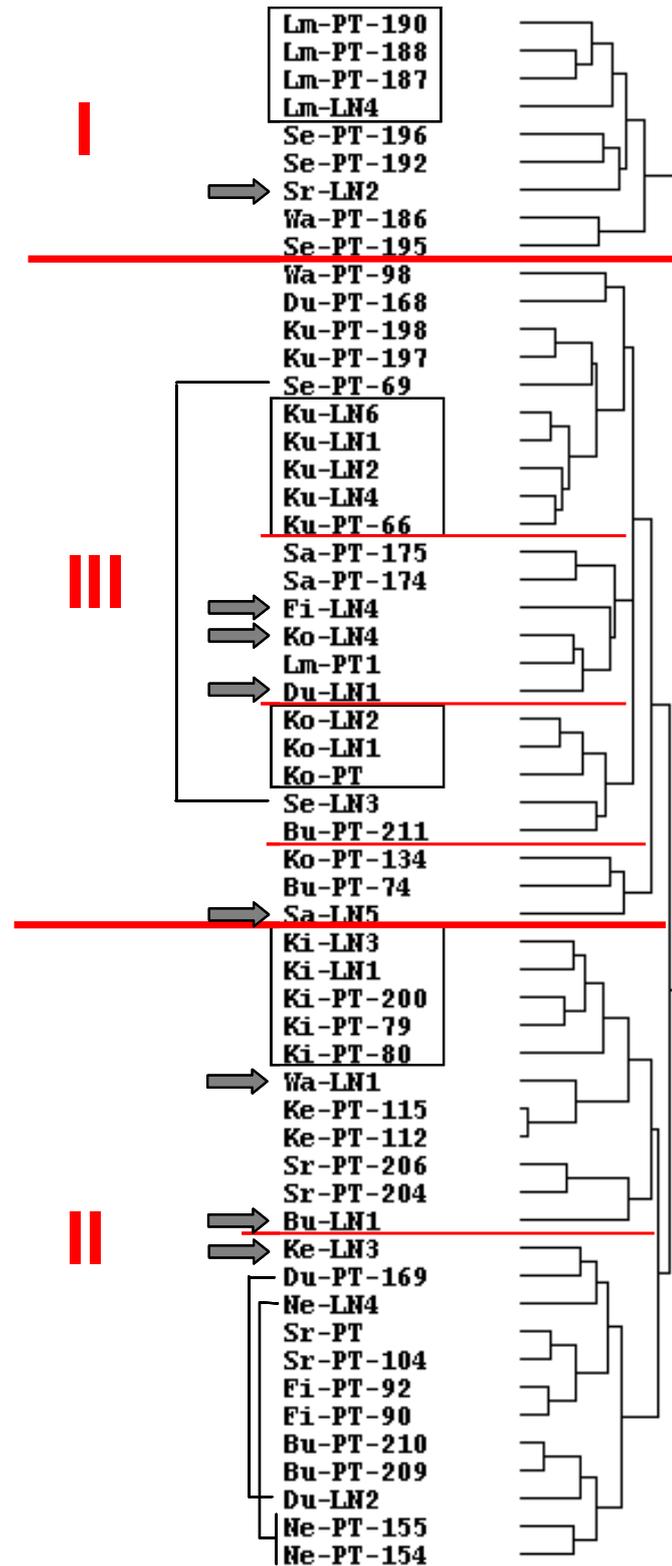
Bei den disseminierten Tumorzellen konnten bei fünf Patienten mehrere disseminierte Tumorzellen isoliert werden (Abb. 3.20 A). In der Clusteranalyse der CGH-Daten war zu erkennen, dass diese Zellen bei vier von fünf Patienten immer in einem Level des Dendrogramms zusammen liegen. Sie sind sich im Bezug auf ihre genomischen Aberrationen sehr ähnlich. Ausnahmen zeigten die Zellen Ko-LN4 und die beiden Zellen des Patienten „Du“. Diese Proben befinden sich in verschiedenen Levels des Clusterbaumes, d.h. sie sind sich weniger ähnlich. Dieses Verhältnis wurde auch durch zusätzliche Tumorzellen von Patienten mit nur einer disseminierten Zelle nicht beeinflusst (Abb. 3.20 B, n=14). Auch dann fanden sich die verschiedenen Zellen eines Patienten im gleichen Level (I und III).

Bei den mikrodisezierten Arealen aus den Primärtumoren (mindestens zwei Areale pro Patient) verhielt es sich ähnlich wie bei den disseminierten Tumorzellen (Abb. 3.20 C). Auch hier gruppieren sich bei 84,6% der Patienten (11 von 13) mindestens zwei Areale aus einem Primärtumor zusammen, d.h. die genomischen Unterschiede zwischen den Arealen eines

Patienten waren gering. Allerdings existierten auch drei Patienten (Wa, Ko, Se), bei denen die verschiedenen Areale in ganz unterschiedlichen Armen zu finden waren, bzw. vier Patienten bei denen zwei Areale zusammen und weitere Areale dieser Patienten in anderen Armen lagen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten einem oder mehreren Arealen aus dem Primärtumor zuordnen lassen, d.h. ob disseminierte Zellen hinsichtlich ihrer genomischen Veränderungen einem oder mehreren Arealen ähnlicher sind. Die Beantwortung dieser Frage soll klären, ob ein „metastasiogenes“ Areal innerhalb des Tumors existiert, von dem aus die Zellen metastasieren. In der Clusteranalyse aus insgesamt 36 Arealen der Primärtumoren und 20 disseminierten Einzelzellen der entsprechenden Patienten konnte man bei sieben Patienten ein oder auch mehrere disseminierte Tumorzellen zusammen mit ein oder mehreren mikrodisezierten Arealen des dazugehörigen Primärtumors in dem gleichen Level finden (I, II oder III, Abb. 3.21). Bezüglich der disseminierten Zellen ließen sich 60% (12 von 28) einem oder mehrerer Areale des entsprechenden Patienten zuordnen. Bei den übrigen 40% der Tumorzellen (8 von 28) waren die entsprechenden Areale aus dem Primärtumor in anderen Hauptarmen des Dendrogramms zu finden und sich daher weniger ähnlich (Abb. 3.21).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genomischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Arealen des Primärtumors und den disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten der NSCLC-Patienten relativ gering sind und dass sich in über der Hälfte der Fälle eine Zelle einem Areal des Primärtumors zuordnen lässt.

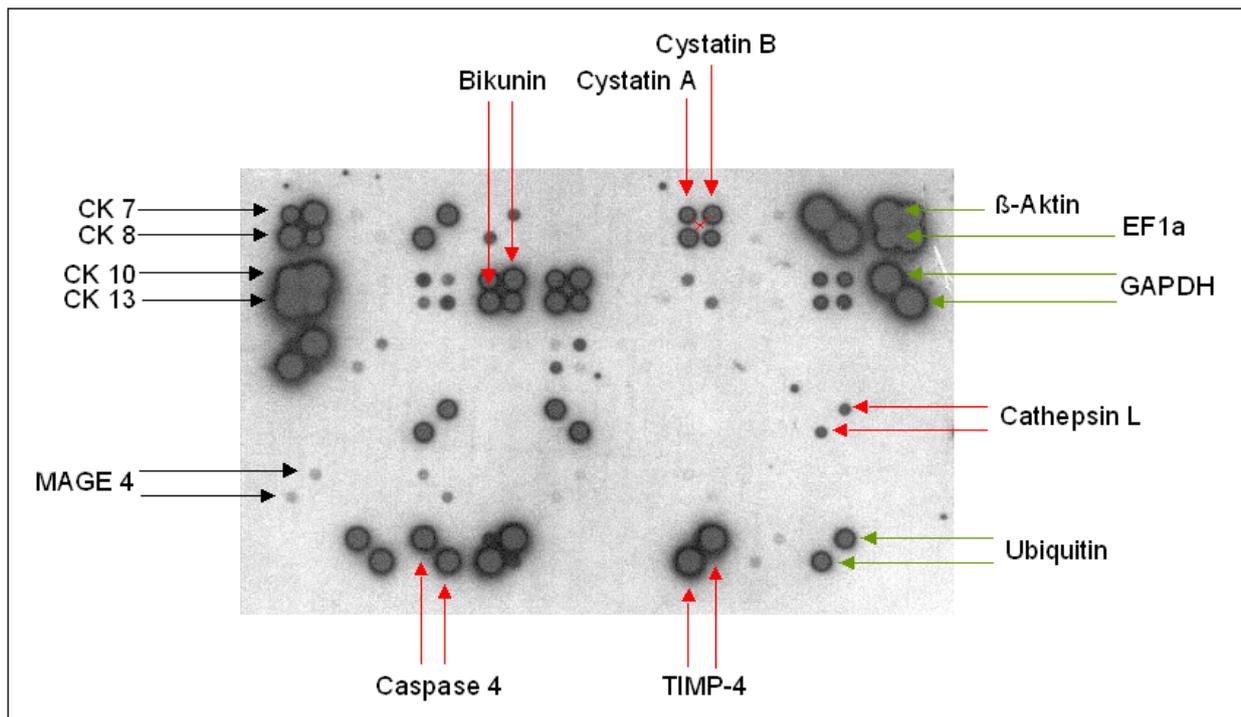


**Abbildung 3.21: Dendrogramm von disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten (LN, n=20) und ihren dazugehörigen Primärtumoren (PT, n=36).** In rot sind die drei großen Hauptgruppen (Level I, II, III) und Untergruppen des Dendrogramms unterteilt. Kästchen markieren disseminierte Tumorzelle und dazugehörige Areale aus dem Primärtumor eines Patienten, die sich sehr ähnlich sind. Klammern kennzeichnen Patienten, bei denen Areal und disseminierte Tumorzelle noch innerhalb eines Armes zusammen liegen. 40% der disseminierten Tumorzellen lassen sich keinem Areal innerhalb eines Levels zuordnen (Pfeile).

### 3.6 Charakterisierung der Genexpression

Da die hier verwendete Methode die Isolation von DNA und RNA erlaubt, konnte des Weiteren untersucht werden, wie unterschiedlich die Expressionsmuster von Primärtumoren und den dazugehörigen disseminierten Tumorzellen sind und ob für Einzelzellen, bzw. Primärtumoren spezifische Proteasen existieren.

Hierfür wurde die cDNA der gleichen Proben, die bereits mit Hilfe der CGH untersucht wurden, auf selbst hergestellte Proteasenarrays hybridisiert (Abb. 3.22).



**Abbildung 3.22: Beispiel für einen entwickelten Proteasenfilter nach Hybridisierung eines Primärtumoreals.** Diagonal gegenüberliegend gespottete cDNAs repräsentieren das gleiche Gen (vgl. Cystatin A und Cystatin B). Beispiele für exprimierte Gene sind mit farbigen Pfeilen gekennzeichnet (grün Haushaltsgene, rot Proteasen/Inhibitoren, schwarz sonstige cDNAs).

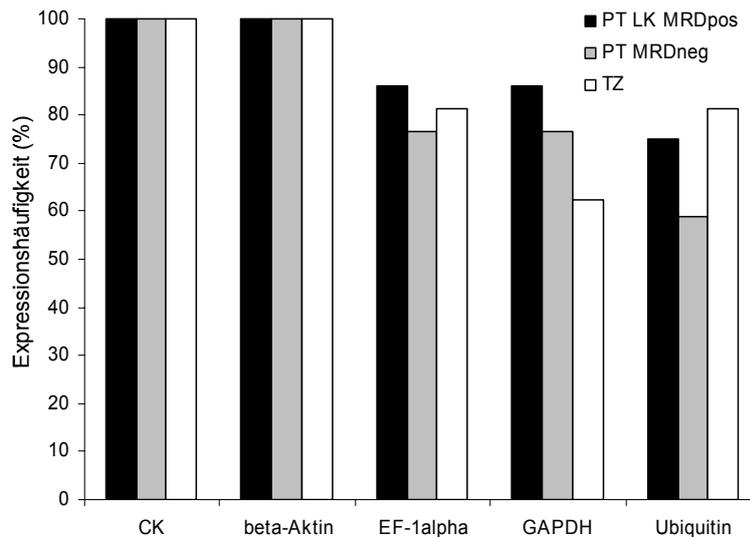
Als Qualitätskontrolle wurde nach cDNA Amplifikation eine PCR mit  $\beta$ -Aktin und EF1-alpha durchgeführt. Für die anschließende Hybridisierung wurden nur Proben verwendet, die mindestens für eine der beiden Kontrollen positiv waren. Abschließend wurden die Filter eingescannt und mit Hilfe der ArrayVision Software (Imaging Research Inc.) ausgewertet (vgl. Methoden 2.9.1). Eine detaillierte Analyse der Expression der disseminierten Tumorzellen wurde bereits von Sabine Schilling im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. Der Schwerpunkt der Auswertung in der hier vorliegenden Arbeit ist der Vergleich von disseminierten Tumorzellen mit verschiedenen Arealen aus den entsprechenden Primärtumoren.

Eine Auflistung aller auf dem Filter vorhandenen cDNAs ist in Tabelle 3.4 zu finden. Die genaue Lokalisation der 109 cDNAs ist in einem Schema im Anhang gezeigt (Abb. 7.2).

<b>Keratine</b>	7,8,10,13,18,19,20
<b>Mage</b>	1,2,3,4,6,12
<b>Integrine</b>	$\alpha$ 2, $\alpha$ 4, $\alpha$ 5, $\alpha$ 6, $\alpha$ v, $\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3, $\beta$ 4, $\beta$ 5, $\beta$ 7
<b>MMPs</b>	MMP1, 7, 13; Gelatinase A+B; Stromelysin 1, 3; MT-MMP 1-5
<b>ADAMs</b>	8, 9, 10, 11, 15, 20, 21, TACE
<b>Caspasen</b>	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10
<b>Cathepsine</b>	B, D, F, H, K, L, S, V, W
<b>Serinproteasen</b>	uPA; Kallikrein 2, 5, 6, 7, 8; TF; Chymotrypsin; Neurotrypsin; Proteinase 3; Medullasin; Granzyme A, B, H, K, M
<b>Inhibitoren</b>	Bikunin; PSTI; Cystatin A, B, C; PAI-1, PAI-2; TIMP1-4
<b>Sonstige</b>	EMMPRIN 1, 2, uPAR, c-est-1, rS9, R13a, Heparanase, CEA, IAP3, EMMPRIN 1, 2, 1323
<b>Haushaltsgene</b>	$\beta$ -Aktin, EF1- $\alpha$ , GAPDH, Ubiquitin

**Tabelle 3.4: Übersicht der auf den Filter gespotteten cDNAs.**

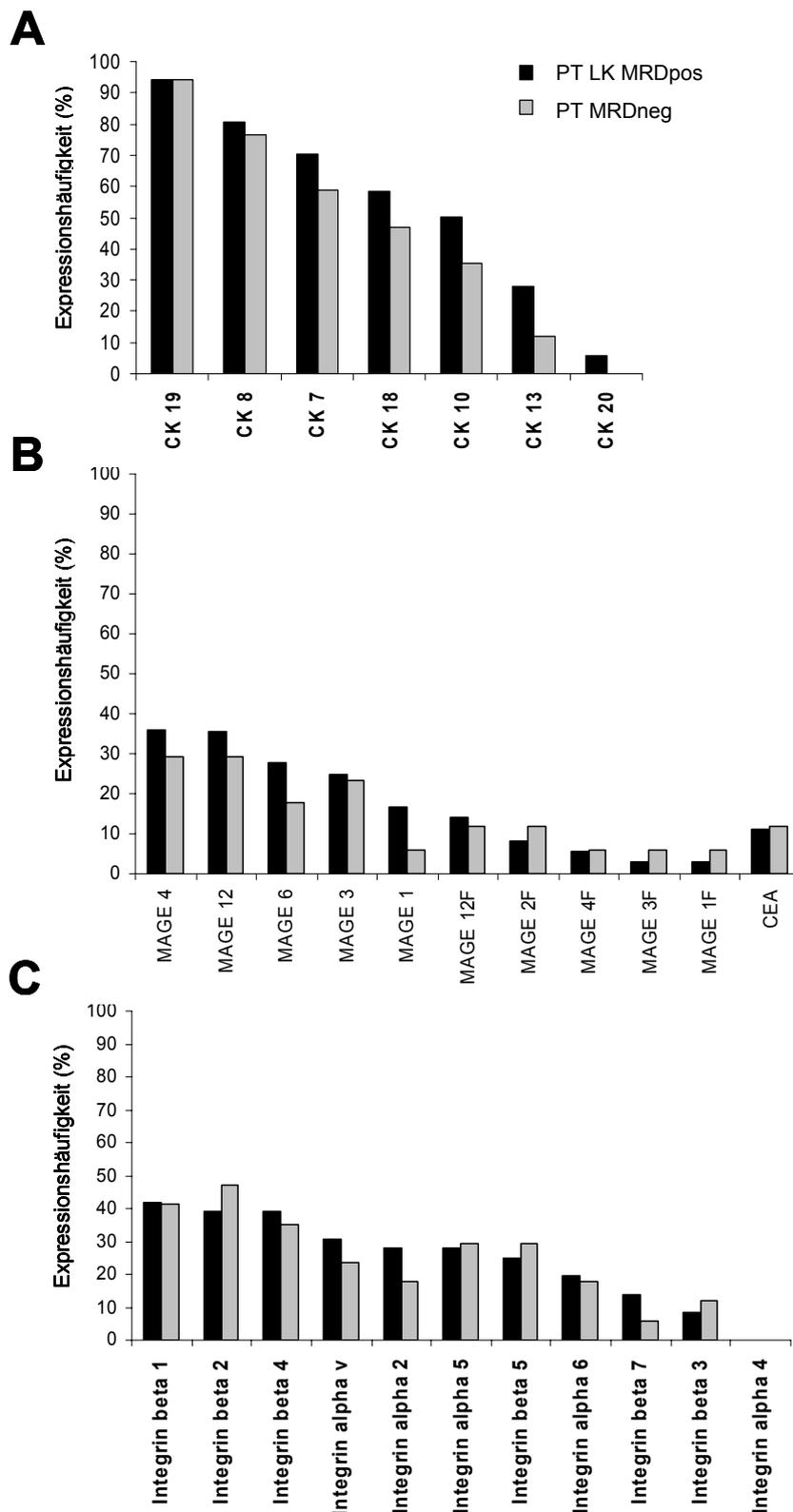
Zusätzlich zu den Proteasen und ihren Inhibitoren waren auf dem Filter tumorspezifische Gene, wie beispielsweise die MAGE-Antigene, Haushaltsgene und Gene, die über den epithelialen Ursprung der Probe Auskunft geben, vorhanden. Von der Gruppe der Zytokeratine, der MAGE Antigene und der Integrine wurden jeweils verschiedene Isotypen auf dem Filterarray immobilisiert. Alle Proben waren sowohl für  $\beta$ -Aktin, als auch für mindestens ein Zytokeratin positiv (Abb. 3.23). Die Haushaltsgene EF1-alpha, GAPDH und Ubiquitin wurden in allen Proben zwischen 60% und 85% exprimiert. Die Stärke der Expression wurde bei dieser ersten Auswertung nicht berücksichtigt. Alle Werte sind nochmals im Anhang (Tab. 7.2) im Detail aufgelistet.



**Abbildung 3.23: Vergleich der Expressionshäufigkeit von Zytokeratinen und Haushaltsgenen.** Disseminierte Tumorzellen aus den Lymphknoten (TZ, n=16), Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten (PT LK MRDpos, n=36) und Primärtumoren ohne disseminierte Tumorzellen (PT MRDneg, n=17). Die Gruppe von Zytokeratinen (n=7) besteht aus CK7, CK8, CK10, CK13, CK18, CK19 und CK20.

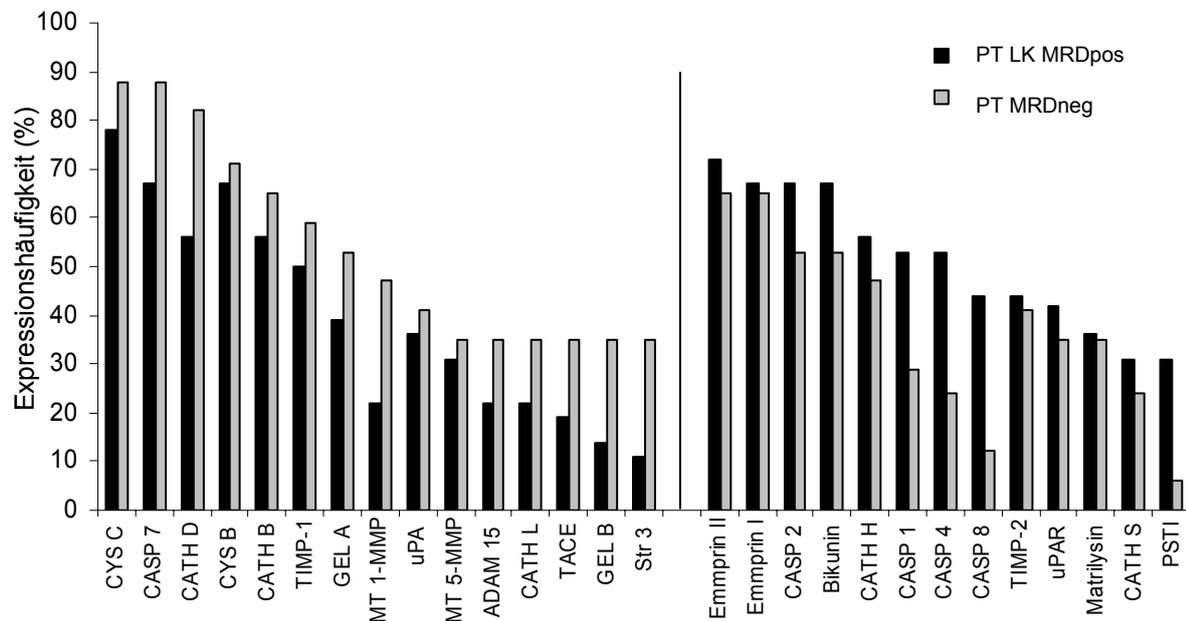
### 3.6.1 Vergleichende Expressionsanalyse der Primärtumoren

Zuerst sollte die Expressionshäufigkeit bei Primärtumoren mit Streuung (=PT LK MRDpositiv) in die lokalen Lymphknoten und bei Tumoren ohne Streuung (=PT MRDnegativ) miteinander verglichen werden. Weder bei den Zytokeratinen, noch bei den MAGE-Antigenen und den Integrinen konnten Unterschiede zwischen den beiden Primärtumortypen festgestellt werden (Abb. 3.24). Bei der Verteilung der Zytokeratine war das CK 19 mit über 94% (Abb. 3.24 A), bei den MAGE-Antigenen MAGE 4 und 12 (35%, Abb. 3.24 B) und bei den Integrinen die Untertypen beta 1 und beta 2 mit etwa 40% am häufigsten bei allen Primärtumoren vertreten (Abb. 3.24 C).



**Abbildung 3.24: Expressionshäufigkeit von Zytokeratinen (A), MAGE-Antigenen, Carcinoembryonalem Antigen CEA (B) und Integrinen (C) bei Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten (PT LK MRDpos, n=36) und Primärtumoren ohne disseminierte Tumorzellen (PT MRDneg, n=17). Die mit „F“ gekennzeichneten MAGE-Antigene stehen für eine kurze Variante der MAGE-Gene, ohne homologe Sequenzen.**

In der weiteren Auswertung sollten unterschiedlich exprimierte Proteasen zwischen den Primärtumoren auffindig gemacht werden. Es zeigte sich, dass keine Proteasen, bzw. keine Inhibitoren existieren, die ausschließlich bei einer der beiden Gruppen zu finden sind (Abb. 3.25).



**Abbildung 3.25: Expressionshäufigkeit der verschiedenen Proteasen bei Primärtumoren mit positivem Lymphknoten (PT LK MRDpos, disseminierte Tumorzellen, n=36) im Vergleich zu Primärtumoren mit negativem Lymphknoten (PT LK MRDneg, keine disseminierten Tumorzellen, n=17).** Es wurden nur Proteasen ausgewählt, die bei mind. 30% der Proben exprimiert wurden.

Allerdings wurden Cystatin C, Caspase 7 und Cathepsin D häufiger in den LK-negativen Primärtumoren, Caspase 2 und Bikunin häufiger in den LK-positiven Primärtumoren exprimiert. Die genaue prozentuale Expressionshäufigkeit für jede Gruppe ist im Anhang in Tabelle 7.3 aufgelistet.

### Stärke der Expression und Normalisierung

Die meisten der 109 Gene/Proteasen wurden nicht spezifisch exprimiert. Ein deutlicher Anteil der Streuung in der Expression der Gene entsteht durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen. Aus diesem Grund wurden alle Werte dahingehend normalisiert, dass sie sich unabhängig von diesen experimentell bedingten Unterschieden auf einem vergleichbaren Niveau befinden. Da nur Filter eingescannt und ausgewertet werden konnten, die eine gleichmäßige Schwärzung aufwiesen, wurden zum Teil Filter mit unterschiedlichen Belichtungszeiten (zwischen 15 min und 45 min) miteinander verglichen. In einem ersten Normalisierungsschritt wurden alle Proben mit der gleichen Belichtungsdauer in einer Gruppe zusammengefasst. Für diese Gruppe wurde ein mittlerer Expressionswert aller Haushaltsgene berechnet. Jedes Experiment wurde dann bezüglich diesem Wert korrigiert, d.h. mit dem

Verhältnis Mittelwert - alle Haushaltsgene der Gruppe/ Mittelwert - eigene Haushaltsgene multipliziert. Nach dieser gruppenspezifischen Angleichung exprimierten alle Experimente im Mittel auf dem gleichen Niveau unabhängig von der Belichtungsdauer.

In einem zweiten Normalisierungsschritt wurde jedes Experiment standardisiert, d.h. alle Proben auf den Mittelwert 0 korrigiert. Dafür wurde der Mittelwert abgezogen und auf eine Varianz gleich 1 normiert indem man durch die Standardabweichung teilt. Nach diesem zweiten Normalisierungsschritt konnten 23 Gene herausgefiltert werden, die über alle Experimente stark streuen. Die bioinformatische Auswertung und Normalisierung wurde von Dr. Thomas Ragg von Quantiom Bioinformatics GmbH & Co.KG durchgeführt.

Bei der Microarray-Datenanalyse treten immer wieder falsch positive Gene auf, die als statistisch unterschiedlich identifiziert werden, die es in Wirklichkeit aber nicht sind. Für die Korrektur dieser individuellen p-Werte stehen Methoden mit unterschiedlicher Stringenz zur Verfügung. Je stringenter eine Methode, desto weniger falsch positive Gene werden zugelassen. Die Methode sollte umso strenger sein, je mehr Gene untersucht werden. Um eine hohe Wahrscheinlichkeit für tatsächlich signifikant unterschiedlich exprimierte Gene zu gewährleisten wurden die individuellen p-Werte jedes Gens durch multiples Testen nach Benjamini/Hochberg (Benjamini & Hochberg 1995) korrigiert.

Nach dem Vergleich streuender (PT MRDpos) und nicht streuender Primärtumoren (PT MRDneg) bezüglich dieser 23 Gene zeigte sich, dass nur das Cathepsin B signifikant stärker bei Primärtumoren ohne disseminierte Zellen in Knochenmark oder Lymphknoten exprimiert wurde. Allerdings war der Unterschied nach Korrektur der p-Werte nach Benjamini & Hochberg nicht mehr signifikant (Tab. 3.5).

Gen	PT pos (n=36)	PT neg (n=17)	p	p*
CK 19	2,20	2,20	1	1
Emmprin I	1,30	1,34	0,904955	0,945677975
R13a	3,34	3,16	0,698161	0,892249758
Cath H	1,23	1,02	0,619226	0,890446988
Bikunin	1,36	1,46	0,772992	0,8889408
CK 18	1,58	1,38	0,577931	0,885968223
TIMP-2	0,97	0,77	0,49958	0,88375702
Cystatin B	1,57	1,69	0,72778	0,8806138
GAPDH	2,33	2,12	0,531507	0,873266001
Emmprin II	1,53	1,44	0,78825	0,86313375
TIMP-1	1,36	1,60	0,63328	0,85682784
b 2	0,74	1,15	0,164609	0,7572014
CK 8	2,52	1,91	0,170566	0,653779478
EF-1alpha	2,36	1,89	0,192729	0,633114765
Gel A	0,95	1,40	0,196066	0,56368975
Cystatin C	1,43	2,10	0,044519	0,5119685
$\beta$ -Aktin	3,13	3,74	0,199446	0,509783976
Ubiquitin	1,18	0,91	0,235684	0,49257956
Cath D	1,43	1,92	0,209849	0,4826527
CK 7	1,97	1,53	0,251451	0,482031567
Cath B	1,16	2,18	<b>0,017323</b>	0,398429
rS9	2,62	1,96	0,061765	0,35514875
TIMP-3	0,38	1,19	0,045522	0,349017174

**Tabelle 3.5: Expressionsstärke verschiedener Gene bei streuenden und nicht streuenden Primärtumoren nach Normalisierung und Korrektur nach Benjamini & Hochberg.** Es ergeben sich keine signifikant unterschiedlich exprimierten Gene zwischen Primärtumoren mit (PT pos) und ohne (PT neg) disseminierte Zellen. p\*, korrigierter p-Wert nach Benjamini & Hochberg (1995).

### 3.6.2 Vergleichende Expressionsanalyse von Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten

Für die vergleichende Analyse der Expression von Primärtumoren und einzelnen disseminierten Tumorzellen wurden Patienten ausgewählt, bei denen sowohl die Filterergebnisse von den Arealen des Primärtumors als auch von den dazugehörigen disseminierten Einzelzellen vorhanden waren. Der Datensatz bestand aus 36 Arealen der Primärtumoren und 16 disseminierten Tumorzellen von 13 Patienten. Zuerst wurde die Expressionshäufigkeit bei den verschiedenen Zytokeratinen, MAGE-Antigenen und Integrienen miteinander verglichen (Abb. 3.26).

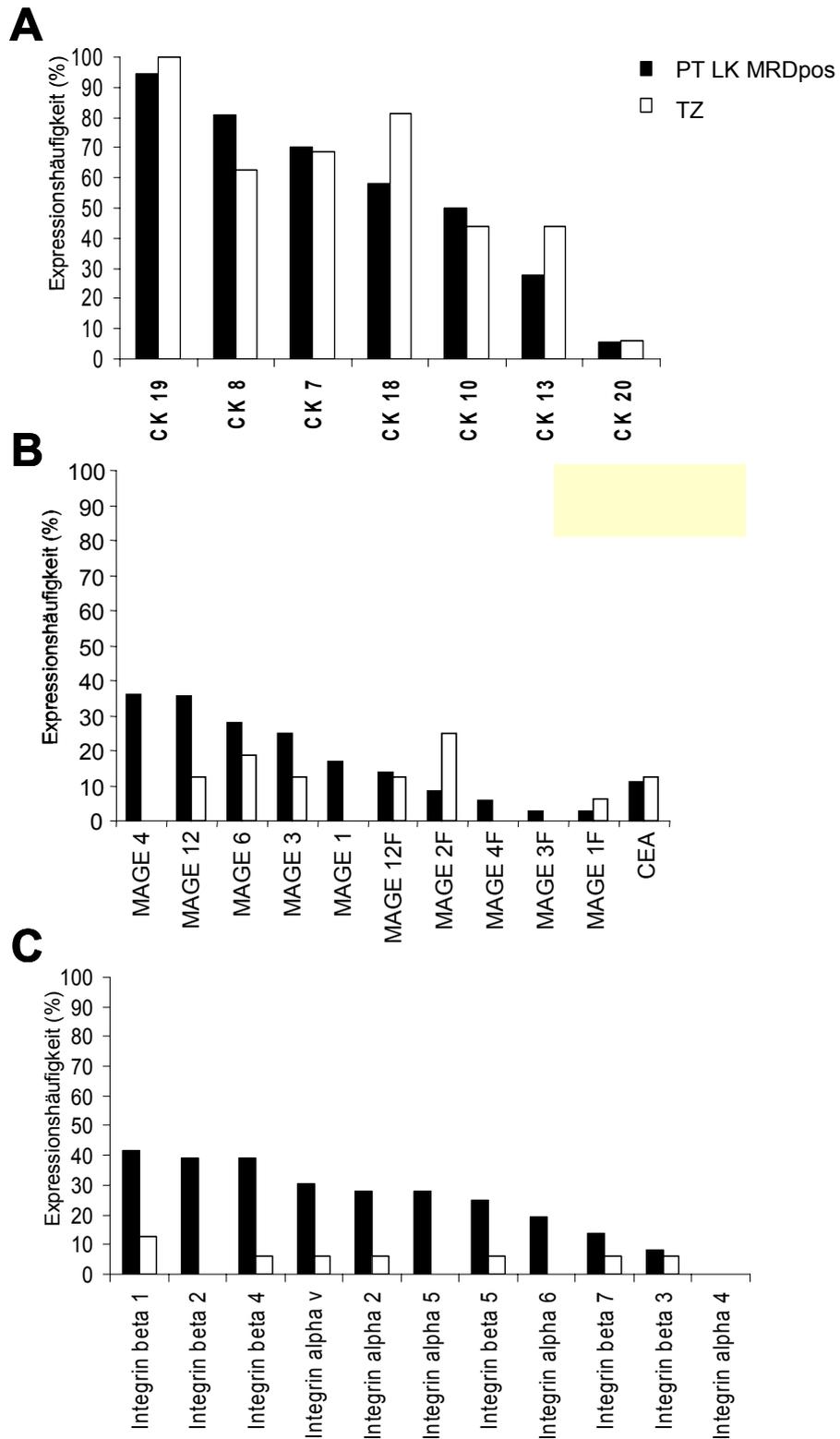
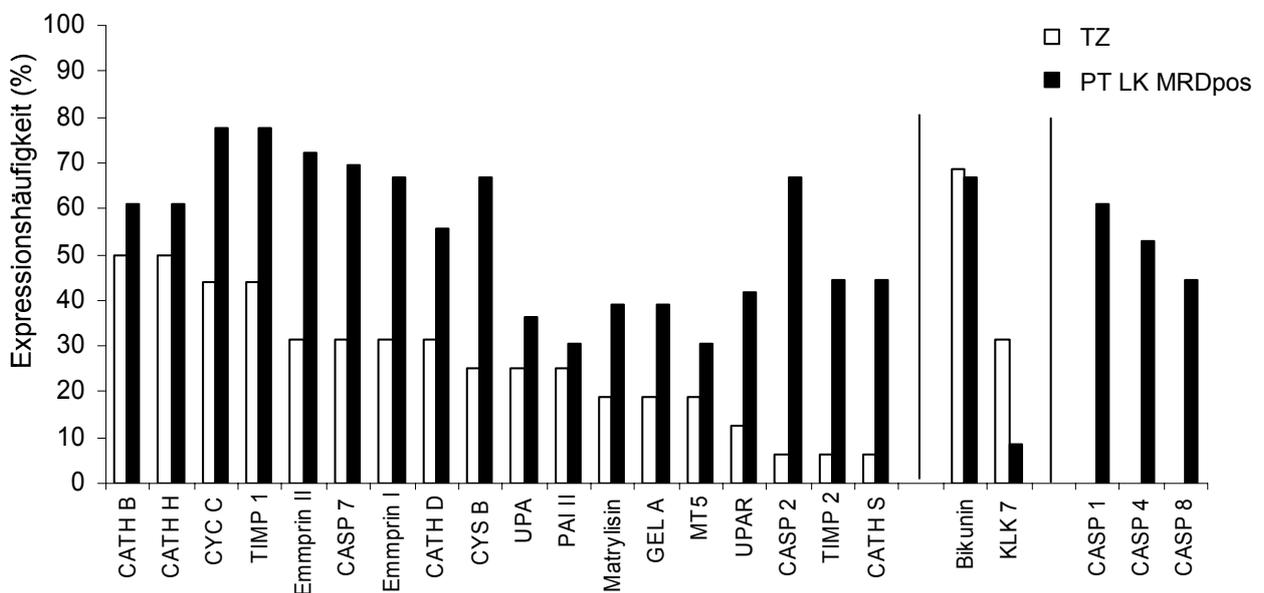


Abbildung 3.26: Häufigkeit der Expression von Zytokeratinen (A), MAGE-Antigenen, Carcinoembryonalem Antigen CEA (B) und Integrinen (C) bei disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten (TZ, n=16) und Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten (PT LK MRDpos, n=36).

Der epitheliale Ursprung der Zellen wurde wieder anhand der Zytokeratinexpression bestätigt. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren sehr gering. In beiden Gruppen wurde das CK 19 mit über 90% am häufigsten und CK 20 mit unter 10% am seltensten exprimiert (Abb. 3.26 A). Die MAGE-Antigene, die bereits seit längerem für eine Immuntherapie im Gespräch sind, fanden sich in der Regel häufiger bei den Primärtumoren. In etwa einem Drittel der Primärtumoren wurden MAGE 4 und MAGE 12 exprimiert. Einige Isotypen wurden allerdings auch von den disseminierten Tumorzellen exprimiert, wie beispielsweise MAGE 2, das mit etwa 25% häufiger als in den Primärtumoren zu finden war (Abb. 3.26 B). Die unterschiedliche Expression der Integrin-Rezeptormoleküle spiegelt deren Bedeutung bei der Verankerung der Zellen aneinander und an die extrazelluläre Matrix wieder. Sie war dementsprechend häufiger bei den Zellen aus den Primärtumoren (Integrine beta 1, beta 2 und beta 3 bei etwa 40%) als bei den disseminierten Einzelzellen zu finden (Abb. 3.26 C). Die Auswertung der Expressionsstärke dieser drei Gruppen ergab nur geringfügige Unterschiede bei den MAGE-Antigenen und den Integrinen. Die Zytokeratine wurden etwas stärker in den Einzelzellen als in den Primärtumoren exprimiert (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde versucht charakteristische Proteasen für Einzelzellen, bzw. den Primärtumor zu identifizieren. 18 Proteasen wurden sowohl in den Primärtumoren, als auch in den disseminierten Einzelzellen exprimiert (Abb. 3.27).



**Abbildung 3.27: Expressionshäufigkeit der Proteasen von verschiedenen Arealen aus den Primärtumoren (PT LK MRDpos, n=36) und deren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen (TZ, n=16) aus den Lymphknoten von 13 NSCLC-Patienten.** Es wurden nur Proteasen gewertet, die bei mindestens 30% der Proben exprimiert wurden.

Von diesen Proteasen wurden 16 häufiger in den Primärtumoren exprimiert. Bei einigen waren die Unterschiede zwischen Einzelzellen und Primärtumor sehr groß, wie beispielsweise bei Caspase 2, andere wiederum wurden fast gleich häufig exprimiert (z.B. PAI II). Eine deutlich vermehrte Expression von Proteasen bei den Einzelzellen im Vergleich zu den Primärtumoren konnte nur bei Kallikrein 7 festgestellt werden. Bei über 30% der Primärtumoren konnten drei Caspasen (1, 4 und 8) identifiziert werden, die nur in den Arealen des Primärtumors zu finden waren. Keine Protease wurde ausschließlich von Einzelzellen exprimiert. Eine genaue Auflistung der Werte in Prozent ist im Anhang (Tab. 7.4) zu finden.

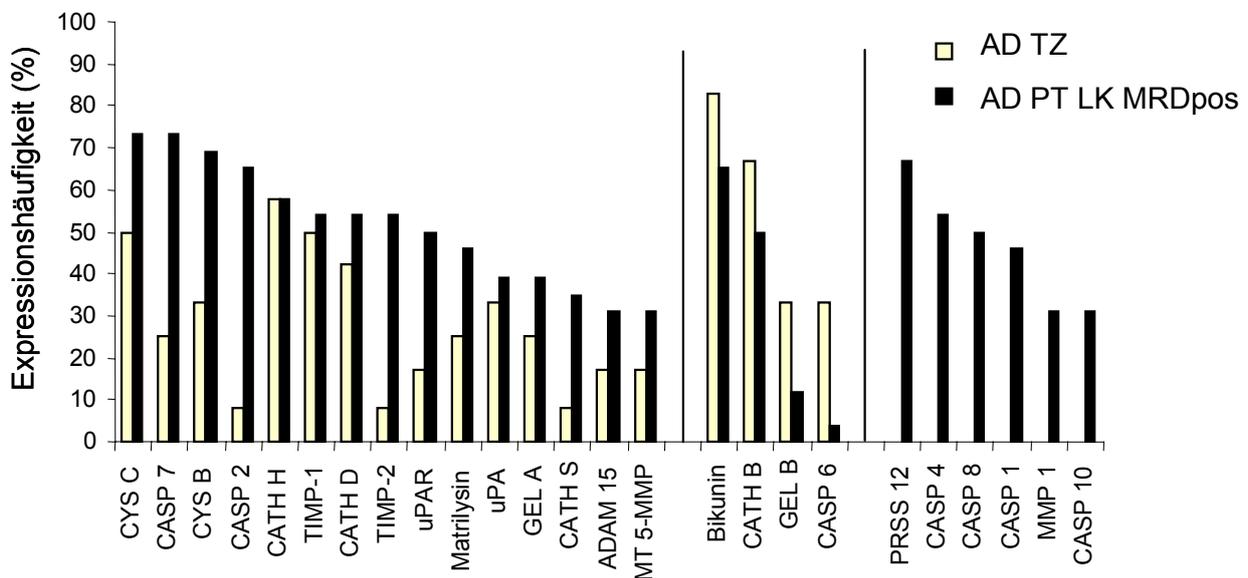
Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich für die 23 nach Normalisierung über alle Experimente streuenden Gene signifikante Unterschiede in der Stärke der Expression zwischen den Primärtumoren und ihren entsprechenden disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten ergeben (Tab. 3.6). Bikunin und die Zytokeratine 18 und 19 wurden stärker bei den Einzelzellen exprimiert, das ribosomale Protein rS9 hingegen stärker bei den Primärtumoren. Nach p-Wert Korrektur (Benjamini & Hochberg) waren nur noch die Unterschiede für rS9 signifikant.

Gen	PT pos (n=36)	TZ (n=16)	p	p*
CK 7	1,97	1,94	0,952395	0,952395
Cystatin C	1,43	1,40	0,920744	0,96217748
$\beta$ -Aktin	3,13	3,09	0,91285	0,99957075
EF-1alpha	2,36	2,22	0,750302	0,8628473
TIMP-1	1,36	1,18	0,633321	0,76631841
Cath H	1,23	1,42	0,626277	0,800382006
R13a	3,34	3,10	0,612265	0,828394545
Cath D	1,43	1,19	0,531563	0,764387594
TIMP-3	0,38	0,56	0,416108	0,637893564
Emmprin I	1,30	0,94	0,341675	0,561372025
Cystatin B	1,57	1,05	0,231968	0,410351392
Emmprin II	1,53	1,00	0,147827	0,283384359
Cath B	1,16	0,71	0,132319	0,27654671
GAPDH	2,33	1,65	0,084524	0,1944052
Gel A	0,95	0,45	0,070227	0,179500212
TIMP-2	0,97	0,44	0,064562	0,18561575
b 2	0,74	0,34	0,053221	0,174830985
Ubiquitin	1,18	1,77	0,049842	0,191044386
CK 8	2,52	1,49	0,028209	0,1297614
CK 19	2,20	2,95	<b>0,022762</b>	0,1308815
CK 18	1,58	2,71	<b>0,011318</b>	0,086775106
Bikunin	1,36	2,55	<b>0,004824</b>	0,055476
rS9	2,62	1,35	<b>0,000666</b>	<b>0,015318</b>

**Tabelle 3.6: Expressionsstärke der 23 differenziell exprimierten Gene von Arealen aus den Primärtumoren und deren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten von 13 NSCLC-Patienten nach Normalisierung und Korrektur der p-Werte nach Benjamini & Hochberg.** Signifikante Unterschiede zwischen streuenden Primärtumoren (PT pos, n=36) und ihren entsprechenden disseminierten einzelnen Tumorzellen (TZ, n=16) ergeben sich für rS9 ( $p^*=0,01$ ).

### Adenokarzinompatienten und ihre disseminierten Tumorzellen

Bei den oben genannten 13 NSCLC-Patienten handelte es sich um 10 Adenokarzinome und drei Plattenepithelkarzinome. Die verschiedenen histologischen Untergruppen beim Bronchialkarzinom können sich auch durch eine eigene Proteasenexpression voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die verschiedenen Areale der Adenokarzinome und deren dazugehörige disseminierte Tumorzellen aus dem Lymphknoten in der nächsten Auswertung gesondert betrachtet. Die Expressionshäufigkeit der untersuchten Moleküle bei 26 Arealen aus den Primärtumoren konnte mit 12 disseminierten Einzelzellen verglichen werden (Abb. 3.28). Eine genaue Auflistung der prozentualen Expression ist im Anhang (Tab. 7.5) aufgeführt.



**Abbildung 3.28: Expressionshäufigkeit der Proteasen von verschiedenen Arealen aus den Primärtumoren (PT LK MRDpos, n=26) und deren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen (TZ, n=12) aus den Lymphknoten von 10 Adenokarzinompatienten.**

15 Proteasen bzw. ihre Inhibitoren wurden häufiger in den Primärtumoren exprimiert. Dabei handelte es sich bis auf drei Proteasen (ADAM 15, PAI II, Cath B) um die Gleichen, die bereits bei der Auswertung aller Proben vermehrt bei den Primärtumoren auftraten (PT LK MRDpos, vgl. Abb. 3.27). Vier Proteasen wurden häufiger bei den disseminierten Tumorzellen identifiziert. Hier wies die Caspase 6 den deutlichsten Unterschied auf (Differenz von 29%). Fünf Proteasen wurden nur bei den Primärtumoren der Adenokarzinome exprimiert (Caspasen 1, 4, 8, 10 und MMP 1). Sie waren auch ohne die Unterteilung in Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome ausschließlich bei den Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten zu finden. Es konnte keine Protease / Inhibitor festgestellt werden, die ausschließlich bei den disseminierten Einzelzellen von Adenokarzinomen exprimiert wurde.

Eine Analyse der Plattenepithelkarzinome war aufgrund der geringen Patientenzahl (n=3) nicht sinnvoll.

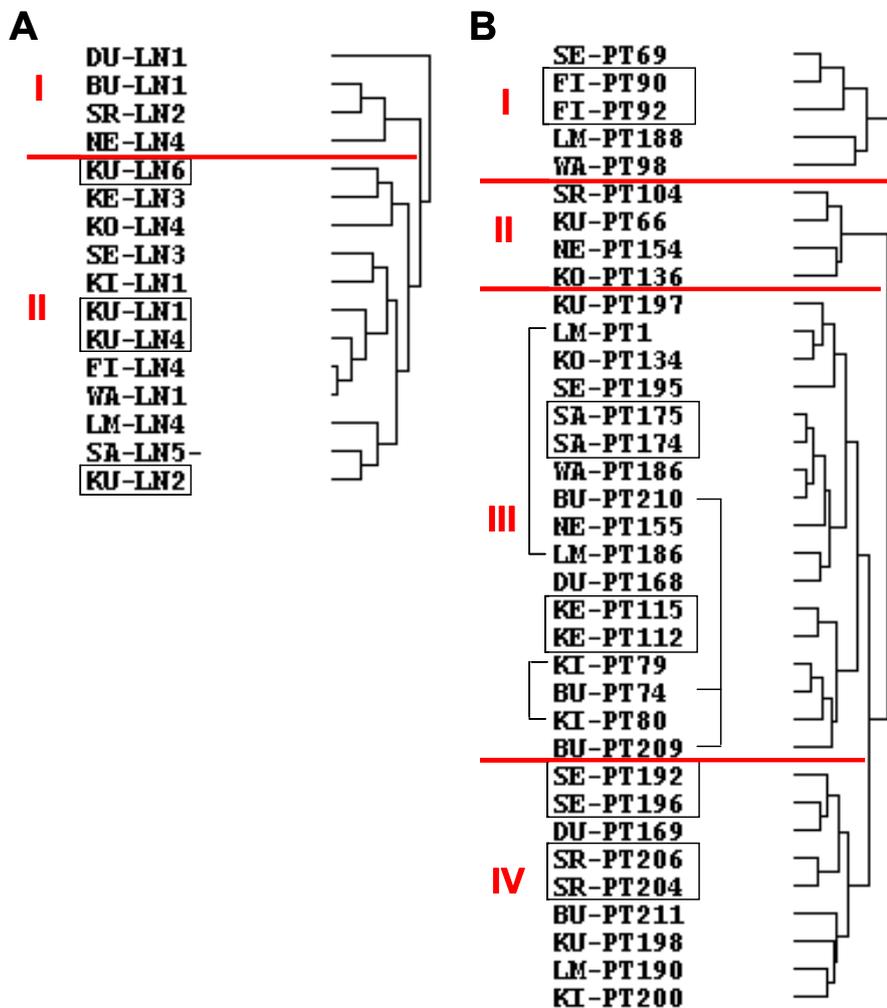
Bezüglich der Stärke der Expression ergab die Unterscheidung von Primärtumor und disseminierten Tumorzellen von Adenokarzinompatienten signifikante Unterschiede sowohl vor, als auch nach p-Wert Korrektur für Zytokeratin 18, 19, rS9 und auch für das Bikunin, das beim Vergleich aller Primärtumoren nach p-Wert Korrektur nicht mehr signifikant war (Tab. 3.7, vgl. Tab. 3.6).

Gen	PT ADC (n=26)	TZ ADC (n=12)	p	p*
CK 7	2,00	2,12	0,811629	0,888733755
Cystatin C	1,51	1,41	0,819394	0,85626673
Cath D	1,34	1,45	0,827114	0,827114
TIMP-1	1,38	1,10	0,507133	0,777434889
Cystatin B	1,61	1,27	0,526225	0,75671155
Cath B	0,96	0,81	0,634131	0,72925065
EF-1alpha	2,42	2,11	0,532673	0,720706569
TIMP-3	0,42	0,60	0,532673	0,680756094
Emmprin II	1,29	0,95	0,400943	0,658749349
Emmprin I	1,19	0,92	0,539163	0,65238723
Cath H	1,15	1,63	0,257726	0,53864734
β-Aktin	3,16	2,70	0,274359	0,525946203
CK 8	2,47	1,85	0,291741	0,516089829
R13a	3,52	2,77	0,219365	0,5045395
Gel A	1,04	0,46	0,111822	0,285817032
TIMP-2	1,08	0,45	0,06822	0,1961325
GAPDH	2,31	1,39	0,035086	0,134484638
Ubiquitin	1,09	1,82	0,026125	0,120175
b 2	0,87	0,31	0,035086	0,11525751
CK 18	1,74	3,12	<b>0,00719</b>	<b>0,0413425</b>
rS9	2,64	1,33	<b>0,001855</b>	<b>0,014222285</b>
CK 19	2,02	3,32	<b>0,000523</b>	<b>0,0060145</b>
Bikunin	1,20	3,00	<b>0,000163</b>	<b>0,003749</b>

**Tabelle 3.7: Expressionsstärke der differentiell exprimierten 23 Gene von Arealen aus den Primärtumoren und deren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten von 10 Adenokarzinompatienten nach Normalisierung und Korrektur der p-Werte nach Benjamini & Hochberg.** Signifikante Unterschiede zwischen den Primärtumoren (PT LK MRDpos, n=36) und den entsprechenden einzelnen Tumorzellen (TZ, n=16) ergeben sich für CK 19 (p\*=0,01), CK 18 (p\* = 0,04), Bikunin (p\*=0,00) und rS9 (p\*=0,01).

### Clusteranalyse der Expressionsdaten

Nachdem die unterschiedliche Expression für die verschiedenen Gruppen analysiert wurde, sollte mit Hilfe einer EisenLab Clusteranalyse der Transkriptomdaten geklärt werden, wie ähnlich disseminierte Tumorzellen aus den Lymphknoten und die verschiedenen mikrodissektierten Areale aus den Primärtumoren der Patienten untereinander sind (Abb. 3.29). Bei den disseminierten Einzelzellen von 13 Patienten konnten nur bei einem Patienten (KU) mehrere disseminierte Zellen erfolgreich hybridisiert werden. Alle vier Zellen befanden sich in einem Level (II). Zwei dieser Zellen, KU-LN1 und KU-LN4 lagen direkt nebeneinander, d.h. sie waren sich in ihrer Expression ähnlicher. Bei acht von insgesamt 13 Patienten (61%) lagen mindestens zwei Areale der Primärtumoren zusammen in einem Level (I, II, III und IV). Fünf von diesen clusterten unmittelbar nebeneinander, waren sich also ähnlicher. Drei weitere Patienten waren in verschiedenen Unterarmen von Level III zu finden.

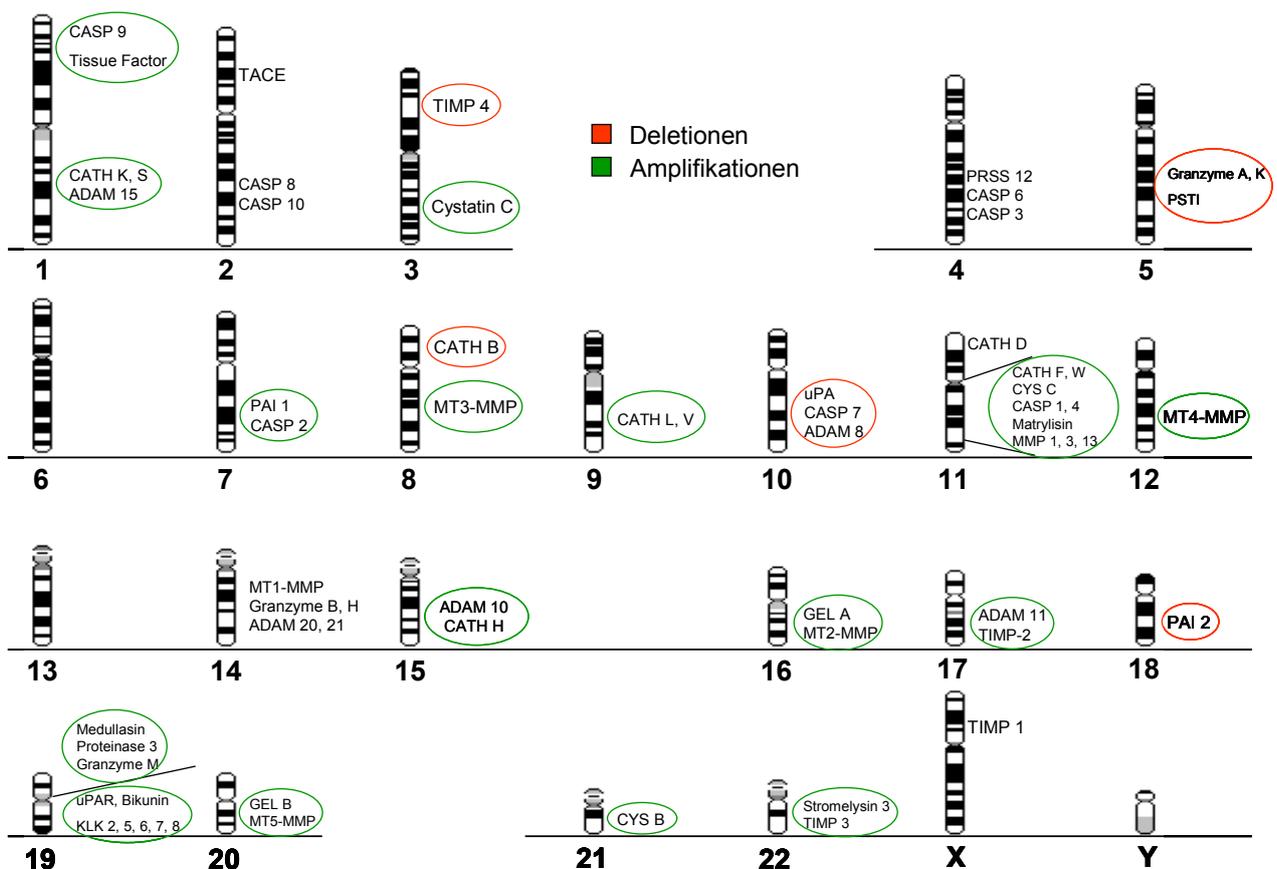


**Abbildung 3.29: Clusteranalyse der Arraydaten.** **A**, Dendrogramm der einzelnen disseminierten Tumorzellen (n=16). **B**, Dendrogramm der vers. Areale aus den Primärtumoren (n=35). Kästchen markieren näher verwandte disseminierte Tumorzellen, bzw. Areale aus dem Primärtumor eines Patienten, Klammern kennzeichnen verschiedene Areale aus den Primärtumoren eines Patienten, die innerhalb eines Levels (=Unterarm) zu finden sind.

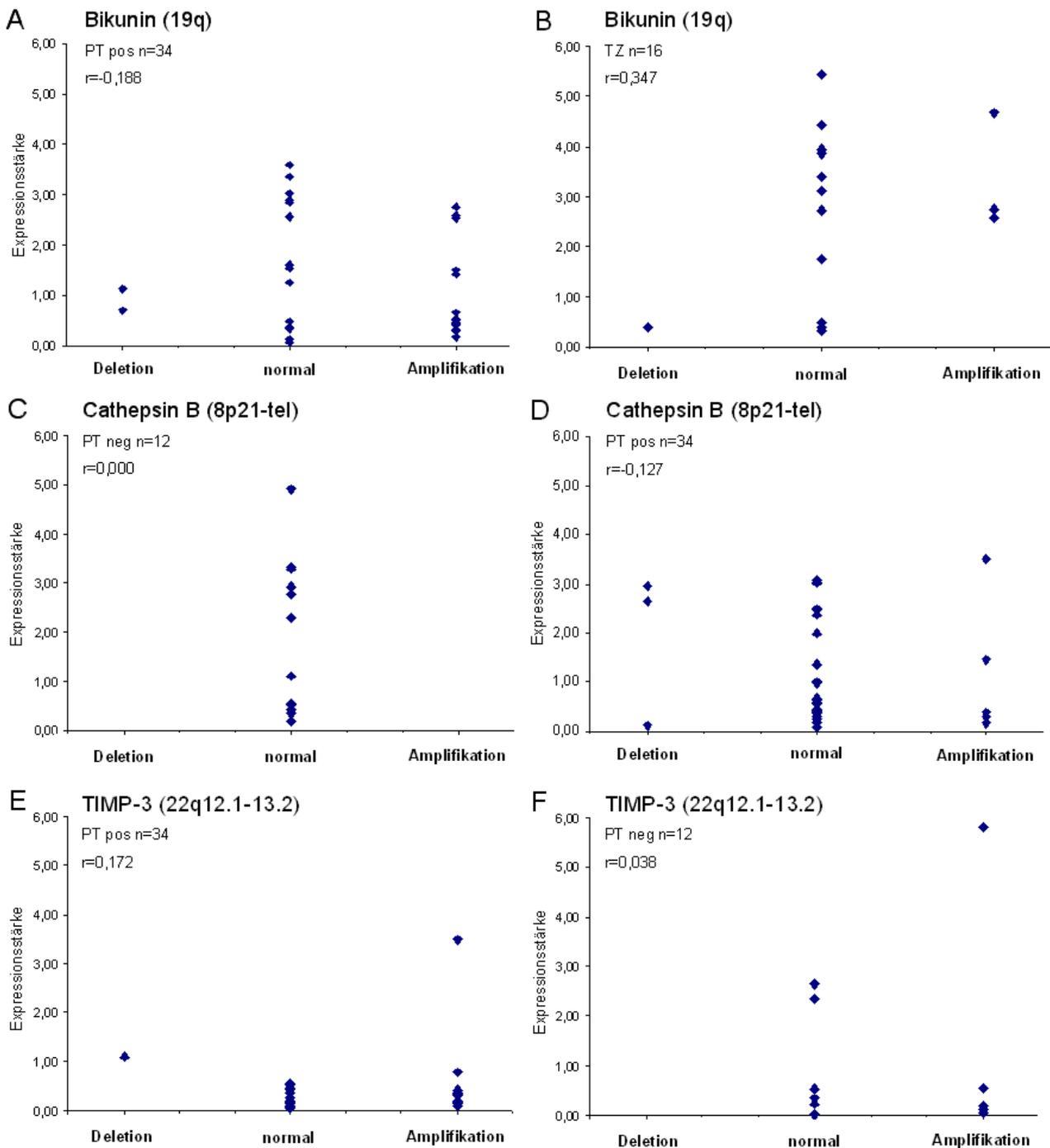
Bereits mit den genomischen Daten konnte durch die CGH gezeigt werden, dass sich über die Hälfte der disseminierten Tumorzellen einem Areal aus dem Primärtumor zuordnen lassen. Der Versuch auch nach der Transkriptomanalyse allen PT-Arealen ihre entsprechenden disseminierten Einzelzellen zuzuordnen, ist aufgrund der vermehrten Proteasenexpression in den Primärtumoren im Vergleich zu den Einzelzellen, die zum einen durch den Zellverband und die daraus resultierenden Zell-Zell-Interaktionen zustande kommt und zum anderen auch in Zusammenhang mit der höheren Zellzahl steht, nicht sinnvoll. Eine Unterteilung nach Primärtumoren (PT) und Tumoreinzelzellen (TZ) würde sich allein aufgrund der geringeren Expression bei den disseminierten Einzelzellen im Vergleich zu den Primärtumoren ergeben.

### 3.7 Chromosomale Zuordnung der Proteasen und ihrer Inhibitoren

Die chromosomale Lokalisation der Proteasen und ihrer Inhibitoren könnte Hinweise auf mögliche Zusammenhänge mit den genomischen Aberrationen geben. In Abbildung 3.30 sind häufig identifizierte chromosomale Veränderungen bei Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten und die eventuell davon betroffenen Proteasen, bzw. Inhibitoren dargestellt.



**Abbildung 3.30: Chromosomale Lokalisation der Proteasen und ihrer Inhibitoren.** In rot sind häufige deletierte, in grün häufig amplifizierte Regionen in den Protease-codierenden Bereichen von Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen markiert.



**Abbildung 3.31: Korrelation zwischen Stärke der Proteasenexpression und genomischer Aberration bei Primärtumoren mit disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten, Primärtumoren ohne disseminierte Tumorzellen und disseminierten Tumorzellen. A und B, Bikunin; C und D, Cathepsin B; E und F, TIMP-3.**

Alle Proteasen aus den als differenziell exprimiert identifizierten 23 Molekülen wurden auf eine mögliche Korrelation zwischen Expression und chromosomalen Veränderungen hin untersucht. Dabei konnte für keine Protease/Inhibitor ein Zusammenhang zwischen Expression und Aberration festgestellt werden. Als Beispiele sind Bikunin, Cathepsin B und TIMP-3 gezeigt (Abb. 3.31). Eine detaillierte Liste über alle Proteasen und ihre Inhibitoren, Synonyme und ihre chromosomale Lokalisation ist im Anhang (Tab. 7.8) aufgeführt. Auch

wenn sich die Proben der Primärtumoren hinsichtlich ihrer Proteasenexpression deutlich von den disseminierten Einzelzellen unterscheiden bleibt noch offen, inwieweit ein Zusammenhang zwischen Aberration und Expression besteht, bzw. ob die gefundenen chromosomalen Aberrationen einer Überexpression oder Niedrigregulierung der jeweiligen Proteasen entsprechen. Hierfür sind genauere Untersuchungen, zum Beispiel mit Markern für die jeweilige Region, nötig.

## 4 Diskussion

### 4.1 Detektion und Frequenz disseminierter Tumorzellen

Mehrere Studien haben gezeigt, dass der Nachweis von disseminierten epithelialen Tumorzellen in den mesenchymalen Organen Knochenmark und Lymphknoten für Patienten mit Karzinomen von prognostischer Bedeutung ist (Braun 2005, Yasumoto 2003). In dieser Arbeit wurden einzelne disseminierte Tumorzellen mit Hilfe von zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern detektiert. Epitheliale disseminierte Tumorzellen aus den Knochenmarkproben von NSCLC-Patienten wurden mit dem monoklonalen Antikörper A45-B/B3 nachgewiesen. Dieser bindet an ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8, 18 und 19. Bei der Verwendung dieses Antikörpers in den Proben der Lymphknoten würde es aufgrund der dort vorhandenen retikulären Zytokeratin-exprimierenden Bindegewebszellen zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. Um dies zu vermeiden, wurde hierfür der monoklonale Antikörper Ber-EP4 ausgewählt, der auf der Oberfläche epithelialer Zellen an das epithelspezifische Zelladhäsionsmolekül Ep-CAM (17-1A, EGP40) bindet und einen spezifischen Nachweis der disseminierten epithelialen Einzelzellen im Lymphknoten ermöglicht (Passlick et al. 1994, Kubuschok et al. 1999, Latza et al. 1990). In 36 von 115 (31,3%) untersuchten Knochenmarkpunktaten wurden CK-positive Zellen und in 25 von 102 (24,5%) untersuchten Lymphknoten EpCAM-positive Zellen detektiert. Die Detektionsrate von über 20% im Lymphknoten stimmt mit der Studie von Passlick et al. (1996) überein. In dieser wurden mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4 in 21,6% der 125 untersuchten Lymphknotenproben positive Zellen detektiert (Tab 4.1).

In anderen Studien, die zum Teil sowohl Knochenmark- als auch Lymphknotenproben untersuchten, wurde mit dem biklonalen antiCK Antikörper AE1/AE3 eine Detektionsrate zwischen 15,7% und 44,9% erreicht. Bei der Häufigkeit von CK<sup>+</sup>-Zellen im Knochenmark schwanken die Zahlen zwischen 27,8% in einer Studie von Osaki et al. (2002), 33,8% bei der Gruppe von Pantel et al. (1993), 31,9% bei Yasumoto et al. (2003) und 40% bei Cote et al. (1995, Tab 4.1).

**Tabelle 4.1: Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen beim Bronchialkarzinom.**  
LK=Lymphknoten; KM=Knochenmark.

Studie	Zellen	Patienten	verwendete Antikörper	Follow-up (Monate)	Detektion (%)
<b>Pantel K 1993</b>	KM	n=88 M0 R0	Monoklonaler anti-CK2	13	30
<b>Cote RJ 1995</b>	KM	n=71 stage I-III (n=43) stage IV (n=4)	Maus monoklonaler anti-AE1 Maus monoklonaler anti-CAM5	13,6	40
<b>Pantel K 1996</b>	KM	n=139 T1-4 N0-2 M0	Monoklonaler anti-CK2 gegen CK18	39	59,7
<b>Passlick B 1999</b>	KM	n=139 stage I-III R0	Monoklonaler anti-CK2 gegen CK18	66	59,7
<b>Passlick B 1996</b>	LK	n=125 565 LK N0	Monoklonaler anti-Ber-Ep4	39	21,6
<b>Osaki T 2002</b>	LK KM	n=115 stage I R0	LK: biklonaler anti-CK (AE1/AE3) n=243 KM: monoklonaler anti-CK (CK2) n=115	35	LK: 27,8 KM: 27,8
<b>Gu CD 2002</b>	LK	n=49 stage I R0	biklonaler anti-CK (AE1/AE3) n=474 + monoklonaler anti-p53 (DO-1) n=263	60	44,9
<b>Yasumoto K 2003</b>	LK KM	n=351 stage I-III R=0	LK: biklonaler anti-CK (AE1/AE3) n=112 KM: monoklonaler anti-CK (CK2) n=216	48,2	KM: 31,9 LK: 15,7

### Isolierte Zellen sind epithelialen und neoplastischen Ursprungs

Es kann nicht zwangsläufig davon ausgegangen werden, dass es sich bei den isolierten disseminierten Einzelzellen um Tumorzellen handelt. Der maligne Ursprung konnte allerdings mit Hilfe der CGH festgestellt werden. So wiesen alle disseminierten Einzelzellen und auch alle mittels Mikrodissektion isolierten Zellen des Primärtumors chromosomale Veränderungen auf. Dabei war die Anzahl an Aberrationen bei den disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten (n=20) mit 14,2 Aberrationen pro Patient im Durchschnitt sogar höher als bei den Primärtumoren (n=15; 11,6). Da sich die einzelnen Tumorzellen vor allem durch die erhöhte Anzahl an Deletionen von den Primärtumoren unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass die disseminierten Tumorzellen diese Deletionen sehr früh in ihrer Entwicklung und unabhängig vom Primärtumor ansammeln. Unter Umständen führen diese Deletionen zum Verlust von Adhäsionsmolekülen und befähigen Zellen dazu, sich aus dem Zellverband zu lösen und zu metastasieren.

Als sicherer Beweis für den neoplastischen Ursprung der isolierten Zellen kann zusätzlich die Expression verschiedener Mitglieder der MAGE Tumor-Antigen Familie angesehen werden. Bei den MAGE-Antigenen, auch bekannt als CT-Antigene, handelt es sich um eine Gruppe von Tumorantigenen, die außer im Testis- ausschließlich in Tumorgewebe zu finden sind und meist als Multigenfamilien X-chromosomal lokalisiert sind (Zendman et al. 2003). Sie wurden mehrfach auch im Zusammenhang mit Bronchialkarzinomen beschrieben und ihre Expression bedeutet in der Regel eine schlechtere Prognose für die Patienten (Sugita et al. 2002, Kufer et al. 2002, Gure et al. 2005, Peikert et al. 2006). Es zeigte sich, dass die Expression von MAGE-A bei disseminierten Zellen aus dem Knochenmark als unabhängiger prognostischer Faktor für NSCLC-Patienten angesehen werden kann (Sienel et al. 2007). Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben wurde bei 47,2% der streuenden, bei 41,2% der nicht-streuenden Primärtumoren und bei 31,3% der disseminierten Einzelzellen mindestens ein Mitglied dieser Antigenfamilie nachgewiesen.

Des Weiteren ist es möglich, die Anwesenheit von Tumorzellen durch die Expression des Zelladhäsionsmoleküls CEA (Carcinoembryonales Antigen) zu bestätigen. Bei dem ursprünglich zur Identifikation von gastro-intestinalen Adenokarzinomen eingesetzten Marker handelt es sich um ein Tumorantigen, dessen Expression auch beim Bronchialkarzinom festgestellt werden konnte. Beispielsweise konnte die Gruppe um D´Cunha (2002) CEA mittels RT-PCR in 90% der Primärtumorproben und in 25% der untersuchten Stage I Lymphknoten nachweisen. Sie erzielten damit die größte Sensitivität, die bisher bei der Detektion von disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten erreicht wurde. Die Ergebnisse von Nosotti et al. (2006) zeigen außerdem, dass CEA mRNA negative Lymphknoten eine bessere Prognose für die Patienten bedeuten. Mittlerweile wird das carcinoembryonale Antigen in Kombination mit weiteren Tumormarkern (CYFRA 21-1, TPS) für die Diagnose und Verlaufskontrolle beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom herangezogen (Barak et al. 2004, Buccheri et al. 2001). Bei den in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Proben konnte bei 11,1% der streuenden und 11,8% der nicht-streuenden Primärtumoren und bei 37,5% der disseminierten Einzelzellen eine Expression dieses Antigens festgestellt werden.

Außerdem kann der epitheliale Ursprung der Zellen durch die Expression von Zytokeratinen und für die disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten zusätzlich durch die Isolation der Zellen über Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM bestätigt werden (Mitas et al. 2003, Passlick et al. 2000). Alle mikrodisssektierten Areale der Primärtumoren und alle isolierten disseminierten Tumorzellen exprimierten mindestens eines der sieben auf dem Filter vorhandenen Zytokeratine, wodurch ihr epithelialer Ursprung bestätigt werden kann.

## **4.2 Prognostische Bedeutung lymphogener und hämatogener Disseminierung**

### **Das untersuchte Kollektiv ist repräsentativ für NSCLC-Patienten**

In den vergangenen Jahren wurde die prognostische Relevanz der disseminierten Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten bei den unterschiedlichsten Tumortypen untersucht und wiederholt ein Einfluss auf das Überleben der Patienten festgestellt. Diese Untersuchungen haben aber bis heute noch keine klinische Bedeutung erlangt. Zur Zeit werden für die Abschätzung der Prognose beim Bronchialkarzinom nur die Tumorgöße, der Befall der Lymphknoten, das Auftreten von Fernmetastasen und das Ausmaß der Resektion herangezogen. Die Stadieneinteilung richtet sich nach dem internationalen System nach C.F. Mountain (2000). Nach dieser Einteilung haben NSCLC-Patienten im Stadium pIIB (T2N1M0, T3N0M0) eine signifikant schlechtere Prognose als Patienten im Stadium pIIA (T1N1M0) (Mountain 1997).

Für das hier untersuchte Kollektiv, das sich aus 124 NSCLC-Patienten ohne diagnostizierte Fernmetastasen zusammensetzt, konnte gezeigt werden, dass Patienten mit großen, das umliegende Gewebe infiltrierenden Tumoren, mit Befall der regionalen Lymphknoten und mit nicht vollständig resezierten Tumoren signifikant kürzer überlebten als Patienten mit noch kleinen, vollständig im Gesunden entfernten Tumoren und ohne Befall der regionalen Lymphknoten. Das hier untersuchte Kollektiv ist somit repräsentativ für NSCLC-Patienten und damit für die weitere Untersuchung und den Vergleich der verschiedenen Metastasierungswege geeignet.

### **Der prognostische Einfluss der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung**

Bei den Lymphgefäßen handelt es sich um ein sogenanntes Ein-Weg-Transportsystem für die Lymphe, eine Flüssigkeit aus Wasser, Elektrolyten, Proteinen und Zellen. Die blind endenden, löchrigen, mit dünnem Endothel ausgestatteten Gefäße, die sich bis in alle Extremitäten immer feiner verzweigen, besitzen keine durchgehende Basalmembran und erleichtern dadurch den Austausch von Zellen und Flüssigkeit (Schmid-Schonbein 1990). Eine Beteiligung der Lymphgefäße an der Tumorzeldisseminierung und Metastasierung gilt mittlerweile als unumstritten (Pepper 2001). Der genaue Vorgang, der dazu führt, dass die Tumorzellen sich vom Primärtumor lösen und in die Lymphgefäße einwandern ist jedoch noch weitgehend unklar. Mittlerweile weiß man, dass Lymphgefäße in der Nähe des Tumors die Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasen erhöhen und dass die Anzahl der Gefäße mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliert. Dabei scheint es allerdings einen Unterschied zu geben, um welche Gefäße es sich handelt. So können nur peritumorale Lymphgefäße Tumorzellen in die Peripherie des Tumors transportieren, intratumorale hingegen nicht, was darauf hindeutet, dass sie keine Rolle bei der

Metastasierung spielen (Stacker et al. 2002, Pepper et al. 2003). Die Lymphangiogenese im Tumor wird dabei unter anderem durch die endothelialen Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie (v.a. VEGF-C) und die Metastasierung in die Lymphknoten durch die Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren (VEGFR-3) stimuliert (He et al. 2002). Eine aktuelle Veröffentlichung zeigt, dass sich mittels verschiedener Inhibitoren, wie beispielsweise Rapamycin, die die VEGF-C Expression inhibieren, die Anzahl der lymphatischen Gefäße innerhalb des Tumors signifikant reduzieren und die Metastasierung in die Lymphknoten unterdrücken lässt (Kobayashi et al. 2007). Wie die Tumorzellen vom Tumor in die Lymphgefäße und von dort zu den regionalen Lymphknoten gelangen, ist ein sehr komplexer Mechanismus, an dem eine Reihe von Faktoren, wie zum Beispiel die Interaktion von intra- und peritumoralem interstitiellem Druck, die Hoch- und Niederregulation von Zelladhäsionsmolekülen, die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und proteolytischer Enzyme, die Expression von Adhäsionsmolekülen und ihren Rezeptoren, die Lymphangiogenese, spezifische mikroanatomische Strukturen der lymphatischen Kapillaren und der Lymphfluss beteiligt sind (Saharinen et al. 2004, Achen und Stacker 2006).

Abhängig von der histologischen Untergruppe überwiegt meist ein Metastasierungsweg. So finden sich bei Plattenepithelkarzinomen Tumorzellmetastasen vor allem in den Lymphknoten, bei den Großzelligen Bronchialkarzinomen überwiegend über den hämatogenen Weg in Leber, Gehirn und Knochen. Bei den Adenokarzinomen treten beide Wege in gleichem Maße auf. Bei den hier untersuchten Patientenproben war dies tendenziell für die Adenokarzinome (LK: n=14, KM: n=16) und die Großzelligen Bronchialkarzinome (LK: n=2, KM: n=4) zu erkennen. Bei den Plattenepithelkarzinomen wurden allerdings überwiegend Zellen in den Knochenmarkproben (LK: n=8, KM: n=15) detektiert. Auch wenn die niedrigen Fallzahlen keine eindeutige Aussage über die Metastasierungswege erlauben (vgl. Ergebnisse, Tab. 3.1), so beweist das Auffinden einzelner disseminierter Zellen epithelialen Ursprungs sowohl in Knochenmarkproben, als auch in Lymphknotenproben, dass bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen sowohl der hämatogene, als auch der lymphogene Metastasierungsweg vorkommen. Die enge Verbindung dieser beiden Systeme ist nicht verwunderlich, da schon während der embryonalen Entwicklung das erste lymphatische Gefäß durch Aussprossung eines Blutgefäßes entsteht (Cao 2005).

Trotz der unumstrittenen gemeinsamen Beteiligung dieser beiden Systeme an der Ausbreitung von Tumorzellen, ist noch immer nicht klar, welche unterschiedliche Auswirkung die lymphogene und hämatogene Metastasierung auf den Krankheitsverlauf von Patienten mit einem Bronchialkarzinom haben kann. Bislang existieren nur zwei Studien, die anhand disseminierter Tumorzellen aus Lymphknoten und Knochenmark sowohl den Einfluss der lymphogenen als auch der hämatogenen Metastasierung beim Bronchialkarzinom auf das Überleben untersucht haben (Osaki et al. 2002, Yasumoto et al. 2003, vgl. Tab. 4.1). Beide

Studien kamen zu dem Ergebnis, dass bereits im Stadium I disseminierte Tumorzellen in den Lymphknoten eine signifikant schlechtere Prognose für die Patienten bedeuten, wohingegen sich in diesem Stadium anhand der disseminierten Zellen aus dem Knochenmark keine Prognose ableiten lässt. Erst ab den Stadien II-III konnte ein signifikant reduziertes Gesamtüberleben festgesellt werden (Yasumoto et al. 2003). Die Ergebnisse zeigen, dass das Stadium der Erkrankung für den unterschiedlichen Einfluss der disseminierten Tumorzellen von Bedeutung ist. Mit der Begründung, dass kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von disseminierten Zellen in den Lymphknoten und Zellen im Knochenmark festgestellt werden konnte, gehen die Autoren davon aus, dass unterschiedliche Regulationsmechanismen vorhanden sein müssen. Da es sich bei allen Patienten mit disseminierten Zellen in den Lymphknoten bei denen ein Rückfall der Erkrankung beobachtet werden konnte, um eine hämatogene rezidivierende Erkrankung handelte, kamen sie des Weiteren zu dem Schluss, dass die Metastasierung in die Lymphknoten nicht nur die Streuung in die Lymphknoten widerspiegelt, sondern auch kennzeichnend für eine frühe Phase der hämatogenen Tumorzeldisseminierung ist (Osaki et al. 2002).

Anders als in diesen beiden Studien, in denen die Patienten nach Stadium I und II-III unterteilt wurden, wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine Trennung der M0 Patienten mit sichtbarem pathologischen Befall der Lymphknoten (pN1-3) und ohne sichtbaren Befall (pN0) vorgenommen. Die durchgeführte Kaplan-Meier Überlebensanalyse ergab, dass das Vorliegen einer minimal residualen Erkrankung (MRD), d. h. das Auffinden disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten oder Knochenmark, bei pN0 Patienten einen signifikant prognostischen Wert besitzt. Für die prognostische Relevanz im Stadium pN1-3 muss unterschieden werden, ob disseminierte Tumorzellen in Knochenmark oder Lymphknoten zu finden sind. Disseminierte Tumorzellen in den Lymphknoten sind nur ohne Befall der regionalen Lymphknoten (pN0) prognostisch relevant, disseminierte Tumorzellen im Knochenmark für die Patienten sowohl mit (pN1-3) als auch ohne Befall der regionalen Lymphknoten (pN0) eine schlechtere Prognose bedeuten. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark ist also unabhängig vom pathologischen Lymphknoten-Status immer mit einer schlechteren Prognose verbunden. Bei der lymphogenen Metastasierung hat die Detektion disseminierter Tumorzellen in den Lymphknoten in einem frühen Stadium der Erkrankung (pN0) einen stärkeren prognostischen Einfluss als in einem fortgeschrittenen Stadium.

### **4.3 Genetischer Ursprung und Heterogenität disseminierter Tumorzellen und ihrer Primärtumoren**

#### **Die Suche nach dem „metastasiogenen Areal“**

Zu Projektbeginn bestand die Überlegung, dass innerhalb eines Primärtumors ein sogenanntes „metastasiogenes Areal“ bestehen könnte, innerhalb dessen die Tumorzellen chromosomale Veränderungen und Fähigkeiten erworben haben, um sich aus dem Zellverband zu lösen und in andere Organe zu metastasieren. Um diese Vermutung zu überprüfen wurden mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion einzelne Areale aus den kryoasservierten Primärtumoren isoliert. Mit dieser Methode kann Tumorgewebe von umliegendem Stromagewebe getrennt und so die Kontamination mit Normalzellen gering gehalten werden. Nach Etablierung war es möglich aus einem 10000  $\mu\text{m}^2$  großen Areal, das in etwa 40-200 Zellen entspricht, ausreichend RNA für die Expressionsstudien zu isolieren. Erstmals gelang es mit Hilfe der kombinierten Genom- und Transkriptomanalyse genomische Aberrationen als auch die Genexpression eines Primärtumorgewebes zu analysieren und direkt mit den Ergebnissen der disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten der entsprechenden Patienten zu vergleichen. Um die aufgestellte Hypothese zu belegen wurde bei der Mikrodissektion des Primärtumors darauf geachtet, aus verschiedenen Regionen des Tumors Material zu entnehmen. In der Regel bestand das zu untersuchende Tumorgewebe sowohl aus einem Areal vom Randgebiet, als auch aus dem zentralen Teil des Tumors.

#### **Sowohl mehrere disseminierte Tumorzellen eines Patienten als auch unterschiedliche Areale innerhalb eines Primärtumors sind sich ähnlich**

Die genomischen Aberrationen der verschiedenen Areale eines Primärtumors wiesen untereinander eine große Ähnlichkeit auf. Bei einer hierarchischen Clusteranalyse lagen bei 84,6% der Patienten mindestens zwei Areale eines Tumors innerhalb eines Armes zusammen. Auch nach Analyse der Genexpressionsdaten befanden sich bei über der Hälfte der Patienten (61%) mindestens zwei Areale eines Primärtumors innerhalb eines Armes. Allein durch die Tatsache, dass sich die untersuchten Areale sehr ähnlich sind, wird die Existenz eines „metastasiogenen Areals“ von dem sich die disseminierten Zellen lösen und metastasieren unwahrscheinlich. Allerdings stand immer nur ein Teil des operativ entfernten Primärtumors der wissenschaftlichen Forschung zur Verfügung, so dass das Ergebnis nur mit Einschränkung auf den gesamten Tumor übertragen werden kann. Es ist theoretisch denkbar, dass sich das „metastasiogene Areal“ in dem anderen, vom Pathologen untersuchten Teil des Tumors befindet.

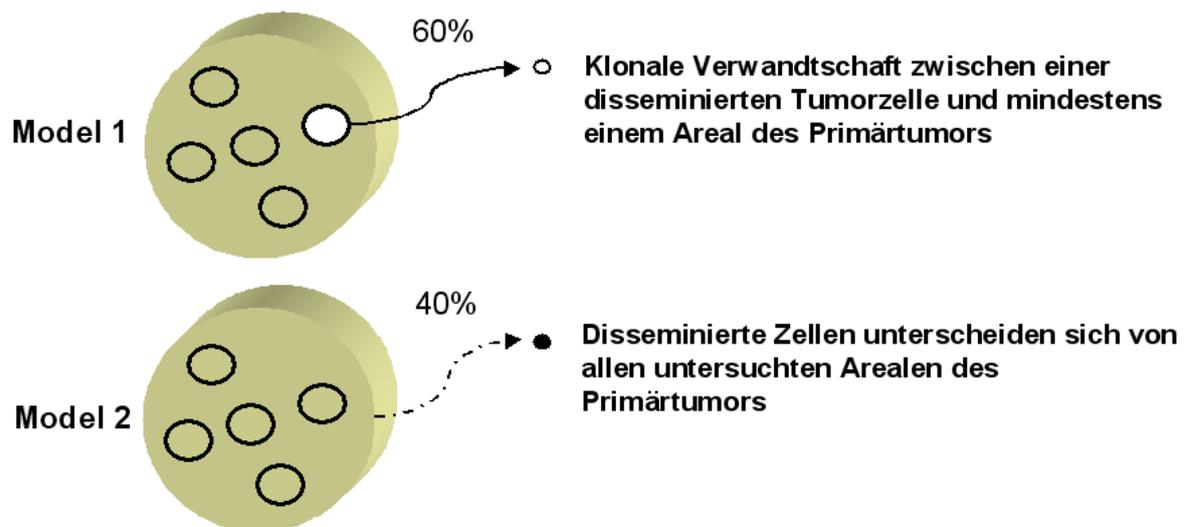
Für die Fragestellung sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse der disseminierten Tumorzellen relevant. Beim Vergleich der Aberrationen von disseminierten

Tumorzellen aus den Lymphknoten bei Patienten mit mehr als einer Zelle, clusterten nach der Analyse 80% der Tumorzellen in einem Arm zusammen.

Bei der Analyse der Transkriptomdaten war es leider nur bei einem Patienten möglich, mehrere disseminierte Tumorzellen zu untersuchen. Auch diese waren sich in ihrem Expressionsmuster sehr ähnlich und befanden sich dementsprechend innerhalb eines Armes. Die nächstliegende Erklärung für diese Ähnlichkeit ist, dass sich die disseminierten Tumorzellen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entwickelt haben. Unter Umständen könnte es sich dabei auch um eine Tumorstammzelle handeln (Otto 2002, Griffiths et al. 2005), deren Existenz aber für das Bronchialkarzinom, im Gegensatz zum Mammakarzinom, noch nicht bewiesen wurde. Einen Hinweis auf eine gemeinsame Vorläuferzelle für alle Bronchialkarzinome lieferten Petersen und Petersen (2001). Sie konnten mit Hilfe der CGH Lungentumoren klassifizieren und die kleinzelligen Bronchialkarzinome in primäre und sekundäre Karzinome unterteilen. Anhand ihrer Ergebnisse kamen sie zu dem Schluss, dass die „primären“ SCLCs über eine Vorläuferzelle unbekanntes Ursprungs entstehen und sich die „sekundären“ SCLCs aus nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen weiter entwickeln müssen. Mittlerweile gelang es im Mausmodell sogenannte „bronchioalveoläre Stammzellen“ (= BASCs) zu isolieren (Kim et al. 2005). Möglicherweise wurden damit die Ursprungszellen für die Entwicklung eines Adenokarzinoms gefunden.

### **Die „klonale Verwandtschaft“ von Primärtumorealen und ihren dazugehörigen Einzelzellen**

Auch wenn sich sowohl die verschiedenen Areale eines Tumors als auch die einzelnen disseminierten Tumorzellen eines Patienten sehr ähnlich sind, kann erst der direkte Vergleich von disseminierter Zelle und mikrodisektiertem Areal des Primärtumors die Lücke in der Entwicklung vom soliden Primärtumor hin zur disseminierten Einzelzelle schließen. Nach genomischer Analyse konnten 60% der disseminierten Tumorzellen aufgrund ähnlicher Aberrationsmuster einem oder mehreren Arealen aus dem Primärtumor zugeordnet werden. Bei den übrigen 40% ließ sich keine Ähnlichkeit feststellen (Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1: Klonale Verwandtschaft auf genomischer Ebene. Modell 1:** Disseminierte einzelne Tumorzellen entwickeln sich klonal und lassen sich anhand ihrer Aberrationen einem Areal des Primärtumors zuordnen. Primärtumor und disseminierte Tumorzelle sind sich in 60% der untersuchten Fälle sehr ähnlich. **Modell 2:** Disseminierte Tumorzellen entwickeln sich unabhängig vom Primärtumor. Disseminierte Tumorzelle und die Areale des Primärtumors sind in 40% der Fälle unterschiedlich.

Zum einen wäre denkbar, dass sich diese Zahlen noch weiter zugunsten der Zellen, die sich einem Areal zuordnen lassen verschieben würden, je mehr Areale pro Primärtumor untersucht werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die disseminierten Zellen, die sich von den Arealen des Primärtumors unterscheiden, im Lauf der Zeit Mutationen angesammelt haben und die eventuell ursprünglich vorhandene Ähnlichkeit während dieser Entwicklung verloren gegangen ist. Unterstützt wird diese Überlegung durch den signifikanten Unterschied in der Anzahl der Deletionen von disseminierten Einzelzellen und ihren dazugehörigen Primärtumoren ( $p=0,02$ , Abb. 3.19). Da bei den einzelnen disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten deutlich mehr Deletionen auftraten als bei den Arealen der Primärtumoren (bei den nicht-streuenden Primärtumoren war die Anzahl an Deletionen noch geringer), ist es durchaus denkbar, dass den disseminierten Einzelzellen durch diese Deletionen Funktionen von Molekülen (beispielsweise Zelladhäsionsmoleküle) verloren gehen, wodurch sie befähigt werden, sich aus dem Zellverband zu lösen. Die Überlegung, dass die 60% der disseminierten Tumorzellen, die sich einem Tumor zuordnen lassen weniger Deletionen aufweisen als die 40% der Tumorzellen, die sich nicht zuordnen lassen, konnte nicht bestätigt werden (im Durchschnitt 5,9 versus 6,4;  $p=0,4$ ).

Obwohl der Anteil an Nicht-Tumorzellen bei der Mikrodissektion sehr gering gehalten werden kann, muss berücksichtigt werden, dass durch die Heterogenität des mikrodissektierten Areals bzw. durch die Normalzellen, die in einem mikrodissektierten Areal zwangsläufig mit untersucht werden, die Anzahl an Aberrationen unter Umständen gesenkt wird. Ein weiterer Grund für die geringe Zahl an chromosomalen Veränderungen im Primärtumor ist darin zu sehen, dass Veränderungen von mindestens 60% geteilt werden müssen, damit sie in der

CGH darstellbar sind. Bei ausgeprägter genetischer Heterogenität könnte deshalb die tatsächliche Anzahl der Veränderungen in den Zellen des Primärtumors deutlich höher sein. Inwieweit ein klonaler Zusammenhang zwischen Primärtumor und disseminierter Tumorzelle besteht wurde bereits mehrfach mittels zytogenetischer Techniken, wie beispielsweise der CGH untersucht. Anhand verschiedener Tumortypen konnte gezeigt werden, dass innerhalb eines Primärtumors verschiedene Klone existieren und dass Metastasen des entsprechenden Lymphknotens diesen Klonen in ihren Aberrationen ähneln (Gorunova et al. 1998, Heim et al. 1997). Andererseits zeigten Studien wie beispielsweise beim Mammakarzinom (Pandis et al. 1998) oder beim kolorektalen Karzinom (Al-Mulla et al. 1999), dass Primärtumoren und ihre Lymphknotenmetastasen unterschiedliche chromosomale Veränderungen aufweisen. Es ist denkbar, dass eine unabhängige Entwicklung der disseminierten Tumorzellen stattfindet, die parallel zur Primärtumorentstehung abläuft. Eine weitere Möglichkeit, warum sich keine Übereinstimmungen mit den Klonen des Primärtumors feststellen lassen, wäre, dass disseminierte Tumorzellen als Subklone des Primärtumors entstehen und dass nur diese Subklone die Fähigkeit besitzen zu metastasieren.

### **Streuende und nicht-streuende Primärtumoren zeigen unterschiedliche chromosomale Aberrationsmuster**

Bei der Behandlung und der Prognose der Patienten ist es entscheidend, ob Zellen des Primärtumors bereits in die Lymphknoten, das Knochenmark oder andere Organe metastasiert sind. Patienten ohne Befall der Lymphknoten werden beispielsweise nur operiert, wohingegen Patienten mit Befall der Lymphknoten zusätzlich eine adjuvante oder neoadjuvante Therapie erhalten. Bei letzteren ist die weitere Prognose trotz systemischer Therapie schlechter. Die momentan verwendeten klinisch-pathologischen Methoden zur Feststellung des Lymphknotenbefalls sind allerdings nicht sensitiv genug. In dem hier untersuchten Kollektiv können mit Hilfe von Antikörpern gegen epitheliale Oberflächenmoleküle bei etwa 20-30% der Patienten ohne einen pathologisch sichtbaren Befall der Lymphknoten in den Lymphknoten (20,16%), aber auch im Knochenmark (29,03%) disseminierte Tumorzellen detektiert werden. Das Auffinden dieser Zellen korrelierte mit einer schlechteren Prognose und einem kürzeren Überleben der Patienten. Für die Patienten wäre eine eindeutige und sichere Identifikation von disseminierten Zellen in den Lymphknoten und im Knochenmark bzw. eine frühzeitige Unterscheidung in streuende und nicht-streuende Primärtumoren wünschenswert. Nur dann ist eine individuelle und erfolgreiche Therapie möglich. Dabei könnten entweder spezifische genomische Veränderungen oder Expressionsunterschiede für streuende und nicht-streuende Primärtumoren hilfreich sein. Bei dem hier durchgeführten Vergleich von 15 streuenden

Primärtumoren mit 12 nicht-streuenden Primärtumoren konnten keine eindeutig signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Veränderungen ( $p=0,5$ ) festgestellt werden. Allerdings gelang es nach einer Clusteranalyse mit der sich die Ähnlichkeit der einzelnen Proben bestimmen lässt, ein Aberrationsmuster zu identifizieren, das zumindest ansatzweise eine Unterscheidung in Primärtumoren mit und ohne disseminierte Tumorzellen möglich macht. Ausschlaggebend hierfür waren bei den streuenden Primärtumoren vor allem Deletionen der Chromosomen 3p11-14 und 6q. Amplifikationen der Region 16q23-tel waren kennzeichnend für nicht-streuende Primärtumoren, Deletionen der selben Stelle hingegen für streuende Primärtumore (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.17). Das bedeutet, dass eventuell erst mehrere Aberrationen zusammen eine Unterscheidung möglich machen und nötig sind damit die Zellen disseminieren können. Erste Ergebnisse einer umfangreichen professionellen bioinformatischen Auswertung lieferten Hinweise auf eine prognostische Relevanz der chromosomalen Regionen 14q21-24, 7q31-tel, 6q21-23 und 3p21-tel bei streuenden Primärtumoren.

#### **Fortgeschrittene Tumoren weisen tendenziell mehr chromosomale Veränderungen auf**

Der Zeitpunkt der Streuung von Tumorzellen aus der Primärläsion ist grundsätzlich unbekannt. Abhängig vom Tumortyp und auch von der Sensitivität der Nachweismethode ist diese Zeitspanne relativ groß. Fest steht allerdings, dass mit der Entwicklung eines Tumors die Ansammlung genomischer Veränderungen einhergeht (Garnis et al. 2004, Karakosta et al. 2005, Yokota 2000). Dies sollte auch hier untersucht werden. Zwischen frühen Tumoren (T1-2,  $n=11$ ) und fortgeschrittenen Tumoren (T3-4,  $n=4$ ) waren auf genomischer Ebene nur geringe Unterschiede zu erkennen. Tumore im Stadium T1-2 wiesen Deletionen auf Chromosom 4 und Amplifikationen auf dem X-Chromosom und Chromosom 21 auf, die bei Primärtumoren im fortgeschrittenen Stadium T3-4 nicht zu sehen waren. Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 zeigten sich nur bei Primärtumoren im Stadium T3-4. Bei den fortgeschrittenen Tumoren ließen sich tendenziell mehr Aberrationen pro Patient ( $n=13,6$ ) feststellen als bei den frühen Tumoren ( $n=10,9$ ;  $p=0,3$ ). Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die beiden Gruppen aus sehr unterschiedlichen Fallzahlen bestehen und sie deshalb nur eine Tendenz vorgeben können.

#### **4.4 Die Analyse der Genexpression**

##### **Mögliche prognostische Relevanz differentiell exprimierter Gene**

Das langfristige Ziel dieser Arbeit war die Identifikation prognostisch relevanter Gene bzw. Proteasen und ihrer Inhibitoren. Die Ähnlichkeitsanalyse der Primärtumoren machte deutlich, dass die unterschiedlichen Areale eines Patienten bei über der Hälfte (61%) in einem Level des Clusterbaumes zu finden sind und dementsprechend ein vergleichbares

Expressionsmuster aufweisen. Bei einem Patienten konnten mehrere disseminierte Einzelzellen untersucht werden, die sich ebenfalls auf ein Level konzentrierten. Dieses Ergebnis entspricht in etwa der genomischen Analyse (4.3) und macht das Vorhandensein eines metastasierten Areals noch unwahrscheinlicher. Streuende und nicht-streuende Primärtumoren konnten aufgrund der geringen Expressionsunterschiede mittels Clusteranalyse nicht getrennt werden.

Auf eine Ähnlichkeitsanalyse der Genexpression von Primärtumoren und den dazugehörigen einzelnen disseminierten Tumorzellen wurde verzichtet, da diese aufgrund der unterschiedlichen Zellzahl von Primärtumorprobe und Einzelzelle nicht sinnvoll wäre. Anders als bei den genetischen Aberrationen würden hier allein die allgemein geringeren Expressionslevels der disseminierten Einzelzellen zu einer Unterteilung nach disseminierten Tumorzellen und Primärtumoren führen. Außerdem bedingt das unterschiedliche biologische Milieu eine für disseminierte Tumorzellen bzw. Primärtumoren spezifische Expression. Die Zellen des Primärtumors befinden sich in einem engen Zellverband weswegen sie anders als die einzelnen disseminierten Tumorzellen, vor allem Gene, die für Zell-Zell-Kontakte und Zell-Zell-Interaktionen benötigt werden, exprimieren (Albelda 1993). So werden beispielsweise Integrin-Rezeptormoleküle, die eine wichtige Rolle bei der Verankerung der Zellen untereinander und an der extrazellulären Matrix spielen (Mizejewski 1999) bei den untersuchten Primärtumoren deutlich häufiger exprimiert als bei den disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten (vgl. Abb. 3.26 C).

Nach statistischer Analyse und Normalisierung der Expressionsstärke konnten 23 der 109 untersuchten Gene als differenziell exprimiert identifiziert werden. Nach p-Wert Korrektur ergaben sich nur bei der Gruppe der Patienten mit einem Adenokarzinom (n=10) in der Expression von vier Genen signifikante Unterschiede zwischen Primärtumor und disseminierten Tumorzellen. Dazu zählen der Serin Protease Inhibitor Bikunin (HAI2) und die beiden Cytokeratine CK18 und CK19, die jeweils signifikant stärker bei den einzelnen Tumorzellen exprimiert wurden sowie das ribosomale Protein rS9 (RPS9), das stärker bei den Primärtumoren exprimiert wurde.

Im letzten Punkt soll nun die Bedeutung dieser vier differentiell exprimierten Gene für die Disseminierung und die Ausbreitung des Tumorgeschehens beim Bronchialkarzinom diskutiert werden.

### **Die Rolle proteolytischer Systeme bei der Tumorprogression**

Die Bedeutung proteolytischer Systeme bei der frühen Disseminierung und der Ausbreitung des Tumorgeschehens beim Bronchialkarzinom wurde in vielen Arbeiten unterschiedlich diskutiert. Der Verlust der Zelladhäsion und der Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) gelten als wichtige Voraussetzungen für die Invasion und die Metastasierung von epithelialen Tumoren. Viele Studien konnten mittlerweile zeigen, dass vor allem die Mitglieder der

Matrixmetalloproteinasen (MMP) und des Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA, uPAR) an der Tumorinvasion, der Metastasierung und der Angiogenese beteiligt sind. MMP-2 und MMP-9 gelten dabei als Schlüsselenzyme, da sie das Typ IV Kollagen, den Hauptbestandteil der ECM abbauen (Starnenkovic 2003). Beispielsweise korreliert beim Bronchialkarzinom die Expression von MMP-2 (Gelatinase A) im Primärtumor von Patienten ohne Befall der Lymphknoten mit einer schlechten Prognose, was vermutlich durch die erhöhte Invasivität der Tumorzellen hervorgerufen wird (Passlick 2000). Ebenso korreliert die Expression von MMP-9 zum einen mit einem zunehmenden T-Status (Gouyer et al. 2005) und zum anderen mit einem kürzeren Überleben und scheint des Weiteren ein unabhängiger prognostischer Marker für das Bronchialkarzinom zu sein (Sienel et al. 2003). In präklinischen und klinischen Studien wurden mittlerweile eine Reihe von Inhibitoren gegen MMPs bei verschiedenen Tumortypen getestet, allerdings mit geringem Erfolg (Rasmussen 1999, Nelson AR, 2000). Schuld daran war meist die geringe Spezifität der Inhibitoren. Für die Zukunft scheint ein wirklicher Fortschritt im Einsatz von MMP Inhibitoren nur möglich, wenn es gelingt tumorspezifische MMPs zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorentwicklung zu inhibieren und weitere tumorspezifische Marker zu identifizieren, um die Antwort der MMPs in vivo zu kontrollieren (Greenwald 1999, Pavlaki und Zucker 2003, Fingleton 2003, 2008).

Zum uPA-System (Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-System, Serinprotease) gehört zum einen das Molekül Plasmin, das unmittelbar am Abbau von ECM-Bestandteilen und an der Aktivierung von Kollagenasen und Metalloproteasen beteiligt ist, und zum anderen uPA und der uPA-Rezeptor, die vor allem die Zelladhäsion und Migration regulieren. Eine verstärkte Produktion von Bestandteilen des uPA-Systems trägt zur Tumorinvasion, Metastasierung und Angiogenese bei (MacKay et al. 1990). Außerdem korreliert eine stromale Expression von uPA mit der Tumorgroße und der Lymphknotenmetastasierung (Bolon et al. 1995, Bolon et al. 1997). Bezüglich der prognostischen Relevanz der am uPA-System beteiligten Moleküle existieren unterschiedliche Meinungen. So konnte beispielsweise die Arbeitsgruppe von Werle et al. (2004) sowohl uPAR, als auch PAI-1 als unabhängige prognostische Faktoren beim NSCLC identifizieren, wohingegen bei Offersen et al. (2007) uPA und PAI-1 unter Umständen die Angiogenese stimulieren können, aber keine prognostischen Marker darstellen.

Im Zusammenhang mit dem uPA-System scheint auch der in dieser Arbeit als differentiell exprimiert identifizierte Inhibitor Bikunin zu stehen. Der auch unter dem Namen HAI-2 (HGF-Aktivator Inhibitor) bekannte Inhibitor moduliert das Zellwachstum, blockiert die zelluläre Aufnahme von Kalzium und inhibiert das Plasmin auf der Oberfläche von Tumorzellen. In gesundem Lungengewebe wird er in Bindegewebszellen und in einigen Becherzellen exprimiert. Kobayashi et al. (2002) konnten zeigen, dass Bikunin die Expression von uPA reduziert. Diese Regulation von uPA erfolgt durch eine Reduktion des Wachstumsfaktors

TGF- $\beta$ 1 (Tanaka et al. 2004), der normalerweise die Expression von uPA erhöht. Die Unterdrückung der uPA Expression durch Bikunin inhibiert die Invasion und Metastasierung von verschiedenen Krebszellen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es in Bikunin-defizienten Mäusen zu einer verstärkten spontanen Metastasierung kommt. Schuld daran scheint der Mangel an zirkulierenden Proteinen der Inter-alpha-Inhibitor Familie zu sein, der in den Knock-out-Mäusen in vivo zu einem erhöhten Auftreten von Lungenmetastasen führt (Yagy et al. 2006). Ein prognostischer Einfluss von Bikunin wurde bis jetzt nur beim Ovarialkarzinom beschrieben. Hier bedingt eine reduzierte Expression im Primärtumor ein kürzeres Überleben der Patienten (Tanaka et al. 2003). Inwieweit dies auch beim Bronchialkarzinom gültig ist, werden folgende Überlebensanalysen zeigen müssen.

### **Cytokeratine und ihre Bedeutung bei der Krebsprognose und Diagnose**

Cytokeratine (CK) gehören zur großen Familie der Intermediärfilamentproteine. Sie bilden zusammen mit Aktin und Mikrotubuli das Zytoskelett der Zelle und sind charakteristisch für epitheliale Zellen. Der Cytokeratin-Nachweis kann sowohl im Blut und in Primärtumoren aber auch in disseminierten epithelialen Tumorzellen erfolgen. Für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom ist CYFRA 21-1 (CK19) der wichtigste Tumormarker (50% Plattenepithel-, 30% Adeno- und 20% Großzellige Karzinome). Dass es sich bei den Cytokeratinen 18 und 19, die in den disseminierten Tumorzellen gegenüber dem Primärtumor hochreguliert gefunden wurden, um wichtige prognostische Faktoren bezüglich des Überlebens handelt, konnten Nisman B et al. bereits 1998 mit Hilfe der für diese beiden Cytokeratine spezifischen Marker CYFRA 21-1 und TPS (tissue polypeptide specific antigen) zeigen. Mittlerweile gehören sie zusammen mit TPA (tissue polypeptide antigen) und CEA zu den im klinischen Alltag für die Krebsdiagnose und den weiteren Krankheitsverlauf gebräuchlichsten Tumormarkern (Barak et al. 2004). Sie sind hilfreich bei der Identifikation von Patienten mit einer frühen subklinischen Metastasierung und gelten auch bei anderen Tumortypen als unabhängige Prognosefaktoren (Nisman et al. 1998, Barak et al. 2004). Zusätzlich kam das Cytokeratin 19 in den letzten Jahren bei der Detektion disseminierter Tumorzellen in den Lymphknoten von NSCLC-Patienten zum Einsatz. Beispielsweise konnten Ge et al. (2005) mittels RT-PCR Amplifikation bei 27% der Patienten ohne pathologisch befallene Lymphknoten die Expression von CK19 mRNA in den Lymphknoten nachweisen und einen Bezug zwischen der CK19 Expression in den Lymphknoten und der Tumorgöße, bzw. der Differenzierung des Tumors herstellen. Sie konnten außerdem ein kürzeres Überleben von Patienten mit diesen disseminierten CK19-positiven Zellen in den Lymphknoten feststellen.

### **Ribosomale Proteine und ihre unbekanntenen „extraribosomalen“ Funktionen**

Bei dem ribosomalen Protein rS9 handelt es sich um einen Bestandteil des aus zwei Untereinheiten (40S und 60S) bestehenden eukaryontischen 80S Ribosoms, das sich aus 4

RNA-Arten und ungefähr 80 unterschiedlichen Proteinen zusammensetzt. Ribosome und ihre Proteine spielen die entscheidende Rolle bei der Proteinbiosynthese und ein Funktionsverlust führt zu schweren Störungen in der Entwicklung. Es konnte allerdings wiederholt gezeigt werden, dass einige dieser ribosomalen Proteine neben der Translation von mRNA in die Aminosäuresequenz auch eine zweite „extraribosomale Funktion“ erfüllen können (Wool 1996). Erst kürzlich wiesen Wissenschaftler aus der Abteilung „Molekulare Genomanalyse“ am Deutschen Krebsforschungszentrum bei Autisten Mutationen in der Gensequenz nach, die das ribosomale Protein L10 (RPL10) kodiert und vermuten, dass ein funktionsgestörtes RPL10 für die mangelhafte Differenzierung von Nervenzellen und unzureichende Ausbildung von Nervenzellverbindungen während der Gehirnentwicklung verantwortlich sein könnte (Klauck et al. 2006). Aber auch eine Beteiligung dieser Proteine bei der Entstehung von soliden Tumoren ist nicht auszuschließen. Beispielsweise konnte beim Vergleich von neoplastischem mit normalem kolorektalen Gewebe eine unterschiedliche Expression verschiedener ribosomaler Proteine festgestellt werden (Kasai et al. 2003). Bei gastrointestinalen Tumoren bewirkte die Expressionsinhibition des ribosomalen Proteins L13 durch „small interfering“ RNA (siRNA) eine drastische Verminderung des Zellwachstums (Kobayashi et al. 2006). Des Weiteren bildet das ribosomale Protein RPL5 einen Proteinkomplex mit Mdm2 und p53 (Marechal et al. 1994, Lindström et al. 2007) und RPS6 fungiert als Tumorsuppressor im hämatopoetischen System von *Drosophila* (Watson et al. 1992).

Das in dieser Arbeit als differentiell exprimiert identifizierte Gen RPS9 konnte von Kenmochi et al. (1998) zusammen mit 11 weiteren Genen der ribosomalen Proteine dem Chromosom 19 zugeordnet werden. Auf der Suche nach einer Verbindung zwischen Gendefekten der ribosomalen Proteine und Krankheiten fanden sie heraus, dass das RPS9 Gen im gleichen Intervall wie das Gen für Retinitis pigmentosa 11 (RP11) liegt. Bei dieser Krankheit kommt es zu einem Absterben der Sehzellen und zu einem völligen Verlust der Sehkraft. Dies geschieht auch bei der sogenannten „Cancer associated retinopathy“ (CAR). Dabei handelt es sich um ein am häufigsten bei SCLC- (Polans et al. 1995), aber auch bei NSCLC-Patienten (Salgia et al. 1998) auftretendem paraneoplastischen Syndrom, bei dem Antikörper an retinale Antigene binden. Ein in diesem Zusammenhang häufig erwähnter Autoantikörper richtet sich gegen das photorezeptor-spezifische Kalzium-bindende Protein Recoverin, das an der Transduktion von Licht bei Photorezeptoren der Vertebraten beteiligt ist. Anti-Recoverin Antikörper können meist noch vor der eigentlichen Krebsdiagnose im Blut, und später unter anderem in Tumoren von Bronchialkarzinompatienten identifiziert werden. Die von Plasmazellen produzierten Antikörper gegen Recoverin erreichen über die periphere Blutzirkulation die Retina und werden dort von den Photorezeptorzellen aufgenommen. Dadurch wird die Phosphorylierung von Rhodopsin inhibiert und die Apoptose der Retina

induziert (Ohguro et al. 2002). Eine Verbindung zwischen Retinitis pigmentosa und Recoverin wurde ebenfalls bereits beschrieben (Senin et al. 2006). Ein Nachweis von Recoverin, beispielsweise im Blut und Primärtumoren des hier untersuchten Kollektivs und eine Untersuchung der Retina der Patienten bzw. Informationen über paraneoplastische Symptome der untersuchten Patienten, könnte einen möglichen Zusammenhang zwischen der Überexpression des ribosomalen Proteins RPS9 in Primärtumoren, dem Autoantigen Recoverin und der Krebs-assoziierten Retinopathie (CAR) herstellen und eventuell die extraribosomale Funktion von RPS9 entschlüsseln.

Abschließend lässt sich sagen, dass diese Interpretation nur einen kleinen Ausschnitt der möglichen Zusammenhänge darstellt und dass auch in der Diskussion nicht aufgeführte Moleküle an der Tumorentstehung und der Metastasierung beteiligt sind und als Risikogene in Frage kommen können. Umfassende professionelle bioinformatische Auswertungen der Daten werden zeigen, welche der differenziell exprimierten Moleküle wirkliche prognostische Relevanz besitzen und sich langfristig als Marker, bzw. Therapieziel eignen könnten.

## 5 Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom liegt bei Männern mit einer Fünfjahres-Überlebensrate von etwa 15% auf Platz eins der Krebssterbefälle (Frauen: 18%, Platz 3). Wie bei allen Tumortypen unterscheiden sich die Überlebensraten deutlich nach dem Stadium der Erkrankung und dem histologischen Tumortyp. Grund für die schlechte Prognose sind das asymptotische Wachstum des Tumors, schlechte und unzureichende Früherkennungsmethoden und, je nach histologischem Typ, die meist frühe Metastasierung.

In der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms zum einen der Einfluss von disseminierten Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten auf das Überleben und zum anderen durch den Vergleich der pathologisch veränderten Genexpression und genetischer Aberrationen von disseminierten Tumorzellen und mikrodissektierten Arealen des Primärtumors die frühe lymphogene Metastasierung untersucht werden. Ziel war es, Gene zu identifizieren, die prognostisch relevant und ein möglicher Angriffspunkt zur Bekämpfung disseminierter Zellen sein könnten.

Die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen wurde anhand einer Follow-up Überlebensanalyse untersucht. Zur Analyse von Genom und Transkriptom wurde eine Methode verwendet, die eine Isolation von mRNA und cDNA von ein und derselben Probe ermöglicht. Dabei handelte es sich im Extremfall um eine einzelne, aus dem Lymphknoten isolierte Zelle. Nach erfolgreicher Etablierung der Mikrodissektion war es möglich den Genotyp bzw. Phänotyp einzelner disseminierter Tumorzellen mit verschiedenen mikrodissektierten Arealen bestehend aus 40-200 Zellen des dazugehörigen Primärtumors zu vergleichen und auf diese Weise den genetischen Ursprung zu analysieren.

Mit Hilfe einer umfangreichen Follow-up Analyse von 124 NSCLC-Patienten konnte der negative Einfluss disseminierter Tumorzellen auf das Überleben belegt werden. Für die Patienten bedeutet das Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark unabhängig vom pathologischen Lymphknoten-Status ein Risiko für das Überleben, wohingegen disseminierte Tumorzellen in den Lymphknoten für den weiteren Verlauf der Krankheit nur ohne Befall der regionalen Lymphknoten (pN0) ausschlaggebend sind. Dementsprechend besitzt die lymphogene Metastasierung in einem frühen Stadium der Erkrankung einen stärkeren prognostischen Einfluss, wohingegen die hämatogene Metastasierung eher langfristig für den weiteren Verlauf von Bedeutung zu sein scheint.

Alle mikrodissektierten Zellen der Primärtumore und alle isolierten Zellen aus den Lymphknoten konnten anhand ihrer chromosomalen Aberrationen und der Expression verschiedenster Moleküle (MAGE, CEA, EpCAM) als epitheliale Zellen neoplastischen Ursprungs identifiziert werden. Nach Analyse der genetischen Veränderungen mittels CGH wurde deutlich, dass sich sowohl die isolierten Tumorzellen aus den Lymphknoten

untereinander (80%), als auch die mikrodissektierten Areale aus den entsprechenden Primärtumoren (84,6%) sehr ähnlich sind. In 60% der Fälle war es möglich, genetische Ähnlichkeit zwischen einer disseminierten Tumorzelle und einem bestimmten Areal aus dem entsprechenden Primärtumor festzustellen. Bei streuenden Primärtumoren konnten im Vergleich zu nicht-streuenden keine signifikanten Unterschiede bei den Aberrationen festgestellt werden. Fortgeschrittene Tumoren (T3-4) wiesen tendenziell mehr Aberrationen auf als frühe Tumoren (T1-2).

Nach Analyse der Genexpression zeigte sich, dass sich sowohl die unterschiedlichen Areale des Primärtumors (60%), als auch die einzelnen Tumorzellen aus den Lymphknoten sehr ähnlich sind. Mit dem laborintern zusammengestellten Proteasen-Filterarray bestehend aus 109 cDNAs von Proteasen, Inhibitoren, tumorspezifischen Genen und Haushaltsgenen konnten 23 als differenziell exprimiert identifiziert werden, von denen wiederum vier Gene nach p-Wert Korrektur bei der Gruppe der Patienten mit einem Adenokarzinom signifikant blieben. Dabei handelt es sich um den Serin Proteaseinhibitor Bikunin (HAI2), die Cytokeratine 18 und 19 und das ribosomale Protein rS9.

Inwieweit diese Gene tatsächlich mit einer schlechteren Prognose korrelieren und ob sich daraus neue diagnostischen Testverfahren oder Therapien entwickeln lassen, werden zukünftige Untersuchungen zeigen müssen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achen MG, Stacker SA (2006). Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread-new players begin to emerge. *Int J Cancer* **119(8)**:1755-60. Review.
- Albelda SM (1993). Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* **68(1)**:4-17. Review.
- Al-Mulla F, Keith WN, Pickford IR, Going JJ, Birnie GD (1999). Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* **24(4)**:306-14.
- Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J (2004). Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **350(4)**:351-60.
- Balsara BR, Testa JR (2002). Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* **21**:6877-83.
- Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R (2004). Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem* **37(7)**:529-40. Review.
- Bjorkqvist AM, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A, Tammilehto L, Mattson K, Vainio H, Knuutila S (1998). DNA gains in 3q occur frequently in squamous cell carcinoma of the lung, but not in adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **22(1)**:79-82.
- Bjorkqvist AM, Tammilehto L, Nordling S, Nurminen M, Anttila S, Mattson K, Knuutila S (1998). Comparison of DNA copy number changes in malignant mesothelioma, adenocarcinoma and large-cell anaplastic carcinoma of the lung. *Br J Cancer* **77(2)**:260-9.
- Blum RH (2004). Adjuvant chemotherapy for lung cancer - a new standard of care. *N Engl J Med* **350(4)**:404-5.
- Böckmann B, Grill HJ, Giesing M (2001). Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomol Engin* **17**:95-111.
- Bolon I, Gouyer V, Devouassoux M, et al (1995). Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am J Pathol* **147**:1298-310.
- Bolon I, Devouassoux M, Robert C, Moro D, Brambilla C, Brambilla E (1997). Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin 1, stromelysin 3, and matrilysin genes in lung carcinomas. *Am J Pathol* **150**:1619-29.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok D, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K (2005). A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* **353(8)**:793-802.

- Buccheri G, Ferrigno D (2003). Identifying patients at risk of early postoperative recurrence of lung cancer: a new use of the old CEA test. *Ann Thorac Surg* **75(3)**:973-80.
- Cantley LC, Neel BG (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:4240-5.
- Cao Y (2005). Emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nature Rev* **5**:735-43.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2(8)**:563-72.
- Choi YS, Shim YM, Kim J, Kim K (2003). Mediastinoscopy in patients with clinical stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* **75(2)**:364-6.
- Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, Shi SR, Harvey J, Chen SC, Sherrod AE, Groshen S, Taylor CR (1995). Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg* **222(4)**:415-25.
- D' Cunha J, Corfits AL, Herndon JE 2nd, Kern JA, Kohman LJ, Patterson GA, Kratzke RA, Maddaus MA (2002). Molecular staging of lung cancer: real-time polymerase chain reaction estimation of lymph node micrometastatic tumor cell burden in stage I non-small cell lung cancer--preliminary results of Cancer and Leukemia Group B Trial 9761. *J Thorac Cardiovasc Surg* **123(3)**:484-91.
- Delebecq TJ, Porte H, Zerimech F, Copin M-C et al. (2000). Overexpression level of stromelysin-3 is related to the lymph node involvement in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Research* **6**:1086-92.
- Demers M, Couillard J, Belanger S, St-Pierre Y (2005). New roles for matrix metalloproteinases in metastasis. *Crit Rev Immunol* **25(6)**:493-523.
- Depierre A, Milleron B, Moro-Sibilot D, Chevret S, Quoix E, Lebeau B et al. (2002). Preoperative chemotherapy followed by surgery compared with primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIa non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **20(1)**:247-53.
- Dracopoli NC, and Fogh J (1983). Polymorphic enzyme analysis of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* **70**: 469-76.
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, and Cremer T (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* **90**:590-610.
- Eils R, Uhrig S, Saracoglu K., Satzler K, Bolzer A, Petersen I, Chassery J, Ganser M and Speicher MR (1998). An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* **82**:160-71.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **95(25)**:14863-8.

- Feder M, Siegfried JM, Balshem A, Litwin S, Keller SM, Liu Z, Testa JR (1998). Clinical relevance of chromosome abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **102(1)**:25-31.
- Fidler IJ (2002). The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* **70**:498-505.
- Fingleton B (2003). Matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy: the current situation and future prospects. *Expert Opin Ther Targets* **7(3)**:385-97. Review.
- Fingleton B (2008). MMPs as therapeutic targets-Still a viable option? *Semin Cell Dev Biol* **19(1)**:61-8.
- Fontanini G, Lucchi M, Vignati S et al. (1997). Angiogenesis as a prospective indicator of survival in non-small cell lung carcinoma: a prospective study, *J Natl Cancer Inst* **89**:881-6.
- Garnis C, Buys TP, Lam WL (2004). Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Mol Cancer* **3**:9. Review.
- Gautam A, Li ZR, Bepler G (2003). RRM1-induced metastasis suppression through PTEN-regulated pathways. *Oncogene* **22(14)**:2135-42.
- Gazdar AF (1994). The molecular and cellular basis of human lung cancer, *Anticancer Res* **14**:261-7.
- Gerber B, Krause A, Müller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K (2001). Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* **19(4)**:960-71.
- Ge MJ, Wu QC, Wang M, Zhang YH, Li LB (2005). Detection of disseminated lung cancer cells in regional lymph nodes by assay of CK19 reverse transcriptase polymerase chain reaction and its clinical significance. *J Cancer Res Clin Oncol* **131(10)**:662-8.
- Gonzalez-Stawinski GV, Lemaire A, Merchant F, O'Halloran E, Coleman RE, Harpole DH et al (2003). A comparative analysis of positron emission tomography and mediastinoscopy in staging non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* **126(6)**:1900-5.
- Gouyer V, Conti M, Devos P, Zerimech F, Copin MC, Crème E, Wurtz A, Porte H, Huet G (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with non-small cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer* **103(8)**:1676-84.
- Greenwald RA (1999). Thirty-six years in the clinic without an MMP inhibitor. What hath collagenase wrought? *Ann N Y Acad Sci* **878**:413-9. Review.
- Griffiths MJ, Bonnet D, Janes SM (2005). Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet* **366(9481)**:249-60. Review.
- Gu CD, Osaki T, Oyama T, Inoue M, Kodate M, Dobashi K, Oka T, Yasumoto K (2002). Detection of micrometastatic tumor cells in pN0 lymph nodes of patients with completely resected non-small cell lung cancer. *Ann Surg* **235(1)**:133-9.

- Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **11(22)**:8055-62.
- Gorunova L, Höglund M, Andrén-Sandberg A, Dawiskiba S, Jin Y, Mitelman F, Johansson B (1998). Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* **23(2)**:81-99.
- Häußlinger KE, Stanzel F, Duell T, Passlick B, Kohlhäufl M (2003). Das frühe Bronchialkarzinom, *Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums*, Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag München.
- Häußlinger KE, Kohlhäufl M (2003). Ätiologie und Epidemiologie des Bronchialkarzinoms, *Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums*, Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag München.
- Hautmann H, Dudel C, Fischer R, Hauck R, Huber RM, Passlick B, Pöllinger B, Schmid L, Thetter O, Uhde C, Zimmermann F (2003). Palliative Therapie, *Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums*, Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag München.
- He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K (2002). Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* **94(11)**:819-25.
- Heim S, Teixeira MR, Dietrich CU, Pandis N (1997). Cytogenetic polyclonality in tumors of the breast. *Cancer Genet Cytogenet* **95(1)**:16-9. Review.
- Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C (1999). International union against cancer: classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* **86(12)**:2668-73.
- Hidalgo M, Eckhardt SG (2001). Matrix metalloproteinase inhibitors: how can we optimize their development? *Ann Oncol* **12(3)**:285-7.
- Hidalgo M, Eckhardt SG (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* **93**:178-93.
- Hochberg Y, Benjamini Y (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* **9(7)**:811-8.
- Huber R, Schalhorn A (2003). Therapieplan für das Bronchialkarzinom, *Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums*, Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag München.
- John TMS, Robinett FD (2000). Building hope through comprehensive prevention. *Cancer* **89(S11)**:2377-83.
- Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, and Lichter P (1993). Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet* **90**:584-9.
- Kajiyama H, Kikkawa H, Khin E, Shibata K, Ino K, Mizutani S (2003). Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix

- metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **63(9)**:2278-83.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F and Pinkel D (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**:818-21.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW and Pinkel D, (1994b). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **10**:231-43.
- Karakosta A, Golias Ch, Charalabopoulos A, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos K (2005). Genetic models of human cancer as a multistep process. Paradigm models of colorectal cancer, breast cancer, and chronic myelogenous and acute lymphoblastic leukaemia. *J Exp Clin Cancer Res* **24(4)**:505-14. Review.
- Kasai H, Nadano D, Hidaka E, Higuchi K, Kawakubo M, Sato TA, Nakayama J (2003). Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem* **51(5)**:567-74.
- Kenmochi N, Ashwoth LK, Lennon G, Higa S, Tanaka T (1998). High-resolution mapping of ribosomal protein genes to human chromosome 19. *DNA Res* **5(4)**:229-33.
- Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* **121(6)**:823-35.
- Klauck SM, Felder B, Kolb-Kokocinski A, Schuster C, Chiocchetti A, Schupp I, Wellenreuther R, Schmotzer G, Poustka F, Breitenbach-Koller L, Poustka A (2006). Mutations in the ribosomal protein gene RPL10 suggest a novel modulating disease mechanism for autism. *Mol Psychiatry* **11(12)**:1073-84.
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:4494-9.
- Klein CA (2000). The biology and analysis of single disseminated tumour cells. *Trends Cell Biol.* **10(11)**:489-93. Review.
- Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B, Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA, Riethmuller G (2002). Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* **20(4)**:387-92.
- Knudson AG Jr (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *PNAS USA* **68 (4)**:820-3.
- Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Nishida T, Takigawa M, Terao T (2002). Suppression of urokinase receptor expression by bikunin is associated with inhibition of upstream targets of extracellular signal-regulated kinase-dependent cascade. *Eur J Biochem* **269(16)**:3945-57.
- Kobayashi S, Kishimoto T, Kamata S, Otsuka M, Miyazaki M, Ishikura H (2007). Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Sci* **98(5)**:726-33.

- Kobayashi T, Sasaki Y, Oshima Y, Yamamoto H, Mita H, Suzuki H, Toyota M, Tokino T, Itoh F, Imai K, Shinomura Y (2006). Activation of the ribosomal protein L13 gene in human gastrointestinal cancer. *Int J Mol Med* **18(1)**:161-70.
- Kohno T, and Yokota J (1999). How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis ? *Carcinogenesis* **20**:1403-10.
- Kubuschok B, Passlick B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K (1999). Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **17(1)**:19-24.
- Kufer P, Zippelius A, Lutterbüse R, Mecklenburg I, Enzmann T, Montag A, Weckermann D, Passlick B, Prang N, Reichhardt P, Dugas M, Kollermann MW, Pantel K, Riethmüller G (2002). Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. *Cancer Res* **62(1)**:251-61.
- Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H (1990). Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. *J Clin Pathol* **43(3)**:213-9.
- Lindström MS, Jin A, Deisenroth C, White Wolf G, Zhang Y (2007). Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Mol Cell Biol* **27(3)**:1056-68.
- Luk C, Tsao MS, Bayani J, Shepherd F, Squire JA (2001). *Cancer Genet Cytogenet* **125**:87-99.
- MacKay AR, Corbitt RH, Hartzler JL, Thorgeirsson UP (1990). Basement membrane type IV collagen degradation: evidence for the involvement of a proteolytic cascade independent of metalloproteinases. *Cancer Res* **50**:5997-6001.
- Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ (1994). The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol* **14(11)**:7414-20.
- Marth C, Kisic J, Kaern J, Trope C, Fodstad O (2002). Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis. *Cancer* **94(3)**:707-12.
- Meltzer SJ, Yin J, Huang Y, McDaniel TK, Newkirk C, Iseri O, Vogelstein B, and Resau JH (1991). Reduction to homozygosity involving p53 in esophageal cancers demonstrated by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:4976-80.
- Mitas M, Hoover L, Silvestri G, Reed C, Green M, Turrisi AT, Sherman C, Mikhitarian K, Cole DJ, Block MI, Gillanders WE (2003). LUNX is a superior molecular marker for detection of non-small lung cell cancer in peripheral blood. *J Mol Diagn* **5**:237-42.
- Mizejewski GJ (1999). Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med* **222(2)**:124-38. Review.
- Mountain CF (1997). Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* **111**:1710-7.
- Mountain CF (2000). The International System for Staging Lung Cancer. *Semin Surg Oncol* **18**:106-15.

- Müller-Höcker J, Bittmann I (2003). Pathomorphologie und Molekulargenetik des Lungenkarzinoms, *Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums*, Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag München.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* **18(5)**:1135-49.
- Nisman B, Lafair J, Heching N, Lyass O, Baras M, Peretz T, Barak V (1998). Evaluation of tissue polypeptide specific antigen, CYFRA 21-1, and carcinoembryonic antigen in nonsmall cell lung carcinoma: does the combined use of cytokeratin markers give any additional information? *Cancer* **82(10)**:1850-9.
- Nosotti M, Falleni M, Palleschi A, Pellegrini C, Alessi F, Bosari S, Santambrogio L (2006). Quantitative real-time polymerase chain reaction detection of lymph node lung cancer micrometastasis using carcinoembryonic antigen marker. *Chest* **128**:1539-44.
- Offersen BV, Pfeiffer P, Andreasen P, Overgaard J (2007). Urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in nonsmall-cell lung cancer: relation to prognosis and angiogenesis. *Lung Cancer* **56(1)**:43-50.
- Ohguro H, Nakazawa M (2002). Pathological roles of recoverin in cancer-associated retinopathy. *Adv Exp Med Biol* **514**:109-24. Review.
- Osaki T, Oyama T, Gu CD, Yamashita T, So T, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K (2002). Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **20(13)**:2930-6.
- Otto WR (2002). Lung epithelial stem cells. *J Pathol* **197(4)**:527-35. Review.
- Pandis N, Teixeira MR, Adeyinka A, Rizou H, Bardi G, Mertens F, Andersen JA, Bondeson L, Sfikas K, Qvist H, Apostolikas N, Mitelman F, Heim S (1998). Cytogenetic comparison of primary tumors and lymph node metastases in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* **22(2)**:122-9.
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmüller G (1993). Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* **85(17)**:1419-24.
- Pantel K, Brakenhoff RH (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* **4(6)**:448-56. Review.
- Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B, Nathrath W, Thetter O, Pichlmeier U, Schweiberer L, Riethmüller G, Pantel K (1994). Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **12(9)**:1827-32.
- Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B, Thetter O, Pantel K (1996). Detection of disseminated lung cancer cells in lymph nodes: impact on staging and prognosis. *Ann Thorac Surg* **61(1)**:177-82.
- Passlick B, Kubuschok B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K (1999). Isolated tumor cells in bone marrow predict reduced survival in node-negative non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* **68(6)**:2053-8.

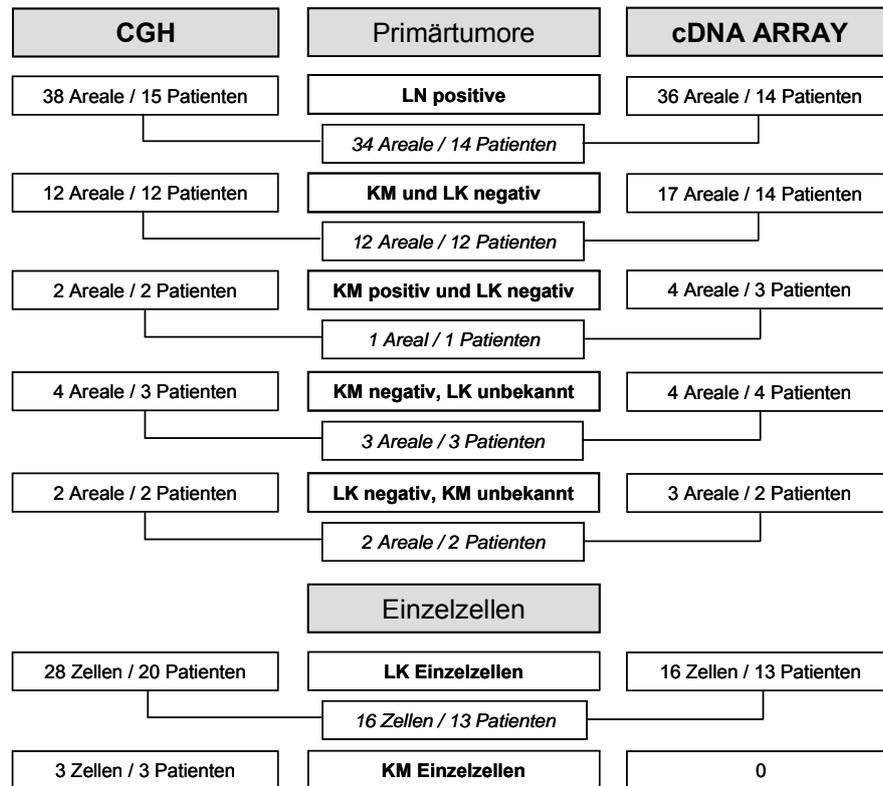
- Passlick B, Siemel W, Seen-Hibler R, Wockel W, Thetter O, Mutschler W, Pantel K (2000). Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **6(10)**:3944-8.
- Passlick B, Siemel W, Seen-Hibler R, Wockel W, Thetter O, Pantel K (2000). The 17-1A antigen is expressed on primary, metastatic and disseminated non-small cell lung carcinoma cells. *Int J Cancer* **187(4)**:548-52.
- Passlick B, Pantel K (2000). Detection and relevance of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes. *Recent Results Cancer Res* **157**:29-37. Review.
- Passlick B (2001). Micrometastases in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* **34**:S25-29.
- Passlick B (2003). Initial surgical staging of lung cancer. *Lung Cancer* **42(1)**:S21-S25.
- Patau K (1960). The identification of individual chromosomes, especially in man. *Am J Hum Genet* **12**:250-76.
- Pavlaki M, Zucker S (2003). Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPis): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev* **22(2-3)**:177-203. Review.
- Pei J, Balsara BR, Li W, Litwin S, Gabrielson E, Feder M, Jen J, Testa JR (2001). *Genes Chrom Cancer* **31**:282-7.
- Peikert T, Specks U, Farver C, Etzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* **66(9)**:4693-700.
- Pepper MS (2001). Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* **7(3)**:462-8. Review.
- Pepper MS, Skobe M (2003). Lymphatic endothelium morphological molecular and functional properties. *J Cell Biol* **163**:209-13.
- Petersen S, Heckert C, Rudolf J, et al. (2000). Gene expression profiling of advanced lung cancer. *Int J Cancer* **86**:512-7.
- Petersen I, Petersen S (2001). Towards a genetic-based classification of human lung cancer. *Anal Cell Pathol* **22(3)**:111-21. Review.
- Petersen I, Petersen S, Bockmuhl U, Schwendel A, Wolf G, Dietel M (1997) Comparative genomic hybridization of bronchial carcinomas and their metastases. *Verh Dtsch Ges Pathol* **81**:297-305.
- Pinkel D, Straume T, and Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:2934-8.
- Polans AS, Witkowska D, Haley TL, Amundson D, Baizer L, Adamus G (1995). Recoverin, a photoreceptor-specific calcium-binding protein, is expressed by the tumor of a patient with cancer-associated retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **92(20)**:9176-80.
- Präuer HW, Müller C, Thetter O (2003). Operative Behandlung des Bronchialkarzinoms, *Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums*, Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag München.

- Rao JS (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* **3(7)**:489-501. Review.
- Rasmussen HS, McCann PP (1997). Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther* **75(1)**:69-75. Review.
- Richardson GE, Johnson BE (1993). The biology of lung cancer. *Semin Oncol* **20(2)**:105-27. Review.
- Roland M, Rudd RM (1998). Somatic Mutations in the development of lung cancer. *Thorax* **53**:979-83.
- Rosell R, Gomez-Codina J, Camps C, Maestre J, Padille J, Canto A et al. (1994). A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **330(3)**:153-8.
- Roth JA, Fossella F, Komaki R, Ryan MB, Putnam JB, Jr., Lee JS et al. (1994). A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **86(9)**:673-80.
- Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K (2004). Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* **25(7)**:387-95. Review
- Salgia R, Hedges TR, Rizk M, Reimer RH, Skarin AT (1998). Cancer-associated retinopathy in a patient with non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer* **22(2)**:149-52.
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Müller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmüller G, Eils R, Klein CA (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **100(13)**:7737-42.
- Schmid-Schonbein GW (1990). Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev* **70**:987-1028. Review.
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD (1998). Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1378**:F21-F59
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD (1999). Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* **118**:1136-52.
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD (2001) Cancer: Principles and Practice of Oncology. DeVita VTJ, Hellman S and Rosenberg SA. (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 917-925.
- Senin II, Bosch L, Ramon E, Zernii EY, Manyosa J, Philippov PP, Garriga P (2006). Ca<sup>2+</sup>/recoverin dependent regulation of phosphorylation of the rhodopsin mutant R135L associated with retinitis pigmentosa. *Biochem Biophys Res Commun* **349(1)**:345-52.
- Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, Lichtinghagen R, Mutschler W, Jochum M, Klein C, Passlick B, Pantel K (2003). Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* **103(5)**:647-51.

- Sienel W, Mecklenburg I, Dango S, Ehrhardt P, Kirschbaum A, Passlick B, Pantel K (2007). Detection of MAGE-A transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **13(13)**:3840-7.
- Smith RA, Glynn TJ (2000). Early lung cancer detection: current and ongoing challenges. *Cancer* **89 (S11)**:2327-8.
- Soria JC, Lee HY, Lee JI, et al. (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* **8**:1178-84.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, and Ward DC (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* **12**:368-75.
- Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K (2002). Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* **2**:573-83.
- Stamenkovic I (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* **200(4)**:448-64. Review.
- Stieber P, Hasholzner U, Lamerz R (2003). Immunologische Diagnostik und Tumormarker, *Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums*, Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag München.
- Sugita M, Geraci M, Gao B, Powell RL, Hirsch FR, Johnson G, Lapadat R, Gabrielson E, Bremnes R, Bunn PA, Franklin WA (2002). Combined use of oligonucleotide and tissue microarrays identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. *Cancer Res* **62(14)**:3971-9.
- Suzuki M, Toyooka S, Miyajima K, Iizasa T, Fujisawa T, Bekele NB, Gazdar AF (2003). Alterations in the mitochondrial displacement loop in lung cancers. *Clin Cancer Res* **9(15)**:5636-41.
- Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Yamakawa T, Morishita H, Terao T (2003). Reduced bikunin gene expression as a factor of poor prognosis in ovarian carcinoma. *Cancer* **98(2)**:424-30.
- Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Suzuki M, Terao T (2004). Upregulation of bikunin in tumor-infiltrating macrophages as a factor of favorable prognosis in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **94(3)**:725-34.
- Testa JR, Siegfried JM, Liu Z, Hunt JD, Feder MM, Litwin S, Zhou JY, Taguchi T, Keller SM (1994). Cytogenetic analysis of 63 non-small cell lung carcinomas: recurrent chromosome alterations amid frequent and widespread genomic upheaval. *Genes Chromosomes Cancer* **11(3)**:178-94.
- Thibodeau SN, Bren G, and Schaid D (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**:816-9.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281(5381)**:1312-6. Review.
- Thornberry NA (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* **5(5)**:R97-103. Review.
- Vogelstein B, Kinzler KW (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9**:138-41.

- Wada N, Otani Y, Kubota T, Kimata M, Minagawa A, Yoshimizu N, Kameyama K, Saikawa Y, Yoshida M, Furukawa T, Fujii M, Kumai K, Okada Y, Kitajima M (2003). Reduced angiogenesis in peritoneal dissemination of gastric cancer through gelatinase inhibition. *Clin Exp Metastasis* **20(5)**:431-5.
- Watson KL, Konrad KD, Woods DF, Bryant PJ (1992). Drosophila homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. *Proc Natl Acad Sci USA* **89(23)**:11302-6.
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, and Lathrop M (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**:794-801.
- Werle B, Kotzsch M, Lah TT, Kos J, Gabrijelcic-Geiger D, Spiess E, Schirren J, Ebert W, Fiehn W, Luther T, Magdolen V, Schmitt M, Harbeck N (2004). Cathepsin B, plasminogenactivator-inhibitor (PAI-1) and plasminogenactivator-receptor (uPAR) are prognostic factors for patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* **24(6)**:4147-61.
- Wool IG (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* **21(5)**:164-5.
- Yagyu T, Kobayashi H, Matsuzaki H, Wakahara K, Kondo T, Kurita N, Sekino H, Inagaki K (2006). Enhanced spontaneous metastasis in bikunin-deficient mice. *Int J Cancer* **118(9)**: 2322-8.
- Yasumoto K, Osaki T, Watanabe Y, Kato H, Yoshimura T (2003). Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected nonsmall cell lung cancer: A multicenter prospective study. *Ann Thorac Surg* **76**:194-202.
- Yokota J (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* **21(3)**:497-503. Review.
- Zendman AJ, Ruiter DJ, Van Muijen GN (2003). Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiol* **194(3)**:272-88. Review.

## 7 Anhang



**Abbildung 7.1: Erfolgreich hybridisierte Proben der Primärtumoren und disseminierten Einzelzellen der verschiedenen Kategorien.** Links: Areale, bzw. Tumorzellen pro Patient nach CGH, Rechts: Areale, bzw. Tumorzellen nach Array-Filterhybridisierung, Mitte (kursiv): Probenanzahl pro Patient mit erfolgreicher CGH und Arrayhybridisierung.

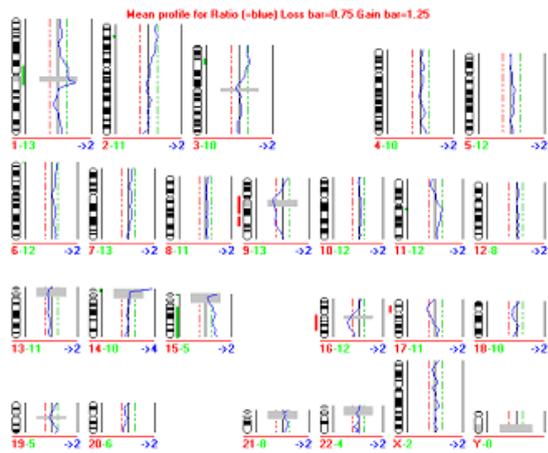
**Tabelle 7.1: Unterteilung aller 128 Patienten nach untersuchten Organen, gefundenen disseminierten Tumorzellen und Anzahl der mit CGH und Array untersuchten Proben.** LK Lymphknoten, KM Knochenmark, PT Primärtumor, EZ Tumorzelle, ADC Adenokarzinom

	128 NSCLC Patienten							
	31 nur ein Organ vorhanden				97 KM und LK untersucht			
	negativ		positiv		beide negativ	ein Organ positiv		beide positiv
	LK -	KM -	LK +	KM +	LK - / KM -	KM + / LK -	LK + / KM -	LK + / KM +
	24		7		52	34		11
	7	17	2	5		20	14	
<b>PT</b> (Patienten)	2	4	0	0	15	4	10	5
CGH	2	3	0	0	12	2	10	5
Array	2	4	0	0	15	3	9	5
Array+CGH	2	3	0	0	12	1	9	5
<b>EZ</b> (Patienten)			1	0		3	13	6
CGH			1	0		3	13	6
Array			0	0		0	9	4
Array+CGH			0	0		0	9	4
<b>ADC</b> (Patienten)			1	0		5	6	4
PT CGH			0	0		5	6	4
Array			0	0		4	6	4
EZ CGH			1	0		0	12	0
Array			0	0		0	6	3
PT+EZ			0	0		0	6	3

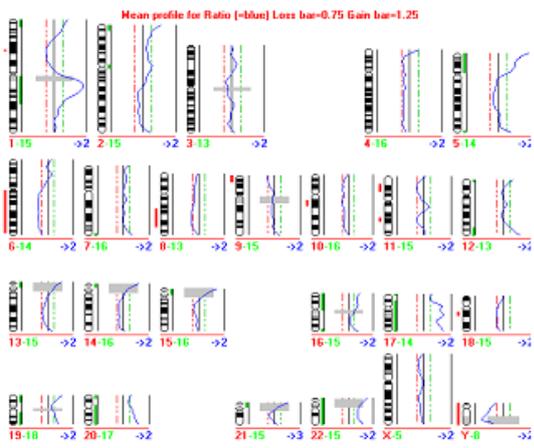
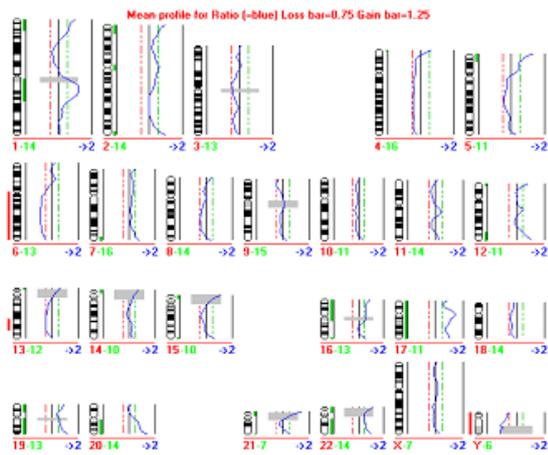
CK 7 CK 8	MAGE 1F	beta 3	Chymotrypsin	MMP 1	ADAM 15	Cystatin A	PAI-1	R13a	$\beta$ -Aktin
CK 8 CK 7	MAGE 2F	beta 4	PRSS12	MMP 13	ADAM 20	Cystatin B	PAI-2	IAP3	EF1-alpha
CK 10	MAGE 3F	beta 5	"Tigger1"	Cathepsin B	ADAM 21	Cystatin C	Str 1	rS9	GAPDH
CK13	MAGE 4F	beta 7	Bikunin	Cathepsin D	TACE	Tissue Factor	Str 3	1323	
CK 18	MAGE 12F	KLK 2	Gel A	Cathepsin F	Caspase 7	GFP	c-est-1	Medullasin	
CK 19	alpha 2	KLK 5	Gel B	Cathepsin H	Caspase 8			Myeloplastin	
CK 20	alpha 4	KLK 6	ADAM 8	MT-1	Caspase 9	Heparanase	uPA	Cathepsin K	
MAGE 1	alpha 5	Caspase 1	ADAM 9	MT-2	Caspase 10	CEA	uPAR	Cathepsin L	
MAGE 3	alpha 6	Caspase 2	ADAM 10	MT-3	PSTI	TIMP-1	Gzm K	Cathepsin S	
MAGE 4	alpha v	Caspase 3	ADAM 11	Matrilysin	Gzm A	TIMP-2	Gzm M	Cathepsin V	
MAGE 6	beta 1	Caspase 4	EMMPRIN I	KLK 7	Gzm B	TIMP-3	MT-4	Cathepsin W	
MAGE 12	beta 2	Caspase 6	EMMPRIN II	KLK8	Gzm H	TIMP-4	MT-5	Ubiquitin	

**Abbildung 7.2: Schema des Proteasenfilters.** Aufteilung der 109 jeweils doppelt gespotteten Gene (Proteasen, Inhibitoren, tumorspezifische Gene, Haushaltsgene) Die cDNAs eines Gens wurden jeweils schräg gegenüberliegend aufgetragen und fixiert.

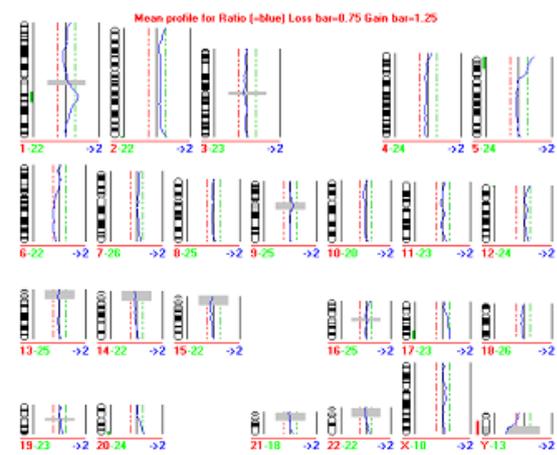
**Abbildung 7.3: CGH-Profile aller Primärtumoren und ihrer dazugehörigen disseminierten Einzelzellen (Buchstabenkürzel = Patient, Z = Zelle, Nummer = Probe)**



Bu Z1

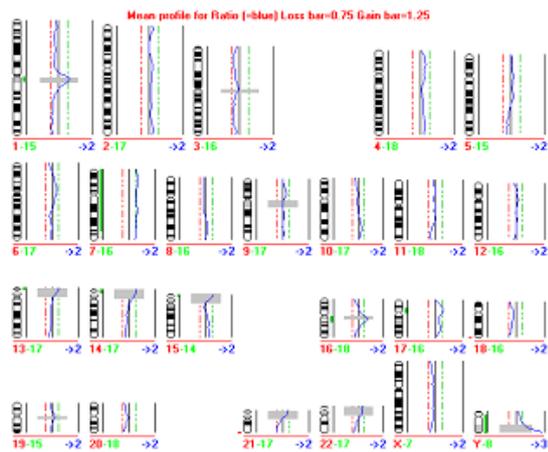


Bu 209

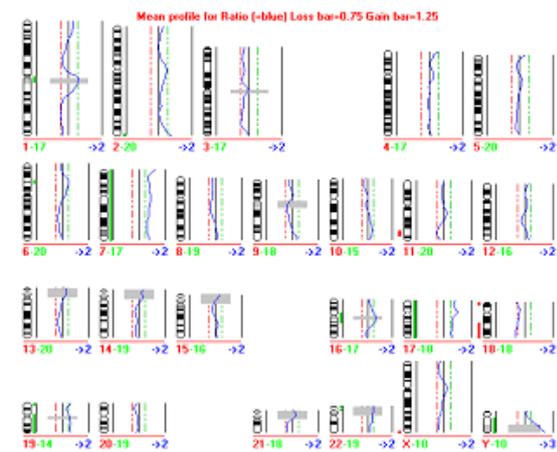


Bu 210

Bu 211



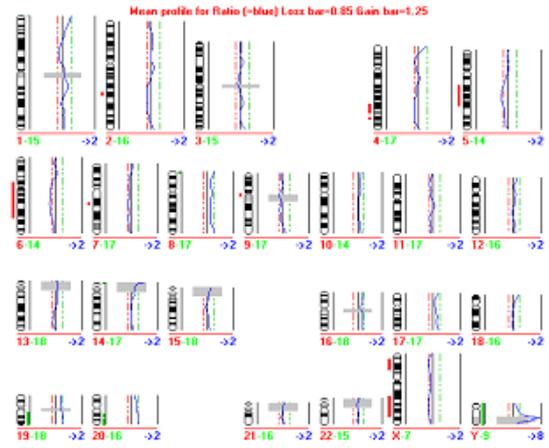
Bu 75



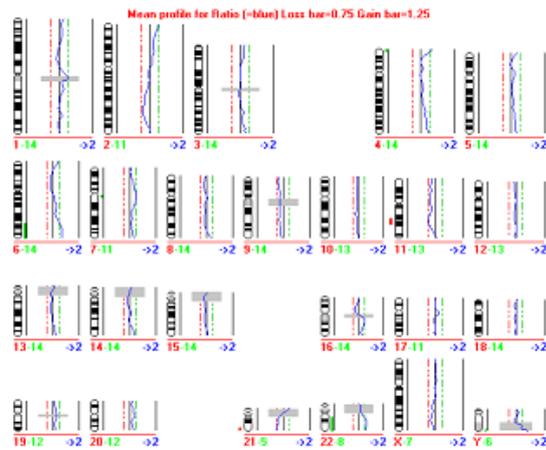
Bu 74



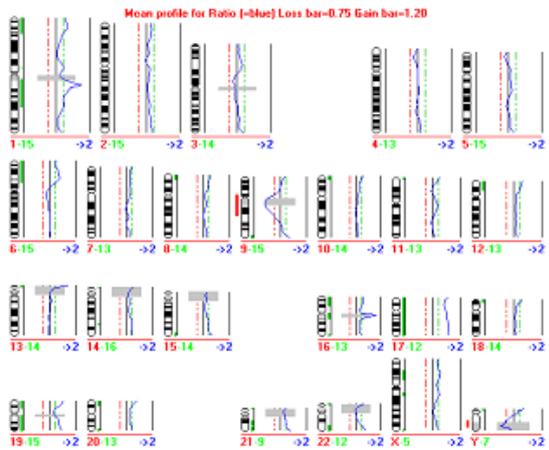
Du 168



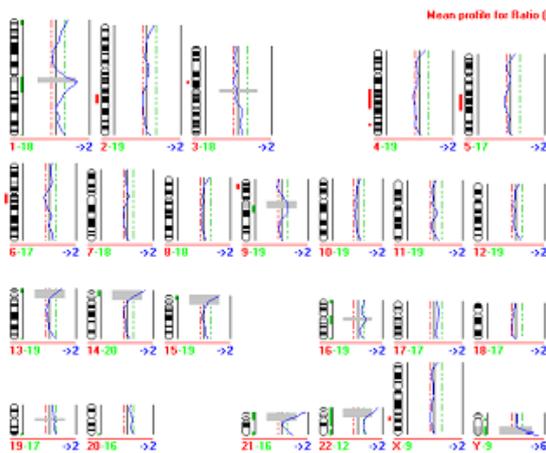
Du 169



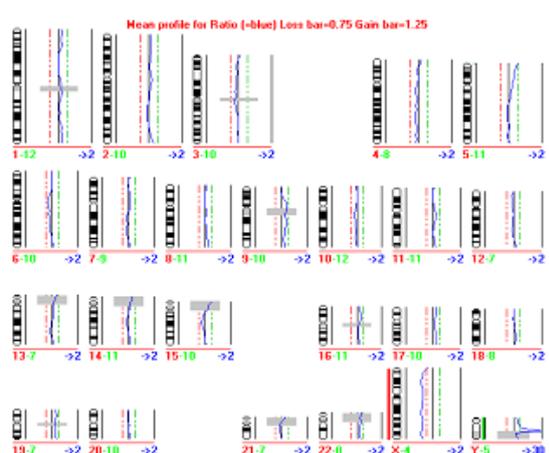
Du Z3



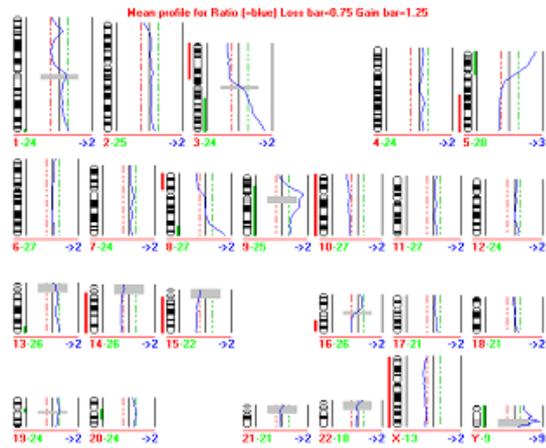
Du Z4



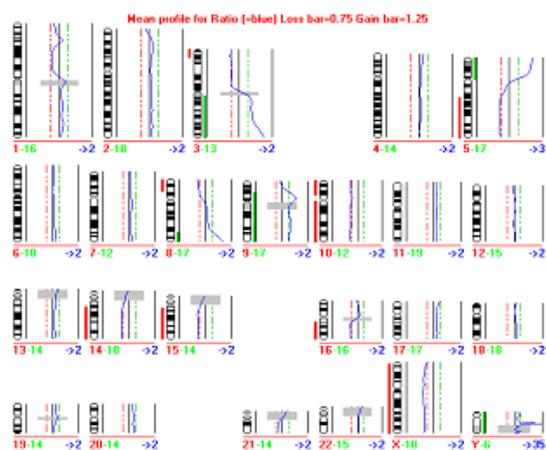
Ke Z3



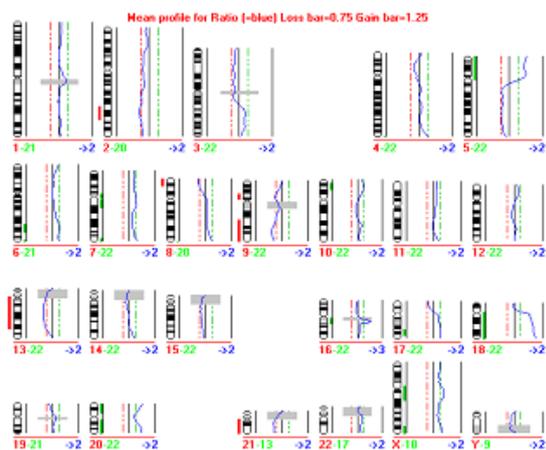
Ke 110



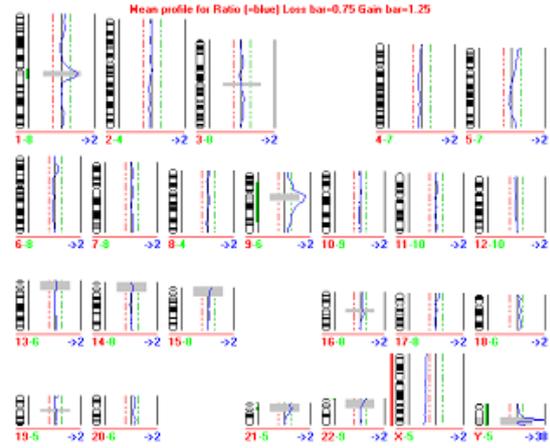
Ke 112



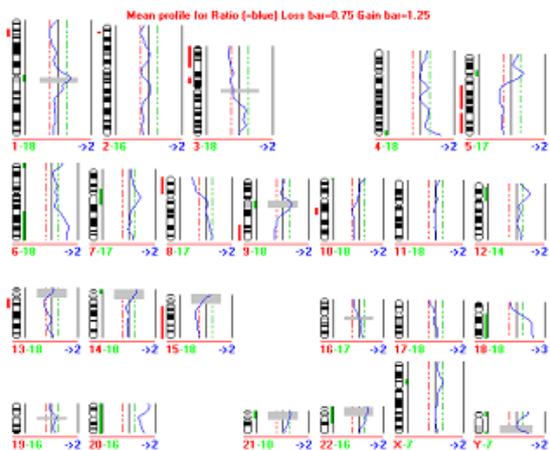
Ke 115



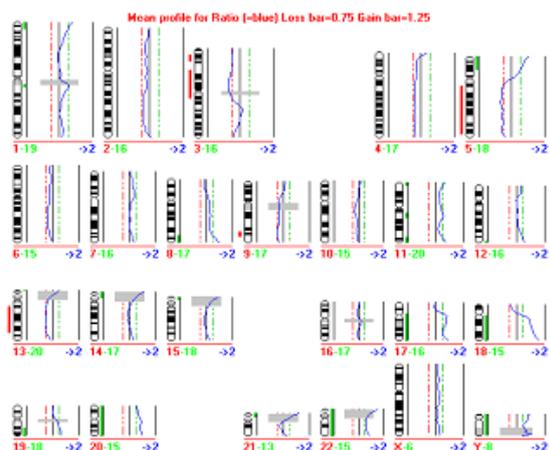
Ki Z3



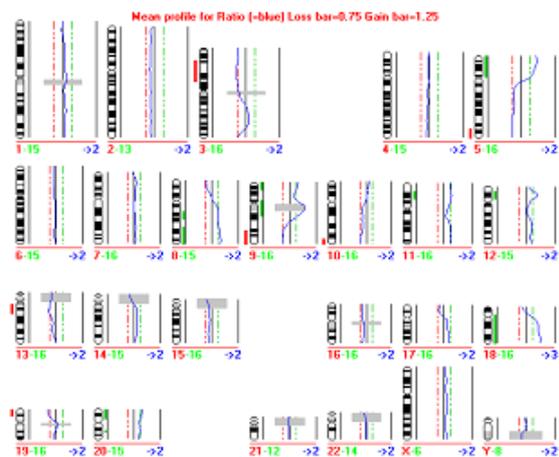
Ke 113



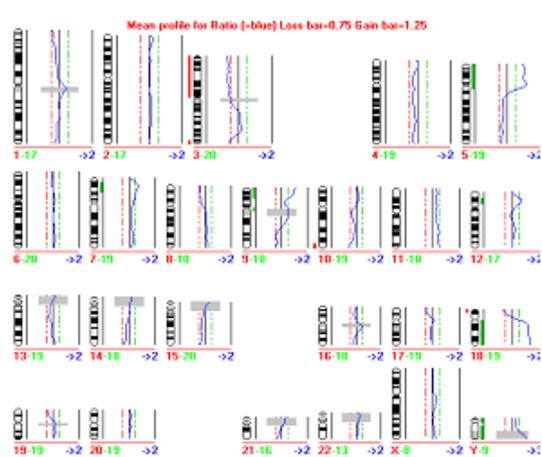
Ki Z2



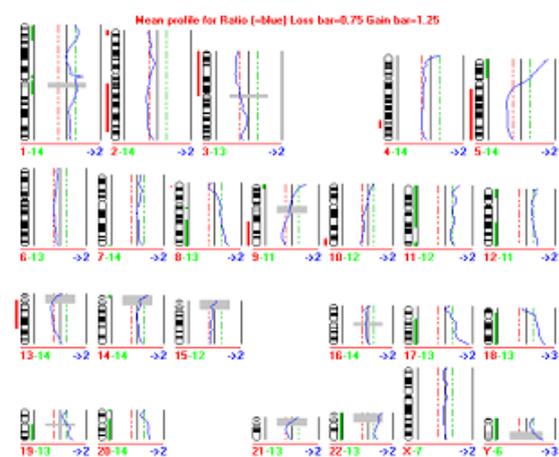
Ki 200



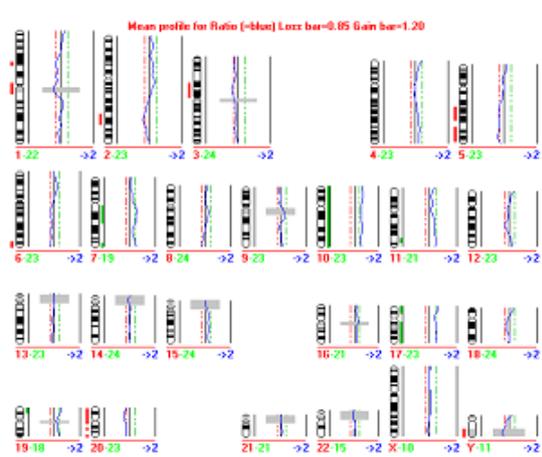
Ki 79



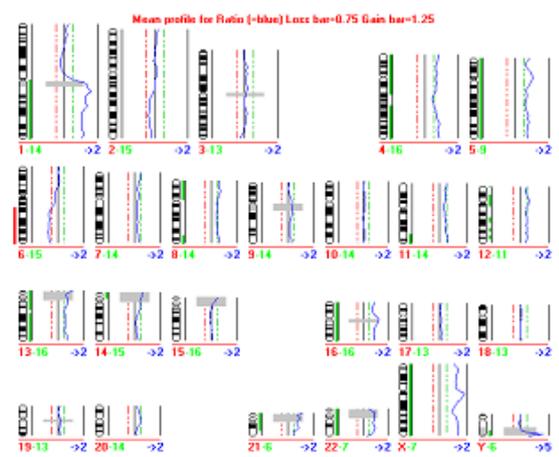
Ki 80



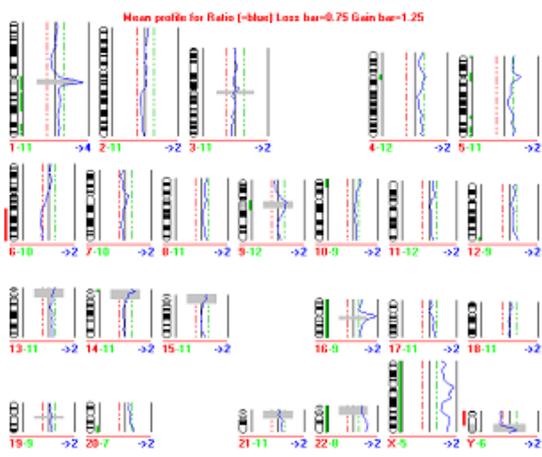
Ki 77



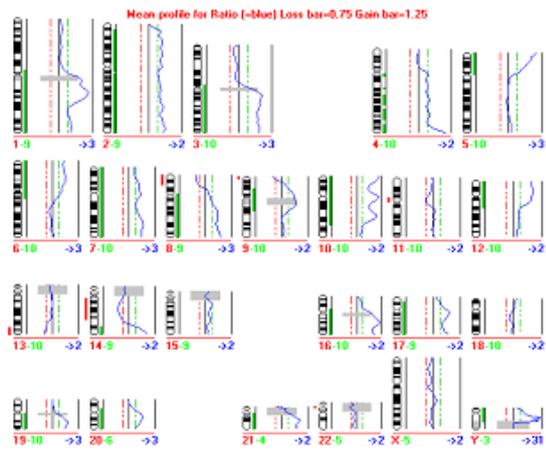
Ko 134



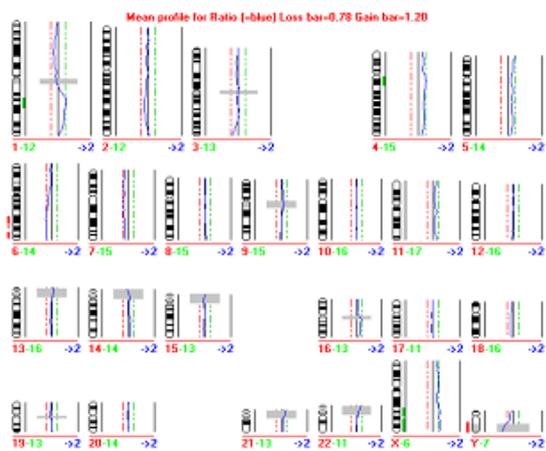
Ku Z1



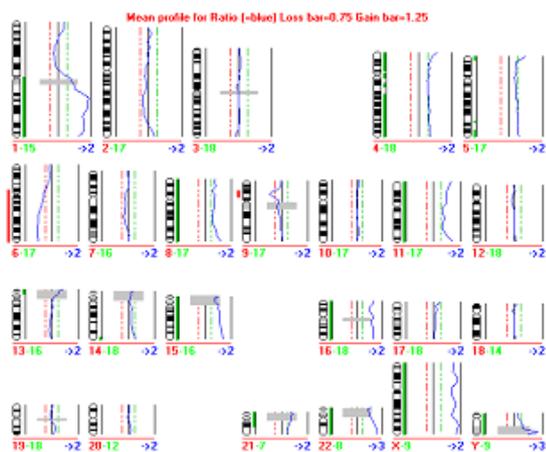
Ku Z2



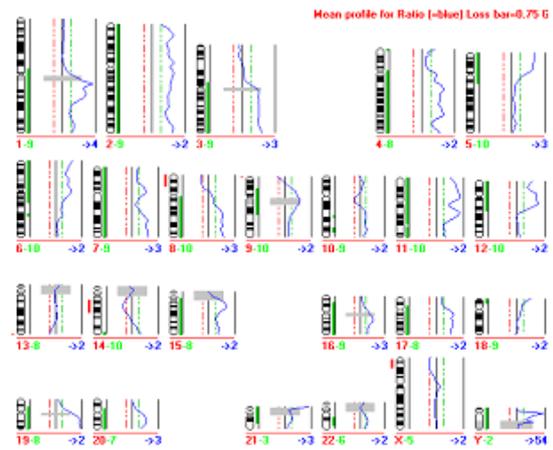
Ko Z2



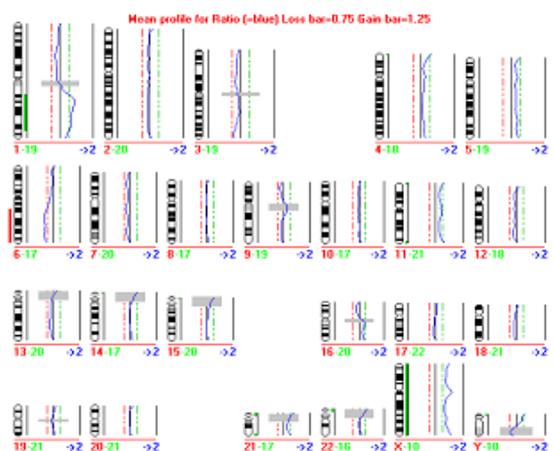
Ku 197



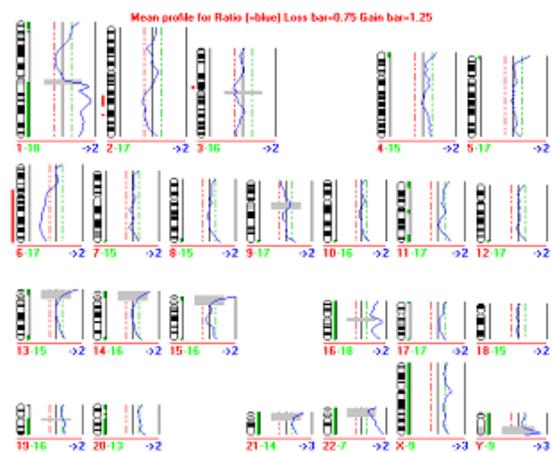
Ku Z6



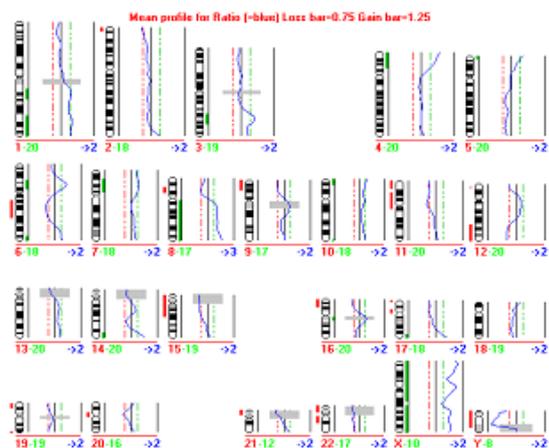
Ko Z4



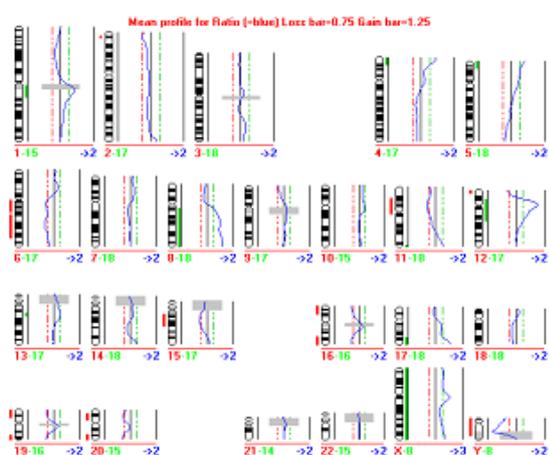
Ku 198



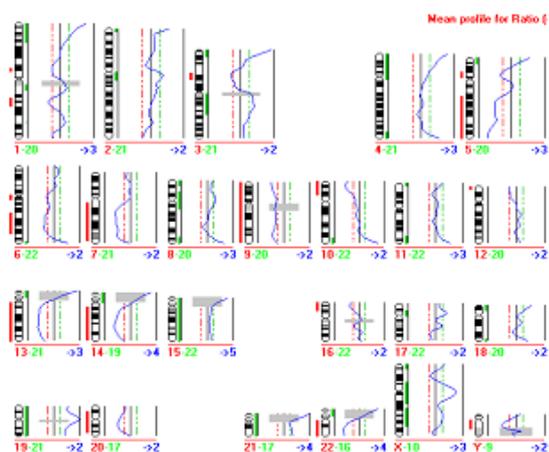
Ku Z4



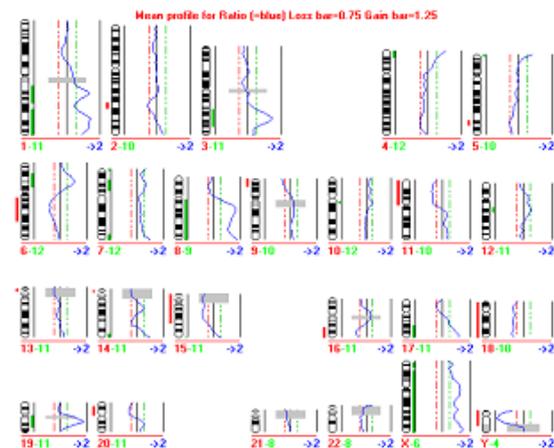
Lm 187



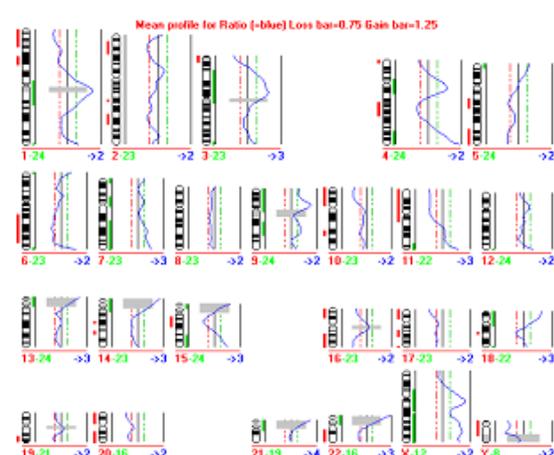
Lm 190



Ma Z3



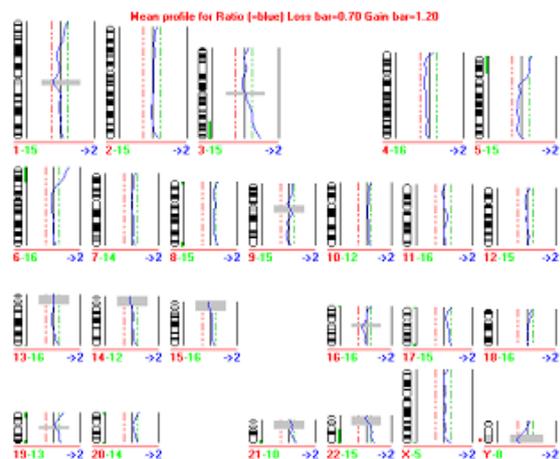
Lm 188



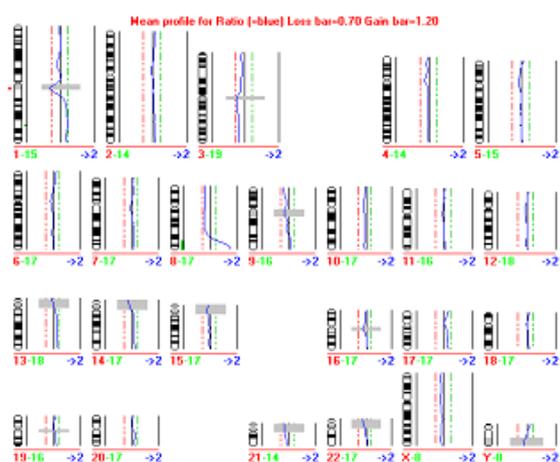
Lm Z4



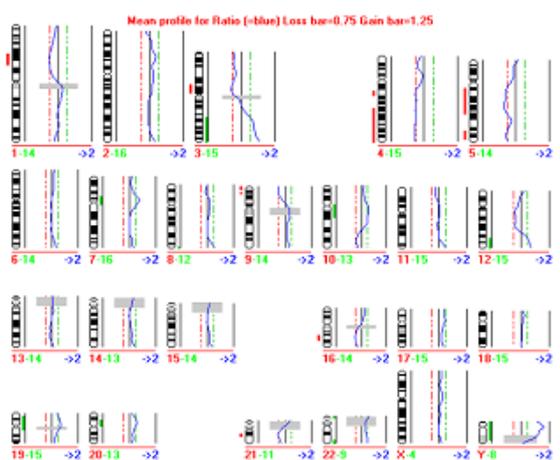
Ne 155



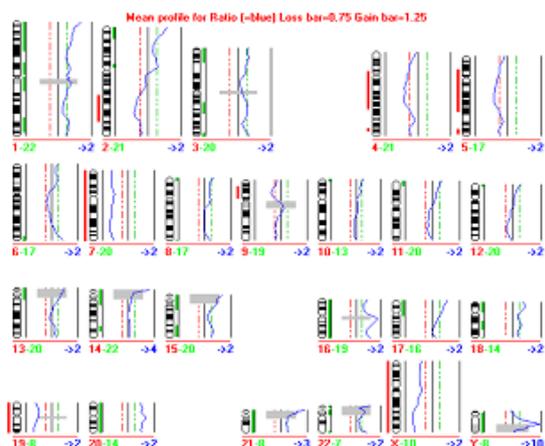
Ne 154



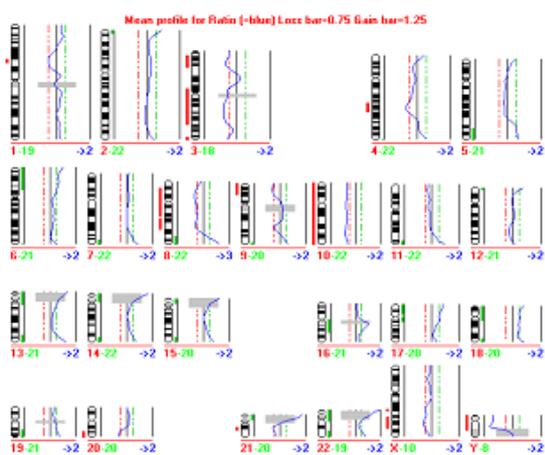
Sa 145



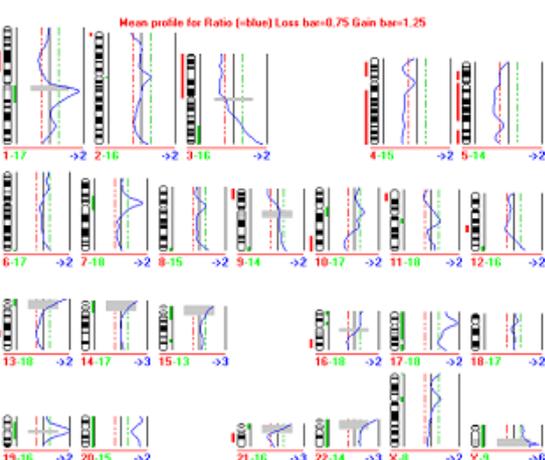
Sr 204



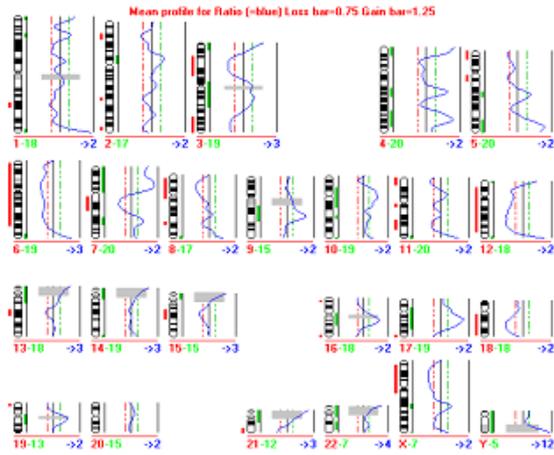
Ne Z4



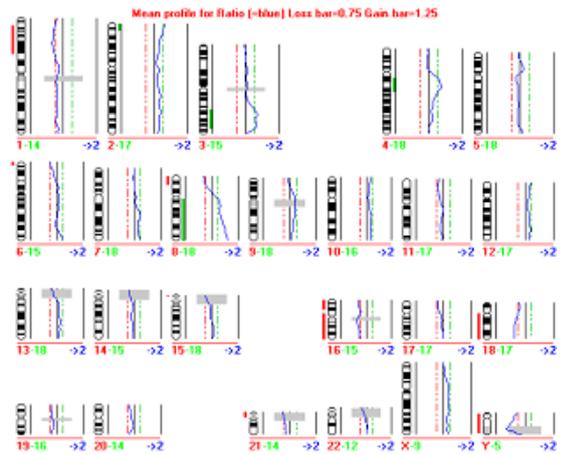
Sa Z5



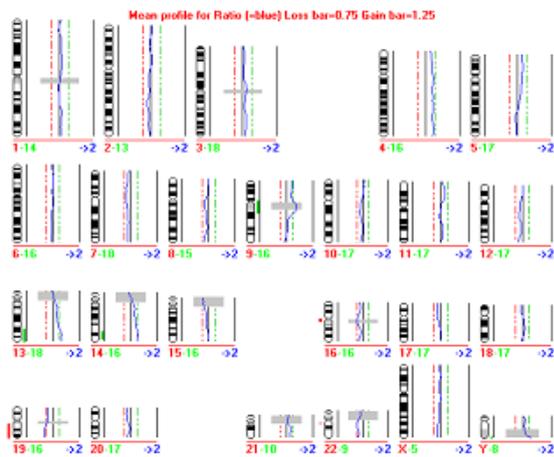
Sr 206



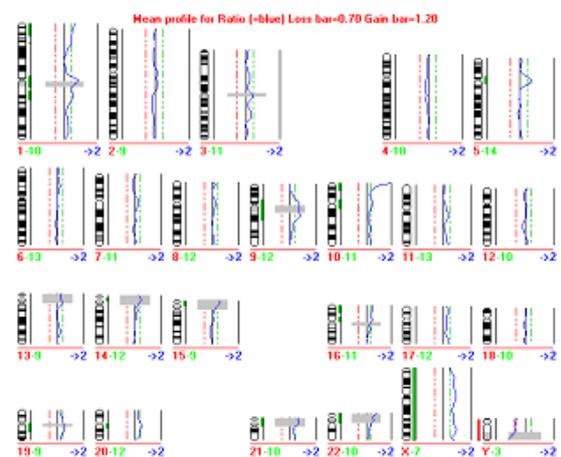
Sr Z2



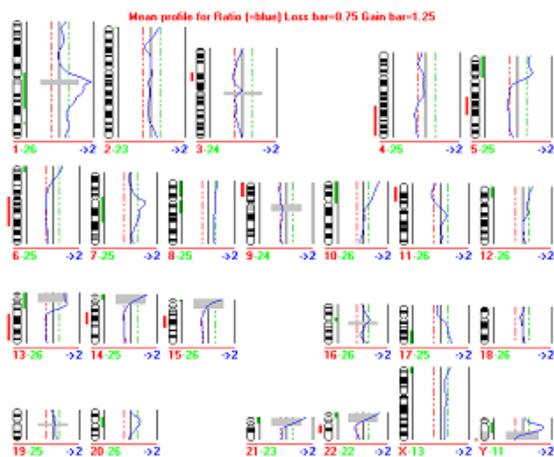
Se 192



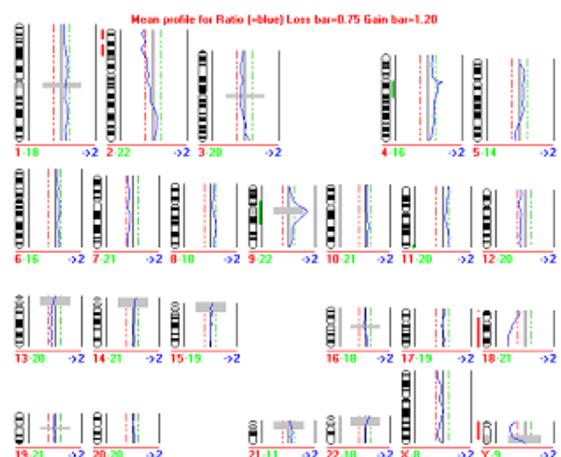
Se 195



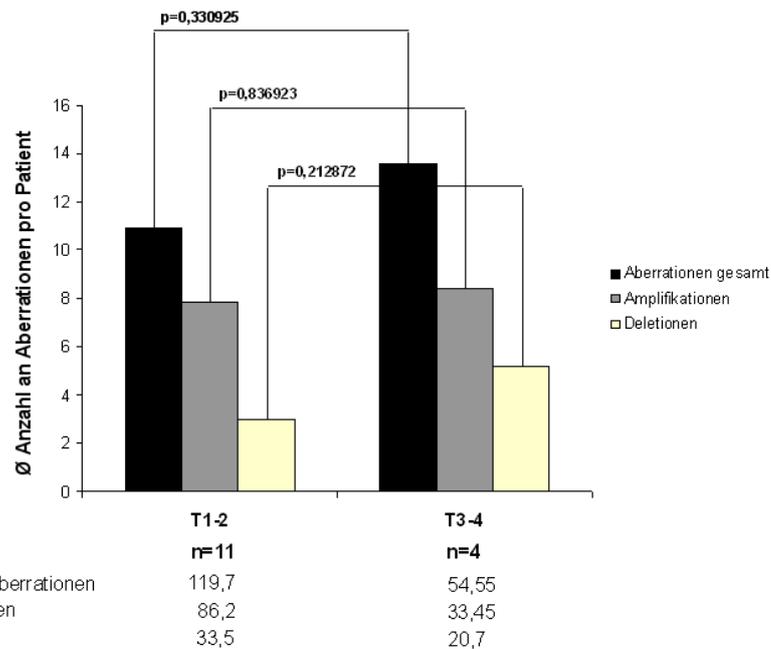
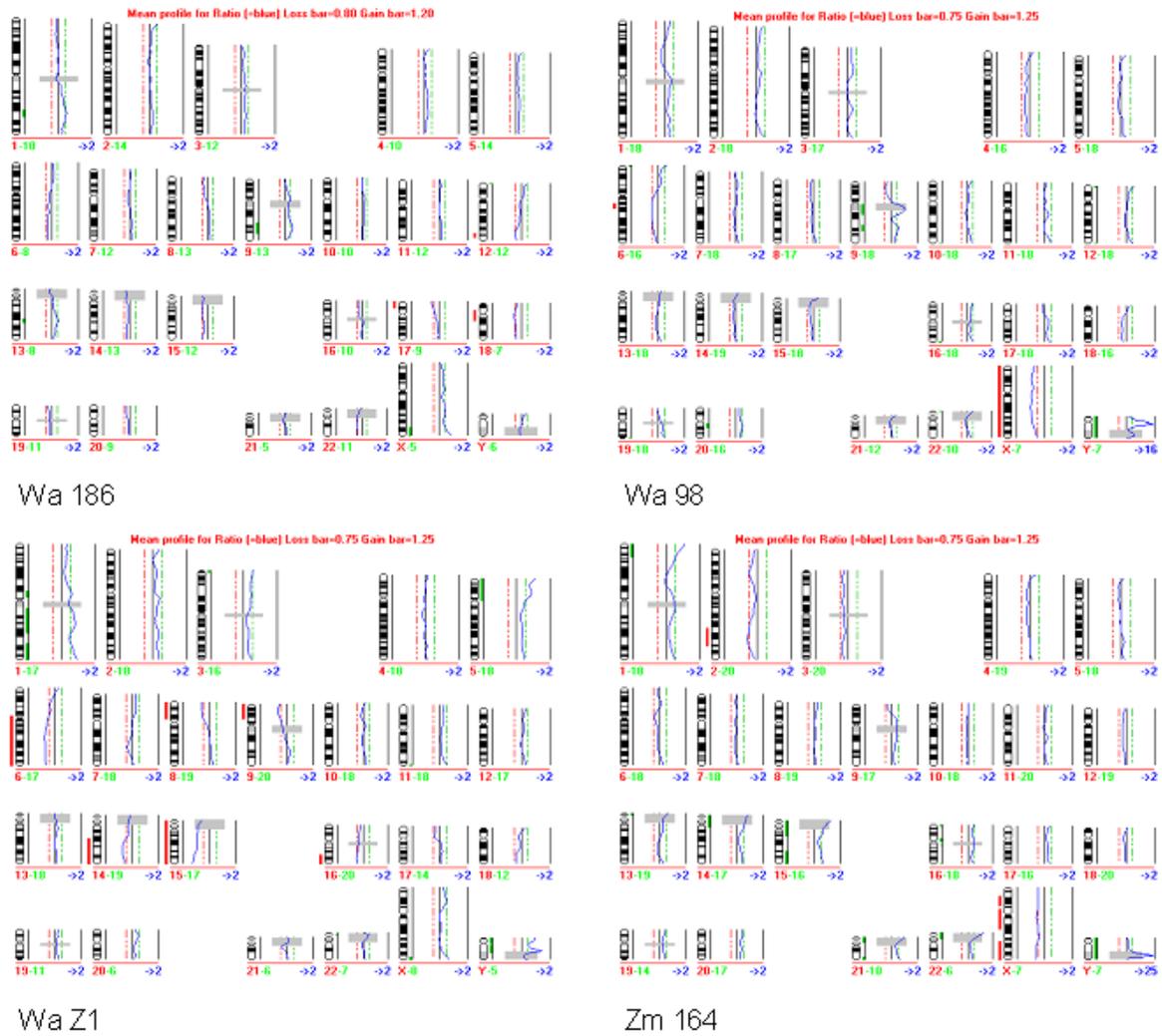
Se 69



Se Z3



Se 196



**Abbildung 7.4: Durchschnittliche Anzahl genomischer Veränderungen bei T1-2 (n=11) und T3-4 (n=4) Tumoren.** Bei mehreren Arealen aus dem Primärtumor wurde der Mittelwert pro Patient gebildet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Aberrationen gesamt, Amplifikationen, Deletionen) festgestellt werden.

**Tabelle 7.2: Expressionshäufigkeit von Cytokeratinen, Haushaltsgenen, Integrinen und tumorspezifischen Genen.** Unterteilung nach Primärtumoren mit (PT LK pos, n = 36), Primärtumoren ohne disseminierte Tumorzellen (PT LK/KM neg, n = 17) und disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten (EZ, n = 16).

	PT LK pos (n=36)		PT LK/KM neg (n=17)		EZ (n=16)	
	n	%	n	%	n	%
<b>Cytokeratine (n=7)</b>	36	100	17	100	16	100
<b>MAGE (n=10)</b>	17	47,2	7	41,2	5	31,3
<b>CEA</b>	4	11,1	2	11,8	6	37,5
<b>Integrine (n=11)</b>	27	75	11	64,7	4	25
<b>EMMPRI N I</b>	24	66,7	11	64,7	5	31,25
<b>EMMPRI N II</b>	26	72,2	11	64,7	5	31,25
<b>beta-Aktin</b>	36	100	17	100	16	100
<b>EF-1alpha</b>	31	86,1	13	76,5	13	81,3
<b>GAPDH</b>	31	86,1	13	76,5	10	62,5
<b>Ubiquitin</b>	27	75	10	58,8	13	81,3
<b>MAGE 1</b>	6	16,7	1	5,9	0	0
<b>MAGE 3</b>	9	25	4	23,5	2	12,5
<b>MAGE 4</b>	13	36,1	5	29,4	0	0
<b>MAGE 6</b>	10	27,8	3	17,6	3	18,75
<b>MAGE 12</b>	11	35,6	5	29,4	2	12,5
<b>MAGE 1F</b>	1	2,8	1	5,9	1	6,25
<b>MAGE 2F</b>	3	8,3	2	11,8	4	25
<b>MAGE 3F</b>	1	2,8	1	5,9	0	0
<b>MAGE 4F</b>	2	5,6	1	5,9	0	0
<b>MAGE 12F</b>	5	13,9	2	11,8	2	12,5
<b>CK 7</b>	26	70,2	10	58,8	11	68,75
<b>CK 8</b>	29	80,6	13	76,5	10	62,5
<b>CK 10</b>	18	50	6	35,3	7	43,75
<b>CK 13</b>	10	27,8	2	11,8	7	43,75
<b>CK 18</b>	21	58,3	8	47,1	13	81,3
<b>CK 19</b>	34	94,4	16	94,1	16	100
<b>CK 20</b>	2	5,6	0	0	1	6,25
<b>Integrin a2</b>	10	27,8	3	17,6	1	6,25
<b>Integrin a4</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Integrin a5</b>	10	27,8	5	29,4	0	0
<b>Integrin a6</b>	7	19,4	3	17,6	0	0
<b>Integrin av</b>	11	30,6	4	23,5	1	6,25
<b>Integrin b1</b>	15	41,7	7	41,2	2	12,5
<b>Integrin b2</b>	14	38,9	8	47,1	0	0
<b>Integrin b3</b>	3	8,3	2	11,8	1	6,25
<b>Integrin b4</b>	14	38,9	6	35,3	1	6,25
<b>Integrin b5</b>	9	25	5	29,4	1	6,25
<b>Integrin b7</b>	5	13,9	1	5,9	1	6,25

**Tabelle 7.3: Proteasenexpression bei Primärtumoren mit (n=36) und Primärtumoren ohne disseminierte Einzelzellen (n=17) in den Lymphknoten in Prozent.**

LN pos %	CYS C	CASP 7	CATH D	CYS B	CATH B	TIMP-1	GEL A	MT 1-MMP	uPA	MT 5-MMP	ADAM 15	CATH L	TACE
LN neg %	78	67	56	67	56	50	39	22	36	31	22	22	19
LN pos %	88	88	82	71	65	59	53	47	41	35	35	35	35
LN neg %	GEL B	Str 3	CASP 2	Bikunin	CATH H	CASP 1	CASP 4	CASP 8	TIMP-2	uPAR	Matrylisin	CATH S	PSTI
LN pos %	14	11	67	67	56	53	53	44	44	42	36	31	31
LN neg %	35	35	53	53	47	29	24	12	41	35	35	24	6

**Tabelle 7.4: Proteasenexpression bei disseminierten Einzelzellen (EZ, n=16) und verschiedenen Arealen aus den dazugehörigen Primärtumoren (PT, n=36) in Prozent.**

EZ %	CATH B	CATH H	CYC C	TIMP 1	CASP 7	CATH D	CYS B	UPA	PAI II	Matrylisin	GEL A
PT %	50	50	43.75	43.75	31.25	31.25	25	25	25	18.75	18.75
EZ %	61.1	61.1	77.8	77.8	69.4	55.6	66.6	36.1	30.6	38.9	38.9
PT %	MT5	UPAR	CASP 2	TIMP 2	CATH S	Bikunin	KLK 7	CASP 1	CASP 4	CASP 8	
EZ %	18.75	12.5	6.25	6.25	6.25	68.75	31.25	0	0	0	
PT %	30.6	41.7	66.6	44.4	44.4	66.6	8.3	61.1	52.8	44.4	

**Tabelle 7.5: Proteasenexpression bei disseminierten Einzelzellen (EZ, n=12) und verschiedenen Arealen aus den dazugehörigen Primärtumoren (PT, n=26) von Adenokarzinomen (AD) in Prozent**

AD PT %	CYS C	CASP 7	CYS B	CASP 2	CATH H	TIMP-1	CATH D	TIMP-2	uPAR	Matrylisin	uPA	GEL A	CATH S
AD EZ %	73	73	69	65	58	54	54	54	50	46	39	39	35
AD PT %	50	25	33	8	58	50	42	8	17	25	33	25	8
AD EZ %	ADAM 15	MT 5-MMP	Bikunin	CATH B	GEL B	CASP 6	PRSS 12	CASP 4	CASP 8	CASP 1	MMP 1	CASP 10	
AD PT %	31	31	65	50	12	4	67	54	50	46	31	31	
AD EZ %	17	17	83	67	33	33	0	0	0	0	0	0	

**Tabelle 7.6: Übersicht über alle auf dem Filterarray gespotteten Proteasen und ihre Inhibitoren, Synonyme und ihre chromosomale Lokalisation**

Proteasen	Synonym	Chromosom	
<b>ADAMs</b> <i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>	<b>ADAM 8</b>	Human Leucocyte Differentiation Antigen, CD156	
	<b>ADAM 9</b>	Myeloma Cell Metalloproteinase, MCMP, MDC9	
	<b>ADAM 10</b>		
	<b>ADAM 11</b>	MDC	
	<b>ADAM 15</b>	MDC 15, Metargidin	
	<b>ADAM 17</b>	Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme, TACE	
	<b>ADAM 20</b>		
	<b>ADAM 21</b>		
	<b>Caspasen</b> <i>Apoptose-related cystein protease</i>	<b>Caspase 1</b>	CASP 10, MCH4, FLICE2
		<b>Caspase 2</b>	CASP 2, NEDD2, ICH1
		<b>Caspase 3</b>	CASP 3, Parp Cleavage Protease, Apopain, CPP32
<b>Caspase 4</b>		CASP 4	
<b>Caspase 6</b>		CASP 6, Apoptotic Cystein Protease MCH2	
<b>Caspase 7</b>		CASP 7	
<b>Caspase 8</b>		CASP 8, MACH, FLICE, MCH5	
<b>Caspase 9</b>		CASP 9, Apoptotic Protease Activating Factor 3, APAF 9	
<b>Caspase 10</b>		CASP 10, MCH4, FLICE2	
<b>Cathepsine</b>		<b>Cathepsin B</b>	CTSB, Amyloid Precursor Protein Secretase, APPS
	<b>Cathepsin D</b>	CTSD	
	<b>Cathepsin F</b>	CTSF	
	<b>Cathepsin H</b>	CTSH	
	<b>Cathepsin K</b>	CTSK	
	<b>Cathepsin L</b>	CTSL, Major excreted Protein, MEP	
	<b>Cathepsin S</b>	CTSS	
	<b>Cathepsin V</b>	CTSV, Cathepsin L2, CTSL2	
	<b>Cathepsin W</b>	CTSW	
	<b>Serinproteasen</b>	<b>uPA</b>	Plasminogenaktivator, PLAU, Urokinase, URK
		<b>Kallirein 2</b>	KLK2
		<b>Kallirein 5</b>	KLK5, Stratum Comeum Tryptic Enzyme, SCTE, Kallikrein-Like 2, KLKL2
		<b>Kallirein 6</b>	KLK6, PRSS9, Neurosin, Protease M, Zyme
<b>Kallirein 7</b>		KLK7, PRSS6, Stratum Comeum Chymotryptic Enzyme, SCCE	
<b>Kallirein 8</b>		KLK8, TADG14, PRSS19,	
<b>Tissue Factor</b>		TF, Coagulation Factor 3, F3, Tissue Thromboplastin	
<b>Granzyme A</b>		GZMA, Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Serin Esterase 3, CTLA3, HFSP	
<b>Granzyme B</b>		GZMB, CTLA1, Granzyme 2, CSPB, CGL1	
<b>Granzyme H</b>		GZMH, Cathepsin G-Like 2, CTSG2, CGL2,	
<b>Granzyme K</b>		GZMK, Tryptase 2, TRYP2, Granzyme 3	
<b>Granzyme M</b>		GZMM, Lymphocyte Met-Ase 1, MET-ASE	
<b>Medullasin</b>		Elastase 2, ELA2, NE	
<b>Proteinase 3</b>		PRTN3, PR3, Myeloblastin, MBT, Wegener Autoantigen, P29, AGP7	
<b>Neurotrypsin</b>		PRSS12, Brain-Specific Serin Protease 3, BSSP3	
<b>Chymotrypsin</b>		CTRB1, Chymotrypsinogen A, alpha-Chymotrypsinogen	
<b>MMPs</b> <i>Matrix Metalloproteinasen</i>		<b>MMP 1</b>	Collagenase, CLG, CLGN
		<b>MMP 2</b>	Gelatinase A, Collagenase Type 4A, CLG4A
		<b>MMP 3</b>	Stromelysin 1, STR1, STMY1, Transin
	<b>MMP 7</b>	Matrylisin, Putative Metalloproteinase 1, PUMP1	
	<b>MMP 9</b>	Gelatinase B, Collagenase Type 4-B, CLG4B, Collagenase Type 5	
	<b>MMP 11</b>	Stromelysin 3, STMY3	
	<b>MMP 13</b>	Collagenase 3, CLG3	
	<b>MMP 14</b>	Membran Type 1 Matrix Metalloproteinase, MT1-MMP	
	<b>MMP 15</b>	MT2-MMP	
	<b>MMP 16</b>	MT3-MMP	
	<b>MMP 17</b>	MT4-MMP	
	<b>MMP 24</b>	MT5-MMP	
	<b>Serin Protease Inhibitor</b>	<b>Bikunin</b>	SPINT2, Kunitz-type, Hepatocyte Growth factor Inhibitor 2, HAI-2,
		<b>PSTI</b>	Pancreatic secretory Trypsin Inhibitor, Kazal-type1, SPINK1, TATI
<b>Cystein Protease Inhibitor</b>	<b>Cystatin A</b>	CSTA, Stefin A, STFA, STF1	
	<b>Cystatin B</b>	CSTB, Stefin B, STFB	
	<b>Cystatin C</b>	Cystatin 3, CST3, Gamma-TRACE	
<b>Plasminogen Activator Inhibitor</b>	<b>PAI 1</b>	PLANH1, Serpine1, PAIE	
	<b>PAI 2</b>	PLANH2, SerpineB2, Urokinase Inhibitor, Monocyte Arginine-Serpin	
<b>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</b>	<b>TIMP-1</b>	Human Collagenase Inhibitor, HCl, EPA	
	<b>TIMP-2</b>		
	<b>TIMP-3</b>		
	<b>TIMP-4</b>		

---

## 8 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Gert Riethmüller danke ich für seine Unterstützung und sein Interesse an meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Christoph Klein möchte ich mich für seine Ideen, seine kompetente Unterstützung als Betreuer und Doktorvater dieser Arbeit und für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken, die mich in all den Jahren motiviert hat. Des Weiteren möchte ich ihm für die Ermöglichung, die Arbeit nach dem Erziehungsurlaub fortzuführen und für seinen Einsatz bei der Finanzierung des Projektes und meiner Stelle danken.

Dank gilt auch allen untersuchten Patienten, die durch ihre Zustimmung die wissenschaftliche Untersuchung ihrer Proben möglich gemacht haben.

Des Weiteren danke ich den Kooperationspartnern Dr. Thomas Ragg und Dr. Crispin für die bioinformatische Berechnung und die statistische Auswertung der Daten.

Die gesamte AG Klein hat dazu beigetragen, dass diese Arbeit in einem angenehmen und inspirierenden Umfeld entstehen konnte. Euch allen Danke dafür!

Für ihre technische Unterstützung bedanke ich mich vor allem bei Manfred „Mani“ Mayer, Elke Burkhart, Barbara Lindner, Isabell Blochberger und Bea Cucuruz.

Besonderer Dank geht an Bernhard „Bernie“ Polzer für das wiederholte, geduldige Korrekturlesen der Dissertation und die wertvollen fachlichen und nicht fachlichen Gespräche. Ich danke Andrea Eberhardt, Thomas Blankenstein, Nickolas Stöcklein und Oleg Schmidt-Kittler für die lustigen Stunden auch außerhalb des Labors. Ich hoffe wir bleiben in Kontakt!

Meinen Eltern möchte ich sowohl für Ihre finanzielle Unterstützung, vor allem aber für die Hilfe bei der Betreuung meiner Kinder danken. Ohne sie wären mir der Wiedereinstieg und die Beendigung der Promotion nicht möglich gewesen.

Meiner Familie David, Joshua und Sarah danke ich für Ihre Geduld und Ihre Rücksichtnahme, für Ihre Unterstützung und Ihre Aufmunterungen und für das Wissen, dass im Leben auch noch etwas anderes wichtig ist ♥♥♥.

---

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Geburtstag: 18.06.1974  
Geburtsort: Nürnberg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Religion: katholisch  
Familienstand: ledig, zwei Kinder

### Ausbildung und beruflicher Werdegang:

seit 5/2007 freie Mitarbeiterin bei Urban&Vogel Verlag GmbH

seit 12/2005 Elternzeit und Beendigung der Dissertation

11/2004 - 11/2005 **Institut für Immunologie, LMU München**  
Durchführung weiterführender Versuche für Publikationen  
(28/11/2005 Promotionsvorprüfung)

6/2003 - 10/2004 Elternzeit und Verfassen der Dissertation

5/2001 - 5/2003 **Institut für Immunologie, LMU München**  
Promotion in der Arbeitsgruppe von Dr. Christoph Klein  
Thema: Proteasenexpression und genomische Analyse einzelner disseminierter Tumorzellen aus den Lymphknoten und verschiedener Tumorzellareale aus dem Primärtumor von Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen

8/2000 - 4/2001 **Institut für Immunologie, LMU München**  
Diplomarbeit unter Prof. Dr. G. Riethmüller und in Zusammenarbeit mit Micromet AG, Martinsried und Altana Pharma (Byk Gulden)  
Thema: Vergleichende DNA-Array-Analyse von Lungenbiopsien: Identifizierung von Kandidaten-Genen zur Früherkennung von Lungenkarzinomen  
Note: 1,3 (sehr gut)

---

10/1997 - 4/2001     **Ludwig-Maximilian Universität München**  
Diplomhauptprüfung Gesamtnote: 1,5 (sehr gut)  
Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik     2,0  
1. Nebenfach: Pharmakologie und Toxikologie     1,7  
2. Nebenfach: Zoologie, neurobiologische Richtung     1,7  
3. Nebenfach: Immunologie     1,3

10/1994 - 9/1997     **Technische Universität München:** Studium der Biologie

9/1991 - 6/1994     Theresien-Gymnasium, München;  
Allgemeine Hochschulreife: 3,2

9/1984 - 7/1991     Dante-Gymnasium, München

9/1980 - 7/1984     Grundschule an der Konrad-Celtis-Straße, München

---

## 10 Publikationen

### Posterpräsentationen

**Gene expression profiling of non small cell lung cancers using bronchoscopic biopsies**, Nicole Wendler, Rudolf M. Huber, Franz Stanzel, Bernward Passlick, Sonja Offner, Christoph A. Klein, *3<sup>rd</sup> international Symposium on Minimal Residual Cancer*, 16-18 February 2001, **Hamburg, Germany**.

**Search for the “metastasiogenic” area within primary tumors from NSCLC patients**, Nicole Wendler, Bernward Passlick, Sabine Krostina, Wulf SieneI, Nikolas H. Stoeklein, Christoph A. Klein, *International Proteolysis Society (IPS)*,: 2nd General Meeting of the International Proteolysis Society, Oct 31<sup>st</sup>-Nov.4th 2001, **Freisig, Germany**.

**Proteinase expression profiling and genomic analysis of single disseminated tumor cells from the bone marrow and from laser-captured tumor cells out of the primary tumor of patients with Non Small Cell Lung Cancer**, Nicole Wendler, Sabine Krostina, Bernward Passlick, Wulf SieneI, Christoph A. Klein, *2<sup>nd</sup> International Conference On Tumor Microenvironment: Progression, Therapy and Prevention*, June 2002, **Baden, Austria**.

### Veröffentlichungen

**The hematopoietic system-specific minor histocompatibility antigen HA-1 shows aberrant expression in epithelial cancer cells**, Klein CA, Wilke M, Pool J, Vermeulen C, Blokland E, Burghart E, Krostina S, Wendler N, Passlick B, Riethmueller G, Goulmy E., *J Exp Med*. 2002 Aug 5; 196(3):359-68.

**Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells**, Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B, Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA, Riethmuller G., *Nat Biotechnol*. 2002 Apr; 20(4):387-92.

---

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, Nicole Wendler, an Eides statt,  
dass ich die vorgelegte Doktorarbeit selbstständig und  
nur mit den angegebenen Quellen angefertigt habe.

München, den

---