

Aus dem Institut für Cytopathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med Alfred Böcking

**Aberrante Methylierung des  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors als  
Tumormarker  
für die molekularzytologische Diagnostik des  
Lungenkarzinoms an Bronchialaspiraten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Zahnmedizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
vorgelegt von

Anne Krücken

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit  
Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent:

Univ.-Prof. Dr. med. Alfred Böcking

Korreferent:

Univ.-Prof. Dr. med. Royer-Pokora

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
1. Einleitung.....	4
1.1 Das Lungenkarzinom .....	4
1.1.1 Bedeutung und Häufigkeit .....	4
1.1.2 Ursachen und Kanzerogenese .....	4
1.1.3 Tumorarten und deren Einteilung .....	6
1.1.4 Entwicklung und Prognose .....	7
1.1.5 Lungenkarzinom-Diagnostik und deren Problematik .....	8
1.2 Biomarker zur Diagnose von Lungenkarzinomen.....	12
1.2.1 Mutationen als Biomarker.....	12
1.2.2 Aberrante Promotor-Methylierungen als Biomarker.....	13
1.3 Nachweis von epigenetischer DNA-Alterationen durch Hypermethylierung....	16
1.3.1 Bisulfitkonversion.....	16
1.3.2 Konventionelle PCR .....	17
1.3.3 Quantitative methylierungs-spezifische PCR (QMSP).....	18
1.4 $p16^{\text{INK4a}}$ .....	20
1.5 Ziel der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden .....	23
2.1 Das Kollektiv .....	23
2.2. Humane Zellkulturlinie T24 und ihre Kultivierung.....	25
2.3 Geräte und Apparaturen .....	26
2.4 Färbungen, Lösungen und Puffer.....	27
2.4.1 Färbungen .....	27
2.4.2 Lösungen.....	27
2.4.3 Puffer .....	28

---

2.5 Molekularbiologische Kits.....	28
2.6 Oligonukleotide .....	29
2.7 Sonstige Chemikalien .....	29
2.8 Zytologische Diagnostik .....	30
2.8.1 Vorbehandlung und Aufarbeitung .....	30
2.8.2 Einteilung in zytologische Diagnosegruppen .....	30
2.9 Molekularbiologische Diagnostik.....	32
2.9.1 DNA-Extraktion.....	32
2.9.2 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung.....	32
2.9.3 Durchführung der Bisulfitkonversion.....	33
2.9.4 Aufreinigung und Ethanol-fällung.....	34
2.9.5 Durchführung der QMSP .....	35
2.9.6 Auswertung der QMSP .....	36
2.10 Statistische Auswertung.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1 Quantifizierung der Tumorzellen .....	38
3.2 Methylierungsfrequenz in Bronchialaspiraten .....	39
3.3 Methylierungslevel in Bronchialaspiraten .....	41
3.4 Diskriminierung zwischen benignen und malignen Lungenerkrankungen .....	43
3.5 Klinisch-pathologische Korrelation .....	46
4. Diskussion .....	51
4.1 Prävalenz der aberranten Hypermethylierung des $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors im Lungenkarzinom .....	52
4.1.1 Klinisch-pathologische Korrelation.....	54
4.2 Aberrante Hypermethylierung des $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors in der Exfoliativzytologie .....	55

---

4.3 Einsatz der $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Hypermethylierung als molekularer Biomarker für die Diagnostik des Lungenkarzinoms .....	58
4.4 Problematik der Vergleichbarkeit der Messwerte .....	60
4.4.1. Einfluss der Primerwahl .....	61
4.4.2 Einfluss der PCR-Technik .....	63
4.4.3 Einfluss des Untersuchungsmaterials.....	66
4.4.4 Einfluss der ethnischen Herkunft des Patientenkollektives.....	68
4.5 Zytologie und Biomarker in Hinblick auf Krebsfrüherkennung und Invasivität.	69
5. Zusammenfassung .....	73
6. Literaturverzeichnis .....	74
7. Abkürzungen .....	85
8. Lebenslauf .....	87

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Lungenkarzinom

#### 1.1.1 Bedeutung und Häufigkeit

Mehr als 1,2 Millionen neue Fälle von Lungenkrebs werden weltweit jedes Jahr diagnostiziert (Parkin *et al.* 2001). Die Inzidenz hat einen Altersgipfel zwischen dem 55. und 70. Lebensjahr. Derzeit stellen Lungentumoren in Deutschland die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes dar (Konietzko und Fabel 2000). Während die Mortalität bösartiger Lungentumoren bei Männern leicht rückläufig ist, steigt sie bei Frauen seit längerem kontinuierlich um 3,2% jährlich an und steht bei ihnen inzwischen an dritter Stelle der Malignom-Mortalität (siehe Abbildung 1.1.1) (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004). Sollte sich dieser Trend fortsetzen, wird das Lungenkarzinom bis 2020 das Mammakarzinom als häufigste Krebstodesursache der Frau ablösen.

#### 1.1.2 Ursachen und Kanzerogenese

Die Hauptursache bösartiger Lungentumoren ist mit rund 90% das inhalative Zigarettenrauchen (Parkin *et al.* 2001). 85 - 90% der Lungentumorpatienten sind Raucher und ca. 20% aller Raucher erkranken an bösartigen Lungentumoren. Diese entwickeln sich aus prämaligen Läsionen, die an verschiedenen Stellen innerhalb des broncho-alveolären Epithels entstehen können. Dieser sogenannte Feldkanzerisierungs-Prozess ist auf eine wiederholte Exposition der Lunge gegenüber Karzinogenen zurückzuführen (Kreuzer *et al.* 1998, Kreuzer *et al.* 1999, Mannino *et al.* 1998). Die Latenzzeit, die von der ersten Einwirkung der karzinogenen Noxe (erste Zigarette) bis zum Auftreten des Tumors vergeht, beträgt etwa 20-40 Jahre (Böcking

1998). Von den multiplen in Tabakrauch enthaltenen Komponenten konnten bislang 20 Karzinogene in direkten Zusammenhang mit der Induktion bösartiger Lungentumoren gebracht werden (Hecht 1999). Wie viele andere chemische Karzinogene wirken die im Tabakrauch enthaltenen polyzyklischen Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine über metabolische Zwischenstufen. Weitere Ursachen für die Entstehung von bösartigen Lungentumoren sind die beruflich bedingte Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und kanzerogenen Schadstoffen sowie Umwelteinflüsse (Konietzko und Fabel 2000).

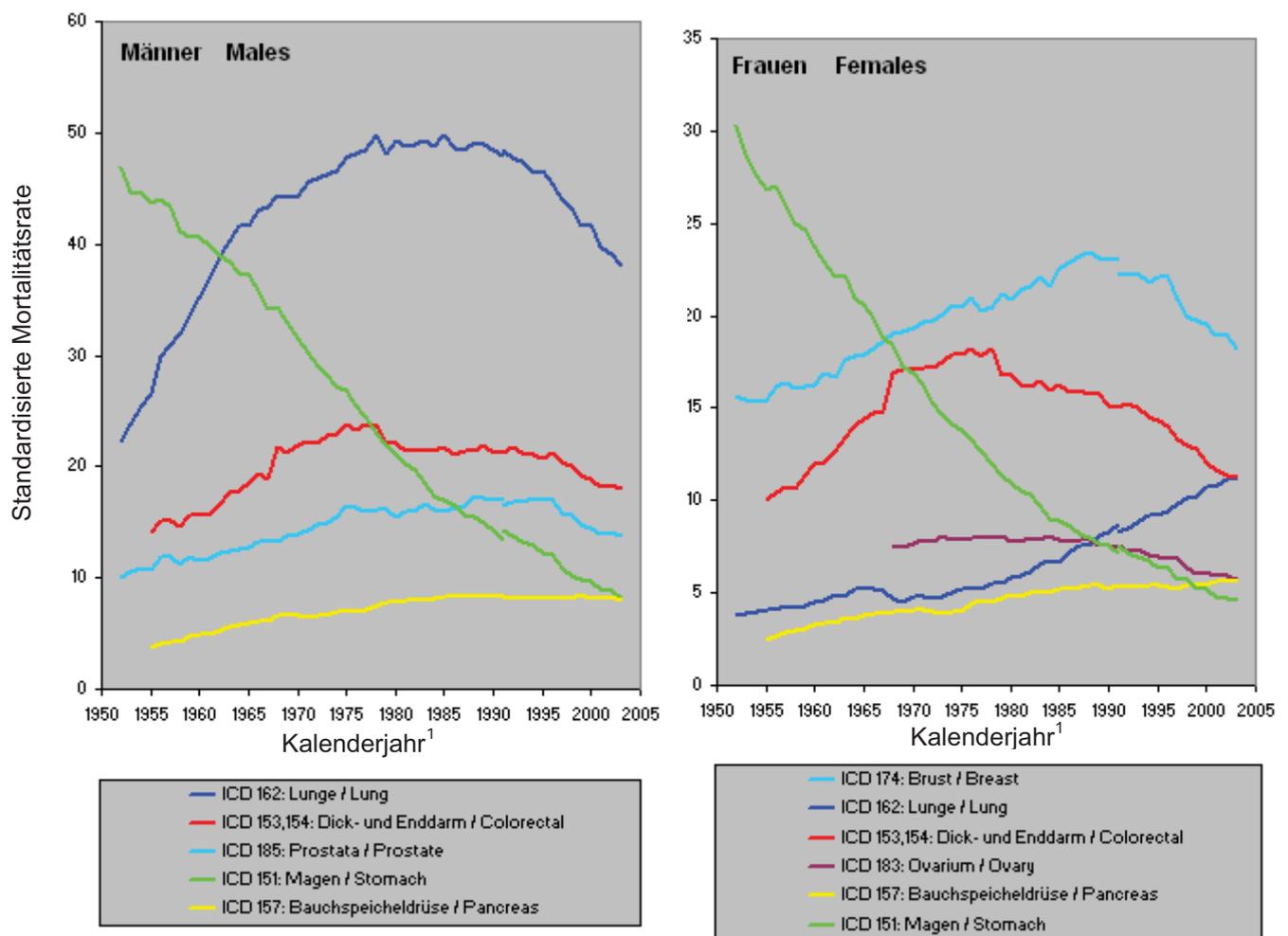


Abbildung 1.1.1: Verlauf der standardisierten Mortalitätsrate der verschiedenen malignen Erkrankungen im Zeitraum von 1950 bis 2005. Vor 1990 beziehen sich die Daten ausschließlich auf Westdeutschland, nach 1990 auf Deutschland (Deutscher Krebsatlas, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg).

### 1.1.3 Tumorarten und deren Einteilung

Die histologische Klassifikation der Lungentumore wurde zuletzt 2004 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) revidiert (Travis *et al.* 2004).

Diese WHO-Klassifikation unterscheidet bei den bösartigen epithelialen Neubildungen neben kleinzelligen Karzinomen unter anderem folgende Hauptgruppen nicht-kleinzelliger Karzinome: Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, großzellige Karzinome und adenosquamöse Karzinome.

Karzinome des bronchioalveolären Epithels gehen von unreifen Progenitorzellen des bronchioalveolären Epithels aus. Das Plattenepithelkarzinom entsteht auf dem Boden eines chronischen Schleimhautreizes durch inhalative oder infektiöse Noxen. Bei anhaltender Schädigung entwickelt sich eine Plattenepithelmetaplasie der Bronchialschleimhaut, welche über weitere dysplastische Veränderungen in einem invasiven Karzinom resultiert. Das Plattenepithelkarzinom entsteht meist in der Schleimhaut an den Verzweigungen der Segment- und Subsegmentbronchien. Charakteristisch ist sein langsames Wachstum und seine frühe Metastasierung in die regionalen Lymphknoten.

Das Adenokarzinom entsteht aus Schleim produzierenden Bronchialepithel und entwickelt sich bevorzugt in Narbengewebe (z.B. alter Tuberkulose). Der Tumor liegt meist in der peripheren Lunge. Auch ist eine frühe Metastasierung typisch, die sowohl über die Lymphbahnen, als auch über die Blutbahn bevorzugt in das Gehirn, die Leber und die Nebennierenrinde geschieht. Eine besondere Rolle spielt das bronchioloalveoläre Karzinom. Diese Sonderform, die ungefähr 1 bis 9% der untersuchten Lungenkarzinome ausmacht, wächst langsam und innerhalb der anatomischen Strukturen. Das bronchioloalveoläre Karzinom entsteht im Bereich der terminalen Bronchien und in Alveolen als solitärer, multizentrischer oder diffuser Tumor, der eine Pneumonie imitieren kann. Diese Karzinome leiten sich von Pneumozyten Typ 2

und/oder von Clara-Zellen ab. Im Gegensatz zu anderen Lungenkarzinomen besteht anscheinend kein Zusammenhang zu inhalativen Noxen.

Wie die nicht-kleinzelligen Tumore gehen auch die kleinzelligen Lungenkarzinome von unreifen Vorläuferzellen des bronchioalvolären Epithels aus und siedeln sich meist zentral im Bronchialsystem an. Frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung führt dazu, dass sich in der Regel schon vor seiner Entdeckung Metastasen, vorzugsweise im Gehirn, Knochen, Leber und Nebennierenrinde, gebildet haben. Aufgrund ihrer neuroendokrinen Differenzierung können die Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms Hormone bilden, die sich auf den Gesamtorganismus auswirken (sogenanntes endokrines paraneoplastisches Syndrom). Das kleinzellige Lungenkarzinom hat eine sehr schlechte Prognose und ist meist inoperabel. Die palliative Therapie der Wahl ist die Chemotherapie.

Die stadienhafte Ausdehnung eines Lungenkarzinoms ist in der TNM- Klassifikation festgelegt (Solbin und Wittekind 1997). Diese Ausdehnung wird nach folgenden Kriterien beurteilt:

1. Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T)
2. Befall der regionalen Lymphknoten (N= nodi lymphatici)
3. Nachweis von Fernmetastasen (M).

Die Einteilung des kleinzelligen Lungenkarzinoms erfolgt in der Regel nicht nach der TNM-Klassifikation. Man unterscheidet stattdessen zwischen extensive und limited disease.

#### **1.1.4 Entwicklung und Prognose**

Seit einigen Jahren ist eine Verlagerung der Tumorentwicklung in die Lungenmantelregion jenseits der Segmentbronchien mit einer gleichzeitigen Zunahme der Inzidenz von Adenokarzinomen zu beobachten (Kreuzer *et al.* 1999).

Diese Entwicklung wird als Folge der Einführung von Filterzigaretten, sowie von Tabakmischungen mit niedrigem Nikotin- und Teergehalt und dem dadurch resultierenden veränderten Rauchverhalten begründet. Einerseits wird der Zigarettenkonsum gesteigert und zusätzlich erlauben diese „leichten“ Zigaretten eine vertiefte Inhalation des Zigarettenrauchs, sodass es vermehrt zu einer chronischen Schädigung der Oberflächenepithelien des bronchiolo-alveolären Bereichs kommt (Thun *et al.* 1997, Osann 1998, Müller 1999).

Die Prognose bösartiger Lungentumoren ist bisher unverändert schlecht. Lungenkarzinome sind im frühen Stadium meist symptomlos und zeigen auch im weiteren Verlauf oftmals keine spezifischen Symptome. Erstes, aber bereits sehr spätes Symptom, ist der Husten (in 20-80% der Fälle). Weiterhin findet man Brustschmerz, Dyspnoe, Hämoptoe und Pneumonien. Die ebenfalls erst im fortgeschrittenen Stadium festzustellende sogenannte B-Symptomatik bei Malignomen bezeichnet Gewichtsverlust, Ermüdungserscheinungen und nächtliches Schwitzen. Die Diagnose erfolgt somit zumeist erst im fortgeschrittenem Stadium, sodass die Gesamtüberlebensrate unter 11% liegt (Parkin *et al.* 2001). Erschwerend kommt hinzu, dass die zunehmend peripher liegenden Tumoren mit den häufig angewandten diagnostischen Mitteln wie beispielsweise der Bronchoskopie schwer erreichbar sind.

### **1.1.5 Lungenkarzinom-Diagnostik und deren Problematik**

Die beschriebenen Entwicklungen verdeutlichen die gesellschaftliche und gesundheitspolitische Relevanz der Lungenkarzinom-Diagnostik und stellen die konventionellen bildgebenden, histologischen und zytologischen Verfahren vor große Herausforderungen.

Die Röntgen-Thoraxaufnahme in zwei Ebenen ist die Grundlage der Diagnostik. Sie erhärtet den Tumorverdacht oder löst weiterführende Maßnahmen aus. Periphere

Rundherde sind in bis zu 80% der Fälle maligne. Ein normaler Röntgenbefund schließt aber einen zentralen Lungentumor nicht aus, da dieser sich initial als geringfügige Hilusdeformität manifestieren kann. Schlecht zu erkennen sind vor allem Tumore der parakardialen und retrokardialen Region sowie zwerchfellnah gelegene Raumforderungen. Darüber hinaus lassen sich im konventionellen Thorax-Röntgenbild Knoten erst ab einer Größe von ca. 1,5 cm nachweisen (siehe Abbildung 1.1.5.1). Zumeist befindet sich der Tumor dann bereits in einem fortgeschrittenen Stadium und ist nicht mehr kurativ zu behandeln.

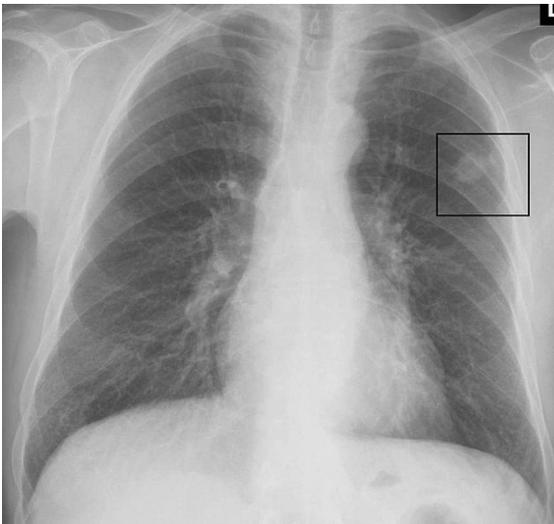


Abbildung 1.1.5.1: Konventionelles Röntgenbild des Thorax mit rundlicher Verdichtung in der linken Lunge

Im konventionellen CT werden Schichtdicken um 1cm gewählt. Kleinere Strukturen können übersehen werden und die Mittelung der Information führt zur Unschärfe. Es spielt bei der Beurteilung kleiner Tumore keine Rolle. Durch die 1992 eingeführte ebenfalls auf Röntgenstrahlen basierende Spiral Computer Tomographie wird eine bessere Auflösung erreicht und Knoten sind bereits ab einer Größe von 1-5mm nachweisbar. Nachteilig bei diesem Diagnoseverfahren ist, dass bei einer hohen Zahl von Hochrisikopatienten verdächtige Knoten festgestellt werden, die sich im weiteren Verlauf als nicht maligne herausstellen (Swensen *et al.* 2003, Henschke *et al.* 1999).

Besteht der Verdacht auf ein Lungenkarzinom, so werden zur histologischen Sicherung Biopsien und zur zytologischen Sicherung Bronchialaspirate und Bürstungen unter Anwendung der Bronchoskopie gewonnen. Eine bronchoskopische Ansicht eines Lungenkarzinoms ist in Abbildung 1.1.5.2 dargestellt.

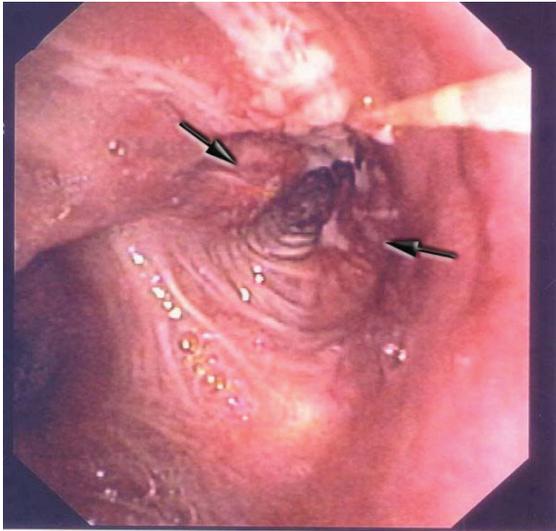


Abbildung 1.1.5.2: Bronchoskopische Ansicht eines Lungenkarzinoms im linken Oberlappenbronchus

Man unterscheidet eine flexible und eine starre Bronchoskopie. In der Regel wird zur Tumordiagnostik die flexible Technik angewendet, da sie für den Patienten weniger belastend ist und darüber hinaus Einblicke bis in den Subsegmentbronchus möglich sind. Dies ist wichtig, da Biopsien und Bronchialbürstungen nur von Gewebe genommen werden können, welche mit dem Bronchoskop erreichbar sind, wohingegen das durch eine Spülung der Bronchien (Bronchiallavage) gewonnene Bronchialaspirat abgeschilferte Zellen aus verschiedensten Bereichen der Lunge enthält. Somit ist grundsätzlich mit Hilfe des Bronchialaspirats eine zytologische Sicherung auch von peripher liegenden Lungentumoren prinzipiell möglich.

Ähnlich verhält es sich mit der in der Krebsvorsorge angewandten Sputumdiagnostik. Dieses weist ebenfalls ein vergleichbar großes Spektrum an Zellen aus der Lunge wie das Bronchialaspirat auf und kann nicht-invasiv gewonnen werden. Jedoch sind 28% aller Proben technisch unzureichend, da sie keine Zellen aus den tieferen Atemwegen enthalten. Somit hängt die Sensitivität für die sputumzytologische Diagnose

eines Lungenkarzinoms auch von der Zahl der untersuchten Proben ab. Sie beträgt bei drei zureichenden Sputen 85% bei einer Spezifität von 99,5%, was bedeutet, dass mit 0,5% falsch positiven Diagnosen zu rechnen ist. Zentrale und fortgeschrittene Lungenkarzinome sind mit dieser Methode besser diagnostizierbar als periphere und frühe (Böcking *et al.* 1992).

Falls sich der verdächtige Bereich außerhalb der Reichweite des Bronchoskops befindet und durch die zytologische Begutachtung der Bronchiallavage keine eindeutige Diagnose möglich ist, kann perkutan der Lungenmantelregion eine Feinnadelbiopsie durchgeführt werden. Diese diagnostische Möglichkeit zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität (99% bzw. 94%) aus (Böcking *et al.* 1995).

Von entscheidender Bedeutung ist jedoch nicht nur die Diagnose der Krebserkrankung, ihrer Art und Ausbreitung, sondern insbesondere auch der Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Wie bereits eingangs erläutert, werden Raumforderungen aufgrund der langen symptomlosen Phase der Erkrankung häufig erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium entdeckt und untersucht. Auch bei Patienten mit bereits bestehendem klinischen Verdacht auf ein Lungenkarzinom ist die morphologische Tumorsicherung oft schwierig. Vor allem bei den kleinen und zunehmend häufiger werdenden peripheren Herden weisen die bislang zur Verfügung stehenden konventionellen zytologischen Techniken eine unbefriedigende Sensitivität auf (Schreiber *et al.* 2003). Infolgedessen wird bei mehr als 30% der Patienten mit einem Lungenkarzinom die Tumordiagnose erst nach mehrfacher Bronchoskopie und / oder zusätzlicher Punktion gestellt. Bei jedem 10. Lungenkarzinom muss sogar ohne vorherige morphologische Tumorsicherung operiert werden.

Die Entwicklung neuer Verfahren für eine treffsichere Lungenkarzinomdiagnostik mit möglichst frühzeitiger Diagnosestellung ist somit dringend erforderlich.

## 1.2 Biomarker zur Diagnose von Lungenkarzinomen

Ein molekularer Biomarker ist als eine (epi-)genetische Veränderung zu verstehen, deren Nachweis für die Krebsdiagnostik genutzt werden kann. Die Grundlage für die Entwicklung solcher Biomarker bilden die inzwischen immer umfangreicheren Kenntnisse der molekularen Genetik und Epigenetik bösartiger Lungentumore.

Im Idealfall sollte ein Biomarker in nicht- bzw. minimal-invasiv gewonnenem Untersuchungsmaterial nachweisbar sein und möglichst keine die üblichen Routineabläufe störenden Anforderungen stellen. Für das Lungenkarzinom eignen sich daher insbesondere Sputen, Bronchialsekrete und Bronchialbürstungen als Untersuchungsmaterial, welches bei Verdacht auf einen bösartigen Lungentumor mit der routinemäßig angewendeten Bronchoskopie gewonnen werden kann. Die Bearbeitung und Auswertung der molekularbiologischen Analysen sollte kostengünstig und schnell erfolgen können. Der Biomarker sollte sowohl kleinzellige als auch nicht-kleinzellige Lungenkarzinome detektieren, idealerweise mit einer den Tumortyp kennzeichnenden Signatur. Um eine hohe Sensitivität und Spezifität zu gewährleisten, sollten die als Biomarker verwendeten genetischen Alterationen bei Tumorpatienten eine hohe Prävalenz aufweisen, bereits im Frühstadium der Tumorerkrankung nachweisbar sein und bei Patienten ohne Tumorerkrankung nicht auftreten.

### 1.2.1 Mutationen als Biomarker

In den 90er Jahren wurde mit dem Einsatz der Molekulargenetik versucht, geeignete Tumormarker zu entwickeln. Dabei richtete sich das Augenmerk auf Veränderungen der Gensequenz, sogenannte Mutationen. Die Verfahren verwendeten in der Regel mehrere hintereinander geschaltete PCR-Schritte und waren dadurch hochsensitiv, allerdings in der Durchführung auch sehr aufwendig (Behn *et al.* 2000, Clayton *et al.* 2000, Mills *et al.* 1995, Somers *et al.* 1999, Yakubowskaya *et al.* 1995). Hinzu

kommt, dass bei diesen Verfahren bekannte Mutationen in sogenannten Hot-Spot Regionen nachgewiesen werden, sodass ein Gen nur punktuell untersucht werden kann. Häufig handelt es sich jedoch um unbekannte Mutationen im kodierenden Bereich. Krebs ist eine Erkrankung, die zwar durch dynamische Veränderungen im Genom gekennzeichnet ist, aber die Progression der Alterationen verläuft nicht unbedingt linear (Hanahan und Weinberg 2000, Barrett *et al.* 1999). Ein erweitertes Screening nach Mutationen ist mit einem unangemessenem Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand verbunden. Für die molekulargenetische Tumordiagnostik bedeutet dies, dass einzelne genetische Alterationen nicht beweisend für Krebs sein müssen, und dass die Bandbreite der Alterationen sowohl in Abhängigkeit vom Tumortyp als auch von Patient zu Patient sehr variabel sein kann. Um bösartige Lungentumoren mit hinreichender Spezifität und Sensitivität zu diagnostizieren, ist somit unter Umständen eine Kombination einer Vielzahl verschiedener molekulargenetischer Biomarker notwendig.

## **1.2.2 Aberrante Promotor-Methylierungen als Biomarker**

### **1.2.2.1 Grundlagen der Epigenetik und DNA-Hypermethylierung**

Eine Möglichkeit aufwendige Verfahren zum Nachweis unbekannter Mutationen zu umgehen, besteht in der Nutzung der immer mehr ins Interesse gerückten Epigenetik als Quelle für die Biomarkerentwicklung. Der Begriff Epigenetik umschreibt die Untersuchung von vererbbaaren Änderungen des Expressionspotentials von Genen, die nicht durch die Änderungen der DNA-Sequenz verursacht werden.

Ein epigenetisches Phänomen ist die DNA-Methylierung. Voraussetzung für eine DNA-Methylierung ist ein auf das Cytosin in der Basensequenz folgendes Guanin (CpG-Dinukleotid).

Im menschlichen Genom sind physiologischerweise ca. 80% der CpG-Dinukleotide stark methyliert. Es handelt sich hierbei um repetitive Sequenzen wohingegen einige CpG-reiche Bereiche, typischerweise in Genpromotoren, unmethyliert bleiben (Bird *et al.* 1986). Nahezu die Hälfte der bekannten Gene haben unmethylierte CpG-reiche Bereiche in Promotor-Regionen und im ersten Exon (Jones and Laird 1999, Bird 2002).

Epigenetische Alterationen bewirken eine erbliche, d.h. auf Tochterzellen übertragbare Änderung der Genexpression, wobei anders als bei genetischen Veränderungen die Nucleotid-Sequenz erhalten bleibt (Holliday 1989).

Eine bekannte epigenetische Alteration ist die DNA-Hypermethylierung (Jones und Baylin 2002, Zöchbauer-Müller *et al.* 2002). 5-Methylcytosin entsteht durch eine enzymatische Reaktion, bei der eine Methylgruppe ( $\text{CH}_3$ ) auf das fünfte Kohlenstoffatom eines Cytosins übertragen wird (Szyf 1996). Wesentlich für diese Reaktion sind die DNA-Methyltransferasen (DNMT) 1,3a und 3b (Attwood *et al.* 2002). Eine detaillierte Darstellung der Reaktion findet sich in Abbildung 1.2.2.1.

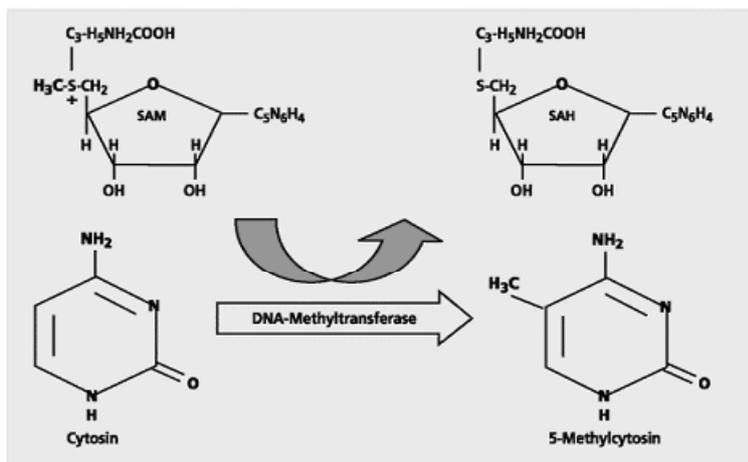


Abbildung 1.2.2.1: Methylierung von Cytosin: Durch die DNA-Methyltransferase wird eine Methylgruppe von dem Methyl-Donor, S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf Cytosin übertragen und es entsteht 5-Methylcytosin und S-Adenosylhomocystin (SAH) (Bastian *et al.* 2004).

### 1.2.2.2 Funktion der DNA-Methylierung und deren Nutzung als Biomarker

Beim epigenetischen Phänomen der DNA-Methylierung besteht für viele Gene eine negative Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression. Somit ist bei einer Methylierung von CpG-Dinukleotiden der Promotorregion mit einer Inaktivierung des nachgeschalteten Gens zu rechnen, was mit einer Transkriptionshemmung assoziiert ist (Dörfler 1983).

Das epigenetische Phänomen der DNA-Methylierung spielt als physiologischer Vorgang beispielweise bei der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in der weiblichen Zelle zur Gen- Dosis Regulierung (Pfeifer *et al.* 1989, Riggs und Pfeifer 1992) , oder beim genomischen Imprinting („elterliche Prägung“) eine Rolle (Li *et al.* 1993, Tremblay *et al.* 1995). Die Methylierung von DNA wirkt sich außerdem auf die zeitliche Regulierung der DNA-Replikation und der Chromatinstruktur aus (Antequera *et al.* 1990, Keshet *et al.* 1986).

Neben der physiologisch vorkommenden Hypermethylierung ist im Zuge der Krebsforschung die Promotor-Methylierung von Tumorsuppressorgenen ins Zentrum des Interesses gerückt. So wurde entdeckt, dass beim Vorliegen einer Krebserkrankung aberrante Promotor-Methylierungen an sonst unmethylierten Promotoren von Tumorsuppressorgenen häufig sind und einen Hauptmechanismus der Inaktivierung von diesen darstellen (Esteller *et al.* 2001, Grote *et al.* 2003 a), Virmani *et al.* 2002, Zöchbauer-Müller *et al.* 2002).

Viele zelluläre Abläufe wie DNA-Reparatur-Mechanismen, Zellzyklus, Apoptose, Zelladhärenz oder Detoxifikation können von der Inaktivierung durch aberrante Promotor-Methylierung betroffen sein (Esteller 2002).

Die Identifizierung von krankheitsspezifischen Methylierungsmustern könnte die Grundlage für diagnostische Biomarker liefern. Da es sich dabei um eine epigeneti-

sche Veränderung handelt, bleibt die DNA-Sequenz unverändert. Darüber hinaus sind epigenetische Veränderungen lokostationär und ermöglichen dadurch einen Nachweis mit hoher Sensitivität. Eine hohe Sensitivität ist eine Grundvoraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methode, da bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials in Form von Sputen, Bronchialsekreten und Bürstungen meist nur eine geringe Anzahl von Tumorzellen bei gleichzeitig großem Überschuss von Nicht-tumorzellen vorliegt.

In der pulmonalen Zytologie finden üblicherweise alkoholhaltige Fixativa, wie das Saccomanno-Fixativ, Verwendung. Dies bedeutet für molekulargenetische Untersuchungen auf genomischer DNA-Ebene gegenüber der in der Histopathologie meist verwendeten Formalinfixierung einen erheblichen Vorteil. Formalin zeigt eine vielfältige chemische Interaktion mit der DNA (Grote *et al.* 2003 b, Srinivasan *et al.* 2002), wohingegen die Alkoholfixierung lediglich zu einer bei Rehydrierung reversiblen Kollabierung der DNA führt. Nach ihrer Extraktion bleibt sie in ihrem hochmolekularen, chemisch unmodifizierten Zustand erhalten.

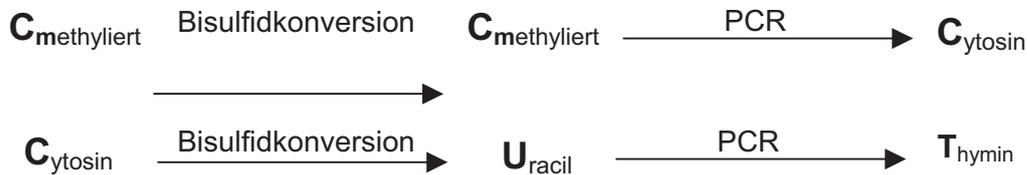
### **1.3 Nachweis von epigenetischer DNA-Alterationen durch Hypermethylierung**

#### **1.3.1 Bisulfitkonversion**

Epigenetische Veränderungen bewirken keine Änderung der DNA-Sequenz, sodass zu ihrem Nachweis die DNA chemisch modifiziert werden muss. Dies geschieht bei der sogenannten Bisulfitkonversion. Dabei werden unmethylierte Cytosin-Reste zu Uracil desaminiert, wohingegen 5-Methyl-Cytosin chemisch unmodifiziert bleibt (Frommer *et al.* 1992). Uracil wird in der nachgeschalteten PCR als Thymin abgelesen. Auf diese Weise kommt es zu einer vom Methylierungs-Status abhängigen Sequenzänderung, die im PCR-Endprodukt abgelesen werden kann (Herman *et al.*

1996)(siehe Abbildung 1.3.1). Die Bisulfitkonversion schafft somit die Voraussetzung für die anschließende methylierungs-spezifische PCR (Polymerase Chain Reaction).

a)



b)

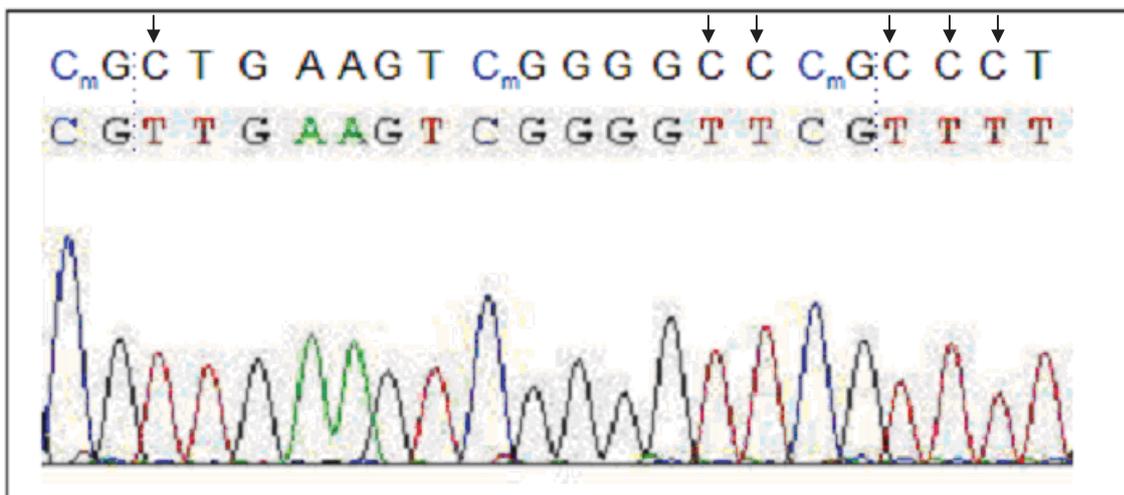


Abbildung 1.3.1: (a) Schematische Darstellung der Umwandlung von unmethyliertem Cytosin ( $C_{\text{tosin}}$ ) über Uracil zu Thymin. 5-Methylcytosin ( $C_{\text{methyliert}}$ ) liegt nach Bisulfitkonversion und PCR chemisch unmodifiziert als Cytosin vor. (b) Ausschnitt aus einer Primersequenz (oben). Die untere Sequenz stellt das Ergebnis der Sequenzanalyse nach Bisulfitkonversion und Klonierung der DNA dar. Die mit den Pfeilen gekennzeichneten unmethylierten Cytosine der Primersequenz wurden desaminiert und als Thymin abgelesen. Somit kommt es zu einer vom Methylierungs-Status abhängigen Sequenzänderung.

### 1.3.2 Konventionelle PCR

Die PCR ist ein Verfahren, das die Amplifikation von DNA - Abschnitten im Erbmateriale ermöglicht. Die DNA liegt normalerweise doppelsträngig vor und wird zu Beginn des Prozesses durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Am Anfang und am Ende des zu amplifizierenden Abschnitts werden Primer gesetzt, welche eine zur DNA komplementäre Sequenz besitzen und auf Grund dessen an die vorbestimmten Stellen binden können (Annealing). Der dazwischen liegende DNA Ab-

schnitt wird mit Hilfe der DNA-Polymerase der jeweils komplementäre DNA Strang synthetisiert (Elongation). Dieser derart gebildete Doppelstrang wird durch Erhöhung der Temperatur wieder getrennt (Denaturierung). Damit sind die Bindungsstellen für die Primer erneut frei und der Vorgang kann nach dem Absinken der Temperatur erneut starten. Nun liegt die doppelte Anzahl der DNA Abschnitte vor. Durch häufiges Wiederholen dieses Vorganges wird eine exponentielle Vervielfältigung (Amplifizierung) dieses DNA Abschnitts erreicht. Die entstandenen DNA Abschnitte (Amplifikate) können durch verschiedene weitere Methoden sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

### **1.3.3 Quantitative methylierungs-spezifische PCR (QMSP)**

Die QMSP-Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR. Das bedeutet, dass der exponentielle Anstieg der Amplifikate während der PCR-Reaktion „live“ über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen verfolgt und quantifiziert werden kann. Zum PCR-Ansatz wird neben den spezifischen Primern auch eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugegeben (Holland *et al.* 1991). Damit die Sonde nicht als Primer fungieren kann, ist sie am 3'-Ende durch eine Phosphatgruppe blockiert. Darüber hinaus ist sie am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert. Wenn die intakte Sonde durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird, wird die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zu dem Quencherfarbstoff unterdrückt (sog. Fluoreszenz-Energietransfer, FRET). Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die lange Zeit unbeachtete Eigenschaft der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase zerschnitten. Durch die Hydrolyse der Sonde wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und der Reporterfarbstoff kann das Fluoreszenzlicht emittieren.

ren. Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs ist in Abbildung 1.3.3 a dargestellt. Eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität kann nur dann erfolgen, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz kommt. Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragments steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional (Busch *et al.* 2007). Die Abbildung 1.3.3 b zeigt einen Ausdruck eines QMSP-Laufes von  $p16^{\text{INK4a}}$ . Nach etwa 30 Zyklen weisen die Proben von Tumorpatienten eine exponentielle Signalvermehrung auf.

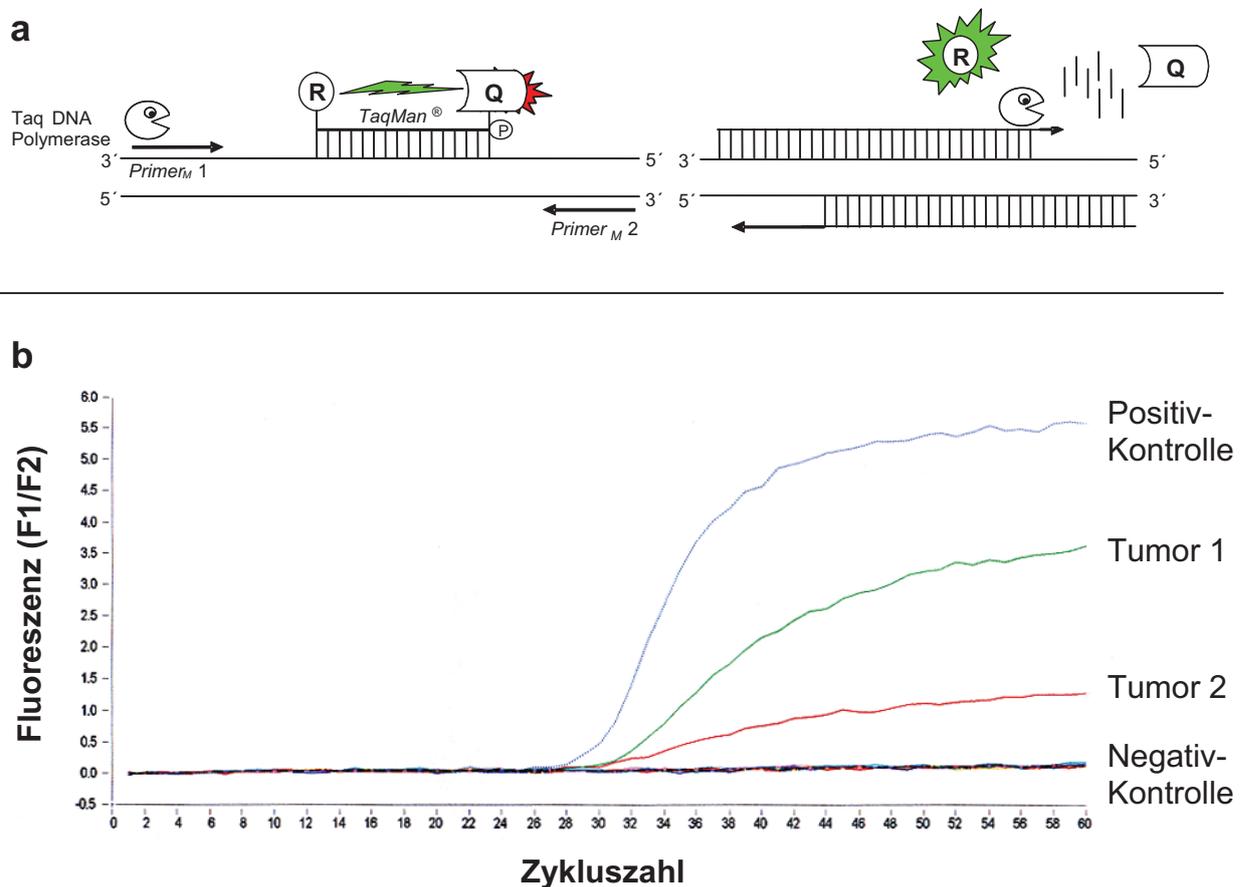


Abbildung 1.3.3 (a) Schematische Darstellung der Elongation in einem QMSP- Zyklus. Die Taq-DNA Polymerase synthetisiert in 3'-5' Richtung einen komplementären DNA-Strang. Gleichzeitig trennt sie durch Ihre 5'-3' Exonuklease-Aktivität die Sonde und unterbricht damit die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher. Daraufhin wird ein Fluoreszenzsignal emittiert. (b) Ausdruck eines QMSP-Laufes von  $p16^{\text{INK4a}}$ . Neben der Positiv- und Negativ-Kontrolle sind Fluoreszenzverläufe mit DNA von 2 verschiedenen Tumorpatienten (Tumor1/Tumor2) dargestellt. Aufgetragen wurde die Zykluszahl gegen die Fluoreszenz der Sonde

Diese von Eads und Mitarbeitern entwickelte quantitative methylierungs-spezifische PCR hat sowohl die Sensitivität, als auch im besonderen die Spezifität gegenüber der konventionellen PCR verbessert (Eads *et al.* 2000). Diese Verbesserung gelingt durch die Verwendung von 2 Primern und einer zusätzlichen Sonde. Darüber hinaus ist mit der QMSP eine Quantifizierung des Methylierungsnachweises möglich, sodass theoretisch ,falls nötig, ein Schwellenwert in der Auswertung verwendet werden kann.

#### 1.4 $p16^{\text{INK4a}}$

Die mittels QMSP feststellbaren aberranten Methylierungen in Promotor-Regionen wurden bei einer Reihe von Tumorsupressor-Genen beim Vorliegen eines bösartigen Lungentumors nachgewiesen. Erstmals wurde der Zusammenhang zwischen aberranter Promotormethylierung und Inaktivierung von Tumorsupressorgenen in der Krebsentstehung 1995 bei  $p16^{\text{INK4a}}$  erkannt (Merlo *et al.* 1995, Herman *et al.* 1995, Gonzalez-Zulueta *et al.* 1995).

Bei dem von der INK4a-Region auf Chromosom 9p21 kodierten Tumorsupressorgen handelt es sich um einen Regulator des Zellzyklus. Das  $p16^{\text{INK4a}}$ -Genprodukt ist ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4), welches die Serin bzw. Threonin-Reste des Retinoblastoma-Proteins phosphoryliert (Sherr 1994, Weinberg 1995). Durch Erhaltung des Retinoblastoma-Proteins in einem unphosphorylierten Zustand verhindert  $p16^{\text{INK4a}}$  den Übergang in die S-Phase und somit die Proliferation der Zelle.

Ist die Transkription des  $p16^{\text{INK4a}}$ -Gen durch aberrante Promotormethylierung inaktiviert, könnte dies zu einer Störung der Zellzyklus-Regulation führen und daraus abnormales Wachstum resultieren. Wäre der Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von einer Lungenkrebserkrankung und dieser Methylierung nachzuweisen, ergäbe

sich daraus die Möglichkeit,  $p16^{INK4a}$  als molekularen Biomarker in der Lungenkrebsdiagnostik zu nutzen.

### 1.5 Ziel der Arbeit

Die niedrige Gesamt-Überlebensrate von weniger als 11% macht das Lungenkarzinom zum führenden Grund krebsbedingter Todesfälle in den Industrienationen. Weltweit erkranken jedes Jahr mehr als 1,2 Millionen Menschen an bösartigen Lungentumoren (Parkin *et al.* 2001). Die Diagnose erfolgt aufgrund der späten Symptomatik zumeist erst im fortgeschrittenem Stadium. Nicht selten sind bis zur endgültigen Diagnose eines Lungenkarzinoms mehrere invasive Untersuchungen erforderlich, die für den Patienten belastend sind. Vor allem bei den zunehmend häufiger werdenden peripheren Lungenkarzinomen ist die Sensitivität der bisher angewandten histo- und zytomorphologischen Untersuchung bislang unbefriedigend (Schreiber und McCrory 2003).

Aus den immer weiter reichenden Erkenntnissen der Epigenetik und der Entdeckung des Zusammenhangs zwischen Hypermethylierung von Promotorregionen bestimmter Gene und dem Vorliegen einer bösartigen Entartung, ergibt sich die Möglichkeit Methylierung als einen lokostationären und in Alkohol stabilen Biomarker zu nutzen. In Kombination mit hochspezifischen und sensitiven Nachweis-Verfahren wie z.B. der quantitativen methylierungs-spezifischen PCR erhofft man sich die Möglichkeit, eine Krebsdiagnose zu einem sehr frühen Zeitpunkt stellen zu können und gleichzeitig eine molekulare Klassifizierung des Tumors. Die Entwicklung eines molekularbiologischen Tests würde nicht nur eine ideale Ergänzung zur Diagnostik darstellen, sondern könnte sowohl die Zahl der Wiederholungsbronchoskopien als auch die Notwendigkeit weiterer invasiver Untersuchungen senken. Darüber hinaus würden, auf-

grund der Möglichkeit, den Test an zytologischem Restmaterial durchzuführen, keine zusätzlichen Untersuchungen notwendig und der übliche Routineablauf nicht gestört. Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem epigenetischen Phänomen der aberranten Hypermethylierung der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotorregion. Das Ziel der Arbeit war, die Prävalenz dieser epigenetischen Alterationen in Bronchialaspiraten mittels QMSP zu bestimmen und ihre Eignung als Tumormarker zur Verbesserung der Diagnose von Lungenkarzinomen zu überprüfen. Die Sensitivität und Spezifität der Methylierung der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotorregion in Bronchialaspiraten zum Nachweis von Tumorzellen wurde unter Berücksichtigung der zytologischen Diagnosegruppen und histologischen Subtypen in einem Fall-Kontroll-Studiendesign untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Das Kollektiv

Im Fall-Kontroll-Studien Design wurden Bronchialsekrete, Bronchiallavagen und bronchoalveoläre Lavagen, im folgenden zusammenfassend als Bronchialaspirate bezeichnet, von insgesamt 168 Patienten mit primären Lungenkrebs und 59 Patienten mit benignen Lungenkrankheiten retrospektiv betrachtet.

Alle Patienten hatten sich zum Ausschluss oder Nachweis einer malignen Erkrankung einer Bronchoskopie zwischen dem 02.07.2001 und dem 23.06.2003 unterzogen. Die Gruppe mit malignen Tumoren bestand aus 48 weiblichen und 120 männlichen Patienten im Alter zwischen 41 und 89 Jahren und einem Durchschnittsalter von 65 Jahren. In Abbildung 2.1 ist die Geschlechterverteilung bei Tumorpatienten gegenüber Nicht-Tumorpatienten graphisch dargestellt.

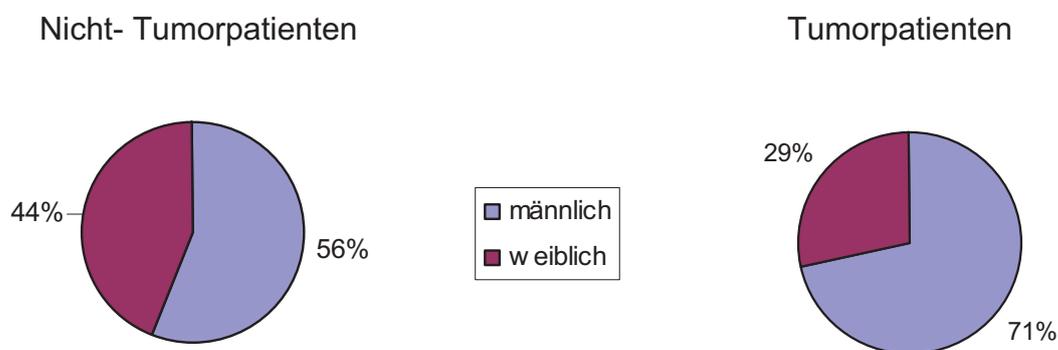


Diagramm 2.1: Geschlechterverteilung bei Nicht-Tumorpatienten und Tumorpatienten in %

Die Tumortypisierung erfolgte gemäß den Richtlinien der internationalen histologischen Klassifikation der WHO bezüglich Lungentumoren (Travis *et al.* 2004) unter Verwendung von zytologischen und histologischen Untersuchungsergebnissen. Die histologischen Subtypen beinhalteten 53 Adenokarzinome, 52 Plattenepithelkarzi-

nome, 25 andere nicht-kleinzellige Karzinome (NSCLC<sub>others</sub>, other non-small cell lung cancers), 37 kleinzellige Karzinome (SCLC, small cell lung cancer) und ein kombiniertes kleinzelliges Karzinom. 11 Patienten hatten ein Tumorrezidiv.

Die Kontrollgruppe umfasste 59 Nicht-Tumorpatienten, wobei von 2 Patienten zusätzlich ein zweites Bronchialaspirat mit in die Studie einbezogen wurde. Sie umfasste 33 Männer und 26 Frauen im Alter zwischen 24 und 80 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 60 Jahre. In der Kontrollgruppe wurden folgende Erkrankungen diagnostiziert: Akute oder chronische Bronchitis (n = 37), Pneumonie (n = 12), interstitielle Lungenerkrankung (n = 5), Lungenembolie (n = 5), Asthma bronchiale (n = 4) und Tuberkulose (n = 1).

Die Informationen zu Alter, Geschlecht, Nikotinabusus und klinisch-pathologischem Staging gemäß UICC TNM Classification of Malignant Tumors wurden aus Patientenakten der Klinik für Pulmologie, Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf, sowie den Datenbanken des Instituts für Cytopathologie, Universitäts-Klinikum Düsseldorf und dem Instituts für Pathologie, Ev. Krankenhaus Bethesda, Duisburg, entnommen (siehe Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Klinisch-Pathologische Daten des Untersuchungskollektivs

	<b>NT-Pat.</b> (n = 59)	<b>Tu-Pat.</b> (n = 168)
<b>Alter</b> <sup>a</sup>	60 (24-80)	65 (41-89)
<b>Geschlecht</b>		
weiblich	26	48
männlich	33	120
<b>Pack-years</b> <sup>b</sup>	40,3 +/- 32,9	50,7 +/- 28
<b>Raucher Status</b> <sup>c</sup>		
Nicht-Raucher	15	8
Ex-Raucher	18	40
Raucher	21	106
Nie-Raucher	5	2
Nicht spezifiziert	-	12
<b>Tumorlokalisation</b>		
Zentral		45
Peripher		22
Nicht spezifiziert		101
<b>Stadium</b> <sup>c</sup>		
I		20
II		2
III		39
IV		45
Limited disease		8
Extensive disease		28
Nicht spezifiziert		26
<b>Histologie</b>		
Adenokarzinom		53
Plattenepithelkarzinom		52
Sonstiges nicht-kleinzelliges Karzinom		25
Kleinzelliges Karzinom		37
Kombiniertes kleinzelliges Karzinom		1

a Median (Spannweite)

b Mittel +/- SD

c Angaben zu Nikotinkonsum und Staging fehlen bei 12 bzw. 26 Patienten

## 2.2. Humane Zellkulturlinie T24 und ihre Kultivierung

Die für die Positivkontrolle verwendete Zelllinie T24 entstammt aus Zellen eines Urothelkarzinoms der Harnblase. Sie wurde von der American Type Cell Culture (ATCC) unter der ATCC Nr.: HTB-4 bezogen und nach Herstellerangaben wie nachfolgend beschrieben kultiviert.

Die Zelllinie wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit stabilisiertem Glutamin, 15% hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C in einer wasser-dampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wuchsen adhärent in 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit je 15 ml Medium. Sie wurden alle 2-5 Tage geteilt und mit frischem Medium versorgt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen kurz mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS, phosphate buffered saline) gewaschen und mit 3 ml Trypsin / EDTA (0,02% / 0,05%) für 2 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden vom Flaschenboden abgelöst und die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 12 ml frischem Medium inaktiviert. Je 3 ml Zellsuspension wurden in neue Kulturflaschen überführt und mit Medium auf 15 ml aufgefüllt.

Zum Anlegen von Gefrierkulturen wurden die Zellen nach der Behandlung mit Trypsin in 1 ml eiskalten FCS und 10% Dimethylsulfoxid suspendiert und in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren und für die Versuche gelagert. Die Stocklösungen wurden nach 24 Stunden bei -80°C in Stickstoff überführt. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde diese möglichst kurz aufgetaut und direkt in 10 ml Medium aufgenommen.

### 2.3 Geräte und Apparaturen

Tischzentrifuge 4515D	Eppendorf, Hamburg
Bio-Photometer®	Eppendorf, Hamburg
Light Cycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler Capillaries	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Vortex	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Perfect Blue Mini M	PEQLAB GmbH, Erlangen
Labor-pH-Meter 765	Knick, Berlin

---

UV-Leuchttisch TFX	Vilber Lourmat, Frankreich
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg

## 2.4 Färbungen, Lösungen und Puffer

### 2.4.1 Färbungen

#### Sacomanno-Fixativ

50% Ethanol

2% Polyethylenglycol 1500

60 mg/l Rifampicin

#### Papanicolaou Färbung:

Hämatoxylin nach Harris

Orange G,

Polychromlösung EA 65,

0,5%ige HCl Lösung,

Lithiumcarbonatlösung (3 Tropfen gesättigte  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ -Lösung auf 100 ml Aqua dest.)

Fixierlösung (50 ml 95% EtOH und 50 ml 95% Diethylether mischen)

### 2.4.2 Lösungen

#### Lösung für die Bisulfitkonversion nach Herman *et al.*

10 N NaOH → 4 g in 10 ml Aqua dest.

10 mM Hydrochinon → 0,055 g in 50ml Aqua dest.

3 M Natriumbisulfit pH 5,0 → 6,2 g in 20 ml Aqua dest.

pH-Wert mit 10 N NaOH auf pH 5.0 einstellen

Lösung für die QMSP (Mastermix)

Je 1,2 µl 10 pmol Primer Lösung (600 nM Endkonzentration)

1 µl 4 pmol TaqMan<sup>®</sup>-Sonde (200 nM Endkonzentration)

2 µl 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>

2 µl Light Cycler-Fast Start DNA Master Hybridization Probes

10,6 µl steriles Aqua dest.

**2.4.3 Puffer**Laufpuffer für Agarose-Gele (TBE-Puffer)

8,9 mM Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan

8,9 mM Borat

2 mM EDTA

5 x DNA Ladepuffer

2,5 mM Tris-HCl pH 8,0

50 mM EDTA pH 8,0

90% Glycerin

0,01% Bromphenolblau

0,01% Xylencyanol

**2.5 Molekularbiologische Kits**

Purgene DNA-Isolierungskit <sup>®</sup>	Gentra Systems, Minneapolis, MN.
Wizard DNA Purification Kit	Promega, WI, USA
Light Cycler-Fast Start DNA Master Hybridization Probes	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## 2.6 Oligonukleotide

Die für den Methylierungsnachweis benötigten Oligonukleotide und TaqMan<sup>®</sup>-Sonden wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bezogen. Die Stocklösungen wiesen eine Konzentration von 100 pmol/μl auf und wurden bei -20°C gelagert. Die benötigten Lösungskonzentrationen für den Mastermix (siehe 2.4.2 Lösung für die QMSP) wurden durch Verdünnung mit sterilem Aqua dest. erreicht.

10 pmol Primer Lösung → 20 μl 100 pmol Primer-Stocklsg. in 180μl Aqua dest.

4 pmol Sonde Lösung → 3 μl 100 pmol Sonden-Stocklsg. in 72μl Aqua dest.

Detaillierte Angaben zu den Primern, TaqMan<sup>®</sup>-Sonde, Hybridisierungstemperaturen,

Anzahl der CpGs und PCR-Fragmentlänge für *p16<sup>INK4a</sup>* finden sich in Tabelle 2.6.

Tabelle 2.6: Primersequenzen und TaqMan<sup>®</sup>-Sonden für *p16<sup>INK4a</sup>* und *Myogenic Differentiation Antigen1 (MYOD1)*. Für den Nachweis von Methylierung in Promotorenregionen verschiedener Gene wurden methylierungsspezifische Oligonukleotide und TaqMan<sup>®</sup>-Sonden konstruiert.

Gen-Promotor	Primer-Sequenz <sup>1</sup>	Annealing Temp.	Anzahl CpGs <sup>2</sup>	Größe [bp] <sup>3</sup>
<i>p16<sup>INK4a</sup></i>	F: 5'-TGG AGT <u>ITT</u> CGG <u>ITG</u> AIT <u>GGT</u> T-3' R: 5'-A <u>AC</u> A <u>AC</u> GCC CGC ACC TCC T-3'  TaqMan <sup>®</sup> : 5'-6FAM-ACC CGA CCC CGA <u>ACC</u> GCG-TAMRA-3'	58°C	7	70
<i>MYOD1</i>	F: 5'-CCA <u>ACT</u> CCA <u>AAT</u> CCC CTC TCT <u>ITA</u> T-3' R: 5'-TGA <u>TTA</u> <u>ATT</u> <u>TAG</u> <u>ATT</u> GGG <u>TTT</u> AGA GAA GGA-3'  TaqMan <sup>®</sup> : 5'-6FAM-TCC CTT CCT <u>ATT</u> CCT <u>AAA</u> TCC AAC CT <u>A</u> <u>AAT</u> <u>ACC</u> TCC-TAMRA-3'	58°C	0	161

1. F = forward, R = reverse, unterstrichen sind durch die Bisulfitkonversion modifizierte Basen

2. Anzahl der durch die drei Oligonukleotide abgedeckten CpG-Dinukleotide

3. Fragmentgröße des zu erzeugenden PCR-Produktes, bp = Basenpaare.

## 2.7 Sonstige Chemikalien

Agarose SeaKem LE

Biorad, München

Bromphenolblau (BPB)

Pharmacia Biotech, Schweden

DNA- Größenmarker

Invitrogen, Karlsruhe

---

Fetales Kälberserum	Seomed Biochrom, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Xylencyanol (XC)	USB, Ohio, USA
Zellkulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.8 Zytologische Diagnostik

### 2.8.1 Vorbehandlung und Aufarbeitung

Das bronchiale Material wurde unmittelbar nach der Bronchoskopie in 50 ml Röhrchen eingebracht und mit 20 ml Saccomanno-Fixativ versetzt (Saccomanno *et al.* 1963). Nach Ankunft im Labor des Institutes für Cytopathologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, wurden die Röhrchen 5 Minuten bei 670 x g zentrifugiert. Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette das Sediment aufgenommen und je einen Tropfen auf insgesamt 4 Objektträger gegeben. Durch einen weiteren flach aufgelegten Objektträger wurde das Material durch Ausstreichen in verschiedene Richtungen gleichmäßig verteilt. Die so präparierten Objektträger wurden gut getrocknet und nach Papanicolaou-Färbung mikroskopisch befundet.

Das übrige Material wurde für die anschließende molekularbiologische Diagnostik (siehe Kapitel 2.10) in 1,5 ml Röhrchen gegeben, in Saccomanno-Fixativ resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.8.2 Einteilung in zytologische Diagnosegruppen

Die konventionelle zytologische Begutachtung, einschließlich der semiquantitativen Bestimmung der Tumorzellzahl, erfolgte an vier zytologischen Ausstrichpräparaten. Die Untersuchung erfolgte mittels eines Lichtmikroskops in verschiedenen Vergröße-

rungsstufen. Der zytologische Befund wurde auf der Grundlage der Tumorzellzahl in verschiedene Untergruppen unterteilt:

1. „negativ“ – keine abnormen oder verdächtigen Zellen
2. „zweifelhaft“ – wenige abnorme Zellen
3. „dringend verdächtig“ – zahlreiche abnorme oder wenige atypische Zellen
4. „positiv“ – Tumorzellen nachweisbar

Ein zytologisch Tumorzell- positives Ergebnis wurde in zwei weitere Untergruppen unterteilt.:

- 4a) „Tu+“ – wenige Tumorzellen oder kleine Tumorzellgruppen in bis zu drei verschiedenen Regionen
- 4b) „Tu++“ – große Tumorzellgruppen oder multiple Tumorzellen als einzelne Tumorzellen oder Tumorzellgruppen in mehr als 3 Regionen

Nach Abgleich der zytologischen Befundung der Bronchialaspirate mit dem jeweils korrespondierenden histologischen Untersuchungsergebnis konnte die Einteilung noch um folgende zytologische Diagnosegruppen erweitert werden:

5. „richtig negativ“ – negative Zytologie bei im klinischen Verlauf negative Histologie
6. „falsch negativ“ – negative Zytologie bei im klinischen Verlauf positiver Histologie

## 2.9 Molekularbiologische Diagnostik

### 2.9.1 DNA-Extraktion

Bei der DNA-Extraktion wurde durch Aussalzen der Proteine eine Reinigung der DNA erreicht. Die Isolierung der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Gentra Systems Purgene DNA-Isolierungskit® (Gentra Systems, Minneapolis, MN).

Die Proben wurden bei 3000 U/min fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 50 µl des resuspendierten Materials nochmals fünf Minuten bei 8000 U/min zentrifugiert. Nach Zugabe von 250 µl Lysepuffer (Cell Lysis Solution®) und 2 µl Proteinkinase K (20 mg/ml) wurden sie bei 65°C 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Die auf Zimmertemperatur abgekühlten Proben wurden mit 100 µl Protein Precipitation Solution® versetzt und 20 Sekunden gut vermischt. Nach erneuter 5 minütiger Inkubation bei 5 °C wurden die ausgesalzenen Proteine 3 Minuten bei 16000 U/min abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Röhrchen eingebracht und 300 µl 100%igen Isopropanol hinzu gegeben. Durch mehrmaliges Wenden der Probe wurden die Komponenten vermischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen und anschließend 5 Minuten bei 16000 U/min zentrifugiert.

Das DNA Pellet wurde nach Verwerfen des Überstands mit 70%igen EtOH abgewaschen und getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl DNA-Hydration solution entweder eine Stunde bei 65°C oder über Nacht im Kühlschrank rehydriert. Die DNA-Ausbeute wurde anschließend photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.9.2).

### 2.9.2 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung

Die DNA-Ausbeute bronchialer Sekrete ist sehr variabel. Dieses ist hauptsächlich der unterschiedlichen Zellularität der Einzelproben zuzuschreiben (Grote *et al.* 2003). Die

Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde mittels Photometer (Eppendorf Bio-Photometer®) bei 260nm und 280nm ermittelt. Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht der optischen Dichte (OD) einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook and Russel 2001). Der DNA-Gehalt pro Teilprobe wurde durch Multiplizieren der DNA-Konzentration mit der endgültigen Menge des DNA-Extraktes ermittelt.

Der DNA-Reinheitsgrad wurde als Quotient von OD 260/ OD 280 geschätzt. Bei Werten zwischen 1,8 – 2,0 hat die Probe den nötigen Reinheitswert.

### **2.9.3 Durchführung der Bisulfitkonversion**

Die Bisulfitkonversion diente dem Nachweis epigenetischer DNA-Alterationen durch aberrante Methylierung von Cytosinen in CpG-Dinukleotiden. Da aberrante DNA-Methylierungen keine Alteration der DNA-Sequenz bewirken, musste zu ihrem Nachweis die DNA zunächst mit Bisulfit behandelt werden (Herman *et al.*1996). In Kapitel 1.3.1 wurde das Prinzip dieses Verfahrens detailliert beschrieben.

Zur praktischen Durchführung der Bisulfitkonversion wurde 1µg der DNA-Probe mit 48,5 µl Aqua dest. und 1,5µl 10 N NaOH Lösung (0,3 M Endkonzentration) für 15 Minuten bei 37°C denaturiert. Dem 50 µl Reaktionsansatz wurden 30µl 10mM Hydrochinon und 520 µl 3 M Natriumbisulfitlösung zugesetzt. Das Ganze wurde kurz vermischt und anschließend 16 Stunden bei 50°C inkubiert. In Abbildung 2.9.3 ist die chemische Umwandlung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil dargestellt.

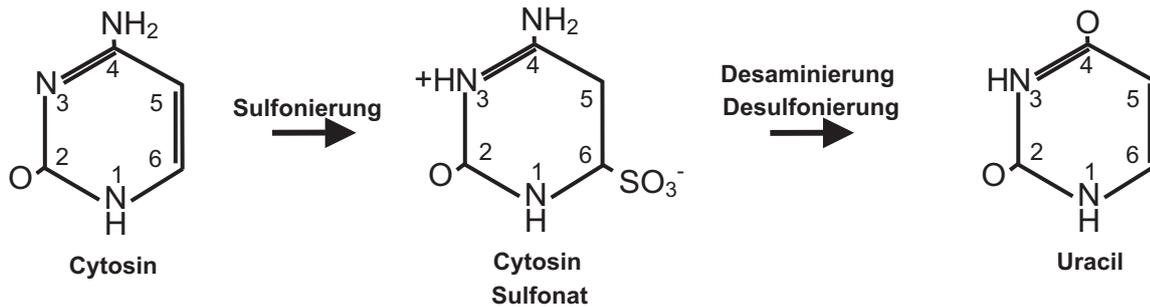


Abbildung 2.9.3: Bisulfitkonversion der DNA: Zunächst findet bei niedrigem pH-Wert und niedriger Temperatur eine reversible Sulfonierung von Cytosin zu Cytosin-6-sulfonat statt. Es kommt zu einer irreversiblen hydrolytischen Desaminierung von Cytosin-6-Sulfonat zu Uracil-6-sulfonat. Für diese Reaktionen sind höhere Konzentrationen an Natriumbisulfit günstig. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 5 und pH 6. Anschließend erfolgt die reversible Desulfonierung von Uracil-6-sulfonat zu Uracil bei hohem pH-Wert. Letzteres wird bei der PCR als Thymin abgelesen (Hajkova *et al.* 2002).

#### 2.9.4 Aufreinigung und Ethanol-fällung

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem Wizard DNA Purification Kit nach Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 1ml Bindepuffer versetzt und auf die Säulen gegeben. Danach wurden die Filter für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Mit 2 ml 80%igen Isopropanol wurde die DNA gewaschen, in 50  $\mu$ l sterilem Aqua dest. eluiert und nach Zugabe von 1,5  $\mu$ l 10 N NaOH Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die anschließende Ethanol-fällung diente dazu, DNA in weniger Lösung aufzunehmen (von 50  $\mu$ l  $\rightarrow$  20  $\mu$ l). Dazu wurde die Probe zunächst mit 30  $\mu$ l sterilem Aqua dest, 8  $\mu$ l 3M mit einem pH von 5,2 und 200  $\mu$ l 100%igen EtOH versetzt und gut vermischt. Anschließend wurden die Proben bei  $-25^{\circ}\text{C}$  für mindestens 2 Stunden inkubiert und danach 30 Minuten bei höchster Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA getrocknet und in 20  $\mu$ l sterilem Aqua dest. resuspendiert.

### 2.9.5 Durchführung der QMSP

Zur Bestimmung der Methylierung des Promotors von  $p16^{\text{INK4a}}$  wurde die quantitative methylierungs-spezifische PCR verwendet (siehe Kapitel 1.3.3). Bei dem für diese Versuchsreihe genutzten Gerät handelt es sich um einen LightCycler der Firma Roche Diagnostics (Abbildung 2.9.5).



Abbildung 2.9.5: LightCycler

Für die PCR wurde zunächst ein sogenannter Mastermix (siehe Kapitel 2.4.2 Lösung für die QMSP) vorbereitet. 2  $\mu\text{l}$  (entspricht 50ng) Bisulfit-konvertierte DNA wurde mit 18  $\mu\text{l}$  Mastermix in LightCycler Kapillaren gegeben, bei 3000rpm in einer Tischzentrifuge für ca. 10 Sekunden zentrifugiert und anschließend im LightCycler® repliziert. Die QMSP-Reaktion lief in verschiedenen Zyklensequenzen ab. Zunächst wurde eine primäre Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten durchgeführt. Anschließend folgten 60 Zyklen mit dem für  $p16^{\text{INK4a}}$  optimierten Temperaturen und Zeiten (Denaturierung 95°C/10sek; Hybridisierung 58°C/8sek; Elongation 72°C/10 sek). Das finale Abkühlen erfolgte bei 40°C für 30 Sekunden.

### 2.9.6 Auswertung der QMSP

Jede PCR wurde mit einer Negativ- und zwei Positivkontrollen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne DNA verwendet, bestehend aus Master Mix und sterilem Aqua dest.. DNA der Zelllinie T24 diente als Positivkontrolle. Als interne Referenz wurde das *Myogenic Differentiation Antigen 1 (MYOD1)* amplifiziert (Brabender *et al.* 2001). Die *MYOD1*-Primer binden in einer Region des *MYOD1*-Gens ohne CpG-Dinukleotide, das heißt an Sequenzen mit unmethyliertem Cytosin. Das bedeutet, dass durch ein *MYOD1*-positives PCR-Produkt der Erfolg der Bisulfitkonversion nachgewiesen werden konnte. Detaillierte Angaben zu Primern, TaqMan®-Sonden, Hybridisierungstemperaturen, Anzahl der CpGs und PCR-Fragmentlängen finden sich in Tabelle 2.6.

Die Auswertung der QMSP erfolgte sowohl qualitativ als auch quantitativ. Für die qualitative Auswertung wurden je 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl DNA Ladepuffer versetzt und auf einem 1,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, kann das Gel auf einem UV-Tisch ausgewertet werden. Die Einlagerung von Ethidiumbromid-Molekülen in die DNA bewirkte eine Änderung des Anregungsspektrums, sodass die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wurde. Auf diese Weise leuchteten im Agarosegel Nukleinsäuren hell auf. Durch den Vergleich mit einer DNA-Leiter konnte die Größe des PCR-Produkts überprüft werden. Das PCR-Produkt sollte für *MYOD1* 161 bp und für *p16<sup>INK4a</sup>* 70 bp betragen. Letzteres ist aufgrund seiner geringen Größe im konventionellen Agarosegel nicht differenzierbar, jedoch ermöglicht es den Nachweis von gegebenenfalls vorhandenen unspezifischer Banden.

Die Prävalenz einer *p16<sup>INK4a</sup>*-Hypermethylierung wurde mittels Kreuzpunktanalyse bestimmt. Hierbei wurden alle Werte  $> 0$  als positiv bewertet und im Folgenden als

Methylierungslevel definiert. Bei der sogenannten Methylierungsfrequenz wurde der prozentuale Anteil der Fälle, die auf den Marker positiv waren in Bezug zu der Gesamtzahl der Fälle bestimmt.

### **2.10 Statistische Auswertung**

Für den Vergleich der zentralen Tendenz zweier unabhängiger Stichproben wurde als verteilungsfreier Test der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Für den Vergleich einer beobachteten Häufigkeitsverteilung mit der theoretischen Häufigkeitsverteilung wurde der Chi-Quadrat Test herangezogen. Beide statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Das Signifikanzlevel wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Quantifizierung der Tumorzellen

Von 168 Patienten mit einer malignen Erkrankung der Lunge wurden 176 bronchoskopisch gewonnene Bronchialaspirate (Bronchialsekrete, Bronchiallavagen und bronchoalveoläre Lavagen) zytologisch aufbereitet und unter dem Lichtmikroskop untersucht. Der zytologische Befund wurde auf der Grundlage der Tumorzellzahl und in Korrelation zum abschließenden histologischen Ergebnis im Verlauf in verschiedene Untergruppen unterteilt. Positiver Befund mit hoher Anzahl von Tumorzellen (Tu++) und positiver Befund mit wenigen Tumorzellen (Tu+) im Bronchialaspirat, „dringender Verdacht“ (d.V.) und „zweifelhaft“ (zw.). Darüber hinaus wurden die Fälle mit falsch-negativer Zytologie einbezogen.

Bei der Analyse der Tumorzellzahl der Präparate in der diagnostischen Routine konnten in 25 von 176 Bronchialaspiraten von Tumorpatienten keine Tumorzellen oder Nester gefunden werden. Eine zytologisch falsch-negative Diagnose kann dadurch bedingt sein, dass keine Tumorzellen im Präparat vorhanden sind. Dieser sogenannte „Sampling Error“ machte mit 96% (24 / 25) den Hauptteil der falsch-negativen Fälle aus. Nach erneuter Durchsicht unter wissenschaftlichen Bedingungen konnten in einem der 25 Bronchialaspirate wenige Tumorzellen nachgewiesen werden. Dieser als „Screening Error“ bezeichnete diagnostische Fehler machte mit 4% (1 / 25) den restlichen Anteil der falsch negativen Fälle aus. Die betroffene Patientin wurde für die weitere Auswertung in die Diagnosegruppe „dringender Verdacht“ umgruppiert.

In 86 Fällen wurde eine positive Zytologie mit wenigen Tumorzellen diagnostiziert oder es bestand zytologisch ein dringender Tumorverdacht. In 42 Präparaten konnte

eine multiple Anzahl von Tumorzellen gefunden werden, sodass diese Präparate als eindeutig positive Zytologie eingestuft werden konnten.

Nach Evaluierung der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenz durch die am Bronchialaspirat durchgeführte QMSP, wurden die molekularbiologischen Ergebnisse mit dem jeweiligen zytologischen Befund korreliert.

Der Vergleich der Methylierungsfrequenzen von Tu++ Fällen (26,2 %) und Fällen mit falsch-negativer Zytologie (4,2 %) zeigte eine signifikant höhere Frequenz in der Gruppe der Fälle mit reichlich Tumorzellen ( $\chi^2 = 4,98$  ;  $p = 0,026$ ). Die Untersuchungsergebnisse sind in Abbildung 3.1 graphisch dargestellt.

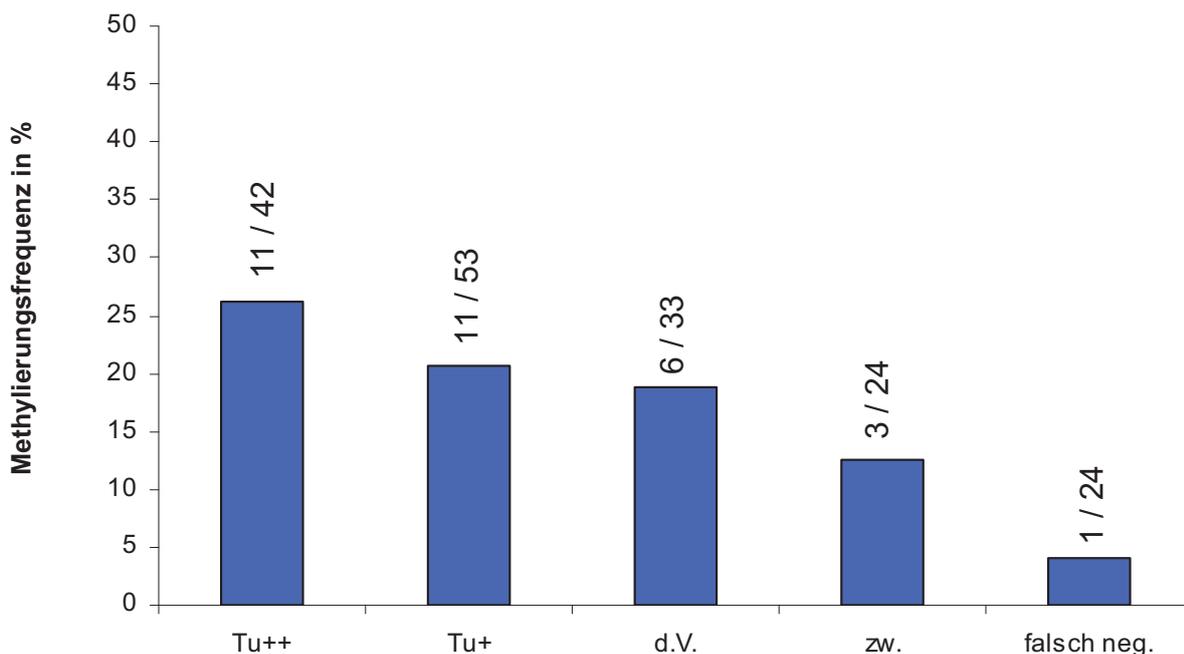


Abbildung 3.1: Häufigkeit der aberranten Promotor-Methylierung in Bronchialaspiraten von Tumorpatienten in Abhängigkeit von der zytologischen Diagnosegruppe (Tu++ = multiple Tumorzellen, Tu+ = wenige Tumorzellen, d.V. = dringender Verdacht, zw. = zweifelhaft, falsch-neg. = falsch-negativ).

### 3.2 Methylierungsfrequenz in Bronchialaspiraten

Analysiert man die  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenz der 176 Bronchialaspirate in Abhängigkeit vom korrespondierenden histologischen Subtyp (Adenokarzinom, Platte-

nepithelkarzinom, NSCLC<sub>others</sub>, SCLC) war vornehmlich beim Plattenepithelkarzinom eine Methylierung der  $p16^{\text{INK4a}}$  Promotorregion nachzuweisen. Sie fand sich hier bei 40,4% (21 / 52) der Fälle. Beim Adenokarzinom und NSCLC<sub>others</sub> lag sie bei 10,7% (6 / 56) bzw. 13,8% (4 / 29) und bei den SCLC lediglich bei 2,6% (1 / 38). Die Untersuchung der  $p16^{\text{INK4a}}$  Promotorregion in Bronchialaspiraten der Kontrollgruppe zeigte in keinem der Fälle eine aberrante Methylierung (0 / 61). Des Weiteren wurden die einzelnen Tumorgruppen auf Grundlage der Tumorzellzahl (Tu++, Tu+, d.V., zw. und falsch-negativ) stratifiziert. Eine graphische Darstellung der Methylierungsfrequenzen in den Subgruppen findet sich in Abbildung 3.2.

Die statistische Analyse belegte eine signifikant höhere Methylierungsfrequenz des  $p16^{\text{INK4a}}$  Promotors bei Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu Adenokarzinomen ( $\chi^2 = 12,66$  ;  $p = 0,0004$ ) NSCLC<sub>others</sub> ( $\chi^2 = 6,17$  ;  $p = 0,013$ ) , SCLC ( $\chi^2 = 16,94$  ;  $p < 0,0001$ ) und der Nicht-Tumorgruppe ( $\chi^2 = 30,26$  ;  $p < 0,0001$ ).

Statistisch signifikant höhere Methylierungsfrequenzen als bei Bronchialaspiraten der Nicht-Tumorpatienten konnten bei der Gruppe der Adenokarzinome ( $\chi^2 = 6,889$  ;  $p = 0,009$ ) und NSCLC<sub>others</sub> ( $\chi^2 = 8,8$  ;  $p = 0,003$ ) bestimmt werden. Dagegen zeigte die Methylierungsfrequenz von Adenokarzinomen gegenüber NSCLC<sub>others</sub> und den SCLC ( $\chi^2 = 0,174$  ;  $p = 0,677$  /  $\chi^2 = 2,146$  ;  $p = 0,143$ ), der Nicht-Tumorgruppe gegenüber den SCLC ( $\chi^2 = 1,622$  ;  $p = 0,2$ ) und der NSCLC<sub>others</sub> versus der SCLC ( $\chi^2 = 2,967$  ;  $p = 0,085$ ) keine signifikanten Unterschiede.

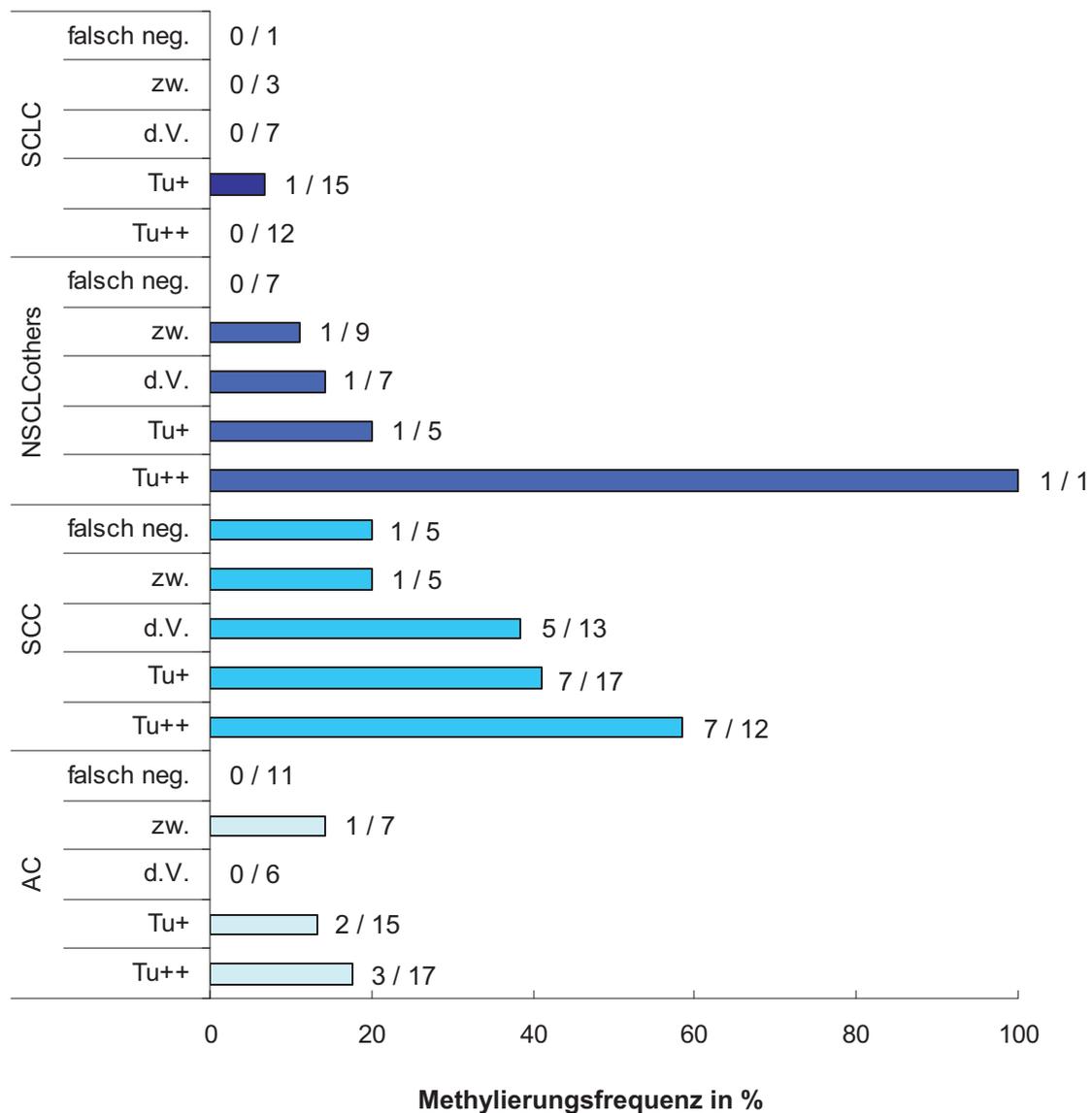


Abbildung 3.2: Methylierungsfrequenz von  $p16^{INK4a}$  in Bronchialaspiraten von Tumorpatienten in Abhängigkeit der verschiedenen Tumorarten (AC = Adenokarzinom, SCC = Plattenepithelkarzinom, NSCLC<sub>others</sub> = Sonstiges nicht-kleinzelliges Karzinom, SCLC = Kleinzelliges Karzinom) und stratifiziert nach den histologischen Diagnosegruppen (Tu++ = multiple Tumorzellen, Tu+ = wenige Tumorzellen, d.V. = dringender Verdacht, zw. = zweifelhaft, falsch-neg. = falsch-negativ).

### 3.3 Methylierungslevel in Bronchialaspiraten

Die quantitativen Messergebnisse der QMSP wurden unter Berücksichtigung vom histologischen Subtyp und der zytologischen Diagnosegruppe stratifiziert (siehe Abbildung 3.3.1 und 3.3.2.). Bei der statistischen Auswertung wurden nur Messwerte größer 0 berücksichtigt, um eine artifizielle Absenkung des durchschnittlichen Methylierungslevels in Abhängigkeit vom Anteil negativer QMSP-Befunde zu vermeiden.

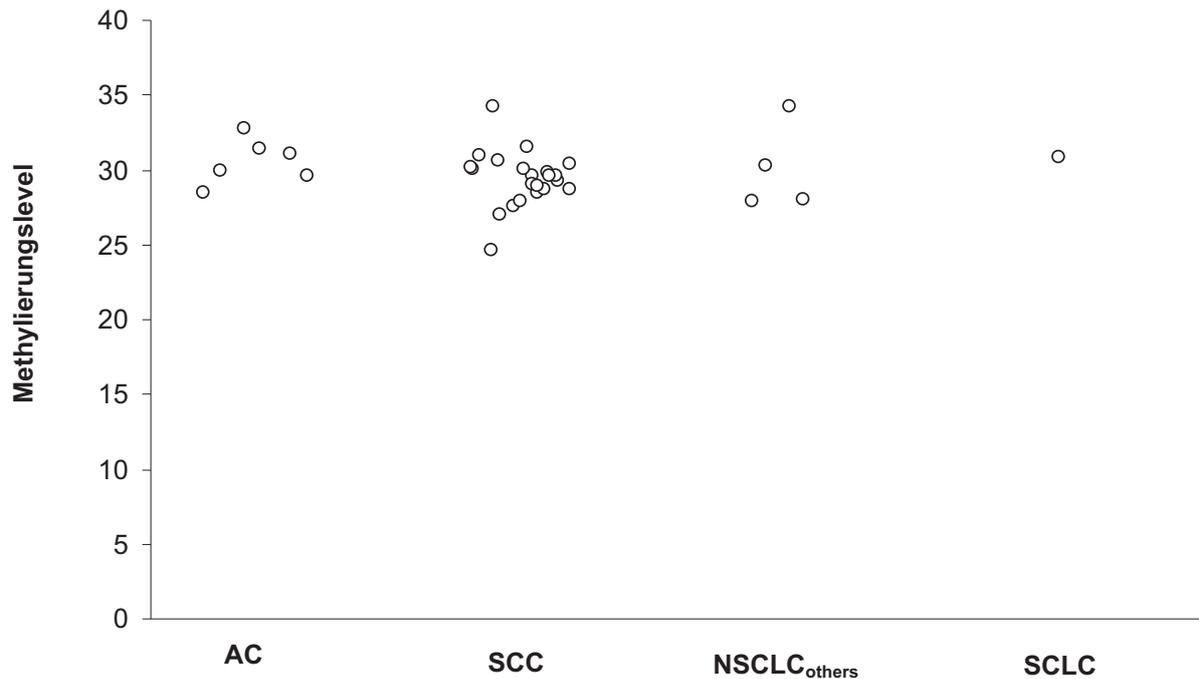


Abbildung 3.3.1:  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Methylierungslevel in Bronchialaspiraten von Tumorpatienten in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp (AC = Adenokarzinom, SCC = Plattenepithelkarzinom, NSCLC<sub>others</sub> = Sonstiges nicht-kleinzelliges Karzinom, SCLC = Kleinzelliges Karzinom). Es sind nur Messwerte > 0 dargestellt.

Das mediane Methylierungslevel der Bronchialaspirate mit nachgewiesener  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung bei allen Tumorpatienten betrug 29,8 (Spannweite 24,65-34,28, n = 33). Bezogen auf die histologischen Subtypen konnte ein medianes Methylierungslevel von 30,5 bei Adenokarzinomen (Spannweite 28,5–32,8 ; n = 6), 29,6 bei Plattenepithelkarzinomen (Spannweite 24,7-34,3 ; n = 22) und 29,1 bei NSCLC<sub>others</sub> (Spannweite 28-34,3 ; n = 4) ermittelt werden. Lediglich ein SCLC war  $p16^{\text{INK4a}}$  methyliert. Das Methylierungslevel lag bei 30,9.

Bei der Bestimmung des medianen Methylierungslevels, der Spannweiten (Spw.) und der Anzahl (n) der Bronchialaspirate mit nachgewiesener  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung in Abhängigkeit von der histologischen Diagnosegruppe fanden sich folgende Ergebnisse: „Tu++“: 29,3 / Spw. 24,65-31,38 / n = 11; „Tu+“: 29,9 / Spw 28,53-31,49 as/ n = 12; „d.V.“: 30,5 / Spw. 27,87-34,25 / n = 6; „zw.“: 30,15 / Spw. 27,95-32,81 / n = 3 und „falsch-neg.“ 34,3 / n = 1.

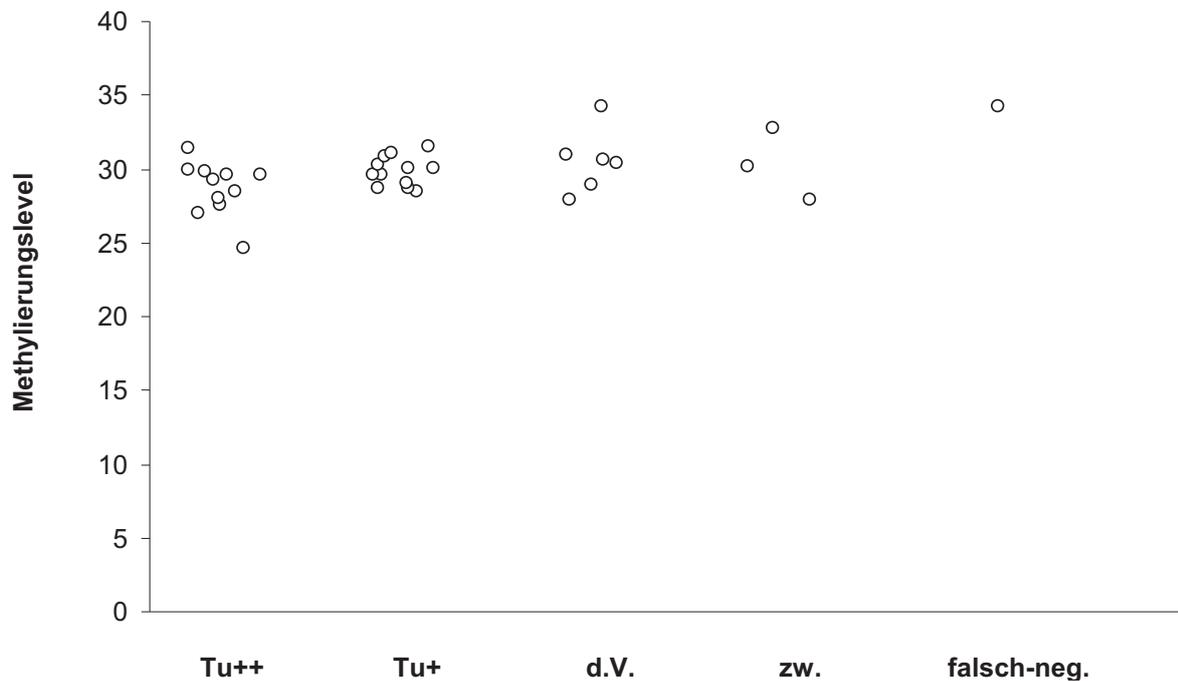


Abbildung 3.3.2:  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Methylierungslevel in Bronchialaspiraten von Tumorpatienten in Abhängigkeit der zytologischen Diagnosegruppe (Tu++ = Multiple Tumorzellen, Tu+ = Wenige Tumorzellen, d.V. = dringender Verdacht, zw. = zweifelhaft, falsch-neg. = falsch-negativ). Es sind nur Messwerte  $> 0$  dargestellt.

Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde das Level der  $p16^{\text{INK4a}}$  Methylierung in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp untersucht. Dabei wurde auf eine weitere Unterteilung der histologischen Subtypen in die verschiedenen zytologischen Diagnosegruppen verzichtet, da die zu analysierenden Gruppen für eine statistische Untersuchung zu klein gewesen wären.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede des Methylierungslevels zwischen den einzelnen histologischen Subtypen ermittelt werden ( $U \leq 1,4$ ;  $p \geq 0,16$ ).

### 3.4 Diskriminierung zwischen benigner und maligner Lungenerkrankung

Die Analyse des Methylierungsstatus von  $p16^{\text{INK4a}}$  erlaubte eine komplette Diskriminierung zwischen Tumor- und Nicht-Tumorfällen. Bei keinem der Bronchialaspirate

von Patienten ohne Lungenkarzinom war eine Methylierung der  $p16^{\text{INK4a}}$  Promotorregion nachzuweisen (0 / 61), was einer Spezifität von 100% entspricht.

Infolge dessen war das Methylierungslevel der Bronchialaspirate von Patienten mit einer malignen Lungenerkrankung deutlich höher als in der Kontrollgruppe ( $\chi^2 = 12,82$ ;  $p = 0,0003$ ). Die Positiv- und Negativkontrollen zeigten in jeder Analyse die erwarteten Ergebnisse.

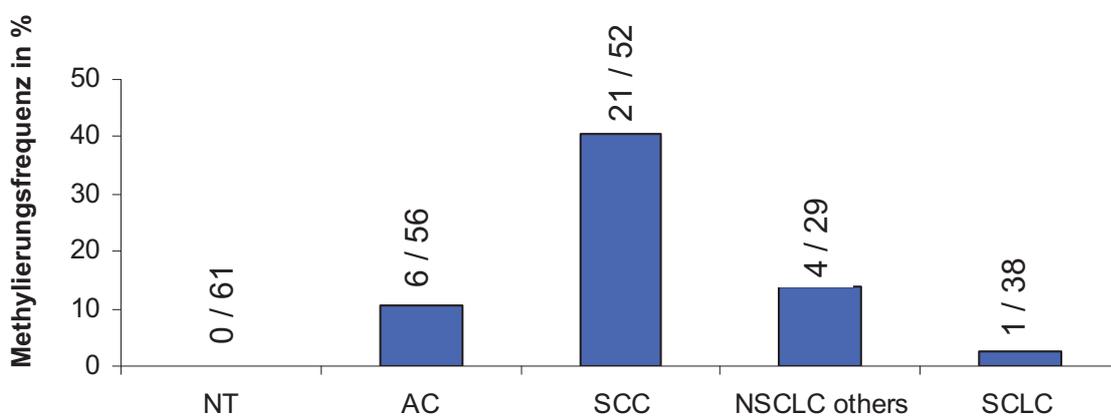


Abbildung 3.4:  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Methylierungsfrequenz in Bronchialaspiraten von Risikopatienten ohne Lungenkarzinom (NT) und Tumorpatienten in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp (AC = Adenokarzinom, SCC = Plattenepithelkarzinom, NSCLC<sub>others</sub> = Sonstiges nicht-kleinzelliges Karzinom, SCLC = Kleinzelliges Karzinom).

Die Untersuchung des  $p16^{\text{INK4a}}$  Methylierungsstatus ermöglichte vornehmlich bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom die Tumordiagnose. Von den insgesamt 52 an einem Plattenepithelkarzinom Erkrankten wiesen 21 Fälle eine im Bronchialaspirat nachweisbare Methylierung der  $p16^{\text{INK4a}}$  Promotorregionen auf. Dies entspricht einer Sensitivität von 40,4%. Bezüglich der anderen Tumorarten war  $p16^{\text{INK4a}}$  deutlich weniger sensitiv. Die Sensitivität betrug bei den Adenokarzinomen und den NSCLC<sub>others</sub> 10,7% (6 / 56) bzw. 13,8% (4 / 29), und bei den SCLC 2,6% (1 / 38) (siehe Abbildung 3.4).

Insgesamt war bei 32 der 176 Bronchialaspirate von Tumorpatienten eine  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Methylierung nachweisbar. Dies entspricht einer Gesamtsensitivität von 18,2%.

Tabelle 3.4: Methylierungshäufigkeiten einer aberranten Promotor-Methylierung von  $p16^{\text{INK4a}}$  in Bronchialaspiraten von Tumorpatienten und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp, der zytologischen Diagnosegruppe, der Tumor-Lokalisation und bei Tumor-Rezidiven.

	<b><i>p16</i> methyliert</b>	<b>Total</b>	<b>Prozent</b>
<b>Histologischer Subtyp</b>			
SCC	21	52	40,38%
AC	6	56	10,71%
NSCLC <sub>others</sub>	4	29	13,79%
SCLC	1	38	2,63%
cSCLC	0	1	0%
<b>Zytologische Diagnosegruppe</b>			
Tu++	11	42	26,19%
Tu+	11	53	20,75%
d.V.	6	33	18,18%
zw.	3	24	12,50%
f.-neg.	1	24	4,17%
r.-neg.	0	61	0%
f.-pos.	0	0	0%
<b>Lokale Rezidive</b>	2	11	18,18%
<b>Tumor-Lokalisation</b>			
zentral	8	45	17,78%
peripher	3	23	13,04%
zentral und peripher	0	2	0%

AC = Adenokarzinom, SCC = Plattenepithelkarzinom, NSCLC<sub>others</sub> = Sonstiges nicht-kleinzelliges Karzinom, SCLC = Kleinzelliges Karzinom, cSCLC= kombiniertes kleinzelliges Karzinom, Tu++ = Multiple Tumorzellen, Tu+ = Wenige Tumorzellen, d.V. = dringender Verdacht, zw. = zweifelhaft, f.-neg. = falsch-negativ, r.-neg = richtig-negativ

Die Sensitivität nahm abhängig von der Tumorzellzahl kontinuierlich ab. Dies ist in Abbildung 3.1. graphisch dargestellt. Eine zusammenfassende und detaillierte Darstellung der Untersuchungsergebnisse bezüglich Histologie, Zytologie, Tumorrezidive und Tumorlokalisierung ist Tabelle 3.4. zu entnehmen.

### 3.5 Klinisch-pathologische Korrelation

Das Auftreten einer aberranten  $p16^{\text{INK4a}}$  Methylierung wurde mit klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Raucherverhalten und klinisches Staging korreliert. Da in keinem der Bronchialaspirate der Kontrollgruppe eine Methylierung zu detektieren war, beschränkt sich die statistische Auswertung auf Bronchialaspirate der Patienten mit einer malignen Lungenerkrankung.

In Bronchialaspiraten von weiblichen und männlichen Tumorpatienten konnte in 12% (6 / 50) bzw. 20,6% (26 / 126) eine aberrante  $p16^{\text{INK4a}}$  Methylierung nachgewiesen werden. Die Methylierungsfrequenz der Proben von Patienten, welche zum Zeitpunkt der Bronchoskopie jünger oder exakt 65 Jahre alt waren lag bei 21,7% (20 / 92) und bei Patienten, die älter als 65 Jahre alt waren, bei 14,3% (12 / 84) (siehe Abbildung 3.5.1).

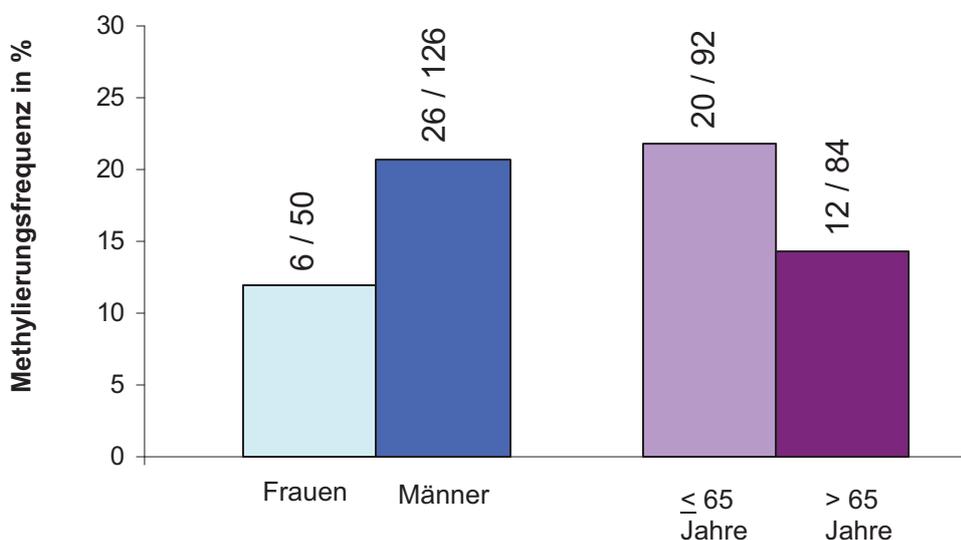


Abbildung 3.5.1: Prozentuale Häufigkeit der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Hypermethylierung in Bronchialaspiraten von Tumorpatienten in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter.

Die Methylierungsfrequenz der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotorregion in Bronchialaspiraten von Tumorpatienten zeigte weder bei der Analyse verschiedener Altersgruppen ( $\leq 65$  Jahre versus  $> 65$  Jahre) noch beim Geschlecht statistisch signifikante Unterschiede

$$(\chi^2 = 1,67 ; p = 0,2 / \chi^2 = 1,794 ; p = 0,18).$$

Angaben zum Nikotinkonsum waren bei insgesamt 224 der 237 Bronchialaspirate verfügbar. Die Kontrollgruppe umfasste 22 Präparate von Rauchern (36,1%), 18 von Ex-Rauchern (29,5%), 15 von Nichtrauchern (24,6%) und 6 von Nie-Rauchern (9,8%). Dem Untersuchungsmaterial der Patienten mit malignen Lungentumoren konnten 111 dem Status des Rauchers (63,1%), 41 des Ex-Rauchers (23,3%), 9 des Nichtrauchers (5,1%) und 2 des Nie-Raucher (1,1%) zugeordnet werden. Zu 13 Proben (7,4%) gab es keine Angaben bezüglich des Raucherverhaltens (Abbildung 3.5.2).

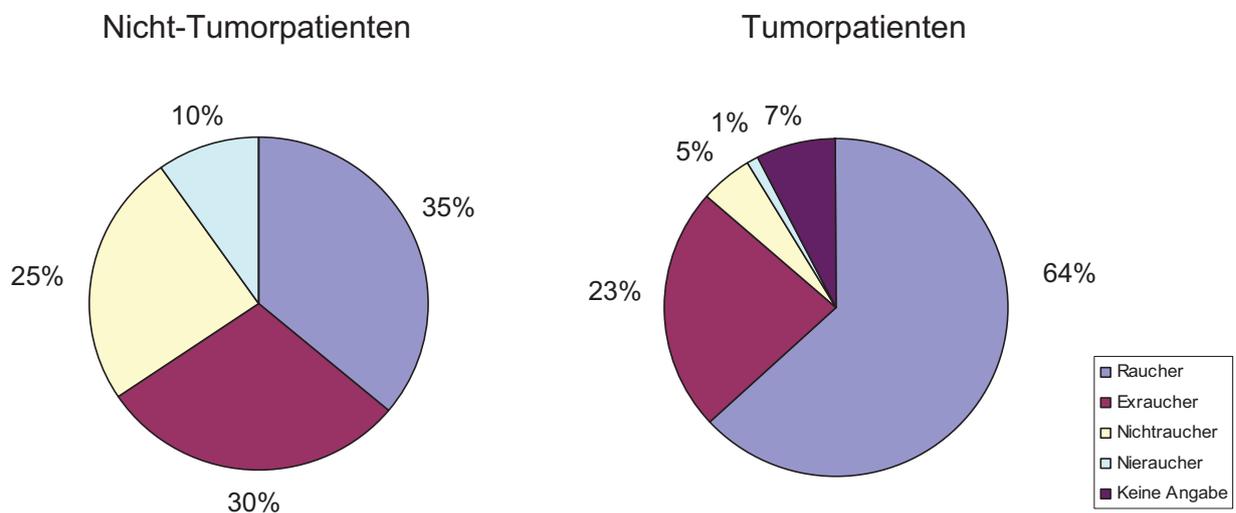


Abbildung 3.5.2: Prozentuale Verteilung der verschiedenen Rauchergewohnheiten der Kontrollgruppe und der Patienten mit einem Lungenkarzinom.

Aberrante Methylierung des  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors konnte in Bronchialaspiraten von Tumorpatienten bei Rauchern und Ex-Rauchern in 17,1% (19 / 111) bzw. 24,4% (10 / 41) sowie in 22,2% (2 / 9) der Nichtraucher detektiert werden. Beide Proben der Gruppe der Nie-Raucher lagen unmethyliert vor (siehe Abbildung 3.5.3).

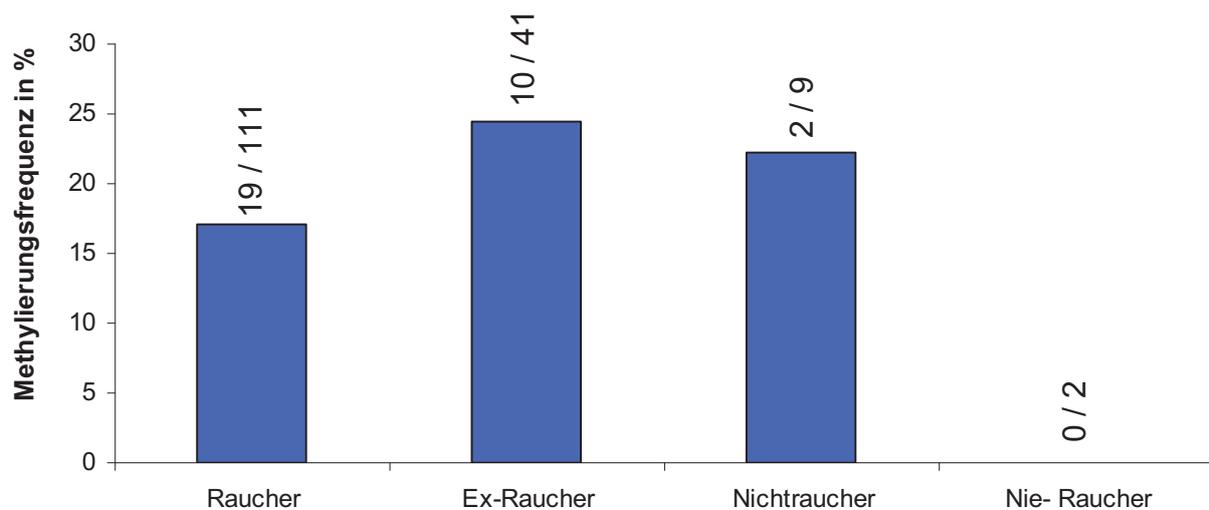


Abbildung 3.5.3: Prozentuale Häufigkeit der  $p16^{\text{INK4a}}$ - Promotor-Hypermethylierung in Bronchialaspiraten von Tumorpatienten in Abhängigkeit von der Raucheranamnese.

Bei der statistischen Auswertung der verschiedenen Raucheranamnesen (Raucher, Ex-Raucher, Nichtraucher, Nie-Raucher) gegeneinander konnten keine signifikanten Unterschiede der Methylierungsfrequenz ermittelt werden ( $\chi^2 = 0,2$ ;  $p = 1,6$ ). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass es eine gewisse Unschärfe in der Klassifizierung der Raucheranamnese gibt. So können beispielsweise Patienten mit der Angabe „Nichtraucher“ auch Ex-Raucher oder sogar Nie-Raucher sein.

Ein komplettes klinisch-pathologisches Tumor-Staging war bei 113 der 137 NSCLC und bei 37 der 38 der SCLC vorhanden. Häufigkeit der Tumorstadien in Korrelation mit den histologischen Subtypen der NSCLC sind in der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Aufgrund der geringen Anzahl der Fälle in einigen Tumorstadien wurden diese für die statistische Auswertung zusammengefasst (Stadium IA+IB+IIB = I/II; Stadium IIIA+IIIB = III) und auf die Unterteilung der NSCLC in histologische Subtypen verzichtet. Bei den Tumorstadien I+II konnte in 29,2% (7 / 24) der Fälle eine aberrante  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung im Bronchialaspirat nachgewiesen werden. Im Stadium III und IV lag die Methylierungsfrequenz bei 16,6% (7 / 42) bzw. 21,3% (10 / 47).

Tabelle 3.5: Häufigkeit der Tumorstadien (IA-IV) bei den nicht-kleinzelligen Karzinomen unterteilt in die verschiedenen histologischen Subtypen und den Fällen ohne Angabe zum Tumorstadium.

Tu-Stadium	SCC	AC	NSCLC others
I A	1	2	1
I B	7	11	0
II B	1	0	1
III A	9	5	8
III B	9	6	5
IV	11	24	12
k.A.	14	8	2

SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; NSCLC others = Sonstiges nicht-kleinzelliges Karzinom; k.A.= keine Angabe

Bei der Untersuchung des Tumorgrades konnten bei 40% (2 / 5) der gut differenzierten (G1) und jeweils bei 18,2% (6 / 27) der mittelgradigen (G2) und gering differenzierten (G3) Tumoren ein positiver QMSP-Befund gefunden werden (siehe Abbildung 3.5.4).

Allerdings waren die beobachteten Unterschiede der Methylierungsfrequenzen weder zwischen den Tumorstadien (I/II, III, IV), noch zwischen den Tumorgraden (G1, G2, G3) statistisch signifikant ( $\chi^2 < 1,43$ ;  $p > 0,23$  /  $\chi^2 < 1,25$  ;  $p > 0,26$ ).

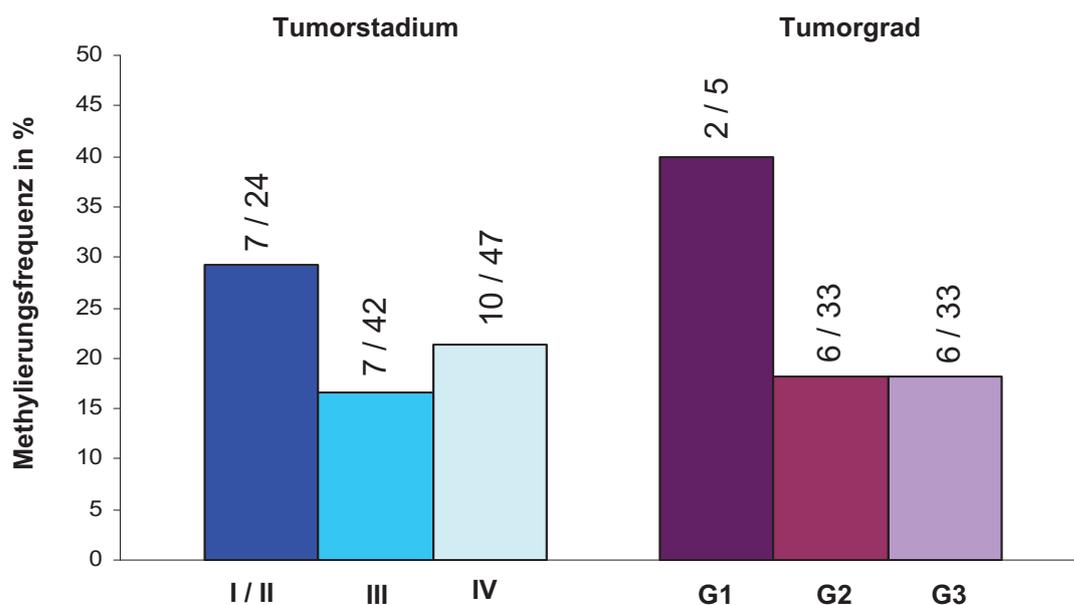


Abbildung 3.5.4: Prozentuale Häufigkeit der p16<sup>INK4a</sup>-Hypermethylierung in Bronchialaspiraten von nicht-kleinzelligen Karzinomen in Abhängigkeit vom Tumorstadium und vom Tumorgrad.

Bei den SCLC konnten 29 Bronchialaspirate einer „extensive disease“ und 8 einer „limited disease“ zugeordnet werden. In zwei Fällen waren keine Angaben bezüglich des klinischen Stagings erhältlich. Bei der Gegenüberstellung der Methylierungsfrequenzen von „limited disease“ (12,5 % ; 1 / 7) und „extensive disease“ (0 % ; 0 / 29) verfehlten die Unterschiede knapp eine statistische Signifikanz ( $\chi^2 = 3,726$  ;  $p = 0,0536$ ).

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Methylierungsstatus des  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors in insgesamt 237 Bronchialaspiraten von 168 Tumorpatienten und 59 Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung untersucht. Das Ziel dieser Studie bestand darin, die aberrante  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Hypermethylierung auf ihre Eignung als molekularbiologischer Tumormarker für die Lungenkarzinom-Diagnostik zu prüfen.

Zum Nachweis der Methylierung wurde die QMSP verwendet. Die Ergebnisse für den Promotor von  $p16^{\text{INK4a}}$  wurden mittels Kreuzpunktanalyse bestimmt. Hierbei wurden alle PCR-Läufe, die ein  $p16^{\text{INK4a}}$ -positives PCR-Produkt zeigten als positiv bewertet. Die vorliegende Studie hat zeigen können, dass insbesondere die Diagnosestellung von Plattenepithelkarzinomen möglich zu sein scheint. Bei 40,4% der Bronchialaspirate von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom wurde eine aberrante Promotormethylierung von  $p16^{\text{INK4a}}$  nachgewiesen. Alle Bronchialaspirate der Nicht-Tumorpatienten zeigten hingegen keine Methylierung von  $p16^{\text{INK4a}}$ . Damit ist die Spezifität des Nachweises der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotormethylierung prinzipiell hinreichend, um sicher eine Tumordiagnose stellen zu können und  $p16^{\text{INK4a}}$  als spezifischen Tumormarker in der Lungenkarzinom-Diagnostik zu nutzen.

Das Tumorsuppressorgen  $p16^{\text{INK4a}}$  nimmt in der Geschichte der Biomarker eine Sonderstellung ein.  $p16^{\text{INK4a}}$  war das erste Gen an dem der Zusammenhang zwischen aberranter Promotormethylierung und Inaktivierung von Tumorsuppressorgen in der Krebsentstehung bewiesen wurde (Merlo *et al.* 1995, Herman *et al.* 1995, Gonzalez-Zulueta *et al.* 1995). Seitdem ist Promotormethylierung als Hauptmechanismus der Inaktivierung von Tumorsuppressorgen identifiziert.

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die die aberrante Methylierung von  $p16^{\text{INK4a}}$  untersuchten. In der folgenden Diskussion wird zunächst die in verschiede-

nen Studien untersuchte Prävalenz der aberranter  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung im Lungenkarzinom dargestellt und in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht und Raucherverhalten gesetzt. Anschließend werden die eigenen Ergebnisse und Ergebnisse der Methylierungsfrequenzen von Untersuchungen der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung im Untersuchungsmaterial der pulmonalen Exfoliativzytologie dargestellt. Nach der Diskussion der Eignung von  $p16^{\text{INK4a}}$  als molekularer Tumormarker wird die Problematik der Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien aufgrund der unterschiedlichen Methodik (PCR-Technik, Primer, Untersuchungsmaterial und ethnischer Herkunft) beleuchtet. Abschließend wird unter 4.5 ein Ausblick über die Möglichkeiten des Einsatzes von Hypermethylierungen in der Krebsfrühdagnostik gegeben.

#### **4.1 Prävalenz der aberranten Hypermethylierung des $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors im Lungenkarzinom**

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die die  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotormethylierung im Lungenkarzinomgewebe untersucht haben (siehe Tabelle 4.1). Im Mittel lag die Methylierungsfrequenz für NSCLC bei 34% (Spw. 17%-37%)(Ahrendt *et al.* 1999, Kim *et al.* 2001, Zöchbauer-Müller *et al.* 2001, Sanchez *et al.* 2001, Toyooka *et al.* 2001, Jarmalaite *et al.* 2003, Toyooka *et al.* 2003, Kim *et al.* 2006, Belinsky *et al.* 2007, Kashiwabara *et al.* 1998, Kurakawa *et al.* 2001, Yanagawa *et al.* 2003, Harden *et al.* 2003, Topaloglu *et al.* 2004, Shivapurkar *et al.* 2007).

Auffällig ist, dass Studien, die eine weitere Unterteilung in die verschiedenen histologischen Subtypen der NSCLC durchführten, bei Plattenepithelkarzinomen eine deutlich höhere Methylierungsfrequenz als bei Adenokarzinomen belegen konnten. In diese Gruppe gehören die Arbeiten von Kim *et al.* 2001, Toyooka *et al.* 2001, Toy-

ooka *et al.* 2003, Yanagawa *et al.* 2003 und Harden *et al.* 2003. Im Mittel betrug die Methylierungsfrequenz 37% für Plattenepithelkarzinome und 18% für Adenokarzinome. Andere Autoren fanden keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden histologischen Subtypen (Chan *et al.* 2002, Jarmalaite *et al.* 2003, Xie *et al.* 2006, Chen *et al.* 2002, Liu *et al.* 2003).

Tabelle 4.1: Literaturübersicht: Aberrante  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor Methylierung bei Lungenkarzinomen und nicht-malignen Lungengewebe sortiert nach PCR-Technik, Untersuchungsmaterial und Primerwahl. a) Auflistung der Arbeiten basierend auf Primern von Herman *et al.* 1996 b) Auflistung der Arbeiten unter Verwendung anderer, oder nicht weiter spezifizierten Primerpaare.

## a)

Autor	PCR-Technik	Material	NT	NSCLC	AC	SCC	SCLC
Ahrent <i>et al.</i> 1999	MSP	Gewebe		38%	47%	39%	
Kim <i>et al.</i> 2001	MSP	Gewebe		28%	22%	41%	
Zöchbauer- Müller <i>et al.</i> 2001	MSP	Gewebe	0%	25%			
Sanchez <i>et al.</i> 2001	MSP	Gewebe		26%			
Toyooka <i>et al.</i> 2001	MSP	Gewebe		32%	25%	47%	6%
Chan <i>et al.</i> 2002	MSP	Gewebe		64%	55%	68%	
Jarmalaite <i>et al.</i> 2003	MSP	Gewebe	9%	41%	36%	33%	0%
Toyooka <i>et al.</i> 2003	MSP	Gewebe	5%	25%	18%	33%	
Kim <i>et al.</i> 2006	MSP	Gewebe		35%			
Belinsky <i>et al.</i> 2007	2-Schritt MSP	Gewebe		47%			

## b)

Autor	PCR-Technik	Material	NT	NSCLC	AC	SCC	SCLC
Kashiwabara <i>et al.</i> 1998	MSP	Gewebe		34%			
Kurakawa <i>et al.</i> 2001	MSP	Gewebe		38%			
Yanagawa <i>et al.</i> 2003	MSP	Gewebe		31%	16%	48%	
Waki <i>et al.</i> 2003	MSP	Gewebe	5%				
Xie <i>et al.</i> 2006	MSP	Gewebe	25%	63%	60%	73%	69%
Chen <i>et al.</i> 2002	MSP nach Smal- Verdau	Gewebe		57%	54%	60%	
Liu <i>et al.</i> 2003	2-Schritt MSP	Gewebe		79%	75%	81%	
Harden <i>et al.</i> 2003	QMSP	Gewebe		17%	8%	18%	
Topaloglu <i>et al.</i> 2004	QMSP	Gewebe		23%	19%	14%	
Ota <i>et al.</i> 2006	QMSP	Gewebe		100%			
Shivapurkar <i>et al.</i> 2007	QMSP	Gewebe	0%	45%			

NT= Nicht-Tumor, NSCLC= Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, AC= Adenokarzinom, SCC= Plattenepithelkarzinom, SCLC= Kleinzelliges Lungenkarzinom, MSP= Methylierungs-spezifische PCR, QMSP= Quantitative methylierungs-spezifische PCR

In der Literatur finden sich nur wenige Arbeiten, welche die Prävalenz der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung in SCLC untersucht haben. Im Allgemeinen wurden sehr niedrige Methylierungsfrequenzen von 0%-6% ermittelt (Toyooka *et al.* 2001, Jarmalaite *et al.* 2003). Eine Ausnahmestellung nehmen die Arbeiten von Chan *et al.* 2002, Xie *et al.* 2006, Chen *et al.* 2002, Liu *et al.* 2003, und Ota *et al.* 2006 ein. Sie ermittelten unab-

hängig der Tumorart deutlich höhere Methylierungsfrequenzen. Ursachen hierfür werden unter 4.4.4 diskutiert.

#### 4.1.1 Klinisch-pathologische Korrelation

Die Prävalenz einer aberranten  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung wurde in verschiedenen Studien mit klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht und Raucherverhalten korreliert.

In der Literatur finden sich nur wenig Information über einen möglichen Zusammenhang zwischen  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung und Alter. Kashiwabara *et al.* (1998) fanden diesbezüglich keinen Zusammenhang. In einer Studie von Jarmalaite *et al.* 2003 wurde eine signifikant höhere Methylierungsfrequenz bei über 65 jährigen Patienten im Gegensatz zu jüngeren Patienten festgestellt. Kim *et al.* (2001) kam zu ähnlichen Ergebnissen, jedoch verpassten die Ergebnisse knapp eine statistische Signifikanz. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse ist eine eindeutige Aussage über den Zusammenhang zwischen  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung und dem Alter zur Zeit nicht möglich.

Ähnlich verhält es sich mit dem Zusammenhang zwischen  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung und dem Geschlecht der untersuchten Patienten. Ein Teil der Studien fand keinen Zusammenhang zwischen den beiden Parametern (Toyooka *et al.* 2003, Kashiwabara *et al.* 1998, Kim *et al.* 2006), wohingegen andere Arbeiten eine statistisch signifikant höhere Methylierungsfrequenz bei Männern beschreiben (Zöchbauer- Müller *et al.* 2001, Belinsky *et al.* 2007, Ota *et al.* 2006). Eine Ausnahmestellung nimmt eine Arbeit von Chan und Mitarbeitern aus dem Jahr 2002 ein. Chan *et al.* detektierten eine signifikant höhere Methylierungsfrequenz von  $p16^{\text{INK4a}}$  bei Adenokarzinomen weiblicher Patienten als bei männlichen. Beim Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms

finden sich dagegen keine geschlechtsabhängigen Unterschiede, was mit der geringen Anzahl der weiblichen Patienten zu begründen sein könnte. Bei gemeinsamer statistischer Analyse beider histologischer Subgruppen blieb der Befund einer signifikant höheren  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenz bei Frauen erhalten. Als eine Ursache für dieses von westlichen Arbeiten abweichendes Ergebnis ziehen Chan und Mitarbeiter den möglichen Einfluss der ethnischen Differenzen in Betracht (siehe auch 4.4.4).

Eine Reihe von Arbeiten befassten sich mit dem möglichen Zusammenhang von aberranter  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Methylierung und Tabakkonsum. Bei diesen Studien ist jedoch zu berücksichtigen, dass es eine gewisse Unschärfe in der Klassifizierung der Raucheranamnese gibt. So können beispielsweise Nichtraucher auch Exraucher mit nicht unerheblicher Nikotinvorgeschichte sein. Toyooka und Mitarbeiter (2003) untersuchten in ihrer Arbeit Lungengewebe mittels MSP. Sie fanden bei Patienten, die jemals geraucht hatten oder aktuell rauchten, signifikant häufiger eine aberrante  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung als bei Patienten, welche niemals Tabak konsumiert hatten. Zu diesem Ergebnis kam auch die methodisch vergleichbare Studie von Kim *et al.* 2006, die darüber hinaus feststellten, dass die  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenz bei Rauchern höher als bei Ex-Rauchern lag. Auch bei der Analyse der Methylierungsfrequenz von Rauchern gegenüber Nichtrauchern belegte Yanagawa *et al.* 2003 eine statistisch signifikant höhere Methylierungsfrequenz bei Rauchern.

#### **4.2 Aberrante Hypermethylierung des $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors in der Exfoliativzytologie**

In der vorliegenden Arbeit wurde die  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenz in 176 Bronchialaspiraten von Tumorpatienten mittels QMSP in Abhängigkeit vom korrespondieren-

den histologischen Subtyp untersucht. Bei den NSCLC lag die Methylierungsfrequenz bei 23%. Bei weiterer Differenzierung war vornehmlich bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom eine Methylierung nachzuweisen (40,4%). Weniger sensitiv war  $p16^{\text{INK4a}}$  für die Detektion von Adenokarzinomen, wo in nur 11% der Fälle ein positives Ergebnis nachzuweisen war. Dies entspricht nahezu den Ergebnissen von einer früheren Arbeit des eigenen Institutes, in der Grote und Mitarbeiter unter Anwendung gleicher Methodik Methylierungsfrequenzen von 12% bei Adenokarzinomen und 56% bei Plattenepithelkarzinomen detektierten (Grote *et al.* 2005). Nur sehr wenige Arbeiten zur Promotor-Methylierung von  $p16^{\text{INK4a}}$  wurden mittels QMSP an Bronchialaspiraten durchgeführt (siehe Tabelle 4.2). Die vorliegende Arbeit, mit ihrem experimentellen Teil aus dem Jahre 2004 und die Arbeit von Grote *et al.* 2005 waren mit die ersten Untersuchungen, die mittels QMSP Bronchialaspirate untersucht haben. Lediglich eine Arbeit hatte bereits früher diese Methodik angewendet (Topaloglu *et al.* 2004). Topaloglu und Mitarbeiter ermittelten jedoch eine ungewöhnlich niedrige  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenz von lediglich 3% an Bronchialaspiraten von amerikanischen NSCLC-Patienten. Das von ihnen sehr klein gewählte Kollektiv von nur 31 Patienten lässt keinen aussagekräftigen Vergleich der Ergebnisse zu. Andere Arbeiten fanden bei Untersuchung von Bronchialaspiraten von Patienten mit einem NSCLC Methylierungsfrequenzen im Mittel von 29% (Grote *et al.* 2005, Kurakawa *et al.* 2001). Eine Ausnahmestellung nimmt eine sehr frühe Arbeit von Ahrendt und Mitarbeitern aus dem Jahr 1999 ein. Sie detektierten an Bronchialaspiraten von Patienten mit einem NSCLC eine Methylierungsfrequenz von 63% und entgegen der Ergebnisse anderer Autoren eine deutlich höhere Methylierungsfrequenz bei Adenokarzinomen (78%) im Gegensatz zu Plattenepithelkarzinomen (56%).

Tabelle 4.2: Literaturübersicht- Aberrante  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor Methylierung in der Exfoliativzytologie bei Patienten ohne und mit einem Lungenkarzinomen sortiert nach PCR-Technik, Untersuchungsmaterial und Primerwahl. a) Auflistung der Arbeiten basierend auf Primern von Herman *et al.* 1996 b) Auflistung der Arbeiten unter Verwendung anderer, oder nicht weiter spezifizierten Primerpaare.

## a)

Autor	PCR-Technik	Material	NT	NSCLC	AC	SCC	SCLC
Ahrent <i>et al.</i> 1999	MSP	BA		63%	78%	56%	
Kersting <i>et al.</i> 2000	2-Schritt MSP	BA	20%	37%**			37%**
Palmisano <i>et al.</i> 2000	2-Schritt MSP	Sputum	15%			90%	
Kersting <i>et al.</i> 2000	2-Schritt MSP	Sputum	16%	35%**			35%**
Gilliland <i>et al.</i> 2002	2-Schritt MSP	Sputum	14%				
Belinsky <i>et al.</i> 2002	2-Schritt MSP	Sputum	35%				
Belinsky <i>et al.</i> 2006	2-Schritt MSP	Sputum	25%	39%*			
Belinsky <i>et al.</i> 2007	2-Schritt MSP	Sputum		40%			

## b)

Autor	PCR-Technik	Material	NT	NSCLC	AC	SCC	SCLC
Kurakawa <i>et al.</i> 2001	MSP	BA		24%			
Soria <i>et al.</i> 2002	MSP	BA	17%				
Chen <i>et al.</i> 2002	MSP nach Smal- Verdau	Sputum		62%			
Liu <i>et al.</i> 2003	2-Schritt MSP	Sputum		76%	68%	81%	
Topaloglu <i>et al.</i> 2004	QMSP	BA	0%	3%			
Grote <i>et al.</i> 2005	QMSP	BA	0%	34%	12%	56%	4%
Vorliegende Arbeit	QMSP	BA	0%	23%	11%	40%	3%
Shivapurkar <i>et al.</i> 2007	QMSP	Sputum	10%	23%	20%	25%	

\*Studienpopulation enthält zu 92 % NSCLC

\*\* Studienpopulation enthält zu 60,8 % NSCLC und zu 39,2% SCLC

NT= Nicht-Tumor, NSCLC= Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, AC= Adenokarzinom, SCC= Plattenepithelkarzinom, SCLC= Kleinzelliges Lungenkarzinom, MSP= Methylierungs-spezifische PCR, QMSP= Quantitative methylierungs-spezifische PCR

In der Literatur finden sich nur wenige Arbeiten, die die Promotor-Methylierung von  $p16^{\text{INK4a}}$  am Bronchialaspirat von Patienten mit einem SCLC untersucht haben.

Grote *et al.* detektierte eine Methylierungsfrequenz von 4%, ähnlich der vorliegenden Arbeit, wo in 3% der SCLC eine aberrante  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung nachgewiesen wurde.

In Sputen lag die Methylierungsfrequenz bei NSCLC im Mittel bei 32% (Belinsky *et al.* 2006, Shivapurkar *et al.* 2007). Ausnahmestellung nahmen hier Arbeiten von Chen *et al.* 2002 und Liu *et al.* 2003 ein, die im Sputum erhöhte Methylierungsfrequenzen von 62% bzw. 76% detektierten.

In Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern wie Alter , Geschlecht und Rauchergewohnheiten konnten in der vorliegenden Studie keine statistisch signifi-

kanten Zusammenhänge gezeigt werden. Auch in Sputen konnten andere Autoren keinen Zusammenhang zwischen Rauchergewohnheiten und Methylierung der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotorregion aufzeigen (Belinsky *et al.* 2002, Gilliland *et al.* 2002, Palmisano *et al.* 2000). Eine Besonderheit der Patientenkollektive von Gilliland *et al.* (2002) und Palmisano *et al.* (2000) bestand darin, dass sie sich aus ehemaligen Uran-Mienenarbeitern zusammensetzten, welche durch die beruflich bedingte Exposition mit ionisierender Strahlung einen zusätzlichen Risikofaktor zur Krebsentstehung ausgesetzt waren. In keiner der beiden Studien an Radon exponierten Individuen konnte jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern hinsichtlich der Methylierungsfrequenz festgestellt werden.

#### **4.3 Einsatz der $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Hypermethylierung als molekularer Biomarker für die Diagnostik des Lungenkarzinoms**

Für die sichere Diagnose eines Lungenkarzinoms müssen möglichst viele der Patienten mit einem Lungenkarzinom eine aberrante  $p16^{\text{INK4a}}$ -Hypermethylierung im Tumorgewebe bzw., in Hinblick auf den Einsatz der Exfoliativzytologie für die Lungenkarzinomdiagnostik, auch in Bronchialaspiraten oder Sputen von Tumorpatienten aufweisen. Die schlechtesten Ergebnisse erzielten diesbezüglich die in der Literatur wenig untersuchten SCLC. Die Methylierungsfrequenzen lagen entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in anderen Studien sowohl im Gewebe, als auch in Bronchialaspiraten bei maximal 6%. Eine höhere wenngleich auch nicht für eine zuverlässige Diagnosestellung ausreichend hohe Sensitivität zeigte  $p16^{\text{INK4a}}$  bei der Untersuchung von Geweben und Bronchialaspiraten bzw. Sputen von Patienten mit einem NSCLC. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Methylierungsfrequenzen in der Exfoliativzytologie an die festgestellten Prävalenzen heran reichen und somit

eine grundsätzliche Eignung der Exfoliativzytologie in der Lungenkarzinomdiagnostik belegt. (vergl. Tabelle 4.1 und 4.2). Sowohl bei der Untersuchung von Lungengewebe, als auch in Bronchialaspiraten zeichnete sich bei weiterer Differenzierung der Gruppe der NSCLC eine deutlich höhere Sensitivität von  $p16^{\text{INK4a}}$  bei Plattenepithelkarzinomen ab. Somit scheint insbesondere die Diagnosestellung von Plattenepithelkarzinomen mit  $p16^{\text{INK4a}}$  als Biomarker möglich.

Um  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Hypermethylierungen als molekularen Biomarker für die Diagnostik des Lungenkarzinoms erfolgreich einsetzen zu können, ist neben einer ausreichenden Sensitivität auch das korrekte Ausschließen einer Erkrankung bei Patienten ohne Lungenkarzinom entscheidend. Die Prävalenz der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung im nicht-malignem Lungengewebe unter Anwendung der MSP lag bei 0-9% (Zöchbauer-Müller *et al.* 2001, Jamalaite *et al.* 2003, Toyooka *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels QMSP sogar bei keinem der Bronchialaspirate von Nicht-Tumorpatienten eine  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung nachgewiesen werden. Diese hohe Spezifität konnte auch schon in anderen, welche mit der vorliegenden Arbeit in Untersuchungsmaterial und PCR-Technik übereinstimmen, gezeigt werden (Topaloglu *et al.* 2004, Grote *et al.* 2005). Dabei ist hervorzuheben, dass es sich bei den Nicht-Tumorpatienten nicht um gesunde Probanden handelte, sondern die Patienten zu einer Risikogruppe gehörten und mit dem Verdacht auf ein Lungenkarzinom bronchoskopiert wurden. Andere Arbeiten, welche Bronchialaspirate von Nicht-Tumorpatienten mit anderen PCR Techniken untersucht haben, ermittelten höhere Methylierungsfrequenzen von 17% bzw. 20% (Soria *et al.* 2002, Kersting *et al.* 2000). Ebenfalls deutlich höhere Methylierungsfrequenzen von 15-25% (Mittelwert: 21%) fanden sich bei Studien, die mittels 2-Schritt-MSP Sputen von Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung untersuchten (Palmisano *et al.* 2000, Kersting *et al.* 2000, Gilli-

land *et al.* 2002, Belinsky *et al.* 2002, Belinsky *et al.* 2006). Die hohe Sensitivität der 2-Schritt-MSP (siehe auch Kapitel 4.4.2.2) bietet eine mögliche Erklärung für die erhöhten Messwerte.

Bei der Untersuchung von gesundem, reseziertem Lungengewebe unter Verwendung der QMSP konnten Shivapurkar und Mitarbeiter (2007) ebenfalls keine Methylierung der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotorregion detektieren. In der gleichen Studie untersuchten sie auch Sputen, bei der in 10% der Proben von Nicht-Tumorpatienten eine  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Methylierung ermittelt werden konnte (Shivapurkar *et al.* 2007). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Sputen neben Zellen aus der Lungenregion auch Zellen aus dem Nasen-Mund-Halsbereich enthalten können und diese die Quelle der nachgewiesenen aberranten  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Methylierung sein können. Bei der Analyse der Ergebnisse scheint insbesondere unter Verwendung der QMSP am histologischen Präparat aber auch an Bronchialaspiraten die Spezifität von  $p16^{\text{INK4a}}$  ausreichend um grundsätzlich eine Tumordiagnose für Plattenepithelkarzinome stellen zu können und  $p16^{\text{INK4a}}$  als spezifischen Tumormarker für die Lungenkarzinom-Diagnostik zu nutzen.

Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Vergleichbarkeit der Studien nur eingeschränkt möglich ist, da sie sich häufig in der PCR-Methodik, Primerwahl, Untersuchungsmaterial und hinsichtlich der Kollektive unterscheiden. Der mögliche Einfluss dieser Faktoren auf die Ergebnisse wird in Kapitel 4.4 näher beleuchtet.

#### **4.4 Problematik der Vergleichbarkeit der Messwerte**

In der Literatur findet sich in den Studien, die  $p16^{\text{INK4a}}$ -Hypermethylierung untersuchten, eine große Spannweite der Messwerte. Es ist zu berücksichtigen, dass sich die einzelnen Studien bezüglich ihrer Methodik teilweise stark unterscheiden. Im Fol-

genden werden die Studien hinsichtlich ihrer Primerwahl, der verwendeten PCR-Technik, dem Untersuchungsmaterial und der ethnischen Herkunft der Patientenkollektive betrachtet und der jeweilige mögliche Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse diskutiert.

#### 4.4.1. Einfluss der Primerwahl

Bei der Entstehung eines Lungentumors spielt die aberrante Methylierung der Promotor-Regionen von Tumorsuppressorgenen eine wichtige Rolle. Die in methylierungs-spezifischen PCRs verwendeten Primerpaare decken nur Teile des Promotor-Bereiches ab. Untersuchungen von Zheng und Mitarbeitern ergaben, dass die Methylierungsmuster der CpG-Dinucleotide nicht uniform sind (Zheng *et al.* 2000). Aufgrund dessen könnte auch die Position der bei der methylierungs-spezifischer PCR verwendeten Primer Einfluss auf die erzielten Untersuchungsergebnisse und damit die nachgewiesene Methylierungsprävalenz haben.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Publikationen zum  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsstatus in Hinblick auf die PCR-Technik, Untersuchungsmaterial und Primerposition im  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor analysiert (siehe Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2).

Eine Gruppe umfasst Arbeiten, die eine konventionelle methylierungs-spezifische PCR (MSP), sowie die 1996 von Herman und Mitarbeitern publizierte Primer verwendeten. Eine weitere Gruppe von Arbeiten greift auf das Protokoll von Palmisano und Mitarbeitern aus den Jahre 2000 zurück, das im Anschluss an eine vom Methylierungsstatus unabhängige Präamplifikation im zweiten PCR-Schritt die 1996 von Herman *et al.* publizierte Primer verwendet (Tabelle 4.1a u Tabelle 4.2a). Diese Arbeiten wurden den Ergebnissen anderer Arbeiten, die andere Primer verwendeten gegenübergestellt (Tabelle 4.1 b u Tabelle 4.2 b). Im Folgenden beschränkt sich die Analyse auf Studien, welche histologisches Material mittels MSP untersuchten, da

das zytologische Material zu heterogen ist, um Rückschlüsse auf den Einfluss der Primerposition auf die Methylierungsfrequenz erlauben zu können.

Bei den Nicht-Tumorpatienten lag die Methylierungsfrequenz bei Studien mit Primern von Herman *et al.* zwischen 0-9% (Zöchbauer-Müller *et al.* 2001, Jamalaite *et al.* 2003, Toyooka *et al.* 2003 siehe Tabelle 4.1a). Zu einem solchen Ergebnis kommen mit einem anderen Primerset auch Waki und Mitarbeiter im Jahre 2003 (Tabelle 4.1b).

Bei Patienten mit einem NSCLC zeigten die Studien unabhängig von der Primerwahl ähnliche Methylierungsfrequenzen. Die Methylierungsfrequenz lag bei den Arbeiten mit Primern von Herman *et al.* (1996) bei 25-41% (Mittelwert: 31%) und bei Studien mit anderen Primern zwischen 31-38% (Mittelwert: 34%) Eine Ausnahmestellung nehmen die Arbeiten von Chan *et al.* 2002, Xie *et al.* 2006 und Chen *et al.* 2002 ein. Diese Arbeiten fanden unabhängig von der Primerwahl insgesamt deutlich höhere Methylierungsfrequenzen (NSCLC: 57-64%, Mittelwert: 61%). Xie und Mitarbeiter detektierten bei 25% der Lungengewebe von Nicht-Tumorpatienten eine  $p16^{\text{INK4a}}$ -Hypermethylierung. Bei der Arbeit von Chen und Mitarbeitern (2002) muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese keine konventionelle MSP verwendet haben, sondern eine MSP nach einem Restriktionsenzym-Verdau (siehe 4.4.2.1). Auffallend ist, dass es sich bei allen drei Arbeiten um Kollektive asiatische Patienten handelt (siehe auch 4.4.4).

Zusammenfassend zeigt der Vergleich von Studien die methodisch vergleichbar aufgebaut sind, dass sie unabhängig von der Primerwahl zu ähnlichen Ergebnissen kommen. Somit scheint die Wahl der Primer bei der Untersuchung von  $p16^{\text{INK4a}}$  eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Um diese Aussage untermauern zu können, müssten Studien gemacht werden, die in einem Versuchsaufbau bei gleicher Methodik verschiedene Primerpositionen untersuchen.

#### 4.4.2 Einfluss der PCR-Technik

Die Tabellen 4.1 und 4.2 zeigen, dass die Studien, in denen die Häufigkeit der aberranten  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung untersucht wurde, hinsichtlich des PCR-Verfahrens variieren. Insgesamt zeigt sich in den Studien auch eine deutliche Variation der Ergebnisse, allerdings unterscheiden sich die Studien häufig auch hinsichtlich des Untersuchungsmaterials, was die Vergleichbarkeit der Arbeiten erschwert.

##### 4.4.2.1 Methylierungs-spezifische PCR (MSP)

Aufbauend auf der Bisulfit-Konversion entwickelten Herman und Mitarbeiter 1996 eine MSP, bei der jeweils ein Primer-Paar so konzipiert wird, dass es entweder methylierte oder unmethylierte Promotor-Sequenzen bindet. Die konventionelle MSP hat inzwischen weite Verbreitung für den Methylierungsnachweis in Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Geweben gefunden. Bei den untersuchten Gewebeproben von NSCLC waren die nachgewiesenen Methylierungsfrequenzen überwiegend sehr ähnlich (25% - 41%, Mittelwert: 32%) (Ahrendt *et al.* 1999, Kim *et al.* 2001, Zöchbauer-Müller *et al.* 2001, Sanchez *et al.* 2001, Toyooka *et al.* 2002, Jarmalaite *et al.* 2003, Toyooka *et al.* 2003, Kim *et al.* 2006, Kashiwabara *et al.* 1998, Kurakawa *et al.* 2001, Yanagawa *et al.* 2003). Zu abweichenden Ergebnissen kommen wiederum drei chinesische Studien, in denen deutlich höhere Methylierungsfrequenzen in NSCLC-Gewebe nachwiesen wurden (Xie *et al.* 2006 - 63%, Chen *et al.* - 57%, Chan *et al.* 2002 - 64%) (siehe auch Kapitel 4.4.4). Chen und Mitarbeiter verwendeten eine besondere Methode: eine MSP nach Restriktionsenzym-Verdau. Diese Untersuchungsmethode wurde bislang von anderen Autoren hinsichtlich des Methylierungsnachweises von  $p16^{\text{INK4a}}$  am Lungenkarzinom nicht reproduziert.

#### 4.4.2.2 Methylierungs-spezifische 2-Schritt-PCR (2-Schritt-MSP)

Mit der Entwicklung einer neuartigen 2-Schritt-MSP erzielten Palmisano und Mitarbeiter im Jahre 2000 eine deutliche Steigerung der Sensitivität des Methylierungsnachweises. Die von ihnen verwendete PCR-Technik amplifiziert zunächst unabhängig vom Methylierungsstatus des betreffenden Zielgens einen Promotor-Abschnitt, der CpG-Inseln enthält. Im zweiten Amplifikationsschritt werden Primer verwendet, die wie bei einer konventionellen MSP jeweils spezifisch für methylierte und unmethylierte DNA sind. Da in einem zytologischen Präparat immer auch normale Zellen mit einer genspezifisch unmethylierten Promotorregion enthalten sind, ist die PCR mit dem „unmethylierten“ Primerset stets positiv. Mit dieser 2-Schritt-MSP ist es möglich, eine aberrante Promotor-Methylierung in Sputen, mit einer Nachweisrate von einem methylierten Allel in 10000 unmethylierten Allelen nachzuweisen. Bei zweifacher Durchführung des Assays sinkt die Nachweisgrenze auf 1:20000, bei dreifacher Durchführung sogar auf 1:50000 (Belinsky *et al.* 2006).

Ein zentrales Problem der 2-Schritt-MSP ist allerdings der hohe Anteil positiver Befunde bei Patienten ohne klinischen Tumornachweis. In verschiedenen Studien mit 2-Schritt-MSP wiesen bei Untersuchungen von Sputen mit dem Markergen  $p16^{\text{INK4a}}$  14% bis 35% (Mittelwert: 21%) der Nicht-Tumorpatienten aberrante Promotor-Methylierungen auf (Palmisano *et al.* 2000, Kersting *et al.* 2000, Gilliland *et al.* 2002, Belinsky *et al.* 2002, Belinsky *et al.* 2006, Belinsky *et al.* 2007). Ursächlich hierfür ist, dass die 2-Schritt MSP ebenso wie die konventionelle MSP ein Verfahren ist, das die Methylierung ausschließlich qualitativ nachweist. Eine lediglich wenige CpG-Dinukleotide betreffende, d.h. partielle und funktionell unbedeutende „low level“-Methylierung kann mit dieser Untersuchungsmethode nicht von einer dichten „high level“-Promotor-Methylierung unterschieden werden, wie sie oft bei der Inaktivierung von Genen zu beobachten ist. Gerade bei der hochsensitiven 2-Schritt-MSP kommen diese

Nachteile einer allein qualitativen Untersuchungsmethode in besonderer Weise zum Tragen und schränken den Nutzen für die Lungenkarzinom-Diagnostik ein.

Aberrante Promotor-Hypermethylierungen finden sich regelmäßig in exfoliativ-zytologischem Material von Rauchern und Ex-Rauchern (Zöchbauer-Müller *et al.* 2003). Auch der Versuch die gemeinsame Methylierung von mehreren Genen als Kriterium für ein positives Testergebnis zu verwenden, konnte die Treffsicherheit des qualitativen Methylierungsnachweises nicht wesentlich steigern: In einer Studie an Sputen von 190 Patienten zeigte eine als Multiplex-PCR konzipierte 2-Schritt-MSP eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 64% (Belinsky *et al.* 2006). In dieser Studie stammten 52% der getesteten Sputen von Tumorpatienten. Überträgt man die Studienergebnisse unter Verwendung des Bayes-Theorems auf eine reale Hoch-Risiko-Population von Patienten mit langfristigem Nikotinabusus und einer Tumorprävalenz von 2%, hätten lediglich 3,5% der Patienten mit positivem Testergebnis tatsächlich einen Tumor (Grote *et al.* 2007).

Belinsky und Mitarbeiter untersuchten in einer jüngst publizierten Studie neben Sputen auch Tumorgewebe von NSCLC mittels 2-Schritt-MSP (Belinsky *et al.* 2007). Mit 47% lag die Methylierungsfrequenz höher als in den Studien, die entsprechende Tumoren mittels konventioneller MSP untersucht hatten (siehe Tabelle 4.1).

#### **4.4.2.3 QMSP**

Die in dieser Arbeit verwendete QMSP zeichnet sich im Vergleich zu der konventionellen MSP durch eine deutliche Steigerung der Sensitivität und Spezifität aus. Die Sensitivität der QMSP liegt im Allgemeinen 10fach höher als die der konventionellen MSP (Eads *et al.* 2000). Die Erhöhung von Sensitivität und Spezifität wird durch die

zusätzlich zu den konventionellen methylierungs-spezifischen Primern verwendete TaqMan-Sonde erreicht (siehe Kapitel 1.3.3).

Darüber hinaus ermöglichte die Verwendung der real-time PCR-Technologie erstmals den quantitativen Methylierungsnachweis. Die Einführung von internen Referenzgenen erlaubte zum einen Rückschlüsse auf den Erfolg der Bisulfitkonversion, und zum anderen ermöglichte sie die Festlegung von Schwellenwerten, sogenannten Cut-off-Werten (Virmani *et al.* 2002). Bei dem untersuchten Gen der vorliegenden Arbeit war die Einführung eines Schwellenwertes nicht notwendig, da in keinem Bronchialaspirat der Kontrollgruppe eine aberrante Methylierung des  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors nachzuweisen war. Auch in anderen Studien wurde unter Verwendung der QMSP keine aberrante Methylierung in Geweben oder Bronchialaspiraten der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotorregion bei Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung gefunden (Shivapurkar *et al.* 2007, Topaloglu *et al.* 2004, Grote *et al.* 2005).

Durch Shivapurkar und Mitarbeiter wurde jüngst eine grundsätzliche Eignung der QMSP für die Lungenkarzinom-Diagnostik an Sputen belegt (Shivapurkar *et al.* 2007). Anzumerken ist, dass in dieser Studie in den Sputen der Nicht-Tumorpatienten eine 10%ige Methylierungsfrequenz festgestellt wurde. Jedoch findet sich eine überraschend große Spannweite der Ergebnisse unter Anwendung der QMSP bei der Untersuchung von formalinfixierten in Paraffin eingebetteten NSCLCs (17-100% siehe Tabelle 4.1 b).

#### 4.4.3 Einfluss des Untersuchungsmaterials

Das Spektrum der für molekularbiologische Untersuchungen verwendeten Untersuchungsmaterialien reicht von in Formalin fixierten Gewebeproben bis hin zu ethanolfixierten Exfoliativzytologien, die im Laufe der klinischen Diagnostik gewonnen wur-

den. Dazu gehören die besonders für die Krebsfrüherkennung interessanten Sputen und die im Rahmen einer Bronchoskopie entnommenen Bronchialsekrete, Bronchiallavagen und bronchoalveoläre Lavagen.

Die molekularbiologische Untersuchung der DNA wird bei Gewebeproben durch die mit einer Formalinfixierung einhergehende zum Teil starke Degradierung und chemische Modifikation der DNA erschwert (Srinivasan *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu wird bei der für die Exfoliativzytologie genutzten Fixierung mit Saccomanno-Fixativ die DNA in einem hochmolekularen und chemisch unmodifizierten Zustand erhalten. So ist eine problemlose molekulare Analyse möglich (Grote *et al.* 2003 b).

Im Jahr 2000 zeigte die Arbeitsgruppe von Palmisano erstmals, dass sich der Nachweis aberranter Methylierungen von Gen-Promotoren für die Tumordiagnostik in der Exfoliativzytologie nutzen lässt. In dieser Arbeit und in darauf folgenden Studien fand sich bei der Untersuchung von Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung mittels 2-Schritt-MSP in Sputen mit 14-35% eine höhere Methylierungsfrequenz als sie in Lungengewebe mit konventioneller MSP nachgewiesen wurde (Tabelle 4.1 und 4.2). Ursächlich hierfür könnte die Kontamination des Sputums mit Zellen aus dem Nasen-Rachenraum sein, da auch diese dem Tabakrauch exponiert sind und häufig aberrante  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungen aufweisen. Allerdings finden sich in einer Studie von Kersting und Mitarbeitern aus dem Jahre 2000 in der Kontrollgruppe ähnlich hohe Werte, obwohl hier Bronchialaspirate untersucht wurden, d.h. zytologische Präparate ohne wesentliche Kontamination durch Zellen der Mund- und Nasenregion. Es ist daher wahrscheinlicher, dass der relativ hohe Prozentsatz positiver Befunde auf die 2-Schritt-MSP-Technik zurückzuführen ist.

Insgesamt zeigt sich bei Sputen, die mittels 2-Schritt-MSP untersucht wurden, eine größere Streuung der Ergebnisse als bei Untersuchungen am formalinfixierten in Paraffin eingebetteten Gewebe mittels konventioneller MSP. Bei Patienten mit einem

NSCLC liegt die Häufigkeit des Nachweises einer aberranten  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung in Sputen mittels 2-Schritt-MSP und in Geweben mittels konventioneller MSP in einer ähnlichen Größenordnung (Mittelwert ca. 40%). Eine Ausnahmestellung nimmt eine frühe Arbeit von Ahrendt *et al.* (1999) ein. Unter Verwendung der weniger sensitiven konventionellen MSP detektierten sie eine Methylierungsfrequenz von 63% in Bronchialaspiraten von Patienten mit einem NSCLC.

#### 4.4.4 Einfluss der ethnischen Herkunft des Patientenkollektives

Die meisten Studien, die den Methylierungsstatus des  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors untersuchen, wurden in westlichen Ländern durchgeführt, sodass sich die Patientenpopulationen überwiegend aus Kaukasiern zusammensetzen. Es ist bekannt, dass genetische Polymorphismen ethnische Einflussfaktoren aufweisen. Es ist daher naheliegend zu untersuchen, ob auch bei epigenetischen Alterationen die Ethnie von Bedeutung ist. So ist denkbar, dass auch die Methylierungsfrequenz des  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors eine Abhängigkeit von der ethnischen Herkunft der Patienten aufweist.

Die Literaturanalyse zur Methylierungsfrequenz von  $p16^{\text{INK4a}}$  zeigt in chinesischen Studien eine auffallend große Anzahl von Patienten mit positivem Methylierungsnachweis. In diesen Studien beträgt die  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenz bei NSCLC im Mittel ca. 65% (Chan *et al.* 2002, Chen *et al.* 2002, Liu *et al.* 2003, Xie *et al.* 2006). Sie liegt somit deutlich über den Ergebnissen von Studien an Patienten mit überwiegend kaukasischer Bevölkerung (siehe Tabelle 4.4.4). Xie und Mitarbeiter detektierten mittels konventioneller MSP sogar bei 25% der Nicht-Tumorpatienten eine  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung.

Der überwiegende Teil von Studien aus den USA, Australien und Europa fand in NSCLC  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenzen von im Mittel bis maximal 41% (siehe Ta-

belle 4.4.4). Auch in Arbeiten aus Korea und Japan, das heißt mit asiatischer Population, wurden ähnlich niedrige Methylierungsfrequenzen wie die westlichen Studien ermittelt (siehe Tabelle 4.4.4).

Tabelle 4.4.4:  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenzen von NSCLC in Studien mit Patienten verschiedener ethnischer Herkunft.

Herkunft	Mittelwert <sup>2</sup> /Spw.	Quellen
China	66% (57-79%)	Chan <i>et al.</i> 2002, Chen <i>et al.</i> 2002, Liu <i>et al.</i> 2003, Xie <i>et al.</i> 2006
Japan	34% (31-38%)	Kurakawa <i>et al.</i> 2001, Yanagawa <i>et al.</i> 2003 Yanagawa <i>et al.</i> 2003, Kashiwabara <i>et al.</i> 1998
Korea	32% (28-35%)	Kim <i>et al.</i> 2001, Kim <i>et al.</i> 2006
Europa	41%	Jarmalaite <i>et al.</i> 2003
Australien	25%	Zöchbauer- Müller <i>et al.</i> 2001
USA	33% (17-47%)	Harden <i>et al.</i> 2003, Sanchez <i>et al.</i> 2001, Shivapurkar <i>et al.</i> 2007, Toyooka <i>et al.</i> 2001, Belinsky <i>et al.</i> 2007, Topaloglu <i>et al.</i> 2004, Ahrendt <i>et al.</i> 1999

<sup>1</sup>Herkunft der Patienten im untersuchten Kollektiv

<sup>2</sup>Mittelwert der Methylierungsfrequenzen von NSCLC im Gewebe in den unter <sup>3</sup> aufgelisteten Studien  
Spw.= Spannweite

Chan und Mitarbeiter erklärten sich die im Vergleich zu übrigen Literaturangaben hohe  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierungsfrequenz von  $p16^{\text{INK4a}}$  in Arbeiten mit chinesischen Patientenkollektiven mit den zugrunde liegenden ethnischen Differenzen. Dies steht im Widerspruch zu einer multinationalen Studie von Toyooka und Mitarbeitern aus dem Jahre 2003. Sie untersuchten mittels konventioneller MSP Lungengewebe von Patienten aus den USA, Australien, Japan und auch Taiwan und stellten keinen Einfluss der geographischen Unterschiede auf die Methylierungshäufigkeit von  $p16^{\text{INK4a}}$  fest.

#### 4.5 Zytologie und Biomarker in Hinblick auf Krebsfrüherkennung und Invasivität

Die lange symptomlose Phase des Lungenkarzinoms und der daraus resultierende späte Zeitpunkt der Diagnosestellung stellt eine der Hauptproblematiken in der Bekämpfung dieser Tumorerkrankung dar. Die histologische Sicherung eines Tumors erfolgt im klinischen Verlauf erst sehr spät, sodass die Entwicklung einfacher zuver-

lässiger und für den Patienten weniger belastender Verfahren insbesondere im Hinblick auf die Krebsfrüherkennung erstrebenswert ist.

Die zytologische Untersuchung der in der Bronchoskopie gewonnenen Bronchialaspirate stellt eine minimal-invasive Diagnostik dar. Jedoch steht hier eine geringe Anzahl von Tumorzellen einer großen Anzahl Nicht-Tumorzellen gegenüber, da die Bronchialaspirate aus allen Bereichen der Lunge abgeschilferte Zellen enthalten. Es kann zu einem sogenannten „Sampling Error“ kommen, wobei trotz Vorliegens eines Lungentumors keine Tumorzellen im Bronchialaspirat vorhanden sind. Darüber hinaus besteht die Gefahr eines sogenannten „Screening Errors“, bei dem im Ausstrichpräparat vorhandene Tumorzellen bei der zytologischen Untersuchung mittels Lichtmikroskops übersehen wurden. In der vorliegenden Studie waren bei 25 der 176 Bronchialaspirate von Tumorpatienten eine zytologisch falsch-negative Diagnose gestellt worden, wobei 96% der Fälle auf einen „Sampling Error“ und nur 4% auf einen „Screening Error“ zurückzuführen waren.

Im Verlauf der Karzinogenese müssen Epithelzellen multiple genetische Alterationen akkumulieren, um einen malignen Phänotyp zu erwerben. Das bedeutet, dass Zellen, die bereits Mutationen oder epigenetische Veränderungen erworben haben, phänotypisch unauffällig sein können und mit rein morphologischer Diagnostik nicht detektierbar sind.

Die Entwicklung möglichst sensitiver Verfahren zur Ergänzung der konventionellen zytologischen und histologischen Tumor-Diagnostik ist insbesondere in Hinblick auf die Krebsfrühdagnostik entscheidend. Bereits 1998 postulierte eine Arbeitsgruppe um Belinsky, dass epigenetische Biomarker geeignet sein könnten Veränderungen zu detektieren, die schon früh in der Kanzerogenese auftreten (Belinsky *et al.* 1998).

In der Literatur finden sich Arbeiten, die die potentielle Eignung einer aberranten Methylierung des  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors als Biomarker zur Krebsfrüherkennung im Ver-

gleich zur konventionellen Zytologie untersuchten. Palmisano und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 2000 mittels 2-Schritt-MSP unter anderem Sputen von Patienten, welche teilweise weit vor der Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms gewonnen wurden. Interessanterweise konnte in allen Sputen der 11 Patienten, die in einem Zeitraum zwischen 5 und 35 Monaten vor der Diagnosestellung eines Lungenkarzinoms gewonnen wurden, der Nachweis einer  $p16^{\text{INK4a}}$ -Hypermethylierung erbracht werden. Die zeitgleich durchgeführte zytologische Untersuchung war nur in einem Fall eindeutig positiv. In einer anderen Studie wurde die Methylierungshäufigkeit eines Marker-Panels bestehend aus  $p16^{\text{INK4a}}$ , *RARB2*, *DAP-Kinase* und *MGMT* in Bronchialaspiraten untersucht (Chan *et al.* 2002). Bei zeitgleich negativer zytologischer Untersuchung wurde in 41 Proben eine Methylierung mindestens eines der Markergene nachgewiesen. Bei 35 dieser Fälle wurde in einem Zeitraum von zwei Tagen bis zu drei Monaten nach der Untersuchung eine maligne Entartung der Lunge diagnostiziert.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass für eine Anwendbarkeit eines Untersuchungsverfahrens nicht nur eine ausreichende Sensitivität, sondern auch eine ausreichende Spezifität gewährleistet sein muss. Bei Palmisano *et al.* (2000) wurde in 15% der Nicht-Tumorpatienten eine  $p16^{\text{INK4a}}$ -Methylierung nachgewiesen und auch in der Arbeit von Chan *et al.* wurden Methylierungen detektiert, obwohl es sich um Bronchialaspirate von Patienten handelte, die zumindest zu diesem Zeitpunkt keine maligne Entartung der Lunge aufwiesen. Jedoch handelte es sich in beiden Studien um Patienten, die zu einer Hochrisikogruppe für Lungenkrebs gehörten.

Diese Studien verdeutlichen, dass  $p16^{\text{INK4a}}$  trotz gewisser Einschränkungen, eine potentielle Eignung als Biomarker für die Krebsfrüherkennung besitzt. Aufgrund der zumeist langen symptomlosen Phase der Lungenkarzinome bietet sich so die

Chance, Tumore zu diagnostizieren, bevor sie ein fortgeschrittenes Stadium erreicht haben.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Methylierungsstatus des  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors an Material der pulmonalen Exfoliativzytologie untersucht und seine Eignung als Tumormarker für die molekularzytologische Diagnostik des Lungenkarzinoms überprüft. Der Nachweis der  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor-Methylierung erfolgte an DNA aus Bronchialaspiraten (Bronchialsekrete, Bronchiallavagen, bronchoalveoläre Lavagen) nach Bisulfitkonversion mittels quantitativer methylierungs-spezifischer PCR (QMSP). Dabei wurde Restmaterial der konventionellen zytologischen Diagnostik verwendet, sodass keine zusätzlichen, für den Patienten belastenden, Untersuchungen notwendig waren. Es wurden 237 Bronchialaspirate (176 Lungenkarzinom- und 61 Nicht-Tumorfälle) in die Untersuchung einbezogen.

Eine aberrante Promotor-Methylierung wurde insgesamt bei 18,2% der Bronchialaspirate von Tumorpatienten und in keinem der Bronchialaspirate der Nicht-Tumorpatienten nachgewiesen. Damit ist die Spezifität des Nachweises in  $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotormethylierung prinzipiell hinreichend, um sicher eine Tumordiagnose stellen zu können und  $p16^{\text{INK4a}}$  als spezifischen Tumormarker für die Lungenkarzinom-Diagnostik zu nutzen. Insbesondere die Diagnosestellung von Plattenepithelkarzinomen scheint möglich. Bei 40,4% der Bronchialaspiraten von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom wurde eine aberrante Promotor-Methylierung von  $p16^{\text{INK4a}}$  gefunden. Ob  $p16^{\text{INK4a}}$  auch in der Krebsfrüherkennung nutzbar ist, muss noch in weiteren Studien untersucht werden. Aber schon jetzt zeichnet sich  $p16^{\text{INK4a}}$  als vielversprechender molekularer Biomarker in der Lungenkrebsdiagnostik ab.

## 6. Literaturverzeichnis

Antequera F., Boyes J., Bird A.: High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62, 503-514 (1990)

Ahrendt S.A., Chow J.T., Xu L.H., Yang S.C., Eisenberger C.F., Esteller M., Herman J.G., Wu L., Decker P.A., Jen J., Sidransky D.: Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluids from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst*; 91: 332-339 (1999)

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland: Krebs in Deutschland. Saarbrücken 4. Ausgabe (2004)

Attwood J.T., Yung R.L., Richardson B.C.: DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.*;59:241-257 (2002)

Barrett M.T., Sanchez C.A., Prevo L.J., Wong D.J., Galipeau P.C., Paulson T.G., Rabinovitch P.S., Reid B.J.: Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nat. Genet.* 22, 106-109 (1999)

Bastian P.J., Waha A., Müller S., von Rücker A.: Epigenetische Veränderungen in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms. *Deutsches Ärzteblatt.*;27: Seite A-1981, B-1654, C-1588 (2004)

Behn M., Thiede C., Neubauer A., Pankow W., Schuermann M.: Facilitated detection of oncogene mutations from exfoliated tissue material by PNA-mediated <enriched PCR> protocol. *J Pathol* 190:69-75 (2000)

Belinsky S.A., Palmisano W.A., Gilliland F.D., Crooks L.A., Divine K.K., Winters S.A., Grimes M.J., Harms H.J., Tellez C.S., Smith T.M., Moots P.P., Lechner J.F., Stidley C.A., Crowell R.E.: Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res*; 62: 2370-2377 (2002)

Belinsky S.A., Liechty K.C., Gentry F.D., Wolf H.J., Rogers J., Vu K., Haney J., Kennedy T.C., Hirsch F.R., Miller Y., Franklin W.A., Herman J.G., Baylin S.B., Bunn P.A., Byers T.: Promotor hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res.* 66, 3338-3344 (2006)

Belinsky S.A., Grimes M.J., Casas E., Stidley C.A., Franklin W.A., Bocklage T.J., Johnson D.H., Schiller J.H.: Predicting gene promoter methylation in non-small-cell lung cancer by evaluating sputum and serum. *Br J Cancer.* 23; 96(8), 1278-83.(2007)

Bird A., CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213 (1986)

Bird A.: DNA methylation patterns and epigenic memory. *Genes Dev* 16: 6-21 (2002)

Böcking A., Biesterfeld S., Chatelain R., Gien-Gerlach G., Esser E.: Diagnosis of bronchial carcinoma on sections of paraffin-embedded sputum. Sensitivity and specificity of an alternative to routine cytology. *Acta Cytologica*; 36(1): 37-47 (1992)

Böcking A., Klose K.C., Kyll H.J., Hauptmann S.: Cytologic versus histologic evaluation of needle biopsy of the lung, hilum and mediastinum. Sensitivity, specificity and typing accuracy. *Acta Cytologica*; 39(3): 463-471 (1995)

Böcking A.: Skriptum zum Kurs der Histopathologie für Zahnmediziner, 6. Auflage (1998)

Brabender J, Usadel H, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Wickramasinghe K, Lum CE, Park JM, Salonga D, Singer J, Sidransky D, Hölscher AH, Meltzer SJ, Danenberg PV: Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. *Oncogene* 20: 3528-3532 (2001).

Busch U., Pecoraro S.: Arbeitsschritte für die Durchführung einer PCR-Analyse. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (2007)

Chan E.C., Lam S.Y., Tsang K.W., Lam B., Ho J.C., Fu K.H., Lam W.K., Kwong Y.L.: Aberrant promoter methylation in Chinese patients with non-small cell lung cancer: patterns in primary tumors and potential diagnostic application in bronchoalveolar lavage. *Clin Cancer Res* 8: 3741-3746 (2002)

Chen J.T., Chen Y.C., Wang Y.C., Tseng R.C., Chen C.Y., Wang Y.C.: Alterations of the p16INK4a gene in resected nonsmall cell lung tumors and exfoliated cells within sputum. *Int J Cancer* 98: 724-731 (2002)

Clayton S.J., Scott F.M., Walker J., Callaghan K., Haque K., Liloglou T., Xinarianos G., Shawcross S., Ceuppens P., Field J.K. Fox J.C.: K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. *Clin Chem*; 46: 1929-1938 (2000)

Doerfler W.: DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 52;93-124 (1983)

Eads C.A., Danenberg K.D., Kawakami K., Saltz L.B., Blake C., Shibata D., Danenberg P.V., Laird P.W.: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 28, E32 (2000)

Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B., Herman J.G.: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61, 3225-3229 (2001)

Esteller M.: CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes.: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 21: 5427-5440 (2002)

Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 1827-1831 (1992)

Gilliland F.D., Harms H.J., Crowell R.E., Li Y.F., Willink R., Belinsky S.A.: Glutathione S-transferase P1 and NADPH quinone oxidoreductase polymorphisms are associated with aberrant promoter methylation of P16 (INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyl-transferase in sputum. *Cancer Res* 62: 2248-2252 (2002)

Gonzalez-Zulueta M., Bender C.M., Yang A.S., Nguyen T., Beart R.W., Van Tornout J.M., Jones P.A.: Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 55, 4531-4535 (1995)

Grote H.J., Schmiemann V., Kiel S., Böcking A., Kappes R., Gabbert H.E., Sarbia M.: Aberrant methylation of the APC gene promotor 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer (2003 a)

Grote H.J., Schmiemann V., Sarbia M., Böcking A.: DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: which method to take? *Anal Cell Pathol* 25; 83-88 (2003 b)

Grote H.J., Schmiemann V., Geddert H., Kiel S., Kappes R., Rohr U., Gabbert H.E., Böcking A.: Aberrant promotor methylation of p16INK4a, RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int. J. Cancer* 110: 751-755 (2005)

Grote H.J., Schmiemann V., Kazimirek M., Böcking A.: Quantitative methylation-specific PCR for the diagnosis of lung cancer. *Pathologe* 28(5): 377-83 (2007)

Hajkova P., el-Maarri O., Engemann S., Oswald J., Olek A., Walter J.: DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method. *Mol Biol.* 200:143-154 (2002)

Hanahan D., Weinberg R.A.: The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000)

Harden S.V., Tokumaru Y., Westra W.H., Goodman S., Ahrendt S.V., Yang S.C., Sidransky D.: Gene promoter hypermethylation in tumor and lymph nodes of stage I lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 9: 1370-1375 (2003)

Hecht, S.S.: Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 91, 1194-1210 (1999)

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986-994 (1996)

Henschke C.I., McCauley D.I., Yankelevitz D.F., Naidich D.P., McGuinness G., Miettinen O.S., Libby D.M., Pasmantier M.W., Koizumi J., Altorki N.K., Smith J.P.: Early lung cancer action project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet* 354: 99-105 (1999)

Herman J.G., Merlo A., Mao L., Lapidus R.G., Issa J.P., Davidson N.E., Sidransky D., Baylin S.B.: Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 55, 4525-4530 (1995)

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR : a novel PCR assay for methylation status of CpG islands *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821-9826 (1996)

Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H.: Detection of specific polymerase chain reaction product utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Sci. USA* 88, 7276-7280 (1991)

Holliday R.: DNA methylation and epigenetic mechanisms. *Cell Biophys* 15:15-20 (1989)

Jarmalaite S., Kannio A., Anttila S., Lazutka J.K., Husgafvel-Pursiainen K.: Aberrant p16 promotor methylation in smokers and former smokers with nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 106(6) ;913-8 (2003)

Jones P.A., Laird P.W.: Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet* 21: 163-167 (1999)

Jones P.A., Baylin S.B.: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415-428 (2002)

Kashiwabara K., Oyama T. et al.: Correlation between methylation status of the p16/CDKN2 gene and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers. *Int. J Cancer*, 79:215-220 (1998)

Kersting M., Friedl C., Kraus A., Behn M., Pankow W., Schuermann M.: Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol*; 18: 3221-3229 (2000)

Keshet I., Lieman-Hurwitz J., Cedar H.: DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 44, 535-543 (1986)

Kim D.H., Nelson H.H., Wiencke J.K., Zheng S., Christiani D.C., Wain J.C., Mark E.J., Kelsey K.T.: p16INK4a and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*; 61: 3419-3424 (2001)

Kim J.S., Kim J.W., H. Joungho, Shim Y.M., Park J., Kim D.: Cohypermethylation of p16 and FHIT Promoters as a Prognostic Factor of Recurrence in Surgically Resected Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 66 (2006)

Konietzko, N., Fabel, H.(Hrsg.): *Weißbuch Lunge*. Thieme, Stuttgart New York (2000)  
Kreuzer M., Kreienbrock L., Gerken M., Heinrich J., Bröske-Hohlfeld I., Müller K.M., Wichmann H.E.: Risk factors for lung cancer in young adults. *Am J Epidemiol*; 147: 1028-1037 (1998)

Kreuzer M., Müller, K.M., Gerken, M., Wichmann, H.E.: Lung cancer histologic types and age of onset. *Cancer* 85, 1958-1965 (1999)

Kurakawa E., Shimamoto T., Utsumi K., Hirano T., Kato H., Ohyashiki K.: Hypermethylation of p16(INK4a) and p15(INK4b) genes in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*; 19: 277-281 (2001)

Li E., Beard C., Jaenisch R.: Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*; 366: 362-365 (1993)

Liu Y., An Q., Li L., Zhang D., Huang J., Feng X., Cheng S., Gao Y.: Hypermethylation of p16INK4a in Chinese lung cancer patients: biological and clinical implications. *Carcinogenesis* ;24; 1897-1901 (2003)

Mannino D.M., Ford E., Giobanni G.A., Thun M.: Lung cancer deaths in the United States from 1979 to 1992: an analysis using multiple-cause mortality data. *Int J Epidemiol*; 27: 159-166 (1998)

Merlo A., Herman J.G., Mao L., Lee D.J., Gabrielson E., Burger P.C., Baylin S.B., Sidransky D.: 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* 1, 686-692 (1995)

Mills N.E., Fishman C.L., Scholes J., Anderson S.E., Rom W.N., Jacobson D.R.: Detection of K-ras oncogene mutations in bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer diagnosis. *J Natl Cancer Inst* 87:1056-1060 (1995)

Müller, K.M.: Neues zur Pathologie der Lungentumoren. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 83, 168-183 (1999)

Osann, K.E.: Epidemiology of lung cancer. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 4, 198-204 (1998)

Ota N., Kawakami K., Okuda T., Takehara A., Hiranuma C., Oyama K., Ota Y., Oda M., Watanabe G.: Prognostic significance of p16(INK4a) hypermethylation in non-small cell lung cancer is evident by quantitative DNA methylation analysis. *1: Anticancer Res.*; 26(5B) 3729-32. (2006)

Palmisano W.A., Divine K.K., Saccomanno G., Gilliland F.D., Baylin S.B., Herman J.G., Belinsky S.A.: Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res*; 60: 5954-5958 (2000)

Parkin D.M., Bray F.I., Devesa S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37:4-66 (2001)

Pfeifer G.P., Steigerwald S.D., Mueller P.R., Wold B., Riggs A.D.: Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science*; 246: 810-813 (1989)

Riggs A.D., Pfeifer G.P.: X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet.* 8(5):169-74. (1992)

Saccomanno G., Saunders R.P., Ellis H., Acher V.E., Wood B.G, Beckler P.A.: Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum. *Acta Cytol.* 7:305-10 (1963)

Sambrook J., Russel D.W.:Molecular Cloning-A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001)

Sanchez-Cespedes M., Decker P.A., Doffek K.M., Esteller M., Westra W.H., Alawi E.A., Herman J.G., Demeure M.J., Sidransky D., Ahrendt S.A.: Increased Loss of Chromosome 9p21 but not p16 Inactivation in Primary Non-Small Cell Lung Cancer from Smokers.*Cancer Research* 61, 2092–2096 (2001)

Schreiber G., McCrory D.C.: Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summery of published evidence. *Chest* 123 Suppl 1, 115S-128S (2003)

Sherr C.J., G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-555 (1994)

Shivapurkar N., Stastny V., Suzuki M., Wistuba II., Li L., Zheng Y., Feng Z., Hol B., Prinsen C., Thunnissen F.B., Gazdar A.F. Application of a methylation gene panel by quantitative PCR for lung cancers.*Cancer Lett.* ;247(1):56-71. (2007)

Solbin L., Wittekind C. TNM classification of malignant tumors, 5th ed. New York: John Wiley, (1997)

Somers V.A., van Henten A.M.J., ten Velde G.P.M., Arends J.W., Thunnissen F.B.J.M.: Additional value of K-ras point mutations in bronchial wash fluids for diagnosis of peripheral lung tumors. *Eur Respir J* 13: 1120-1124 (1999)

Soria J.C., Rodriguez M., Liu D.D., Lee J.J., Hong W.K., Mao L.: Aberrant promoter methylation of multiple genes in bronchial brush samples from former cigarette smokers. *Cancer Res* 62: 351-355 (2002)

Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S.: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J pathol* 161, 1961-1971 (2002)

Swensen S.J., et al Lung cancer screening with CT: Mayo Clinic experience. *Radiology* 226, 756-761 (2003)

Szyf M.: The DNA methylation machinery as a target for anticancer therapy. *Pharmacol Ther.* 70:1-37 (1996)

Thun, M.J., Lally, C.A., Flannery, J.T., Calle, E.E., Flanders, W.D., Heath, C.W. Jr: Cigarette smoking and changes in the histopathologic of lung cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 89, 1580-1586 (1997)

Topaloglu O., Obaidul H., Tokumaru Y., Lee J., Ratovitski E., Sidransky D., Mool C.-S.: Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res*; 10: 2284-2288 (2004)

Toyooka S., Toyooka K.O., Maruyama R., Virmani A.K., Girard L., Miyajima K., Harada K., Ariyoshi Y., Takahashi T., Sugio K., Brambilla E., Gilcrease M., Minna J.D., Gazdar A.F.: DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther* 1: 61-67 (2001)

Toyooka S., Maruyama R., Toyooka K.O., McLarren D., Feng Z., Fukuyama Y., Virmani A.K., Zöchbauer-Müller S., Tsukuda K., Sugio K., Shimizu M., Shimizu K., et al.: Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int. J Cancer* 103: 153-160 (2003)

Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E, Sobin LH, eds. *Histological typing of lung and pleural tumors*. 3rd ed. WHO International Histological Classification of Tumors. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1999)

Travis W.D., Brambilla E., Müller-Hermelink H.K., Harris C.C. eds.: *WHO-Classification of tumors. Pathology of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC-Press, Lyon (2004)

Tremblay K.D., Saam J.R., Ingram R.S., Tilghman S.M., Barolomei M.S.: A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nat Genet*; 9: 407-413 (1995)

Virmani A.K., Tsou J.A., Siegmund K.D., Shen L.Y.Y.C., Long T.I., Laird P.W., Gazdar A.F., Laird-Offringa I.A.: Hierarchical clustering of lung cancer cell lines using DNA methylation markers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention* 11, 291-297 (2002)

Waki T., Tamura G., Sato M., Motoyama T.: Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene* 22: 4128-33 (2003)

Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control *Cell* 81, 323-330 (1995)

Xie G., Hou A., Li L., Gao Y., Cheng S.: Aberrant p16 promoter hypermethylation in bronchial mucosae as a biomarker for the early detection of lung cancer. *Chinese Medical Journal*; 119 (17), 1469-1472 (2006)

Yakubowskaya M.S., Spiegelman V., Luo F.C., Malaev S., Salnev A., Zborovskaya I., Gasparyan A., Polotsy B., Machaladze Z., Trachtenberg A.C., Belitsky G.A., Ronai Z.: High frequency of K-ras mutations in normal appearing lung tissues and sputum of patients with lung cancer. *Int J Cancer* 63: 810-814 (1995)

Yanagawa N., Tamura G., Oizumi H., Takahashi N., Shimazaki Y., Motoyama T.: Pro-moter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Sci*; 94: 589-592 (2003)

Zheng S., Chen P., McMillan A., Lafuente A., Lafuente M.J., Ballesta A., Trias M., Wiencke J.K.: Correlations of partial and extensive methylation at the p14(ARF) locus with reduced mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors. *Carcinogenesis*. 21(11): 2057-64 (2000)

Zöchbauer-Müller S., Fong K.M., Virmani A.K., Geradts J., Gazdar A.F., Minna J.D.: Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 61: 249-255, (2001)

Zöchbauer-Müller S., Minna J.D., Gazdar A.F.: Aberrant DNA methylation in lung cancer: biological and clinical implications. *Oncologist* 7, 451-457 (2002)

Zöchbauer-Müller S., Lam S., Toyooka S., Virmani A.K., Toyooka K.O., Seidl S., Minna J.D., Gazdar A.F.: Aberrant methylation of multiple genes in the upper aerodigestive tract epithelium of heavy smokers. *Int J Cancer* 107:612-616 (2003)

## 7. Abkürzungen

A	Adenin
AC	Adenokarzinom
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
arithm. Mittel	arithmetisches Mittel
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-Phosphodiesterbindung-Guanin (Dinukleotid)
CpG	Cytosin-Phosphodiesterbindung-Guanin (Dinukleotid)
cSCLC	kombiniertes kleinzelliges Karzinom
CT	Comutertomographie
d.V.	dringender Verdacht
<i>DAP-kinase</i>	Dihydroxyacetonphosphat- kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälber Serum
G	Guanin
HCl	Salzsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
<i>MGMT</i>	Methyl-Guanine-DNA Methyltransferase
MSP	Methylierungs-spezifische PCR
<i>MYOD1</i>	<i>Myogenic Differentiation Antigen 1</i>
NaOH	Natriumhydroxid

---

NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NT-Pat.	Nicht-Tumorpatient
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
QMSP	Quantitative methylierungs-spezifische PCR
<i>RARB2</i>	<i>Retinoic Acid Receptor Beta 2</i>
rpm	<i>rotation per minute</i>
SCC	Plattenepithelkarzinom
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SD	Standardabweichung
Spw.	Spannweite
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tu+	Bronchialaspirat mit wenigen Tumorzellen
Tu++	Bronchialaspirat mit zahlreichen Tumorzellen
Tu-Pat.	Tumorpatient
zw.	zweifelhaft
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan

## 8. Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	Anne Krücken geboren am 18.06.1980 in Düren ledig
<b>Schullaufbahn</b>	1986-1990 Besuch der Grundschule 1990-1999 Besuch des Leibniz-Gymnasiums Dormagen Hackenbroich 06/1999 Abitur
<b>Studium</b>	WS 99/00- SS 05 Zahnmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
<b>Prüfungen</b>	10/2000 Naturwissenschaftliche Vorprüfung 03/2002 Zahnärztliche Vorprüfung 06/2005 Zahnärztliche Prüfung
<b>Berufslaufbahn</b>	11/2005- 06/2008 Assistenzärztin, Praxis Dr. Nolte, Köln ab 06/2008 Angestellte Zahnärztin Praxis C. Nordmann, Köln
<b>Promotion</b>	11/2003- 07/2008 Dissertation am Institut für Cytopathologie der Heinrich Heine- Universität Düsseldorf, unter Anleitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. A. Böcking

Anne Krücken

## **Aberrante Methylierung des $p16^{INK4a}$ -Promotors als Tumormarker für die molekularzytologische Diagnostik des Lungenkarzinoms an Bronchialaspiraten**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Methylierungsstatus des  $p16^{INK4a}$ -Promotors an Material der pulmonalen Exfoliativzytologie untersucht und seine Eignung als Tumormarker für die molekularzytologische Diagnostik des Lungenkarzinoms überprüft. Der Nachweis der  $p16^{INK4a}$ -Promotor-Methylierung erfolgte an DNA aus Bronchialaspiraten (Bronchialsekrete, Bronchiallavagen, bronchoalveoläre Lavagen) nach Bisulfitkonversion mittels quantitativer methylierungs-spezifischer PCR (QMSP). Dabei wurde Restmaterial der konventionellen zytologischen Diagnostik verwendet, sodass keine zusätzlichen, für den Patienten belastenden, Untersuchungen notwendig waren. Es wurden 237 Bronchialaspirate (176 Lungenkarzinom- und 61 Nicht-Tumorfälle) in die Untersuchung einbezogen.

Eine aberrante Promotor-Methylierung wurde insgesamt bei 18,2% der Bronchialaspirate von Tumorpatienten und in keinem der Bronchialaspirate der Nicht-Tumorpatienten nachgewiesen. Damit ist die Spezifität des Nachweises in  $p16^{INK4a}$ -Promotormethylierung prinzipiell hinreichend, um sicher eine Tumordiagnose stellen zu können und  $p16^{INK4a}$  als spezifischen Tumormarker für die Lungenkarzinom-Diagnostik zu nutzen. Insbesondere die Diagnosestellung von Plattenepithelkarzinomen scheint möglich. Bei 40,4% der Bronchialaspiraten von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom wurde eine aberrante Promotor-Methylierung von  $p16^{INK4a}$  gefunden. Ob  $p16^{INK4a}$  auch in der Krebsfrüherkennung nutzbar ist, muss noch in weiteren Studien untersucht werden. Aber schon jetzt zeichnet sich  $p16^{INK4a}$  als vielversprechender molekularer Biomarker in der Lungenkrebsdiagnostik ab.