

„Molekulare Charakterisierung von primären und fortgeschrittenen Lungenkarzinomen“

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Astrid Rohrbeck

aus Magdeburg

5. Dezember 2006

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD. Dr. med. Ralf Kronenwett
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Rolf Wagner

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

I- III

1. Einleitung

1.1. Das Lungenkarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2. Klinische Manifestation	2
1.1.3. Histologie	3
1.1.4. Stadien und Prognose	4
1.1.5. Zeitlicher Ablauf morphologischer Veränderungen in der Tumorigenese von Lungenkarzinomen	7
1.1.6. Invasion und Metastasierung	9
1.1.7. Genetische Veränderungen	9
1.1.7.1. Genetische Veränderungen im kleinzelligen und nichtkleinzelligen Lungenkarzinom	11
1.1.7.2. Genetische Veränderungen im kleinzelligen Lungenkarzinom	14
1.1.7.3. Genetische Veränderungen im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom	14
1.1.7.4. Genetische Veränderungen in Assoziation mit der Metastasierung	16
1.2. Therapie des Lungenkarzinoms	17
1.2.1. Klassische Therapie	17
1.2.2. EGFR „epidermal growth factor receptor“ als therapeutische Zielstruktur	18
1.2.3. Erlotinib	19
1.3. Aufgabenstellung und Zielsetzung	20

2. Material und Methoden

2.1. Material	21
2.1.1. Chemikalien	21
2.1.2. Puffer, Gele und Lösungen	22
2.1.3. Zelllinien	24
2.1.4. „Assay-on-Demand gene expression products“	24
2.1.5. Kits	25
2.1.6. Verbrauchsmaterial	25
2.1.7. Geräte	26
2.2. Patientenrekrutierung	27
2.3. Molekulargenetische Standardtechniken	29
2.3.1. Zellkultivierung und Zellpassagierung	29
2.3.2. Laser Capture Mikrodissektion	30
2.3.3. RNA- Extraktion	31
2.3.4. RNA- Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop	32
2.3.5. RNA- Qualitätskontrolle mittels Agilent 2100 Bioanalyzer	33

2.4. Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie	34
2.4.1. Statistische Analysen	39
2.4.2. Genetische Programmierung zur Generierung eines Klassifikators	41
2.5. Bestätigung der Affymetrixdaten mittels quantitativer „Real Time“- PCR	42
2.5.1. Agarosegel– Elektrophorese	44
2.6. Mutationsanalyse des Kandidatengens EGFR	45
2.6.1. DNA – Extraktion	45
2.6.2. DNA Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop	45
2.6.3. Polymerase- Kettenreaktion (PCR) von Exon 18,19, 20 und 21 des EGF- Rezeptors	45
2.6.4. Nachweis des PCR- Produktes mittels Agarosegel– Elektrophorese	47
2.6.5. SSCP (Einzelstrang- Konformations- Polymorphismus- Analyse)	47
2.6.5.1. Silberfärbung der SSCP- Gele	48
2.6.6. DHPLC (Denaturierende Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie)	49
2.6.7. Sequenzierung	54
2.7. Immunhistochemischer Nachweis von EGFR	54
2.8. Immunhistochemischer Nachweis von β - Catenin	55
3. Ergebnisse	
3.1. Etablierung der verwendeten Methoden	57
3.1.1. Fixierung der Gewebeschnitte für die LCM	57
3.1.2. RNA- Amplifikation	58
3.2. Differentiell exprimierte Gene im primären Lungenkarzinom	60
3.2.1. Hierarchische Clusteranalyse	62
3.2.2. Funktionelle Gruppen	67
3.2.2.1. Proliferation	67
3.2.2.2. DNA- Reparatur	70
3.2.2.3. Protoonkogene	72
3.2.2.4. Gene der Zelladhäsion	74
3.2.2.5. Strukturproteine	76
3.2.2.6. Metabolismus	79
3.2.2.7. Immunsystem	80
3.2.3. Weitere differentiell exprimierte Gene	82
3.3. Bestätigung der identifizierten Gene mittels quantitative „Real Time“- PCR	83
3.4. Probenabgrenzung mittels Genetischer Programmierung	87

3.5. Differentiell exprimierte Gene im progredienten oder rezidivierenden Lungenkarzinom	89
3.5.1. Hierarchische Clusteranalyse der progredienten Lungenkarzinome im Vergleich zu den Primärtumoren	91
3.5.2. Einteilung der signifikanten Gene in funktionelle Gruppen	92
3.5.2.1. Veränderungen im Wnt- Signalweg der progredienten Lungenkarzinome	93
3.5.2.2. Veränderungen in der Proliferation der progredienten Lungenkarzinome im Vergleich zum Primärtumor	96
3.5.2.3. Veränderungen in der Ubiquitin- abhängigen Proteolyse	97
3.5.2.4. Veränderungen bei Genen, die eine Rolle bei der Kondensation / Dekondensation des Chromatins spielen	99
3.6. Bestätigung der in den progredienten Tumoren identifizierten Gene mittels quantitativer „Real Time“- PCR	100
3.7. Immunhistochemischer Nachweis der differentiellen Expression von β - Catenin	104
3.8. Charakterisierung des EGF- Rezeptors	106
3.8.1. Mutationsanalyse des EGF- Rezeptors	107
3.8.1.1. SSCP (Einzelstrang- Konformations- Polymorphismus- Analyse)	107
3.8.1.2. DHPLC (Denaturierende Hochleistungs- Flüssigkeits-Chromatographie)	109
3.8.1.3. Sequenzierung	111
3.8.2. Immunhistochemischer Nachweis des EGF- Rezeptors	114
4. Diskussion	119
4.1 Das primäre Lungenkarzinom	121
4.1.1. Veränderte chromosomale Regionen im primären Lungenkarzinom	121
4.1.2. Einteilung in funktionelle Gruppen	126
4.1.2.1. Proliferation	127
4.1.2.2. DNA- Reparatur	128
4.1.3.3. Protoonkogene	129
4.1.3.4. Zelladhäsion	130
4.1.3.5. Metabolismus	132
4.1.3.6. Weitere differentiell exprimierte Gene	132
4.1.4. Vergleich der eigenen Studie mit anderen Studien	133
4.1.5. Mögliche Zielstrukturen im primären Lungenkarzinom	133
4.2. Das progrediente nichtkleinzellige Lungenkarzinom	134
4.2.1. Progressions- relevante chromosomale Regionen	135
4.2.2. Funktionelle Gruppen des progredienten Lungenkarzinoms	137
4.2.2.1. Proliferation im progredienten Lungenkarzinom	138
4.2.2.2. Wnt- Signalweg	138
4.2.3. β - Catenin als mögliche Zielstruktur des progredienten Lungenkarzinoms	140

4.3. Charakterisierung des EGF- Rezeptors	141
4.3.1. EGFR- Mutationsanalyse	141
4.3.2. EGFR- Expressionsanalyse	142
4.4. Kritische Bewertung der angewandten Methoden	143
4.4.1. RNA- Isolation	143
4.4.2. RNA- Amplifikation	144
4.4.3. Genexpressionsanalysen mittels Oligonukleotid- Arrays und „Real Time“- PCR	145
4.4.4. Proteinnachweis mittels Immunhistochemie	148
4.4.5. Methoden der Mutationsanalyse	149
4.5. Schlussfolgerung	150
4.6. Ausblick	150
5. Zusammenfassung	151
5.1. Summary	152
6. Danksagung	153
7. Literaturverzeichnis	154
8. Eidesstattliche Erklärung	185

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenokarzinom
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BAK	BCL2-antagonist/killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Broka	Bronchialkarzinom
cDNA	complementary DNA
CHES	2-Cyclohexylamin- Ethan Sulfonsäure
DAB	Diaminobenzidin
CDK	Cyklin abhängige Kinase
DAB	3,3`-Diaminobenzidin - tetrahydrochlorid
DEPC	Di- ethyl- pyrocarbonate
DNA	Desoxyribonucleid acid
dNTP	desoxy –Nukleotidtriphosphat
dUTP	desoxy – Uraciltriphosphat
DTT	Di-thiothreitol
EDTA	Ethylen- diamine -tetra- acetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	Mitogen- aktivierende Proteinkinase
E2F	E2F transcription factor
FA	fortschreitendes Adenokarzinom
Forb	fortschreitendes oder rezidivierendes Bronchialkarzinom
FP	fortschreitendes Plattenepithelkarzinom
g	Gramm
GRB2	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin – Eosin
Hs	Homo sapiens
HSP	Hitze- Schock- Protein
JNK	c-Jun N-terminale Kinase

K	kleinzelliges Lungenkarzinom
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LOH	Loss of heterozygosity (Allelverlust)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	Morpholinopropane sulfonic acid
myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
µl	Mikroliter
N	Nichttumor
OD	Optische Dichte
P	Plattenepithelkarzinom
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Piperazine di- Acrylamid
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
raf	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
ras	ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
RNA	Ribonucleid acid
rpm	rounds per minute
RT- PCR	real time- Polymerase Chain Reaction
SSC	Sodium chloride + Sodium citrate
SSCP	single strand conformation polymorphism
SDS	Sodium dodecyl sulphate
Taq.	Thermophilus aqueductus
TdT	Terminale Desoxyribosyl- Transferase
TBE	Gemisch aus Tris- Borat und EDTA
TBS	Tris– gepufferte Salzlösung
TE	Gemisch aus Tris und EDTA
TEAA	Tri-ethyl-ammonium-acetat

TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamine
TNM	Tumorklassifikationssystem
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultra Violett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
W	Watt
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Das Lungenkarzinom

1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das Lungenkarzinom ist einer der häufigsten Tumoren in den Industrieländern und daher von hoher klinischer und sozialer Bedeutung. Es steht bei den Krebstodesursachen der Männer an erster und bei Frauen an dritter Stelle. Im Jahre 2002 wurden weltweit 1,35 Millionen Neuerkrankungen registriert. Da Inzidenz und Mortalität beim Lungenkarzinom sehr nahe beieinander liegen, ist die Erkrankung mit 1,18 Millionen Todesfällen im Jahr 2002 sogar für 17,6% aller Krebstodesfälle verantwortlich (Parkin D.M. et al, 2005). In Deutschland beträgt die Zahl der Neuerkrankungen etwa 40.000 / Jahr, entsprechend einer Inzidenz von 52 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern und Jahr.

Bei Männern ist das Lungenkarzinom nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste, bei Frauen nach Brust- und Darmkrebs die dritthäufigste Krebserkrankung, mit insgesamt 39 000 Todesfällen in Deutschland im Jahr 2002 (Leschinger M., 2005). Trotz Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten und neueren Medikamenten stieg die Fünfjahresüberlebensrate für Patienten mit Lungenkarzinom nur marginal an und liegt derzeit insgesamt bei ca. 13%. Die Analyse der Überlebenszeiten ergibt eine mediane Überlebenszeit von 10 Monaten für Männer und von 12 Monaten für Frauen (Krebsregister Rheinland- Pfalz, 2002).

Die Inhalation exogener chemischer Karzinogene ist die häufigste Ursache für die Entstehung des Lungenkarzinoms. Mit dem Beginn der modernen Epidemiologie wurde ein Zusammenhang zwischen Lungenkarzinom und inhalativem Tabakkonsum in groß angelegten Studien nachgewiesen. So zeigen Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern ein 10-fach erhöhtes Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken. Heute gilt als gesichert, dass das Lungenkrebsrisiko mit zunehmender Dauer und Menge der Tabakexposition steigt, das heißt, in Abhängigkeit von der Gesamtmenge der gerauchten Zigaretten. Die gebräuchliche Einheit zur Quantifizierung der Gesamtmenge der gerauchten Zigaretten wird in Packungsjahren („pack years“) bemessen. Ein Packungsjahr bedeutet den täglichen Konsum von 20 Zigaretten (1 Packung) über ein Jahr (Garfinkel L. et al, 1988).

Übersteigt der Tabakkonsum 20 Zigaretten pro Tag, ist das Risiko um das 20-fache erhöht und steigt mit zunehmenden Packungsjahren überdeutlich an. Bei 40 Packungsjahren liegt das Risiko, an einem Lungenkarzinom zu erkranken, schon beim 60- bis 70-fachen eines Nichtrauchers (Alberg A.J. et al, 2003). Das Eintrittsalter des Rauchens ist ein weiterer relevanter Faktor. Bei Personen, die vor dem 17. Lebensjahr mit dem Rauchen begonnen haben, steigt das Risiko, an einem Lungenkarzinom zu erkranken, auf das 30-fache an.

Neben dem Tabakkonsum sind noch weitere Karzinogene mit der Entstehung von Lungenkarzinomen vergesellschaftet. Hierzu gehören die pulmotropen Karzinogene Asbest, Radon, Bis(chlormethyl)ether, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Chrom, Nickel und anorganische Arsenbestandteile sowie Luftverschmutzung. Einige dieser Stoffe

vervielfältigen durch synergistische Effekte die krebserregende Wirkung des Tabaks (WHO 2006). Ein Beispiel hierfür ist die Asbestexposition, die in Kombination mit Rauchen zu einem 70-fach höheren Risiko, an einem Lungenkarzinom zu erkranken, führen (Konietzko N. et al 1992).

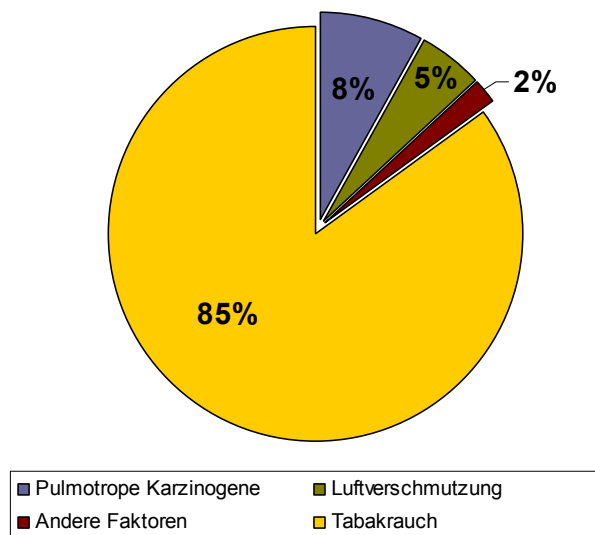


Abbildung 1: Für die Entstehung des Lungenkarzinoms verantwortliche Faktoren (nach Kohlhammer 1998)

1.1.2. Klinische Manifestation

Es gibt keine für das Lungenkarzinom spezifische Symptomatik, die eine frühzeitige Diagnose ermöglicht. Die Symptome sind von der Art der endobronchialen Ausbreitung abhängig. Ein persistierender Reizhusten, insbesondere eine Änderung des Hustencharakters bei chronischer Bronchitis oder neu aufgetretene Hämoptysen sind wesentliche Leitsymptome. Durch tumorbedingte Okklusion eines Lappen- oder Hauptbronchus kann eine Retentionspneumonie entstehen. Infiltratives Tumorwachstum führt zu Thoraxwand Schmerzen, Dysphagie oder Ausfällen des sympathischen Nervensystems (Horner- Syndrom). Die extrathorakale Ausbreitung kann supraclavikuläre und zervikale Lymphknoten betreffen oder als Folge von Skelettmetastasen mit Knochenschmerzen manifestiert werden. ZNS- Metastasen können zu Schwindel, Kopfschmerzen oder einer anderweitigen neurologischen Symptomatik führen (Schweisfurth H. et al, 2004). Weiterhin kann es, insbesondere bei kleinzelligen Lungenkarzinomen, als Begleitreaktion zur Freisetzung von Hormonen wie z.B. ACTH (adrenocorticotropes Hormon) kommen und zu einem paraneoplastischen Syndrom wie dem Cushing-, dem Schwartz- Barter- Syndrom (Hyponatriämie) und zur Hyperkalzämie führen (Drings P. et al, 2003). Dies ist vermutlich Ausdruck der neuroendokrinen Abstammung des kleinzelligen Lungenkarzinoms.

1.1.3. Histologie

Aus klinischen Gesichtspunkten hat sich die Einteilung der Lungenkarzinome nach ihrem biologischen Verhalten in zwei Entitäten durchgesetzt: Das nichtkleinzellige (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) und das kleinzellige (Small Cell Lung Cancer, SCLC) Lungenkarzinom. Die erste Gruppe umfasst etwa 70% aller Lungenkarzinome und wird unterteilt in Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und großzellige Karzinome. In Tabelle 1 ist eine Zusammenfassung der Unterteilung und Häufigkeiten der Lungenkarzinome dargestellt.

nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC) 73%	kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC) 18%	andere seltene Formen 9%
1. Adenokarzinom 35% - azinär - papillär - bronchioalveolär - solides, schleimbildendes 2. Plattenepithelkarzinom 29% - spindelförmig 3. großzelliges Lungenkarzinom 9% - großzellig mit Riesenzellen - hellzellig	- oat- cell type - intermediate cell type - combined oat-cell	1. Karzinoide 2. kombiniertes adenosquamoses Karzinom 3. Karzinome der Bronchialwanddrüsen

Tabelle 1: Klassifizierung der Lungenkarzinome (WHO 1990) und Häufigkeiten der Subtypen in Prozent.

Nichtkleinzellige Lungenkarzinome vom Typ der Adenokarzinome sind bevorzugt in der Lungenperipherie angeordnet und zeigen eine Tendenz zur zentralen Tumورvernarbung. Histologisch sind sie gekennzeichnet durch drüsenähnliche Strukturen. In den Tumorzellen können histochemisch in wechselnder Ausprägung mucine Substanzen oder Sekretvakuolen nachgewiesen werden.

Plattenepithelkarzinome sind gewöhnlich in den größeren Bronchien zentral lokalisiert und zeigen nekrotische Anteile, die aufgrund von Durchblutungsstörungen der Tumorzentren entstehen. In den Tumorzellen kann eine variable Keratinexpression bis zur Ausbildung konzentrischer Hornperlen resultieren.

Die großzellig undifferenzierten Tumoren sind durch ein schnelles, lokales Wachstum mit möglicher Knochendestruktion oder Einwachsen in das Mediastinum gekennzeichnet.

Zum Zeitpunkt der Diagnose haben 40 – 50% der Patienten mit NSCLC ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium, weitere 25 – 30% der Patienten weisen Metastasen auf. Damit sind, je nach lokaler Ausdehnung ca. 60 – 70% der Patienten mit NSCLC nicht mehr

kurativ behandelbar (Leschinger M. et al, 2005). Im Gegensatz zum nichtkleinzelligen Lungenkarzinom handelt es sich beim kleinzelligen Lungenkarzinom um einen Tumor neuroendokrinen Ursprungs. Charakteristisch für diese Entität ist die rasche Progredienz, frühzeitige Metastasierung und die hohe lokoregionale Rezidivneigung. Bei fast allen Patienten liegt bei Diagnosestellung bereits ein Befall regionaler sowie extrathorakaler Lymphknoten vor. Histologisch handelt es sich um auffallend kleine Tumorzellen, die im Verband angeordnet sind. Zumeist sind kombinierte Radio- und Chemotherapie die Behandlungsweise erster Wahl.

1.1.4. Stadien und Prognose

Für ein Tumor- Staging beim NSCLC erfolgt eine Stadieneinteilung in die Stufen I – IV nach der TNM – Klassifikation, in der Größe und Ausbreitung des Primärtumors berücksichtigt werden (T) und in der das Ausmaß des Befalls regionaler Lymphknoten (N) und die Bildung von Fernmetastasen (M) beschrieben werden. In Tabelle 2 ist das TNM- System näher erläutert. Für Patienten mit zum Zeitpunkt der Diagnosestellung frühen Tumorstadien I - II liegt die 5- Jahres- Überlebensrate nach erfolgter Resektion bei etwa 50%. Für Patienten mit nicht operablem NSCLC liegt die 5- Jahres- Überlebensrate trotz Chemo- und Radiotherapie nur bei 5% (Drings P. et al, 2003). Eine Übersicht der Stadieneinteilung und der 5- Jahres- Überlebensrate bietet Tabelle 3.

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor 3cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)

T2 Tumor mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen hinsichtlich Größe oder Ausbreitung

- Tumor mehr als 3cm in größter Ausdehnung
- Tumor befällt Hauptbronchus, 2cm oder weiter distal der Carina
- Tumor infiltriert viszerale Pleura
- assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge

T3 Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: Brustwand (einschließlich Tumoren des Sulcus superior), Zwerchfell, mediastinale Pleura, parietales Perikard; oder Tumor im Hauptbronchus weniger als 2cm distal der Carina, aber Carina selbst nicht befallen, oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge

T4 Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina; vom Primärtumor getrennte

Tumorherde im gleichen Lappen; oder Tumor mit malignem Pleuraerguß

N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1 Metastase(n) in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen Hiluslymphknoten (einschließlich eines Befalls durch direkte Ausbreitung des Primärtumors in intrapulmonale Lymphknoten)

N2 Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder ipsilateralen Lymphknoten

N3 Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten

M0 Keine Fernmetastasen

M1 Fernmetastasen, einschließlich vom Primärtumor getrennter Tumorherde in einem anderen Lungenlappen (ipsilateral oder kontralateral)

Tabelle 2: TNM- Klassifikation des Lungenkarzinoms (aus UICC 1997)

ISS - Stadium	TNM - Klassifikation	5-Jahres-Überlebensrate in %
Stadium 0	Tis N0 M0	---
Stadium IA	T1 N0 M0	61
IB	T2 N0 M0	38
Stadium IIA	T1 N1 M0	34
IIB	T2 N1 M0 ; T3 N0 M0	24
Stadium IIIA	T3 N1 M0; T1 N2 M0; T2 N2 M0; T3 N2 M0	13
IIIB	T1 – 4 N3 M0; T4 N0 – 3 M0	5
Stadium IV	T1 – 4 N0 – 3 M1	1

Tabelle 3: Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms mit 5-Jahres- Überlebensraten (Mountain 1997)

Für das SCLC wurde eine vereinfachte Einteilung entwickelt, die sich wegen der unterschiedlichen Primärtherapie und Entwicklung des Tumors als erfolgreich erwiesen hat. Das kleinzellige Lungenkarzinom wird in ein begrenztes („limited - stage disease“, in 30% der Fälle) und ein ausgedehntes Stadium („extensive – stage disease“, in 70% der Fälle) aufgeteilt (Tabelle 5). Das begrenzte Stadium beschreibt ein Karzinomstadium, in dem die Therapie noch kurativ durchgeführt werden kann. Beim ausgedehnten Stadium können dagegen nur palliative Maßnahmen ergriffen werden. Trotz dem Initial guten Ansprechen auf

die Therapie ist die 5- Jahres- Überlebensrate mit 5% sehr schlecht beim kleinzelligen Lungenkarzinom.

„limited – stage disease“ – begrenztes Stadium

- Primärtumor ohne Thoraxwandinfiltration
- ipsilaterale, hiläre, mediastinale und supraklavikuläre Lymphknoten
- kein Pleuraerguß
- kein Vena cava superior-Syndrom

„extensive – stage disease“ – ausgedehntes Stadium

- Thoraxwandinfiltrationen
- kontralateraler Lymphknotenbefall
- Pleuraerguß
- Vena cava superior-Syndrom
- Metastasen in die kontralaterale Lunge
- Sonstige Fernmetastasen

Tabelle 4: Klassifikation kleinzelliger Bronchialkarzinome (Loddenkemper R.1998)

Das histologische Tumorgrading (Tabelle 5) benennt den geweblichen und zytologischen Differenzierungsgrad und wird von Kern- und Mitosezahltypie bestimmt. Der Malignitätsgrad ergibt sich aus Differenzierung, Proliferation, Nekroseneigung, Invasivität und Metastasierungsfähigkeit.

GX	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Tabelle 5: Histopathologisches Grading der Lungentumore (UICC 1997)

1.1.5. Zeitlicher Ablauf morphologischer Veränderungen in der Tumorigenese von Lungenkarzinomen

Vor dem klinisch offenkundigen Lungenkarzinom treten eine Reihe morphologisch distinkter präneoplastischer Veränderungen des Bronchialepithels auf. Bisher konnten nur für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom verschiedene Transformationsschritte aufgezeigt werden. Es wird vermutet, dass dieser mehrstufige Prozess der Karzinogenese mit der Initiation durch ein Karzinogen, das eine bestimmte Veränderung in der Zelle bewirkt, wie beispielsweise die Aktivierung eines Proto-Onkogens beginnt. Diese alterierte Zelle wird während der klonalen Expansion selektiv vermehrt, ein Vorgang, der sich über Jahre hinweg erstrecken kann und als Promotion bezeichnet wird. Aufgrund der klonalen Expansion kommt es zu einer reversiblen Vergrößerung des Gewebes (Hyperplasie). Weitere Schritte, wie die Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Gene, müssen in der Zelle ablaufen, um die benigne Zelle in eine maligne Zelle umzuwandeln. Dieser Schritt der Karzinogenese wird als Konversion bezeichnet und geht einher mit einer als Metaplasie bezeichneten Umwandlung einer Gewebeart in eine andere. Im weiteren Verlauf der Karzinogenese sind zunehmende Veränderungen der malignen Zellen, insbesondere der Zellkerne sowie der Zellkern- Zytoplasmabeziehungen zu beobachten. Es werden metachromatische Zellkerne, eine erhöhte Mitosefrequenz und Gewebeunregelmäßigkeiten beschrieben und als Dysplasie zusammengefasst. Im Anschluss an die Konversion kommt es zur Proliferation der mehrfach veränderten malignen Zelle, was zu einem bösartigen intraepithelialen Karzinom, dem Carcinoma in situ führt. Überschreitet die Tumorzelle die Basalmembran, erfüllt sie damit ein wesentliches Kriterium der Malignität, das invasive Wachstum und man spricht von einem invasivem Karzinom mit Metastasierung (Abbildung 2).

Nach immunhistochemischen Befunden leiten sich nichtkleinzellige Lungenkarzinome von Zellen der bronchiolo- alveolären Bereiche mit Clarazellen, Pneumozyten TypII und transformierten Alveolarepithelien ab. Dem gegenüber steht das kleinzellige Lungenkarzinom, das sich aus pulmonalen endokrinen Zellen ableitet.

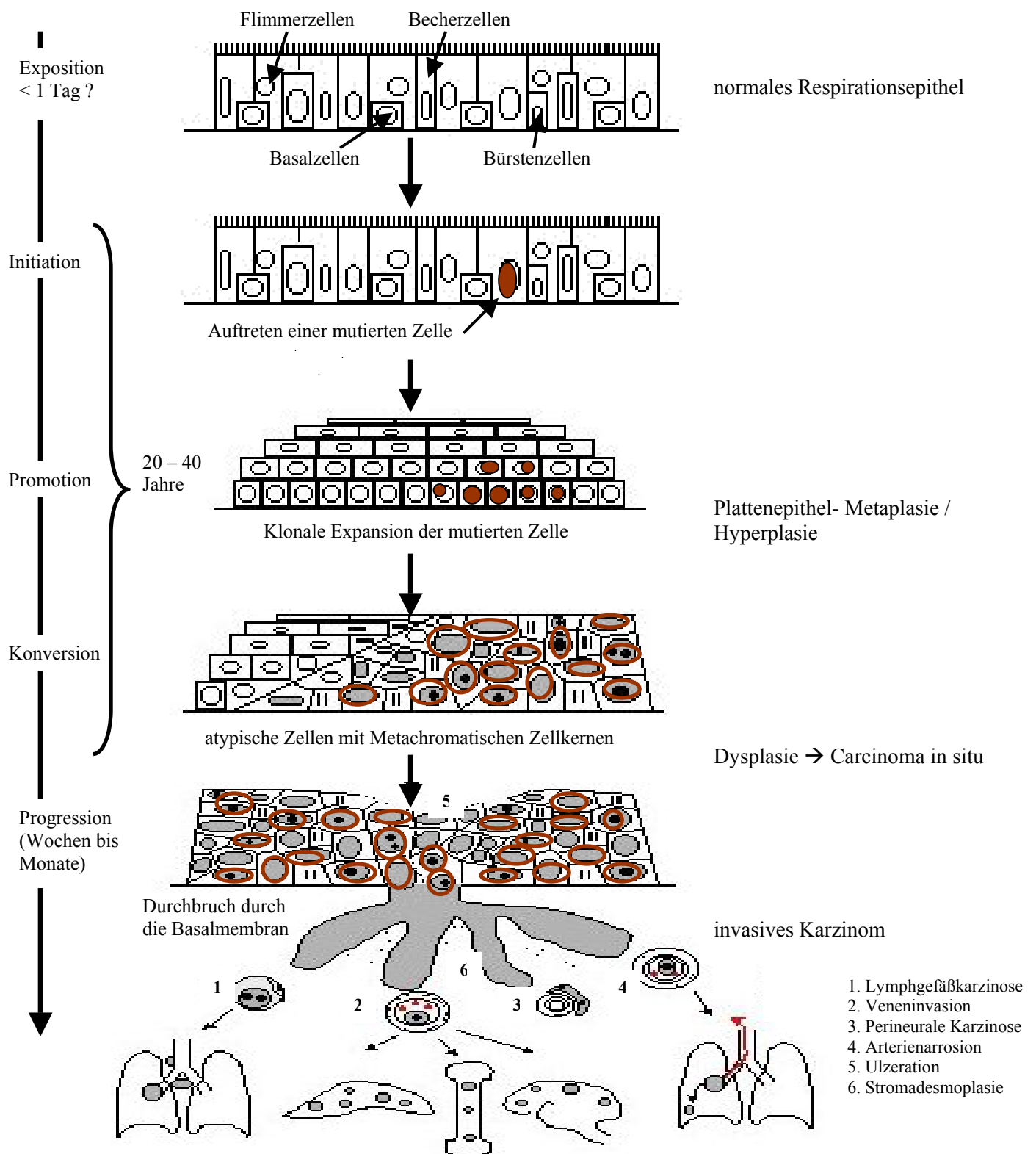


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bildung eines invasiven nichtkleinzelligen Karzinoms mit Metastasierung ausgehend von mehrreihigem Flimmerepithel, über Hyper- und Dysplasie und Carcinoma in situ (modifiziert nach Alberts B. et al, 1999).

1.1.6. Invasion und Metastasierung

Nach der Drei-Schritt-Hypothese besteht die Invasion aus folgenden Schritten: Adhäsion der Tumorzellen an die Matrix, Degradation der Matrix und Migration der Tumorzellen durch die degradierte Matrix (Rintoul R.C. et al, 2002; Blumenthal R.D. et al, 2005). Die Vermittler der Adhäsion sind die Zelladhäsionsmoleküle. Ihre Modifizierung macht den Prozess der Metastasierung erst möglich, da keine Metastasen gebildet werden können, wenn die Tumorzellen über ihre Zelladhäsionsmoleküle mit anderen Zellen im Primärtumor eng verbunden bleiben würden. Die Degradation der Matrix wird als wichtiger Schritt angesehen und ermöglicht den malignen Zellen eine lokale Invasion. Mittels lokaler Proteolyse wird ein Zugang durch die Basalmembran und weiter in die extrazelluläre Matrix geschaffen. Die dazu benötigten Enzyme werden von der Tumorzelle selbst oder vom gesunden Gewebe nach Stimulation durch die Tumorzelle produziert. Die Migration der Tumorzellen ist ein zentraler Punkt im Verlauf der Metastasierung. Die Tumorzellen bewegen sich durch die degradierte Matrix mittels Chemotaxis. Die Motilitätsfaktoren werden dabei sowohl vom gesunden als auch von den Tumorzellen selbst ausgeschüttet. Nach Verlust der Zell- Zell- Adhäsion und der Degradation der Basalmembran kommt es im weiteren Verlauf zum Einbruch von Tumorzellen in die Lymph- oder Blutgefäße, was als erster Schritt der Fernmetastasierung angesehen wird.

Die Metastasierung auf lymphatischem Wege ist beim Lungenkarzinom sehr häufig und resultiert in der Ausbildung von Lymphknoten- Metastasen, welche zunächst in unmittelbarer Nähe zum Primärtumor auftreten. Die regionären Lymphknoten des Patienten sind bei Diagnosestellung beim kleinzelligen Karzinom zu 78% infiltriert. Beim Plattenepithelkarzinom beträgt die Rate 40% und beim großzelligen Karzinom 32%. Die hämatogene Metastasierung liegt bei Patienten mit kleinzelligem und großzelligem Lungenkarzinom mit 99% bzw. 97% am höchsten (Wiethage T. et al, 2000) und resultiert in der Entstehung von Organ- Metastasen. Dabei kann jedes Organ betroffen sein, wobei gehäuft Leber-, Nebennieren-, Gehirn- und Knochenmetastasen auftreten.

Die Tumorzellen dringen während der Metastasierung zunächst in die Lymphabflusswege ein, bilden Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten und gelangen dann weiter über die Lymphabflusswege in die Blutbahn. Dieser Schritt der Metastasierung wird als Intravasation bezeichnet. Als weiterer Schritt der Metastasierung durchdringen die Tumorzellen die endotheliale Basalmembran, ein Prozess der als Extravasation bezeichnet wird, invadieren das subendotheliale bindegewebige Stroma und im weiteren Verlauf das Parenchym des betreffenden Organs. Hier bilden sich schließlich die Metastasen.

1.1.7. Genetische Veränderungen

Die Entstehung des Lungenkarzinoms wird als Folge einer allmählichen Akkumulation von genetischen Veränderungen gesehen. Bereits an Tumorgewebe angrenzende präneoplastische Zellen zeigen einige genetische Veränderungen, wie sie in typischen Tumorzellen auftreten,

wie ras- Mutationen, p53- Immunreaktivität und DNA- Aneuploidie (Smith A.L. et al, 1996). Über Alleltypisierungstudien und Mutationsanalyse an mikrodissiziertem präneoplastischem Epithel und frühen Tumorstadien konnte nachgewiesen werden, dass 3p- Allelverluste die frühesten Ereignisse sind, gefolgt von 9p- und 17p- Allelverlusten mit p53- Mutationen, 5q- LOH und K-ras- Mutationen (Kishimoto Y. et al, 1995; Sikkink S.K. et al, 2003).

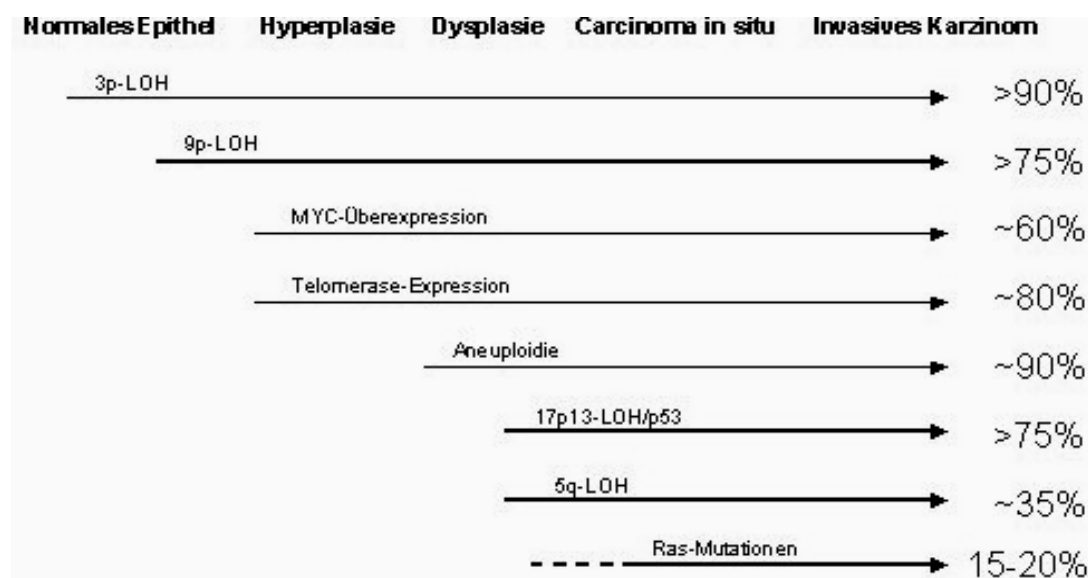


Abbildung 3: Sequentielle Akkumulation genetischer Veränderungen in der Tumorigenese von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (nach Sekido Y., 1998; Ohno J. et al, 2001; Fong K.M. et al, 2003).

In einzelnen Untersuchungen wurde versucht, die Rolle genetischer Faktoren bei der Entstehung des Lungenkarzinoms zu klären. Auf molekularer Ebene wurden Mutationen von Tumorsuppressorgen und Onkogenen gefunden, wie ein alkylierungsbedingter Basenaustausch und weitere Polymorphismen im Tumorsuppressorgen p53 mit Folge einer Inaktivierung (Vikhanskaya F. et al, 2005). Die Entstehung maligner Tumorzellen aus normalen Epithelzellen stellt einen vielstufigen Prozess dar, im Laufe dessen eine Reihe von Änderungen am Erbmateriale stattfinden, die letztendlich eine volle maligne Transformation bewirken. Einige dieser Läsionen sind bereits seit längerem bekannt, bei anderen wurde die Bedeutung erst in neuerer Zeit entdeckt.

Viele Wachstumsfaktoren oder regulatorische Peptide und deren Rezeptoren werden in Tumor- und normalem Lungengewebe exprimiert und lassen vermuten, dass eine Reihe autokriner bzw. parakriner Wachstumsstimulationsprozesse bei Lungenkarzinomen eine Rolle spielen (Viallette & Sausville, 1996). Einige Komponenten dieser Signaltransduktionskaskaden wurden initial als Proto-Onkogene identifiziert, welche durch unterschiedliche genetische Mechanismen abnormal aktiviert werden. Diese Produkte umfassen Wachstumsfaktoren, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Membran-assoziierte G-Proteine, cytoplasmatische Serin / Threonin-Kinasen und nukleäre Transkriptionsfaktoren. Eine Zusammenfassung der genetischen Veränderungen im Lungenkarzinom ist in Tabelle 6 dargestellt.

genetische Veränderungen	kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC)	nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)
ras- Mutation	< 1%	20 – 50%
myc- Amplifikation	18 – 30%	8 – 20%
BCL2- Expression	75 – 95%	10 – 35%
p53 - Mutation	75 – 100%	50%
abnorme p53- Expression	40 – 70%	40 – 60%
pRB- Verlust	> 90%	15 – 40%
p16- Mutationen	< 1%	10 – 40%
fehlende p16- Expression	0 – 10%	30 – 70%
Cyclin D1	keine Angaben	~ 45%

Tabelle 6: Auswahl häufiger genetischer Veränderungen beim SCLC und NSCLC

1.1.7.1. Genetische Veränderungen im kleinzelligen und nichtkleinzelligen

Lungenkarzinom

Die **ras**- Genfamilie (K-ras, H-ras, N-ras) ist häufig durch Mutation aktiviert. Im Gegensatz zum kleinzelligen Lungenkarzinom, die kaum Mutationen aufweisen, zeigen bis zu 50% der nichtkleinzelligen Lungenkarzinome Mutationen (Clements NC. et al, 1995)

Interessanterweise sind 70% aller K-ras- Mutationen G > T Transversionen, wie sie auch im p53- Gen vorkommen und durch Einwirkung von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen entstehen (Graziano S.L., 1999). Die RAS- Signaltransduktionskaskade resultiert durch die Aktivierung von Raf und des sich anschließenden MAPK- Signalweges in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren z.B. TCF (Ternary complex factor), das schließlich zur Expression verschiedener Gene führt. Durch Mutationen im ras- Gen verliert das mutierte Protein die Fähigkeit der Hydrolyse des gebundenen GTP und führt zur ständigen Stimulation Ras- abhängiger Signalwege.

Ein Proto- Onkogene ist das **myc**- Gen, welches zu der amphiphilen Klasse von Transkriptionsfaktoren (Helix-Loop-Helix-Motiv und Leucin- Reißverschluss) zählt. Es ist funktionell als MYC- MAX- Heterodimer aktiv und bindet mit hoher Affinität an CACGTG- Konsensussequenzen, was zur Transkriptionsaktivierung von Gene führt. MYC ist beteiligt am normalen Zellwachstum und der Proliferation über die direkte Aktivierung von Genen der DNA- Synthese, vom RNA- Metabolismus und der Zellzyklusregulation (Grandori C. et al, 2005). Während eine Aktivierung von myc sowohl im kleinzelligen als auch im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom in der Tumorigenese eine Rolle spielt, kommen Veränderungen von N-MYC und L-MYC lediglich in kleinzelligen Lungenkarzinomen vor. Die Aktivierung der myc- Proto- Onkogene erfolgt durch Amplifikation oder transkriptionelle Deregulation (Krystal GW. et al, 1990). In mehreren Studien konnten in insgesamt 18- 31% der kleinzelligen sowie in 8- 20% der nichtkleinzelligen

Lungenkarzinome myc- Amplifikationen nachgewiesen werden (Richardson GE. et al, 1993; Kim Y.H. et al, 2006).

Das sicherlich am besten charakterisierte Tumorsuppressorgen in Lungenkarzinomen ist **p53**. Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms, wenn die DNA durch Gamma- und UV- Strahlung oder Karzinogene geschädigt wird. Läsionen der DNA induzieren einen raschen Anstieg der p53- Proteinkonzentration. Dies induziert die Transkriptionsaktivierung von p53 abhängigen Genen, die in den Zellzyklus regulierend eingreifen wie z.B. p21 und Gadd45. Dieser Vorgang bewirkt ein Arretieren des Zellzyklus in der G₁- Phase. Durch diese Mechanismen können die zur Reparatur der geschädigten DNA notwendigen Korrekturabläufe einsetzen und wirksam werden. Ist die DNA irreparabel geschädigt, wird der Zellzyklus in die Apoptose umgeleitet. Dies erfolgt über die p53 abhängige Transaktivierung von bax, dessen Protein das Apoptoseschutzprotein BCL2 degradiert. Neben häufig auftretenden Allelverlusten (loss of heterozygosity, LOH) auf Chromosom 17p13.1, wo das p53- Gen lokalisiert ist, finden sich Mutationen im zweiten Allel in 75-100% von SCLC und ungefähr 50% der NSCLC (Greenblatt M.S. et al, 1994; Greenblatt M.S. et al, 2003). Die am häufigsten auftretenden Mutationen im p53- Gen sind G > T Transversionen, wie sie insbesondere nach Bildung von DNA- Addukten durch Kanzerogene im Tabakrauch induziert werden. Darüber hinaus konnte die Entstehung dieser Addukte innerhalb des p53- Genes, inmitten häufig mutierten Regionen (so genannten „hotspots“), in Bronchialepithelzellen durch Inkubation mit Benzo[a]pyren erzeugt werden (Denissenko et al, 1996; Matter B. et al, 2004).

BCL2 und p53 sind Schlüsselmoleküle in der Apoptose normaler Zellen. Der programmierte Zelltod wird unter bestimmten Bedingungen, z.B. DNA- Schädigung, eingeleitet. Dieser Weg scheint in einer Vielzahl von Tumorzellen, so auch in Lungenkarzinomen, funktionell beeinträchtigt zu sein. BCL2 gehört zur großen Familie der antiapoptotischen Proteine und bewirkt bei Überexpression eine Resistenz der Tumorzelle gegenüber vielen Apoptosestimuli. Immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass in über 70% der kleinzelligen Lungenkarzinome das BCL2- Protein überexprimiert ist. BCL2- Expression kann häufiger im Plattenepithelkarzinom (25-35%) als im Adenokarzinom (10%) beobachtet werden. Eine Korrelation zwischen BCL2- Expression und abnormer p53- Expression in kleinzelligen Lungenkarzinomen führte zu der Hypothese, dass zur Modulation der Apoptose beide Faktoren gemeinsam alteriert sein müssen.

Der p16- CyclinD1- CDK4- RB- Signalweg ist ein zentraler Bestandteil des Übergangs von der G₁ in die S- Phase im Zellzyklus. Mindestens eines dieser vier Gene ist gewöhnlich in Lungenkarzinomen mutiert.

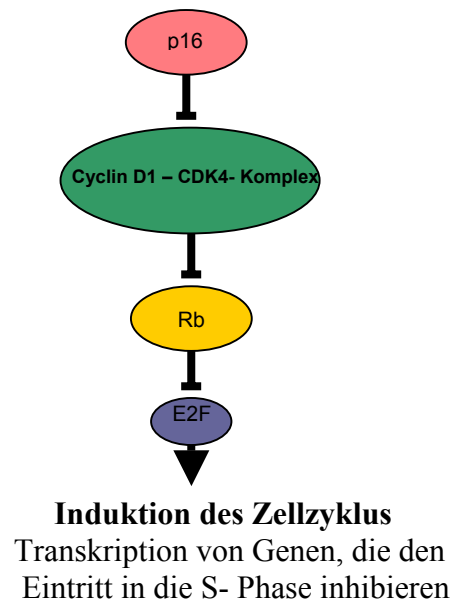


Abbildung 4: Der p16- CyclinD1- CDK4- RB- Signalweg vereinfacht dargestellt. P16 inhibiert die Formation des aktiven CyclinD1 – CDK4- Komplexes. Dadurch kann Rb nicht vom CyclinD1- CDK4- Komplex phosphoryliert werden und bindet den Transkriptionsfaktor E2F, wodurch die Expression von Genen der S- Phase inhibiert und somit die Proliferation kontrolliert wird.

Das **p16^{ink4}** – Protein ist ein Zellzyklus- Modulator, der die RB- Funktion über Inhibierung der CDK4: CyclinD1- Kinase- Aktivität reguliert und stellt ein weiteres Ziel für Mutationen innerhalb des Zellzyklusweges in Lungenkarzinomen dar. P16^{ink4} – Alterationen treten insbesondere in NSCLC auf, während sie in kleinzelligen Lungenkarzinomen die Ausnahme sind. In 30- 40% der NSCLC wurden homozygote Deletionen bzw. Punktmutationen beschrieben (Hommura F. et al, 1999). Fehlende Expression auf RNA bzw. auf Proteinebene wurde in 30- 70% der untersuchten Lungenkarzinome beschrieben. In Tumoren ohne nachweisbarer Mutationen wurde als mögliche Ursache der fehlenden Expression von p16^{ink4} die Hypermethylierung im 5'-CpG- Bereich des Promotors und daraus resultierende transkriptionelle Herabregulierung im erhaltenen Allel diskutiert. Zusammenfassend spielen p16- Mutationen eher in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und RB- Inaktivierung vorwiegend in kleinzelligen Lungenkarzinomen eine Rolle. Während eine Inaktivierung von beiden Genen, rb und p16, gleichzeitig ungewöhnlich ist, sind CyclinD1- Überexpressionen zusätzlich möglich (Drings P. et al, 2003).

CyclinD1 ist eine Kinase, die über die Hyper- Phosphorylierung des Retinoblastoma- Proteins und daraus resultierender Freisetzung von Transkriptionsfaktoren die Replikation von S-Phase- Genen einleitet. Das Protoonkogen cyclinD1 ist auf Chromosom 11q13 lokalisiert. In ca. 60% der NSCLC bestehen Amplifikationen bzw. Überexpressionen von CyclinD1, was mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Tanaka H. et al, 1998; Dobashi Y. et al, 2004).

Das Retinoblastoma- Gen (**Rb**) ist auf Chromosom 13q14 lokalisiert und kodiert ein nukleäres Phosphoprotein. Es hat im unphosphorylierten Zustand wachstumssupprimierende Funktion durch Inhibition des Übergangs der G1- in die S- Phase. Rb- Mutationen zusammen mit Verlust des anderen Allels wurden in Lungenkarzinomen beschrieben (Kaye F.J, 2002). Verminderte Proteinexpression ist in über 90% der SCLC und in 15-30% der NSCLC beschrieben (Drings P. et al, 2003). Die weniger häufige Deaktivierung von Rb in NSCLC lässt andere Wege der Inaktivierung der Rb- vermittelten Zellzykluskontrolle vermuten. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom sehr häufig p16^{ink4} inaktiviert ist, wodurch der Rb- Signalweg ebenfalls inaktiviert wird (Burke L. et al, 2005).

FHIT (fragile histidine triad), eine Dinukleotidhydrolase auf Chromosom 3p14, stellt ein tumorassoziiertes Gen dar, bei dem Veränderungen aufgrund einer Chromosomeninstabilität auftreten. Der FHIT- Locus in Lungenkarzinomen zeigt häufig LOH, Mutationen treten dagegen recht selten auf (Calvez F.L. et al, 2005).

Unsere Arbeitsgruppe konnte immunhistochemisch in 61,8% der untersuchten kleinzelligen Lungenkarzinome FHIT nachweisen und zeigen, dass diese FHIT- Expression mit einer besseren Prognose für Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom korreliert (Rohr UP. et al, 2005).

1.1.7.2. Genetische Veränderungen im kleinzelligen Lungenkarzinom

Das **kit**- Proto- Onkogen, eine weiterer Rezeptor-Tyrosin- Kinase, und deren Ligand SCF (stem cell factor) reguliert üblicherweise das Wachstum hämatopoetischer Vorläuferzellen. In 70% der kleinzelligen Lungenkarzinome sind c- KIT und SCF jedoch gleichzeitig exprimiert. Normales Lungengewebe exprimiert dagegen kein c- KIT. Sonst scheint das c – KIT / SCF – System eine autokrine Wachstumsschleife darzustellen, die den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil bietet (Krystal GW. et al, 2001). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnten wir bei 87,7% von 203 kleinzelligen Lungentumoren c-kit nachweisen und zeigen, dass die Expression von c-kit mit einer besseren Prognose korreliert (Rohr UP. et al, 2004).

1.1.7.3. Genetische Veränderungen im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom

HGF / SF (hepatocyte growth factor / scatter factor), welcher in normalen Lungengewebe sehr gering exprimiert ist, spielt eine wichtige Rolle bei der embryonalen Lungenentwicklung und stimuliert epitheliale Zellen zur Proliferation, Migration und Differenzierungen, wie Morphogenese (Yasuo T. et al, 2002). Während der vom c- met- Proto- Onkogen kodierte HGF- Rezeptor generell in normalem Lungengewebe, kleinzelligem und nichtkleinzelligem Lungenkarzinom exprimiert ist, ist eine erhöhte HGF- Expression nur in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen nachweisbar (Pilewski J.M. et al, 2001) und korreliert dort mit einer schlechten Prognose (Siegfried et al, 1998).

Neureguline (Neu differentiation factors, NDF's, heregulins) sind Peptid-wachstumsfaktoren, die mit der ERBB- Familie der Transmembran- Rezeptor- Tyrosin-Kinasen (ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4) interagieren (Sithanandam G. et al, 2003). Bisher sind 4 Mitglieder der Neuregulin- Familie bekannt, welche alle strukturell mit dem epidermalen Wachstumsfaktor verwandt sind und als spezifische Liganden für die Aktivierung der EGF- like Rezeptor (HER) Familie anzusehen sind. Die Rezeptoraktivierung resultiert in einer Auto- und Transphosphorylierung der Tyrosin- Kinase- Domäne, wodurch es in weiteren Schritten zur Aktivierung des JAK- STAT- Signalweges kommt (Liu J., Kern J. A., 2002). Neuregulin und die ERBB- Familie stellen eine weitere potentielle Wachstums stimulierende Schleife in Lungentumoren dar (Rachwal et al, 1995).

ERBB1 (epidermal growth factor receptor; EGFR) reguliert die epitheliale Proliferation, Differenzierung und spielt eine wesentliche Rolle in der Tumorangiogenese (Onn A. et al, 2005). Dieser Rezeptor ist der Prototyp der Klasse- I –Rezeptor – Tyrosinkinase. Durch extrazelluläre Bindung eines Liganden wird der Rezeptor aktiviert, d.h. er dimerisiert und verschiedene Tyrosinkinasedomänen werden intrazellulär aktiviert. Dies führt zur Aktivierung eines intrazellulären Signalproteins, welches im aktiven Zustand eine Phosphorylierungskaskade über drei Proteinkinasen auslöst. Die dritte Proteinkinase phosphoryliert verschiedene genregulatorische Zielproteine. Die wichtigsten Signalkaskaden des EGF- Rezeptors sind schematisch in Abbildung 5 zusammengefasst.

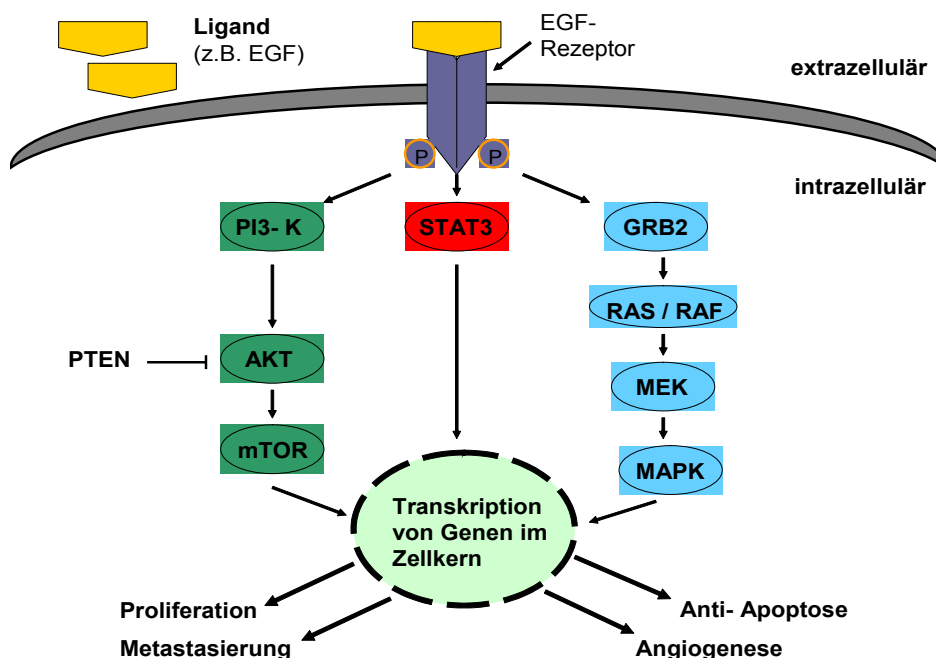


Abbildung 5: EGFR- Signaltransduktion vereinfacht dargestellt.

EGF = Epidermal Growth Factor; PI3-K = Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase; AKT = Serine-Threonine- Kinase; mTOR = Rapamycin Proteinkinase; PTEN = phosphatase and tensin homologue deleted from chromosom 10; GRB2 = growth factor- bound protein 2; MAPK = mitogen activated protein kinase; MEK = MAPK Kinase; STAT3 = signal transducer and activator of transcription

Mittlerweile belegen mehrere Studien, dass der EGF- Rezeptor in vielen Tumorarten häufig überexprimiert wird, wie z.B. in Brust-, Lungen-, Kolorektal-, Hirntumoren und vielen weiteren, wobei die Mechanismen der Überexpression noch nicht ganz geklärt sind. So konnte die Arbeitsgruppe um Conde E. 2006 bei 14% der untersuchten Adenokarzinomen eine Amplifikation des ERBB1- Genes, resultierend in einer erhöhten EGFR- Proteinkonzentration aufzeigen. Eine weitere wichtige Beobachtung ist, dass eine erhöhte EGFR- Expression mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert ist (Mendelsohn J., 2002). So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine Überexpression des EGF- Rezeptors in einer ansteigenden Proliferation, einer verminderten Apoptose, verstärkte Motilität der Tumorzelle sowie einer Angiogenese resultiert (Scagliotti GV. et al, 2004). Des Weiteren wurde beschrieben, dass verschiedene Deletionen und Mutationen im ERBB1- Gen eine Rolle spielen (Suzuki M. et al, 2005). Diese Mutationen scheinen die Induktion der EGFR- Autophosphorylierung durch Liganden zu fördern und somit zu einer verstärkten Aktivierung der EGFR- Signaltransduktion zu führen (Conde E. et al, 2006). Der EGF- Rezeptor ist vorwiegend im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom exprimiert und möglicherweise an Tumorstadien und Differenzierung gebunden (Damstrup L. et al, 2002). Zu den Liganden dieses Rezeptors gehören TGF α (transforming growth factor- α) und EGF (epidermal growth factor). Die Produktion dieser Faktoren, insbesondere von TGF α , und den entsprechenden Rezeptoren in Tumorzellen des Lungenkarzinoms sprechen wiederum für eine autokrine Wachstumsstimulation (Salomon D.S. et al, 1995, Rusch et al, 1997). Des Weiteren scheint eine erhöhte Rezeptordichte auch mit einer gesteigerten Produktion von Liganden einherzugehen (z.B. TGF α).

Amplifikation und Überexpression von **ERBB2** (HER2/neu) auf Chromosom 17q21 spielen eine Rolle in Tumorigenese von Brust- und Ovarialtumoren. Obwohl ERBB2- Amplifikationen relativ selten bei Lungenkarzinomen sind, ist ERBB2 in rund 30% der Lungenkarzinome, insbesondere in Adenokarzinomen, überexprimiert (Sithanandam G. et al, 2003). Bisher ist für dieses Mitglied der EGF- Rezeptorfamilie kein Ligand bekannt. Der HER2- Rezeptor existiert in Form eines inaktiven Monomers, das nach Ligandenbindung entweder Homodimere oder mit anderen Mitgliedern der EGF- Rezeptorfamilie, vorzugsweise mit EGFR Heterodimere ausbildet (Ciardiello F. et al, 2004). Eine Überexpression von EGFR in Koexpression mit ERBB2 korreliert mit einer schlechten Prognose, besonders für das Adenokarzinom.

1.1.7.4. Genetische Veränderungen in Assoziation mit der Metastasierung

Viele Veränderungen in der Progression von Lungenkarzinomen sind noch nicht geklärt. Den sich anhäufenden Daten über chromosomale Veränderungen steht eine Minderheit an bereits aufgedeckten metastasierungsrelevanten Genen gegenüber. Als gesichert gilt, dass Tumoren im Rahmen der Metastasierung zusätzliche chromosomale Veränderungen akkumulieren. So können sich offenbar bereits bestehende Deletionen während der Tumorprogression weiter

ausdehnen. Veränderungen, die gehäuft bei metastasierten Adenokarzinomen auftreten, sind Deletionen von den Chromosomenabschnitten 3p22-p25 und 17p12-p13, wo auch p53 lokalisiert ist (Iniesta P. et al, 2004; Goeze A. et al, 2002). Auch bei metastasierten Plattenepithelkarzinomen konnten vermehrt Deletionen aufgezeigt werden. So wurde in der chromosomalen Region 20p12 signifikant häufiger bei metastasierten als bei nichtmetastasierten Karzinomen eine Deletion gefunden. Ob sich in diesem Bereich ein Tumorsuppressorgen befindet und welche Bedeutung es hat, ist bisher nicht geklärt (Petersen I. et al, 2000). Die Komplexität der Veränderungen während der Progression und Metastasierung wird durch die Vielzahl der in der Literatur diskutierten metastasierungsrelevanten Genen deutlich und umfasst proteolytische Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Proteine des Zytoskeletts, Signaltransduktionswege, DNA-Reparaturenzyme, Angiogenesefaktoren, Zell- Extrazellulä- Matrix- Interaktionen und viele mehr. In Tabelle 7 ist eine Auswahl der in der Litaratur diskutierten metastasierungsrelevanten Gene dargestellt (Tarverna D. et al, 2005; Xi L. et al, 2006; Zhu CQ et al, 2006).

Gen	Chromosomale Lokalisation	Expression im metastasierenden Tumor	Auswirkung
Cyclin D1	11q13	vermehrt exprimiert	unkontrollierte Proliferation
c-Myc	8q24.12-q24	vermehrt exprimiert	unkontrollierte Wachstumsstimulation
PTEN (phosphatase and tensin homolog)	10q23.2	vermehrt exprimiert	fehlende Wachstums hemmung
Telomeras-reverse-Transkriptase	5p15.33	vermehrt exprimiert	unlimitiertes Wachstumspotential
Matrix- Metalloproteinase 9	20q11.2-q13	sowohl vermehrte als auch verminderte Expression	Degradation der Extrazellulären Matrix
Matrix- Metalloproteinase 10	11q22.3-q23	vermehrt exprimiert	Degradation der Extrazellulären Matrix
E-Cadherin	16q22.1	vermindert exprimiert bis hin zum kompletten Verlust	Invasion
β3-Integrin	17q21.32	vermehrt exprimiert	Invasion, Migration
β5-Integrin	3q21.2	vermehrt exprimiert	Invasion, Migration
Zytokeratin 19	17q21.2	vermehrt exprimiert	Invasion ?

Tabelle 7: Beispiele von Genen, die mit der Metastasierung assoziieren.

1.2. Therapie des Lungenkarzinoms

1.2.1. Klassische Therapie

Die Therapie des Lungenkarzinoms ist multimodal, d.h. umfasst eine Kombination von Chirurgie, Radiologie und Chemotherapie. Sie ist vom histologischen Typ und von der Tumorausbreitung abhängig. Bei der Therapiewahl muss zwischen den nichtkleinzelligen und den kleinzelligen Lungenkarzinom unterschieden werden. Generell sollten die

Lungenkarzinome, wenn dies möglich ist, operativ entfernt werden. Hierbei wird der Tumor zusammen mit umgebendem gesundem Lungengewebe entfernt.

NSCLC- Stadium	Therapie
Stadium I – II	Operation und Chemotherapie
Stadium IIIa	Radio- und Chemotherapie und Operation
Stadium IIIb	Chemotherapie
Stadium IV	Chemotherapie

Tabelle 8: Therapieschemata für das nichtkleinzellige Lungenkarzinom

SCLC- Stadium	Therapie
Stadium I	Operation und Chemotherapie
Stadium II	Chemotherapie und Operation
Stadium III	Radio- und Chemotherapie
Stadium IV	Chemotherapie

Tabelle 9: Therapieschemata für das kleinzellige Lungenkarzinom

Jedoch lässt sich die Erkrankung durch eine Chemotherapie oft nur für einige Monate aufhalten. Durch neue zytotoxische Substanzen mit neueren Wirkmechanismen und weniger Toxizität sowie einer verbesserten Praktikabilität konnte in der vergangenen Dekade die Therapie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms weiterentwickelt werden (Manegold C., 2003). Dies führte jedoch nur unwesentlich zur Verbesserung des Gesamtüberlebens für die Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom.

Im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie kommen aus der pharmakologischen Forschung interessante antineoplastisch wirksame Substanzen, die sowohl zytotoxisch als auch zytostatisch wirksam sein können. Als Grundlage ihrer Entwicklung fungieren neue molekularbiologische Befunde, die potentielle therapeutische Zielstrukturen identifizieren, wie z.B. Proteinkinasen, Farnesyltransferasen, VEGF und p53 (Dy G.K. et al, 2001 /2002). Im Zentrum des klinischen Interesses steht aktuell der „epidermal growth factor receptor“ (EGFR).

1.2.2. EGFR „epidermal growth factor receptor“ als therapeutische

Zielstruktur

Der EGF- Rezeptor wurde vor über 20 Jahren als mögliches Ziel für Antitumorthapien entdeckt. Aktuell kann man die Strategie, den EGF- Rezeptor für Tumorthapien zu beeinflussen, in 4 Kategorien zusammenfassen, und zwar in:

1. monoklonale Antikörper, welche gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gerichtet sind;
2. kleine Moleküle, die die intrazellulären Tyrosinkinasen inhibieren;

3. Inhibierung des EGF- Rezeptors durch Antisense- Oligonukleotide und
4. Verwenden von Antikörperbasierten Immunkonjugaten, wie Immuntoxine, Immunradionukleotide und Immunliposomen.

Von klinischer Relevanz sind bisher die monoklonalen Antikörper und die Tyrosinkinaseinhibitoren. Sie sind durch erfolgreiche Phase – III – Studien für die Behandlung des Lungenkarzinoms und des kolorektalen Karzinoms zugelassen. Monoklonale Antikörper binden an die extrazelluläre Domäne des EGF- Rezeptors und verhindern dadurch kompetitiv eine Bindung des natürlichen Liganden. Zum einen werden dadurch die Aktivierung des Rezeptors und damit auch durch ihn ausgelöste Signalkaskaden inhibiert und zum anderen wird eine Internalisierung und damit eine Abnahme der Rezeptordichte, hervorgerufen. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist der monoklonale Antikörper Cetuximab (IMC-C225, Erbitux™; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Chemisch- synthetische Rezeptor- Tyrosinkinaseinhibitoren konkurrieren mit Adenosintriphosphat (ATP) an den intrazellulären ATP- Bindungsstellen des EGF- Rezeptors und verhindern dadurch eine Aktivierung der ansonsten ausgelösten Signalkaskade (Abbildung 5). Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern kommt es bei dieser Substanzklasse zu keiner Abnahme der EGF- Rezeptordichte. Erlotinib (Erlotinib™) ist die Substanz, welche aktuell in der Klinik im Rahmen von klinischen Studien am erfolgreichsten war und wegen des bewiesenen therapeutischen Nutzens seit November 2005 in Europa zur Behandlung des rezidierten nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms zugelassen ist (Mamot C. et al, 2005).

1.2.3. Erlotinib

Erlotinib ist ein neues niedermolekulares Medikament gegen Krebs, welches von OSI- Pharmaceuticals, Genentech und Roche entwickelt wurde. Bereits geringe Erlotinib- Konzentrationen (150mg/d) führten zur Inhibition der EGFR- Tyrosinkinase. Als Chinazolin- Derivat (Abbildung 6) und somit nicht- peptidischer Arzneistoff wird diese Substanz gut aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und kann oral appliziert werden. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichts zeigt Erlotinib™ ein gutes Diffusionsverhalten und erreicht auch Tumorzellen im Inneren größerer Tumore.

Erlotinib wurde bereits in mehreren Phase – II – Studien untersucht. So konnte bereits 2004 Perez- Soler R. et al. bei Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom in der Zweitlinientherapie ein Ansprechen von 12% beobachten sowie eine Einjahresüberlebensrate von etwa 40%. Das in der EU eingereichte Zulassungsgesuch basiert auf den Ergebnissen aus einer randomisierten klinischen Studie der Phase III (BR21), welche vom National Cancer Institute of Canada, Clinical Trials Group der Queens University (NCIC CTG) in Zusammenarbeit mit OSI Pharmaceuticals, durchgeführt wurde. Die Studie schloss 731 Patienten ein und untersuchte die Wirksamkeit von Erlotinib™ im Vergleich zu Placebo bei Patienten mit fortgeschrittenem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom nach Versagen einer konventionellen Chemotherapie.

Die Überlebenszeit und progressionsfreie Zeit konnte mit Erlotinib gegenüber Placebo signifikant um 2 Monate verlängert werden, was eine Verbesserung von 42% (6,7 Monate im Vergleich zu 4,7 Monate) entspricht. Weiterhin verlängerte sich die Zeitspanne bis zur Verschlechterung der klinischen Symptome wie Husten, Luftnot und Schmerzen (Shepherd F.A. et al, 2005). Des Weiteren wurde bereits in der Literatur diskutiert, ob Mutationen im Exon 18, 19, 20 und 21 des EGF- Rezeptors (Lynch T.J. et al, 2004) prädiktive Faktoren sein könnten. Die BR21- Studie zeigte jedoch, dass Patienten mit Mutationen im Vergleich zu Patienten mit Wild- Typ- Tumoren keinen Überlebensvorteil hatten.

1.3. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Zukünftige Forschungen werden sich darauf konzentrieren, biologische Marker und ihre klinischen Bedeutung nicht nur für das Überleben zu validieren, sondern insbesondere auch ihren prädiktiven Aussagewert für die differenzierte Entscheidung zu unterschiedlichen Therapiestrategien in einem multimodalen Therapiekonzept zu erarbeiten sowie neue Targets zu identifizieren. Auf der Grundlage dieser neuen tumorbiologischen Erkenntnisse ist zu erwarten, dass zukünftig eine Kombinationstherapie aus „klassischer Chemotherapie“ und „biologischer Therapie“ zur Verfügung stehen wird, die an individuellen biologischen Charakteristika des Tumors der Patienten gebunden ist.

Zielsetzung meiner Arbeit war die molekulare Charakterisierung primärer Lungenkarzinome sowie rezidivierter oder progredienter nichtkleinzelliger Lungenkarzinome.

Dabei wurde besondere Aufmerksamkeit folgenden Fragen zugewandt:

- Gibt es spezifische Muster von transkriptionellen Veränderungen bei den drei häufigsten Tumorentitäten des Lungenkarzinoms (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und kleinzelliges Lungenkarzinom)?
- Ist es möglich anhand der ermittelten Daten einen Klassifikator für die Diagnostik zu erstellen?
- Finden sich neue molekulare Strukturen für Therapieansätze?
- Gibt es transkriptionelle Veränderungen, die einen Primärtumor von einem nach Chemotherapie rezidivierten oder progredienten Tumor unterscheiden?
- Sind Unterschiede zwischen Primärtumor und progredienten Tumor hinsichtlich der Expression von EGFR zu finden?

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

- Untersuchung eines Tumorkollektivs von primären Adenokarzinomen, primären Plattenepithelkarzinomen und primären kleinzelligen Lungenkarzinomen sowie die Untersuchung eines weiteren Tumorkollektivs von progredienten Adeno- und Plattenepithelkarzinomen mittels Oligonukleotid- Arrays und „Real Time“- PCR.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe bezogen und besaßen den Reinheitsgrad pro analysis.

Chemikalien und Lösungen	Firma	Katalognummer
Accugen Water	Cambrex, Verviers	# 51200
Acetonitril	Serva, Heidelberg	# 45606.1
Agarose	GIBco BRL, Life Technologie	# 15510-027
Ammoniumpersulfat	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# A-3678
Borsäure	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# B-7901
Bromphenolblau	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# B-5525
Butanol	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.01990
Chloroform	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.02445
EDTA	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# E-7889
Entellan	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.07961
Eosin	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# HAT 110-2-32
Essigsäure	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.00063
Ethanol	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.00983
Ethidiumbromid	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# E-1510
Formaldehyd	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# F-8775
Formamid	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.09684
Glycerol	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# G-5516
Hämatoxylin II	Thermo Shandon, Pittsburgh	# 1.05174
HE-Eindeckmedium	Thermo Shandon, Pittsburgh	# 9990402
Methanol	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.06009
Methylgrün	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.15944
Natriumborhydrid	Merck, KGaA Darmstadt	# 8.06373
Natriumcarbonat	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.06395
Natriumhydroxid	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.06495
PAA (Polyacrylamid 29:1)	Roth, Karlsruhe	# A-515.1
PAA (Polyacrylamid 49:1)	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# A-0924
PBS	PAA, Laboratories GmbH, Pasching	# H15-002
RNA- Later	Ambion, Austin, TX, USA	# 7020
Silbernitrat	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.01512
TEMED	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# T-8133
Tissue Freezing Medium	Jung, Leica Microsystems GmbH	# 14020108926
TRISBase	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# T-1503
Triton-X	SIGMA – Aldrich, Steinheim	# T-9284
Wasserstoffperoxid	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.07209
XL Xylenecyamid	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.10590
Xylol	Merck, KGaA Darmstadt	# 1.02445

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lösungen.

2.1.2. Puffer, Gele und Lösungen

Die aufgeführten Puffer, Gele und Lösungen wurden selbst hergestellt.

◆ TBE - Puffer

10x TBE

0,89M TRISBase	188,9g	
0,89M Borsäure	55g	
0,02M EDTA pH 8,0	40ml	auf 1 Liter mit Aqua dest.

◆ SSCP- Gele (unter 4 Bedingungen)

◆ 8% iges PAA- Gel (Poylacrylamid- Gel) + 2% Glycerol

29 : 1 PAA (Bedingung 1)

Aqua dest.	29ml
10 x TBE	4,5ml
40% PAA(29:1)	9ml
40% Glycerol	2,25ml
10% APS	136µl
TEMED	75µl

49 : 1 PAA (Bedingung 2)

Aqua dest.	29ml
10 x TBE	4,5ml
40% PAA (49:1)	9ml
40% Glycerol	2,25ml
10% APS	136µl
TEMED	75µl

◆ 8% iges PAA- Gel + 10% Glycerol

29 : 1 PAA (Bedingung 3)

Aqua dest.	19,4ml
10 x TBE	4,5ml
40% PAA(29:1)	9ml
40% Glycerol	11,25ml
10% APS	136µl
TEMED	75µl

49 : 1 PAA (Bedingung 4)

Aqua dest.	19,4ml
10 x TBE	4,5ml
40% PAA (49:1)	9ml
40% Glycerol	11,25ml
10% APS	136µl
TEMED	75µl

◆ SSCP- Loadingpuffer

95% Formamid deionisiert	9,5ml
10mM EDTA	0,2ml
Wasser	0,3ml

♦ SSCP- Größenmarker

SSCP Loadingpuffer + Farbstoff

Formamid	10ml
0,5M EDTA pH 8,0	200µl
BPB Bromphenolblau	10mg
XL Xylenecyamid FF	10mg

♦ SSCP- Färbelösungen:

- Lösung A

10% Ethanol	100ml Absoluten Ethanol
0,5% Essigsäure	5ml

auffüllen bis 1Liter mit Aqua dest.

- Lösung B

Stammlösung (10X) 1% AgNO₃ → 5g AgNO₃ in 500ml Wasser

Gebrauchslösung 1 x Lösung B (100ml Stammlösung + 900ml Aqua dest.)

- Lösung C (für 2 Gele)

NaOH	9g	
NaBH ₄	0,03g	(1 Körnchen)
Formaldehyd 37%	2,4ml	
Aqua dest.	600ml	

- Lösung D

7,5 % Na₂CO₃ Fixierlösung

Stammlösung → 37,5g Na₂CO₃ auf 500ml Wasser

Gebrauchslösung → 1 x Lösung D (50ml 10x Lösung D + 450ml Wasser)

♦ Ethidiumbromidbad

Ethidiumbromid 10µl in 100ml dH₂O

2.1.3. Zelllinien

Die verwendeten Methoden der Mutationsanalyse wurden an Tumorzelllinien etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei humane Tumorzelllinien H446 und H1299 verwendet.

Bezeichnung	Tumor	Eigenschaften
H446 (ATCC – Nummer: HTB- 171)	kleinzelliges Lungenkarzinom	- wächst adherent und in Suspension - epitheliale Morphologie - hypertriploid (Chromosomenzahl: 74) - exprimiert NSE und neuronspezifische Kreatinkinase - c-myc ist überexprimiert
H1299 (ATCC – Nummer: CRL- 5803)	nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	- wächst adherent - epitheliale Morphologie - p53- Negativ - exprimiert Neuromedin B (NMB)

Tabelle 11: Überblick über die verwendeten Zelllinien.

Für Zellkulturen wurden folgende Medien und Antibiotika benutzt.

♦ Medium:	50ml Fötale Kälberserum (FCS)	PAA (# A15-043)
	5ml 1M L-Glutamin	PAA (# M11-004)
	5ml Penicilin-Streptomycin-Mix	PAA (# P11-010)
	in 500ml RPMI-1640-Medium	SIGMA- Aldrich (# R0883)

Zum Ablösen der adherenten Zellen wurde Trypsin EDTA- Lösung (SIGMA- Aldrich, Steinheim, # T-3924) benutzt.

2.1.4. „Assay-on-Demand gene expression products“

Die folgenden „Assay-on-Demand gene expression product“ (TaqMan- Sonden, Applied Biosystems, Weiterstadt) wurden verwendet, um bestimmte Gene zu bestätigen. Für die Primärtumoren wurden signifikante Gene mit einer Intensität auf dem Array von mindestens 7 (weit über dem Background) sowie einem „Fold Change“ von mindestens 2 ausgewählt: NRCAM (Hs00170554_ml), PTTG1 (Hs00851754_g1), ICAM1 (Hs0016493_ml), PTTG1IP (Hs0018896_ml), COL1A1 (Hs00164004_ml), RTN1 (Hs00221700_ml), CASK (Hs00177620_ml), PRKCI (Hs00702254_ml), PLS3 (Hs00192406_ml), HPCAL1 (Hs00365962_ml), INFGR2 (Hs00194264_ml), GJA1 (Hs00748445_ml), CCNB2 (Hs00270424_ml), PCNA (Hs00427214_ml), UBE2C (Hs00738962_ml), UPP1 (Hs00427695_ml), NCAM1 (Hs00169851_ml), MAGED4 (Hs00602656_gl), FOXG1B (Hs00702391_st), FYN (Hs00941600_ml) und RPS11 (Hs00817975_gl) als „Housekeeping“-Gen.

Für die Verifizierung der Ergebnisse des zweiten Teils wurden signifikante Gene mit einem „Fold Change“ von mindestens 1,5 ausgewählt: MYC (Hs00153408_ml), FZD6 (Hs00171574_ml), CCND1 (Hs00277039_ml), SMAD4 (Hs00232068_ml), CNNB1 (Hs00170025_ml), RYK (Hs00243196_ml), UBE2L6 (Hs00188450_ml), SGKL (Hs00179430_ml), UCHL1 (Hs00188233_ml), UBE2E1 (Hs00268678_ml), PSMD4 (Hs00356654_ml), PSMC1 (Hs02386942_g), PSMA3 (Hs00541061_ml), MYO6 (Hs00192265_ml), SMARCC1 (Hs00268265_ml), HIST1H4C (Hs00543883_sl), COPS6 (Hs00371822_ml), TEBP (Hs00163037_ml), HSPA1B (Hs00359147_sl), SENP2 (Hs00222121_ml), und GAPDH (Hs99999905_ml) als „Housekeeping“-Gen.

2.1.5. Kits

Die verwendeten kommerziell erhältlichen Kits stammen von den in Tabelle 12 aufgeführten Firmen.

Kits	Firma	Katalognummer
Bio Array High Yield RNA Transcript Labelling Kit	Enzo Life Sciences, Farmingdale	# 42655
EGFR pharmDX ICH Kitsystem	DAKO, Carpinteria, CA, USA	# K1492
EnVision+DAB Detectionssystem	DAKO, Carpinteria, CA, USA	# K4006
High Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt	# 4322171
Message Amp TM II aRNA Kit	Ambion, Austin, TX, USA	# 1751
Message Amp TM aRNA Kit	Ambion, Austin, TX, USA	# 1750
QIAamp DNA MicroKit	Qiagen, Santa Clarita, CA, USA	# 56304
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Santa Clarita, CA, USA	# 28104
RNase freies DNase- Set	Qiagen, Santa Clarita, CA, USA	# 79254
RNeasy Micro- Kit	Qiagen, Santa Clarita, CA, USA	# 74004
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt	# 4304437

Tabelle 12: Überblick über die verwendeten Kits.

2.1.6. Verbrauchsmaterial

Für die Experimente wurden Plastik- Reaktionsgefäße verschiedener Größe von Eppendorf, gestopfte Pipettenspitzen unterschiedlicher Volumina von Biozym sowie das in der Tabelle 13 aufgelistete Verbrauchsmaterial verwendet.

Verbrauchsmaterial	Firma	Katalog-nummer
25m ² Zellkulturschalen, adhären	Greiner- Cellstar, Frickenhausen	# 690175
50ml Falcongefäße	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes	# 3217298
96 Well Optical Reaction Platte	Applied Biosystem, Weiterstadt	# 4306737
Adhesive PCR- Film	ABgene, Surrey	# AB-0558
CapSure Macro LCM Caps	Arcturus Bioscience, Oldendorff	# 10284-04
Deckgläser	Shandon, Pittsburgh	# 3217231
GelBond PAG Film	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorff	# 54780
Objektträger, Adhäsion, Superfrost Plus	Menzel GmbH, Braunschweig	#1800AMNZ
Objektträger, geschliffen	Engelbrecht Labortechnik GmbH	# 3217222

Tabelle 13: Übersicht des benutzten Verbrauchsmaterials

2.1.7. Geräte

Folgende Geräte wurden zur Durchführung oder Dokumentation der Experimente benutzt.

ABI Prism 7900HT	Applied Biosystems, Weiterstadt
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto CA
Autopix 100	Arcturus Bioscience, Oldendorff
Biofuge fresco (Tischzentrifuge)	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Cryostat CM 1900	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Elektrophoresekammer (Agarosegel)	Owl SeparationSystems, Inc Portsmouth, B1A
Elektrophoresekammer (SSCP)	Pharmacia Biotech, Multiphor II
HPLC	Transgenomic,
Inkubator	Laborbedarf Sauer, Reutlingen
Megafuge 1.0R	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom RM2155	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
NanoDrop ^R ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR mastercycler gradient	Eppendorf GmbH, Hamburg
Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilbank, HS12	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Syngene Bio- Imaging	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorff

Thermomixer comfort (Thermoblock)	Eppendorf GmbH, Hamburg
Vakuumzentrifuge	Eppendorf GmbH, Hamburg

2.2. Patientenrekrutierung

Die Arbeit basiert auf insgesamt 2 Tumorkollektiven. Zum einen wurden Proben primärer Lungenkarzinome vor Therapie gewonnen. Im zweiten Tumorkollektiv wurden Proben von Patienten, die trotz Therapie einen fortschreitenden Krankheitsverlauf aufweisen herangezogen.

In beiden Fällen wurden die Proben an der Klinik für Kardiologie, Pulmonologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf mittels Biopsie während einer Bronchoskopie gewonnen. Zusätzlich wurden einige Proben des zweiten Tumorkollektives mittels Computer Tomographie gesteuerter Nadelbiopsie an der Klinik für Radiologie der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf gewonnen und innerhalb weniger Minuten in RNA- Later überführt. Anschließend wurde das Gewebe auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Das Probenmaterial und die bei dieser Auswertung erlangten personengebundenen Daten wurden mit Hilfe eigener Bezeichnungen verschlüsselt und gemäß gültigem Datenschutzgesetz gehandhabt. Jedem Patient wurden ein Informationsblatt und eine zu unterzeichnende Einverständniserklärung, die vorab von der Ethikkommission begutachtet worden war, ausgehändigt.

Für die Studie der Genexpressionsanalysen primärer Lungenkarzinome wurden insgesamt 29 Patienten, davon 10 Patienten mit einem Adenokarzinom, 10 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom und 9 Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom untersucht. Zusätzlich wurden als Kontrollen 5 Proben von Patienten ohne Tumorerkrankung verwendet (Tabelle 14). Im zweiten Tumorkollektiv konnten insgesamt 23 Patienten, die trotz adjuvanter Chemotherapie ein fortschreitendes nichtkleinzelliges Lungenkarzinom aufwiesen, in die Studie aufgenommen werden. Dieses Tumorkollektiv teilt sich auf in 15 Patienten mit einem Adenokarzinom und 9 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom (Tabelle 15).

Patient	Alter (Jahre)	Geschlecht	Diagnose
A1	n.b.	n.b.	Adeno - Ca
A2	63	m	Adeno - Ca
A3	45	w	Adeno - Ca
A4	62	m	Adeno - Ca
A5	n.b.	n.b.	Adeno - Ca
A6	73	m	Adeno - Ca
A7	63	m	Adeno - Ca
A8	81	w	Adeno - Ca
A9	64	m	Adeno - Ca
A10	53	m	Adeno - Ca
P1	n.b.	n.b.	Plattenepithel - Ca
P2	n.b.	n.b.	Plattenepithel - Ca
P3	76	m	Plattenepithel - Ca
P4	57	m	Plattenepithel - Ca
P5	n.b.	n.b.	Plattenepithel - Ca
P6	n.b.	n.b.	Plattenepithel - Ca
P7	60	m	Plattenepithel - Ca
P8	80	m	Plattenepithel - Ca
P9	76	m	Plattenepithel - Ca
P10	73	w	Plattenepithel - Ca
K1	81	w	Kleinzelliges Lungenkarzinom
K2	74	m	Kleinzelliges Lungenkarzinom
K3	67	m	Kleinzelliges Lungenkarzinom
K4	39	w	Kleinzelliges Lungenkarzinom
K5	64	w	Kleinzelliges Lungenkarzinom
K6	61	m	Kleinzelliges Lungenkarzinom
K7	70	m	Kleinzelliges Lungenkarzinom
K8	55	w	Kleinzelliges Lungenkarzinom
K9	74	m	Kleinzelliges Lungenkarzinom
N1	57	w	Nichttumor
N2	64	m	Nichttumor
N3	65	w	Nichttumor
N4	72	m	Nichttumor
N5	74	m	Nichttumor

Tabelle 14: Patientengruppe der Genexpressionsstudie primärer Lungenkarzinome (A = Adeno- Ca = Adenokarzinom, P = Plattenepithel- Ca = Plattenepithelkarzinom, K = kleinzelliges Lungenkarzinom, N = Nichttumor, m = männlich, w = weiblich, n.b. = nicht bekannt, KW = Kaiserswerth)

Patient	Alter (Jahre)	Geschlecht	Diagnose
FA1	79	m	Bronchoalveoläres- Ca
FA2	53	m	Adeno-Ca
FA3	63	m	Adeno- Ca
FA4	49	m	Adeno- Ca
FA5	50	w	Adeno- Ca
FA6	70	m	Adeno- Ca
FA7	60	m	Adeno- Ca
FA8	54	m	Adeno- Ca
FA9	63	w	Adeno- Ca
FA10	72	m	Adeno- Ca
FA11	62	m	Adeno- Ca
FA12	65	m	Bronchoalveoläres- Ca
FA13	76	m	Adeno- Ca
FA14	72	m	Adeno- Ca
FA15	43	m	Adeno- Ca
FP1	77	m	Plattenepithel-Ca
FP2	55	m	Plattenepithel- Ca
FP3	68	m	Plattenepithel- Ca
FP4	59	m	Plattenepithel- Ca
FP5	55	m	Plattenepithel- Ca
FP6	61	m	Plattenepithel- Ca
FP7	74	w	Plattenepithel- Ca
FP8	57	m	Plattenepithel- Ca
FP9	67	m	Plattenepithel- Ca

Tabelle 15: Patientengruppe des zweiten Tumorkollektivs.

(FA = progredientes Adenokarzinom, FP = progredientes Plattenepithelkarzinom, Adeno- Ca = Adenokarzinom, Plattenepithel- Ca = Plattenepithelkarzinom, m = männlich, w = weiblich)

2.3. Molekulargenetische Standardtechniken

2.3.1. Zellkultivierung und Zellpassagierung

Die humanen Tumorzellen wurden in einem speziell für die Zellzucht eingerichteten Labor kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 5% CO₂ und 37°C in feuchter Atmosphäre eines Brutschrankes. Es wurden Nährmedien mit stabilem Glutamin verwendet, denen 10% fötales Kälberserum zugegeben wurde. Zur Verhinderung von Kontaminationen durch Bakterien und Pilze wurde den Medien ein Antibiotikagemisch zugesetzt (Zusammensetzung des Nährmediums siehe Abschnitt 2.3.1.).

Die Zellen wurden schnell aufgetaut und in 10ml Nährmedium in eine 25cm² Kulturflasche verteilt. Nach 24 Stunden wurde das verbrauchte Kulturmedium entfernt

und neues Nährmedium zugegeben. Dann wurde die Inkubation fortgesetzt. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurden sie durch Zugabe von 2ml Trypsin von der Kulturflasche abgelöst und zum Anzüchten der Zellen in weitere 75 cm² Kulturflaschen aufgeteilt. Die Zellen wurden nach 3 Tagen mit frischem Kulturmedium versorgt und stets mikroskopisch begutachtet.

Nachdem diese Kulturflaschen 60% konfluent bewachsen waren, wurde der Überstand von der zu untersuchenden Zelllinie abgenommen. Die Zellen wurden erneut durch Zugabe von 2ml Trypsin von der Kulturflasche abgelöst, in 10ml PBS aufgenommen und 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in 350µl RLT- Puffer aufgenommen und in ein Eppendorfröhrchen überführt und umgehend bei -80°C bis zur RNA- und DNA- Extraktion gelagert.

2.3.2. Laser Capture Mikrodisektion

Die Laser Capture Mikrodisektion (LCM) ist eine Methode, um kleine Areale oder auch einzelne Zellen aus einem histologischen Schnitt zu isolieren. Zellgenaue und kontaktfreie Dissektion aus heterogenen Gewebeschnitten ermöglichen Analysen von DNA, RNA und Proteinen, ohne Kontamination durch andere Zellsorten. LCM kam im Rahmen dieser Arbeit bei Proben mit weniger als 70% Tumoranteil zur Anwendung. Proben mit mehr als 70% Tumoranteil wurden nach der Dehydrierung mittels Skalpell direkt vom Objektträger in ein Eppendorfröhrchen überführt.

Die LCM wurde durchgeführt am Autopix 100. Das System besteht aus einem Mikroskop mit eingekoppelten Niedrigenergie- Infrarot- Laser, der an einen Computer und an eine digitale Videokamera angeschlossen ist. Die Kamera überträgt dabei die Bilder an den Computer. Über eine Software (Autopix 100) wurden die gewünschten Zellen markiert und der Laser sowie die Bewegung des Motortisches gesteuert. Auf die markierten Zellen wurde ein LCM- Cap, das mit einem speziellen Transferfilm versehen ist, aufgesetzt. Anschließend wurde der Laser aktiviert. Dieser trifft auf das LCM- Cap, wobei der Transferfilm schmilzt und auf die darunter liegenden markierten Zellen fällt und mit diesen verschmilzt. Beim Abnehmen des LCM- Caps wurden die Zellen, mit denen der Transferfilm verschmolzen ist, aus dem umliegenden Zellverband herausgelöst (Abbildung 6).

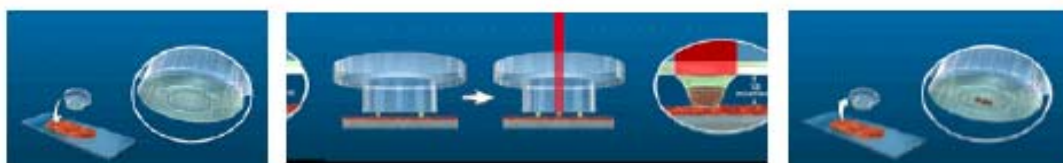


Abbildung 6: Methodischer Hintergrund der Laser Capture Mikrodisektion. Das LCM- Cap wird computergestützt auf die markierten Zellen aufgesetzt. Der Transferfilm des LCM- Caps wird durch den Beschuss mit einem Infrarotlaser aktiviert und verschmilzt mit dem Gewebe. Das Cap mit angeheftetem Gewebe wird abgenommen und weiter verarbeitet.

Die Zellen gelangten dadurch in den Deckel des LCM- Caps und konnten dann, nach Zugabe eines geeigneten Reaktionspuffers, analysiert werden.

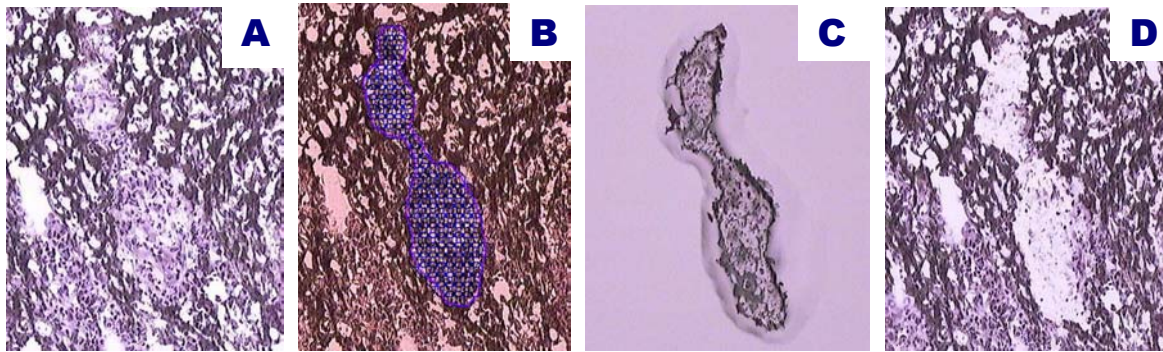


Abbildung 7: Methode der LCM.

Der Gewebeschnitt wird unter Mikroskop begutachtet (A). Es wird ein LCM- Cap aufgesetzt und die gewünschten Tumorzellen werden computergestützt markiert (B). Die markierten Zellen werden aus dem Gewebeverband herausgelöst und sind im LCM- Cap (C). Anschließend wird zur Kontrolle das Gewebe nach den Lasern auf eventuelle Zellrückstände kontrolliert (D).

Die Gefriergewebestücke wurden bei -80°C gelagert und auf Trockeneis transportiert. Es wurden $8\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Die verwendeten Objektträger wurden vor dem Aufziehen der Gewebeschnitte 20 Minuten in Chloroform gereinigt und anschließend bis zum Gebrauch luftdicht verpackt. Nach Anfertigen der Kryoschnitte wurden diese auf die vorbereiteten Objektträger aufgezogen und direkt im Kryostaten bei -30°C eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Um die Mikrodisektion der Tumorzellen zu ermöglichen, wurden die Gewebeschnitte 30 Sekunden in 95% Methanol / 3% Essigsäure / 2% dH_2O fixiert und anschließend gewässert. Zur Visualisierung der unterschiedlichen Zellen erfolgte die Färbung der Kryoschnitte mit Hämatoxylin II und anschließend die Entfärbung in RNase- freiem Wasser, um überschüssige Färbelösung zu entfernen. Daran schloss sich eine Entwässerung der Zellen mittels aufsteigender Alkoholreihe (je 30 Sekunden in 70%igen, 90%igen und zweimal 100%igen Alkohol) an. Zum Abschluss der Entwässerung wurden die Kryoschnitte für 3 Minuten in Xylol überführt und anschließend trockneten sie ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur. Dann konnten die Objektträger in das Arcturusgerät eingelegt und die LCM durchgeführt werden. Folgende Einstellungen am LCM- Gerät wurden verwendet: Duration: 850ns; Repeat: 0,2s; Target: 0,205V; Current: 18,0mA; Spotsize: $30\mu\text{m}$; Power: 80mW. Die isolierten Zellen wurden in Lysepuffer überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3.3. RNA- Extraktion

Aufgrund der LCM bedingten geringen Zellzahl erfolgte die RNA- Extraktion mittels RNeasy Micro- Kit von Qiagen. Dazu wurden die Proben auf Eis aufgetaut, $350\mu\text{l}$ 70%iger Ethanol hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Diese $700\mu\text{l}$ wurden auf die RNeasy MinElute- Säule überführt und 1 Minute bei 10.000 rpm

abzentrifugiert. Um keine RNA zu verlieren wurde der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und die Zentrifugation wiederholt. Danach konnte der Durchfluss dekantiert werden. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 350µl RW1- Puffer und erneuter Zentrifugation (1 Minute bei 10.000 rpm). Dann schloss sich die DNase- Verdauung an. Dazu wurden 10µl DNase- Stammlösung zu 70µl RDD Puffer gegeben und vorsichtig gemischt. Diese 80µl wurden direkt auf den Filter der Säule pipettiert und 15 Minuten bei 30°C im Thermoblock inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 350µl RW1- Puffer. Die MinElute- Säule wurde auf ein neues Sammelutube gesetzt und der vorherige Waschschrift mit 500µl RPE- Puffer wiederholt. Anschließend wurden 500µl 80%iger Ethanol hinzugegeben und 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Um den Ethanol vollständig zu entfernen, wurde die Säule mit offenem Deckel 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend auf ein neues 1,5ml Sammelutube überführt. Für die Elution der RNA wurden 14µl vorgewärmtes RNase freies Wasser genau auf den Filter der Säule pipettiert und 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde eine 1: 5 Verdünnung für die Konzentrationsbestimmung am Nanodrop sowie für die Qualitätskontrolle am Bioanalyzer hergestellt. Die eluierte RNA wurde stets auf Eis aufbewahrt und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

2.3.4. RNA- Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 und 280nm mit dem NanoDrop® ND-1000 gegen Aqua dest. Der NanoDrop ist ein Spektrophotometer mit dem bereits kleine Probenmengen von 1µl korrekt und reproduzierbar gemessen werden können. Dadurch können die RNA- Proben hoch konzentriert und ohne Verdünnung gemessen werden, was bei den mittels LCM gewonnen gering konzentrierten RNA- Proben von großem Vorteil ist. Grundsätzlich kann Nukleinsäure bei einer UV- Wellenlänge von 260nm photometrisch quantifiziert werden. Das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280nm gibt eine Aussage über die Proteinkontamination in der Lösung. Reine RNA und DNA haben ein OD_{260}/OD_{280} – Verhältnis (Ratio) von 1,7 – 2,0.

Von den zu analysierenden RNA- Proben wurde eine 1: 5 Verdünnung (1µl Probe + 4µl Aqua dest.) hergestellt. Das Spektrophotometer wurde mit Aqua dest. kalibriert, d.h. auf 0,0µg/ml eingestellt. Danach wurde die verdünnte Probe luftblasenfrei auf das eine Ende des optischen Fieberkabels pipettiert. Ein zweites optisches Fieberkabel wird anschließend in Kontakt mit der flüssigen Probe gebracht, so dass die beiden Fieberkabel durch die Probe verbunden sind. Eine Xenon Blitzlichtlampe dient als Lichtquelle und liefert den Impuls, der durch die Probe geht und anschließend detektiert und von einem linearen CCD- Array analysiert wird. Es wurden stets zwei Messungen von jeder Probe durchgeführt und anschließend der Mittelwert berechnet.

2.3.5. RNA- Qualitätskontrolle mittels Agilent 2100 Bioanalyzer

Da auch geringe Veränderungen in der Genexpression mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie detektiert werden sollen, ist es wichtig die RNA Qualität hinsichtlich Degradation und Kontaminationen vor der Chipanalyse zu untersuchen. Der Agilent 2100 Bioanalyzer in Kombination mit den RNA 6000 Pico LabChip Kit (Caliper®, Agilent Technologies, Palo Alto CA) stellt eine Möglichkeit zur Qualitätskontrolle und Quantifikation von geringen RNA Konzentrationen im Bereich von 200pg/µl bis 5000pg/µl dar. Die Methode beruht darauf, dass an einer kapillären Gelmatrix, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, ein elektrisches Feld angelegt wird, in der die zu analysierende RNA- Probe von der Kathode (-) zur Anode (+) wandert und der Größe nach aufgetrennt wird. Dabei lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff an die Nukleinsäure an und kann anschließend mittels Laser gemessen werden. Das Ergebnis wird anschließend als Elektropherogramm dargestellt. Im Elektropherogramm sind bei guter Qualität der RNA scharfe Banden der 18s rRNA und der 28S rRNA, die als Peaks im Vergleich zu der flachen Basislinie erscheinen, zu erkennen (Abbildung 8). Bei degradierter RNA fehlt ein rRNA Peak kombiniert mit einer verkürzten Migrationszeit, so dass der Peak mehr nach links im Elektropherogramm verschoben ist.

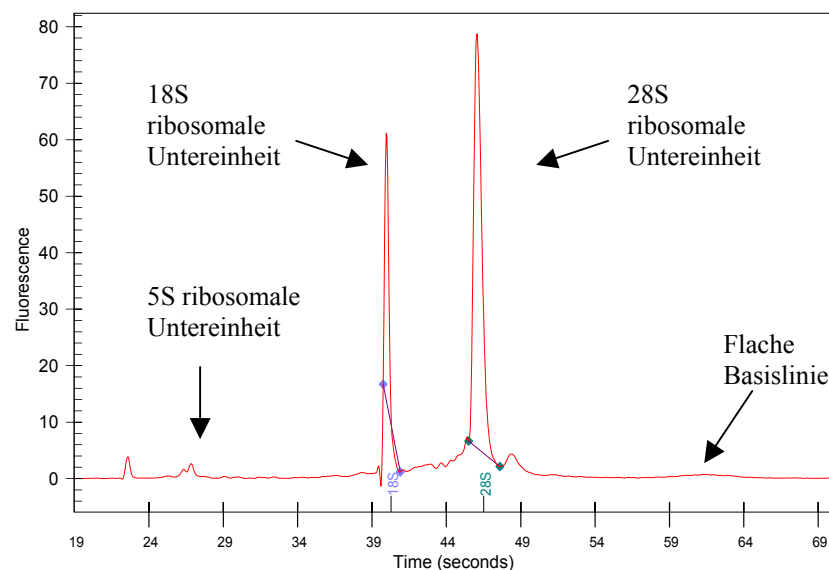


Abbildung 8: Qualitätskontrolle von RNA mittels Bioanalyzer.

Im Elektropherogramm sind deutlich die zwei rRNA- Peaks zu erkennen. Der kleine Peak bei 27 Sekunden entsteht aufgrund der 5s, 5.8s Untereinheiten der rRNA und tRNA. RNA- Proben, die solch ein Elektropherogramm aufwiesen wurden, für weitere Analysen verwendet.

Nach der Amplifikation der RNA erfolgte ebenfalls eine qualitative und quantitative Kontrolle mittels Agilent 2100 Bioanalyzer. Da die RNA- Probe amplifiziert ist und verschiedene Fragmente unterschiedlicher Länge enthält, erscheint im Elektropherogramm jetzt ein breiter, großer Peak (Abbildung 9).

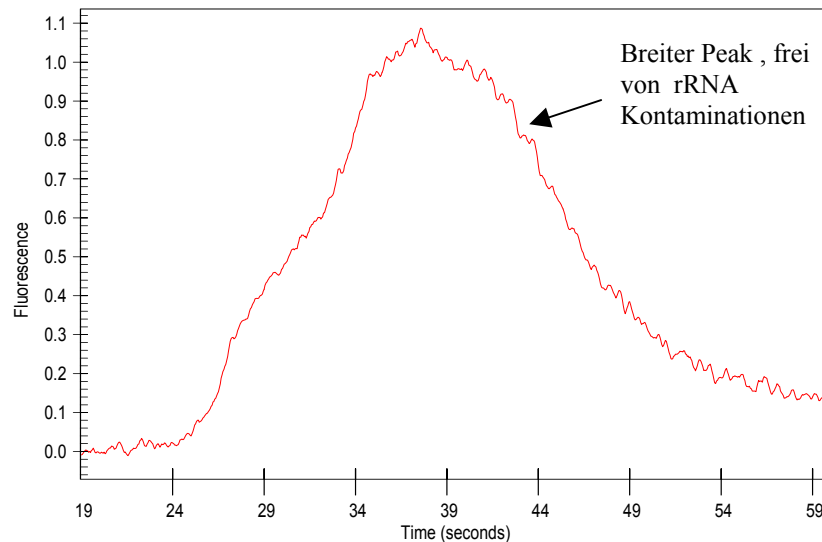


Abbildung 9: Qualitätskontrolle von amplifizierter RNA mittels Bioanalyzer. Amplifizierte RNA- Proben die solch ein Elektropherogramm aufwiesen, konnten für die Arrayhybridisierung verwendet werden.

Der RNA 6000 Pico Assay wurde gemäß des von der Firma mitgelieferten Agilentprotokolls durchgeführt. Zuerst wurden 550µl der Gelmatrix auf den Spinfilter gegeben und 10 Minuten bei 1500rpm abzentrifugiert. Davon wurden 65µl abgenommen und mit 1µl Fluoreszenzfarbstoff vermischt sowie erneut 10 Minuten bei 1300rpm abzentrifugiert, damit sich der Farbstoff gleichmäßig in der Gelmatrix verteilt. Der Pico Chip wurde in die „Priming“ Station eingelegt und die drei mit G- markierten Wells mit je 9µl des Gel- Farbstoffmixes und das mit CS- markierte Well mit 9µl der RNA 6000 „Conditioning Solution“ beladen. Anschließend wurden in die 11 Wells für die zu analysierenden RNA- Proben 5µl des RNA 6000 Pico Markers eingefüllt. Nachdem die RNA- Proben und der Ladder für 2 Minuten bei 70°C erhitzt wurden, wurde 1µl der zu analysierenden RNA- Probe in die mit Marker vorbereiteten Wells pipettiert. Zusätzlich wurde als Standard 1µl des vorgewärmten Ladders in ein weiteres Well gegeben. Anschließend wurde der beladene Chip vorsichtig 1 Minute gevortext (IKA Vortexer), bevor der Chip eingelegt und der Lauf gestartet wurde. Nach 40 Minuten wurden mittels 2100 Expert Software die Elektropherogramme erstellt.

2.4. Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip®

Array Technologie

Bei den im Experiment benutzten Human Genome Focus Oligonukleotid- Arrays handelt es sich um kleine Glasträger in der Größenordnung von 1,3 x 1,3 cm von der Firma Affymetrix. Auf dieser Oberfläche befinden sich 8793 voneinander abgetrennte Spots. Auf jedem dieser Spots ist eine Oligonukleotid- Probe bekannter Sequenz als Sonde fest angeheftet. Rund 8700 dieser Spots enthalten Sequenzen von zu testenden humanen Genen, 3 Gensequenzen von „Housekeeping“- Genen (GAPDH, beta- Actin und STAT1)

sind auf dem Chip mehrmals aufgespottet und dienen als Positivkontrollen. Um verschiedene Arrays miteinander vergleichen zu können und eine Aussage über die Hybridisierungseffizienz machen zu können, sind des Weiteren prokaryotische Kontrollgensequenzen von *E. coli* (BioB, BioC und BioD, Gene des bakteriellen Biotinsyntheseweges) und ein Rekombinasegen von dem Bakteriophagen P1 (cre) aufgespottet. An den Ecken des Arrays befinden sich außerdem noch B2 Kontrolloligonukleotide, die ein genaues Ausrichten und Zuordnen der gespotteten Oligonukleotide ermöglicht.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Vorhybridisierung des Chips. Anschließend wurde jeder dieser Spots komplett mit einer Nukleinsäurelösung bedeckt. Dann wurde der Array mehreren Waschschritten unterzogen. Dadurch verblieben nur die aufgrund der Komplementarität gebundenen Nukleinsäuren der Testsubstanz auf dem Spot und ließen sich nach dieser als Hybridisierung bezeichneten Phase auf dem Array nachweisen. Der Nachweis war möglich, da die Nukleinsäuren der Proben vor der Hybridisierung in aRNA umgeschrieben wurde und dabei Biotin markierte dUTPs verwendet wurden, so dass ein Streptavidin- Phycoerythrin konjugierter Primärantikörper an diesen markierten Nukleotid binden konnte. Zur Signalverstärkung erfolgte dann die Zugabe eines anti- Streptavidin- Phycoerythrin gekoppelten Sekundärantikörpers, der sich im 'Sandwich- Verfahren' am Primärantikörper anlagerte. Der Array wurde dann von einem Argon- Laser gekoppelten Scanner gelesen, wobei das Phycoerythrin bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt wurde und Energie frei gab, die als Signalintensität gemessen werden konnte. Anschließend erfolgte eine computergestützte statistische Auswertung der Daten.

Bei der Affymetrix GeneChip® Array Technologie wurden im Wesentlichen folgende Schritte durchlaufen.

- (1) Probenvorbereitung: Reverse Transkription und Markierung der Probe
- (2) Qualitätskontrolle der amplifizierten RNA
- (3) Fragmentierung
- (4) Hybridisierung, Waschen, Färben
- (5) Scannen des Array
- (6) Analyse der gewonnen Daten

(1) Probenvorbereitung: Reverse Transkription und Markierung der Probe

Aufgrund der geringen RNA- Mengen in mikrodissiziertem Gewebe musste stets eine Amplifikation der gesamten mRNA erfolgen, bevor weiterführende Analysen gemacht werden konnten. Zu diesem Zwecke wurde das MessageAmp™ aRNA Kit von Ambion verwendet. Es wurden je 200ng bis 500ng der aus den Tumorzellen isolierten RNA in cDNA mittels Kit wie folgt umgeschrieben.

1) Erststrang cDNA- Synthese

Probenansatz:	(RNA oder RNA und dH ₂ O) Probe	11µl
	Oligo(dT)Primer	1µl
		Σ 12µl

Alle Komponenten wurden mit der Pipette vorsichtig vermischt und kurz abzentrifugiert. Die Eppendorfröhrchen wurden in einem auf 70°C vorgeheizten Thermoblock für 10 Minuten gestellt, anschließend die Proben auf Eis gestellt und der Reaktionsansatz hinzu pipettiert.

Reaktionsansatz:	2µl	10x First Strand Buffer
	1µl	Ribonuclease Inhibitor
	4µl	dNTP Mix

Σ 7µl

Erneut kurz abzentrifugiert, dann 1µl reverse Transkriptase hinzu gegeben und 2 Stunden bei 42°C im Inkubator inkubiert.

2) Zweitstrang cDNA- Synthese

Reaktionsansatz:	63µl	Nuclease-free Water
	10µl	10x Second Strand Buffer
	4µl	dNTP Mix
	1µl	RNase H

Σ 78µl

Für die Zweitstrangsynthese wird erneut der Reaktionsansatz der Probe zugeführt, kurz abzentrifugiert und 2µl der DNA- Polymerase hinzu gegeben.

Das Gemisch inkubiert für weitere 2 Stunden bei 16°C im Thermoblock.

Anschließend erfolgt die Aufreinigung der cDNA laut Protokoll.

- Protokoll:
- 50µl Bindepuffer auf den cDNA- Säulenfilter pipettieren → 5 Minuten bei RT inkubieren
 - 250µl cDNA-Bindepuffer zu jeder Probe pipettieren, mit der Pipette mischen und auf die Säule pipettieren → 1 Minuten bei 10.000rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
 - 650µl cDNA- Waschpuffer auf die Säule geben → 1 Minute bei 10.000rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
 - Trockenzentrifugieren bei 1 Minuten und 10.000 rpm
 - Säule auf ein neues 1,5ml Röhrchen setzen
 - 10µl vorgewärmtes Nuklease freies Wasser genau auf den Säulenfilter pipettieren → 2min bei Raumtemperatur inkubieren, dann 2 Minuten bei 10.000rpm zentrifugieren

- Elutionsvorgang (10µl RNase freies Wasser, Inkubation bei RT und Zentrifugation) wiederholen (Elutionsvolumen sollte 16µl betragen)
- Proben bei -20°C über Nacht lagern

3) Markierung durch in vitro Transkription mit Biotin markierten Nukleotiden

Markierungsmix:	4µl	biotinylierte dNTPs von ENZO
	4µl	T7 10x Reaction Buffer
	12µl	RNase freies Wasser
		Σ 20µl

Den Markierungsansatz zu der Probe pipettieren sowie die 4µl Enzymmix. Alle Komponente vorsichtig mit der Pipette mischen und 5 Stunden im Inkubator bei 37°C inkubieren.

Anschließend erfolgt die Aufreinigung der amplifizierten RNA laut Protokoll.

- Protokoll:
- 100µl aRNA- Bindepuffer auf die Säule pipettieren → 5 Minuten bei RT inkubieren
 - 60µl Elutionslösung in die Proben geben (Gesamt volumen der Probe = 100µl)
 - 350µl aRNA Bindepuffer zu jeder Probe geben und vorsichtig mischen
 - 250µl 100%igen Ethanol zu diesem Gemisch hinzu pipettieren (700µl Probenvolumen) und vorsichtig mischen und zügig auf die Säule pipettieren → 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
 - 650µl aRNA-Waschpuffer auf den Filter pipettieren → 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
 - Trockenzentrifugieren bei 10.000 rpm für 1 Minute
 - Säule auf neues 1,5ml Röhrchen überführen
 - 50µl der vorgewärmten Elutionslösung genau auf den Filter der Säule pipettieren → 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und dann 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugieren
 - Elutionsvorgang wiederholen (Elutionsvolumen sollte 96µl betragen)

(2) Qualitätskontrolle der amplifizierten RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der amplifizierten RNA erfolgte durch erneute Absorptionsmessung bei 260 und 280nm mit dem NanoDrop gegen RNase freies Wasser. Auch hier gibt das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280nm eine Aussage über mögliche Proteinkontamination in der Lösung. Das Verhältnis

(OD₂₆₀/ OD₂₈₀) sollte bei der amplifizierten RNA genauso wie bei isolierter RNA zwischen 1,7 und 2 liegen. Es wurden für diese Messung erneut 1:5 Verdünnungen (1µl Probe + 4µl RNase freies Wasser) hergestellt. Das Photometer wurde mit RNase freiem Wasser kalibriert, d.h. auf 0,0µg/ml eingestellt. Danach wurden 1,5µl der verdünnten Probe luftblasenfrei aufgetragen und gemessen. Um mögliche Degradierungen und Kontaminationen der amplifizierten RNA auszuschließen, erfolgte erneut die RNA-Analyse am Bioanalyzer mittels RNA 6000 Pico Chip (Abbildung 9).

(3) Fragmentierung

Um eine optimale Hybridisierung der komplementären Oligonukleotidsequenzen zu gewährleisten, erfolgte eine Fragmentierung der amplifizierten Probe. Hierzu wurde die Probe zunächst in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf) auf insgesamt 24µl eingengt. Dann wurden 6µl Fragmentierungspuffer (200mM TRIS-Azetat, pH 8,2, 500mM KOAc, 150mM MgOAc, Affymetrix) hinzu gegeben und bei 94°C für 35 Minuten inkubiert.

(4) Hybridisierung, Waschen, Färben

Vor der eigentlichen Hybridisierung erfolgte eine 10-minütige Prähybridisierung der Chips mit 140µl MES- Hybridisierungspuffer (70,4g MES free acid monohydrat, 193,3g MES Sodium Salz, 800ml Accugenwasser, pH 6,5 – 6,7; Lösung sterilfiltern), verdünnt mit 140µl Aqua dest. bei 45°C und 60rpm im Gene Chip® Hybridisierungssofen 640 (Affymetrix). Währenddessen wurde die Hybridisierungslösung (30µl fragmentierte amplifizierte RNA, 5µl Kontroll- Oligo B2, 15µl 20x Eukaryotische Hybridisierungskontrolle, 3µl Heringsspermien- DNA, 3µl azetyliertes BSA, 150µl 2x MES- Hybridisierungspuffer und 94µl Aqua dest.) zuerst für 5 Minuten bei 99°C denaturiert und danach für 5 Minuten bei 45°C temperiert und anschließend bei 14.000rpm abzentrifugiert. Die Präinkubationslösung wurde entfernt und der Chip mit 250µl der Hybridisierungslösung beladen. Anschließend erfolgte für 16 Stunden bei 45°C unter ständigem Rotieren die Hybridisierung. Danach wurde die Hybridisierungslösung aus dem Chip entfernt und 280µl des Waschpuffers A (300ml 20x SSPE, 1ml 10% Tween 20, 698ml Accugenwasser, Puffer sterilfiltern) eingefüllt. Anschließend erfolgte das Beladen der Waschstation (Gene Chip® Fluidics, Affymetrix) mit den hybridisierten Chips (maximal 4) und dem Puffer A und Puffer B (83,3ml 12x MES Stammlösung, 5,2ml 5M NaCl, 1ml 10% Tween 20, 910,5ml Accugenwasser, Puffer sterilfiltern) sowie die Eingabe des Waschprotokolls (von Affymetrix vorgegeben, für Human Genome Focus Oligonukleotid- Arrays = Midi-euk2v3). Während des Waschvorganges wurde die Färbelösung angesetzt.

Färbelösung:	600µl 2x Färbepuffer
	540µl dH ₂ O
	48µl BSA
	12µl Streptavidine- Phycoerythrin- Konjugat
	Σ 1200µl

Diese 1200µl Färbelösung wurden auf zwei Eppendorfröhrchen aufgeteilt. Die ersten 600µl der Färbelösung wurden dem Chip unmittelbar nach dem Waschvorgang zugeführt und inkubierten 40 Minuten. Anschließend erfolgte die Zugabe der Antikörper- Lösung.

Antikörper- Lösung:	300µl	2x Färbepuffer
	266,4µl	dH ₂ O
	24µl	BSA
	6µl	Goat IgG
	3,6µl	biotinylierter Anti- Streptavidin- AK
	Σ 600µl	

Die Antikörperlösung verblieb für 10 Minuten auf dem Chip und wurde anschließend durch die restlichen 600µl der Färbelösung ersetzt. Diese inkubierte zur Signalverstärkung nochmals 10 Minuten auf dem Chip und wurde anschließend vorsichtig abgenommen und der Chip gewaschen, um die überschüssige Antikörper- und Färbelösung zu entfernen.

(5) Scannen

Mit Hilfe des GeneArray[®] 2500 Scanner (Affymetrix, Software GCOS[GeneChip Operating System]) wurden die Arrays mit einer Pixelauflösung von 3µm gescannt, wobei die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Phycoerythrin bei einer Wellenlänge von 488nm und die Emission bei 570nm erfolgte.

(6) Analyse der Daten

Die Scans von jedem Array wurden quantifiziert, indem die mittlere Signalintensität auf eine Zielintensität von 100 gesetzt wurde. Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der erhobenen Daten.

2.4.1. Statistische Analysen

Zur Qualitätskontrolle, Normalisierung und Datenanalyse wurde das Paket von statistischen Funktionen der Programmiersprache 'R', welche im Bioconductor Projekt (<http://www.bioconductor.org/>) integriert ist, verwendet. Es wurden Histogramme der "Perfekt Match" Intensitäten, 5' zu 3' RNA Degradation "side-by-side" Plots erstellt, um die Qualität der Proben und der Hybridisierung zu kontrollieren.

Um die verschiedenen Arrays miteinander vergleichen zu können, wurden die Rohdaten der Scans anschließend mit der VSN („Variance stabilization transformation“) Methode normalisiert (Abbildung 10) (Huber W. et al, 2002). Hierbei kompensiert die VSN-Methode experimentell bedingte Abweichungen der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben untereinander und wandelt die Intensitäten in eine logarithmische Skala um, bei der die Varianz der einzelnen Proben, unabhängig von der Intensität, sehr gering ausfällt.

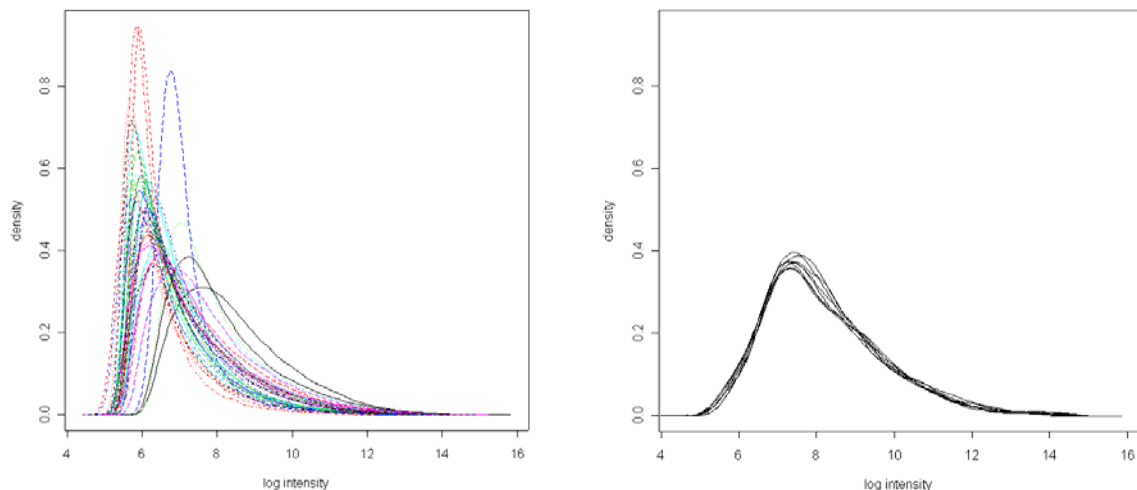


Abbildung 10: Die Verteilung der Expressionswerte des ersten Tumorkollektivs. Das linke Diagramm zeigt die Verteilung der Expressionswerte der 34 Arrays der primären Tumore vor dem Normalisieren. Das rechte Diagramm zeigt die Arrays nach der Normalisierung.

Um die normalisierten Daten von den Tumorproben mit den Nichttumorproben zu vergleichen, wurde die „Significance Analysis of Microarrays“ (SAM) Methode (<http://www-stat.stanford.edu/tibs/SAM/>) verwendet, welcher eine gleitende Scala für die falschpositiv Rate (false discovery rate, FDR) der signifikant herauf und herunter regulierten Gene enthält. Dazu permutierten alle Daten 800 Zyklen mittels Benutzung des zwei Klassen, ungepaarten Datenmodus der SAM- Methode. Das Signifikanzniveau von jedem einzelnen Gen wurde mit Hilfe des q- Wertes (niedrigste falschpositiv Rate bei der ein Gen signifikant ist) angegeben. Die Ergebnisse dieser Studie wurden in der GEO DataSets- Datenbank unter www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi hinterlegt. Um die wichtigen Gene zu selektieren, wurden die Gene ausgewählt, die ein „Fold Change“ für überexprimierte Gene von 2 und für unterexprimierte Gene von 0,5 und ein q- Wert kleiner 2,5 aufwiesen. Anschließend wurden Scatter Plots erstellt, um die Ergebnisse graphisch darzustellen. Des Weiteren erfolgte eine Hierarchische Clusteranalyse mit Hilfe der 'hclust' Funktion der statistischen Programmiersprache 'R', welche im Bioconductor Projekt (<http://www.bioconductor.org/>) integriert ist (Huber W. et al, 2003).

Hierarchische Clusteranalyse ist eine Methode, in der einzelne Expressionsprofile sich zu Gruppen verbinden, die sich wiederum zu weiteren Gruppen verbinden, bis hin zu hierarchischen Bäumen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie einfach ist und das Ergebnis sehr gut graphisch dargestellt werden kann. Als erstes wird paarweise die Distanzmatrix für alle Proben, die geclustert werden sollen, berechnet. Dann wird die Distanzmatrix für die zwei Cluster (Cluster mit je einer Probe d.h. eigentlich werden zwei Proben untersucht), die sich am ähnlichsten sind, gesucht. Anschließend gehen diese zwei Cluster ineinander über und erzeugen ein neues Cluster mit mindestens zwei Proben. Die Distanz zwischen diesem neuen Cluster und allen anderen Clustern wird berechnet. Diese Vorgänge werden so oft wiederholt, bis alle selektierten Proben in einem Cluster sind. Für

unsere Analyse wurde unter Vorgabe der signifikanten Gene ein „unsupervised complete linkage clustering“ Algorithmus benutzt.

2.4.2. Genetische Programmierung zur Generierung eines Klassifikators

Basierend auf den ermittelten Mikroarray- Daten erfolgte in Kooperation mit Michael Roskopf aus dem Institut für Bioinformatik der Heinrich- Heine- Universität unter Verwendung der Genetischen Programmierung (GP) die Generierung eines Klassifikators, mit dem Ziel anhand der GP die Tumorsubtypen voneinander sowie vom Nichttumor abzugrenzen. Genetisches Programmieren erzeugt Computerprogramme oder Algorithmen in einem evolutionären Prozess und stellt damit eine Variante des maschinellen Lernens dar. Der Lernprozess wird in der Regel als überwachtes Lernen realisiert, d.h. die Anpassung der Parameter wird durch die Beurteilung anhand einer externen Gütefunktion gesteuert. Die Ergebnisse der Genetischen Programmierungs-Versuche sind kleine automatisch generierte Programme, so genannte Klassifikatoren, die für die Datensätze die jeweils vorher definierte Fragestellung beantworten sollen (Goldberg D., 1989; Poli R. et al, 1998). In unseren Fall soll ein Klassifikator erstellt werden, der es ermöglicht eine vorher unbekannte Probe zu dem jeweiligen histologischen Tumorsubtyp bzw. Nichttumor richtig zuzuordnen. GP wurde bereits in verschiedenen Studien erfolgreich eingesetzt, um Mikroarray- Daten von Tumorgewebe zu analysieren (Driscoll JA. et al, 2003; Sun M. et al, 2003; Tsakonas A. et al, 2004; Mitra AP. et al, 2006). Wir führten einen Trainings- und Klassifikationsschritt mit Hilfe der „leave-one-out“- Crossvalidierung (LOOCV) unter Verwendung des GP- „Tools“ DISCIPULUS durch. Bei der LOOCV wurde eine Probe vom Trainingsset, bestehend aus 34 Proben entfernt. Die anderen Proben des Trainingssets wurden für die Generierung eines Klassifikators genutzt, der anschließend für die Zuordnung der vorher entfernten Probe diente. Dieser Trainingsprozess wurde für alle Proben wiederholt, so dass jede Probe sozusagen als Testmenge von der Trainingsmenge abgespalten wurde. Während diesem Trainingsprozess wurden jeweils die 30 besten Klassifikatoren jeder wiederholten Anwendung generiert und gesammelt, so dass insgesamt 1020 Klassifikatoren (34 Proben und 30 Klassifikatoren pro wiederholter Anwendung) erstellt wurden. Zur Verkleinerung des Suchraumes kamen jeweils die 50 Gene mit dem besten Signal- Rausch- Verhältnis für die LOOCV zur Anwendung.

Die Anzahl der korrekt zugeordneten Proben zum Trainingsset wurde als Trefferrate in Prozent angegeben und diente als Fitnesskriterium. Zusätzlich wurde die Häufigkeit der Anwendung eines Klassifikators als Qualitätskriterium festgelegt.

Die 10 Gene mit der höchsten Frequenz wurden von jeder analysierten Klasse (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom und Nichttumor) für die Generierung eines endgültigen Klassifikators, bestehend aus 40 Genen ausgewählt. Zur Validierung erfolgte die Klassifikation eines Testsets, bestehend aus 16

unterschiedlichen Lungentumorproben (13 progrediente Tumorproben und 3 primäre Tumorproben).

2.5. Bestätigung der Affymetrixdaten mittels quantitativer

„Real Time“- PCR

Zur Bestätigung der durch Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie ermittelten Daten, erfolgte eine „Real-Time“ PCR (Echtzeit- PCR). Hierbei wird über die periodische Bestimmung der Fluoreszenzintensität der an den TaqMan-Sonden gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe (am 5' Ende 6- Carboxyfluorescein [FAM] und am 3' Ende den Quencher 6- Carboxytetramethylrhodamin [TAMRA]) der Zuwachs an PCR- Produkt in Abhängigkeit von der Zeit über 40 Zyklen gemessen. Dabei kann die TaqMan- Sonde als dritter Primer angesehen werden, der zwischen Forward- und Revers-Primer an die DNA bindet. Neben der Fluoreszenzmarkierung enthält die Sonde weiterhin einen Quencher, der das Aussenden eines Fluoreszenzsignales verhindert, solange Farbstoff und Quencher dicht beieinander sind. Erst wenn die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq DNA Polymerase zerstört wird und der Quencher und Fluoreszenzfarbstoff räumlich getrennt werden, wird ein Fluoreszenzsignal emittiert, das direkt mit der Menge neu synthetisierter DNA korreliert (Abbildung 11).

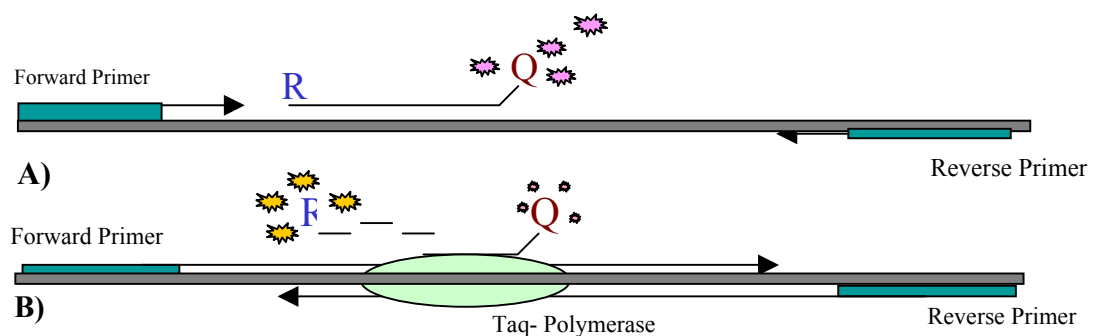


Abbildung 11: Funktionsweise der TaqMan- Sonden schematisch dargestellt.

A) Zwischen den zwei spezifischen Oligonukleotid- Primern (blau dargestellt) liegt ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid, die so genannte TaqMan- Sonde. Sie besitzt am 5'-Ende ein Reporter- Fluoreszenzfarbstoff (FAM) und am 3'- Ende einen Quencher (TAMRA). Die Reportefluoreszenzemission wird durch die Nähe zum Quencher (Q) unterdrückt. B) Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq- Polymerase durch ihre 5'-,3'- Exonukleaseaktivität die TaqMan- Sonde in kleine Fragmente, wodurch der Reporter (R) vom Quencher abgespalten wird und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden kann. Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird gemessen und ist proportional der Menge des DNA- Templates.

Um diese Methode durchführen zu können, muss die aus den Tumorzellen isolierte RNA zuvor jedoch in cDNA umgeschrieben werden. Dieser als reverse Transkription bezeichnete Vorgang erfolgt am RNA- Leitstrang, an dem ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert wird.

Für die cDNA Synthese wurde der High-Capacity cDNA Archive Kit verwendet. Im Ansatz wurden jeweils 1000ng RNA mit RNase freiem Wasser auf 50µl Endvolumen gebracht. Zu diesem Gemisch wurden weitere 50µl Reaktionsansatz hinzu gegeben.

Reaktionsansatz:	10µl	10 x RT Puffer
	4µl	25 x dNTPmix
	10µl	10 x Random Primer
	5µl	MultiScribe Reverse Transcriptase
	21µl	RNase freies Wasser
		Σ 50µl

Das Reaktionsgemisch wurde kurz abzentrifugiert und inkubierte dann 10min bei 25°C. Zur cDNA- Synthese wurde das Gemisch für 2 Stunden auf 37°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Die Proben wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Die sich daran anschließende „Real- Time“ PCR wurde in einer 96-Well Platte in einem Endvolumen von 25µl ausgeführt.

Reaktionsansatz:	12,5µl	2 X TaqMan Universal PCR Master Mix
	1,25µl	20 X Assay-on-Demand gene expression product
	10,25µl	RNase freies Wasser
		Σ 24µl

Dieser Reaktionsansatz wurde zusammen pipettiert und 24 µl in jedes Well vorgelegt. Anschließend wurde 1µl cDNA (10ng) hinzu gegeben und die 96- Well Platte mit Folie abgeklebt, die Well – Platte bei 1500rpm kurz abzentrifugiert und die RT- PCR mittels ABIPrism 7900HT Sequenz Detectors durchgeführt.

Das gewählte Programm begann mit einer 120 Sekunden AmpErase UNG Aktivierung bei 50°C gefolgt von einer 600 Sekunden langen Präinkubationsphase bei 95°C, wodurch der cDNA Strang denaturiert wurde. Im Anschluss daran erfolgte die eigentliche „Real-Time“ PCR mit 40 Zyklen und begann jeweils mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95°C für 15 Sekunden, gefolgt von der Annealing- und Extensionsphase bei 60°C für 1 Minute, in der sich die Primer an die Zielsequenz des DNA- Einzelstranges anlagerten und die thermostabile Taq DNA- Polymerase entlang der Sequenzinformation des DNA- Einzelstranges die Primer verlängerte. Während diesem Schritt wurde die am DNA- Einzelstrang angelagerte TaqMan- Sonde fragmentiert und es konnte ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Um Kontaminationen und damit falsch-positive PCR- Ergebnisse auszuschließen, wurde für jede PCR ein Leerwert mitgeführt, der anstatt der cDNA ein äquivalentes Volumen Aqua dest. enthält.

Die Auswertung der „Real Time“- PCR erfolgte mittels der „Threshold cycle“ (Ct)-Analyse. Die Ct- Werte wurden mit Hilfe der ABIPrism Software berechnet. Um Abweichungen so gering wie möglich zu halten, wurde jede RT- PCR wiederholt und die Proben im Doppelansatz gemessen, anschließend der Mittelwert gebildet und die Werte

normalisiert. Dazu wurde vom Ct- Wert jedes Gens der Ct- Wert des als externe Kontrolle mitgeführten „Housekeeping“- Gens RPS11 bzw. GAPDH, abgezogen (ΔCt). Um Änderungen in der Genexpression zu ermitteln, wurden anschließend die Expressionsunterschiede wie folgt berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Kontrolle}} - \Delta Ct_{\text{Tumor}}$$

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die Signifikanz der Daten wurden des Weiteren mittels t- Test (ungepaarte Proben, homogener Typ) berechnet.

Um nachzuweisen, dass während der „Real Time“- PCR ein Produkt gebildet wurde, wurden die PCR- Ansätze anschließend in einem 1%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.5.1. Agarosegel– Elektrophorese

Zur qualitativen Kontrolle erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung von 10µl des PCR- Produktes in einem 1%-igem Agarosegel. Bei der Elektrophorese wird an einem Gel, welches sich in einer Pufferlösung befindet, ein elektrisches Feld angelegt. Dadurch können die DNA- Fragmente, welche in einer wässrigen Lösung eine negative elektrische Ladung besitzen, in diesem elektrischen Feld von der Kathode (-) zur Anode (+) wandern und der Größe nach aufgetrennt werden. Bei dieser Trennung wandern kleine DNA- Fragmente fast ungehindert durch das Gel und große Fragmente werden von dem Gelnetzwerk zurückgehalten und verbleiben im oberen Bereich des Gels.

Hierfür wurden 2g Agarose in 200ml 1 x TBE– Puffer in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 55°C wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und nach Erstarren des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (1 x TBE- Puffer) gefüllt. Die Proben wurden mit Loadingpuffer gemischt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Zur Identifikation der DNA– Fragmente wurde ein Längenstandard mitgeführt (Tabelle 16). Bei einer Spannung von 100 V erfolgte die Elektrophorese für 50 Minuten. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch UV- Licht nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid. Die Auswertung des Gels erfolgte am Image System.

Reagenzien	Firma	Katalognummer
Smart Ladder 200 lanes	Eurogentec, Seraing	# MW-1700-02
Smart Ladder 100 lanes	Eurogentec, Seraing	# MW-1700-10
Orange Blue Loadingpuffer	Promega, Madison	# G-1881

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Größenmarker

2.6. Mutationsanalyse des Kandidatengens EGFR

2.6.1. DNA – Extraktion

Aufgrund des geringen Probenmaterials erfolgt die Extraktion von DNA aus Tumorgewebe direkt aus dem ersten Durchfluss der RNA- Extraktion mit Hilfe des QIAamp DNA Mikro – Kits. Hierfür wurden zu diesem Durchfluss 2 Volumenanteile 70%-igen Ethanol hinzu gegeben und 10 Minuten bei 8000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200µl PBS und 200µl AL- Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die DNA- Extraktion gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

2.6.2. DNA- Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 und 280nm mit dem NanoDrop®ND-1000 gegen Aqua dest. Für die DNA- Konzentrationsbestimmung wurde das gewünschte Programm zur DNA- Messung am NanoDrop®ND-1000 eingestellt und wie im Kapitel 2.3.4. beschrieben, vorgegangen.

2.6.3. Polymerase- Kettenreaktion (PCR) von Exon 18,19, 20 und 21 des EGF- Rezeptors

Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) findet bei der in vitro- Anreicherung von DNA- Segmenten Anwendung. Eine exponentielle Anhäufung des Amplifikates auf bis zu 10^7 - fach ist unter optimalen Bedingungen möglich. Die dabei wesentlichen Prozesse lassen sich in drei Schritte einteilen:

1. Erhitzung der DNA, wodurch der Doppelstrang getrennt wird und die DNA als Einzelstrang vorliegt. → Denaturierung
2. Abkühlung des Reaktionsansatzes, so dass sich die in der Lösung vorhandenen Primer an der Zielsequenz des DNA- Einzelstranges anlagern können. → Annealing
3. Die thermostabile DNA- Polymerase verlängert die Primer entlang der Sequenzinformation des DNA- Einzelstranges. → Elongation

Bereitgestellt werden müssen kurze doppelsträngige Startersequenzen (Primer), Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs), eine definierte Zusammensetzung an Salzionen im Reaktionspuffer und eine hitzestabile Taq DNA- Polymerase (Tabelle 17).

Reagenzien	Firma	Katalognummer
Taq- DNA Polymerase, rekombinant	Invitrogen	# 10342-020
25mM dNTP Mix	Invitrogen	# R725-01

Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Reagenzien

Die Primer (Tabelle 18) stammen aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenzen und sind komplementär zu jeweils einem der beiden DNA- Stränge. Je nach Basenzusammensetzung und Länge ist die Annealing- Temperatur festgelegt. Das Amplifikat ist umso spezifischer je höher die Schmelztemperatur des Primers und somit auch dessen Annealing- Temperatur liegt.

EGFR- Genabschnitt	Primersequenz	Fragment- länge
Exon 18	Forward 5'-CAA ATg AgC Tgg CAA gTg CCg TgT C- 3' Reverse 5'-gAg TTT CCC AAA CAC TCA gTg AAA C-3'	400 bp
Exon 19	Forward 5'-gCA ATA TCA gCC TTA ggT gCg gCT C- 3' Reverse 5'-CAT AgA AAg TgA ACA TTT Agg ATg Tg- 3'	372 bp
Exon 20	Forward 5'-CCA TgA gTA CgT ATT TTg AAA CTC- 3' Reverse 5'-CAT ATC CCC ATg gCA AAC TCT TgC- 3'	408 bp
Exon 21	Forward 5'-CTA ACg TTC gCC AgC CAT AAg TCC- 3' Reverse 5'- gCT gCg AgC TCA CCC AgA ATg TCT gg- 3'	415 bp

Tabelle 18: Sequenzen der eingesetzten Primer.

Die Amplifikation der Exone 18, 19, 20 und 21 wurde wie folgt durchgeführt.

Reaktionsansatz: MgCl ₂ (50mM)	1,5µl
Puffer (10 x Puffer)	5µl
Nukleotide (10mM dNTP)	4µl
Primer a (Vorwärtsprimer)	1,5µl
Primer b (Rückwärtsprimer)	1,5µl
Taq-Polymerase	0,3µl
	/ Σ13,8µl

Zu diesem Reaktionsansatz wurde 50ng DNA- Probe, in 36,2µl Aqua dest. gelöst, hinzu pipettiert, kurz abzentrifugiert und die PCR gestartet.

Die Reaktionsbedingungen und Zyklusanzahl ist der Tabelle 19 zu entnehmen.

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl	Prozess
94°C	1min	1x	Denaturierung
61°C Exon 18, 19 / 58°C Exon 20, 21	2min	35x	Annealing
72°C	2min	35x	Elongation
72°C	10min	1x	Stabilisierung der dsDNA
4°C	∞	1x	Kühlung

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert und stets eine Negativkontrolle ohne DNA (Leerwert) mitgeführt. Es wurde für die PCR Thermocycler mit beheizbaren Deckeln verwendet, so dass kein Mineralöl zur Übersichtung benötigt wurde und die Ansätze auf 4°C nach Abschluss der Reaktion gekühlt werden konnten. Die PCR- Produkte wurden entweder bei -20°C aufbewahrt oder direkt für die SSCP, DHPLC oder Sequenzierung weiter aufgearbeitet.

2.6.4. Nachweis des PCR- Produktes mittels Agarosegel– Elektrophorese

Anschließend erfolgte zur qualitativen Kontrolle auch hier eine elektrophoretische Auftrennung von 8µl des PCR- Produktes in einem 1%-igem Agarosegel (siehe Kapitel 2.5.1.).

2.6.5. SSCP (Einzelstrang- Konformations- Polymorphismus- Analyse)

Die Einzelstrang- Konformations- Polymorphismus- Analyse (SSCP) dient der Detektion unbekannter Mutationen wie z.B. der Austausch einzelner Basen. Denaturierte PCR- Produkte zeigen schon bei Punktmutationen unterschiedliches Laufverhalten in einem elektrischen Feld. Die Renaturierung in einem nichtdenaturierten Polyacrylamid- Gel führt zu dreidimensionalen Konformationszuständen der Einzelstränge, die sich dann in unterschiedlichem Bandenmuster verdeutlichen. Die Sensitivität der SSCP ist von folgenden Parametern abhängig: der PCR- Fragmentlänge (optimal zwischen 200 und 300bp), dem GC- Gehalt der Sequenz, der Art und Lage der Mutation und der Verwendung unterschiedlicher Gel- und Laufkonditionen bei der Elektrophorese. Für die Mutationssuche mittels SSCP wurden nichtdenaturierende Horizontal- Polyacrylamid- Gele in der Größe 25 cm x 16 cm x 0,075 cm hergestellt. Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele ist dem Kapitel 2.1.2. zu entnehmen.

Dazu wurden zwei Glasplatten benötigt. Eine Glasplatte war an den Rändern mit Gummispacern und am unteren Rand mit kleinen Filterpapierstreifen versehen. Beide Glasplatten wurden mit Isopropanol entfettet. Auf die Glasplatte ohne Spacer wurde etwas Aqua dest. gegeben und eine Plastikfolie darauf gelegt und angepresst. Diese

Plastikfolie verhinderte das Ankleben des Gels an die Glasplatte. Beide Glasplatten wurden anschließend mit Hilfe von Klammern dicht aneinander gebracht. Die Zutaten für das Gel wurden zusammen pipettiert und zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Dieser Vorgang sollte zügig und ohne Luftblasen von statten gehen. Das Gel blieb für 45 Minuten liegen und wurde dann zur weiteren Auspolymerisierung im Kühlschrank aufbewahrt. Unmittelbar vor der SSCP wurden je nach Bandenstärke im Agarosegel 2 – 3 µl des PCR- Produktes zu 4 – 5 µl Formamidpuffer hinzu gegeben, für 10 Minuten bei 90°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Gleichzeitig wurden die Elektrophoresekammern vorgekühlt und mit dem Laufpuffer (1 x TBE) aufgefüllt. Dann wurden die Kühlplatten mit 5ml Triton- X versehen, die Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt und die Gele mit der Plastikfolie aufgelegt. Je 5 µl der Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und es wurden sowohl am oberen Rand (Anode) als auch am unteren Rand (Kathode) in TBE- Puffer getränkte Filzstreifen auf das Gel aufgelegt und die Gelelektrophorese gestartet. Die Gele liefen 6 Stunden mit 300Volt bei 15°C. Die anschließende Gelfärbung erfolgte mit Hilfe der Silberfärbung.

2.6.5.1. Silberfärbung der SSCP- Gele

Hierbei wurden die Gele zunächst mit Silbernitrat inkubiert. Silbernitrat dissoziiert in wässriger Lösung in Silberionen und den Nitratrest. Die Silberionen lagern sich an den DNA- Banden im Gel an. Bei Zugabe von Natriumcarbonat, welches in Lösung in Natriumionen und Carbonationen dissoziiert, lagern sich die Carbonationen an den am Gel fixierten Silberionen an und es entsteht eine Braunfärbung der Banden. Zunächst wurden die Gele zur Fixierung für 2 mal 3 Minuten in 0,5%-iger Essigsäure mit 10% Ethanol gegeben, anschließend zur Färbung für 15 Minuten in 0,1%-iger Silbernitratlösung und dann 3 mal 2 Minuten mit Aqua dest. gewaschen. Zur Entwicklung wurden die Gele für 20 Minuten in 1,5% Natriumhydroxid, 0,1% Natriumborhydrid und 0,05% Formaldehyd gegeben. Die abschließende Fixierung erfolgte für 20 Minuten in 0,75% Natriumcarbonat. Die Gele wurden anschließend hinsichtlich des Bandenmusters auf einem Leuchttisch ausgewertet.

Die optimale Größe der PCR- Fragmente liegt zwischen 150 und 300bp, da es bei kleineren PCR- Fragmenten nicht zur Ausbildung einer Sekundärstruktur kommt und bei Fragmenten über 300bp die Wahrscheinlichkeit eines SSCP- Nachweises abnimmt (Sheffield VC. et al, 1993). Da unsere PCR-Fragmente zwischen 380 und 400bp lagen, und wir nach Möglichkeit keine Mutation übersehen wollte, führten wir des Weiteren zur Mutationsanalyse die DHPLC durch.

2.6.6. DHPLC (Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie)

Für die Detektion von Punktmutationen wurden die EGFR- PCR- Produkte (Abschnitt 2.6.3.) mit Hilfe des Wave Nucleic Acid Fragment Analysis System (Wave- System) analysiert. Die DHPLC- Analyse wurde nach der Methode von Oefner und Underhill (Oefner PJ. et al, 1994; Wuyts W. et al, 2005) durchgeführt, die auf der unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeit von DNA- Homo- und Heteroduplexes durch die Matrix einer Trennsäule basiert. Diese werden von einer mobilen Phase (Laufpuffer) auf die DHPLC- Trennsäule überführt, die aus einer hydrophoben Polymermatrix besteht. Indem sich hydrophobe Ammonium- Kationen des TEAA im Laufpuffer an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA anlagern und die Alkylgruppe des TEAA an die Oberfläche der Polymermatrix binden, werden die DNA- Moleküle an die Säule gebunden. Die Freigabe der DNA- Fragmente erfolgt über Ionenpaar- Umkehrphase- Chromatographie, bei der die DNA- Fragmente mittels einer kontinuierlich steigenden Acetonitril- Konzentration von der Polymermatrix eluiert werden. Längere Fragmente haften dabei stärker und damit länger an der Säule als kürzere Fragmente. Bei einer nicht denaturierenden Temperatur verläuft die Trennung daher streng nach Fragmentlänge und ist somit unabhängig von der Basenzusammensetzung. Bei der Mutationsanalyse hingegen werden PCR- Fragmente identischer Länge voneinander getrennt, die sich aufgrund einer Mutation in ihrer Basenzusammensetzung unterscheiden. Beginnend mit einer kontrollierten De- und Renaturierung von PCR- Produkten mit einer heterozygoten Mutation werden bis zu vier mögliche DNA- Duplexes generiert (2 Heteroduplexes [Wildtyp/Mutante^(sense), Mutante^(antisense)/Wildtyp] und 2 Homoduplexes [Wildtyp/Wildtyp, Mutante/Mutante]) (Abbildung 12), die sich während der DHPLC- Analyse im Bereich ihrer spezifischen Schmelztemperatur aufgrund minimaler struktureller Unterschiede in ihren Migrationsgeschwindigkeiten unterscheiden.

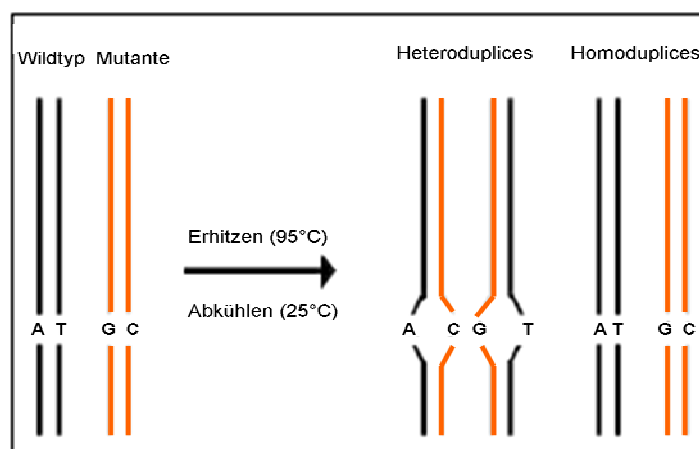


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Homo- und Heteroduplexbildung. Bei heterozygoten Anlageträgern sind Wildtyp und mutierte DNA im Verhältnis 1:1 vorhanden. Nach Denaturierung entstehen durch Hybridisierung Homo- und Heteroduplexes in gleicher Menge. Heteroduplexes tragen Basen- Mismatches und sind dadurch weniger thermostabil (nach Schwarzer S., 2000).

Im Idealfall sollten bei heterozygoten Mutationsträgern im Chromatogramm vier Peaks zu erkennen sein, zwei Heteroduplex- Peaks und zwei Homoduplex- Peaks, da sich beide Formen einer Duplexspezies an einer Basenposition voneinander unterscheiden

(Abbildung 12). Der Unterschied der Retentionszeit ist aber meist so gering, dass er von der Säule nicht erfasst wird (Xiao W. & Oefner PJ., 2001). In der Mehrzahl der Fälle zeigt das Chromatogramm bei Heterozygoten zwei Elutionspeaks, der Erste verursacht durch die thermolabileren Heteroduplices, der Zweite verursacht durch die Homoduplices (Abbildung 14). Zum Teil ist es aber auch nur eine zusätzliche Schulter im Homoduplex-Peak, die auf die Anwesenheit von Heteroduplices und damit auf eine Sequenzvariante schließen lässt (Schmitt TJ. et al, 2000). Bei homozygoten Anlageträgern bilden sich keine Heteroduplices, es entstehen vier identische Homoduplices, so dass ein homogener Peak im Chromatogramm resultiert (Abbildung 13).

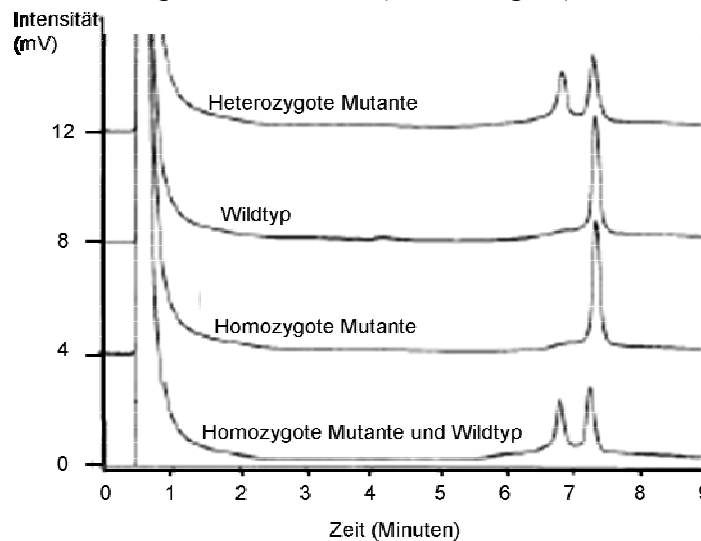


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt DHPLC- Chromatogramme (Schmitt TJ. et al, 2000). Mutationen im heterozygoten Zustand lassen einen Heteroduplex- Peak erkennen, der deutlich vor den Homoduplices eluiert. Durch Mischen mit dem Wildtyp wird bei Homozygoten ein heterozygoter Zustand erreicht.

Die Detektion von Mutationen mittels DHPLC ist stark abhängig von der Analysetemperatur. Unter nicht denaturierenden Bedingungen, bei Temperaturen bis 50°C, ist die Retentionszeit doppelsträngiger DNA rein längenabhängig (Oefner PJ. et al, 1995). Die Unterscheidung zwischen Homo- und Heteroduplices gleicher Länge setzt partiell denaturierende Bedingungen voraus. Aufgrund der nicht homologen Basenpaarung haben Heteroduplices einen geringeren Schmelzpunkt, denaturieren also schon bei niedrigeren Temperaturen als vergleichbare Homoduplices. Bei Temperaturen knapp unterhalb dieses Schmelzpunktes ist demnach die teilweise Denaturierung des Heteroduplices schon weiter fortgeschritten als die der Homoduplices. Ideale Trennergebnisse liefert DHPLC bei einer Analysetemperatur, bei der noch 70 -85% des Fragments als Doppelstrang vorliegt (Schmitt TJ. et al, 2000).

Eine Möglichkeit zur computergestützten Schmelzpunktbestimmung bietet die von Transgenomic für das WAVE- System entwickelte WAVE- Maker- Software. Das Programm gibt für die Nukleinsäuresequenz des zu analysierenden PCR- Produktes eine partiell denaturierende Temperatur an, bei der das Fragment analysiert werden soll. Zusätzlich ermöglicht es die graphische Darstellung der Schmelzeigenschaften des

Fragments. Sind im Fragment mehrere Schmelzdomänen vorhanden, können weitere Temperaturen ausgewählt und als Analysemethode gespeichert werden. Durch die Auswahl mehrerer Temperaturen wird das Aufschmelzen jeder einzelnen Domäne eines DNA- Fragments gewährleistet (Abbildung 14). Im Rahmen unserer Arbeit wurden für jedes Fragment bis zu drei Schmelztemperaturen bestimmt, bei denen die Helikale Fraktion für jeden Schmelzbereich zwischen 50 und 99% lag. Dabei ergaben sich für die einzelnen EGFR- PCR- Produkte die folgenden Schmelzeigenschaften:

A) Exon 18

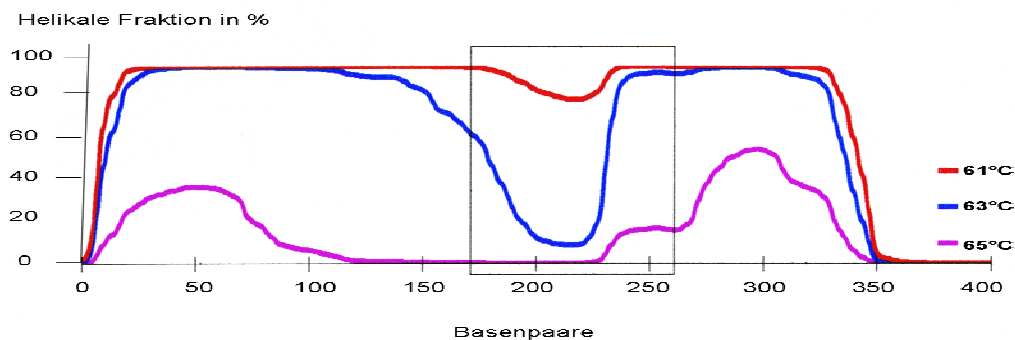


Abbildung 14a: Das WAVE- Maker- Diagramm zeigt das Schmelzverhalten vom PCR- Produkt des Exon 18 bei den, von der WAVE- Maker- Software ermittelten Schmelztemperaturen. Das Fragment ist bei 61°C nur im Bereich zwischen dem 175igsten und dem 265igsten Basenpaar angeschmolzen (schwarz umrandet). Die zweite berechnete Schmelztemperatur liegt bei 63°C und führt zur partiellen Denaturierung des Sequenzbereichs zwischen dem 175igsten und dem 265igsten Basenpaar (schwarz umrandet). Bei 65°C ist die gesamte Sequenz denaturiert.

B) Exon 19

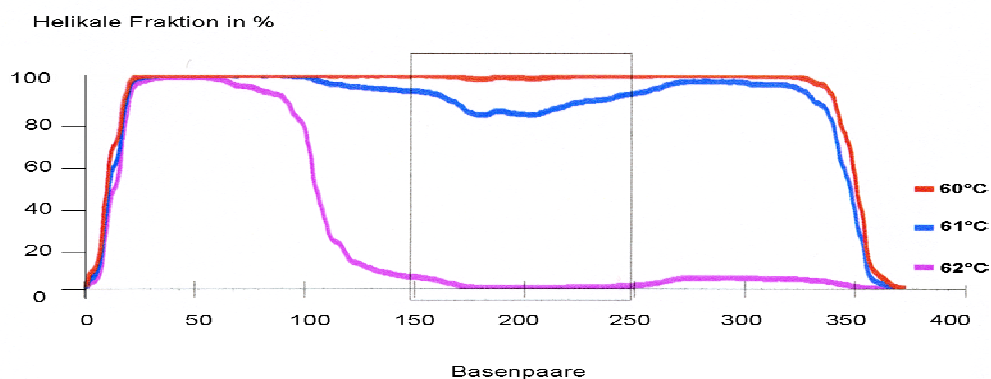


Abbildung 14b: Das WAVE- Maker- Diagramm zeigt das Schmelzverhalten vom PCR- Produkt des Exon 19 bei den, von der WAVE- Maker- Software ermittelten Schmelztemperaturen. Das Fragment ist bei 60°C über die gesamte Sequenz unverändert. Eine weitere vorgeschlagene Schmelztemperatur liegt bei 61°C und führt zum Aufschmelzen der Sequenz ab der Basenposition 149 bis zur Basenposition 247 (schwarz umrandet). Bei 62°C ist der Sequenzbereich ab Basenposition 98 denaturiert.

C) Exon 20

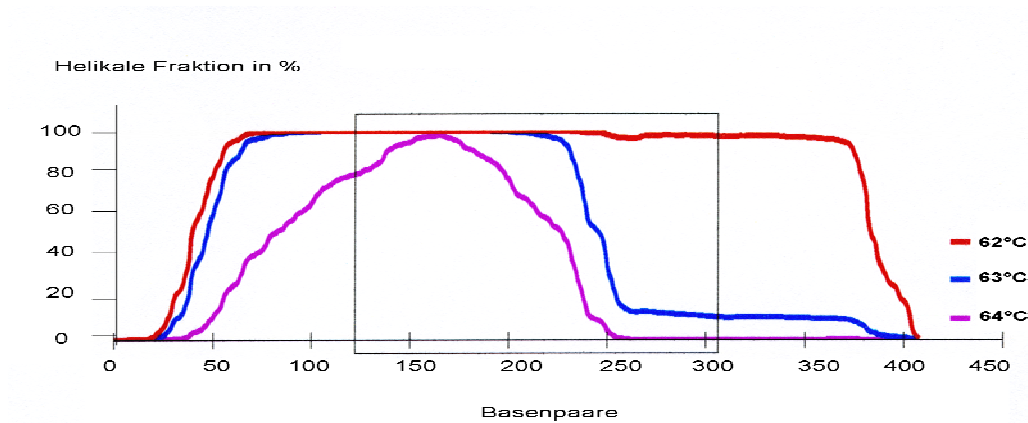


Abbildung 14c: Das WAVE- Maker- Diagramm zeigt das Schmelzverhalten vom PCR- Produkt des Exon 20 bei den, von der WAVE- Maker- Software ermittelten Schmelztemperaturen. Das PCR- Produkt ist bei 62°C über die gesamte Sequenz unverändert. Bei 63°C ist der Sequenzbereich bis zur Basenposition 400 partiell denaturiert. Bei 64°C ist der Sequenzbereich bis Basenposition 250 partiell und ab dann komplett denaturiert.

D) Exon 21

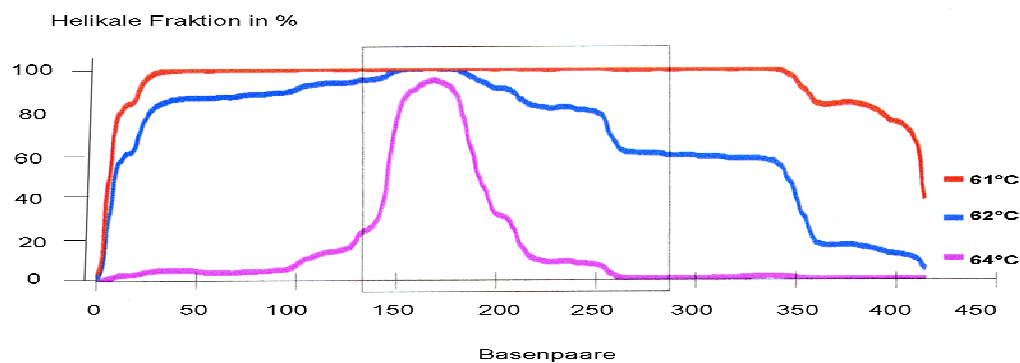


Abbildung 14d: Das WAVE- Maker- Diagramm zeigt das Schmelzverhalten vom PCR- Produkt des Exon 21 bei den, von der WAVE- Maker- Software ermittelten Schmelztemperaturen. Das PCR- Produkt ist bei 61°C ab der Basenposition 350 partiell denaturiert. Bei 62°C ist das Fragment über die gesamte Sequenz partiell denaturiert. Bei 64°C ist der Sequenzbereich bis Basenposition 150 und ab 200 komplett denaturiert.

Anhand der theoretischen Bestimmung der Analysetemperaturen und Darstellung des Schmelzverhaltens mittels der WAVE- Maker- Software wurden die in Tabelle 20 aufgeführten Schmelztemperaturen ermittelt und für weitere Analysen genutzt.

Fragment	Schmelztemperatur	
Exon 18	61°C	63°C
Exon 19	61°C	
Exon 20	62°C	64°C
Exon 21	62°C	64°C

Tabelle 20: Für DHPLC verwendete Schmelztemperaturen.

Neben der Analysetemperatur musste auch der Puffer A- Gradient sowie das Verhältnis der Puffer A und B für jedes Fragment bestimmt werden. Mit Hilfe der WAVE- Maker- Software wurde der Puffer A- Gradient sowie das Verhältnis der Puffer A und B bei jeder Sequenz für die vorhergesagte Analysetemperatur berechnet (Tabelle 21). Der Puffer B- Anteil wurde diesen Angaben entsprechend angepasst.

Fragment	Schmelztemperatur	Puffer A - Gradient
Exon 18	61°C	Puffer A von 45% auf 33% reduziert
	63°C	Puffer A von 46% auf 34% reduziert
Exon 19	61°C	Puffer A von 46% auf 34% reduziert
Exon 20	62°C	Puffer A von 45% auf 33% reduziert
	64°C	Puffer A von 48% auf 36% reduziert
Exon 21	62°C	Puffer A von 44 % auf 32% reduziert
	64°C	Puffer A von 49% auf 37% reduziert

Tabelle 21: Ermittelte Puffer A- Gradienten.

Anschließend wurden die PCR- Produkte von Wildtyp- Kontrollen für alle 4 Exone bei den ermittelten Temperaturen und Puffer A- Gradienten mit dem WAVE- System analysiert. Dafür wurden die PCR- Produkte zunächst 5 Minuten bei 95°C denaturiert und zur Bildung der DNA- Duplices schrittweise (1°C/min) auf 65°C abgekühlt.

Es wurden 5µl PCR- Produkt auf die DNA- SepColumn injiziert und mit einem linearen Acetonitril- Gradienten aus Puffer A (0,1M TEAA; 0,1mM EDTA) und Puffer B (0,1M TEAA; 25% Acetonitril; 0,1mM EDTA) eluiert. Die Gesamtanalysezeit betrug 8 Minuten. Der Anteil an Puffer A wurde innerhalb eines 6 Minuten Gradienten reduziert (Tabelle 21). Die Durchflussrate des Elutionspuffers durch die Säule lag konstant bei 0,9ml/min.

Um das Elutionsprofil einer heterozygot vorliegenden Mutation von dem Elutionsprofil einer Wildtypsequenz unterscheiden zu können, wurden zunächst die einzelnen Wildtyp- Elutionsprofile der zu untersuchenden EGFR- PCR- Produkte (Exon 18- 21) etabliert. Hierfür wurden die Amplifikate der Zelllinien- DNA- Proben von je zwei Zelllinien (H1299, H446) verwendet, deren Wildtyp- Sequenz durch Sequenzierungen bekannt waren. Diese PCR- Produkte wurden mittels DHPLC analysiert um Kontroll- Elutionsprofile zu erhalten. Die Auswertung d.h. der Vergleich der Wildtypprofile mit den Profilen der zu testenden Patientenproben wurde ebenfalls mit Hilfe der Software WAVE-Maker 4.1 vorgenommen. Um die konstante Trennleistung der DHPLC- Säule zu überprüfen, wurde zu Beginn und am Ende jeder Probenserie ein Mutationsstandard analysiert.

2.6.7. Sequenzierung

Um sicherzugehen, dass keine Mutation übersehen wurde, wurden die PCR- Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierung der PCR- Produkte erfolgte in Kooperation mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) nach der Dideoxy- Methode von Sanger (Sanger F. et al, 1977) unter Verwendung des AmpliTaq FS BigDye Terminator Premix (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Sequenzier- PCR- Produkte werden mittels Kapillar-Elektrophorese auf einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Für die Sequenzierung der PCR- Produkte in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung wurden dieselben Primer wie für die PCR verwendet. Die Kettenabbruchreaktionen erfolgten mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotitriphosphate (ddNTP) im Reaktionsgemisch (Prober JM. et al, 1987). Die Sequenzierreaktionen wurden in einem Volumen von 23µl in 0,5ml Eppendorfröhrchen als Auftragsarbeit im BMFZ ausgeführt.

2.7. Immunhistochemischer Nachweis von EGFR

Zur Ermittlung des EGFR- Status wurde das EGFR pharmDx ICH Kitsystem verwendet. Dieses Kit enthält Reagenzien, die für die Durchführung einer immunhistochemischen Färbeprozedur fixierter, paraffineingebetteter Proben benötigt werden. Im Anschluss an die Inkubation mit dem primären monoklonalen Antikörper gegen humanes EGFR- Protein, wird ein gebrauchsfertiges Visualisierungsreagenzes auf der Basis von Dextrantechnologie eingesetzt. Das Reagenz enthält sowohl sekundäre Ziegen- Anti- Maus- Antikörper wie auch Meerrettichperoxidasemoleküle, die mit einem gemeinsamen Dextranpolymer- Rückgrat verknüpft sind, wodurch die sequentielle Anwendung von Link- Antikörper und Peroxidasekonjugat überflüssig wird. Die enzymatische Umwandlung des anschließend zugegebenen Chromogens (3,3'-Diaminobenzidin = DAB) führt zur Ausbildung eines sichtbaren Reaktionsprodukts an der Antigenstelle. Zur Qualitätskontrolle der Färbefeffizienz werden Kontrollobjektträger mit zwei formalinfixierten, paraffineingebetteten humanen Zelllinien (CAMA-1, Expressionslevel : 0 und HT-29, Expressionslevel: 2 +) mit Score- Zahlen für die Färbungsintensität von DAKO zur Verfügung gestellt.

Zuerst erfolgte die Anfertigung von 8µm dicken Kryoschnitten am Mikrotom (LEICA RM2155). Formalin- fixierte und in Paraffin- eingebettete Gewebeschnitte müssen vor einer immunenzymatischen Färbung deparaffinisiert und dehydriert werden, um die Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein spezifisches Antigen im Gewebe zu gewährleisten. Diese Vorbehandlung führt bei histologischen Präparaten zum Aufschluss von durch die Formalinfixierung entstandenen Quervernetzungen von Proteinen, welche die Antikörperbindung an ein Protein inhibieren.

Die Objektträger wurden zur in 3,7%igem Formalin / PBS 15 Minuten fixiert und anschließend in Waschpuffer (mit TRIS gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20)

gespült. Zur eigentlichen Fixierung wurden die Objektträger in 3%igem Wasserstoffperoxid / Methanol für 30 Minuten bei Raumtemperatur überführt mit anschließendem Spülen in Waschpuffer. Um die endogenen Peroxidasen zu blocken, wurden die Objektträger 5 Minuten in 3%igem Wasserstoffperoxid gestellt. Nach zweimaligem Waschen in Waschpuffer (je 5 Minuten) erfolgte die Inkubation mit dem primären monoklonalen Maus Anti- human EGFR (Clone 2- 18C9) Antikörper. Dafür wurden die Objektträger mit 100µl Antikörperlösung überschichtet und inkubierten 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach 2 weiteren Waschschritten wurden die Objektträger mit 150µl konjugiertem Dextranpolymer bedeckt und inkubierten erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das überschüssige Dextranpolymer wurde in PBS abgewaschen. Die Visualisierung erfolgte durch Zugabe der Substrat- Chromogen- Lösung, welche DAB enthält. Diese Lösung inkubierte 10 Minuten bei Raumtemperatur und wurde durch spülen in PBS abgestoppt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in 2%igem Methylgrün 15 Minuten gegengefärbt, über Butanol, Xylol entwässert und in Entellan eingedeckt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet.

2.8. Immunhistochemischer Nachweis von β - Catenin

Zum Nachweis von β - Catenin wurde ein monoklonaler Maus- Anti-Human-Beta Catenin Antikörper der Firma Upstate (Upstate, cell signaling solutions, Lake Placid, NY) und das EnVision+DAB- Detektionssystem von DAKO verwendet.

Mit einem Mikrotom (LEICA RM2155) wurden 8 µm dicke Schnitte von in Paraffineingebettetem Gewebe angefertigt, in 42 °C warmes Aqua dest. überführt und auf Objektträger (SuperFrost Plus) aufgezogen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Nach einer Deparaffinisierung der Gewebeschnitte in Xylol für 2 mal 5 Minuten, wurden diese mittels einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert. Folgende Inkubationsschritte wurden durchgeführt: 2 mal 3 Minuten in 96 % Ethanol, 2 mal 3 Minuten in 70 % Ethanol, 5 Minuten in Aqua dest. Die vorbehandelten histologischen Präparate wurden vor der Färbung zuerst einer Proteinase K- Verdauung unterzogen. Dazu wurden die Objektträger mit 250µl Proteolyse-K-Solution bedeckt und inkubierten 5 Minuten. Anschließend erfolgte ein Waschschriff in Aqua dest. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase- Aktivität wurden die Objektträger in eine Färbekammer gelegt und für 5 Minuten mit 250 µl Peroxidase-Blockierungs- Lösung bedeckt. Nach einem zweimaligen Waschschriff für jeweils 5 Minuten mit Wasch-Puffer, inkubierten die Präparate mit dem Primärantikörper für eine 30 Minuten. Der Antikörper wurde mit 1 x TRIS- Puffer auf eine 1: 200 Konzentration eingestellt. Anschließend wurden die Präparate für 5 Minuten in Waschpuffer inkubiert und anschließend für weitere 30 min mit 2 Tropfen des Sekundärantikörper-Systems EnVision (Ziege anti-Maus/Kaninchen- Ig, HRP-konjugiert) bedeckt, wodurch der gebundene Primärantikörper detektiert wird. Nach diesem Detektionsschriff erfolgte ein zweimaliger Waschschriff für jeweils 5 Minuten. Im

Anschluss wurden die Objektträger für 10 Minuten mit 250 µl des Substrat Chromogen DAB (Diaminobenzidin) (Liquid DAB+ Substrate-Chromogen Solution) inkubiert. Durch die gebundene Meerrettich- Peroxidase wird mit Hilfe des Chromogens DAB ein lösliches Substrat umgesetzt, das als ein brauner Niederschlag die Bindung des spezifischen Antikörpers nachweist. Die Präparate wurden mit Aqua dest. gespült und für 1 Minute in ein Hämatoxylin II- Bad zur Gegenfärbung gegeben. Anschließend wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült und in Entellan eingedeckt. Des Weiteren wurde bei jedem Ansatz als Negativkontrolle eine Färbung nur mit dem Sekundärantikörper, aber ohne Primärantikörper, durchgeführt.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten im ersten Teil neue und im Speziellen tumorspezifische Gene gefunden werden, die sich durch ihre differentielle Expression in den drei häufigsten Tumorsubtypen des Lungenkarzinoms (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und kleinzellige Lungenkarzinom) im Vergleich zum Nichttumor auszeichnen. Im zweiten Teil sollten genetische Veränderungen, die einen Primärtumor von einem nach Chemotherapie rezidierten oder fortschreitenden Tumor unterscheiden, identifiziert werden. Des Weiteren sollte eine Mutationsanalyse des EGF- Rezeptors durchgeführt und hinsichtlich eines möglichen Zusammenhanges zwischen Mutation und Fortschreiten der Erkrankung untersucht werden, sowie eine immunhistochemische Untersuchung des EGF- Rezeptors durchgeführt werden.

3.1. Etablierung der verwendeten Methoden

3.1.1. Fixierung der Gewebeschnitte für die LCM

Die Laser Capture Mikrodisektion kann nur an fixierten, gefärbten und entwässerten Gefrierschnitten durchgeführt werden. Die meist angewandte Methode zur Fixierung des Gewebes ist die Ethanol- Fixierung (Miura K. et al, 2002; Emmert-Buck MR. et al, 1996). Diese führte jedoch aufgrund der geringen Größe der durch die endoskopisch gewonnen Proben zu Schrumpfung der Zellen, so dass keine Unterscheidung der Tumorzellen vom umliegenden Gewebe möglich war (Abbildung 15B). Deshalb erfolgte als erstes ein Vergleich mehrerer Fixierungsmöglichkeiten und Färbemethoden sowie eine Untersuchung von deren Auswirkungen auf die RNA- Qualität. Dabei ergab sich, dass die Fixierung der Gewebeschnitte mit 95% Methanol / 3% Essigsäure / 2% dH₂O und eine anschließende Färbung des Schnittes mit Hämatoxylin II für das Gewebe am besten geeignet war. Trotz der Fixierung und anschließender Entwässerung konnten die Tumorzellen mikroskopisch erkannt werden und auch die RNA- Qualität war vergleichsweise gut (Abbildung 15).

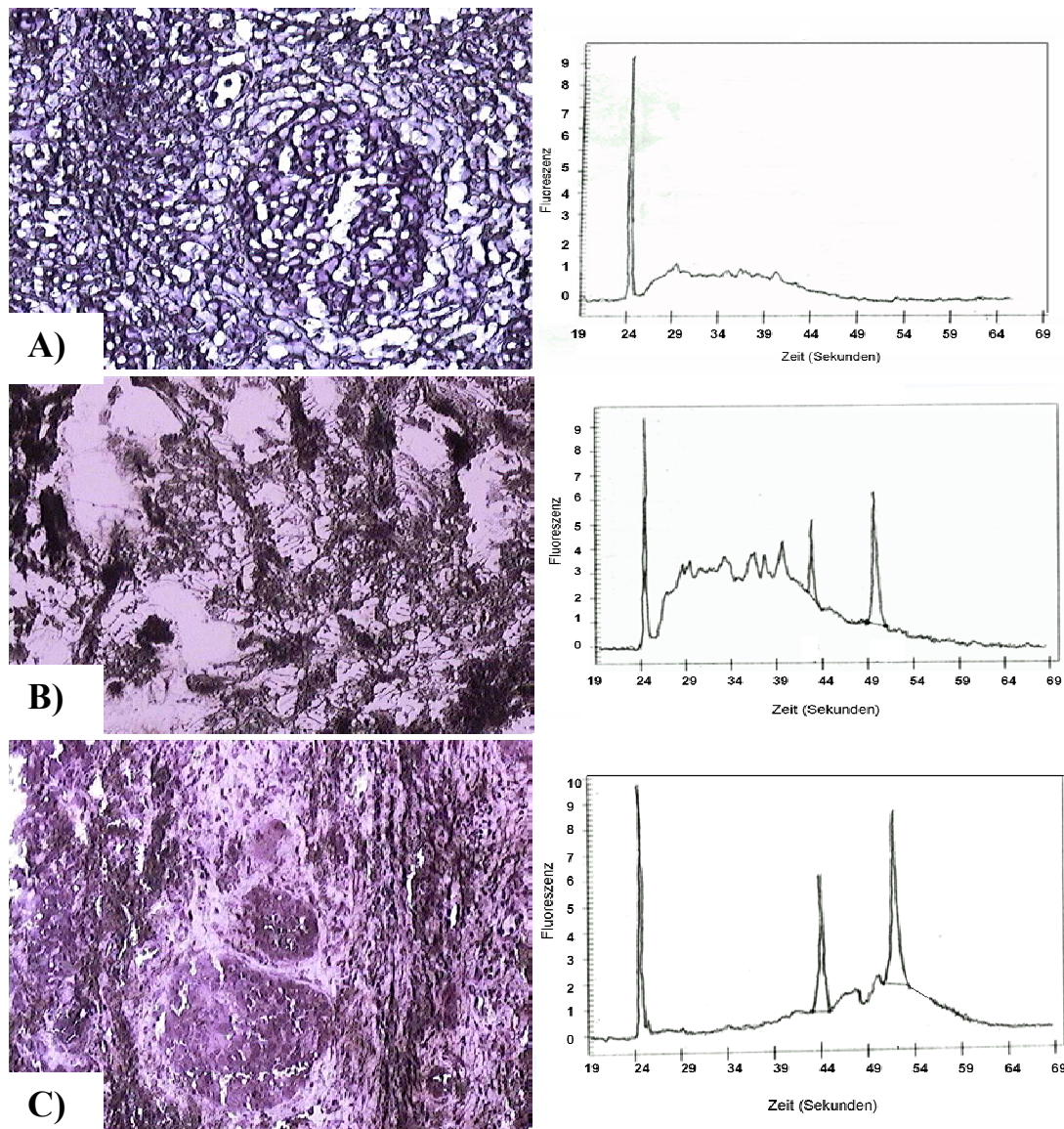


Abbildung 15: Dargestellt sind links die Fotos der unterschiedlichen Gewebeschnittfixierungen bei einer 10-fachen Vergrößerung und rechts die Ergebnisse der RNA- Qualitätskontrolle, analysiert am Agilent Bioanalyzer 2100. A) Der Gewebeschnitt fixierte 30 Sekunden in Aceton. B) Der Gewebeschnitt inkubierte zur Fixierung 30 Sekunden in 95%igen Ethanol. C) Zur Fixierung inkubierte der Gewebeschnitt 30 Sekunden in 95% Methanol / 3% Essigsäure / 2% dH₂O. Anschließend wurden die Gewebeschnitte gewässert, mit Hämatoxylin II gefärbt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert. Die Dokumentation erfolgte am Autopix 100. Die RNA- Extraktion wurde gleichzeitig mit dem RNeasy Micro- Kit von Qiagen durchgeführt. Die RNA ist aufgrund der Acetonfixierung (A) komplett degradiert. Auch bei der Ethanolfixierung (B) ist eine Degradation im Elektropherogramm zu erkennen. Im unteren Elektropherogramm sind die zwei RNA- Peaks (18sRNA und 28sRNA) gut zu erkennen, so dass diese Fixierung für die weitere Aufarbeitung zur Anwendung kam.

3.1.2. RNA- Amplifikation

Die Amplifikation der RNA wird als entscheidender Punkt für die Aussagekraft der Genexpressionsprofile beschrieben (Pabon C. et al, 2001). Deshalb wurde vor Beginn der Aufarbeitung der Gewebeproben die RNA aus zwei unterschiedlichen Zellkulturen isoliert und Amplifikationen mittels dem MessageAmp aRNA- Kit von Ambion nach

Angaben des Herstellers, einmal mit biotinmarkierten Nukleotiden der Firma ENZO (Enzo Biochemicals) und einmal mit biotinmarkierten Nukleotiden der Firma Perkin-Elmer (Perkin Elmer, Life Sciences) sowie als Vergleich mit den im MessageAmp aRNA-Kit von Ambion mitgelieferten unmarkierten Nukleotiden durchgeführt.

Bei der RNA- Amplifikation mit den biotinmarkierten Nukleotiden von Perkin- Elmer konnte weder eine ausreichende Amplifikationseffizienz (von 500ng RNA- Ausgangsmenge auf 2µg amplifizierte RNA, d.h. eine Faktor von 4) noch eine Reproduzierbarkeit erzielt werden. Außerdem lieferte die Amplifikation zu kurze Transkripte (Abbildung 16A). Die RNA- Amplifikation mit den biotinmarkierten Nukleotiden von ENZO stellte sich als optimal heraus, da diese Amplifikation eine ausreichende Effizienz (von 500ng RNA- Ausgangsmenge auf 8µg amplifizierte RNA, d.h. einen Faktor von 16) und eine gute RNA- Qualität lieferte, vergleichbar mit dem Ergebnis der Amplifikation mittels MessageAmp aRNA- Kit (Abbildung 16B und C).

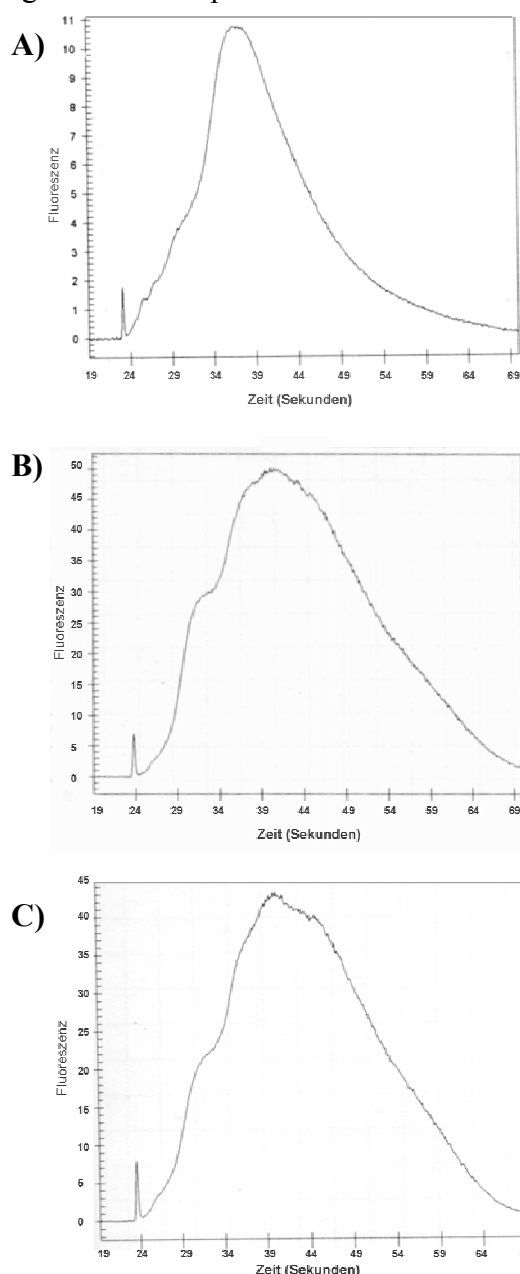


Abbildung 16: Darstellung der Elektropherogramme der amplifizierten RNA der unterschiedlichen RNA-Amplifikationen, analysiert am Agilent Bioanalyser 2100. A) Die in vitro-Transkription wurde mit den biotinmarkierten Nukleotiden von der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Im Elektropherogramm ist gut zu erkennen, dass der Peak schnell ansteigt und sehr schnell wieder abfällt, was für kurze Transkripte spricht, welche das Ergebnis der Genexpressionsanalysen verfälschen würden.

B) In dieser Probe kamen die biotinmarkierten Nukleotide der Firma ENZO zum Einsatz. Hier ist im Elektropherogramm der Peak gleichmäßig verteilt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Transkripte aller möglichen Längen amplifiziert wurden.

C) Diese Probe wurde zum Vergleich mit den im MessageAmp aRNA-Kit enthaltenen unmarkierten Nukleotiden amplifiziert. Dieses Kit ist von der Firma Ambion für die Amplifikation von geringen RNA-Mengen etabliert, so dass hier optimale Ergebnisse erzielt werden. Im Elektropherogramm der Probe ist eine gleichmäßige Verteilung des Peaks zu erkennen.

Daher kam die Kombination aus MessageAmp aRNA- Kit von Ambion und biotinmarkierten Nukleotiden von ENZO für die Amplifikation der Proben zur Anwendung.

3.2. Differentiell exprimierte Gene im primären

Lungenkarzinom

Zur Anfertigung der Genexpressionsprofile primärer Lungenkarzinome wurden insgesamt 29 Tumorproben (10 Adenokarzinome, 10 Plattenepithelkarzinome, 9 kleinzellige Lungenkarzinome) sowie 5 Nichttumorproben mit Hilfe von Human Genome Focus Oligonukleotid- Arrays (Affymetrix) untersucht, welche insgesamt 8793 bekannte Gene umfassten. Anschließend schlossen sich die Normalisierung der Daten mittels „variance stabilizing transformation“ und zur Identifizierung der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene eine Zweiklassenanalyse mittels „significance analysis of microarrays“ (SAM) an. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der analysierten 8793 Gene jedes Tumorsubtypes im Vergleich zum Nichttumor. Bei einem Vergleich der Verteilung der Gene innerhalb der Scatter Plots wurde ersichtlich, dass das Adenokarzinom die wenigsten überexprimierten Gene aufwies und die verstärkt exprimierten Gene des Plattenepithelkarzinoms nicht so starke Unterschiede zeigten wie die der beiden anderen Tumorsubtypen. Besonders bei dem kleinzelligen Lungenkarzinom gab es Gene, die im Vergleich zum Nichttumor stark überexprimiert waren. Dagegen streuten die unterexprimierten Gene stärker in den nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, d.h. hier wurden mehr Gene im Vergleich zum Nichttumor stark vermindert exprimiert. Die Originaldaten sind in der GEO DataSets- Datenbank unter www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi (Accession: GSE 6044) verfügbar.

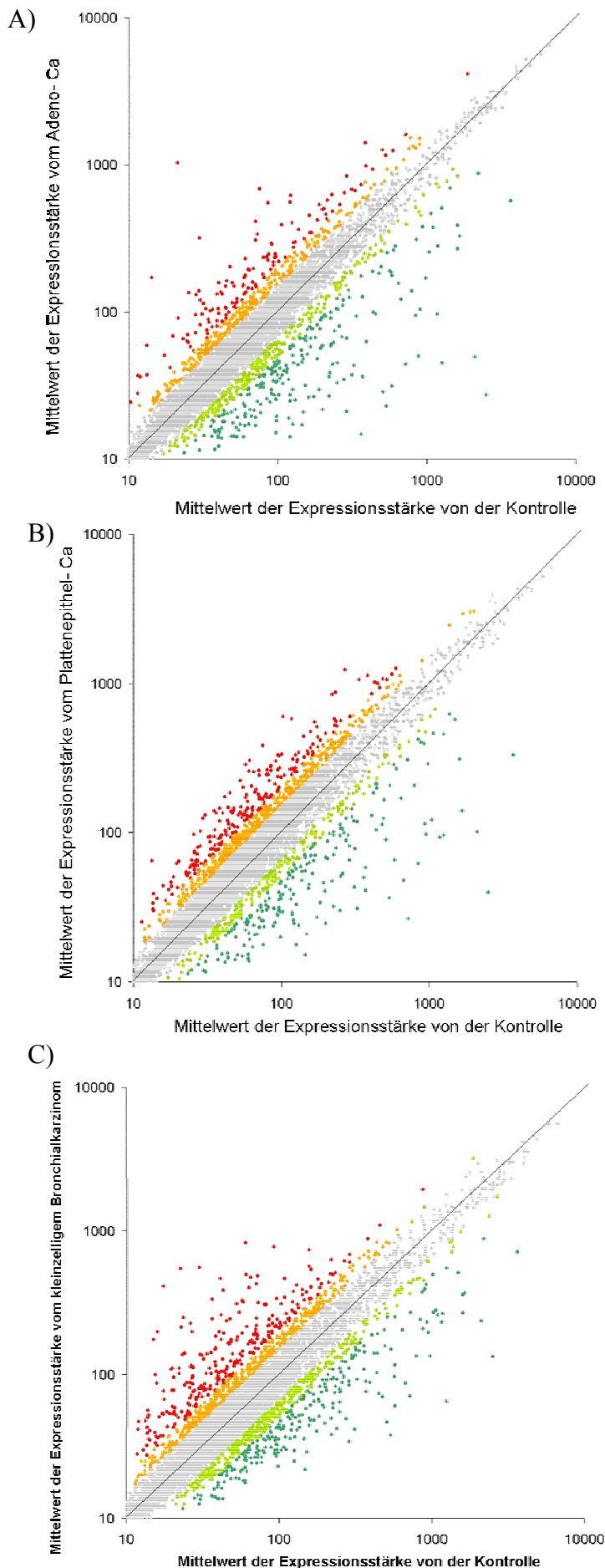


Abbildung 17: Scatter Plots als graphische Darstellung der Expressionsintensitäten aller 8793 Gene im Vergleich zum Nichttumor. Die Abbildungen A und B stellen die Ergebnisse der nichtkleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC) (A) Adenokarzinom, B) Plattenepithelkarzinom) dar und die untere Abbildung (C) die des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC). In rot wurden Gene mit einem „Fold Change“ > 2 , d.h. deutlich überexprimiert, dargestellt. Die orange gekennzeichneten Gene wiesen im Vergleich zum Nichttumor eine leicht erhöhte Expression auf und besaßen einen „Fold Change“ zwischen 1,5 und 2. In grau wurden Gene mit einem „Fold Change“ zwischen 0,66 und 1,5 unterlegt. In hellgrün, wurden die Gene dargestellt, die einen „Fold Change“ zwischen 0,5 und 0,66 hatten, d.h. Gene die im Vergleich zum Nichttumor leicht vermindert exprimiert wurden. Dunkelgrün zu erkennende Gene waren mit einem „Fold Change“ $< 0,5$ deutlich, im Vergleich zum Nichttumor, unterexprimiert.

Um aus der Datenmenge der erfassten Gene diejenigen herauszufiltern, die bestimmten Signifikanzkriterien standhalten, wurden folgende Auswahlkriterien festgelegt. Alle Gene, die in den Tumorsubtypen des Lungenkarzinoms im Vergleich zum Nichttumor einen q-Value kleiner 2,7% hatten sowie einen „Fold Change“ größer 2 bzw. einen „Fold Change“ kleiner 0,5 (Faktor 2) aufwiesen, wurden selektiert. Von den 8793 analysierten Genen konnten so insgesamt 944 signifikante Gene identifiziert werden, von denen 404 Gene dem kleinzelligen Lungenkarzinom (223 Gene überexprimiert, 181 Gene unterexprimiert), 335 Gene dem Plattenepithelkarzinom (172 Gene überexprimiert, 163 Gene unterexprimiert) und 205 Gene dem Adenokarzinom (43 Gene überexprimiert, 162 Gene unterexprimiert) zugeteilt werden konnten (Abbildung 18).

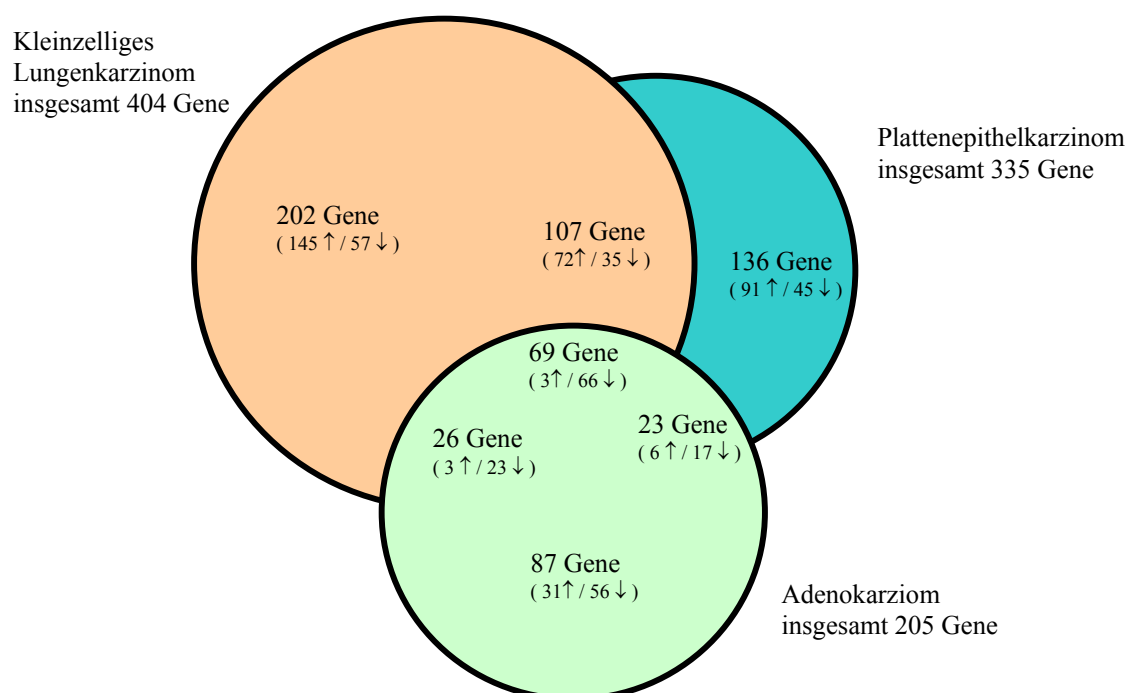


Abbildung 18: Aufteilung der 944 signifikanten Gene. (↑ um einen Faktor von größer 2 überexprimierte Gene, ↓ um einen Faktor von größer 2 unterexprimierte Gene)

3.2.1. Hierarchische Clusteranalyse

Bei der Durchführung eines „unsupervised complete linkage clustering“ Algorithmus der hierarchischen Clusteranalyse unter Verwendung der signifikant differentiell exprimierten Gene des jeweiligen Tumorsubtypes konnten die Gruppen im Dendrogramm, welches das Ergebnis des Clusterings veranschaulicht, eindeutig voneinander getrennt werden.

Beim Adenokarzinom konnte im Dendrogramm eine deutliche Auftrennung der zwei Gruppen aufgezeigt werden (Abbildung 19). Bei einer Trennhöhe von 0,23 erfolgte eine weitere Unterteilung der zu analysierenden Proben, wobei alle Adenokarzinome zu einer Gruppe zusammengefasst werden konnten.

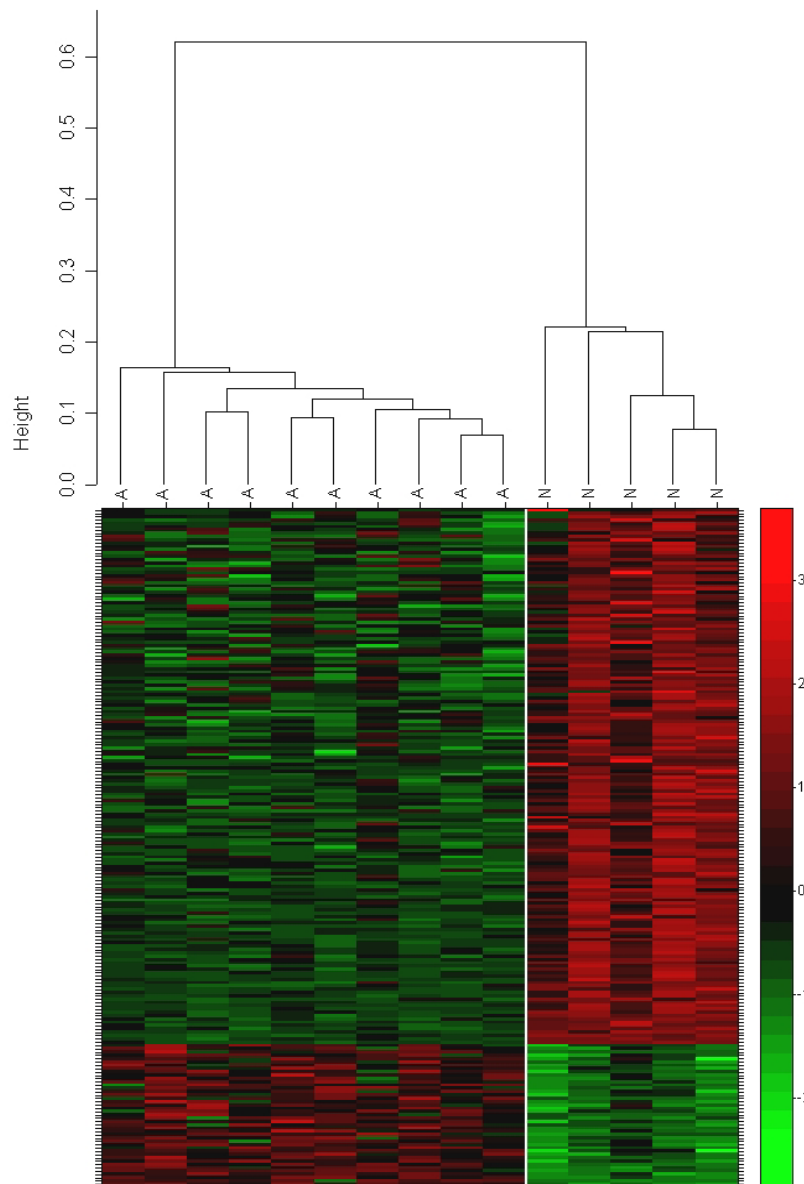


Abbildung 19: Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse des Adenokarzinoms versus Nichttumor. Unterhalb des Dendogramms befinden sich in den 10 linken Spalten die Adenokarzinomproben (A), in den 5 rechten Spalten die Nichttumorprobe (N). Zur Darstellung wurden die Expressionswerte mit einer rot-grün- Skala farbkodiert. Rot dargestellt wurden die Gene, die im Bezug zum Mittelwert des Einzelgens überexprimiert und grün, die Gene die unterexprimiert wurden. Insgesamt wurden 200 Gene, die mit einem „Fold Change“ von größer 2,3 überexprimiert bzw. unterexprimiert waren und einen q-Value kleiner 2,5% hatten, für die Erstellung des Clusters genutzt. Es wurden horizontal die Proben und vertikal die für die Erstellung des Clusters verwendeten Gene, aufgetragen.

Auch beim Plattenepithelkarzinom erfolgte eine klare Einteilung der Proben in zwei Gruppen, wobei die 10 Plattenepithelkarzinomproben in einer Gruppe und die 5 Nichttumorproben in die zweite Gruppe zusammengefasst wurden (Abbildung 20).

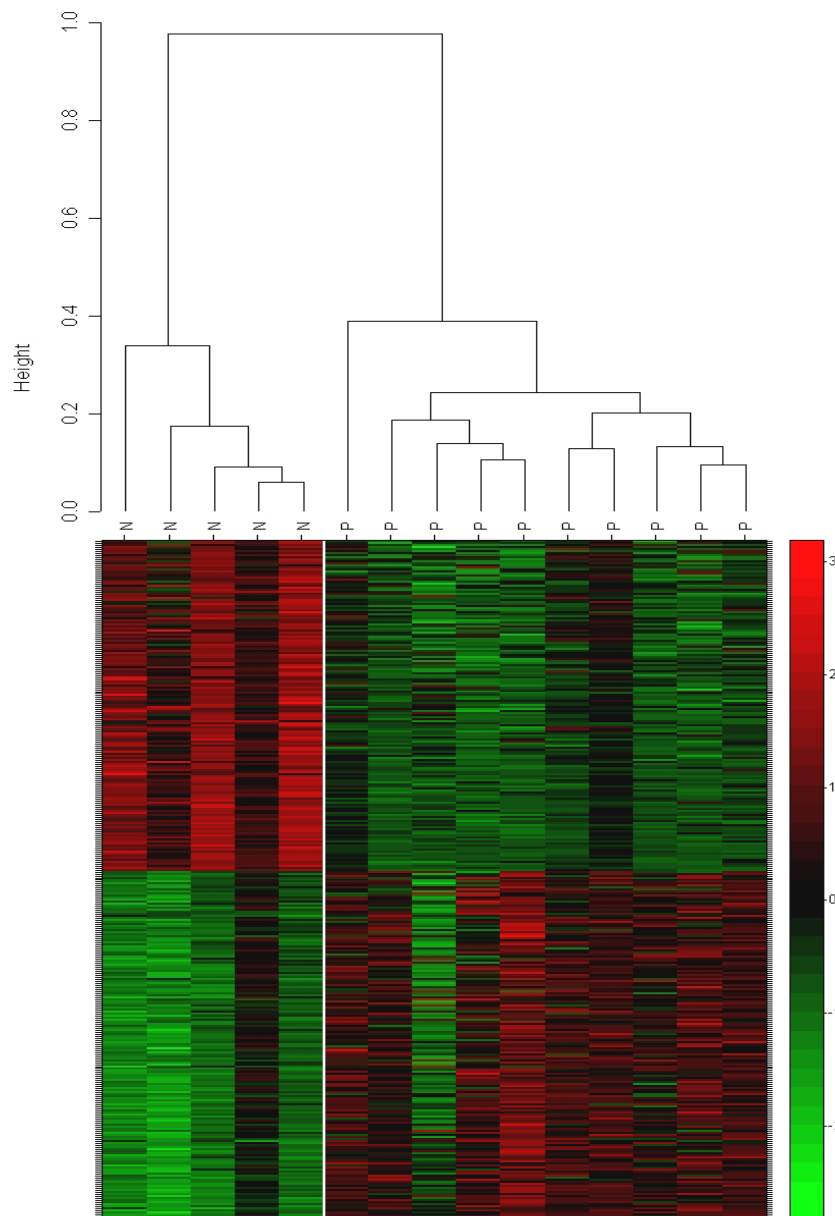


Abbildung 20: Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse des Plattenepithelkarzinoms versus Nichttumor. In den 5 linken Spalten befinden sich die Nichttumorproben (N), in den 10 rechten Spalten die Plattenepithelkarzinomproben (P). Zur Darstellung wurden die Expressionswerte mit einer rot-grün- Skala farbkodiert. Rot dargestellt wurden die Gene, die im Bezug zum Mittelwert des Einzelgens überexprimiert und grün, die Gene die unterexprimiert wurden. Insgesamt wurden 330 Gene, die mit einem „Fold Change“ von größer 2 überexprimiert bzw. unterexprimiert waren und einen q-Value kleiner 2,5% hatten, für die Erstellung des Clusters genutzt. Weitere 5 signifikante Gene wurden nicht mit in die Clusteranalyse einbezogen, da deren Expressionswerte innerhalb der Tumorproben sehr heterogen waren. Es wurden horizontal die Proben und vertikal die für die Erstellung des Clusters verwendeten Gene aufgetragen.

Beim kleinzelligen Lungenkarzinom konnten ebenfalls die zu analysierenden Proben in zwei sich deutlich unterscheidende Gruppen unterteilt werden (Abbildung 21).

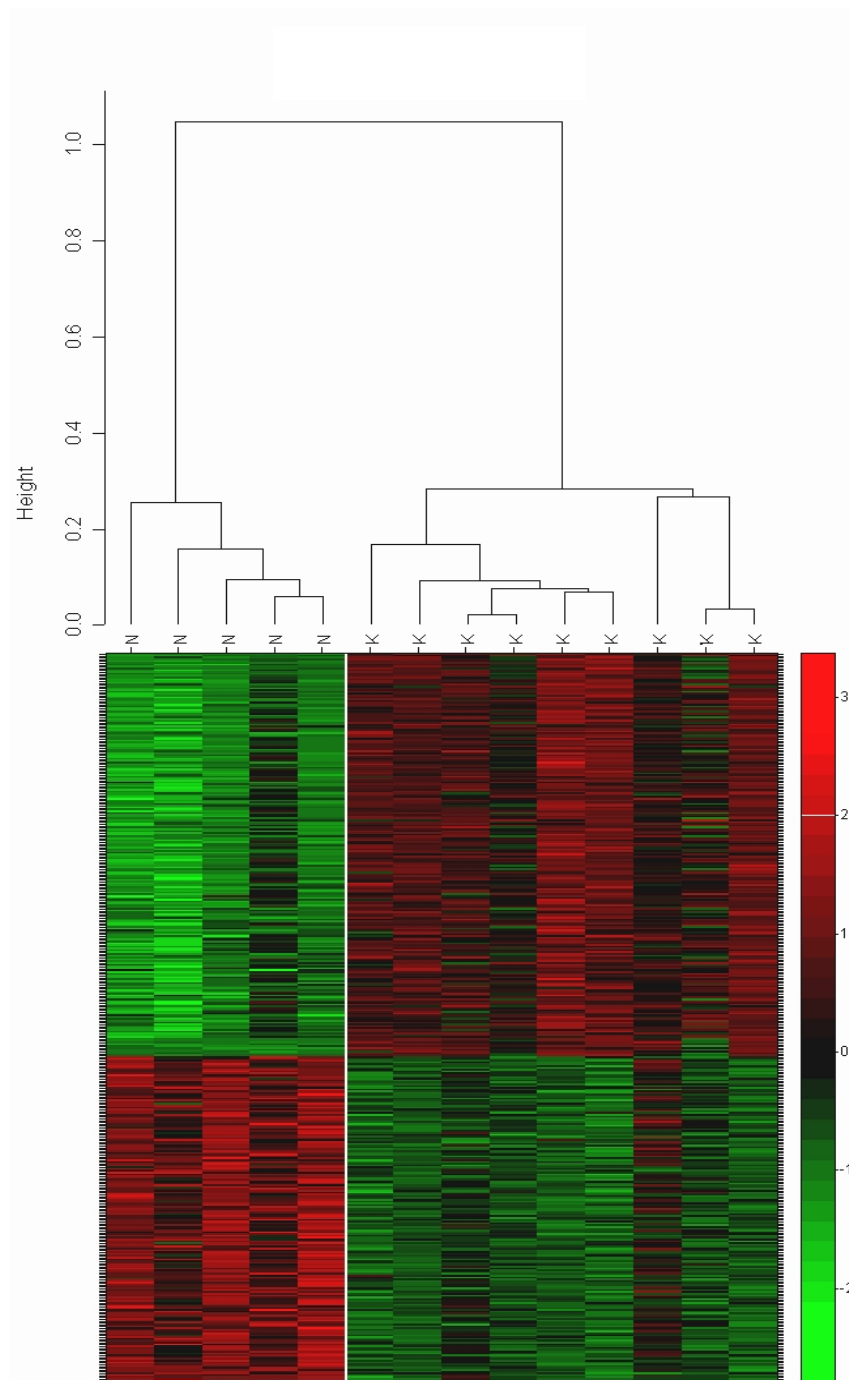


Abbildung 21: Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse des kleinzelligen Lungenkarzinoms versus Nichttumor. In den 5 linken Spalten befinden sich die Nichttumorproben (N), in den 10 rechten Spalten die Proben des kleinzelligen Lungenkarzinoms (K). Zur Darstellung wurden die Expressionswerte mit einer rot- grün- Skala farbkodiert. Rot dargestellt wurden die Gene, die im Bezug zum Mittelwert des Einzelgens überexprimiert und grün, die Gene die unterexprimiert wurden. Insgesamt wurden 242 Gene, die mit einem „Fold Change“ von größer 2,75 überexprimiert bzw. unterexprimiert waren und einen q-Value kleiner 2,5% hatten, für die Clusteranalyse verwendet. Es wurden horizontal die Proben und vertikal die für die Erstellung des Cluster verwendeten Gene aufgetragen.

Ausgehend von den 944 signifikanten Genen, wurden die 50 am stärksten differenziell exprimierten Gene von jeder zu analysierenden Gruppe (Adenokarzinom,

Plattenepithelkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom und Nichttumor) ausgewählt und für die Durchführung einer weiteren Clusteranalyse genutzt (Abbildung 22). Auf Grundlage dieser 200 Gene ist eine klare Abgrenzung der Tumorklassen untereinander und vom Nichttumor möglich.

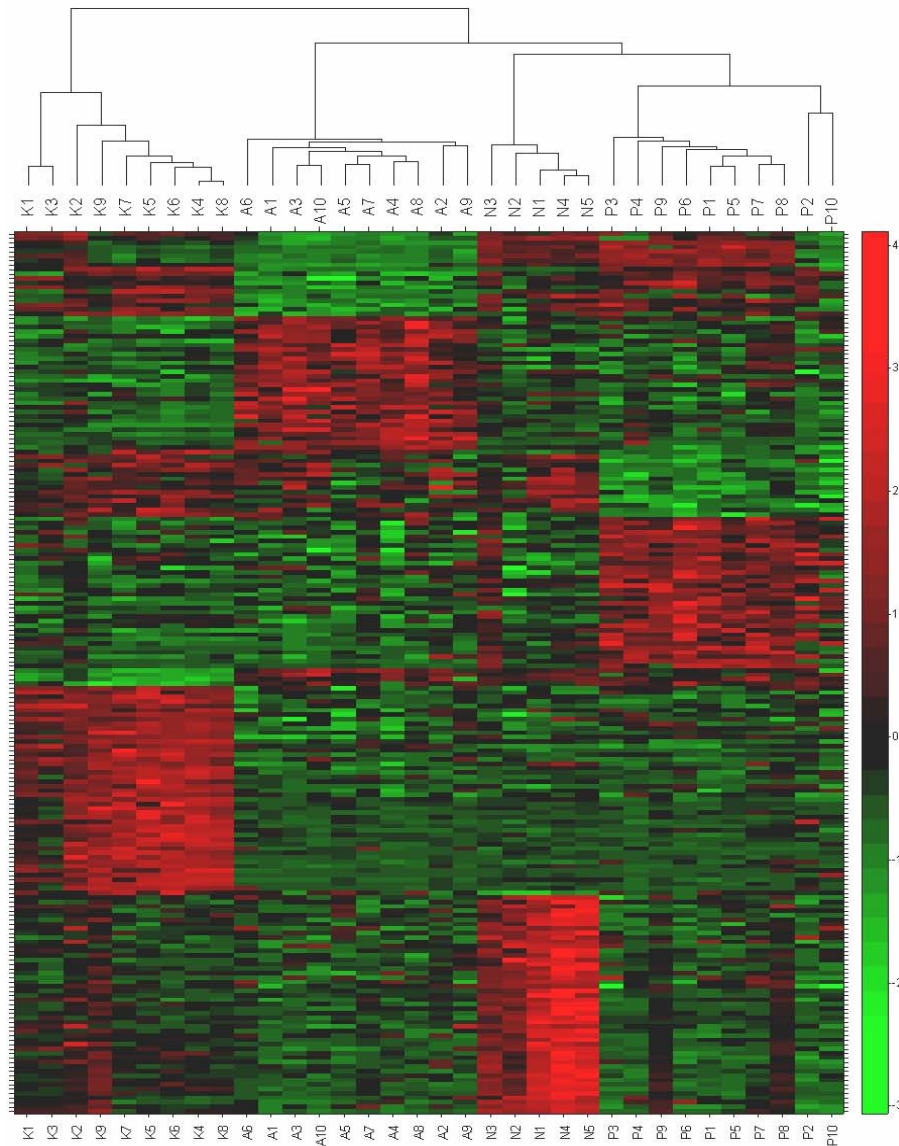


Abbildung 22: Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse aller drei Tumorsubtypen versus Nichttumor. In den 9 linken Spalten befinden sich die Proben des kleinzelligen Lungenkarzinoms (K), gefolgt von den 10 Adenokarzinomproben (A) und den sich daran anschließenden 5 Nichttumorproben (N). In den 10 rechten Spalten bilden die 10 Plattenepithelkarzinomproben (P) den Abschluss. Insgesamt wurden 200 Gene für die Clusteranalyse verwendet.

3.2.2. Funktionelle Gruppen

Die 944 signifikant differentiell exprimierten Gene wurden zur detaillierten Auswertung anhand ihrer in der Literatur beschriebenen Funktion in folgende 14 funktionelle Gruppen eingeteilt und in Tabelle 22 zusammengefasst.

funktionelle Gruppen	Adenokarzinom	Plattenepithelkarzinom	kleinzelliges Lungenkarzinom
Proliferation	1 Gen ↑ 1 Gen ↓	41 Gene ↑	56 Gene ↑ 1 Gen ↓
DNA- Reparatur	1 Gen ↓	8 Gene ↑	14 Gene ↑
Protoonkogene	1 Gen ↑ 11 Gene ↓	8 Gene ↑ 11 Gene ↓	12 Gene ↑ 10 Gene ↓
Zelladhäsion	3 Gene ↑ 6 Gene ↓	2 Gene ↑ 6 Gene ↓	8 Gene ↑ 7 Gene ↓
Strukturproteine	7 Gene ↑ 20 Gene ↓	14 Gene ↑ 15 Gene ↓	19 Gene ↑ 18 Gene ↓
Metabolismus	11 Gene ↑ 25 Gene ↓	34 Gene ↑ 26 Gene ↓	22 Gene ↑ 38 Gene ↓
Immunsystem	6 Gene ↑ 13 Gene ↓	3 Gene ↑ 19 Gene ↓	2 Gene ↑ 25 Gene ↓
Signaltransduktion	13 Gene ↓	7 Gene ↑ 3 Gene ↓	18 Gene ↑ 10 Gene ↓
Transkription	1 Gen ↑ 8 Gene ↓	10 Gene ↑ 5 Gene ↓	22 Gene ↑ 4 Gene ↓
Transport	2 Gene ↑ 12 Gene ↓	11 Gene ↑ 15 Gene ↓	8 Gene ↑ 15 Gene ↓
Entwicklung	1 Gen ↑ 9 Gene ↓	5 Gene ↑ 6 Gene ↓	12 Gene ↑ 4 Gene ↓
Ca- Bindeproteine	3 Gene ↑ 4 Gene ↓	3 Gene ↓	4 Gene ↓
Apoptose	1 Gen ↓	---	3 Gene ↑ 1 Gen ↓
Funktion unklar	7 Gene ↑ 38 Gene ↓	29 Gene ↑ 54 Gene ↓	27 Gene ↑ 44 Gene ↓

Tabelle 22: Zusammenfassung der Geneinteilung in funktionelle Gruppen.

In den weiteren Abschnitten wird auf die wichtigsten dieser funktionellen Gruppen genauer eingegangen.

3.2.2.1. Proliferation

Zellvermehrung entsteht auf Grund der Progression der Zelle durch den Zellzyklus, der sich aus 4 definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G₁, S, G₂ und M- Phase. Zellen, die sich nicht teilen, sind in der G₀- Phase. Sie erhalten in der Regel von außen ein Signal, in einen neuen Zyklus einzutreten. Der Übergang von einer in die nächste Phase des Zellzyklus wird durch Cyclin- abhängige Kinasen (CDK) reguliert. Diese Enzyme bilden einen Komplex mit jeweils spezifischen Ko- Faktoren, den Cyclinen. Die aktiven Cyclin / CDK- Komplexe phosphorylieren Substratproteine z.B. Rb und regulieren hierdurch die entscheidenden Kontrollpunkte des Zellzyklus. Die Aktivität der CDK wird durch spezifische Inhibitoren (p21, p27, p57 und p16) negativ reguliert.

Wie aus Tabelle 23 ersichtlich wird, fand sich vor allem beim kleinzelligen Lungenkarzinom eine Überexpression von Cyclinen und Cdk's, die in der S- Phase und der G₂- Phase wirken. Die Mitglieder der Rb- Familie (RB1, RbL1, RbL2) und die verschiedenen E2F- Transkriptionsfaktoren waren in der Genexpression im Vergleich zum Nichttumor unverändert.

Zellzyklusgene	Phase des Zellzyklus	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
Cyclin E	Progression in die S- Phase	- Aktivierung von Cdk2	1,31	1,88	4,48
Cyclin A1	späte S- Phase	- Aktivierung von Cdk2 und Cdc2	0,39	0,57	0,67
Cyclin A2			1,44	2,05	2,07
Cyclin B2	Progression in die M- Phase	- Aktivierung von Cdc2	1,84	4,34	4,43
Cdk4 (cyclin-dependent kinase 4)	G ₁ - Phase	- Phosphorylierung von Rb	1,58	2,89	2,55
Cdk2 (cyclin-dependent kinase 2)	Progression in die S- Phase	- Phosphorylierung der DNA- Replikations- Maschinerie	1,20	1,60	2,41
Cdc2 (cell division cycle 2)	Progression in die M- Phase	- Phosphorylierung vom Histon H1	1,34	2,89	3,42
p16 (CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)	G ₁ - Phase	- Inhibition von Cdk4	1,35	1,68	5,15

Tabelle 23: Zusammenfassung der differentiell exprimierten Zellzyklusgene.

A = Adenokarzinom, P = Plattenepithelkarzinom, K = kleinzelliges Lungenkarzinom, N = Nichttumor. In rot und grün sind die Gene dargestellt, die im Vergleich zum Nichttumor einen „Fold Change“ von größer 2 bzw. kleiner 2 haben sowie einen q- Value kleiner 2,7%. Schwarz verdeutlicht Gene, die in dem entsprechenden Tumorsubtyp nicht die Signifikanzkriterien erfüllten.

Als weiteres Indiz einer vermehrten Proliferation konnte eine erhöhte Expression von „minichromosome maintenance“ (MCM)- Genen nachgewiesen werden (Tabelle 24). Die Familie der MCM- Gene besteht aus sechs Mitgliedern, die alle für DNA- Bindeproteine kodieren und am Ende vieler Signalwege, involviert in Zellproliferation, stehen. Die einzelnen MCM- Mitglieder (MCM2 – MCM7) bilden einen heterohexameren Komplex, der eine Schlüsselrolle bei der Umwandlung des Pre- Replikationskomplexes (ORC, MCM, CDC6, CDT1, CDK und DDK) in den Replikationskomplex spielt (Obermann EC. et al, 2005; Patterson S. et al, 2005).

MCM- Gene	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
MCM2 (minichromosome maintenance deficient 2)	- als MCM- Komplex Bestandteil des Pre- Replikationskomplexes	1,05	2,54	3,34
MCM3 (minichromosome maintenance deficient 3)		1,36	2,04	2,73
MCM5 (minichromosome maintenance deficient 5)		1,40	2,50	1,88
MCM6 (minichromosome maintenance deficient 6)		2,43	3,01	4,34
Cdc7 (cell division cycle 7 homolog)	- phosphoryliert MCM2	1,24	1,41	3,68

Tabelle 24 : Zusammenfassung der differentiell exprimierten MCM- Gene.
Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Auch aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass beim kleinzelligen Lungenkarzinom so gut wie alle aufgelisteten Gene im Vergleich zum Nichttumor überexprimiert wurden. Im Plattenepithelkarzinom wurden die einzelnen MCM- Gene vermehrt exprimiert, was ebenfalls für eine erhöhte Proliferation spricht. Beim Adenokarzinom zeigten die untersuchten Gene nur wenige Veränderungen auf Genexpressionsebene.

Des Weiteren konnten veränderte Gene, die in der Mitose wirken, aufgezeigt werden. So war eine Reihe von Genen, die für Proteine des Centromer / Kinetochors- Proteinkomplex (Tabelle 25) kodieren sowie Gene, deren Genprodukte eine Veränderung der chromosomalen Struktur bewirken, überexprimiert. Da nur in der Metaphase die Chromosomen maximal verkürzt in der Äquatorialebene der Zelle vorliegen und ein Centromer ausbilden, kann die Überexpression dieser Gene als ein weiterer Hinweis für eine vermehrte Zellteilung angesehen werden.

Centromer / Kinetochor- Gene	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
CENPA (centromere protein A)	- ersetzt in den Nukleosomen des Centromers das Histon-H3 - definiert Centromer- Region als Aufbaustelle des Kinetochors (Regnier V. et al, 2005)	1,45	3,29	4,68
CENPE (centromere protein E)	- Bestandteil der äußeren Kinetochorplatte - Verantwortlich für die Chromatidenbewegung und der Spindelfaser- Elongation (Chan GKT. et al, 1998)	1,20	1,66	2,38
CENPF (centromere protein F)	- Bestandteil der äußeren Kinetochorplatte - interagiert mit CENPE und BUBR-1 (Chan GKT. et al, 1998)	1,27	1,90	4,07
BUB1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog)	- Anbindung der Spindel an das Kinetochor - Bestandteil des Spindel- Checkpoints (Lee EA. et al, 2004)	1,30	1,80	2,38
BUB1B (budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta)	- bindet BUB1 und unterstützt es funktionell (Sudakin V. et al, 2001)	1,48	2,67	3,51
HEC1 / KNTC2 (kinetochore associated 2)	- wichtig für die Rekrutierung der Checkpoint- Proteine Mad1 und Mad2 ans Kinetochor (DeLuca JG. et al, 2005)	1,18	2,15	3,66
MAD2L1 (mitotic arrest deficient-like 1)	- Bestandteil des Spindel- Checkpoints (Kops GJPL. et al, 2005)	1,62	3,20	3,78
NEK2 (never in mitosis gene a-related kinase 2)	- Regulation der Centrosomen- Separation - essentiell für den Eintritt in die Mitose	1,20	1,81	2,48
PRC1 (protein regulator of cytokinesis 1)	- wichtig für die Spindelbildung - reguliert die Cytokinese	1,64	3,54	4,23

Tabelle 25: Centromer / Kinetochor- Gene, die in einem der Lungenkarzinomsubtypen überexprimiert wurden. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Zusammenfassend zu den Proliferations- assoziierten Genen lässt sich sagen, dass vor allem beim kleinzelligen Lungenkarzinom aber auch beim Plattenepithelkarzinom das Expressionsmuster mit hoher Proliferationsaktivität vereinbar ist.

3.2.2.2. DNA- Reparatur

Die DNA- Replikation verläuft mit einer sehr niedrigen Fehlerrate von 10^{-7} , so dass gelegentlich Abweichungen vorkommen. Bleiben diese Fehler unkorrigiert, so hat dies zur Folge, dass ein Tochtermolekül an einer Stelle eine Fehlpaarung (mismatch) enthält, weil die in der DNA- Doppelhelix gegenüberliegenden Nukleotide nicht zueinander passen, d.h. nicht komplementär sind. Um die Zahl von Mutationen so niedrig wie möglich zu halten, besitzen alle Organismen Mechanismen für die DNA- Reparatur, mit

denen versucht wird, Fehlpaarungen und strukturelle Veränderungen in den DNA-Molekülen zu korrigieren. Auch bei Tumoren wird dieser Reparaturmechanismus aufrechterhalten, da eine zu hohe Mutationsrate in den Tumorzellen unter anderem zur Einleitung von Apoptose führen und sich somit negativ auf das Tumorstadium auswirken würde. Auch wir konnten mittels Genexpressionsprofile zeigen, dass die DNA-Reparaturgene in den stark proliferierenden Tumorsubtypen im Vergleich zum Nichttumor vermehrt exprimiert wurden (Tabelle 26).

Gene der DNA-Reparatur	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
PCNA (proliferating cell nuclear antigen)	- essentiell für DNA- Replikation und DNA- Reparatur	1,15	2,62	3,12
MSH2 (mutS homolog 2)	- DNA- Mismatch- Reparatur - interagiert mit MSH6 → MutSa-Komplex (Iyer RR. et al, 2006)	1,04	1,58	2,31
MSH3 (mutS homolog 3)	- DNA- Mismatch- Reparatur - interagiert mit MSH2 → MutSβ-Komplex (Iyer RR. et al, 2006)	0,44	0,57	0,57
MSH6 (mutS homolog 6)	- DNA- Mismatch- Reparatur	1,21	2,10	2,09
RFC3 (replication factor C (activator 3))	- DNA- Replikation und DNA- Reparatur	1,14	1,62	2,58
RFC4 (replication factor C (activator 4))		1,29	5,73	5,56
RFC5 (replication factor C (activator 5))		1,20	2,09	2,55
PIR51 (RAD51 associated protein 1)	- DNA- Reparatur (Doppelstrangbrüche) - bindet an RAD51	1,14	2,48	3,60
FANCG (Fanconi anemia, complementation G)	- Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen	1,10	1,47	2,22

Tabelle 26: Zusammenfassung der differentiell exprimierten DNA-Reparatur- Gene. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Da das kleinzellige Lungenkarzinom die höchste Proliferationsrate von den drei untersuchten Tumorsubtypen besitzt (Kerr KM. et al., 1984; Kazantseva IA. et al, 1990; Ebina M. et al, 1994), traten vermutlich hier auch die meisten Fehler während der DNA-Replikation auf. So war es nicht verwunderlich, dass fast alle in der Tabelle aufgeführten Gene beim kleinzelligen Lungenkarzinom eine deutliche Überexpression zeigten.

In der Literatur wird eine Erhöhung der DNA- Reparatur als möglicher Mechanismus zur Erlangung von Therapieresistenzen diskutiert (Rossel R. et al., 2005).

Beim Adenokarzinom konnte lediglich MSH3 mit einer Unterexpression detektiert werden. Defizite in der DNA- Reparatur führen zu einer erhöhten Mutationsrate und in

Folge zu einem Ansteigen der genomischen Instabilitäten und somit die Tumorentstehung begünstigt (Mao L. et al, 1994).

Zusammenfassend gibt das Expressionsmuster Hinweis auf eine erhöhte DNA- Reparatur im kleinzelligen Lungenkarzinom und im Plattenepithelkarzinom. Inwieweit diese Gene zur Chemotherapieresistenz beitragen, muss in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

3.2.2.3. Protoonkogene

Zwei Klassen von Genen sind kausal an der Entstehung von Tumoren beteiligt: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Erstere werden durch genetische Veränderungen wie Amplifikationen, Punktmutationen und chromosomale Translokationen aktiviert. Tumorsuppressorgene werden dagegen durch Deletionen, Punktmutationen oder epigenetische Mechanismen inaktiviert. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten bei den drei Tumorsubtypen veränderte Genexpressionswerte mehrerer Protoonkogene nachgewiesen werden. In Tabelle 27 ist eine Auswahl von veränderten Protoonkogenen dargestellt. So konnte innerhalb der RAS- Signalkaskade im Plattenepithelkarzinom und kleinzelligen Lungenkarzinom Gene mit veränderter Expression nachgewiesen werden, wobei Ras selbst im Vergleich zum Nichttumor unverändert war.

Aufgrund der zentralen Position der RAS- Proteine in der Signaltransduktionskaskade und aufgrund der Häufigkeit von Mutationen der RAS- Gene, wird RAS und der RAS- Signalweg als wichtiges Ziel für eine Tumorthherapie diskutiert. Unter den überexprimierten Protoonkogenen, die für nukleäre Transkriptionsfaktoren kodieren, befanden sich beim Plattenepithelkarzinom bekannte Onkoproteine wie MYC, MAF und PTTG1. Mutationen dieser Gene können durch Aktivierung oder Inhibierung der Transkription von Schlüsselgenen des Wachstums transformierende Wirkung ausüben. Die Erfassung der Tumor- assoziierten molekularen Veränderungen in diesen Protoonkogenen lässt möglicherweise weitere Einblicke im Bezug auf Prognose und Therapie des Plattenepithelkarzinoms zu. Des Weiteren wurden im kleinzelligen Lungenkarzinom Protoonkogene wie z.B. die Membran- assoziierte Proteintyrosinkinase FYN und der nukleäre Transkriptionsfaktor FOXG1B mit einer erhöhten Genexpression nachgewiesen (Abbildung 23, Tabelle 27).

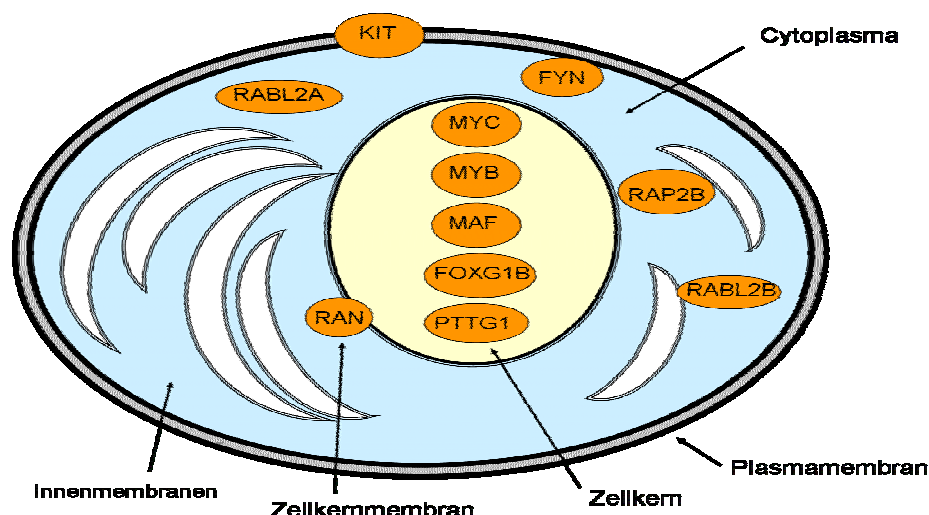


Abbildung 23: Schematische Darstellung der mittels Oligonukleotid- Array detektierten Protoonkogene und die Lokalisation der Protoonkogen- Produkte innerhalb der Zelle.

Protoonkogene	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
RAN (Ras- Related Nuclear Prot.)	- GTP- Bindeprotein der RAS- Superfamilie	1,27	2,02	2,39
RABL2A (Rab- like 2A)	- kleines GTP- Bindeprotein - beteiligt am vesikulären Transport	0,27	0,33	0,40
RABL2B (Rab- like 2B)		0,34	0,35	0,44
RAP2B (Ras- Related Protein 2B)	- innerhalb von intra-zellulären Membransystemen involviert in der GTP- Bindung	1,61	2,30	0,74
MYC (v-myc Avian Myelocytomatosis viral oncogene homolog)	- Transkriptionsfaktor - führt im aktiven Zustand zur Proliferation, Transformation oder zur Apoptose	1,39	2,43	0,76
MAF (v-maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma oncogene)	- Transkriptionsfaktor, bildet Homodimere aber auch mit AP-1, Fos oder Jun Heterodimere	1,58	2,63	1,14
MYB (v-myb Avian Myeloblastosis viral oncogene homolog)	- Transkriptionsfaktor, involviert in der Kontrolle der hämatopoetischen Entwicklung und Zellproliferation	0,39	0,54	1,53
FYN (fyn oncogene related to src, fgr, yes)	- Membran- assoziierte Proteintyrosinkinase, involviert in mehreren Signaltransduktions- kaskaden (Werdich XQ. et al, 2005)	1,37	1,40	3,91
FOXG1B (Forkhead BOX G1B, QIN oncogene)	- Transkriptionsfaktor, fungiert vorallem als transkriptioneller Repressor (Katoh M, 2004)	0,93	1,17	16,76
PTTG1 (pituitary tumor- transforming 1)	- involviert in der DNA- Replikation und DNA- Reparatur (Shibata. Y et al, 2002)	1,43	2,49	2,56
KIT (v- KIT Hardy- Zuckerman 4 Feline Sarcoma viral oncogene homolog)	- Rezeptor Protein-Tyrosinkinase für SCF, involviert in Wachstum und Differenzierung	0,70	0,46	2,79

Tabelle 27: Protoonkogene, die in den Tumorsubtypen eine veränderte Genexpression aufwiesen. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Zusammenfassend konnte eine Reihe von überexprimierten Protoonkogenen aufgezeigt werden, deren Inhibierung als möglicher Therapieansatz des Lungenkarzinoms diskutiert werden kann. Im vergangenen Jahrzehnt sind verschiedene Versuche unternommen worden, Onkogene gezielt zu blockieren. So konnte bereits 1994 die Arbeitsgruppe um Gibbs JB. durch den Einsatz eines Farnesyltransferaseinhibitors die Hemmung von Ras nachweisen. Dieses Ergebnis wurde von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt (Lerner EC. et al, 1995). Mittlerweile stellt der Einsatz von Farnesyltransferaseinhibitoren in Kombination mit konventionellen Zytostatika die Basis neuer Chemotherapie- Konzepte für das nichtkleinzellige Lungenkarzinom dar (Loprevite M. et al, 2004).

3.2.2.4. Gene der Zelladhäsion

Die Modifizierung von Zelladhäsionsmolekülen macht den Prozess einer Metastasierung möglich, da keine Metastasen gebildet werden können, wenn die Tumorzellen über ihre Zelladhäsionsmoleküle mit anderen Zellen im Primärtumor eng verbunden bleiben. Deshalb erfolgt in der Anfangsphase der Metastasierung eine Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen. Auf diese Weise erlangen die Tumorzellen die Fähigkeit den Primärtumor zu verlassen. Nach dem Eindringen in die Kreislaufsysteme müssen die Tumorzellen wiederum ihre Adhäsionsmolekülausstattung verändern, um an die Basalmembran der Kapillarendothelien zu binden, diese zu durchdringen und in sekundäre Gewebe einzuwandern. Mittels Oligonukleotid- Arrays konnten wir eine Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen in allen drei Tumorsubtypen zeigen (Tabelle 28). Im Adenokarzinom wurde z.B. eine vermehrte Expression von Integrinen und ICAM1, einem Mitglied der Immunglobulin- Superfamilie, beobachtet. Im kleinzelligen Lungenkarzinom wurde dagegen eine Überexpression von Cadherinen und verschiedenen Mitgliedern der Immunglobulin- Superfamilie nachgewiesen.

Gene der Zelladhäsion	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
ITGA3 (Integrin, α -3)	- involviert in der Zell- Zelladhäsion und Zellmigration (Voura EB. et al, 2001; Wang X. et al, 2005)	2,02	1,03	0,82
CDH2 (N-cadherin)	- involviert in Zell- Zell- und Zell- Matrix- Wechselwirkungen (Qi J. et al, 2005)	1,09	1,00	5,41
NCAM1 (neural cell adhesion molecule 1)	- involviert in Zell- Zelladhäsion und in Zell- Matrix- Interaktionen - wichtig für Zellmigration (Onganer PU. et al, 2005)	1,01	0,89	12,75
NRCAM (neuronal cell adhesion molecule)	- involviert in Zell- Zelladhäsion , Zell- Matrix- Interaktionen und Migration (Falk J. et al, 2004)	0,84	2,76	9,43
ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1)	- involviert in Zell- Zelladhäsion und in Zell- Matrix- Interaktionen (Rahn JJ. et al, 2005)	5,80	1,30	1,01

Tabelle 28: Differenziell exprimierte Gene der Zelladhäsion. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Im Plattenepithelkarzinom konnte vorwiegend eine Verschiebung bei Genen, deren Produkte an der Bildung von „Gap Junctions“ und „Tight Junctions“ involviert sind, detektiert werden (Tabelle 29).

Gene der Zelladhäsion	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
GJA1 (gap junction protein, alpha 1, connexin 43)	- involviert in Zell- Zelladhäsion - beteiligt an Zellkommunikation (Pollmann MA. et al, 2005; Carystinos GD. et al, 2002)	1,49	3,90	1,23
TJP3 (tight junction protein 3, zona occludens 3)	- dichten Interzellularraum ab - verbinden Aktinfilamentnetzwerk benachbarter Zellen (Roh MH. et al, 2002; Martin TA. Et al, 2004)	0,68	0,42	0,45
CLDN10 (claudin 10)	- involviert in Zell- Zelladhäsion - lokalisiert in den Tight Junctions (Morin J P. et al, 2005)	0,30	0,22	0,32
DSG3 (desmoglein 3)	- gehört zu den desmosomalen Cadherinen - verknüpft das Netzwerk der Intermediären Zellfilamente mit der Matrix des Interzellularraums (Moll R. et al, 1998)	0,48	2,43	0,66
DSC3 (desmocollin 3)	- involviert in der interzellularen Adhäsion - gehört zu den desmosomalen Cadherinen (Moll R. et al, 1998)	0,32	2,62	0,59
KAL1 (Kallmann syndrome 1 sequence)	- spielt in der Zelladhäsion und Migration eine Rolle (Liu Fu-Shing et al, 2003)	0,62	0,42	0,35

Tabelle 29: Weitere Zelladhäsionsmoleküle, die in den Tumorsubtypen Veränderungen in der Genexpression aufweisen. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Zelladhäsionsmoleküle sind an allen Schritten der malignen Progression und der Tumormetastasierung beteiligt (Brodt P. 1991). So konnte gezeigt werden, dass ICAM1 in der Tumor- Stromaadhäsion und der transendothelialen Migration involviert ist (Alkhamesi NA. et al, 2005; Rahn JJ. et al, 2005). Auch die Dysregulation von Integrinen beeinflusst die maligne Progression, wobei sowohl Zugewinn als auch Verlust bestimmter Integrine invasives Wachstum und Metastasierung fördern (Voura EB. et al, 2001; Wang X. et al, 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass ein Verlust von „Tight Junction“-Molekülen mit einer schlechteren Prognose im Mammakarzinom assoziiert ist (Martin TA. et al, 2004).

Zusammenfassend kann anhand der vorliegenden Daten in allen drei Tumorsubtypen eine Dysregulation von Adhäsionsmolekülen beobachtet werden, was als Hinweis auf Tumorprogression und Metastasierung gesehen werden kann.

3.2.2.5. Strukturproteine

Es gilt als erwiesen, dass Tumorzellen einer morphologischen Transformation unterliegen, einhergehend mit Veränderungen in der zytoplasmatischen Organisation des Filamentsystems und der extrazellulären Matrix.

Auch wir konnten beim Adenokarzinom 27 Gene, beim Plattenepithelkarzinom 29 Gene und beim kleinzelligen Lungenkarzinom 37 Gene des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix identifizieren, die auf Genexpressionsebene im Vergleich zum Nichttumor signifikante Veränderungen aufwiesen (Tabelle 22).

Vor allem bei den Aktinfilamenten, den so genannten Mikrofilamenten des Zytoskeletts wurden mehrere Gene, deren Genprodukte direkt mit dem Auf- oder Abbau des Aktinfilaments bzw. deren Zusammenlagerung assoziiert sind, detektiert (Tabelle 31). Die Aufhebung der Aktinorganisation ermöglicht der Tumorzelle eine schnelle Veränderung der Form und verschafft ihr somit einen Vorteil bei der Migration und Invasion. Die Polymerisation von Aktinfilamenten ist ein wesentlicher Faktor bei der Ausbildung von Filo- und Pseudopodien, die besonders bei mobilen Zellen also auch bei Tumorzellen beobachtet werden können.

Gene des Aktin-zytoskeletts	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
ARPC1B (actin related protein 2/3 complex, 1B)	- involviert in der Kontrolle der Aktinpolymerisierung	2,38	1,32	0,87
TMSNB (thymosin, beta, 4X)	- involviert in Aktin-polymerisation und Depolymerisation (Marquette I. et al, 2004)	1,30	3,24	29,99
TMSB10 (thymosin, beta 10)	- bindet G-Actin, involviert in Aktindepolymerisation	2,01	1,61	1,72
PLS3 (plastin 3)	- Aktinbindeprotein, verantwortlich für die Bündelung von Aktinfilamenten (Lin CS. et al, 1993)	2,46	2,46	1,04
FSCN1 (fascin, homolog 1)	- Aktinbündelungsprotein zur Ausbildung von Filopodien (Bryan J. et al, 1993)	1,26	2,20	1,47
ENC1 (ectodermal- neural cortex 1)	- Aktinbindeprotein, involviert in der Zytoskelettorganisation (Fujita M. et al, 2001)	1,76	1,30	2,32
PFN2 (profilin 2)	- Aktin- Monomer- Bindeprotein - involviert in Aktindepoly -merisation (Kwiatkowski DJ. et al, 1988)	0,37	1,43	1,29
VILL (villin-like)	- bindet als Zytoskelettbestandteil an Aktinfilamente	0,65	0,49	0,50
ANK3 (ankyrin 3)	- Membran- assoziiertes Protein, verknüpft Zytoskellet mit der Plasmamembran (Kordeli E. et al, 1995)	0,40	0,46	0,31

Tabelle 30: Gene des Aktinzytoskeletts, die in den Tumorsubtypen Veränderungen in der Genexpression aufwiesen. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Aber auch bei Genen, die für Tubuli- und Mikrotubuli- assoziierte Proteine kodieren, konnte eine Dysregulierung aufgezeigt werden (Tabelle 31). Mikrotubuli bilden unter anderem die Grundstruktur beweglicher Zellfortsätze, der Zilien (Pozo K. et al, 2006). In der Literatur wird beschrieben, dass die Zilien des Flimmerepithels der Bronchien während der Karzinogenese morphologischen Veränderungen unterliegen. So konnte eine Abnahme der Zilienanzahl pro Zelle als auch eine verminderte Beweglichkeit der Zilien beobachtet werden. Letzteres beruht auf Mutationen in Dyneingenen. Auffällig bei unseren Daten war, dass viele Gene, die für Dynein kodieren in allen drei Tumorsubtypen mit einem „Fold Change“ kleiner 0,36 unterexprimiert wurden. Dynein ist nicht nur für den intrazellulären Transport von Vesikeln und Zellorganellen wichtig, sondern interagiert auch mit den Mikrotubulusdoubletten der Zilie und bewirkt als molekularer Motor eine Krümmung dieser Zilie.

Gene des Zytoskeletts	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
DPYSL1 (dihydropyrimidinase-like 2)	- bindet Tubulindimere und reguliert deren Wachstum	2,87	1,29	2,90
TUBG1 (tubulin, gamma 1)	- wichtiger Bestandteil des Mikrotubuli-Organisationszentrum im Centrosom (O'Neal Wise D. et al, 2000)	1,16	1,78	2,01
TUBA3 (tubulin, alpha 3)	- involviert am Aufbau von Mikrotubulifilamenten	0,39	0,34	1,44
TUBB2 (tubulin, beta 2)	- involviert am Aufbau von Mikrotubulifilamenten	0,33	0,57	0,74
TEKTT (tektin 2)	- filamentbildendes Protein - involviert am Aufbau von Zilien, interagiert mit Dynein (Tanaka, H. et al, 2004)	0,29	0,28	0,36
DNALI1 (dynein, axonemal, light intermediate polypeptide 1)	- am Aufbau von Zilien beteiligt - als Motorprotein bewirkt Dynein die Bewegung der Zilien	0,16	0,16	0,27
DNAI1 (dynein, axonemal, intermediate polypeptide 1)		0,31	0,33	0,36
DNAI2 (dynein, axonemal, intermediate polypeptide 2)		0,11	0,12	0,18
DNAH9 (dynein, axonemal, heavy polypeptide 9)		0,28	0,29	0,35

Tabelle 31: Gene des Mikrotubulizytoskeletts, die in den Tumorsubtypen Veränderungen in der Genexpression aufwiesen. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Auch bei den Intermediärfilamenten konnten wir mittels Oligonukleotid- Array Dysregulation nachweisen. Vor allem bei den Keratinen kam es zu einer veränderten Expression. So konnte im kleinzelligen Lungenkarzinom bei drei Keratingenen (KRT5, KRT15 und KRT19) eine verminderte Expression mit einem „Fold Change“ kleiner 0,3 gezeigt werden. Beim Adenokarzinom wurden zwei Keratingene (KRT5 und KRT15) mit einem „Fold Change“ kleiner 0,06 niedrig exprimiert. Im Gegensatz dazu konnte mit einem „Fold Change“ von 5,11 eine Überexpression von KRT7 beobachtet werden (Tabelle 32).

Gene des Zytoskeletts	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
LMNB1 (lamin B1)	- als Intermediärfilament Hauptkomponente der Kernlamina (Vergnes L. et al, 2004)	1,19	1,47	2,25
KRT5 (keratin5)	- Intermediärfilament, erstrecken sich im inneren von Epithelzellen und bieten mechanischen Halt - an Desmosomen beteiligt - begrenzen Kanäle und spezifische Drüsen	0,05	1,42	0,24
KRT7 (keratin7)		5,11	0,44	0,81
KRT15 (keratin15)		0,06	0,66	0,11
KRT19 (keratin19)		0,44	0,27	0,29

Tabelle 32: Gene der Intermediärfilamente, die in den Tumorsubtypen Veränderungen in der Genexpression aufwiesen. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Die Interaktion zwischen Tumorzellen und umgebender extrazellulärer Matrix wird als ein Schlüsselereignis der Metastasierung angesehen. Dieser Vorgang fördert bzw. ermöglicht die Invasion von Tumorzellen in Sekundärgewebe. So konnten auch wir im Rahmen dieser Arbeit auf Genexpressionsebene mehrere veränderte Gene, deren Produkte Bestandteile der extrazellulären Matrix sind, aufzeigen. Auffällig war, dass COL1A1 bei allen drei Tumorsubtypen im Vergleich zum Nichttumor vermehrt exprimiert wurde. Kollagene stellen die zahlreichsten und bedeutendsten fibrillären Proteine der extrazellulären Matrix dar und spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur (Pöschl E. et al, 2003). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Kollagen in malignen Zellen verändert exprimiert wird (Sengupta P. et al, 2005; Fischer H. et al, 2001).

Zusammenfassend kann bei allen drei Tumorsubtypen eine dysregulierte Expression der Zytoskelett- assoziierten Gene sowie eine veränderte Expression der Gene der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. Beides begünstigt die Invasion sowie eine gesteigerte Zellmotilität der Tumorzellen, was Voraussetzungen für eine Metastasierung sind.

3.2.2.6. Metabolismus

Die Malignität der Tumorzellen ist nicht nur durch Änderungen morphologischer Eigenschaften sondern auch durch Änderungen biochemischer Eigenschaften gekennzeichnet. Mittels Oligonukleotid- Arrays konnten differentiell exprimierte Gene, die im Glukosemetabolismus involviert sind, nachgewiesen werden. So wurde beim Adenokarzinom mit einem „Fold Change“ von 3,70 eine erhöhte Expression von FBP1 (Fructose-1,6-bisphosphatase 1) gezeigt. Im Plattenepithelkarzinom wurde mit einem „Fold Change“ größer 2 eine Überexpression von PGK1 (Phosphoglycerat- kinase 1) und ENO1 (Enolase 1) vorgefunden. Dies spricht für eine hohe aerobe Glykolyse sowie für eine gesteigerte Nährstoffaufnahme in der Tumorzelle.

Des Weiteren konnten mehrere Gene, die im Metabolismus endogener Substrate, Umweltschadstoffe, kanzerogener Stoffe und einer Vielzahl von Arzneistoffen d.h. im Xenobiotikastoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, mit einer Unterexpression identifiziert werden (Tabelle 33).

Gene des Xenobiotikastoffwechsels	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
ADH7 (alcohol dehydrogenase 7)	- involviert in Fettsäuremetabolismus, Gallensäurebiosynthese, Tyrosinmetabolismus, Glycerolipidmetabolismus, Xenobiotikametabolismus	0,15	0,47	0,26
ADH1B (alcohol dehydrogenase IB)		0,29	0,19	0,21
ADH1C (alcohol dehydrogenase IC)		0,13	0,13	0,12
ALDH1A3 (aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3)	- involviert in Fettsäuremetabolismus, Gallensäurebiosynthese, Tyrosin-, Arginin-, Prolin-, Histidin-, Phenylalanin-, Tryptophan- und beta- Alaninmetabolismus, Xenobiotikametabolismus sowie im Pyruvatmetabolismus	0,59	0,36	0,55
ALDH3A1 (aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA1)		0,05	0,18	0,10
ALDH3A2 (aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA2)		0,45	0,84	0,46
CYP2F1 (cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1)	- involviert im Abbau von Xenobiotika	0,36	0,38	0,40
CYP2B6 (cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6)		0,34	0,14	0,23
CYP2C18 (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18)		0,59	0,91	0,49
AKR1C3 (aldo-keto reductase family 1, member C3)		0,33	0,88	0,19
GSTA3 (glutathion S- transferase 3)	- involviert im Xenobiotika- und Glutathionmetabolismus	0,26	0,27	0,29
EPHX1 (epoxide hydrolase 1)	- involviert im Xenobiotika- und Tetrachlorethenmetabolismus	0,72	0,65	0,48

Tabelle 33: Differentiell exprimierte Gene, die im Xenobiotikastoffwechsel involviert sind. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Es wurden mehrere Studien zu genetischen Polymorphismen in Enzymen von Karzinogen- metabolisierenden Stoffwechselwegen durchgeführt, insbesondere innerhalb des Cytochrom P450- Systems (CYP), welche für die Metabolisierung von Tabak-Karzinogenen und deren Ausscheidung verantwortlich sind. Polymorphismen innerhalb dieser Gene wurden mit unterschiedlichen Graden der metabolischen Kapazität und mit einem erhöhten Lungenkrebs- Risiko assoziiert (Shaw GL. et al, 1995; Shaw GL. et al, 1998). Zusätzlich zu diesen Enzymen, welche kanzerogene Zwischenprodukte bilden können, beeinflussen auch Enzyme, die an der Entgiftung und beschleunigten Ausscheidung toxischer Metaboliten beteiligt sind, das Lungenkrebs- Risiko (Ford JG. et al, 2000; Townsend D. et al, 2003). So konnte 1996 die Arbeitsgruppe um To et al, zeigen, dass die fehlende oder reduzierte Aktivität der Gluthation- S- Transferase (Isoform M1) mit einer erhöhten Suszeptibilität für die Entstehung eines Lungenkarzinoms korreliert (To-Figueras J. et al, 1996). Da alle mittels Oligonukleotid-Arrays identifizierte Gene des Xenobiotikastoffwechsel unterexprimiert sind, kann dies als Hinweis auf eine reduzierte Entgiftung und verminderte Ausscheidung giftiger Metabolite angesehen werden.

Zusammenfassend kann bei allen drei Tumorsubtypen im Vergleich zum Nichttumor eine Dysregulation von Genen, die in verschiedenen tumorbegünstigenden Stoffwechselwegen involviert sind, gezeigt werden.

3.2.2.7. Immunsystem

Damit Tumorzellen metastasieren können, müssen sie neben veränderten morphologischen und biochemischen Eigenschaften auch dafür sorgen, dass sie einer Immunreaktion entgehen. Deshalb war auch eine regulatorische Verschiebung von Genen, die eine Rolle im Immunsystem spielen, zu erwarten (Tabelle 34). Im Rahmen unserer Studie konnte beim Adenokarzinom eine deutlich vermehrte Expression von C1QB, dessen Genprodukt die Erkennungseinheit des klassischen Weges des Komplementsystems bildet, nachgewiesen werden. Dem gegenüber steht der alternative Weg des Komplementsystems, welcher der unspezifischen humoralen Abwehr zuzuordnen ist. Gene des alternativen Weges wurden im kleinzelligen Lungenkarzinom vermindert exprimiert (Tabelle 34). In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Lungentumore verschiedene Komponente des Komplementsystems exprimieren und diese Expression mit einer verminderten Reaktivität des Immunsystems gegen den Tumor einhergeht (Ajona D. et al, 2004; Oner F. et al, 2004).

Gene des Immunsystems	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
C1QB (complement component 1, q subcomponent, beta polypeptid)	- involviert im klassischen Weg des Komplementsystems	3,80	1,49	1,20
C3 (complement component 3)	- involviert im alternativen Weg des Komplementsystems	1,66	0,45	0,30
C6 (complement component 6)		0,49	0,46	0,46
DF (D component of complement)		0,99	0,62	0,41
HF1 (complement factor H)		0,83	0,44	0,33
CLU (clusterin ;complement lysis inhibitor)		0,27	0,27	0,26
CXCL1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1)	- involviert in der Zytokin-Zytokin- Rezeptor-Interaktion	0,36	0,27	0,36
CXCL6 (chemokine (C-X-C motif) ligand 6)		0,32	0,29	0,54
CXCL14 (chemokine (C-X-C motif) ligand 14)		0,46	3,57	0,29
CX3CL1 (chemokine (C-X3-C motif) ligand 1)		0,61	0,80	0,49
CCL11 (chemokine (C-C motif) ligand 11)		0,56	0,50	0,54
CCL15 (chemokine (C-C motif) ligand 15)		0,26	0,22	0,27
CCL19 (chemokine (C-C motif) ligand 19)		0,50	0,67	0,35
IL17RB (interleukin 17 receptor B)		1,30	1,00	2,70
IL20RA (interleukin 20 receptor, alpha)		0,49	0,64	0,51
IFNGR2 (interferon gamma receptor 2)		2,10	1,69	1,36
TNFRSF12A (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A)		2,11	1,46	1,23
HLA- E (major histocompatibility complex, class I, E)	- involviert in der Antigenprozessierung und der Antigenpräsentation	0,84	0,59	0,47
RAGE (Renal Tumor Antigen)	- Tumorantigen, dass von T- Zellen erkannt wird	0,33	0,60	0,64
PSCA (prostate stem cell antigen)	- als Antigen in Tumoren exprimiert	0,30	0,20	0,26

Tabelle 34: Differentiell exprimierte Gene, die im Immunsystem involviert sind. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Es ist bekannt, dass das Mikromilieu des Tumors hinsichtlich der Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen für die Tumorummunabwehr gleichermaßen von Bedeutung ist, da es den Zugang und den funktionellen Kontakt zwischen T- Zellen und Tumorzellen entscheidend beeinflusst. Die für die Immunabwehr verantwortlichen T- Zellen erkennen Antigene nur nach deren Spaltung in Peptide. Diese

Peptide binden an Haupthistokompatibilitätsmoleküle (MHC) der Klasse I und II und werden dadurch an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von T- Zellen entdeckt werden können. Tumoren scheinen jedoch häufig diese Erkennungsmechanismen abzuschalten, wodurch sie sich der Immunabwehr entziehen können. Auch im Rahmen dieser Studie konnte beim kleinzelligen Lungenkarzinom eine verminderte Expression von HLA- E, einem Haupthistokompatibilitätsmoleküle der Klasse I gezeigt werden (Tabelle 34). Des Weiteren kann die Tumorzelle sich durch eine Modulation der Tumor- assoziierten Antigene dem Angriff der Effektorzellen entziehen. Durch eine Herunterregulierung der Tumorantigene, verhindert die Tumorzelle, dass sie von Antikörpern erkannt wird. So konnte im Adenokarzinom eine deutlich herabgesetzte Expression von RAGE (Renal Tumor Antigen), im Plattenepithelkarzinom und im kleinzelligen Lungenkarzinom von PSCA („Prostate stem cell antigen“) gezeigt werden.

Zusammenfassend können differentiell exprimierte Gene in den untersuchten Tumorsubtypen identifiziert werden, die eine wesentliche Rolle im Komplementsystem spielen und einhergehen mit einer verminderten Antitumor- Reaktivität des Immunsystems. Des Weiteren konnten differentiell exprimierte Gene gezeigt werden, die in der Prozessierung und Präsentation von Antigenen und damit in der Tumorerkennung involviert sind.

3.2.3. Weitere differentiell exprimierte Gene

Für einige Gene konnte gezeigt werden, dass sie spezifisch in einem Tumorsubtyp exprimiert werden. So wurde im Adenokarzinom eine Dysregulation von Surfactant aufgezeigt. Die Surfactant- Proteine A, B, C und D werden in der Lunge exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase des pulmonalen Surfactants. Das Surfactant- Protein A trägt quantitativ den größten Anteil der Gesamtmenge der Surfactantproteine bei. Bisher konnte in primären Adenokarzinomen in 46 bis 62% der Fälle Surfactant nachgewiesen werden (Zamecnik J. et al, 2002). Die bisherigen Erkenntnisse korrelieren auch mit unserem Ergebnis. So zeigte bei den Adenokarzinomen insbesondere Surfactant B eine signifikant vermehrte Expression bei einem „Fold Change“ von 77,7 (Tabelle 35). Aber auch Surfactant A2, C und D waren, zwar nicht signifikant, doch aber in der Mehrzahl der untersuchten Adenokarzinomen überexprimiert (Surfactant A2 mit einem „Fold Change“ von 10,52; Surfactant C mit einem „Fold Change“ von 9,22 und Surfactant D mit einem „Fold Change“ von 4,90). Beim Plattenepithelkarzinom wurden vor allem Strukturproteine wie Kollagen überexprimiert. Des Weiteren war auffällig, dass TFF1 und TFF3, Gene, die in verschiedenen Schutzmechanismen der Mukosa involviert sind, deutlich vermindert exprimiert wurden. Bei dem kleinzelligen Lungenkarzinom wurde der neuroendokrine Ursprung deutlich, so konnte mittels Oligonukleotid- Arrays eine hohe Expression einer Vielzahl von neuroendokrinen Markern aufgezeigt werden (Tabelle 35).

Gene	Funktion	Fold Change A vs N	Fold Change P vs N	Fold Change K vs N
SFTB (surfactant, pulmonary-associated protein B)	- essential für die Surfactant- Auskleidung der Alveolen (Ewis AA. et al, 2006)	77,73	1,69	1,43
TFF1 (trefoil factor 1)	- involviert in der Aufrechterhaltung und Reparatur der Mukosa - bei Mangel tritt Defekt in der mukosalen Barriere auf	0,94	0,27	0,23
TFF3 (trefoil factor 3)		0,22	0,06	0,07
COL1A1 (collagen, type I, alpha 1)	- bilden die Hauptformen des fibrillären Kollagens - vorkommend in Sehnen, Knochen, Faserknorpel und lockerem Bindegewebe - viele Mutationen nachgewiesen → Mutationen führen zur Aufhebung der Zellanordnung im Gewebe (Sengupta P. et al, 2005; Malone JP. et al, 2005)	7,98	3,24	2,39
COL11A1 (collagen, type II, alpha 1)	- bildet Fibrillen und ist Strukturprotein im Knorpel und der extrazellulären Matrix (Fischer H, Stenling R. et al, 2001; Fischer H, Salahshor S. et al, 2001)	4,46	7,94	1,54
PCP4 (Purkinje cell protein 4)	- zeigt Neuron- spezifische Expression	1,72	0,89	13,98
SGNE1 (secretory granule, neuroendocrine protein 1)	- exprimiert in neuroendokrinen Zellen	1,73	1,28	7,81
INA (internexin neuronal intermediate filament protein, alpha)	- als Neurofilament Bestandteil eines filamentösen Netzwerks um den Zellkern	0,95	1,13	6,05
SYT1 (synaptotagmin1)	- ist als synaptisches Vesikelprotein involviert in der Neurotransmitterabgabe	1,05	2,32	5,34
SNAP25 (synaptosomal-associated protein, 25kDa)	- als präsynaptisches Plasmamembranprotein in der Neurotransmitterabgabe involviert	1,08	1,09	2,86

Tabelle 35: Differenziell exprimierte Tumorsubtyp- spezifische Gene. Abkürzung und Farbkodierung siehe Tabelle 23.

Zusammenfassend konnten mittels Oligonukleotid- Arrays in den Tumorsubtypen im Vergleich zum Nichttumor differenziell exprimierte Gene, die bereits als spezifisch für den jeweiligen Tumorsubtyp beschrieben wurden, identifiziert werden.

3.3. Bestätigung der identifizierten Gene mittels quantitativer

„Real Time“- PCR

Um die ermittelten Genexpressionsdaten mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden Gene in je 3 Proben der jeweiligen Tumorsubtypen (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und kleinzelliges Lungenkarzinom) mit Hilfe der quantitativen „Real Time“- PCR unter Verwendung der Taqman- Technologie hinsichtlich der

Expression ihrer mRNA untersucht, mit je 3 mitgeführten Nichttumorproben verglichen und die PCR-Produkte zur qualitativen Kontrolle im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenzgen für die Quantifizierungsanalysen wurde RPS11 ausgewählt, weil die Expression des Gens zwischen den untersuchten Tumor- und Normalgeweben am wenigsten variierte. Konventionelle „Housekeeping“-Gene wie z.B. ACTB (Actin, beta) und GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) kamen als Referenzgen nicht in Betracht, da sie in dieser Studie zwischen normalem und neoplastischem Gewebe differentiell exprimiert waren.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Oligonukleotid-Arrays konnten Unterschiede in der Genexpression mit der „Real Time“-PCR nachgewiesen werden, welche an zwei Beispielen (Abbildung 24 und 25) aufgezeigt werden soll.

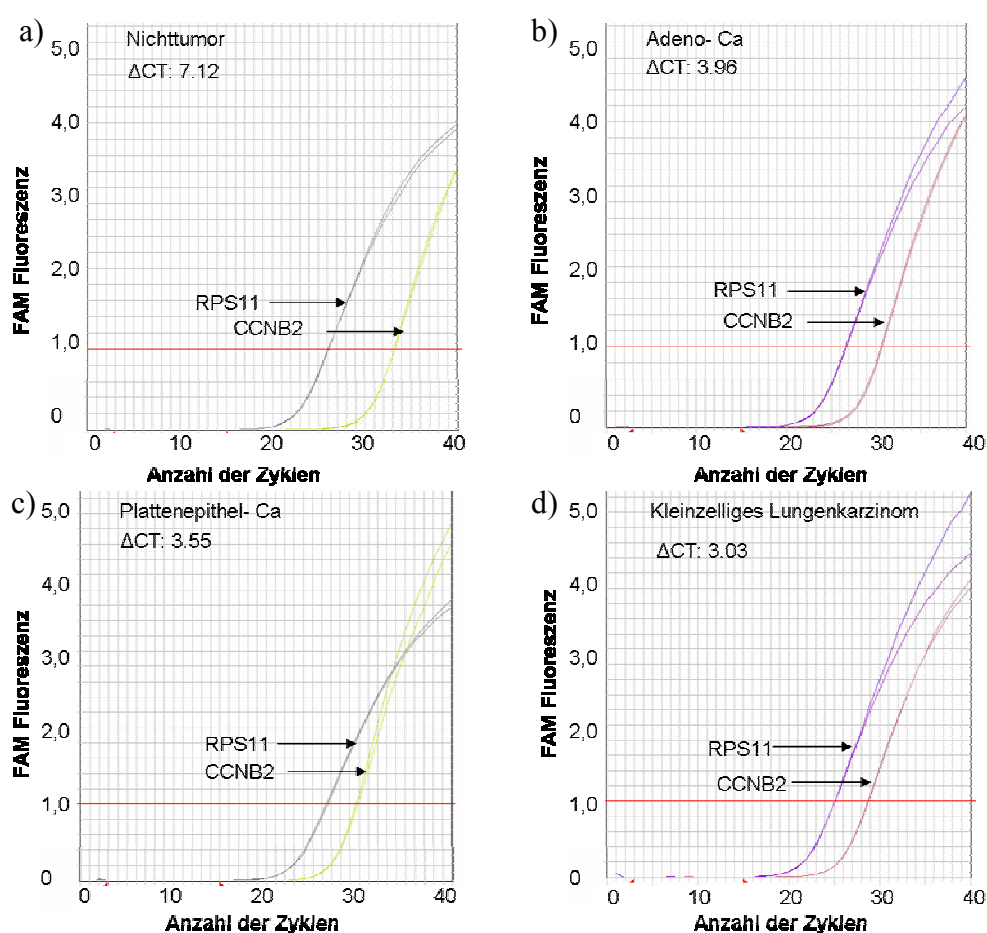


Abbildung 24: Änderungen in der Genexpression, ermittelt durch quantitative „Real Time“-PCR unter Verwendung der Taqman-Technologie. Dargestellt sind die „Real Time“-PCR-Kurven des untersuchten Gens CCNB2 und des Referenzgenes RPS11 (a) Nichttumor, b) Adenokarzinom, c) Plattenepithelkarzinom und d) kleinzelliges Lungenkarzinom). Der Unterschied zwischen CCNB2 und RPS11 ist als ΔC_t -Wert angegeben. Je kleiner der ΔC_t -Wert ist, desto größer ist die relative Expression der mRNA von CCNB2.

Anhand dieser „Real Time“-PCR-Kurven war zu erkennen, dass CCNB2 in allen drei Tumorsubtypen im Vergleich zum Nichttumor höher exprimiert wurde. Am höchsten konnte es im kleinzelligen Lungenkarzinom nachgewiesen werden.

Auch für COL1A1 konnte bei allen drei Tumorsubtypen eine erhöhte Expression nachgewiesen werden (Abbildung 25). Auch bei diesem Gen war die relative Expression der mRNA beim kleinzelligen Lungenkarzinom am höchsten.

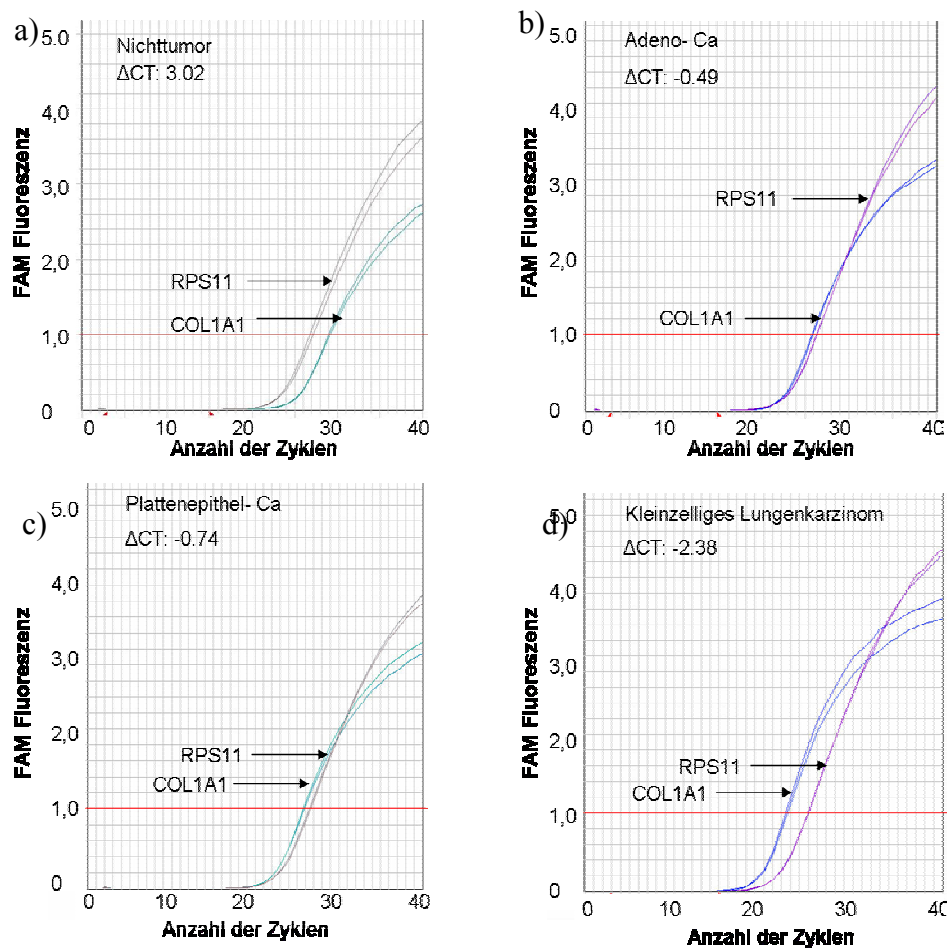


Abbildung 25: Ein weiteres Beispiel für eine veränderte Genexpression, ermittelt durch quantitative „Real Time“-PCR unter Verwendung der Taqman-Technologie. Dargestellt sind die „Real Time“-PCR-Kurven des untersuchten Genes COL1A1 und des Referenzgenes RPS11 (a) Nichttumor, b) Adenokarzinom, c) Plattenepithelkarzinom und d) kleinzelliges Lungenkarzinom). Der Unterschied zwischen COL1A1 und RPS11 ist als ΔCt -Wert angegeben. Je kleiner der ΔCt -Wert ist, desto größer ist die relative Expression der mRNA von COL1A1.

Um die Qualität der „Real Time“-PCR zu beurteilen und um nachzuweisen, dass ein PCR-Produkt gebildet wurde, erfolgte eine Elektrophorese der PCR-Produkte auf einem 1%igen Agarosegel. In Abbildung 26 ist ein Beispiel für im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte dargestellt. Zu erkennen war jeweils nur eine Bande pro Probe, was aus der Bildung eines PCR-Produkts resultierte.

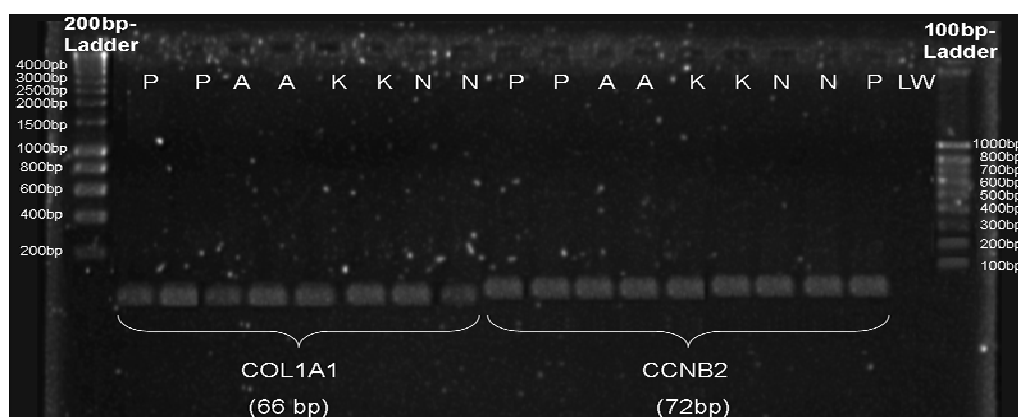


Abbildung 26: Darstellung eines 1%igen Agarosegels. Im Gel erfolgte der Nachweis von COL1A1 (Fragmentlänge 66bp) und CCNB2 (Fragmentlänge 72bp). Während der Elektrophorese wurden stets zwei Größenmarker (200bp-Ladder und 100bp-Ladder) mitgenommen. Nach der Elektrophorese erfolgte die Färbung der Banden im Ethidiumbromidbad. Die Auswertung und Dokumentation wurde am Image-System durchgeführt. A = Adenokarzinom, P = Plattenepithelkarzinom, K = kleinzelliges Lungenkarzinom, N = Nichttumor und LW = Leerwert.

Zum direkten Vergleich der Ergebnisse erfolgte eine Darstellung der Genexpressionsdaten der Oligonukleotid- Arrays und der Ergebnisse der „Real Time“-PCR in einem Diagramm (Abbildung 27, 28 und 29). Insgesamt wurden beim Adenokarzinom 16 Gene, beim Plattenepithelkarzinom 14 Gene und beim kleinzelligen Lungenkarzinom 12 Gene untersucht.

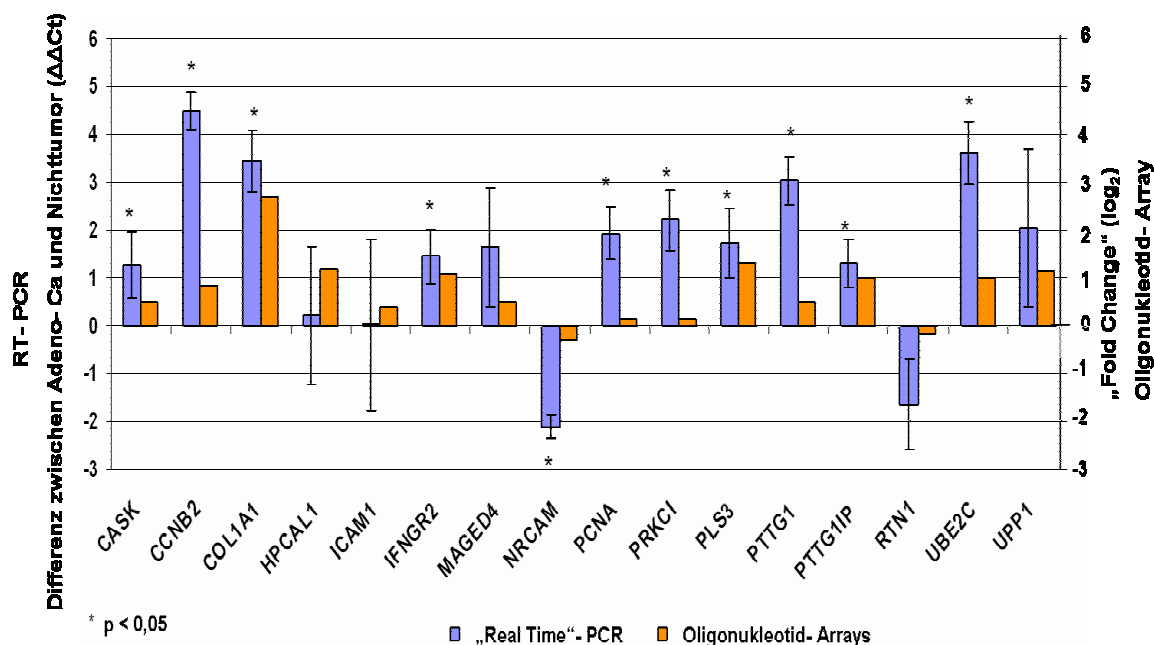


Abbildung 27: Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der mittels quantitativer „Real Time“-PCR verifizierten Gene für Adenokarzinom versus Nichttumor. Ein $\Delta\Delta C_t$ -Wert von 1 entspricht einem „Fold Change“ von 2.

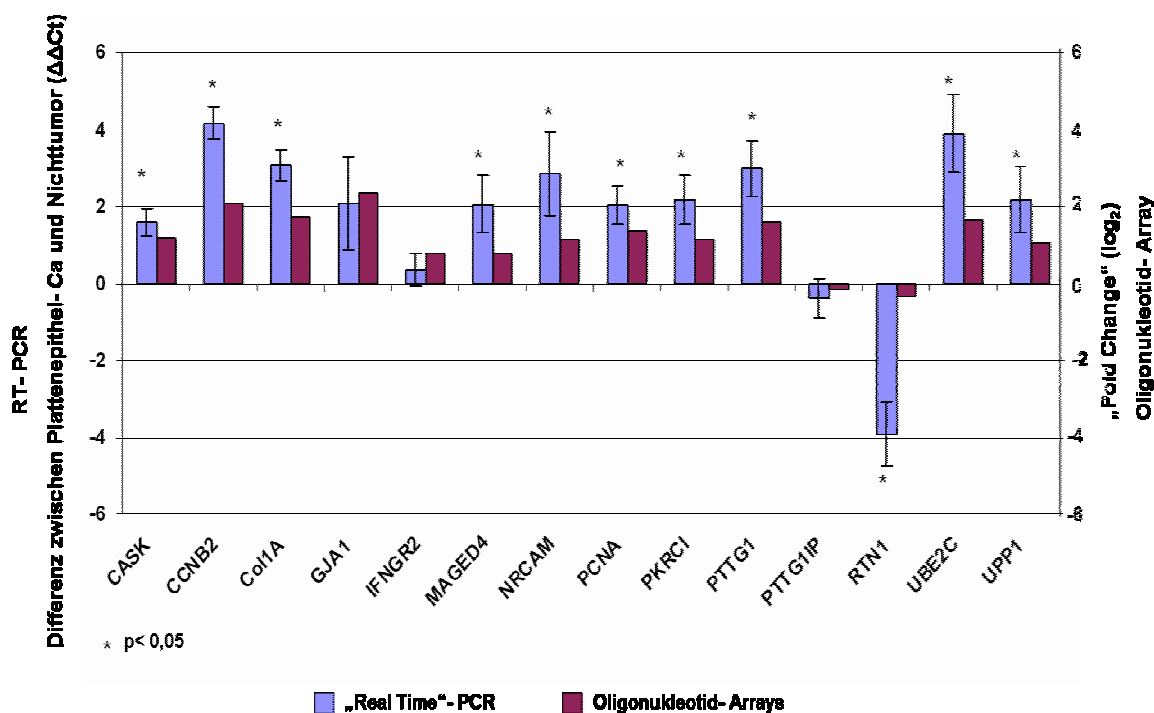


Abbildung 28: Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der mittels quantitativer „Real Time“-PCR verifizierten Gene für das Plattenepithelkarzinom versus Nichttumor.

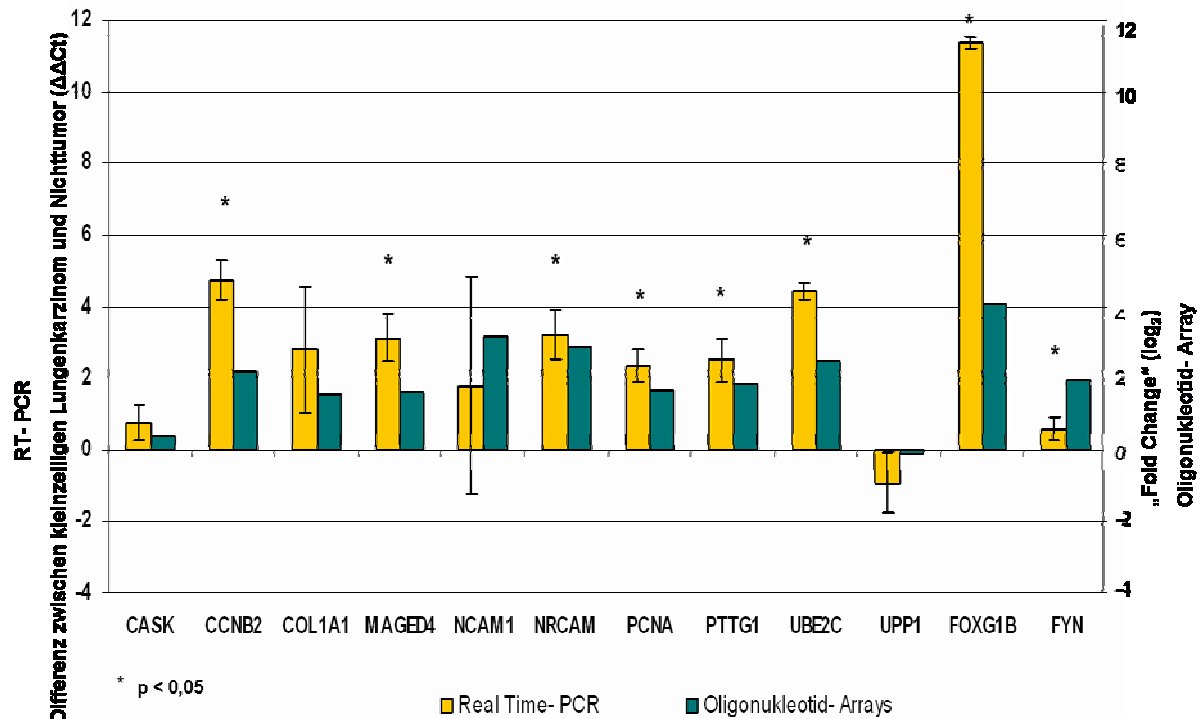


Abbildung 29: Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der mittels quantitativer „Real Time“- PCR verifizierten Gene für das kleinzellige Lungenkarzinom versus Nichttumor.

Generell konnten die Ergebnisse der Oligonukleotid- Arrays mittels „Real Time“- PCR bestätigt werden. Da nur in sehr begrenzten Mengen RNA zur Verfügung stand, konnten einige Gene aufgrund des geringen Probenmaterials nicht ein drittes Mal wiederholt werden und sind somit in der „Real Time“- PCR nicht signifikant.

3.4. Probenabgrenzung mittels Genetischer Programmierung

Mit dem Ziel, Gene zu identifizieren, mit deren Hilfe eine Unterscheidung der Tumorsubtypen sowie eine Abgrenzung zum Nichttumor durchgeführt werden kann, erfolgte eine Datenanalyse unter Verwendung der Genetischen Programmierung. Als Datenbasis zur Erstellung eines Klassifikators diente eine mittels Oligonukleotid- Arrays ermittelten Datenmenge bestehend aus einem Trainingsset von 34 Proben (10 Adenokarzinome, 10 Plattenepithelkarzinome, 9 kleinzellige Lungenkarzinome und 5 Nichttumorproben) und einem Testset von 16 Proben (13 progrediente und 3 primäre Lungenkarzinome). Es konnte mit dieser Methode ein Klassifikator aus insgesamt 1020 Genen generiert werden. Um die Datenmenge einzuschränken wurden die 10 Gene mit der höchsten Frequenz von jeder analysierten Klasse (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom und Nichttumor) für die Generierung eines endgültigen Klassifikators, bestehend aus 40 Genen ausgewählt (Tabelle 36). Zur Validierung erfolgte die Klassifikation des Testsets. Alle Proben des Testsets wurden mit Hilfe der 40 Gene korrekt klassifiziert und dem jeweiligen Tumorsubtyp zugeordnet.

Probe	Gensymbol	Genname	Chromosomale Lokalisation
A- Gen1	SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	4q22-q24
A- Gen2	KRT7	keratin 7	12q12-q13
A- Gen3	KRT5	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	12q12-q13
A- Gen4	EFS	embryonal Fyn-associated substrate	14q11.2-q12
A- Gen5	GPCR5A	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	12p13-p12.3
A- Gen6	FGG	fibrinogen, gamma polypeptide	4q28
A- Gen7	SEMA3F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F	3p21.3
A- Gen8	CLCA2	chloride channel, calcium activated, family member 2	1p31-p22
A- Gen9	SERPINA1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	14q32.1
A-Gen10	PTPRZ1	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	7q31.3
P- Gen1	RAB40B	RAB40B, member RAS oncogene family	17q25.3
P- Gen2	KIF13B	kinesin family member 13B	8p12
P- Gen3	RAB17	RAB17, member RAS oncogene family	2q37.3
P- Gen4	GOLPH2	golgi phosphoprotein 2	9q21.33
P- Gen5	ATP2B1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	12q21.3
P- Gen6	CHST2	carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2	3q24/7q31
P- Gen7	SCNN1A	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	12p13
P- Gen8	DGKA	diacylglycerol kinase, alpha 80kDa	12q13.3
P- Gen9	ADCY3	adenylate cyclase 3	2p24-p22
P- Gen10	CASK	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	Xp11.4
K- Gen1	POU4F1	POU domain, class 4, transcription factor 1	13q21.1-q22
K- Gen2	ID4	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	6p22-p21
K- Gen3	CELSR3	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog, Drosophila)	3p24.1-p21.2
K- Gen4	CTSH	cathepsin H	15q24-q25
K- Gen5	FANCA	Fanconi anemia, complementation group A /// Fanconi anemia, complementation group A	16q24.3
K- Gen6	ISL1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-1)	5q11.2
K- Gen7	MGC13024	hypothetical protein MGC13024	16p11.2
K- Gen8	ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	17q11.2-q12/17q21.1
K- Gen9	DLK1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	14q32
K- Gen10	XYLT2	xylosyltransferase II	17q21.3-17q22
NT-Gen1	LRRC6	leucine rich repeat containing 6	8q24.22
NT-Gen2	RTDR1	rhabdoid tumor deletion region gene 1	22q11.2
NT-Gen3	ANKMY1	ankyrin repeat and MYND domain containing 1	2q37.3
NT-Gen4	VNN3	vanin 3	6q23-q24
NT-Gen5	C18orf43	chromosome 18 open reading frame 43	18p11.21
NT-Gen6	GSTA3	glutathione S-transferase A3	6p12.1
NT-Gen7	NKX3-1	NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)	8p21
NT-Gen8	MIPEP	mitochondrial intermediate peptidase	13q12
NT-Gen9	ALOX15	arachidonate 15-lipoxygenase	17p13.3
NT-Gen10	DNAI1	dynein, axonemal, intermediate polypeptide 1	9p21-p13

Tabelle 36: Die 40 Gene, des Klassifikators. A = Adenokarzinom, P = Plattenepithelkarzinom, K = kleinzelliges Lungenkarzinom, NT = Nichttumor.

3.5. Differentiell exprimierte Gene im progredienten oder rezidivierenden Lungenkarzinom

Zur Untersuchung der Genexpressionsprofile progredienter oder rezidivierender Lungenkarzinome wurden ebenfalls Human Genome Focus Oligonukleotid- Arrays von Affymetrix für weitere 23 Proben (15 fortschreitende oder rezidivierende Adenokarzinome und 8 fortschreitende oder rezidivierende Plattenepithelkarzinome) verwendet und anschließend wie bei den primären Lungenkarzinomen die Daten mittels „variance stabilizing transformation“ normalisiert. Zur Identifizierung der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene erfolgte der Vergleich der primären nichtkleinzelligen Lungenkarzinome mit den fortschreitenden oder rezidivierenden NSCLC, im Folgenden als progredientes Lungenkarzinom bezeichnet, mittels „significance analysis of microarrays“ (SAM), getrennt nach histologischem Subtyp.

Die Ergebnisse der analysierten 8793 Gene der progredienten Adenokarzinome bzw. Plattenepithelkarzinome im Vergleich zum jeweiligen Primärtumor werden als Scatter Plot in Abbildung 30 gezeigt. Dargestellt wurde die mittlere Expression der Gene in den primären Tumorproben gegen die mittlere Expression der Gene in den progredienten Tumorproben. Aus den Scatter Plots geht hervor, dass bei dieser Auswertung deutlich weniger Gene Veränderungen auf Expressionsebene zeigten, als bei dem Vergleich der einzelnen Tumorsubtypen mit den Nichttumorproben (Abbildung 17), was darauf zurückzuführen ist, dass bei letzterem ein Vergleich des gleichen Tumorsubtyps zugrunde lag und die zu vergleichenden Gruppen lediglich Unterschiede im Tumorstadium zeigten. Dennoch konnten mittels Oligonukleotid- Arrays signifikant unterschiedlich exprimierte Gene in den progredienten Tumoren im Vergleich zu den Primärtumoren identifiziert werden.

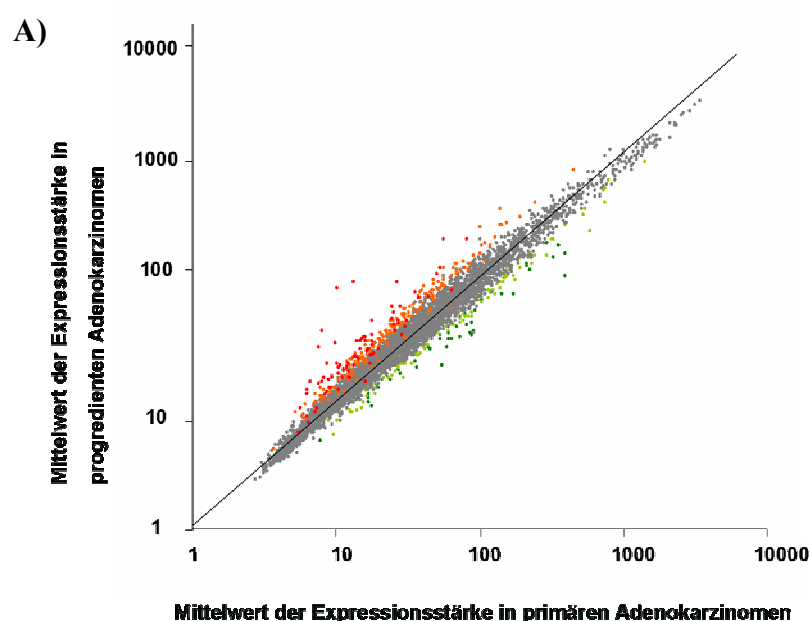


Abbildung 30A: Scatter Plot als graphische Darstellung der Expressionswerte aller 8793 Gene. Die Abbildung zeigt das Ergebnis des Vergleichs primäres Adenokarzinom versus progredientes Adenokarzinom. Farbkodierung siehe Abbildung 17.

B)

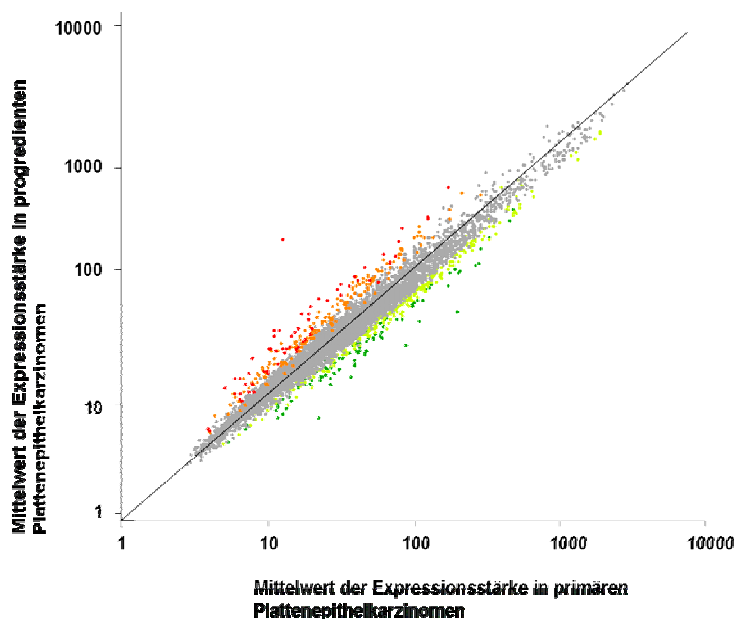


Abbildung 30B: Abbildung B zeigt das Ergebnis des Vergleichs primäres Plattenepithelkarzinom versus progredientes Plattenepithelkarzinom. Farbkodierung siehe Abbildung 17.

Alle Gene, die in den progredienten Tumorsubtypen im Vergleich zum Primärtumor einen q-Value kleiner 5% hatten und damit signifikant waren, sowie einen „Fold Change“ größer 1,5 aufwiesen bzw. einen „Fold Change“ kleiner 0,54 (Faktor 1,5) aufwiesen, wurden selektiert. Von den 8793 analysierten Genen konnten so insgesamt 239 signifikante Gene identifiziert werden, von denen 115 Gene dem progredienten Adenokarzinom (113 Gene überexprimiert, 2 Gene unterexprimiert) und 124 Gene dem progredienten Plattenepithelkarzinom (29 Gene überexprimiert, 95 Gene unterexprimiert) zugeteilt werden konnten (Abbildung 31).

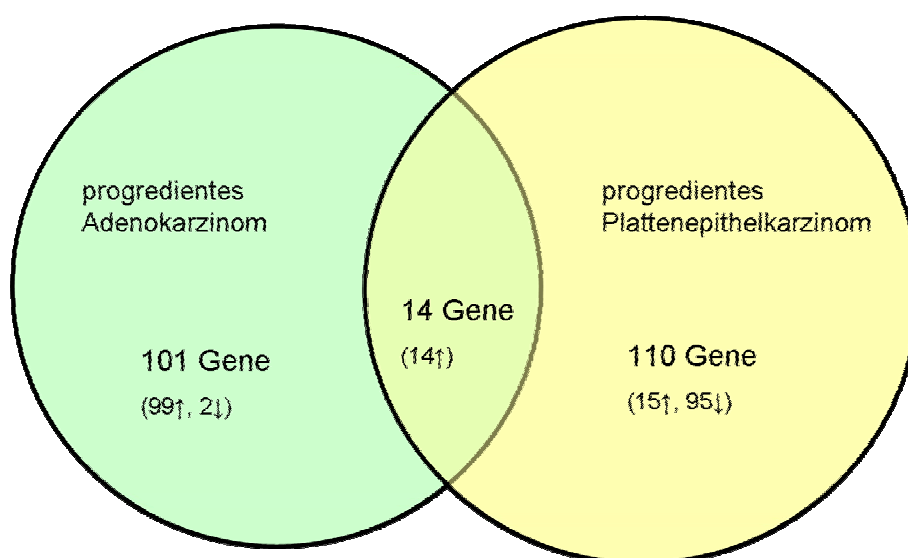


Abbildung 31: Aufteilung der 239 signifikanten Gene. ↑ um einen Faktor von 1,5 überexprimierte Gene, ↓ um einen Faktor von 1,5 unterexprimierte Gene

3.5.1. Hierarchische Clusteranalyse der progredienten Lungenkarzinome im Vergleich zu den Primärtumoren

Um das Ergebnis zu veranschaulichen, erfolgte eine hierarchische Clusteranalyse der signifikant differentiell exprimierten Gene des jeweiligen Tumorsubtypes unter Verwendung eines „unsupervised complete linkage clustering“ Algorithmus. Beim Adenokarzinom konnte im Dendrogramm keine klare Auftrennung der analysierten Gruppen aufgezeigt werden (Abbildung 32). Bei einer Trennhöhe von 0,55 erfolgte zunächst eine Aufteilung der Proben in zwei Gruppen. Jedoch konnten bei dieser Trennhöhe die Proben nicht eindeutig voneinander getrennt werden, so dass eine Gruppe sowohl primäre Adenokarzinomproben als auch progrediente Adenokarzinomproben enthielt. Bei einer Trennhöhe von 0,39 erfolgte eine weitere Unterteilung der letzteren Gruppe in die primären Adenokarzinome und der fortschreitenden oder rezidivierenden Adenokarzinome, so dass erst ab der zweiten Trennhöhe die zwei zu vergleichenden Tumorkollektive voneinander separiert wurden. Eine Probe der progredienten Adenokarzinome gruppierte in die Gruppe der primären Adenokarzinome und kann als Ausreißer angesehen werden.

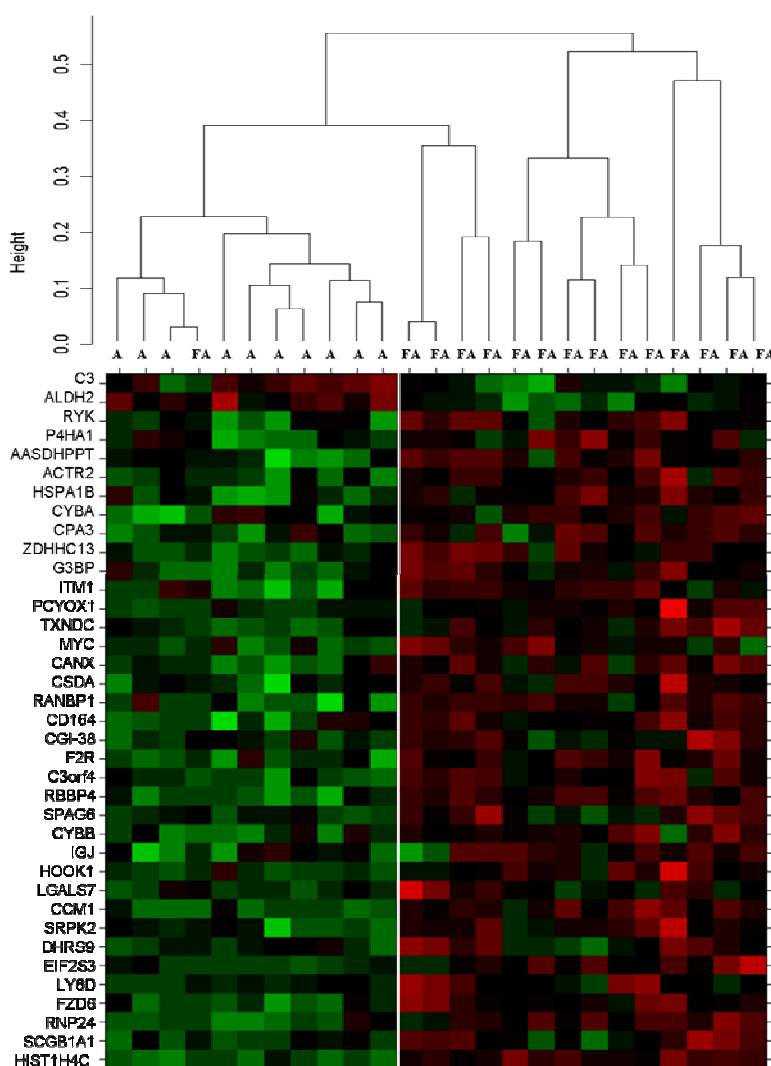
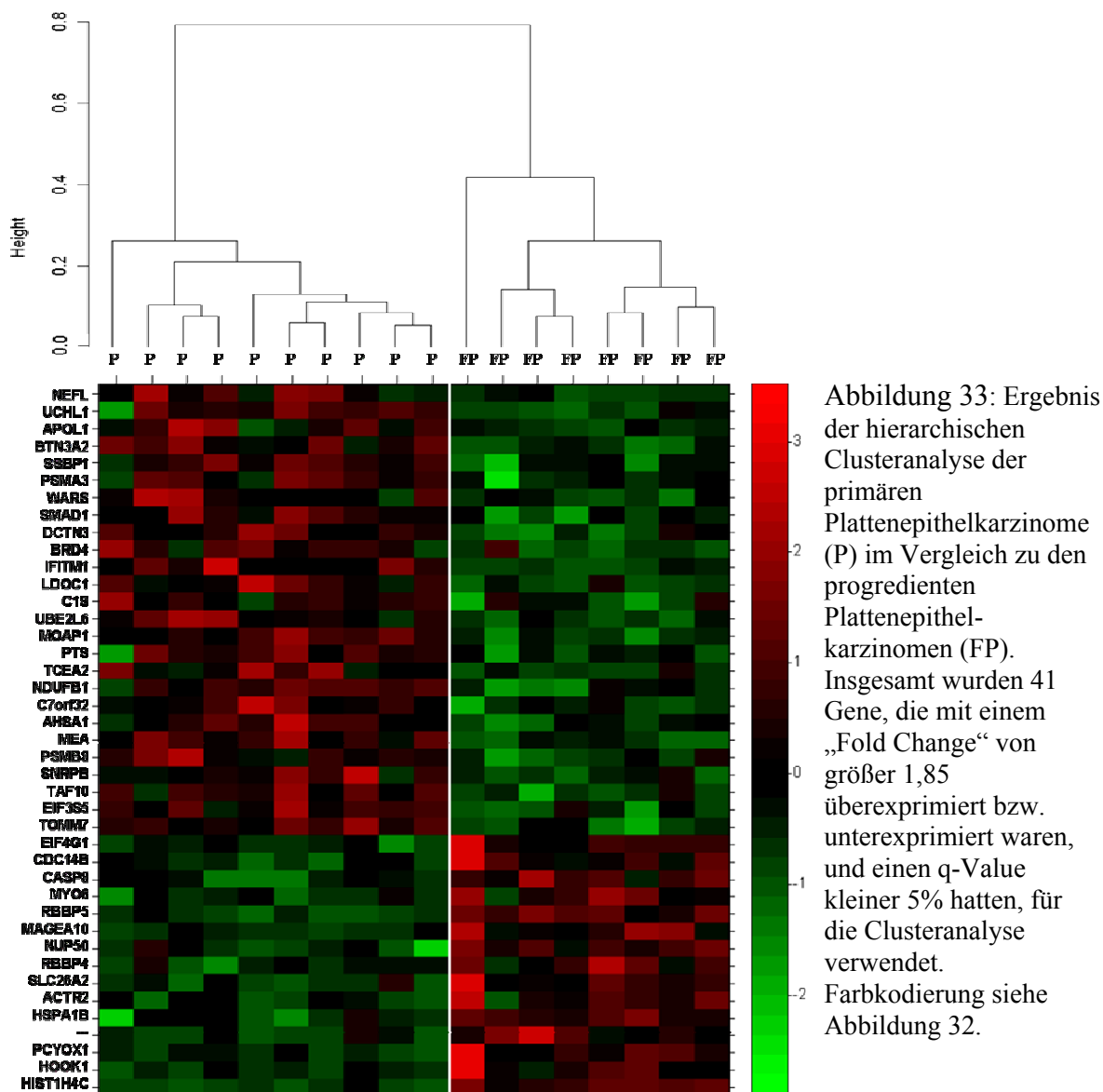


Abbildung 32: Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse der primären Adenokarzinome (A) im Vergleich zu den progredienten Adenokarzinomen (FA). Zur Darstellung wurden die Expressionswerte mit einer rot-grün-Skala farbkodiert. Rot dargestellt wurden die Gene, die im Bezug zum Mittelwert des Einzelgens überexprimiert und grün, die Gene die unterexprimiert wurden. Insgesamt wurden 37 Gene, die mit einem „Fold Change“ von größer 1,85 überexprimiert bzw. unterexprimiert waren, und einen q-Value kleiner 5% hatten, für die Clusteranalyse verwendet. Es wurden horizontal die Proben und vertikal die für die Erstellung des Clusters verwendeten Gene (mit Gensymbolen abgekürzt) aufgetragen.

Bei dem Vergleich der primären Plattenepithelkarzinomproben und den progredienten Plattenepithelkarzinomproben erfolgte eine klare Einteilung der Proben in zwei Gruppen, wobei die 10 primären Plattenepithelkarzinomproben in eine Gruppe und die 8 progredienten Proben in die zweite Gruppe zugeordnet wurden (Abbildung 33).



3.5.2. Einteilung der signifikanten Gene in funktionelle Gruppen

Die 239 signifikant differentiell exprimierten Gene des progredienten Lungenkarzinoms wurden zur detaillierten Auswertung anhand ihrer in der Literatur beschriebenen Funktion in folgende 16 funktionelle Gruppen eingeteilt und in Tabelle 37 zusammengefasst.

funktionelle Gruppen	Adenokarzinom	Plattenepithelkarzinom
Signaltransduktion	14 Gene ↑	5 Gene ↑ 3 Gene ↓
Proliferation	5 Gene ↑	3 Gene ↑ 6 Gene ↓
Ubiquitin- abhängige Proteolyse	1 Gen ↑	10 Gene ↓
Proteinfaltung	5 Gene ↑	1 Gen ↑ 4 Gene ↓
Chromosomenkondensation /- dekondensation	3 Gene ↑	1 Gen ↑ 1 Gen ↓
mRNA- Prozessierung / Splicing	9 Gene ↑	2 Gene ↑ 9 Gene ↓
Metabolismus	14 Gene ↑ 1 Gen ↓	3 Gene ↑ 26 Gene ↓
Immunsystem	3 Gene ↑ 1 Gen ↓	2 Gene ↓
Apoptose	2 Gene ↑	3 Gene ↑ 1 Gen ↓
Transkription	12 Gene ↑	2 Gene ↑ 10 Gene ↓
Transport	15 Gene ↑	3 Gene ↑ 4 Gene ↓
Entwicklung	2 Gene ↑	3 Gene ↓
Zytoskelett	4 Gene ↑	2 Gene ↑ 1 Gen ↓
Zelladhäsion	3 Gene ↑	-----
DNA- Reparatur	1 Gen ↑	
Funktion unklar	20 Gene ↑	4 Gene ↑ 15 Gene ↓

Tabelle 37: Zusammenfassung der Geneinteilung der differentiell exprimierten Gene des fortschreitenden oder rezidivierenden Lungenkarzinoms in funktionelle Gruppen.

In den Weiteren Abschnitten wurde auf 4 dieser funktionellen Gruppen genauer eingegangen.

3.5.2.1. Veränderungen im Wnt- Signalweg der progredienten

Lungenkarzinome

Mittels Oligonukleotid- Arrays wurden, in den fortschreitenden Lungenkarzinomen auf Expressionsebene veränderte Gene, die in verschiedenen Signalkaskaden involviert sind, identifiziert. So konnten im progredienten Adenokarzinom differentiell exprimierte Gene, die im Calcium-Signalwege involviert sind, wie z.B. CALM1 (Calmodulin1) mit einem „Fold Change“ größer 1,60 und S100A2 mit einem „Fold Change“ größer 4,71 gezeigt werden. Beim progredienten Plattenepithelkarzinom wurde mit einem „Fold Change“ von 1,65 eine Überexpression von Calcineurin, einem Gen, dessen Genprodukt sowohl im Calcium- Signalweg als auch im Wnt- Signalweg eine Rolle spielt, nachgewiesen. Aber vor

allen Genen des Wnt- Signalweges zeigten in der Expression Veränderungen (Tabelle 38, Abbildung 34). Nicht alle Gene waren signifikant, doch aber in der Mehrzahl der untersuchten Proben von Patienten mit einem progredienten Tumor verändert exprimiert. Trotzdem konnte in beiden progredienten Tumorsubtypen im Vergleich zu den Primärtumoren eine signifikante Überexpression von β - Catenin gezeigt werden. Das β - Catenin ist ein bifunktionelles Protein, das in der Zelladhäsion und im Wnt- Signalweg eine wichtige Rolle spielt. Innerhalb des Adhäsionskomplexes bindet es intrazellulär an Cadherin und dem Aktin- bindenden Protein α - Catenin. Fehlregulationen des Cadherin- Catenin- Komplexes können zur Akkumulation und zur verstärkten Transkriptionsaktivierung von β - Catenin führen (Iwaya K. et al, 2003; Mazieres J. et al, 2005). Ein Proteinkomplex aus den Molekülen Glykogensynthasekinase 3-beta (GSK3B), dem Tumorsuppressorgen „Adenomatous Polyposis Coli“ (APC) und Axin bindet an das freie β - Catenin und bewirkt dessen Phosphorylierung. Die Phosphorylierung ist Voraussetzung für einen anschließenden Abbau von β - Catenin in der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse (Cong F. et al., 2004). Durch Aktivierung des kanonischen Wnt- Signalweges (Abbildung 34) wird die Bildung des Axin- vermittelten Degradationskomplexes inhibiert und zytoplasmatisches β - Catenin stabilisiert. Als Folge reichert sich β - Catenin im Zytoplasma an und kann mit Transkriptionsfaktoren der Tcf/LEF- Familie interagieren. Der β - Catenin/ Tcf- Komplex, welcher durch die Interaktion mit weiteren Kotranskriptionsfaktoren wie z.B. SMAD4 reguliert wird (Bai RY. et al, 2002), aktiviert im Zellkern die Transkription von Zielgenen wie z.B. Myc, CyclinD1, PPAR, naked, Tcf-1 und andere (Cong F. et al., 2004). Einige Komponenten des kanonischen Wnt- Signalweges sind auch in anderen zellulären Prozessen beteiligt. So sind Frizzled und Dishevelled in den JNK (c-Jun N-terminal Kinase)- Signalweg eingebunden, der die planare Zellpolarität reguliert (Katoh M, 2005; Hughes TA. et al, 2006). Zusätzlich zur Aktivierung des JNK- Signalweges wird auch die GTPase RhoA aktiviert und führt über ROCK zur Destabilisierung des Cadherin- Catenin- Komplexes und zu Veränderungen im Zytoskelett. Als alternative zum kanonischen Wnt- Signalweg und zum planaren Zellpolarität (PCP)- Signalweg existiert noch der Calcium- abhängige Wnt- Signalweg (Steel MD. et al, 2005). Hier kommt es durch Bindung von Wnt- Molekülen an Transmembranrezeptoren der Frizzled- Familie vermutlich zu einer Aktivierung von trimeren G- Proteinen, was in Folge zur Aktivierung von Calcineurin, einer Calcium/Calmodulin- regulierten Proteinphosphatase führt. Calcineurin kontrolliert die nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF-AT (nuclear factor of activated T cells) (Graef IA. et al, 2001; Tang W. et al, 2005). Die Bedeutung der Regulation des zytoplasmatischen β - Catenin wird deutlich durch die Tatsache, dass bei der Entstehung einer Reihe von humanen Tumoren eine erhöhte β - Catenin- Konzentration und Transkriptionsaktivität zu beobachten ist (Lustig B. et al, 2002; Zheng P. et al, 2006).

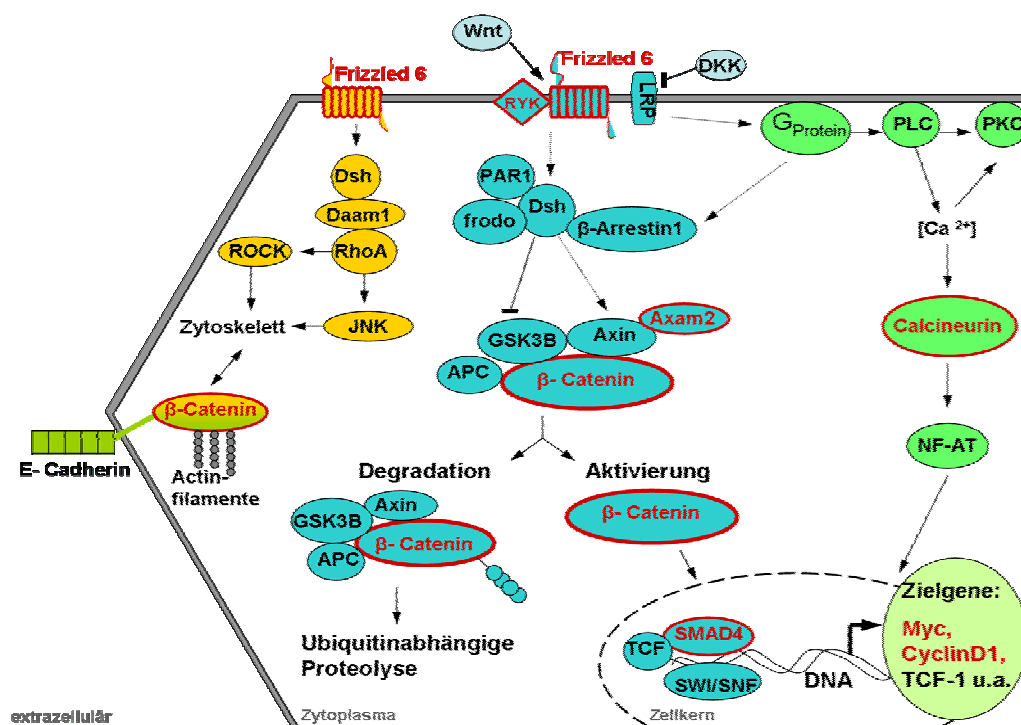


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin- Signalweges. Der kanonische Wnt- Signalweg ist in blau, der nicht-kanonische planare Zellpolarität- Signalweg in gelb und der Calcium- abhängige Wnt- Signalweg in grün dargestellt. Die überexprimierten Gene wurden rot markiert. (Abbildung: modifiziert nach Lustig B. et al, 2002)

Gene des Wnt-Signalweges	Funktion	FC A vs FA	FC P vs FP
RYK (RYK receptor-like tyrosine kinase)	- fungiert als Korezeptor von Frizzeld (Schmitt AM. et al, 2006) - bindet extrazellulär Wnt und intrazellulär Dishvelled (Lu W. et al, 2004)	1,85	1,52
FZD6 (frizzled homolog 6 (Drosophila))	- membranständiger Rezeptor an dem extrazellulär Wnt bindet (Cong F. et al., 2004)	2,94	2,41
SEN2 / Axin2 (SUMO1/sentrin/SMT3 specific protease 2)	- involviert in der Desumoylation von Tcf- 4 (Yamamoto H. et al, 2003) - bindet an Axin (Kadoya T. et al, 2002)	1,53	1,45
CTNNB1 (catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa)	- zentrales Molekül des Wnt- Signalweges - gelangt im unphosphoryliertem Zustand in den Zellkern und aktiviert die Transkription von verschiedenen Genen (Xu HT. et al, 2006)	1,42	1,75
SMAD4 (SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila))	- als Heterooligomer ein Kotranskriptionsfaktor von β - Catenin - involviert in der TGF β – Signaltransduktion (Bai RY. et al, 2002)	1,85	1,53
MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog)	- ist unter anderem ein Zielgen von β - Catenin	1,96	1,23

Tabelle 38: Gene des Wnt- Signalweges, die in den fortschreitenden oder rezidivierenden Tumorsubtypen Veränderungen in der Genexpression aufwiesen. In rot sind die Gene dargestellt, die im Vergleich zum Primärtumor einen „Fold Change“ (FC) von größer 1,5 haben sowie einen q-Value kleiner 5%. Schwarz verdeutlicht Gene, die in dem entsprechenden Tumorsubtyp nicht die Signifikanzkriterien erfüllten. A = primäres Adenokarzinom, FA = fortschreitendes Adenokarzinom, P = Plattenepithelkarzinom, FP = fortschreitendes Plattenepithelkarzinom.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Vergleich zu den Primärtumoren mehrere Komponenten des Wnt/ β - Catenin- Signalweges in den progredienten Lungenkarzinomen verändert exprimiert werden, was für eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs spricht.

3.5.2.2. Veränderungen in der Proliferation der progredienten

Lungenkarzinome im Vergleich zum Primärtumor

In den progredienten Tumoren wurden mehrere Gene, die in der Transition aus der G₁-Phase in die S- Phase involviert sind, mit einer Überexpression identifiziert (Tabelle 39).

Gene des Zellzyklus	Funktion	Fold Change A vs FA	Fold Change P vs FP
CCND1 (cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1))	- Zyklin der G ₁ - Phase - ist auch Zielgen von β - Catenin	1,59	3,17
CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)	- beteiligt an Progression in die S- Phase - bindet an Cyclin A und Cyclin E	1,58	1,46
CDC14B (CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae))	- involviert in der Zellzyklusregulation - moduliert die Spindeldynamik während der Mitose (Cho HP. et al, 2005)	1,37	1,87
CDC25B (cell division cycle 25B)	- beteiligt an der Regulation des Zellzyklus - spielt in der Progression der M- Phase eine Rolle (Miyata H. et al, 2000)	0,85	0,61

Tabelle 39: Veränderte Gene des Zellzyklus. Abürzungen und Farbkodierung siehe Tabelle 39.

Im Vergleich zum Primärtumor konnte im progredienten Adenokarzinom eine Überexpression von CyclinD1 und CDK2 beobachtet werden. CyclinD1 ist eine Kinase, die über Hyper- Phosphorylierung des Retinoblastom- Proteins und daraus resultierender Freisetzung von Transkriptionsfaktoren die Replikation von S- Phase- Genen einleitet und somit das Fortschreiten des Zellzyklus aus der G₁- Phase in die S- Phase bewirkt. Neben CyclinD1 ist beim Übergang von der G₁- Phase in die S- Phase auch das CDK2 essentiell. Da beide Gene überexprimiert sind, deutet dies auf einen Defekt im G₁- Restriktionspunkt hin, was vermutlich einhergeht mit einer erhöhten Proliferation. Auch in anderen Studien konnte im nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen eine erhöhte Expression von CyclinD1 nachgewiesen und mit einer schlechten Prognose assoziiert werden (Tanaka H. et al, 1998; Ratschiller D. et al, 2003; Esposito V. et al, 2005). Im progredienten Plattenepithelkarzinom wurde dagegen eine Unterexpression von CDC25B nachgewiesen. Es ist bekannt, dass CDC25B durch Aktivierung des CDC2/CyclinB1- Komplexes die G₂- M- Transition fördert und somit im G₂- M- Kontrollpunkt involviert ist (Miyata H. et al, 2000). Da CDC25B in den progredienten Plattenepithelkarzinomen vermindert exprimiert wurde, kann dies als Hinweis auf einen möglichen G₂- M- Arrest gedeutet werden.

Zusammenfassend konnte im Vergleich zum Primärtumor im progredienten Adenokarzinom anhand der veränderten Gene eine Dysregulierung des G₁-Restriktionspunkt gezeigt werden. Im progredienten Plattenepithelkarzinom gibt es Hinweise auf eine Dysregulierung der G₂- M- Transition.

3.5.2.3. Veränderungen in der Ubiquitin- abhängigen Proteolyse

Durch sorgfältig kontrollierten Proteinabbau hat die Zelle die Möglichkeit die Menge eines bestimmten Proteins zu regulieren. Es ist bekannt, dass Proteine mit einer geringen Lebensdauer eine kurze Aminosäuresequenz besitzen, die das Protein zur Ubiquitinierung und dadurch zum Abbau durch das Proteasom freigibt. Denaturierte und fehlgefaltete Proteine sowie solche mit oxidierten oder anderweitig anormalen Aminosäuren werden ebenfalls von dem Ubiquitin- abhängigen Proteolysesystem erkannt und abgebaut. Bei malignen Zellen konnte beobachtet werden, dass dieser kontrollierte Proteinabbau nicht mehr ordnungsgemäß ausgeführt wird und es zur Akkumulation des abzubauenen Proteins kommt (Nalepa G. et al, 2006). Da das Protein dadurch in einer erhöhten Konzentration vorliegt, kann dies zu verheerenden Auswirkungen wie z.B. zu einer unkontrollierten Zellproliferation führen. Dies macht das Ubiquitin- Proteasom- System zu einem attraktiven Angriffspunkt in der therapeutischen Anwendung. So wurden in vergangenen Jahren spezifische Inhibitoren des Proteasoms entwickelt und derzeit in klinischen Studien getestet. Ein spezifischer 26S- Proteasominhibitor ist Bortezomib. Die Hemmung des Proteasoms durch Bortezomib ist reversibel und die schon von ihrer Ubiquitinkette abgelösten Proteine verlassen das Proteasom noch intakt und funktionstüchtig. So konnte in mehreren Tumorzelllinien des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms nach der Inkubation mit Bortezomib eine Anreicherung von CyclinA, CyclinB und p21 nachgewiesen werden sowie eine erhöhte Apoptoserate (Adams J. et al, 1999; Ling YH. et al, 2003). In einer weiteren Studie wurde in Lungenkarzinomzelllinien ein G₂- M- Arrest beobachtet, ausgelöst durch die Behandlung mit Bortezomib (Bunn PA, 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse werden spezifische Proteasomeninhibitoren derzeit in klinischen Studien als Tumorthapeutika erprobt. Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie mit Bortezomib ist eine gesteigerte Proteasomaktivität in den malignen Zellen. Wie aus Tabelle 40 jedoch ersichtlich wird, fand sich vor allem beim fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinom eine verminderte Expression von Genen, die in dem Ubiquitin- abhängigen Proteolysesystem involviert sind. Diese Ergebnisse können daraufhinweisen, dass Patienten mit einem progredienten Plattenepithelkarzinom weniger von einer Bortezomibtherapie profitieren.

Gene der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse	Funktion	Fold Change A vs FA	Fold Change P vs FP
UBE1 (ubiquitin-activating enzyme E1)	- aktiviert Ubiquitin und damit das Ubiquitin- abhängigen Proteolysesystem	0,75	0,63
UBE2L6 (ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6)	- Enzyme, die Ubiquitin an Proteine, die proteosomal abgebaut werden sollen, anheften und dadurch zum Abbau markieren (Nalepa G. et al, 2006)	0,75	0,48
UBE2E1 (ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1)		0,76	0,57
UCLH1 (ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1)		1,45	0,19
COPS6 (COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 6)	- Untereinheit vom COPS9- Signalosom - involviert an der Regulation der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse u.a. von β - Catenin	0,97	0,59
PSMC1 (proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1)	- Untereinheiten des 26S- Proteasoms des Ubiquitin- abhängigen Proteolysesystems	0,94	0,61
PSMD4 (proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4)		0,82	0,64
PSMA3 (proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3)		0,76	0,44
PSMB8 (proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8)		0,83	0,51

Tabelle 40: Veränderte Gene der Ubiquitin- abhängigen Proteolyse. Abürzungen und Farbkodierung siehe Tabelle 39.

Zusammenfassend konnte mittels Oligonukleotid- Arrays in den progredienten Plattenepithelkarzinomen besonders für UCLH1 mit einem „Fold Change“ von 0,19 eine Unterexpression gezeigt werden. In der Literatur wurde in mehreren Studien in primären Plattenepithelkarzinomen eine Überexpression von UCLH1 und UBE1 beschrieben (Hibi K. et al, 1999; Otsuki T. et al, 2004, Pitha-Rowe I. et al, 2004). Diese Beobachtungen sind widersprüchlich mit den Ergebnissen der progredienten Lungenkarzinome, bestätigen aber die Daten der primären Lungentumore im Vergleich zum Nichttumor. So konnte im Rahmen dieser Arbeit im primären Plattenepithelkarzinom mit einem „Fold Change“ von 3,27 eine Überexpression von UCLH1 nachgewiesen werden. Auch weitere Gene, deren Genprodukt in der Ubiquitin- abhängigen Proteolyse involviert sind, zeigen mit einem „Fold Change“ zwischen 1,30 und 2,50 im Primärtumor eine Überexpression, was als Hinweis auf eine gesteigerte Proteasomaktivität gesehen werden kann.

3.5.2.4. Veränderungen bei Genen, die eine Rolle bei der Kondensation / Dekondensation des Chromatins spielen

Die dichte Verpackung von Chromatin, die bei der Mitose stattfindet, hat eine wichtige Folge für die Transkription der Gene. Aufgrund der vielen Verpackungsstufen der chromosomalen DNA, wird die DNA so dicht gepackt, dass die RNA- Polymerase und andere für die Transkription nötigen Proteine keinen Zugang mehr haben und die RNA-Synthese aufhört. Viele der mit der DNA in Chromosomen- assoziierten Proteine sind an der Verpackung der DNA beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei den fortschreitenden Tumorsubtypen veränderte Genexpressionswerte mehrerer Gene, die eine entscheidende Rolle bei der Kondensation und Dekondensation des Chromatins spielen, nachgewiesen werden (Tabelle 41). So konnte in beiden progredienten Lungenkarzinomen im Vergleich zum jeweiligen Primärtumor mit einem „Fold Change“ größer 10 eine Überexpression von HIST1H4C, einem Mitglied der Histon 1- Familie nachgewiesen werden. Histone sind basische Zellkernproteine, die verantwortlich für die Nukleosomenstruktur sind. Für Histon H1 ist bekannt, dass es in der Umwicklung der DNA um die nukleosomale Hauptstruktur, bestehend aus Histon 2A, Histon 2B, Histon 3 und Histon 4 involviert ist. Das so genannte „Linker“- Histon H1 ist damit verantwortlich für den Aufbau einer übergeordneten Chromatinstruktur, der 30nm Fibrille (Albig W. et al, 1997).

Im progredienten Plattenepithelkarzinom konnte zudem mit einem „Fold Change“ von 0,59 eine Unterexpression von CBX, einem weiteren Gen, das in der Endpackung des Chromatins involviert ist, nachgewiesen werden. In der Literatur wird beschrieben, dass CBX an der Endpackung der stark kondensierten Chromatindomänen beteiligt ist und vorübergehend an diesen Domänen bindet. Je dichter das Chromatin gepackt ist, desto geringer ist die Bindungsaffinität von CBX für das Chromatin (Cheutin T. et al, 2003). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass CBX in der M- Phase des Zellzyklus nicht mehr am kondensierten Chromatin binden kann. Für die Regulation des Bindungsverhaltens von CBX ist Histon H3 verantwortlich (Fischle W. et al, 2005).

Im progredienten Adenokarzinom wurde zusätzlich zur Überexpression von HIST1H4C auch eine Überexpression von SMARCC1 und NAP1L1 beobachtet. SMARCC1 ist ein Aktin- abhängiger Regulator des Chromatins und verantwortlich für die Chromatinumgestaltung, die der transkriptionellen Aktivierung von Genen vorausgeht (Wang W. et al, 1996). Bei NAP1L1 handelt es sich um ein nukleäres Protein das in der Verpackung des Chromatins und in der DNA- Replikation involviert ist (Simon HU. et al, 1994). In verschiedenen Tumoren konnte bereits eine Überexpression von NAP1L1 nachgewiesen werden (Kidd M. et al, 2006; Modlin IM. et al, 2006).

Gene der Chromosomen-verpackung	Funktion	Fold Change A vs FA	Fold Change P vs FP
NAP1L1 (nucleosome assembly protein 1-like 1)	- involviert in der Zusammenlagerung der Nukleosomen	1,78	1,27
SMARCC1 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1)	- Bestandteil des Chromosomenremodelingkomplexes	1,85	1,64
HIST1H4C (histone 1, H4c)	- involviert in der Kondensation der Nukleosomen zur 30nm- Faser	10,54	14,83
CBX1 (chromobox homolog 1)	- wichtig beim Endpacken des Chromatins	0,90	0,59

Tabelle 41: Differenziell exprimierte Gene, die in der Chromatinkondensation bzw. Dekondensation involviert sind. Abkürzungen und Farbkodierung siehe Tabelle 39.

Zusammenfassend zeigen die mittels Oligonukleotid- Array ermittelten Daten, dass im Vergleich zu den Primärtumoren in den progredienten Lungenkarzinomen Gene, die in der Veränderung der Chromatinstruktur involviert sind, eine wichtige Rolle spielen.

Da Gene überexprimiert wurden, die verantwortlich für die Kondensation des Chromatins sind, kann dies möglicherweise als Hinweis auf eine dichtere Verpackung des Chromatins gesehen werden.

3.6. Bestätigung der in den progredienten Tumoren identifizierten Gene mittels quantitativer „Real Time“- PCR

Zur Verifizierung der Daten wurden 11 Gene in je 5 Proben der jeweiligen Tumorsubtypen (fortschreitendes oder rezidivierendes Adenokarzinom und fortschreitendes oder rezidivierendes Plattenepithelkarzinom) mit Hilfe der quantitativen „Real Time“- PCR unter Verwendung der Taqman- Technologie analysiert, mit je 5 mitgeführten Primärtumorproben verglichen und zur qualitativen Kontrolle im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenzgen wurde GAPDH für die Quantifizierungsanalysen ausgewählt, weil die Expression des Gens zwischen den untersuchten Primärtumorproben und den progredienten Tumorproben am wenigsten variierte. RPS11 kam bei diesem Tumorkollektiv als Referenzgen nicht in Betracht, da es zwischen primärem und fortschreitendem Tumorgewebe differentiell exprimiert war. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Oligonukleotid- Arrays konnten auch in diesem Tumorkollektiv Unterschiede in der Genexpression mit der „Real Time“- PCR nachgewiesen werden, welche beispielhaft an β - Catenin (CTNNB1) und Frizzeld 6 (FZD6) beim Adenokarzinom (Abbildung 35) und an β - Catenin und Ubiquitin Carboxyl-Terminalen Esterase L1 (UCHL1) beim Plattenepithelkarzinom (Abbildung 36) aufgezeigt werden soll.

Anhand dieser „Real Time“- PCR- Kurven war zu erkennen, dass CTNNB1 in beiden progredienten Tumorsubtypen im Vergleich zum jeweiligen Primärtumor höher exprimiert wurde. Auch für das FZD6 konnte beim progredienten Adenokarzinom eine erhöhte Expression nachgewiesen werden (Abbildung 35b). Des Weiteren konnte auch für UCHL1 die differentielle Expression beim progredienten Plattenepithelkarzinom mittels „Real Time“- PCR bestätigt werden (Abbildung 36b).

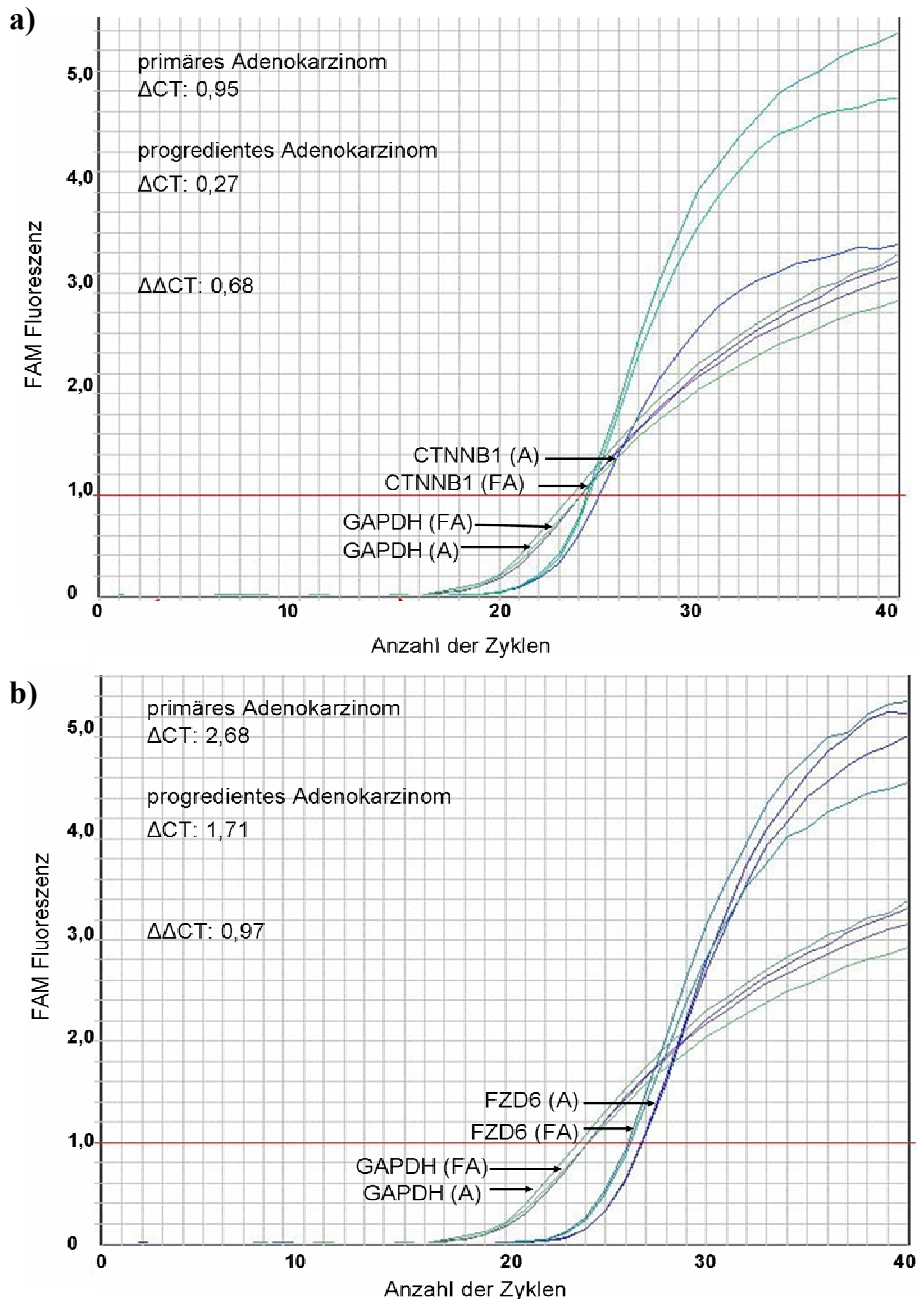


Abbildung 35: Zwei Beispiele für eine veränderte Genexpression, ermittelt durch quantitative „Real Time“- PCR unter Verwendung der Taqman- Technologie. Dargestellt sind die „Real Time“- PCR- Kurven des untersuchten Gens CTNNB1 (a) bzw. FZD6 (b) und des Referenzgenes GAPDH vom progredienten Adenokarzinom (FA) und primärem Adenokarzinom (A). Der Unterschied zwischen CTNNB1 bzw. FZD6 und GAPDH ist als ΔCT - Wert angegeben. Je kleiner der ΔCT - Wert ist, desto größer ist die relative Expression der mRNA von CTNNB1 / FZD6. Die Änderung der Genexpression ist als $\Delta\Delta CT$ - Wert angegeben. Ein $\Delta\Delta CT$ - Wert von 1 entspricht einem „Fold Change“ von 2.

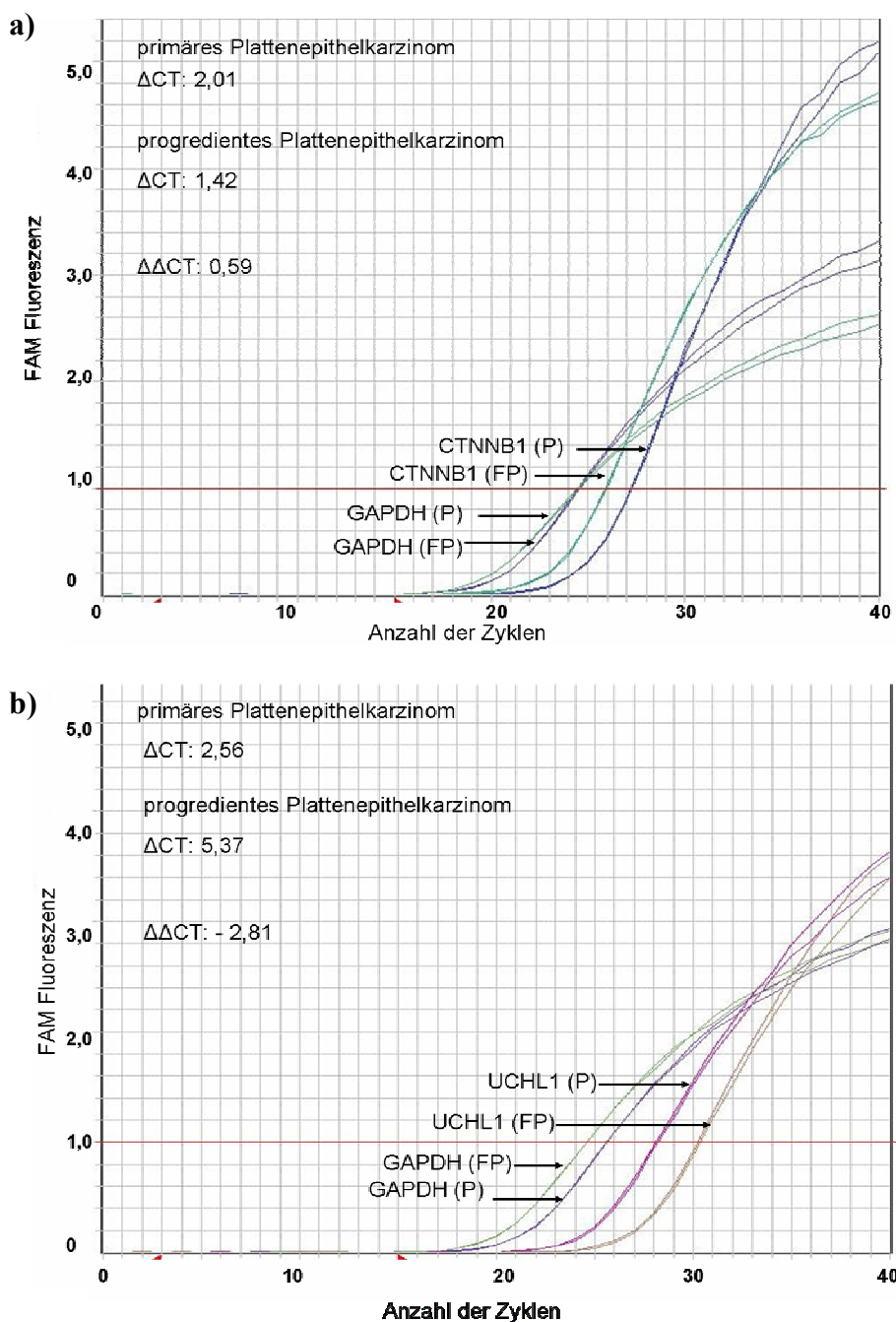


Abbildung 36: Zwei Beispiele für eine veränderte Genexpression, ermittelt durch quantitative „Real Time“-PCR unter Verwendung der Taqman-Technologie. Dargestellt sind die „Real Time“-PCR-Kurven des untersuchten Gens CTNNB1 (a) bzw. UCHL1 (b) und des Referenzgenes GAPDH vom progredienten Plattenepithelkarzinom (FP) und primärem Plattenepithelkarzinom (P).

Um nachzuweisen, dass ein PCR-Produkt gebildet wurde, erfolgte auch hier eine Elektrophorese der PCR-Produkte auf einem 1%igen Agarosegel (Abbildung nicht gezeigt). Es konnte im Gel jeweils eine Bande mit Ethidiumbromid angefärbt werden. Als Vergleich der Ergebnisse beider Methoden, erfolgte eine Darstellung der Ergebnisse in einem Diagramm (Abbildung 37 und 38). Auch die Ergebnisse der Oligonukleotid-Arrays dieser 22 ausgesuchten Gene konnten mit Hilfe der „Real Time“-PCR bestätigt werden.

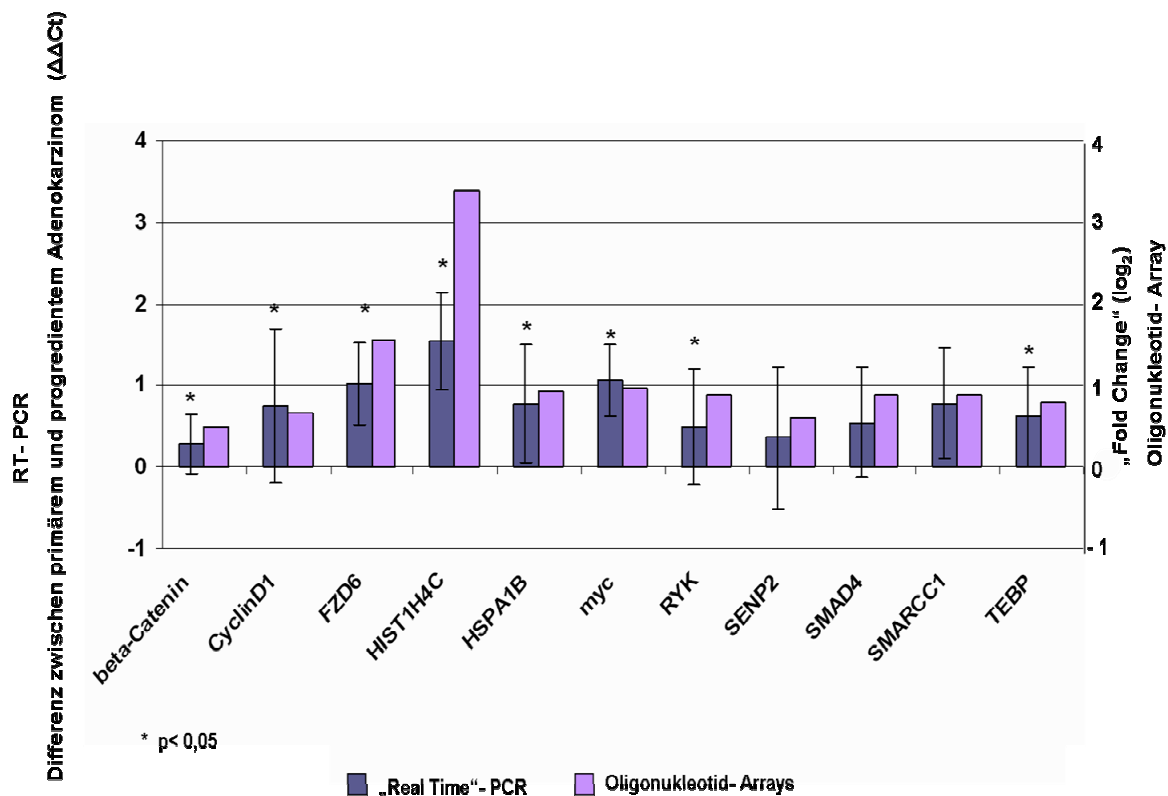


Abbildung 37: Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der mittels quantitativer „Real Time“-PCR verifizierten Gene für das progrediente Adenokarzinom. Ein $\Delta\Delta Ct$ -Wert von 1 entspricht einem „Fold Change“ von 2.

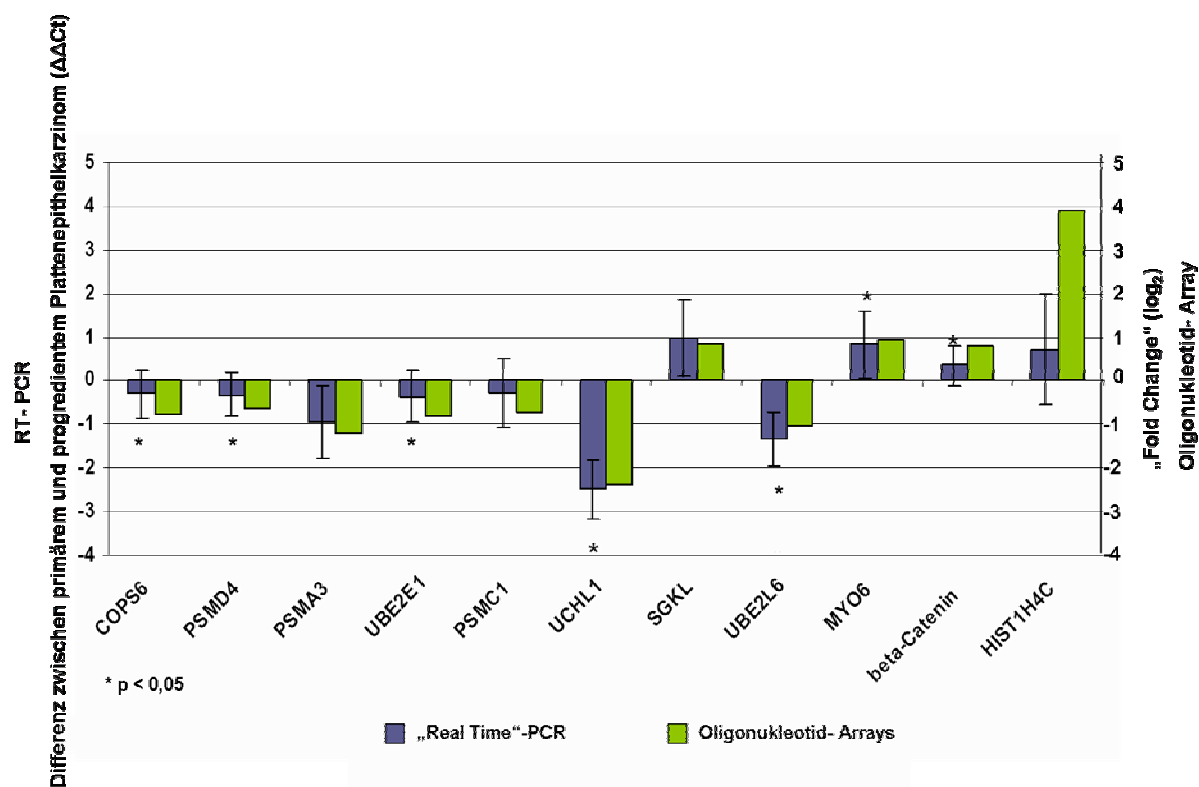


Abbildung 38: Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der mittels quantitativer „Real Time“-PCR verifizierten Gene für das progrediente Plattenepithelkarzinom.

3.7. Immunhistochemischer Nachweis der differentiellen

Expression von β - Catenin

β - Catenin erfüllt die essentielle Rolle eines Adaptermoleküls zwischen der Zellmembran und dem Zytoskelett und ist damit maßgeblich an der strukturellen Organisation der Zelle beteiligt. Gewöhnlich ist der größte Anteil an β - Catenin an der Membran lokalisiert. Aber auch als zentraler Mediator des Wnt- Signalweges ist es an der Regulierung der Genexpression beteiligt (Kotsinas A. et al, 2002; Horvai AE. et al, 2006; Piedra J. et al, 2001; Liu C. et al, 2002). In Kolonkarzinomen führt eine Mutation in den Phosphorylierungsstellen β - Catenins zur Inhibition der Ubiquitin- abhängigen Proteolyse und somit zur Akkumulation des Proteins im Zytosol (Morin PJ. et al, 1997). Auch im Lungenkarzinom konnte bereits mittels immunhistochemischer Analyse eine veränderte Expression von β - Catenin nachgewiesen werden (Hommura F. et al, 2002; Xu HT. et al, 2005). Um eine differentielle Expression von β - Catenin zwischen primären und fortschreitenden Lungenkarzinom nachzuweisen, wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunhistochemie die Expression von β - Catenin auf Proteinebene in Gewebeschnitten primärer und progredienter nichtkleinzelliger Lungenkarzinomproben untersucht. Bei der Analyse wurde darauf geachtet, dass das Paraffinmaterial des Primärtumors und der progredienten Tumorprobe von demselben Patienten stammt. Nach der Inkubation des Gewebeschnittes mit dem Antikörper konnte β - Catenin sowohl in der Zellmembran als auch im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen werden. In den progredienten Lungenkarzinomproben ist eine Färbung der gesamten Tumorzelle zu erkennen, was für eine erhöhte Konzentration von β - Catenin im Zellkern spricht (Abbildung 39 und 40).

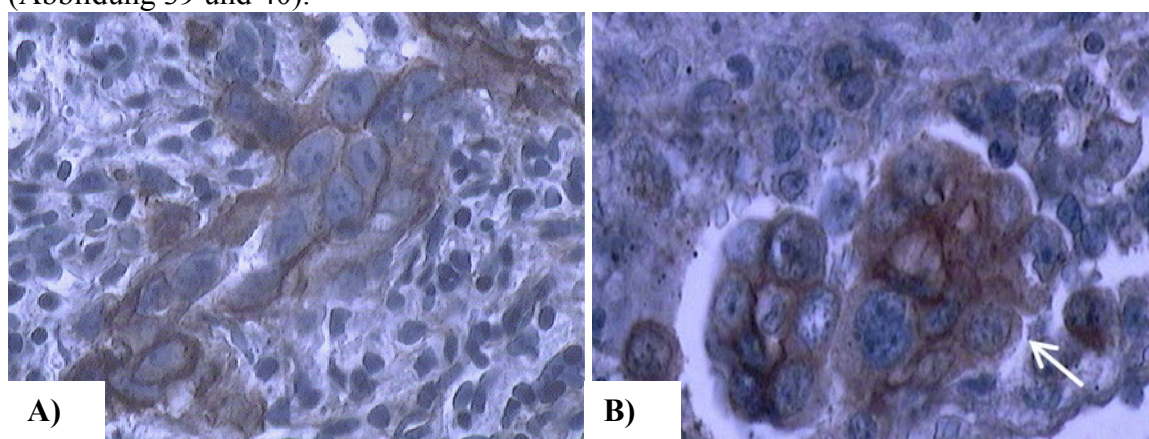


Abbildung 39: Immunhistochemischer Nachweis von β - Catenin im primären Adenokarzinom (39A) und progredienten Adenokarzinom (39B) bei einer 20- fachen Vergrößerung. Im primären Adenokarzinom ist β - Catenin vorwiegend an der Zellmembran und im Zytoplasma lokalisiert. Im progredienten Adenokarzinom ist β - Catenin in der gesamten Zelle zu erkennen. Außerdem findet sich im progredienten Karzinom eine Zunahme der Signalintensität (Pfeil).

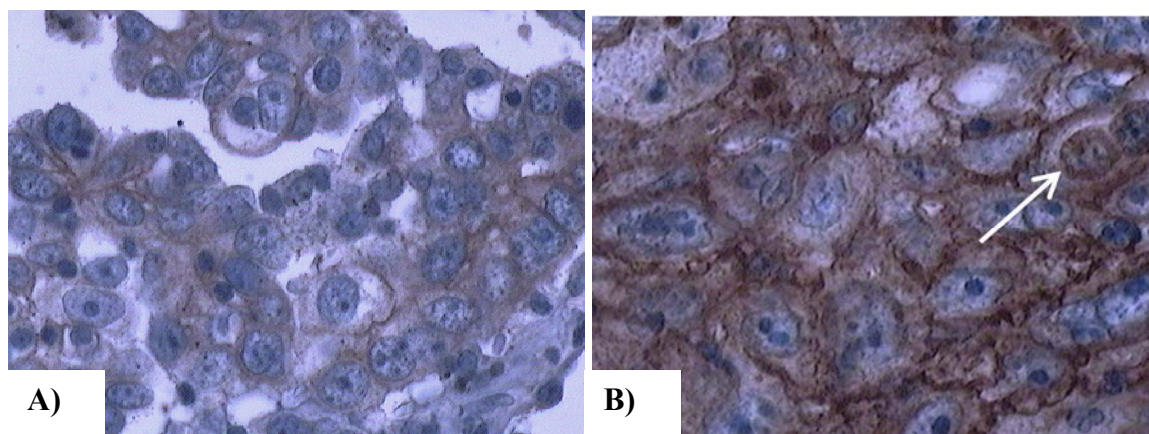


Abbildung 40: Immunhistochemischer Nachweis von β -Catenin im primären Plattenepithelkarzinom (40A) und progredienten Plattenepithelkarzinom (40B) bei einer 20-fachen Vergrößerung. Auch hier ist β -Catenin im Primärtumor vorwiegend an der Zellmembran und im Zytoplasma lokalisiert. Im progredienten Plattenepithelkarzinom ist β -Catenin zusätzlich im Zellkern (Pfeil) zu erkennen. Auch die Signalintensität hat deutlich zugenommen.

Ein Großteil des immunhistochemisch nachgewiesenen β -Catenins befindet sich an der Zellmembran. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von verschiedenen Autoren für das Kolonkarzinom veröffentlicht. So konnte in Fraktionsexperimenten mit der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 gezeigt werden, dass mehr als 90% der β -Cateninmenge an der Membran lokalisiert sind (Reinacher-Schick A. et al, 2001). Des Weiteren wurde beschrieben, dass während der Zellmigration die Interaktion zwischen β -Catenin und E-Cadherin aufgehoben wird und die zytoplasmatische Konzentration von β -Catenin ansteigt (Muller T. et al, 1999). Bei einem Vergleich zwischen Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom ist eine stärkere Färbung der Plattenepithelkarzinome zu erkennen, was vermutlich auf einer erhöhten Konzentration von β -Catenin zurückzuführen ist. Dies resultiert wahrscheinlich nicht nur aus einer erhöhten Genexpression sondern auch aus einem verminderten Abbau von β -Catenin. So konnte im Rahmen dieser Studie im progredienten Plattenepithelkarzinom nicht nur eine erhöhte Expression von β -Catenin sondern auch eine verminderte Expression von Genen, die im Ubiquitin-abhängigen Proteolysesystem und damit am Abbau von β -Catenin involviert sind, identifiziert werden. Jedoch zeigten nicht alle Tumorareale einer Gewebeprobe gleichstark angefärbte Zellen, so dass allgemein von einer ungleichen Verteilung von β -Catenin in den Zellen ausgegangen werden muss. In Studien am Kolonkarzinom konnte bereits beobachtet werden, dass vor allem dissoziierte Tumorzellen und Tumorzellen der Invasionsfront eine starke nukleäre β -Cateninexpression aufzeigen (Brabletz T. et al, 1998).

Zusammenfassend konnte im zweiten Teil dieser Studie gezeigt werden, dass auch in den progredienten Lungenkarzinomen im Vergleich zum Primärtumor eine Vielzahl von fehlregulierten Genen involviert ist. Unter anderem wurden Gene identifiziert, die auf eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges hinweisen. So konnte die differentielle

Expression von β -Catenin nicht nur mit der „Real Time“-PCR sondern auch auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Analyse bestätigt werden. Des Weiteren wurden vor allem im progredienten Adenokarzinom Gene, die für eine unkontrollierte Zellproliferation sprechen, mittels Oligonukleotid-Arrays identifiziert. Für das progrediente Plattenepithelkarzinom konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum Primärtumor Gene, die in der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse involviert sind, unterexprimiert wurden. Darüber hinaus konnten in beiden progredienten Lungenkarzinomen Gene, die in der Kondensation des Chromatins eine wesentliche Rolle spielen, mit einer veränderten Expression nachgewiesen werden. Die im Vergleich zwischen primären und progredienten Lungenkarzinom nachgewiesenen differentiell exprimierten Gene können als Grundlage für die Identifikation von Progressions-assoziierten Genen angesehen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass im Verlauf der Progression weitere Dysregulationen auf transkriptioneller Ebene vorliegen, die vermutlich in Folge zu entscheidenden funktionellen Veränderungen in der Tumorzelle führen.

3.8. Charakterisierung des EGF- Rezeptors

Der EGF- Rezeptor ist in den Zellmembranen nahezu aller Epithel- und Stromazellen, sowie in bestimmten Glia- und Muskelzellen vorhanden. Hendler und Ozanne zeigten bereits 1984 mittels radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper, dass EGFR in Lungenkarzinomen in erhöhtem Maße exprimiert ist. In nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen konnte eine ausgeprägte EGFR- Überexpression beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe um Bunn konnte in 65% der Adenokarzinome und 85% der Plattenepithelkarzinome eine EGFR- Überexpression nachweisen (Bunn PA. et al, 2002; Hirsch FR. et al, 2003).

Der EGF- Rezeptor spielt eine bedeutende Rolle für Wachstum und Überleben von Tumoren, und nicht selten korrelieren hohe Rezeptordichten mit einem aggressiveren klinischen Verlauf der Erkrankung (Salomon DS. et al, 1995; Hong WK. et al, 2000). So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine Überexpression des EGF- Rezeptors mit einer ansteigenden Proliferation einhergeht (Mendelsohn J., 2002). Zudem finden sich bei diversen hochaggressiven Tumoren durch Mutation veränderte, konstitutiv aktive Formen des EGFR, wie EGFRvIII, der auch ohne Ligandenbindung aktiv ist (Pedersen MW. et al, 2001). Des Weiteren konnten Mutationen innerhalb der katalytischen Kinase-Domäne, innerhalb des Exon 18 bis einschließlich Exon 21 beschrieben werden, die in der Literatur als verantwortlich für Resistenzen gegenüber Erlotinib diskutiert werden (Lynch TJ. et al, 2004; Paez JG. et al, 2004, Pao W. et al, 2004). Im Rahmen dieser Studie wurde eine Mutationsanalyse des EGF- Rezeptors durchgeführt und hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs zwischen Mutation und Fortschreiten der Erkrankung untersucht. Darüber hinaus wurde nach möglichen

Unterschieden in der Expression von EGFR im Vergleich zwischen Primärtumor und progredienten Lungenkarzinom gesucht.

3.8.1. Mutationsanalyse des EGF- Rezeptors

3.8.1.1. SSCP (Einzelstrang- Konformations- Polymorphismus- Analyse)

Zur Detektion von Mutationen des EGFR- Gens in den nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, erfolgte die Amplifikation von 4 kodierenden Exons des EGFR- Gens (Exons 18 - 21). Die Länge der PCR-Fragmente lag zwischen 372 und 415 bp. Anschließend erfolgte zur qualitativen Kontrolle eine elektrophoretische Auftrennung von 8µl des PCR- Produktes in einem 1%-igem Agarosegel (Abbildung 41).

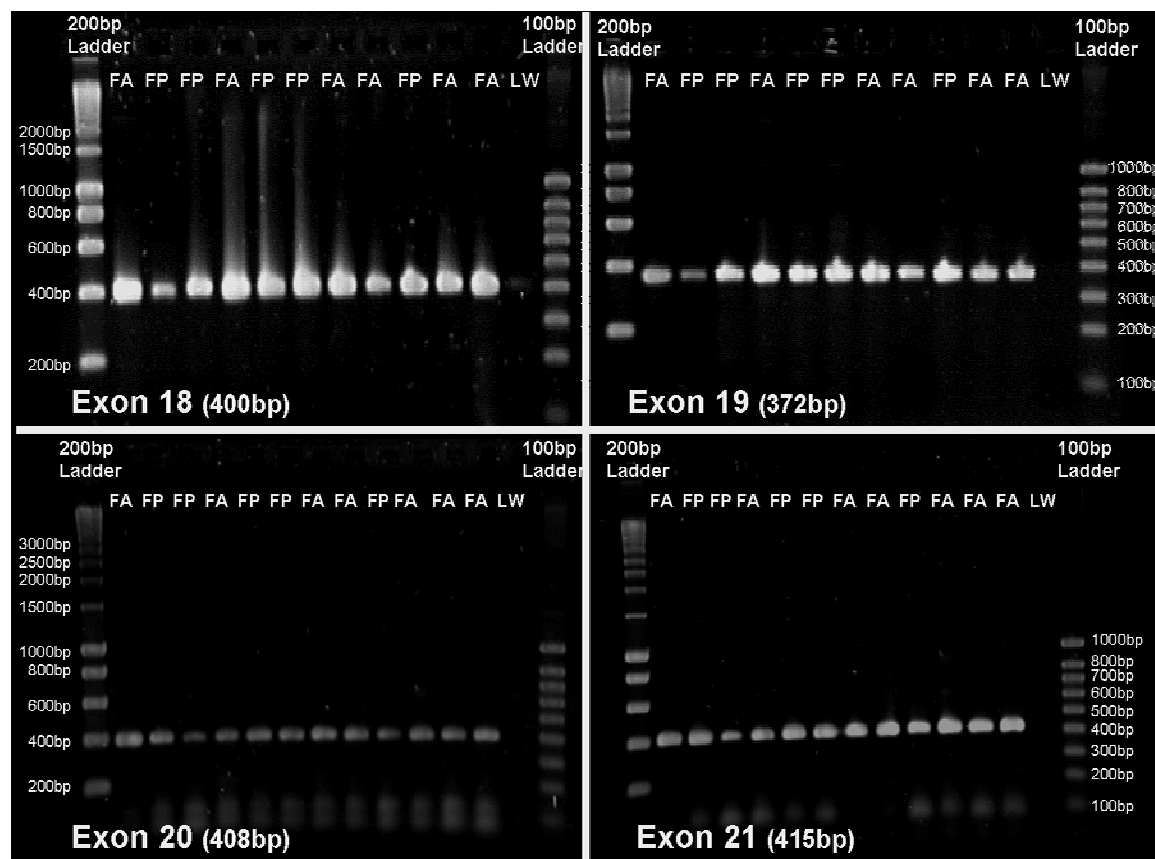
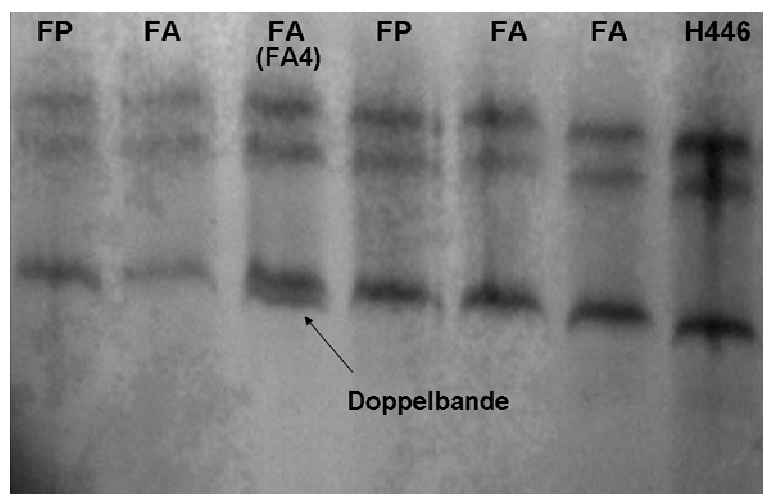


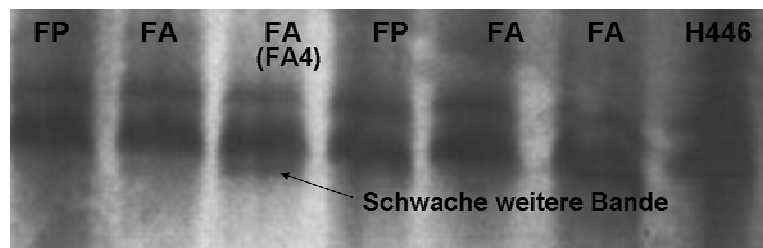
Abbildung 41: Darstellung der 1%igen Agarosegele. Im Gel erfolgte der Nachweis der amplifizierten Exons des EGFR- Genes. Während der Elektrophorese wurden stets zwei Größenmarker (200bp-Ladder und 100bp-Ladder) mitgenommen. Nach der Elektrophorese erfolgte die Färbung der Banden im Ethidiumbromidbad. Die Auswertung und Dokumentation wurde am Image System durchgeführt. FA = progredientes Adenokarzinom, FP = progredientes Plattenepithelkarzinom, LW = Leerwert, bp = Basenpaar

Für die SSCP- Analyse wurden je nach Bandenstärke im Agarosegel bei Exon 18 2µl und bei den restlichen Exons 3µl des PCR- Produktes denaturiert und auf den verschiedenen Polyacrylamidgelen mit unterschiedlicher Glycerol- und Polyacrylamidkonzentration elektrophoretisch getrennt. Die Banden zeigten

sich nach einer Silberfärbung und konnten auf dem Leuchttisch ausgewertet und am Image System dokumentiert werden. Mit Hilfe der SSCP- Analyse konnten von insgesamt 23 progredienten Tumorproben 4 mit einem fraglichen Konformationspolymorphismus detektiert werden. Im Exon 18 konnte bei einer Probe eines progredienten Adenokarzinoms (FA4) eine zusätzliche Bande in den zwei 8%igen PAA- Gelen, mit unterschiedlicher Glycerolkonzentration d.h. unter zwei verschiedenen Bedingungen innerhalb des zu untersuchendem Bereichs beobachtet werden (Abbildung 42). Dies wurde als ein Hinweis auf einen Konformationspolymorphismus in diesem Exon gedeutet.



8%iges PAA; 2% Glycerol- Gel

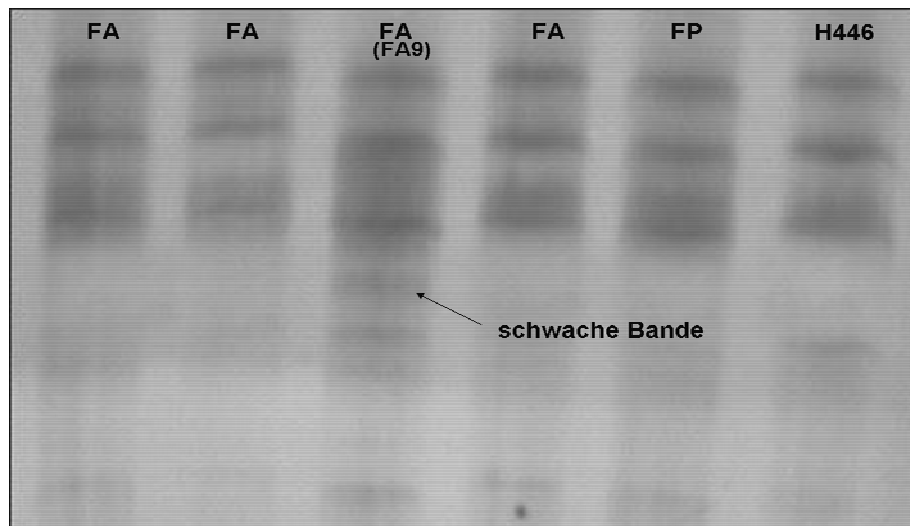


8%iges PAA; 10% Glycerol- Gel

Abbildung 42: Eine mittels Vertikalelektrophorese dargestellte SSCP- Analyse der 8%igen Polyacrylamidgele des Exon 18. Im 8%igen Polyacrylamidgel mit 2% Glycerol war nach der Silberfärbung bei der FA4- Probe eine weitere Bande zu erkennen. Im 8%igen Polyacrylamidgel mit 10% Glycerol wurde bei der FA4- Probe ebenfalls eine weitere Bande schwach nachweisbar. FA = progredientes Adenokarzinom, FP = progredientes Plattenepithelkarzinom

Im Exon 20 traten geringe Abweichungen des Bandenmusters bei drei Proben von Patienten mit einem progredienten Tumor (einem progredienten Plattenepithelkarzinom [FP4] und zwei progredienten Adenokarzinomen [FA9 und 11]) im 8%igen PAA- Gel mit 2% Glycerol auf (Abbildung 43) und kann aus einer vorliegenden Mutation in diesen Proben resultieren. Jedoch konnte in keinem der drei weiteren PAA- Gelen d.h. bei keiner

anderen Polyacrylamidkonzentration und auch nicht bei einer Glycerolkonzentration von 10% bei diesen Proben eine Abweichung des Bandenmusters beobachtet werden. In den so genannten „hot spots“ des EGFR- Gens, Exon 19 und Exon 21, konnten bei den untersuchten 23 Proben mit Hilfe der SSCP- Analyse keine Abweichungen des Bandenmusters aufgezeigt werden.



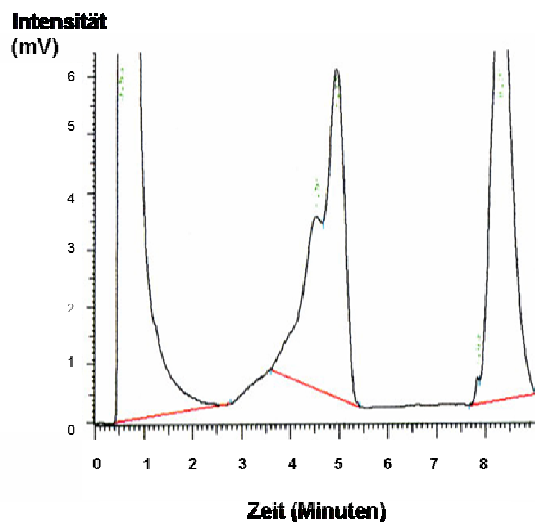
8%iges PAA; 2%Glycerol- Gel

Abbildung 43: Darstellung des 8%igen, 2%-Glycerol- Polyacrylamidgel der SSCP- Analyse des Exon 20. Im Gel wurde bei den FP4, FA9 und FA11 - Proben eine weitere schwache Bande nach der Silberfärbung sichtbar. In der Abbildung ist die elektrophoretische Trennung des PCR- Produktes der Probe FA9 dargestellt.

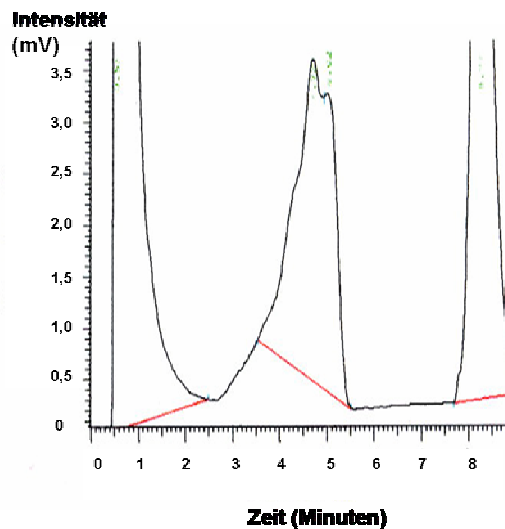
3.8.1.2. DHPLC (Denaturierende Hochleistungs- Flüssigkeits- Chromatographie)

Da die Wahrscheinlichkeit, eine Sequenzabweichung mit Hilfe der SSCP- Analyse zu detektieren, mit der Länge des zu untersuchenden Fragments stark abnimmt, erfolgte zusätzlich eine Untersuchung der PCR- Produkte mit Hilfe des Wave Nucleic Acid Fragment Analysis System (Wave- System). Mit Hilfe der DHPLC wurden weitere Proben mit einem fraglichen Konformationspolymorphismus detektiert. So zeigte sich im Exon 19 im Chromatogramm der progredienten Adenokarzinomprobe FA6 (Abbildung 44) sowie im Exon 21 bei der progredienten Plattenepithelprobe FP2 ein breiterer und kleinerer Peak (Abbildung 45) als in den Chromatogrammen der anderen analysierten Proben und der mitgeführten Negativkontrolle H446. Im Exon 20 konnte bei zwei weiteren progredienten Adenokarzinomproben (FA4 und FA6) ein leicht verbreiteter Peak nachgewiesen werden. Die Chromatogramme der Proben vom Exon 18 zeigten keine wesentlichen Unterschiede der Elutionsprofile.

Exon 19



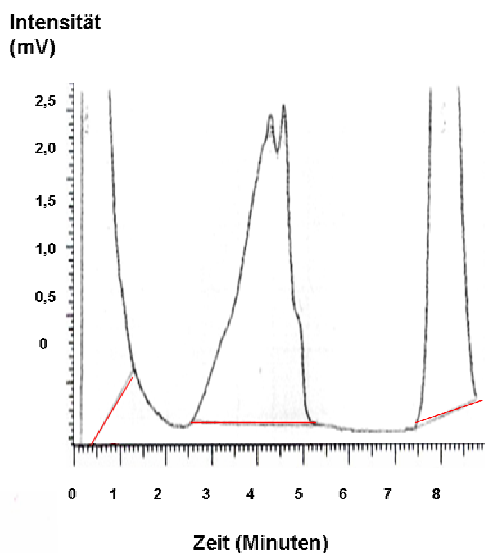
H446



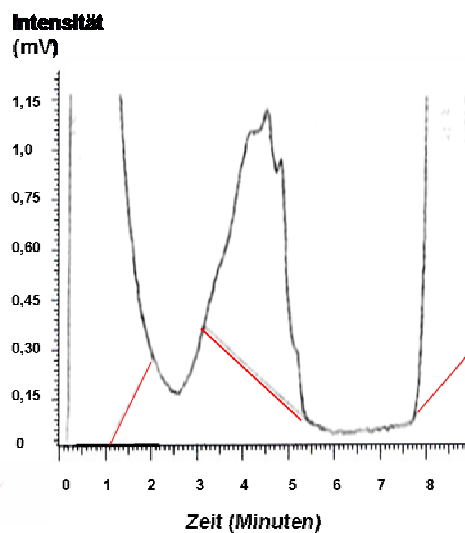
FA6

Abbildung 44: Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer DHPLC- Analyse von Exon 19 bei 61°C. Im Vergleich der Chromatogramme erkennt man, dass der Peak im rechten Diagramm breiter und kleiner ist als im Elutionsprofil der mitgeführten Negativkontrolle H446. FA = progredientes Adenokarzinom

Exon 21



H446



FP2

Abbildung 45: Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer DHPLC- Analyse von Exon 21 bei 64°C. Im Vergleich der Chromatogramme erkennt man, dass der Peak im rechten Diagramm breiter und kleiner ist als im Elutionsprofil der mitgeführten Negativkontrolle H446. FP = progredientes Plattenepithelkarzinom

In Tabelle 42 sind die Ergebnisse der SSCP- Analyse und der DHPLC- Analyse zusammengefasst dargestellt.

Probe	Diagnose	SSCP- Analyse	DHPLC- Analyse
FP2	progredientes Plattenepithelkarzinom	unverändert	Exon 21, breiterer Peak im Vergleich zur Kontrolle
FP4	progredientes Plattenepithelkarzinom	Exon 20, zusätzliche Bande im Gel	unverändert
FA4	progredientes Adenokarzinom	Exon 18, zusätzliche Bande im Gel	Exon 20, breiterer Peak im Vergleich zur Kontrolle
FA6	progredientes Adenokarzinom	unverändert	Exon 19 und Exon 20, breiterer Peak im Vergleich zur Kontrolle
FA9	progredientes Adenokarzinom	Exon 20, zusätzliche Bande im Gel	unverändert
FA11	progredientes Adenokarzinom	Exon 20, zusätzliche Bande im Gel	unverändert

Tabelle 42: Zusammenfassung der mittels SSCP- und DHPLC- Analysen auffälligen Proben mit fraglichen Mutationen. Es konnten mittels SSCP- Analyse 4 Proben mit einem veränderten Bandenmusters im Polyacrylamidgel und 3 weitere Proben mittels DHPLC aufgrund einer Abweichung der Peakgröße im Chromatogramm im Vergleich zur mitgeführten Zelllinie H446 nachgewiesen werden.

Wie aus Tabelle 43 ersichtlich, konnten die Ergebnisse der SSCP- Analyse nicht mit der DHPLC- Methode bestätigt werden. Beide Methoden liefern verschiedene Proben mit fraglichen Mutationen in unterschiedlichen Exons. Um eine vorhandene Mutation die mittels SSCP- oder DHPLC- Analyse möglicherweise gefunden wurde, zu verifizieren und ihre genaue Position bestimmen zu können, erfolgte deshalb die Aufreinigung und anschließende Sequenzierung aller PCR- Produkte. Zusätzlich wurde aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse bei den Mutationsanalysen der Primärtumoren auf die SSCP- und DHPLC- Analyse verzichtet und die Proben mittels direkter Sequenzierung auf Mutationen im Exon 18 bis 21 des EGFR- Gens untersucht.

3.8.1.3. Sequenzierung

Die DNA- Sequenzierung wurde nach Anleitung des Herstellers mit Hilfe der nicht-radioaktiven Sequenzierungsmethode durchgeführt. Die Sequenzreaktionen der PCR- Produkte wurden mit Hilfe der Software Chromas ausgewertet und gezielt nach bereits in der Literatur (Lynch TJ. et al, 2004, Pao W. et al, 2004) beschriebene Mutationssequenzen gesucht. Zuvor wurden die Sequenzen mit der jeweiligen Originalsequenz in BLAST auf eventuelle Unterschiede verglichen. Mit Hilfe der Sequenzierung wurde die Basenabfolge der amplifizierten Fragmente bestimmt und bei insgesamt 9 Proben Sequenzvarianten erkannt. So konnte im Exon 18 bei einer progredienten Adenokarzinomprobe (FA4) auf DNA- Ebene ein Austausch der Purinbase Guanin durch die Purinbase Adenin an Basenposition 2165 nachgewiesen werden (Abbildung 46), welche in der Literatur bisher nicht beschrieben ist. Durch diese Transition ändert sich das dritte Nukleotid des Kodons gcg zu gca. Da aber sowohl das

Kodon gcg als auch das Kodon gca für Alanin (A) kodieren, hat diese Basensubstitution keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz, so dass von einer stummen Mutation ausgegangen werden kann, die ohne Folgen bleibt. Die für das Exon 18 bereits in der Literatur beschriebenen Punktmutationen wie z.B. E709V; I715S; G719S und S720F (Shigematsu H. et al, 2005, Pao W. et al, 2004) konnte jedoch im Rahmen dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

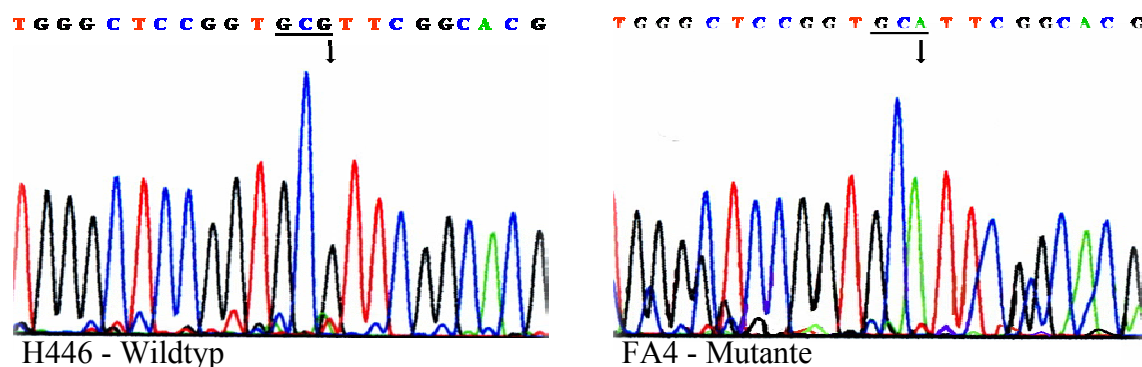


Abbildung 46: Die Sequenzen von einer Tumorprobe (FA4) im Vergleich zu H446 vom Exon18. Links ist die Basenabfolge der Negativkontrolle H446 dargestellt. Rechts ist die DNA- Sequenz der progredienten Tumorprobe FA4 zu sehen. An Basenposition 2165 erfolgte der Austausch von Guanin (Pfeil - schwarzer Peak) durch Adenin (Pfeil - grüner Peak). A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Im Exon 20 konnten bei den Primärtumoren bei insgesamt 5 Proben (P1, P3, A2, A5 und A9) sowie bei drei weiteren progredienten Proben (FP4, FA9 und FA11)

Basensubstitutionen nachgewiesen werden (Abbildung 47). In diesem Fragment konnte an Basenposition 2361 ein Austausch von Adenin durch Guanin beobachtet werden. Dies hat zur Folge, dass sich das dritte Nukleotid des Kodons von caa zu cag ändert. Aber auch diese beiden Kodons kodieren für eine Aminosäure, in diesem Fall für Glutamin (Q).

Dadurch kann diese detektierte Sequenzvariation als eine weitere stumme Mutation angesehen werden. Da sich die gefundene Sequenzvariante des Exon 20 bei 7 weiteren Proben wiederholt, kann von einem Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP), d.h. das Vorkommen von wenigstens zwei oder mehreren Allelen mit signifikanter Frequenz in einer Population, ausgegangen werden. In der Literatur wurden bereits mehrere Punktmutationen für das Exon 20 beschrieben wie z.B. R776C und T790M, unter anderem konnte auch der Einzelnukleotidpolymorphismus an Basenposition 2361 nachgewiesen werden (Pao W. et al, 2005; Pao W. et al, 2004; Shigematsu H. et al, 2005; Kosaka T. et al, 2004).

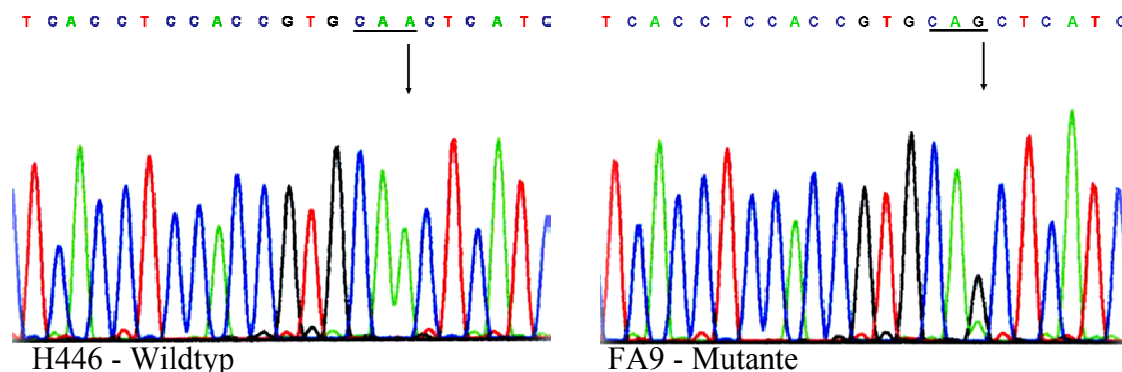


Abbildung 47: Die Sequenzen von einer Tumorseite (FA9) im Vergleich zu H446. Links ist die Basenabfolge der Negativkontrolle H446 dargestellt. Rechts ist die Sequenz der Probe Forb34 zu sehen. An Basenposition 2361 erfolgte der Austausch von Adenin (Pfeil - grüner Peak) durch Guanin (Pfeil - schwarzer Peak). A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Auch mit Hilfe der Sequenzierung konnten keine Mutationen in den „hot spot“ – Regionen des EGFR- Genes nachgewiesen werden. So wurden keine Mutationen, wie die in der Literatur beschriebenen Deletionen (E746_A750del; L747_S752del) im Exon 19 oder Punktmutationen im Exon 21 (H835L; L858R; L861Q), gefunden (Pao W. et al, 2004; Shigematsu H. et al, 2005; Tomizawa Y. et al, 2005).

In Tabelle 43 ist eine Zusammenfassung der gefundenen Mutationen wiedergegeben.

Patient	Diagnose	Exon	Mutation- Position in der DNA- Sequenz	Mutation auf Proteinebene	Mutationstyp
FA4	progredientes Adenokarzinom	18	2165G>A Transition	A722A	stumme Mutation
P1	Plattenepithelkarzinom	20	2361A>G Transition	Q787Q	stumme Mutation
P3	Plattenepithelkarzinom	20	2361A>G Transition	Q787Q	stumme Mutation
A2	Adenokarzinom	20	2361A>G Transition	Q787Q	stumme Mutation
A5	Adenokarzinom	20	2361A>G Transition	Q787Q	stumme Mutation
A9	Adenokarzinom	20	2361A>G Transition	Q787Q	stumme Mutation
FP4	progredientes Plattenepithelkarzinom	20	2361A>G Transition	Q787Q	stumme Mutation
FA9	progredientes Adenokarzinom	20	2361A>G Transition	Q787Q	stumme Mutation
FA11	progredientes Adenokarzinom	20	2361A>G Transition	Q787Q	stumme Mutation

Tabelle 43: Zusammenfassung der detektierten Mutationen. Es konnten in 9 Proben Transitionen nachgewiesen werden. Da aber jeweils das dritte Nukleotid eines Kodons betroffen war, kam es zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz, so dass kein mutierter Phänotyp entstand. A= Adenokarzinom, P= Plattenepithelkarzinom, FA= progredientes Adenokarzinom, FP= progredientes Plattenepithelkarzinom

Vergleicht man die drei Methoden, die für die Mutationsanalyse verwendet wurden, so zeigen die Ergebnisse, dass die in der SSCP- Analyse auffälligen Proben durch die

Sequenzierung bestätigt werden. Dem gegenüber zeigen die Proben, die in der DHPLC-Analyse ermittelt wurden, keine Veränderungen in der Basenabfolge (Tabelle 44).

Probe	SSCP- Analyse	DHPLC- Analyse	Sequenzierung
FP2	unverändert	Exon 21, breiterer Peak im Vergleich zur Kontrolle	unverändert
FP4	Exon 20, zusätzliche Bande im Gel	unverändert	SNP im Exon 20
FA4	Exon 18, zusätzliche Bande im Gel	Exon 20, breiterer Peak im Vergleich zur Kontrolle	SNP im Exon 18
FA6	unverändert	Exon 19 und Exon 20, breiterer Peak im Vergleich zur Kontrolle	unverändert
FA9	Exon 20, zusätzliche Bande im Gel	unverändert	SNP im Exon 20
FA11	Exon 20, zusätzliche Bande im Gel	unverändert	SNP im Exon 20

Tabelle 44: Zusammenfassung der mittels SSCP-, DHPLC- Analysen und Sequenzierung ermittelten Ergebnisse. FA= progredientes Adenokarzinom, FP= progredientes Plattenepithelkarzinom; SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus

Zusammenfassend bestätigt die Sequenzierung die in der SSCP- Analyse auffälligen Proben (Tabelle 44). Jedoch erfolgte in 8 Proben lediglich der Nachweis von einem bereits in der Literatur beschriebenen Einzelnukleotidpolymorphismus des Exon 20 sowie in einer weiteren Probe der Nachweis einer stummen Mutation im Exon 18 (Tabelle 44). Dass keine weitere Mutation gefunden wurde, liegt vermutlich daran, dass häufig mutierte Allele nur zu einem geringen Anteil im Tumorgewebe vorkommen und dass das untersuchte Tumorkollektiv nur aus insgesamt 43 Proben bestand.

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse im Rahmen dieser Studie belegen keinen Zusammenhang zwischen identifizierten Mutationen im EGFR- Gen und Fortschreiten der Erkrankung. Vergleicht man jedoch die Anzahl der analysierten Tumورproben aus den oben erwähnten Studien mit dem Tumorkollektiv, welches im Rahmen dieser Studie analysiert wurde, so wird ersichtlich, dass weitere Proben für eine klare Aussage notwendig sind.

3.8.2. Immunhistochemischer Nachweis des EGF- Rezeptors

Für viele Karzinome konnte eine erhöhte EGFR- Aktivität mit einem vermehrten Tumorwachstum in Zusammenhang gebracht werden. Einige Studien legen die Vermutung nahe, dass EGFR- vermittelte Signale auch andere Aspekte der Tumورprogression beeinflussen, wie beispielsweise Angiogenese und Metastasierung. Es konnte bisher gezeigt werden, dass eine EGFR- Überexpression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und Tumورprogression korreliert (Salomon DS. et al, 1995; Hong WK. et al, 2000). Um mögliche Unterschiede in der EGFR- Expression zwischen primären und fortschreitenden Lungenkarzinomen zu identifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunhistochemie die EGFR- Expression auf Proteinebene in Gewebeschnitten primärer und progredienter nichtkleinzelliger Lungenkarzinomproben

untersucht. Für diese Analyse konnte auf Paraffinmaterial von weiteren Patienten mit einem Lungenkarzinom zurückgegriffen werden. So konnten zu den 31 Proben aus Kryomaterial 12 weitere Proben aus Paraffin genutzt werden. Insgesamt wurden 21 Adenokarzinomproben (9 Primärtumorproben und 12 progrediente Tumorproben) und 22 Plattenepithelkarzinomproben (9 Primärtumorproben und 13 progrediente Tumorproben) untersucht. Nach der Inkubation des Gewebeschnittes mit dem EGFR- Antikörper konnten die Tumorzellen von den Nichttumorzellen innerhalb des Gewebeschnittes sowohl bei den Primärtumoren als auch in den progredienten Tumorproben eindeutig voneinander abgegrenzt werden (Abbildung 48 und 49).

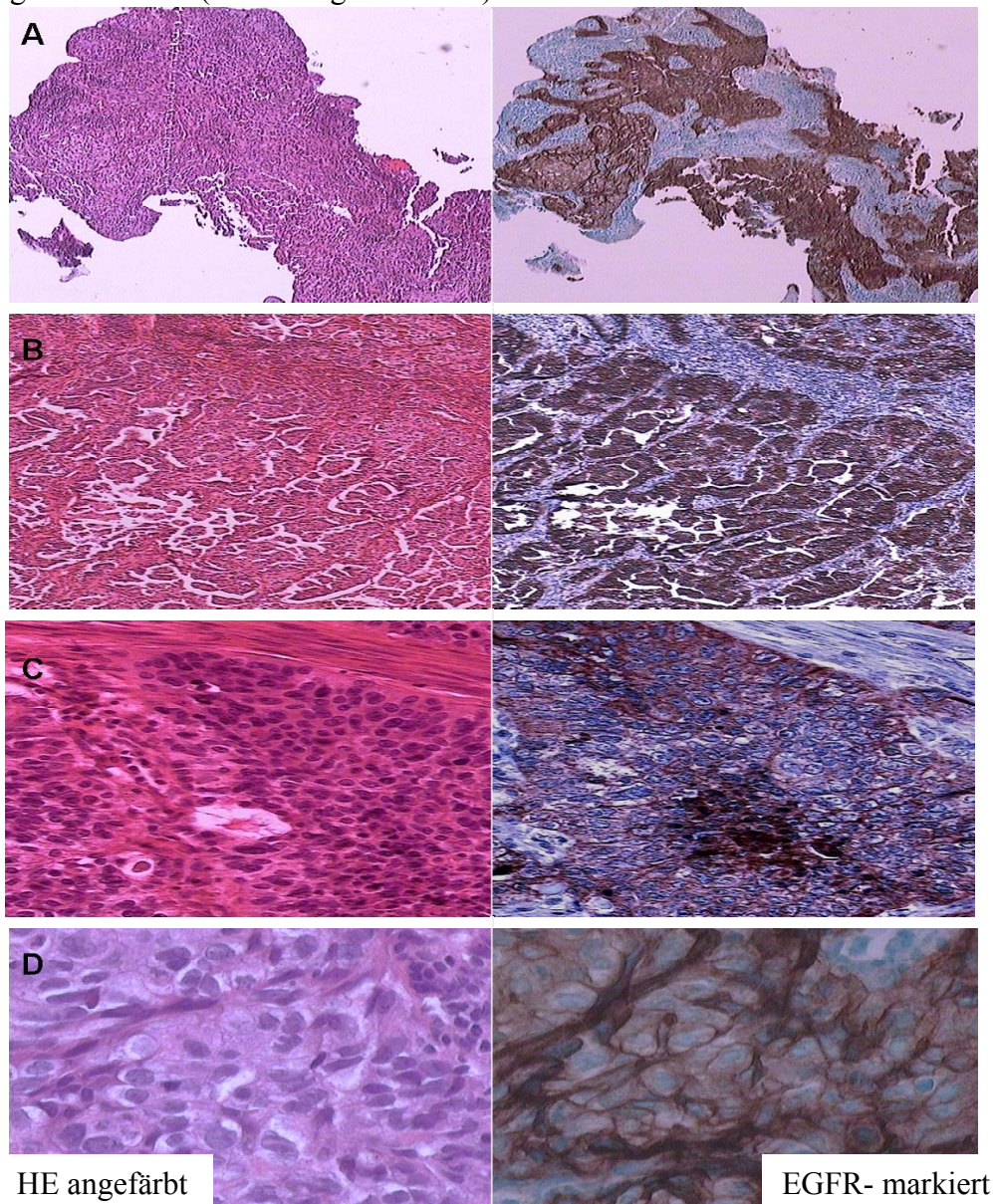


Abbildung 48: Darstellung der EGFR- markierten Gewebeschnitte des Adenokarzinoms in A) 4-fach Vergrößerung, B) 10-fach Vergrößerung, C) 20-fach Vergrößerung und D) 40-fach Vergrößerung. Auf der linken Seite sind die Hämatoxylin-Eosin- Übersichtsfärbungen (HE) und auf der rechten Seite die Gewebeschnitte nach der EGFR- Antikörper- Inkubation abgebildet. Als Nachweis des membranständigen EGF- Rezeptors konnte die braun gefärbte Membran der Tumorzellen unter dem Mikroskop in allen Vergrößerungsstufen eindeutig erkannt werden. Der Zellkern erschien aufgrund der Gegenfärbung mit Methylgrün türkis.

Auch bei den Plattenepithelkarzinomen konnte in beiden Tumorkollektiven EGFR immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abbildung 49).

Auf den Fotos der markierten Plattenepithelkarzinome war zu erkennen, in welchen Zellen EGFR exprimiert wurde. Zudem konnte ebenfalls bei einer weiteren Vergrößerung die Lokalisation des Proteins in der Zellmembran gezeigt werden (Abbildung 49C und 49D). Zur Quantifizierung der Färbereffizienz wurden Kontrollobjekträger mit zwei formalinfixierten, paraffineingebetteten humanen Zelllinien (CAMA-1, Expressionslevel : 0 und HT-29, Expressionslevel: 2 +) mit Score- Zahlen für die Färbungsintensität von DAKO genutzt.

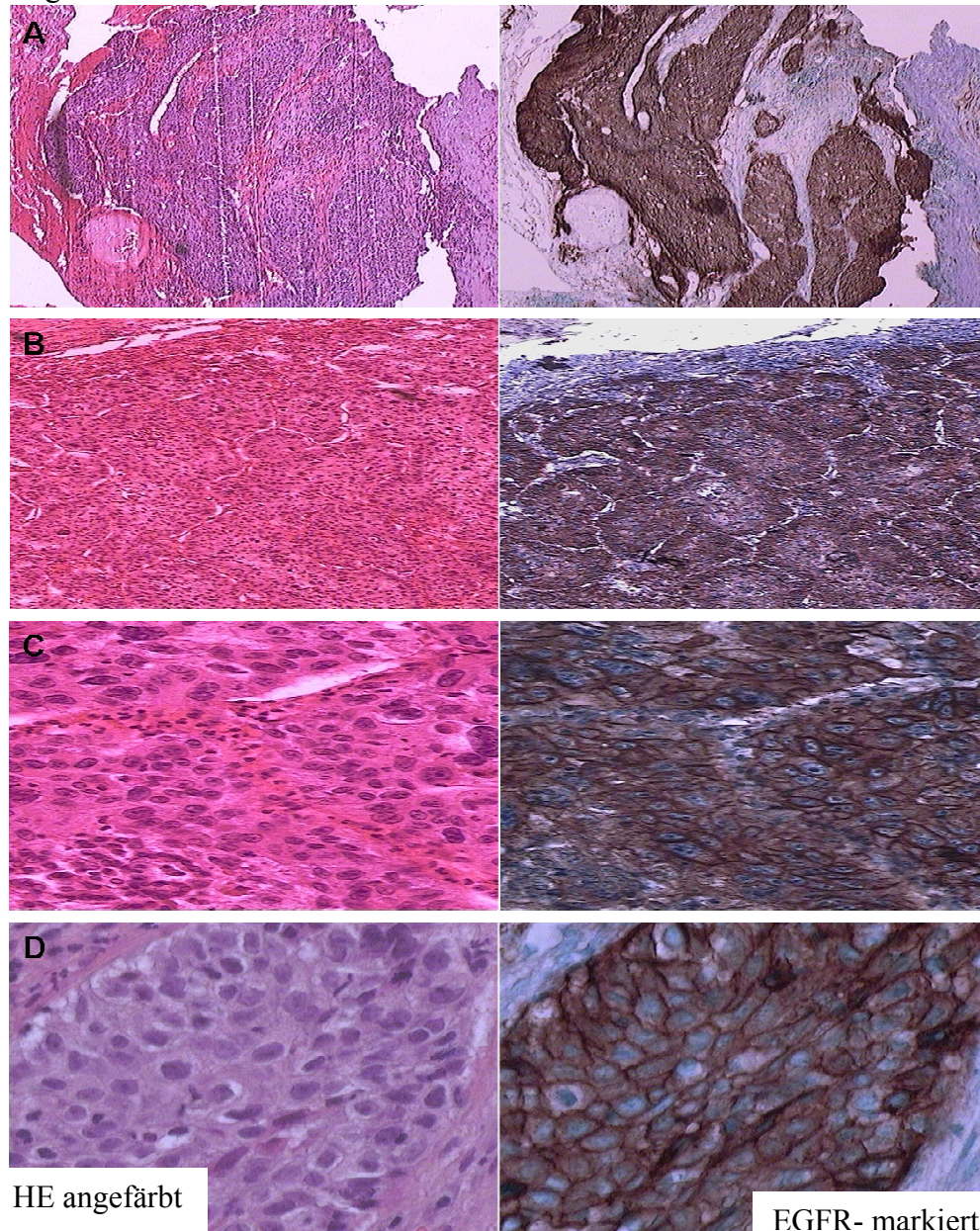


Abbildung 49: Darstellung der EGFR- markierten Gewebeschnitte des Plattenepithelkarzinoms in A) 4-fach Vergrößerung, B) 10-fach Vergrößerung, C) 20-fach Vergrößerung und D) 40-fach Vergrößerung. Auf der linken Seite sind die Hämatoxylin-Eosin- Übersichts-färbungen (HE) und auf der rechten Seite die Gewebeschnitte nach der EGFR- Antikörper- Inkubation abgebildet. Die EGFR- markierten Zellen erscheinen braun angefärbt, der Zellkern erscheint aufgrund der Gegenfärbung mit Methylgrün türkis.

Mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse wurden von insgesamt 43 untersuchten Tumorproben beim primären Adenokarzinom 6 Proben (67%) mit einer EGFR-Überexpression, 2 Tumorproben (22%) mit einer mittleren EGFR- Expression und eine Probe ohne Farbreaktion d.h. als negativ nachgewiesen. In den progredienten Adenokarzinomen wurden 8 Tumorproben (67%) mit einer EGFR- Überexpression, eine Probe (8%) mit einer mittleren EGFR- Expression und 3 negative Proben (25%) nachgewiesen (Abbildung 50) und somit keinen signifikanten Unterschied zu den Primärtumoren gezeigt werden.

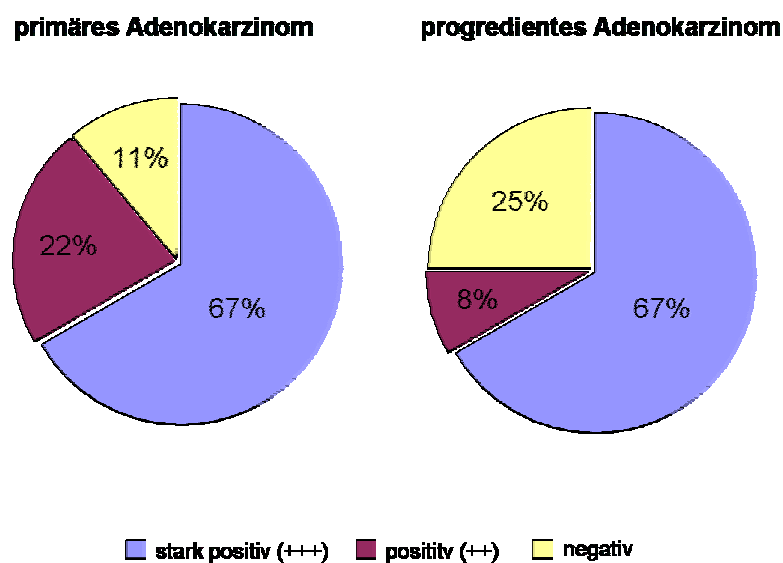


Abbildung 50: Darstellung der Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises von EGFR im Adenokarzinom.

Im primären Plattenepithelkarzinom konnten 8 Proben (89%) mit einer EGFR-Überexpression und eine Probe (11%) mit einer mittleren EGFR- Expression nachgewiesen werden. Im progredienten Plattenepithelkarzinom wurden 11 Proben (85%) mit einer EGFR- Überexpression und 2 Proben (15%) mit einer mittleren EGFR- Expression nachgewiesen (Abbildung 51). Auch hier war kein signifikanter Unterschied in der EGFR- Expression zu erkennen.

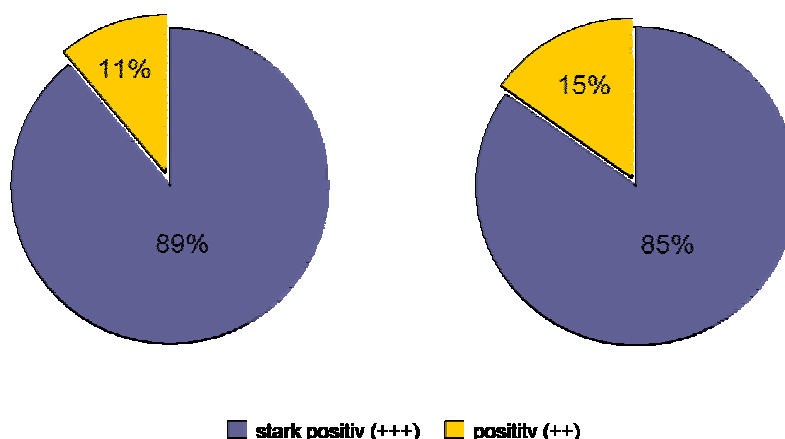
primäres Plattenepithelkarzinom**progredientes Plattenepithelkarzinom**

Abbildung 51: Darstellung der Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises von EGFR im Plattenepithelkarzinom.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Immunhistochemie sowohl in den Primärtumoren als auch in den progredienten Lungenkarzinomen in der Mehrzahl der untersuchten Proben eine starke Expression des EGF- Rezeptors nachgewiesen werden. Vergleicht man die Primärtumoren mit den progredienten Tumoren, wird zwar eine geringe Veränderung der EGFR- Expression ersichtlich. So verändert sich im progredienten Adenokarzinom nicht die Anzahl der Tumorproben mit einer dreifach- positiven EGFR- Überexpression, jedoch nehmen die zweifach- positiven EGFR- Proben zu Gunsten der negativen progredienten Tumorproben um 14% ab. Auch beim progredienten Plattenepithelkarzinom ist eine geringe Veränderung der EGFR- Expression zu erkennen. Hier kommt es zu einer Abnahme der Tumorproben mit einer dreifach- positiven EGFR- Überexpression von 4% zu Gunsten der zweifach- positiven EGFR- Proben. Aber diese Unterschiede sind nicht signifikant und auch zu gering, um eine klare Aussage machen zu können. Darüber hinaus zeigen auch die Ergebnisse der Oligonukleotid- Arrays mit einem „Fold Change“ von 1,02 beim progredienten Adenokarzinom und einem „Fold Change“ von 1,15 beim progredienten Plattenepithelkarzinom im Vergleich zum jeweiligen Primärtumor keine Veränderungen auf Genexpressionsebene.

4. Diskussion

Die Entstehung des Lungenkarzinoms ist ein multifaktorieller Prozess und ist die Folge von Veränderungen verschiedenster zellulärer Regulationsmechanismen die schließlich zu ungehemmter Proliferation, infiltrativem Wachstum in gesunden Geweben und Metastasierung führen. Der Fortschritt bei der Aufklärung der hieran beteiligten Gene und Signalwege zeigte früh, dass die Störung von sowohl Zellzyklus-Regulation als auch Zelltod- Mechanismen, wesentliche Faktoren beim Übergang von normalem zu malignem Zellwachstum darstellen. Ist ein Lungentumor in Folge derartiger genetischer Veränderungen entstanden, dann können zusätzliche Störungen der Proliferations- und Apoptosekontrolle zur weiteren Enthemmung der Zellproliferation und zunehmender Therapieresistenz führen. Es kommt zur Tumorprogression. Ursächlich hieran beteiligt sind neben den eigentlichen Zellzyklus- und Apoptose- Regulatoren auch Störungen in Signalwegen, die genetische und chromosomale Stabilität kontrollieren, wie z.B. DNA-Reparatur und Zellzyklus- Kontrolle, aber auch Veränderungen des Tumormikromilieus und Veränderungen in der Tumor- Angiogenese (Malaney S. & Daly RJ., 2001). Während der Tumorigenese unterliegt die Genexpression einer differentiellen Regulation durch ein komplexes Netzwerk an Faktoren. Um die Bedeutung der differentiellen Regulation für das Lungenkarzinom aufzuklären, wurden in den vergangenen Jahren in mehreren Studien Mikroarray – Analysen von Lungenkarzinomen (Nacht M. et al, 2001; Amatscheck S. et al, 2004; Kettunen E. et al, 2004; Petty RD. et al, 2004) und Lungenkarzinomzelllinien (Sugita M. et al, 2002; Whitsett JA. et al, 2004; Ju Z. et al, 2005; Coe BP. et al, 2006) durchgeführt. In der Studie von Amatscheck beispielsweise wurden Genexpressionsprofile mittels cDNA- Arrays von 11 Adenokarzinomen und 11 Plattenepithelkarzinomen der Lunge, 8 Nierenzellkarzinome und 16 Brusttumorproben im Vergleich zu 22 unterschiedlichen Nichttumorproben, verschiedenen Gewebeursprungs (lediglich 2 Proben aus Lungengewebe) erstellt. Als Ergebnis konnte die Arbeitsgruppe mit Hilfe der cDNA- Arrays in den Tumorproben insgesamt 527 differentiell exprimierte Gene nachweisen. Darunter waren Gene, die bereits im Zusammenhang mit den untersuchten Tumoren beschrieben wurden z.B. Surfactant A2 im Adenokarzinom oder RAN im Plattenepithelkarzinom. Es konnten aber auch Gene nachgewiesen werden, die noch nicht im Zusammenhang mit der Tumorigenese beschrieben wurden wie z.B. Gene, die in der Mineralisierung der Knochenmatrix involviert sind (OSN [Osteopontin] und OSF-2 [Osteoblast specific factor 2]) (Amatscheck S. et al, 2004). In der Studie von Nacht erfolgte eine molekulare Charakterisierung mittels serieller Analyse der Genexpression (SAGE) von insgesamt 4 normalen Lungenepithelzelllinien (NHBE-1, NHBE-2, SAEC-1 und SAEC-2), 2 Adenokarzinomproben, 1 Adenokarzinomzelllinie (A549) und 2 Plattenepithelkarzinomproben. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden des Weiteren cDNA- Arrays von insgesamt 32 weiteren Proben angefertigt. Auch diese Arbeitsgruppe konnte eine Vielzahl differentiell exprimierter Gene nachweisen. So wurde im Adenokarzinom mit einer erhöhten Expression Gene, wie z.B. Surfactant A2, B und

Mucin 1 und mit einer verminderten Expression Gene, wie z.B. 14-3-3 δ (Stratifin) und p21 identifiziert (Nacht M. et al, 2001). Die Arbeitsgruppe um Ju erstellte Genexpressionsprofile von der Tumorzelllinie H292 (human mucoepidermoid pulmonary carcinoma) im Vergleich zur Zelllinie NHTBE (normal human tracheobronchial epithelial) unter Verwendung von Oligonukleotid- Arrays. Auch diese Studie lieferte eine große Anzahl an unterschiedlich exprimierten Genen.

Diese Studien lieferten zwar alle eine Vielzahl von dysregulierten Genen, jedoch sind die Daten sehr heterogen und es ist schwierig diese Ergebnisse mit einander zu vergleichen, da unterschiedliche Methoden sowie unterschiedliches Gewebematerial zur Erstellung der Genexpressionsprofile verwendet wurden. Auch fand die Kombination von LCM und Genexpressionsanalyse bisher nur in wenigen Studien an nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen im Vergleich zum Nichttumor Anwendung wie z.B. in der Studie von Kikuchi, in der 37 nichtkleinzelligen Lungenkarzinomproben mittels LCM sowie anschließender cDNA- Arrayanalyse aufgearbeitet wurden. In dieser Studie konnten anhand der differentiell exprimierten Gene die Adenokarzinome von den Plattenepithelkarzinomen getrennt werden (Kikuchi T. et al, 2003).

Bisher gibt es keine veröffentlichte Studie, in der die Kombination aus LCM von Tumorzellen und anschließender Genexpressionsanalyse mittels Oligonukleotid- Arrays von Affymetrix im Vergleich zu Normalgewebe Anwendung fand. Die Notwendigkeit einer Mikrodissektion ergibt sich jedoch aus der Heterogenität der Zellen im und um den Tumorarealen. Eine Verunreinigung der zu untersuchenden Tumorzellen durch normale Epithelzellen, Blutgefäße und Tumornekrosen kann zu einer Fehleinschätzung bezüglich der differentiell exprimierten Gene der Tumore im Vergleich zum Normalgewebe führen (Simone NL. et al, 1998). Darüber hinaus wurden bisher keine Oligonukleotid- Array-Analysen von dem kleinzelligen Lungenkarzinom im Vergleich zum Normalgewebe durchgeführt.

Deshalb wurden im Rahmen unserer Studie erstmals Genexpressionsprofile in Kombination mit der LCM vom Adenokarziom, Plattenepithelkarzinom und vom kleinzelligen Lungenkarzinom im Vergleich zum Nichttumor durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass spezifische Muster von transkriptionellen Veränderungen für die einzelnen histologischen Subgruppen bestehen und, dass diese transkriptionellen Veränderungen dazu geeignet sind, einen Klassifikator für die Diagnostik zu erstellen.

Des Weiteren können die ermittelten Daten dazu genutzt werden, mögliche molekulare Zielstrukturen wie z.B. Kinasen für neue Therapieansätze zu identifizieren (Hanke JH. et al, 1996; Levitzki A, 2003). Darüber hinaus konnten im Rahmen dieser Studie transkriptionelle Veränderungen, die einen Primärtumor von einem nach Chemotherapie rezidierten oder progredienten Tumor unterscheiden, identifiziert werden.

Des Weiteren wurde auf Proteinebene gezeigt, dass zwischen Primärtumor und progredienten Tumor hinsichtlich der EGFR- Expression kein signifikanter Unterschied zu finden ist.

4.1. Das primäre Lungenkarzinom

4.1.1. Veränderte chromosomale Regionen im primären

Lungenkarzinom

Eine zentrale Bedeutung in der Tumorigenese des Lungenkarzinoms wird den Tumorsuppressorgen zugeschrieben, deren onkogene Wirkung sich durch ihren Funktionsverlust (in der Regel Inaktivierung durch Mutation/ Deletion) offenbart. Zur Identifizierung möglicher Tumorsuppressorgene, erfolgte zunächst eine Analyse der Daten hinsichtlich möglicher chromosomaler Regionen mit gehäuft auftretenden unterexprimierten Genen.

Cytogenetische Untersuchungen sowie Allelotypisierungsstudien haben neben chromosomale Regionen mit bereits bekannten und gut charakterisierten Tumorsuppressorgen auch solche gefunden, bei denen der zugrunde liegende genetische Defekt noch nicht aufgeklärt ist. Die am häufigsten auftretende Veränderung ist die Deletion einer Kopie von Chromosom 3p in mehr als 90% der SCLC bzw. mehr als 80% der NSCLC, welche auf die Existenz mehrerer Tumorsuppressorgene hindeutet. Eine Reihe genetischer Studien entdeckten schon in den achtziger Jahren, dass das Chromosom 3 im Lungenkarzinom eine besondere Rolle spielen muss, und in jüngster Zeit wurden sogar homozygote 3p-Deletionen kartiert und kloniert mit dem Ziel, die darin enthaltenen Gene und ihre Bedeutung für das Lungenkarzinom aufzuklären, bislang blieb jedoch ein Erfolg hinsichtlich der Identifizierung eines relevanten Gens aus (Hung J. et al, 1995; Chmara M. et al, 2004; Iijima H. et al, 2004). Die Allelotypisierungsanalyse mit mehreren Markern impliziert mindestens die drei Regionen 3p25-p26, 3p21.3-22 und 3p14-cen (Hibi K. et al, 1992). In Lungentumorzelllinien wurden 5 separate homozygote Deletionen beschrieben, drei bei 3p21, eine bei 3p12-p13 und eine bei 3p14.2 (Rabbitts P. et al, 1990; Drabkin HA. et al, 1992; Latif F. et al, 1992; Todd S. et al, 1997; Ma J. et al, 2006). Weitere Allelverluste sind für die Regionen 1p, 1q, 6p, 6q, 8p, 9q, 13q, 16q, 17q, 18q, 21q und 22q beschrieben worden (Sekido Y. et al, 1998; Balsara BR. et al, 2002; Ma J. et al, 2006; Fong KM. et al, 2006), welche noch nicht charakterisierte Kandidatengene beherbergen. Häufige Allelverluste auf 13q mit geringerer Inzidenz von RB-Mutationen (Tamura K. et al, 1997) sowie eine höhere Inzidenz von LOH auf Chromosom 17p13.3 als auf 17p13.1 und entsprechenden p53-Mutationen (Konishi H. et al, 1998) sprechen außerdem auch für die Existenz weiterer Tumorsuppressorgene auf diesen Chromosomenarmen. Mit Hilfe der Oligonukleotid- Arrays konnten auch im Rahmen unserer Studie chromosomale Regionen mit gehäuft auftretenden unterexprimierten Genen beobachtet werden, welche mit den oben genannten Regionen korrelieren und als Hinweis auf vorliegende Deletionen gesehen werden kann (Tabelle 45, 46 und 47). In Tabelle 45 sind die chromosomalen Regionen mit den unterexprimierten Genen des Adenokarzinoms zusammengefasst.

Chromosomale Lokalisation	Genname	Gensymbol	"Fold Change"
1p13.3	vav 3 oncogene	VAV3	0,35
1p31-p22	chloride channel, calcium activated, family member 2	CLCA2	0,14
1p33-p32.2	c-myc binding protein	MYCBP	0,36
1p34.1	tetraspan 1	TSPAN1	0,08
1p34-p12	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	CYP4B1	0,07
1p35.1	dynein, axonemal, light intermediate polypeptide 1	DNALI1	0,15
1p35.3-p34.1	tektin 2 (testicular)	TEKT2	0,28
3p21.3	leucine zipper transcription factor-like 1	LZTFL1	0,27
3p21.3	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F	SEMA3F	0,45
3p25	oxytocin receptor	OXTR	0,31
3p26.1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	CHL1	0,36
3q13.3-q21	uroplakin 1B	UPK1B	0,12
3q21	cystatin A (stefin A)	CSTA	0,21
3q21-q25	carboxypeptidase A3 (mast cell)	CPA3	0,39
3q25.1	Myeloid leukemia factor 1	MLF1	0,49
3q25.1-q25.2	profilin 2	PFN2	0,37
3q26.2-qter	apolipoprotein D	APOD	0,40
3q27.3	28kD interferon responsive protein	IFRG28	0,41
3q27-q29	tumor protein p73-like	TP73L	0,12
6q22	male germ cell-associated kinase	MAK	0,29
6q22.33-q23.1	interleukin 20 receptor, alpha	IL20RA	0,49
6q22-q23	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	MYB	0,39
6q23-q24	vanin 3	VNN3	0,41
8p21	NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)	NKX3-1	0,37
8p21-p12	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	CLU	0,26
8p23.1-p21.3	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	NAT1	0,36
9q21.13	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	ALDH1A1	0,16
9q34	chromosome 9 open reading frame 9	C9orf9	0,39
9q34.1	endonuclease G	ENDOG	0,43
13q12	mitochondrial intermediate peptidase	MIPEP	0,41
13q12.1	tetratricopeptide repeat domain 10	TTC10	0,42
13q12.3-q13	cyclin A1	CCNA1	0,39
13q13	neurobeachin	NBEA	0,24
16q13-q22.1	carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	CES1	0,32
16q21	likely ortholog of mouse gene trap locus 3	GTL3	0,47
16q22	Ras-related associated with diabetes	RRAD	0,33
16q22.1	brain specific protein /// brain specific protein	CGI-38	0,07
16q22.2-q22.3	craniofacial development protein 1	CFDP1	0,41

Fortsetzung Tabelle 45			
Chromosomale Lokalisation	Genname	Gensymbol	"Fold Change"
17p11.2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	ALDH3A1	0,04
17p11.2	B9 protein	EPPB9	0,29
17p12	dynein, axonemal, heavy polypeptide 9	DNAH9	0,28
17p13.3	arachidonate 15-lipoxygenase	ALOX15	0,27
17q11.2	chemokine (C-C motif) ligand 14 /// chemokine (C-C motif) ligand 15	CCL14 /// CCL15	0,25
17q21.2	keratin 15	KRT15	0,06
18q12.1	desmocollin 3	DSC3	0,32
18q12.1-q12.2	desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen)	DSG3	0,48
18q21.3	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	SERPINB5	0,25
18q21.3	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	SERPINB3	0,04
21q22.3	trefoil factor 3 (intestinal)	TFF3	0,22
21q22.3	receptor-interacting serine-threonine kinase 4	RIPK4	0,49
22q11.2	rhabdoid tumor deletion region gene 1	RTDR1	0,24
22q12.2	LIM domain kinase 2	LIMK2	0,46
22q13.1	RAB, member of RAS oncogene family-like 4	RABL4	0,27
22q13.33 /// 2q13	RAB, member of RAS oncogene family-like 2B /// RAB, member of RAS oncogene family-like 2A	RABL2B /// RABL2A	0,30

Tabelle 45: Im Adenokarzinom mit einem q- Value kleiner 2,5 unterexprimierte Gene auf bereits in der Literatur beschriebenen deletierten chromosomalen Regionen.

Auch für das Plattenepithelkarzinom konnten im Rahmen dieser Studie in einigen chromosomalen Regionen gehäuft vermindert exprimierte Gene gezeigt werden (Tabelle 46).

Chromosomale Lokalisation	Genname	Gensymbol	"Fold Change"
1p21	amylase, alpha 2A; pancreatic	AMY2A	0,39
1p22-p21	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	F3	0,26
1p31.3-p31.2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	CYP2J2	0,44
1p33-p32.2	c-myc binding protein	MYCBP	0,49
1p34.1	tetraspan 1	TSPAN1	0,07
1p34-p12	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	CYP4B1	0,05
1p35.1	dynein, axonemal, light intermediate polypeptide 1	DNALI1	0,16
1p35.3-p34.1	tektin 2 (testicular)	TEKT2	0,28
3p21.3	villin-like	VILL	0,49
3p21.3	leucine zipper transcription factor-like 1	LZTFL1	0,25
3p25	oxytocin receptor	OXTR	0,34
3p26.1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	CHL1	0,28
3q22.1	transferrin	TF	0,45
3q23	plastin 1 (I isoform)	PLS1	0,45
3q23-q25	ceruloplasmin (ferroxidase)	CP	0,32

Fortsetzung Tabelle 46			
Chromosomale Lokalisation	Genname	Gensymbol	"Fold Change"
3q25.32	latexin	LXN	0,34
3q27-q28	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	ST6GAL1	0,47
3q29	mucin 4, tracheobronchial	MUC4	0,22
6q22	male germ cell-associated kinase	MAK	0,29
6q23-q24	vanin 3	VNN3	0,39
8p21	NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)	NKX3-1	0,38
8p21.2	a disintegrin and metalloproteinase domain 28	ADAM28	0,36
8p21-p12	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	CLU	0,27
8p23.1-p21.3	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	NAT1	0,25
9q21.33	golgi phosphoprotein 2	GOLPH2	0,40
9q34	lipocalin 2 (oncogene 24p3)	LCN2	0,13
9q34	chromosome 9 open reading frame 9	C9orf9	0,43
13q12.1	tetratricopeptide repeat domain 10	TTC10	0,45
13q13	neurobeachin	NBEA	0,25
13q31-q34	claudin 10	CLDN10	0,22
16q22	Ras-related associated with diabetes	RRAD	0,25
16q22.1	brain specific protein /// brain specific protein	CGI-38	0,09
17p11.2	B9 protein	EPPB9	0,32
17p12	dynein, axonemal, heavy polypeptide 9	DNAH9	0,29
17p13.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	SERPINF1	0,47
17p13.3	arachidonate 15-lipoxygenase	ALOX15	0,29
17q11.2	chemokine (C-C motif) ligand 14 /// chemokine (C-C motif) ligand 15	CCL14 /// CCL15	0,22
17q21.1-q21.2	chemokine (C-C motif) ligand 11	CCL11	0,50
21q22.3	trefoil factor 3 (intestinal)	TFF3	0,05
21q22.3	trefoil factor 1 (breast cancer, estrogen-inducible sequence expressed in)	TFF1	0,27
21q22.3	transmembrane protease, serine 3	TMPRSS3	0,45
22q11.2	rhabdoid tumor deletion region gene 1	RTDR1	0,27
22q11.22	RAB36, member RAS oncogene family	RAB36	0,33
22q13.1	myoglobin	MB	0,37
22q13.1	RAB, member of RAS oncogene family-like 4	RABL4	0,36
22q13.33 /// 2q13	RAB, member of RAS oncogene family-like 2B /// RAB, member of RAS oncogene family-like 2A	RABL2B /// RABL2A	0,32

Tabelle 46: Im Plattenepithelkarzinom mit einem q- Value kleiner 2,7 unterexprimierte Gene auf bereits in der Literatur beschriebenen deletierten chromosomalen Regionen.

Auch für das kleinzellige Lungenkarzinom sind in der Literatur mehrer Allelverluste auf chromosomale Regionen wie 1p, 3p, 5q und 17p beschrieben worden (Sekido Y. et al, 1998, Krystal GW. et al, 2001, Fong KM et al, 2003). Tabelle 47 zeigt eine

Zusammenfassung der mittels Oligonukleotid- Arrays identifizierten chromosomalen Regionen mit den unterexprimierten Genen des kleinzelligen Lungenkarzinoms.

Chromosomale Lokalisation	Genname	Gensymbol	"Fold Change"
1p13.3	vav 3 oncogene	VAV3	0,49
1p21	amylase, alpha 2A; pancreatic	AMY2A	0,36
1p22-p21	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	F3	0,32
1p31	leptin receptor	LEPR	0,40
1p31.3-p31.2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	CYP2J2	0,46
1p31-p22	chloride channel, calcium activated, family member 2	CLCA2	0,34
1p32-p31	tumor-associated calcium signal transducer 2	TACSTD2	0,43
1p33-p32.2	c-myc binding protein	MYCBP	0,46
1p34.1	tetraspan 1	TSPAN1	0,18
1p34-p12	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	CYP4B1	0,10
1p35.1	dynein, axonemal, light intermediate polypeptide 1	DNALI1	0,27
3p21.3	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	ENTPD3	0,49
3p21.3	villin-like	VILL	0,50
3p21.3	leucine zipper transcription factor-like 1	LZTFL1	0,36
3p25	tissue inhibitor of metalloproteinase 4	TIMP4	0,49
3p25	oxytocin receptor	OXTR	0,38
3p26.1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	CHL1	0,43
5q12.1-q13.2	polo-like kinase 2 (Drosophila)	PLK2	0,49
5q23.3	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4	SLC22A4	0,22
5q31	non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase)	NME5	0,19
5q31.1	PDZ and LIM domain 4	PDLIM4	0,37
5q32	serine protease inhibitor, Kazal type 5	SPINK5	0,43
5q33.3-q34	fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)	FABP6	0,28
17p11.2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	ALDH3A2	0,46
17p11.2	tripartite motif-containing 16	TRIM16	0,50
17p11.2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	ALDH3A1	0,09
17p11.2	B9 protein	EPPB9	0,36
17p12	dynein, axonemal, heavy polypeptide 9	DNAH9	0,35
17p12-p11.2	adenosine A2b receptor	ADORA2B	0,50
17p13.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	SERPINF1	0,36
17p13.3	arachidonate 15-lipoxygenase	ALOX15	0,33

Tabelle 47: Im kleinzelligen Lungenkarzinom mit einem q- Value kleiner 2,7 unterexprimierte Gene auf bereits in der Literatur beschriebenen deletierten chromosomalen Regionen.

Auffällig an den Daten war, dass einige Gene, wie z.B. das Gen MYCBP, welches für das Myc- Bindeprotein kodiert und auf der chromosomalen Region 1p33-p32.2 liegt, sowie das Gen TSPAN1 (Tetraspan1), welches in der chromosomalen Region 1p34.1 liegt, in den untersuchten Lungenkarzinomen eine Unterexpression zeigten. Auch in anderen chromosomalen Regionen konnten Gemeinsamkeiten beobachtet werden. So wurden zwei weitere Gene wie z.B. OXTR, welches für den Oxytocin- Rezeptor und CHL1, welches für das Zelladhäsionsmolekül CHL1 kodiert, mit einer Unterexpression sowohl in den

nichtkleinzelligen als auch im kleinzelligen Lungenkarzinom identifiziert. Beide Gene liegen innerhalb der oft als deletiert beschriebenen chromosomale Region 3p25-p26. und kommen somit als mögliche Tumorsuppressorgene in Frage.

Für das CHL1- Gen wurden bereits Deletionen, beschrieben (Frants SGM. Et al, 2003; Kozma C. et al, 2004). Darüber hinaus wird diskutiert, ob der Verlust des CHL1- Genes möglicherweise Ursache der geistigen Retardierung beim 3p-Syndrom und Syndromen mit Ringformation des Chromosom 3 ist (Angeloni D. et al, 1999). Jedoch konnte eine Deletion des CHL1- Genes noch nicht im Zusammenhang mit Tumoren beschrieben werden (Rökman A. et al, 2005).

Eine Expression des Oxytocin- Rezeptors wurde bereits in verschiedenen Tumoren wie z.B. im Brustkarzinom, Neuroblastom, Gliom und im endometrialen Adenokarzinom im Zusammenhang mit einer Oxytocin- vermittelten Inhibierung der Zellproliferation beobachtet (Cassoni P. et al, 1998; Fay MJ. et al, 1999; Turton NJ. et al, 2001; Morita T. et al, 2004). Jedoch konnte auch bei diesem Gen bisher kein Zusammenhang zwischen einer Deletion und Tumorigenese gezeigt werden.

4.1.2. Einteilung in funktionelle Gruppen

Im ersten Teil der Studie konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl fehl regulierter Gene im primären Lungenkarzinom mittels Oligonukleotid- Arrays identifiziert wurde, die mit den speziellen biologischen Eigenschaften von Tumorzellen einhergehen. So konnten unter anderem Gene identifiziert werden, die auf eine erhöhte Zellproliferation sowie auf eine erhöhte DNA- Reparatur hinweisen. Des Weiteren konnten bekannte Protoonkogene, die in Zellproliferation und Differenzierung eingreifen, mit einer erhöhten Expression nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die in der Zelladhäsion involviert sind und in der Literatur bereits mit Metastasierung in Verbindung gebracht werden. In allen drei Tumorsubtypen konnte eine dysregulierte Expression der Zytoskelett- assoziierten Gene nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden transkriptionelle Veränderungen im Metabolismus aufgezeigt. Vor allem Gene, die in die Entgiftung und Ausscheidung von toxischen Metaboliten involviert sind, zeigten eine verminderte Expression. Des Weiteren konnten Gene, die eine Spezifität für eine Tumorentität haben und nur in einem der untersuchten Tumorsubtypen eine differentielle Expression zeigten, identifiziert werden wie z.B. Surfactant B im Adenokarzinom. Die signifikanten Gene wurden zur detaillierten Auswertung anhand ihrer in der Literatur beschriebenen Funktion in funktionelle Gruppen eingeteilt (Tabelle 22). Die Komplexität der Veränderungen während der Tumorigenese, Progression und Metastasierung wird durch die Vielzahl der Gene aus den unterschiedlichen Bereichen deutlich. Die Schwerpunkte, die in den folgenden Abschnitt diskutiert werden, lagen entsprechend auf den Bereichen Proliferation, DNA- Reparatur, Protoonkogene, Zelladhäsion und Metabolismus.

4.1.2.1. Proliferation

Maligne Tumore sind durch Dysregulation der Zellproliferation gekennzeichnet. Es ist daher nicht überraschend, dass vor allem im kleinzelligen Lungenkarzinom, welches in der Tumorgruppe der neuroendokrinen Tumoren mit dem höchsten Malignitätsgrad geführt wird (Drings P. et al, 2003), die meisten veränderten Zellzyklusgene vorzufinden waren. Insgesamt konnten in diesem Tumorsubtyp 56 überexprimierte Gene, die im Zellzyklus und somit in der Proliferation involviert sind nachgewiesen werden.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass im kleinzelligen Lungenkarzinom bis zu 95% der Tumore und bei den nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen bis zu 30% der Tumore eine Inaktivierung von Rb durch LOH zeigen. Dadurch kommt es zum Verlust der Kontrolle des Zellzyklus, mit der Möglichkeit zur ungebremsten Proliferation. Begünstigt wird dies durch die Überexpression von CyclinE. Aufgrund einer hohen CyclinE- Konzentration können die Zellen verstärkt aus der G₁- Phase in die S- Phase gedrängt werden. Da aber auch CyclinA und CyclinB überexprimiert sind, erfolgt nicht nur ein verstärkter Eintritt der Zellen in die S- Phase, sondern kann auch ein schneller Übergang der Zellen aus der S- Phase in die G₂- Phase bis hin zur M- Phase erfolgen (Abbildung 52).

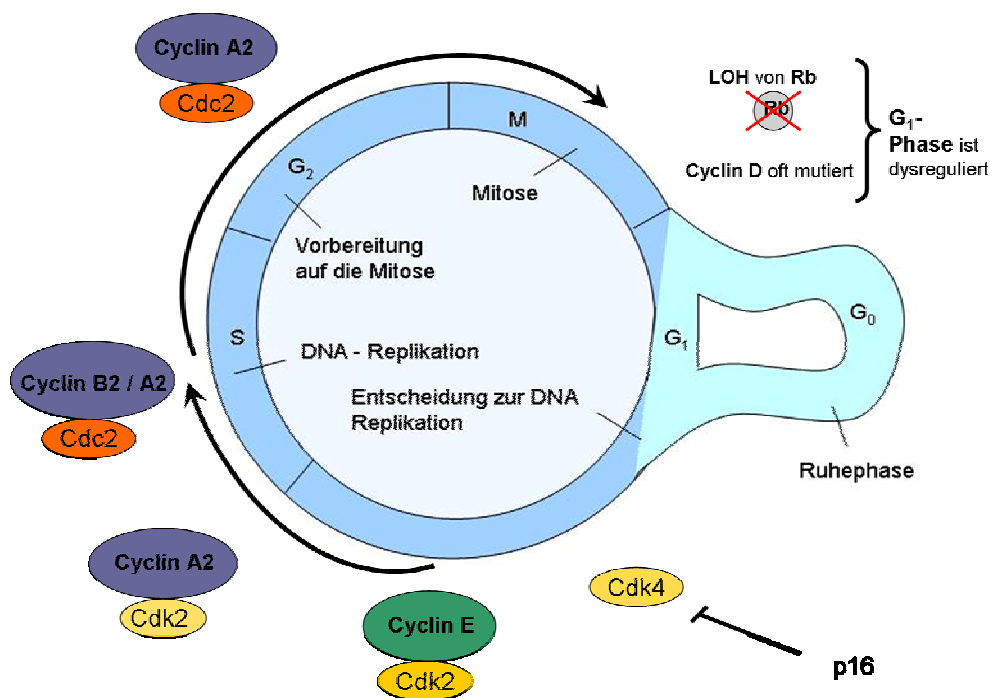


Abbildung 52: Schematische Darstellung der hochregulierten Zellzyklus- assoziierten Gene beim kleinzelligen Lungenkarzinom. Da Rb und CyclinD oft inaktiviert sind, kommt es zur Dysregulation der G₁- Phase. Zusätzlich finden Veränderungen in der CyclinE, CyclinA / B- Expression statt, so dass der Zellzyklus schneller vorangetrieben und ein Verlust der Proliferationskontrolle begünstigt wird. Dargestellt wurden die hoch regulierten Gene des kleinzelligen Lungenkarzinoms.

Auch beim Plattenepithelkarzinom konnte mittels Genexpressionsprofil eine veränderte Cyclin- Expression aufgezeigt werden. Ähnlich wie beim kleinzelligen Lungenkarzinom

kam es hier zu einer Überexpression von CyclinA / B, Cdk4 und Cdc2, was eine Progression der Zellen aus der G₂- Phase in die M- Phase begünstigt und den Zellzyklus ebenfalls schneller vorantreibt. Auch CyclinE und Cdk2 waren vermehrt exprimiert. Vermutlich steht die unkontrollierte Progression von der G₂- Phase in die M- Phase bei diesem Tumorsubtyp im Vordergrund.

Beim Adenokarzinom hingegen konnte nur eine sehr geringe Veränderung in der Expression Zellzyklus- regulierender Gene aufgezeigt werden. Lediglich CyclinA1 war deutlich vermindert exprimiert. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine veränderte Expression von CyclinA1 mit der Tumorigenese und Progression assoziiert ist (Yang R. et al, 1999; Nakamaki T. et al, 2003; Liao C. et al, 2004). CyclinA1 spielt eine wesentliche Rolle in der Progression des Zellzyklus aus der G₁- Phase in die S- Phase (Ji P. et al, 2005; Rivera A. et al, 2006).

Diese Daten bestätigen die, für das kleinzellige Lungenkarzinom in der Literatur beschriebene, hohe Proliferationsrate mit einer Tumorverdopplungszeit von 10 bis 50 Tagen (Deutsche Krebsgesellschaft E.V., 2002; Hansen HH. et al, 1978; Shepherd FA. et al, 1991) und die damit assoziierte schlechte Prognose (Kerr KM. et al., 1984; Wiethage T. et al, 2000; Drings P. et al, 2003).

Diese hohe Proliferationsrate ist auch der Grund für die Sensitivität des kleinzelligen Lungenkarzinoms gegenüber Chemotherapie. Viele Zytostatika wie z.B. Cisplatin, Etoposid und Gemcitabin hemmen die zelluläre DNA- Synthese. Diese Substanzen werden während der DNA- Synthese als Nukleosidtriphosphat in den neu synthetisierten DNA- Strang eingebaut und führen auf diese Weise zu einem Kettenabbruch, wodurch DNA- Strangbrüche erzeugt werden. Die DNA- Synthese wird über diesen Mechanismus komplett gehemmt und die Zelle leitet die Apoptose ein (Rintoul RC. et al, 2002).

Aufgrund der im kleinzelligen Lungenkarzinom vermehrten DNA- Synthese, welche aus einer erhöhten Proliferationsrate resultiert, kommt es auch zu einem vermehrten Einbau des Zytostatikas und damit zu einer erhöhten Chemosensibilität (Leschinger MI. et al, 2005).

4.1.2.2. DNA- Reparatur

Neben der Dysregulation des Zellzyklus konnte auch eine Dysregulation von DNA- Reparaturgenen gezeigt werden. Auch hier konnte im kleinzelligen Lungenkarzinom mit 14 überexprimierten Genen die meisten differentiell exprimierten Gene im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom (8 überexprimierte Gene) und Adenokarzinom (1 unterexprimiertes Gen) nachgewiesen werden. Im kleinzelligen Lungenkarzinom wurde vor allem eine vermehrte Expression von DNA- Reparaturgenen, die bei DNA- Fehlpaarungen wie z.B. PCNA, MSH2 sowie MSH6 und Doppelstrangbrüchen wie z.B. PIR51 und FANCG eine Rolle spielen gezeigt. MSH2 und MSH6 unterstützen unter Bildung des MutS α - Komplexes die Reparatur von allen 8 Base- Base- Fehlpaarungen sowie Insertion – Deletions- Fehlpaarungen, bei der auch das überexprimierte PCNA

essentiell ist (Orre LM. et al, 2006; Iyer RR. et al, 2006). Auch im Plattenepithelkarzinom konnte eine erhöhte Expression von PCNA und MSH6 gezeigt werden. Beim Adenokarzinom wurde hingegen nur MSH3 detektiert, welches deutlich vermindert exprimiert wurde. MSH3 bindet vorzugsweise mit MSH2 als MutS β -Komplex an die DNA, und unterstützt die Reparatur von Insertion- Deletion- Falschpaarungen von 2 bis maximal 10 Nukleotiden (Orre LM. et al, 2006; Chao EC. et al, 2006).

Bereits in einigen Studien konnte im Adenokarzinom eine verminderte DNA-Reparaturaktivität im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom sowie eine vermehrte Expression von MTH1 (MutT Homolog 1) im Lungentumoren nachgewiesen werden (Speina E. et al, 2003; Speina E. et al, 2005). Auch ist bekannt, dass genetische Veränderungen in DNA-Reparaturgenen die DNA-Reparaturkapazität modulieren können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine hohe DNA-Reparaturkapazität mit einer schlechteren Überlebensrate in Patienten mit einem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom, die eine Cisplatin basierende Chemotherapie bekamen, assoziierte (Bosken CH. et al, 2002). Auch ist gesichert, dass polymorphe Varianten in DNA-Reparaturgenen verantwortlich für inter-individuelle Unterschiede im Ansprechen auf eine Cisplatintherapie bei Patienten mit einem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom sind (Schiller JH. et al, 2002). Diese Daten belegen, dass eine erhöhte DNA-Reparatur von Vorteil für die Tumorzelle bei der Chemotherapie mit DNA-schädigenden Substanzen ist (Perez-Plasencia C. et al, 2006; Kiyohara C. et al, 2006).

4.1.3.3. Protoonkogene

Die beim Lungenkarzinom insbesondere involvierten Protoonkogene sind vor allem MYC-Onkogene (c-MYC, N-MYC, L-MYC) und RAS-Onkogene (K-ras, H-ras, N-ras) (Sekido Y. et al, 1998). So war es nicht überraschend, dass auch wir mehrere differentiell exprimierte Protoonkogene identifizieren konnten. Im Plattenepithelkarzinom wurde beispielsweise c-MYC mit einer Überexpression nachgewiesen. Die Aktivierung von c-MYC ist ausreichend und notwendig für die Induktion der Zellzyklusprogression in ruhenden Zellen. Obwohl diverse onkogene Funktionen des c-myc-Proteins beschrieben worden sind, wie z.B. Induktion von Zellzyklusprogression, Immortalisierung, Transformation und Zellwachstum, war weitgehend unklar, welche Zielgene diese Effekte letztlich vermitteln. Es zeigte sich, dass c-myc neben Genen der Zellzyklus-Regulation auch Gene induziert, die DNA-Reparatur, Neovaskularisierung, Glykolyse oder Apoptose vermitteln bzw. regulieren (Hermeking H, 2003; Menssen A. et al, 2003). Des Weiteren konnten wir mehrer Mitglieder der ras-Genfamilie mit einer differentiellen Genexpression in den untersuchten Lungenkarzinomen beobachten. Die RAS-Protoonkogenfamilie (K-ras, H-ras, N-ras) kodiert für Plasmamembranproteine. Eine Mutation im RAS-Gen führt zu einer inadäquaten verlängerten Signaltransduktion, die eine Fortführung der Zellteilung zur Folge hat. Etwa 90% aller ras-Mutationen

betreffen das K-ras- Gen, davon treten 85% im Kodon 12 auf. K-ras- Mutationen treten in besonders hoher Frequenz in Adenokarzinomen (20-30%) auf, seltener in Plattenepithelkarzinomen (Rodenhuis S. et al, 1992; Graziano SL. et al, 1999). Das Auftreten von ras- Mutationen in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen wurde als negativer prognostischer Faktor beschrieben (Slebos RJC. et al, 1988; Li S. et al, 1994; Rosell R. et al, 1993). Im kleinzelligen Lungenkarzinom sind Mutationen im RAS- Gen selten (Richardson GE. et al, 1993). Im Rahmen dieser Studie konnten wir im Plattenepithelkarzinom sowie im kleinzelligen Lungenkarzinom mehrere Gene der RAS- Genfamilie identifizieren. Im kleinzelligen Lungenkarzinom wurde beispielsweise RAN, RANBP1, RACGAP1, RAP2B und RALA mit einer Überexpression nachweisen. Diese Gene spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation des nukleo- zytoplasmatischen Transports durch den nukleären Porenkomplex, bei der Signaltransduktion, bei der Reorganisation des Zytoskeletts aber auch in der Kontrolle des Zellwachstums (Görlich D. et al, 1999; Kuersten S. et al, 2001; D'Angelo MA. et al, 2006).

Aber auch Protoonkogene, die noch nicht im Zusammenhang mit dem Lungenkarzinom beschrieben wurden, zeigten eine Überexpression, wie z.B. FOXG1B und FYN im kleinzelligen Lungenkarzinom. Das FYN- Protoonkogen ist ein Mitglied der SRC- Familie, welche zu den Membran- assoziierten Protein- Tyrosinkinasen gehören (Selvakumar P. et al, 2006). In einigen Studien wird diskutiert ob eine Aktivierung der SRC- Kinasen die Angiogenese in Tumoren begünstigt (Kanno S. et al, 2000; Xiang Q. et al, 2005).

Das Protoonkogen FOXG1B gehört zur „Forkehead- Box“- Genfamilie und ist auf Chromosom 14q lokalisiert (Shoichet SA. et al, 2005). Bisher ist wenig bekannt über dieses Protoonkogen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Dysregulation von Genen dieser Familie zu kongenitalen Krankheitsbildern, zum Diabetes mellitus oder zur Karzinogenese führt (Kato M. et al, 2004). Darüber hinaus wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass FOXG1B in der kortikalen Entwicklung eine wesentliche Rolle spielt (Bisgaard AM. et al, 2006).

4.1.3.4. Zelladhäsion

Untersuchungen zur Pathophysiologie der Metastasierung von Tumorzellen weisen daraufhin, dass eine Dysregulation von Adhäsionsmechanismen die Loslösung von Tumorzellen aus ihrem primären Zellverband erleichtert und sich eine komplexe Kaskade von adhäsiven Interaktionen zwischen Tumorzellen und Gewebe anschließt (Stein- Werblowsky R, 1983; Nicolson C. 1988).

Daher ist es nicht überraschend, dass auch in unseren Ergebnissen eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen in den Tumorsubtypen eine veränderte Expression zeigte. In Korrelation mit der frühzeitigen Metastasierungstendenz des kleinzelligen Lungenkarzinoms (Wiethage T. et al, 2000), konnten in diesem Tumorsubtyp im Vergleich zum Nichttumor mit 8 überexprimierten und 7 unterexprimierten Genen, die

meisten differentiell exprimierten Gene nachgewiesen werden. Darunter waren Gene wie N- Cadherin, NCAM1 und NRCAM. In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Cadherine die Hauptmediatoren der zellulären Adhäsion in transformierten Zellen sind (Hynes RO, 1992; Wang X. et al, 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass der Verlust oder die Fehlsteuerung von Cadherinen, vor allem von E- Cadherin, zum Auflösen des Tumorzellverbandes führt, was ein Eindringen der Tumorzelle in andere Gewebe zur Folge hat (Kinsella AR. et al, 1994). Aber auch eine veränderte Expression von N- Cadherin, wie beispielsweise im kleinzelligen Lungenkarzinom wird eine Rolle in der Metastasierung zugeschrieben (Sandig M. et al, 1997; Wang X. et al, 2005). Darüber hinaus konnte in der Studie von der Arbeitsgruppe um Qi J. gezeigt werden, dass eine N- Cadherin vermittelte Zelladhäsion in der Aktivierung des β - Catenin- Signalweges involviert ist (Qi J. et al, 2005).

Des Weiteren sind im kleinzelligen Lungenkarzinom NCAM1 und NRCAM überexprimiert. Beide Moleküle sind neurale Calcium- abhängige Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin- Superfamilie, die vorwiegend im ZNS exprimiert werden und auf den neuroendokrinen Ursprung des kleinzelligen Lungenkarzinoms zurückzuführen sind. Neuronale Zelladhäsionsmoleküle werden früh von der Zelle an der Oberfläche exprimiert und sind dort beteiligt am Wachstum und der Faszikulation neuronaler Zellen. In Tumorzellen fördert eine erhöhte Expression von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen vermutlich die Zellmotilität sowie die Proliferation (Onganer PU. et al, 2005).

Im Plattenepithelkarzinom, welches im Vergleich zum kleinzelligen Lungenkarzinom eine spätere Metastasierungstendenz zeigt, sind vorwiegend Zelladhäsionsmoleküle unterexprimiert, die in „Tight Junctions“ vorkommen wie z.B. Claudin 10 und „Tight Junction“- Protein 3. Diese Proteine sind integrale Membranproteine, und gehen sowohl homophile als auch heterophile Interaktionen mit den Proteinen der benachbarten Epithel- oder Endothelzelle ein. Sie sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität und dichten den Interzellularraum ab (Alberts B. et al, 2004).

Bereits in einigen Tumoren wie z.B. im Mammakarzinom und im Magenkarzinom konnte eine verminderte Expression von Proteinen, die am Aufbau der „Tight Junctions“ beteiligt sind beobachtet werden (Morin PJ, 2005). Der Mangel dieser Proteine führt zur Aufhebung der „Tight Junctions“, ein Prozess der eine wichtige Rolle beim Verlust der Kohäsion und der unzureichenden Differenzierung der Tumorzelle spielt (Li D. et al, 2000). Darüber hinaus geht durch den Verlust der „Tight Junctions“ die geordnete Gewebestruktur verloren, Tumorzellen können sich aus dem Gewebsverband lösen und in umliegendes Gewebe eindringen (Morin PJ, 2005).

Auch eine Dysregulierung von Molekülen der Immunglobulin- Superfamilie, welche vor allem Zell zu Zell- Kontakte vermitteln wird für die Metastasierung verantwortlich gemacht (Nigam AK. et al, 1993). Im Adenokarzinom konnte eine Überexpression von ICAM1 gezeigt werden. In einer Studie von Rahn JJ. et al wurde berichtet, dass ICAM1 in der Tumor- Stromaadhäsion und der transendothelialen Migration involviert ist (Rahn JJ. et al, 2005).

4.1.3.5. Metabolismus

Die Malignität der Tumorzellen wird aber auch durch Änderungen biochemischer Eigenschaften gekennzeichnet. So ist der Metabolismus von Tumorzellen charakterisiert durch ein hohes Aktivitätspotenzial der aeroben Glykolyse (Brown RS. et al, 1993; Eigenbrodt E. et al, 1997). Dies belegt die erhöhte Expression von FBP1 (Fructose-1,6-bisphosphatase 1) beim Adenokarzinom sowie die Überexpression von PGK1 (Phosphoglycerat-kinase 1) und ENO1 (Enolase 1) beim Plattenepithelkarzinom. Jedoch werden in der Tumorzelle Kohlenhydrate nicht mehr zur Synthese von Fetten verwendet oder der Energiegewinnung zugeführt, sondern vorrangig in die Nukleinsäuresynthesewege eingeschleust (Flier JS. et al, 1987; Eigenbrodt E. et al, 1998; Eigenbrodt E. et al, 1998b). Besonders hervorzuheben für die Abwehr und Entgiftung von Fremdstoffen sind wegen ihrer großen Zahl die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme (FME) des Xenobiotikastoffwechsels, die sowohl funktionell als auch genetisch polymorph sein können (Moyer VD. et al, 1994). So wurden mittels Oligonukleotid-Arrays allein im kleinzelligen Lungenkarzinom 12 unterexprimierte Gene wie z.B. CYP2B6, CYP2C18, CYP2F1, GSTA3 und AKRC1C, die für fremdstoffmetabolisierende Enzyme kodieren identifiziert. Aber auch bei den nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen konnten unterexprimierte Gene des Xenobiotikastoffwechsels wie z.B. ADH1B, CYP2F1 und GSTA3 nachgewiesen werden. Heute ist allgemein bekannt, dass auf der Basis konstitutionell determinierter FME- Polymorphismen Individuen in gute und weniger gute Metabolisierer unterschieden werden können und dieselbe Dosis eines Karzinogens interindividuell einen unterschiedlichen Effekt haben kann (Colditz G. et al, 1996). Es wird vermutet, dass diese genetisch determinierten Eigenschaften auch über die Suszeptibilität für die Entstehung von Lungenkarzinomen mitentscheiden (Puga A. et al, 1997 ; Evans WE. et al , 1999). Beim Abbau der beim Rauchen inhalierten Karzinogene sind möglicherweise Polymorphismen der Enzymfamilien des Cytochrom P450, der Glutathion S-Transferasen (GST) und der N-Acetyltransferasen beteiligt (Kouri RE. et al, 1982; Hengstler JG. et al, 1998). Allgemein wird angenommen, dass die Gene der FME als Suszeptibilitätsgene im Vergleich zu prädisponierenden Genen nur einen kleinen intrinsischen Beitrag zum Lungenkrebsrisiko leisten, der erst in Verbindung mit einer Karzinogenexposition relevant werden kann.

4.1.3.6. Weitere differentiell exprimierte Gene

Darüber hinaus wurden Gene identifiziert, von denen bereits bekannt ist, dass sie in den jeweiligen Tumorsubtyp differentiell exprimiert sind. Dies waren sowohl überexprimierte Gene (z.B. SFTB im Adenokarzinom (Betz C. et al, 1995; Khor A. et al, 1997), COL4 im Plattenepithelkarzinom (Nakagawa H. et al, 1994; Catusse C. et al, 2000; Ikeda K. et al, 2005) und Synaptophysin im kleinzelligen Lungenkarzinom (Kasprzak A. et al, 2003;

Bobos M. et al, 2006) als auch unterexprimierte Gene (z.B. ADH1 in allen drei Tumorentitäten (Dannenbergl O. et al, 2006).

4.1.4. Vergleich der eigenen Studie mit anderen Studien

Beim Vergleich unserer Ergebnisse mit den Genexpressionsstudien von Amatscheck und Ju konnten, obwohl die verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Methoden sowie Material zur Erstellung der Genexpressionsprofile verwendeten, Übereinstimmungen aufgezeigt werden. So konnten auch in der Arbeitsgruppe von Ju die meisten differentiell exprimierten Gene dem Zellzyklus und der Proliferation zugeordnet werden. Darüber hinaus wurden Gene wie z.B. MYC („v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog“), FEN1 („Flap structure-specific endonuclease 1“), MAD2L1 („mitotic arrest deficient-like 1“), SMC4L1 („structural maintenance of chromosomes 4-like 1“) und FSCN1 („fascin homolog 1“) beim Plattenepithelkarzinom und CALU (Calumenin) beim Adenokarzinom, die in unserer Studie als überexprimiert nachgewiesen werden konnten und unterexprimierte Gene wie z.B. Muc1 (Mucin 1), LOH11CR2A („Loss of heterozygosity, 11, chromosomal region2, gene A“), RARRES3 („Retinoic acid receptor responder 3“) und SERPINF1 („Serine proteinase inhibitor“) im Plattenepithelkarzinom und TRIM29 („Tripartite motif-containing 29“) im Adenokarzinom sowie TF (Transferrin) und TFF3 („Trefoil factor 3“) in beiden nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, in den Studien von Amatscheck und Ju ebenfalls mit einer Überexpression bzw. Unterexpression beschrieben (Ju Z. et al, 2005; Amatscheck S. et al, 2004). Weitere Experimente wie Proteinexpressionsstudien und funktionelle Analysen sind jedoch notwendig, um die RNA- Daten aus dieser Arbeit zu bestätigen.

4.1.5. Mögliche Zielstrukturen im primären Lungenkarzinom

Als attraktive Zielmoleküle für eine molekulare Therapie des Lungenkarzinoms bieten sich möglicherweise die überexprimierten Kinasen an. So sind beispielsweise im Zellzyklus die Cyclin- abhängigen Kinasen CDK2 (im kleinzelligen Lungenkarzinom) und CDK4 (im kleinzelligen Lungenkarzinom und Plattenepithelkarzinom) überexprimiert. Bereits einige Studien, in denen Zelllinien (H1299; U2OS) mit Inhibitoren der Cyclin- abhängigen Kinasen behandelt wurden, zeigten, dass Flavopiridol- Behandlung der Tumorzellen zur Inhibierung der CDK4- Aktivität führt (Shapiro GI, 2004; Cai D. et al, 2006). In der Studie von Reuveni wurde gezeigt, dass die Behandlung von transformierten ras- Fibroblasten mit dem Farnesyltransferase- Inhibitor HR12 zu einem zytosolischen Anstieg des Cyclin- abhängigen Kinase- Inhibitors p27Kip1 führte. In Folge konnte eine Inhibierung der Cyclin E/ Cdk2- Aktivität, einhergehend mit einem G₁- Arrest beobachtet werden (Reuveni H. et al, 2003). Diese Daten zeigen, dass der Einsatz eines Farnesyltransferase- Inhibitors bei dem kleinzelligen Lungenkarzinom vielleicht zur Proliferationshemmung geeignet wäre, da sowohl CDK2 als auch Cyclin E

überexprimiert sind. Auch wurden bereits mehr oder weniger selektive Inhibitoren für Src- Kinasen beschrieben, unter anderen PP1, ein Pyrazolo- Pyrimidin Derivat (Hanke JH. et al, 1996; Levitzki A, 2003). Die Arbeitsgruppe um Hanke zeigte 1996, dass PP1 die Src- Kinasen Lck und Fyn in vitro bei niedrigen Konzentrationen inhibiert und die Inhibierung hemmend auf die Proliferation wirkt (Hanke JH. et al, 1996). Da Fyn im kleinzelligen Lungenkarzinom überexprimiert ist, wäre dieses Protoonkogen eine weitere mögliche Zielstruktur. Neue therapeutische Ansätze in der Onkologie konzentrieren sich auf die Inhibierung der Tumorzellmetastasierung und der tumorinduzierten Angiogenese. Eine der involvierten Zielstrukturen stellt das beta-3-Integrin dar. In der Studie von Haubner konnte gezeigt werden, dass radioaktiv markierte glycosylierte Peptide rezeptorspezifisch an beta-3- Integrin exprimierenden Tumoren binden und somit die Interaktion zwischen Tumorzelle und Umgebung inhibiert werden kann (Haubner R. et al, 1997; Haubner R. et al, 2006). Da auch im Lungenkarzinom eine Dysregulation von Integrinen vorliegt, ist möglicherweise ein therapeutischer Einsatz dieser radioaktiv markierten glycosylierten Peptide auch im Lungenkarzinom ein viel versprechender Therapieangriffspunkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die differentiell exprimierten Gene dazu geeignet sind, Aussagen über die molekularen Grundlagen der pathologischen Veränderungen des Lungenkarzinoms zu machen. Darüber hinaus konnte basierend auf den Daten, unter Verwendung der genetischen Programmierung, ein Klassifikator erstellt werden, mit dessen Hilfe es möglich war zwischen dem jeweiligen Tumorsubtyp und Nichttumor zu unterscheiden. Auch in der Studie von Mitra AP. et al, konnten mittels Klassifikator, welcher ebenfalls unter Verwendung der genetischen Programmierung generiert wurde, die zu analysierenden primären Blasentumorproben von den progredienten Tumorproben abgegrenzt sowie die Proben der Kontrollen der Nichttumorgruppe korrekt zugeordnet werden (Mitra AP. et al, 2003). Diese Daten belegen, dass die GP- basierende Methode in der Lage ist, genaue und nachvollziehbare Ergebnisse zu liefern, die es ermöglichen Tumorproben exakt zu unterscheiden. Möglicherweise kann die Generierung eines Klassifikators, mit dem Ziel die Tumorsubtypen voneinander sowie vom Nichttumor abzugrenzen hilfreich in der Diagnostik eingesetzt werden.

4.2. Das progrediente nichtkleinzellige Lungenkarzinom

In diesem Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es genetische Veränderungen gibt, die einen Primärtumor von einem nach Chemotherapie rezidierten oder progredienten Tumor unterscheiden. So wurden 239 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert, von denen 124 Gene dem progredienten Plattenepithelkarzinom und 115 Gene dem progredienten Adenokarzinom zugeteilt werden konnten. Unter Verwendung der hierarchischen Clusteranalyse konnten die primären Tumorproben und die progredienten Tumorproben des Plattenepithelkarzinoms

voneinander getrennt und an den zwei Hauptästen des Dendogramms angeordnet werden (Abbildung 33). Dagegen zeigten im Adenokarzinom die Gene ein heterogeneres Expressionsmuster, so dass erst bei einer zweiten Bifurkation des Dendogramms eine Auftrennung der analysierten Gruppen zustande kam (Abbildung 32). Jedoch befand sich eine progrediente Tumorprobe in der Gruppe der primären Adenokarzinomen und kann als Ausreißer angesehen werden. Der Grund für die Gruppierung beruht offenbar auf geringe Genexpressionsveränderungen in dieser Probe, die es der Software nicht ermöglicht, diese Tumorprobe zu den anderen progredienten Proben zu gruppieren. Dennoch scheint es so, dass die Genexpressionsveränderungen, die zur Trennung der Primärtumoren von den progredienten Lungenkarzinomen in der Clusteranalyse führen, mit der Progression des Lungenkarzinoms assoziiert sind. Unter anderem wurden Gene identifiziert, die darauf hindeuten, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges mit der Progression assoziiert.

4.2.1. Progressions- relevante chromosomale Regionen

Allgemein ist bekannt, dass progrediente Tumoren wesentlich mehr genetische Veränderungen zeigen, als die korrespondierenden Primärtumoren. Dies spricht für eine Akkumulation zusätzlicher genetischer Aberrationen im Laufe der Progression durch die ein Tumor bzw. einzelne Zellpopulationen die Fähigkeit zur Dissemination erlangen (Petersen S. et al, 1998). Für die Chromosomen 6q, 8p und 10q gibt es mehrfache Hinweise auf deren Beteiligung an der Progression. Wie bereits erwähnt, wurden Deletionen einiger Regionen auf Chromosom 3p insbesondere in frühen Tumorstadien gefunden (Hung J. et al, 1995; Mertens F. et al, 1994). Interessanterweise treten offensichtlich aber auch einige DNA-Verluste erst in fortgeschrittenen Tumoren auf. Die Arbeitsgruppe um Petersen S. konnte 1998 zeigen, dass kleinere interstitielle Deletionen auf Chromosom 10q im Laufe der Progression zu Metastasen vergrößert werden. So traten zunächst interstitielle Deletionen auf, während in der Progression Verluste ganzer Chromosomenarme oder Chromosomen nachgewiesen werden konnten (Petersen S. et al, 1998). Chromosom 8q-Überrepräsentationen und im Besonderen Amplifikationen des myc- Onkogens auf 8q24 sind genetische Marker für die Tumorprogression. Das ist passend zu der Beschreibung, dass Amplifikationen typischerweise in fortgeschrittenen Tumoren auftreten (Brison O., 1993). Um mögliche genetische Veränderungen, die im Verlauf der Progression entstehen, zu identifizieren, erfolgte auch im Rahmen unserer Studie eine Auswertung der Daten hinsichtlich chromosomaler Regionen mit gehäuft auftretenden unterexprimierten Genen. So konnten in beiden analysierten progredienten Lungenkarzinomsubtypen, unterexprimierte Gene gefunden werden, die auf Progressions -relevante Chromosomenorte wie z.B. 1q25, 3p22-p24, 17p12-p13 und 20p12 lokalisiert sind (Tabelle 48 und 49) und belegen damit die Ergebnisse vorangegangener Studien. So wurden chromosomale Veränderungen wie z.B. Deletionen von den

Chromosomenabschnitten 3p22-p25 und 17p12-p13 gehäuft bei metastasierten Adenokarzinomen beobachtet (Iniesta P. et al, 2004; Goeze A. et al, 2002). Auch bei progredienten Plattenepithelkarzinomen konnten vermehrt Deletionen beschrieben werden. Zusätzlich zu den Chromosomenabschnitten 3p22-p25 und 17p12-p13 wurde hier in der chromosomalen Region 1q25-32, 12q23-24.3 und 20p12 signifikant häufiger bei metastasierten als bei nichtmetastasierten Karzinomen eine Deletion gefunden (Petersen S. et al, 2000; Ma J. et al, 2006). In Tabelle 48 sind die chromosomalen Regionen mit den unterexprimierten Genen des progredienten Adenokarzinoms zusammengefasst.

Chromosomale Lokalisation	Genname	Gensymbol	"Fold Change"
1q25	neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	NCF2	0,72
1q25-q31	regulator of G-protein signalling 16	RGS16	0,59
1q23	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide	FCER1G	0,70
1q23.2	SLAM family member 8	SLAMF8	0,71
3p23-p22	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1 (peroxisomal 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	ACAA1	0,73
3p24.2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1 (UBC4/5 homolog, yeast)	UBE2E1	0,76
12q23.3	myosin binding protein C, slow type	MYBPC1	0,55
12q24.2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	ALDH2	0,48
17p13.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	SERPINF1	0,52
17p13.1	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13 /// tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12-member 13	TNFSF13 ///TNFSF12	0,65
17p13-p11.2	peripheral myelin protein 22	PMP22	0,68
20p12	-----	-----	-----

Tabelle 48: Unterexprimierte Gene auf Progressions- relevante chromosomale Regionen im progredienten Adenokarzinom. In der chromosomalen Region 20p12 konnten keine unterexprimierten Gene identifiziert werden. In grün ist das Gen dargestellt, dass im Vergleich zum Primärtumor ein q- Value kleiner 5% hat. Bei den in schwarz dargestellten Genen, lag der q- Value zwischen 5 und 35%.

Auch für das progrediente Plattenepithelkarzinom konnten im Rahmen dieser Studie in einigen chromosomalen Regionen gehäuft vermindert exprimierte Gene gezeigt werden (Tabelle 49).

Chromosomale Lokalisation	Genname	Gensymbol	"Fold Change"
1q23	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	CCT3	0,64
1q23	uridine-cytidine kinase 2	UCK2	0,55
1q23.3	prefoldin 2	PFDN2	0,57
1q25-q31	laminin, gamma 2	LAMC2	0,60
1q25-q31	regulator of G-protein signalling 16	RGS16	0,62
3p22.1	translation factor sui1 homolog	GC20	0,61
3p23	special AT-rich sequence binding protein 1 (binds to nuclear matrix/scaffold-associating DNA's)	SATB1	0,63
3p23-p22	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1 (peroxisomal 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	ACAA1	0,63
3p24.2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1 (UBC4/5 homolog, yeast)	UBE2E1	0,57
3p25	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1	0,71
3p25	xeroderma pigmentosum, complementation group C	XPC	0,69
3p25.1	LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM3	0,63
3p25.3	transcriptional adaptor 3 (NGG1 homolog, yeast)-like	TADA3L	0,69
12q23-q24.1	thioredoxin reductase 1	TXNRD1	0,60
12q24	nuclear receptor co-repressor 2	NCOR2	0,64
12q24.2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	ALDH2	0,59
12q24.2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	OAS3	0,68
12q24.23	prostatic binding protein	PBP	0,67
12q24.3	RAN, member RAS oncogene family	RAN	0,59
17p12	syntaxin 8	STX8	0,68
17p12-p11.2	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	HS3ST3A1	0,59
17p13	integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)	ITGAE	0,69
17p13.3	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast) /// PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast)	PRPF8	0,58
17p13-p11	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	ACADVL	0,69
17pter-p13	aspartoacylase (aminoacylase 2, Canavan disease)	ASPA	0,61
20p12.2-p11.22	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B"	SNRNPB2	0,62
20p12-p11.2	NTF2-like export factor 1	NXT1	0,67

Tabelle 49: Unterexprimierte Gene auf Progressions- relevante chromosomale Regionen im progredienten Plattenepithelkarzinom. In grün sind die Gene dargestellt, die im Vergleich zum Primärtumor einen q- Value kleiner 5% haben. Bei den in schwarz dargestellten Genen, lag der q- Value zwischen 5 und 42%.

Diese Daten belegen, dass während des Fortschreitens der Erkrankung viele Gene ihr Genexpressionsmuster verändern und möglicherweise die genomische Instabilität die genetisch treibende Kraft hinter diesen Veränderungen ist.

4.2.2. Funktionelle Gruppen des progredienten Lungenkarzinoms

Die Vielzahl der differentiell exprimierten Gene weist darauf hin, dass der genetische Hintergrund der Tumorprogression ebenfalls komplex ist und so erfolgte auch hier zur

detaillierten Auswertung die Einteilung der signifikanten Gene anhand ihrer in der Literatur beschriebenen Funktion in funktionelle Gruppen (Tabelle 37). Die Gene wurden hierbei in Gruppen wie z.B. Wnt- Signalweg, Proliferation, Ubiquitin- abhängige Proteolyse (UCHL, UBE1 und PSMA3 im Plattenepithelkarzinom), Gene die für Hitze-Schock- Proteine kodieren, Gene die in der Chromosomenkondensation bzw. –dekondensation involviert sind, mRNA- Prozessierung, Immunsystem und viele weitere mehr eingeteilt. Die Schwerpunkte lagen entsprechend auf den Bereichen Wnt-Signalweg, Proliferation, Ubiquitin- abhängige Proteolyse und Chromosomenkondensation bzw. –dekondensation. Im Folgenden wird auf zwei Schwerpunkte, die besonders interessant erschienen, näher eingegangen.

4.2.2.1. Proliferation im progredienten Lungenkarzinom

Wie bereits erwähnt, wurde im progredienten Adenokarzinom eine Überexpression von CyclinD1 und Myc nachgewiesen. Dies kann in Folge aus der β - Catenin vermittelten transkriptionellen Aktivierung resultieren aber auch aufgrund von Genamplifikationen des für CyclinD1 bzw. Myc kodierenden Gens erfolgen. So ist bekannt, dass in ca. 45% der nichtkleinzelligen primären Lungenkarzinomen Amplifikationen von CyclinD1 bestehen (Tanaka H. et al, 1998). Eine CyclinD1 Überexpression ist direkt mit der Proliferationsaktivität assoziiert. So führt die Aktivierung von CyclinD1 durch Phosphorylierung des Retinoblastomproteins zur Aufhebung der Zellzyklushemmung am G₁- S- Übergang. Bisher wurde eine CyclinD1- Überexpression mit der Tumorigenese des Lungenkarzinoms beschrieben (Lingfei K. et al, 1998). In der Studie von Guggner konnte bei 63% der untersuchten nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium IIIB- IV eine Überexpression von CyclinD1 aufgezeigt werden (Guggner M. et al, 2001). Im Pankreaskarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von CyclinD1 mit Tumorprogression assoziiert ist (Li YJ. Et al, 2005). Dies legt nahe, dass eine Dysregulation von CyclinD1 eine der treibenden Kräfte der Proliferation in den progredienten Adenokarzinomen sein könnte. Trotz des zunehmend besseren Verständnisses der generellen molekularen Grundlagen der Tumorigenese sind die Mechanismen der Tumorprogression des Lungenkarzinoms nach wie vor ungeklärt.

4.2.2.2. Wnt- Signalweg

Bei den Analysen der differentiellen Genexpression wurde interessanterweise in beiden progredienten Tumorsubtypen β - Catenin mit einer Überexpression im Mikroarray identifiziert und mittels „Real Time“- PCR und Immunhistochemie bestätigt. Zudem wurden im Adenokarzinom im Vergleich zum Primärtumor weitere Gene, die im kanonischen Wnt- Signalweg involviert sind wie z.B. FZD6, RYK und SMAD4 mit einer Überexpression nachgewiesen und in der „Real Time“- PCR bestätigt. Diese Ergebnisse

unterstützen die Hypothese, dass eine Aktivierung des Wnt/ β - Catenin- Signalweges mit der Progression des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms assoziiert ist. Gestützt werden die Ergebnisse von einigen Studien, in denen nur in weniger als 10% der primären Adenokarzinome eine erhöhte Expression sowie immunhistochemisch eine nukleäre Expression von β - Catenin nachgewiesen werden konnte (Pirinen RT. et al, 2001; Ikeda S. et al, 2005). Im Gegensatz dazu wurden in der Zelllinie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms H292, die in den Eigenschaften eher einem progredienten Tumor ähnelt, β - Catenin sowie weitere Gene des Wnt- Signalweges mit einer Überexpression identifiziert (Ju Z. et al, 2005).

Bereits 1999 wurde beobachtet, dass Komponenten des Wnt- Signalweges in metastasierenden Lungenkarzinomen dysreguliert sind (Smythe WR. et al, 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von β - Catenin in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen durch eine gesteigerte Tabakexposition der Patienten hervorgerufen wird (Woenckhaus M. et al, 2006). Auch eine Überexpression von Wnt5a wurde im Lungenkarzinom beobachtet und in Zusammenhang mit der Tumorprogression diskutiert (Huang CL. et al, 2005). Bereits 2003 konnte beobachtet werden, dass eine aberrante Smad4- Expression in der Tumorprogression des Lungenkarzinoms involviert ist und vermutlich eine vermittelnde Rolle in der Invasion und Metastasierung spielt (Shen JL. et al, 2003). In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass Axam2 in der β - Catenin abhängigen Tcf- 4 vermittelter Transkriptionen involviert ist (Yamamoto H. et al, 2003).

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Aktivierung des Wnt- Signalweges generell von enormer Bedeutung für die Tumorentstehung und Tumorprogression ist. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten darüber hinaus funktionell aktivierte Gene von β - Catenin, wie MYC und CyclinD1 eine Überexpression im progredienten Adenokarzinom. Im progredienten Plattenepithelkarzinom wurde als Komponente des kanonischen Wnt- Signalwegs zwar nur β - Catenin sowie Calcineurin, einem Schlüsselmolekül des Calcium- abhängigen Wnt- Signalweges mit einer erhöhten Expression nachgewiesen. Darüber hinaus wurde aber eine Reihe von Genen, die in der Ubiquitin- abhängigen Proteolyse involviert sind, mit einer Unterexpression identifiziert. Diese Unterexpression kann möglicherweise als Indiz für einen verminderten Abbau von β - Catenin angesehen werden und begünstigt in Folge ein Akkumulieren von β - Catenin im Zytoplasma, so dass aufgrund des reduzierten Abbaus zusätzlich zur erhöhten β - Catenin Expression eine Zunahme der zytosolischen β - Catenin Konzentration vorliegt und dies in Folge zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen führt. Auch immunhistochemisch konnte auf Proteinebene in den progredienten Lungenkarzinomen die differentielle Expression von β - Catenin bestätigt werden. Die Ergebnisse unsere Arbeitsgruppe werden gestützt durch die Ergebnisse einiger immunhistochemischer Studien, in denen sowohl eine veränderte Expression von β - Catenin als auch von weiteren Komponenten des Wnt- Signalweges im Lungenkarzinom beschrieben wurden. So konnte die Arbeitsgruppe um Xu, mittels immunhistochemischer Untersuchungen von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen nachweisen, dass eine

aberrante Expression von β - Catenin im Zellkern sowohl mit einer geringen Differenzierung als auch mit der Progression assoziiert ist (Xu HT. et al, 2006). Trotz der zahlreichen Studien ist bis heute die Rolle des Wnt- Signalweges im Bezug auf Tumorigenese und Tumorprogression im Lungenkarzinom noch weitestgehend unklar.

4.2.3. β - Catenin als mögliche Zielstruktur des progredienten

Lungenkarzinoms

Weiterführende Studien mit den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Progressions- assoziierten Genen werden weitere wichtige Einblicke in die genetischen Grundlagen der Tumorprogression und Tumormetastasierung geben und vielleicht Zielstrukturen für therapeutische Ansätze in der progredienten Erkrankung identifizieren. Eine attraktive Zielstruktur für eine molekulare Therapie des progredienten Lungenkarzinoms ist möglicherweise β - Catenin bzw. der Wnt- Signalweg, da er sowohl im progredienten Adenokarzinom als auch im progredienten Plattenepithelkarzinom aktiviert zu sein scheint. In den letzten 10 Jahren wurde dieser Signalweg intensiv nach möglichen therapeutischen Angriffsmöglichkeiten untersucht, da über 85% der Kolonkarzinome sowie auch andere maligne Erkrankungen wie z.B. das Multiple Myelom eine Aktivierung des Wnt- Signalweges, einhergehend mit einer erhöhten β - Cateninkonzentration zeigen (Hugh TH. et al, 1999; Derksen PW. et al, 2004). Die Entwicklung eines β - Catenin- Inhibitors erweist sich jedoch als schwierig, da β - Catenin keine enzymatische Aktivität besitzt. In der Studie von Thompson WJ. wurde in vitro gezeigt, dass der Einsatz von Exisulind, einem Sulfon- Derivate von Sulindac (einer nicht-steroidalen, anti-inflammatorischen Substanz, [NSAID]) in den behandelten Zellen Apoptose induziert, sowie die β - Cateninkonzentration nach der Behandlung abnahm (Thompson WJ. et al, 2000). Die Arbeitsgruppe um Li konnte zeigen, dass Exisulind eine Hemmung der cGMP- abhängigen Phosphodiesterase (PDE) bewirkt, die wiederum eine Erhöhung des cGMP- Levels und der Proteinkinase G (PKG)- Aktivität nach sich zieht. Er schlussfolgerte daraus, dass β - Catenin ein mögliches Substrat der Proteinkinase G ist und damit Exisulind eine mittels PKG- vermittelte Phosphorylierung von β - Catenin induziert, was in Folge zu einem gesteigerten proteosomalen Abbau von β - Catenin führt (Thompson WJ. et al, 2000; Li H. et al, 2002). Auch die Arbeitsgruppe um Chang konnte 2005 eine Reduktion von β - Catenin in den mit Exisulind behandelten Tumorzellen zeigen (Chang WC. et al, 2005). Darüber hinaus konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass der Einsatz eines Analogons der nicht- steroidalen, anti- inflammatorischen Substanzen (NSAID), dem R-ectodolac über Inhibierung der Zyklooxygenase 2 ebenfalls zu einer Hemmung des Wnt- Signalweges kam und in Folge zur verminderten Proliferation (Derksen PW. et al, 2004; Lu D. et al, 2004; Prince HM. et al, 2005). Jedoch sind die genauen Mechanismen, die dem zugrunde liegen noch nicht vollständig geklärt.

4.3. Charakterisierung des EGF- Rezeptors

Die Bedeutung von EGFR als Prognoseindikator wird gegenwärtig in der Literatur kontrovers diskutiert. In einigen Studien gibt es Hinweise für eine mögliche Assoziation von EGFR- Expression und erhöhtem Rezidivrisiko, verminderter Überlebensrate, höherem Tumorstadium und vermehrtem Metastasierungsrisiko (Volm M. et al, 1993; Volm M. et al, 1998).

4.3.1. EGFR- Mutationsanalyse

Die Überexpression von EGFR ist als Teil der neoplastischen Progression oft mit der Expression mutierter Formen assoziiert (Hirsch FR. et al, 2003). Die häufigsten Mutationen des EGF- Rezeptors betreffen die Rezeptor- Tyrosinkinasedomäne und liegen im Exon 18 bis 21 des EGFR- Genes. Diese Mutationen führen zu einer erhöhten Autophosphorylierung der Tyrosinkinase, welche in Folge zur Rezeptoraktivierung und somit zur Stimulierung der nachgeschalteten Signalwege führt (Lynch TJ. et al, 2004; Lynch TJ. et al, 2006; Conde E. et al, 2006). In der Literatur wird bereits diskutiert, ob diese Mutationen in der katalytischen Kinasedomäne, innerhalb des Exons 18 bis einschließlich des Exons 21 des EGF- Rezeptors prädiktive Faktoren für ein Therapieansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren sein könnten (Lynch TJ. et al, 2004). Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom eine Zunahme der auftretenden Mutation im Exon 20 mit dem Fortschreiten der Krankheit assoziiert (Inukai M. et al, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe der Mutationsanalyse untersucht werden, ob das potentielle Tumorsuppressorgen EGFR in progredienten Lungentumoren häufiger Mutationen aufweist als im Primärtumor. Mit einer SSCP- Analyse, DHPLC und Sequenzierung von 23 progredienten und 20 primären Lungenkarzinomproben im kodierenden Bereich (Exon 18 -21) des EGFR- Gens, konnten im Exon 18 bei einer progredienten Probe und im Exon 20 bei acht Proben (5 primäre und 3 progrediente Lungenkarzinomproben) eine Transition nachgewiesen werden, die jedoch zu keinen veränderten Phänotyp führen. In den „hot spot“- Regionen des Exon 19 und 21 wurden dagegen keine Veränderungen im Vergleich zur bekannten Gensequenz nachgewiesen. In der Literatur wird die Mutationsrate des EGF- Rezeptors im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom mit 15 bis 30% angegeben (Lynch TJ. et al, 2004; Paez JG. et al, 2004; Shigematsu H. et al, 2005). So beschrieb Lynch 2004 bei 8 von 25 Patienten mit einem primären NSCLC eine Mutation in der „hot spot“- Region des EGFR- Genes. Die Arbeitsgruppe um Paez zeigte bei 16 von 119 Patienten eine Mutation im Exon 18, 19, 20 oder 21 und Shigematsu gelang es bei 130 von 617 Patienten eine Mutation nachzuweisen (Lynch TJ. et al, 2004; Paez JG. et al, 2004; Shigematsu H. et al, 2005; Tomizawa Y. et

al, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnten bei 9 von 43 nichtkleinzelligen Lungentumoren, d.h. 20% eine stumme Mutation nachgewiesen werden. Dass im Rahmen dieser Studie keine weiteren Mutationen gefunden wurden, resultiert vermutlich aus dem begrenzten Untersuchungsmaterial, was zur Verfügung stand, so setzte sich das untersuchte Tumorkollektiv nur aus 43 Proben von Patienten kaukasischer Herkunft zusammen, von denen 17 Patienten zudem ein Plattenepithelkarzinom hatten, was laut Literatur selten mit Mutationen innerhalb der Tyrosinkinasedomäne des EGFR-Gens assoziiert ist (Lynch TJ. et al, 2004; Shepherd FA. et al, 2005). Der Nachweis von Mutationen im kodierenden Bereich wäre ein zusätzlicher Hinweis auf eine Bedeutung von EGFR für die Tumorprogression. Somit können die Daten, die im Rahmen dieser Studie erhoben wurden keine Korrelation zwischen auftretende Mutationen im EGFR-Gen und der Tumorprogression belegen. Wahrscheinlich sind nicht nur Mutationen innerhalb der Tyrosinkinasedomäne des EGF- Rezeptors, sondern auch andere Mechanismen wie Genamplifikation und eine aberrante Signaltransduktion entscheidend für die Tumorigenese und Tumorprogression.

4.3.2. EGFR- Expressionsanalyse

Die Ergebnisse einiger Studien am Tiermodell lassen vermuten, dass die EGFR-Expression in Metastasen größer ist als im Primärtumor. Eine erhöhte EGFR- Expression wurde beispielsweise in Metastasen humaner Kolon- Karzinomzellen gefunden, nicht aber im korrespondierenden Primärtumor. So fanden sich in Tumoren mit hoher metastatischer Tendenz um mehr als fünffach höhere Konzentrationen von EGFR-mRNA als bei Tumoren mit geringer Metastasenfrequenz (Radinsky R., 1995).

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass eine EGFR- Überexpression mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium und Tumorprogression korreliert (Salomon DS. et al, 1995; Hong WK. et al, 2000). Im Rahmen unserer Studie konnte unter Verwendung der Oligonukleotid- Arrays bei den progredienten Tumoren im Vergleich zu den jeweiligen Primärtumoren keine differentiellen Unterschiede in der EGFR- Genexpression identifiziert werden. Vermutlich sind die Unterschiede auf RNA- Ebene zu gering, dass sie mit den Oligonukleotid- Arrays nachgewiesen werden können. Jedoch ist es auch möglich, dass eine EGFR- Überexpression bereits als frühes Ereignis in der Karzinogenese auftritt und im Verlauf der Progression keine weiteren Veränderungen des EGFR- Genes hinzukommen. Auch die Arbeitsgruppe um Herbst RS. beschrieb, dass eine erhöhte EGFR- Expression in allen Stadien des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms sowie bereits in prämaligen Läsionen zu beobachten ist (Herbst RS. et al, 2003).

Um zu untersuchen, ob eine veränderte EGFR- Expression auf Proteinebene vorliegt, erfolgte im Rahmen unserer Arbeit ein immunhistochemischer Nachweis des EGF- Rezeptors an Kryo- und Paraffingewebeschnitten von primären und progredienten Lungentumoren. So konnte gezeigt werden, dass das Protein sowohl bei 67% der primären als auch bei 67% der progredienten Adenokarzinomen stark exprimiert wird.

Demzufolge verändert sich im progredienten Adenokarzinom nicht die Anzahl der Tumorproben mit einer dreifach- positiven EGFR- Überexpression, jedoch nehmen die negativen progredienten Tumorproben um 14% zu, zu Ungunsten der zweifach- positiven EGFR- Proben. Auch beim progredienten Plattenepithelkarzinom ist eine geringe Veränderung der EGFR- Expression zu erkennen. Hier kommt es zu einer Abnahme der Tumorproben mit einer dreifach- positiven EGFR- Überexpression von 4% zu Gunsten der zweifach- positiven EGFR- Proben. Diese Ergebnisse belegen, dass eine erhöhte EGFR- Expression bereits im Primärtumor besteht. In der Literatur wird für das Adenokarzinom eine EGFR- Überexpression bei 59 – 67% der Fälle beschrieben und für das Plattenepithelkarzinom bei 82% (Hirsch FR. et al, 2003). Diese Daten unterstützen die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Studie erhoben wurden (Abbildung 50 und 51). Jedoch konnte bei einem Vergleich der primären mit den progredienten Lungenkarzinomen in beiden Lungenkarzinomsubtypen zwar eine leichte Abnahme der EGFR- Expression beobachtet werden, aber sind die Veränderungen so gering, dass sie wahrscheinlich nicht relevant sind. Hinzu kommt, dass in dem untersuchten Tumorkollektiv aufgrund des limitierten Patientenmaterials die Primärtumorproben und die progredienten Tumorproben nicht von den selben Patienten stammen, so dass bei diesen geringen Veränderungen keine zuverlässige Aussage über eine Abnahme der EGFR- Expression während der Progression getroffen werden kann. Zwar deuten erste Daten von Vergleichen zwischen primären und metastasierten nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen daraufhin, dass sich die EGFR- Expression im Lungenkarzinom während der Progression verändert. So zeigte die Arbeitsgruppe um Italiano bei 7 von 30 untersuchten Tumoren, d.h. bei 23%, eine Abnahme und bei 3 weiteren Tumoren, d.h. bei 10%, eine Zunahme der EGFR- Expression im Verlauf der Progression (Italiano A. et al, 2006). Jedoch werden weitere Studien erforderlich sein, um dies zu belegen. Auch ist es möglich, dass progrediente Tumorzellen für ein Überleben weniger von einer erhöhten Expression an EGFR, sondern eher von einer erhöhten Aktivität des EGF- Rezeptors abhängig sind. Aber auch dafür werden weitere Studien erforderlich sein. Sollten sich die beobachteten Veränderungen in der EGFR- Expression im Verlauf der Progression in weiteren Studien bestätigen, müsste über EGFR als prädiktiver Faktor für ein Ansprechen auf eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitor neu diskutiert werden.

4.4. Kritische Bewertung der angewandten Methoden

4.4.1. RNA- Isolation

Eine unabdingbare Voraussetzung für die Erstellung und Vergleichbarkeit von Genexpressionsanalysen ist eine gute Qualität der eingesetzten RNA. Diese Nukleinsäure ist im Gegensatz zur nukleären DNA hochempfindlich und unterliegt einem raschen enzymatischen Abbau. Entscheidend für die RNA- Qualität sind die Art der

Probenentnahme und damit die Qualität des Ausgangsmaterials, die Transport- und Lagerbedingungen sowie die Probenaufbereitung.

Um das Gewebe in einem möglichst guten Zustand zu erhalten, wurden die Tumorproben, die im Rahmen dieser Arbeit zur RNA- Gewinnung eingesetzt wurden, sofort in RNA- Later überführt und innerhalb kurzer Zeit direkt auf Trockeneis eingefroren.

Zur Gewinnung einzelner Tumorzellen oder Tumorzellgruppen aus den heterogenen Gewebeproben kam die Laser Capture Mikrodisektion zum Einsatz. Die Laser Capture Mikrodisektion ist eine präzise Methode zur gezielten Gewinnung einzelner Zellen.

Große Areale sind ebenso wie kleine Zellkompartimente in einem reproduzierbaren Prozess isolierbar (Simone NL. et al, 1998; Miura K. et al, 2002; Wernert N, 2004). Da beim Laserschnitt und dem Prozess der Isolierung keine Hitze produziert wird, können Zellen sehr schonend und ohne Gefahr einer Verunreinigung aus einem Gewebeverband entnommen werden (Okuducu AF. et al, 2003). Die Laser Capture Mikrodisektion, in Kombination mit sich anschließende Analysen auf Genexpressionsebene, ist eine gute Methodik, mit der sich Fragestellungen zur Entstehung und Verhalten des Lungenkarzinoms möglicherweise beantworten lassen.

Die RNA aus den mikrodisezierten Geweben wurde anfangs mit dem Microprep- Kit von Stratagene nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Jedoch wies dieses Kit den Nachteil auf, dass für die Elution der RNA 25µl Elutionspuffer notwendig waren, was zu einer Verdünnung der schon geringen RNA- Konzentration führte. Deshalb kam das RNeasy Micro- Kit von Qiagen zum Einsatz, da hier bereits mit 14µl Elutionspuffer die RNA erfolgreich extrahiert werden konnte und somit höhere RNA- Konzentrationen in einem kleineren Volumen erzielt wurden.

Zurzeit übliche kommerziell erhältliche Kits für die Isolierung von RNA bzw. DNA konzentrieren sich auf die Extraktion einer der beiden Nukleinsäuren, da jedoch nur begrenztes Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand und sowohl RNA für die Genexpressionsanalysen und DNA für die Mutationsanalysen benötigt wurden, erfolgte in dieser Arbeit die Etablierung einer Methode zur simultanen Isolierung der beiden Nukleinsäuren, die sich als zuverlässig erwies. Die genaue Durchführung ist im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben (Kapitel 2.6.1.). Mit diesem RNA- Aufbereitungsverfahren konnten für die Mikroarray- Experimente Proben mit guter RNA- Qualität produziert werden, jedoch war für die Bewertung der RNA- Qualität die übliche Messung der Optischen Dichte nicht ausreichend und die Proben wurden zusätzlich im Agilent Bioanalyzer 2100 analysiert.

4.4.2. RNA- Amplifikation

Da für die Hybridisierung der Oligonukleotid- Arrays eine Mindestprobenmenge von 3 Mikrogramm nötig ist und durch die Laser Capture Mikrodisektion der Tumorzellen mit anschließender RNA-Extraktion nicht die nötige Probenmenge zu erreichen war, blieb nur die Möglichkeit, die RNA zu amplifizieren. Nach Etablierung der geeigneten Methode

wurde für die Amplifikation eine Kombination aus dem MessageAmp aRNA- Kit von Ambion und den biotinmarkierten Nukleotiden von ENZO für die Amplifikation gewählt, da mit dieser Methodik ausreichend amplifizierte RNA mit guter Qualität synthetisiert werden konnte. Zudem waren die Ergebnisse reproduzierbar.

4.4.3. Genexpressionsanalysen mittels Oligonukleotid- Arrays und „Real Time“- PCR

Da zurzeit keine Standards für die Durchführung von Mikroarray- Experimente vorliegen, ist es schwierig, direkte Vergleiche zwischen verschiedenen Experimenten anzustellen oder Daten aus mehreren Versuchen zu vereinen.

Viele Studien konnten bereits Fehlerquellen und Abweichungen in der Versuchsdurchführung der Mikroarray- Experimente verschiedener Labore aufzeigen. Sie beinhalten Variationen im Umgang mit dem Gewebeprobe und der RNA- Extraktion sowie Abweichungen bei der Amplifikation und der Array- Hybridisierung. Zudem gibt es verschiedene Formen von Mikroarrays wie z.B. cDNA- Arrays, Oligonukleotid- Arrays, „One-color“- Mikroarray und „Two-color“- Mikroarray und mehrere Firmen, die Mikroarrays anbieten wie z.B. Affymetrix, Applied Biosystems, Agilent und Eppendorf. Hinzu kommt, dass jeder Anbieter seine eigene Software für die Generierung eines quantitativen Signals für jede Probe auf dem Mikroarray benutzt (Shi L. et al, 2006). Um Qualitätskriterien zu etablieren, mit deren Hilfe die mittels Mikroarray generierten Daten verschiedener Labore und Studien verglichen werden können, erfolgte innerhalb des Mikroarray- Qualitätskontroll- Projekts (MAQC) eine groß angelegte Studie, in der Vergleiche zwischen verschiedenen Mikroarrays, unterschiedlichen Versuchsprotokollen und mehreren Normalisierungsverfahren durchgeführt wurden (Shi L. et al, 2006; Tong W. et al, 2006; Shippy R. et al, 2006, Patterson TA. et al, 2006; Ji H. et al, 2006; Canales RD. et al, 2006). In der im Rahmen des MAQC durchgeführten Studie von Shi erfolgte ein Vergleich von sechs (Applied Biosystems, Affymetrix, Agilent Technologie, GE „Healthcare“, Illumina und Eppendorf) kommerziell verfügbaren Mikroarrayplattformen in Bezug auf Vergleichbarkeit der ermittelten differentiell exprimierten Gene und der Reproduzierbarkeit. Die Arbeitsgruppe konnte anhand von 450 bis 550 differentiell exprimierten Genen zeigen, dass unter Verwendung des gleichen Versuchsprotokolls bei der Durchführung der Mikroarray- Experimente mit den Mikroarrays von Affymetrix, von Agilent Technologie, von Illumina und von Applied Biosystem mit einem Korrelationswert größer 0,9 sehr ähnliche Ergebnisse erstellt werden. So konnten 74% der differentiell exprimierten Gene bei allen verwendeten „One-color“- Mikroarrays nachgewiesen werden. Die Mikroarrays der Firma GE „Healthcare“ identifizierten 30% mehr Gene und zeigten auch in der Übereinstimmung der Gene mit einem Korrelationswert von 0,84 Abweichungen im Vergleich zu den anderen Arrays. Die Reproduzierbarkeit der Mikroarray- Ergebnisse wurde anhand mehrerer Probenansätze getestet. Hier konnte eine Übereinstimmung von 80 – 95% nachgewiesen

werden. Diese Daten zeigen, dass Mikroarray- Ergebnisse unter Verwendung des gleichen Versuchsprotokolls und der gleichen Vorgehensweise bei der Auswertung der Mikroarrays die Ergebnisse verschiedener Studien und Labore miteinander vergleichbar und die Ergebnisse auch reproduzierbar sind (Shi L. et al, 2006).

In der Studie von Patterson TA. erfolgte der Vergleich zwischen „One-color“ und „Two-color“- Mikroarrays der Firma Agilent, CapitalBio und TeleChem. Die „One-color“- Mikroarray- Methode basiert auf die Hybridisierung einer Probe pro Mikroarray, nachdem diese mit einem Farbstoff wie z.B. im Rahmen unserer Studie das Phycoerythrin markiert wurde. Vorteil dieser Methode ist, dass dieses experimentelle Design einfach und flexibel ist. Die Hybridisierung von einer Probe pro Mikroarray ermöglicht den Vergleich zwischen verschiedenen Mikroarrays und zwischen Gruppen von Proben. Bei der „Two-color“- Mikroarray-Methode werden zwei Proben mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert und auf demselben Mikroarray hybridisiert. Dies erlaubt einen direkten Vergleich der zwei Proben und minimiert Abweichungen, die aufgrund der experimentellen Mikroarray- Hybridisierung möglicherweise entstehen können (Patterson TA. et al, 2006). Patterson konnte mit dieser Studie zeigen, dass die „One-color“- Mikroarrays mehr differentielle Gene als die „Two-color“- Mikroarrays lieferten, was entweder auf eine höhere Sensitivität der „One-color“- Mikroarrays zurückzuführen ist oder aus eine nicht so starke Kompression des „Fold Change“ resultiert. Generell konnten aber mit beiden Methoden fast äquivalente und reproduzierbare Ergebnisse erstellt werden (Patterson TA. et al, 2006). Neben den verwendeten Mikroarrays ist auch die Amplifikation entscheidend für die Ergebnisse der Mikroarray- Studie. Um Abweichungen und Verfälschungen der Ergebnisse, die aus Fehlern bei der Amplifikation oder Mikroarray- Hybridisierung resultieren, wird von der Arbeitsgruppe Tong W. empfohlen standardisierte RNA- Proben mit bekanntem Genotyp und bekannten Genkopien als externe Qualitätskontrollen vor der Amplifikation und vor der Mikroarray- Hybridisierung den Proben hinzu zufügen. Der Vorteil dieser externen RNA- Kontrollen besteht in der Qualitätsabsicherung der eigenen Ergebnisse und ermöglicht eine leichtere Fehleranalyse bei verschiedenen Schritten des Versuchsprotokolls (Tong W. et al, 2006). Darüber hinaus erleichtert es den Vergleich verschiedener Studien (Ji H. et al, 2006). Diese Studien, die im Rahmen des MAQC durchgeführt wurden, zeigen, dass die im Rahmen unserer Arbeit verwendeten „One-color“- Oligonukleotid- Arrays von Affymetrix für die Identifizierung von differentiellen Genen zwischen verschiedenen Probengruppen geeignet sind und reproduzierbare Ergebnisse liefern. Da die Probenaufbereitung auch stets nach dem gleichen Versuchsprotokoll und von derselben Person durchgeführt wurde, sollten mögliche Abweichungen, die aus der experimentellen Vorgehensweise resultieren gering sein.

Aber auch die bioinformatische Auswertung der Mikroarray- Daten hat einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Ergebnis. Da es bis heute keine allgemein standardisierten Regeln gibt, wie Mikroarraydaten ausgewertet werden sollen, kann ein Vergleich mehrerer Studien schwierig sein (Zapala MA. et al, 2002; Tilstone C. 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum Vergleich der normalisierten Daten von den Tumorproben mit den Nichttumorproben bzw. primären Tumorproben mit den progredienten Tumorproben die „Significance Analysis of Microarrays“ (SAM) Methode (<http://www-stat.stanford.edu/tibs/SAM/>) verwendet. Diese Methode erwies sich bereits in mehreren Genexpressionsstudien als relativ robust und lieferte reproduzierbare Ergebnisse (Tusher VG. et al, 2001; Pan W., 2002, Huber W. et al. 2003; Neumann F. et al, 2004). Auch diesem Problem wurde im Rahmen des MAQC- Projekts nachgegangen. So erfolgte in der Studie von Shippy R. ein Vergleich mehrerer Methoden zur Normalisierung mit dem Ergebnis, dass alle in der Studie verwendeten Methoden ähnliche Ergebnisse lieferten (Shippy R. et al, 2006). Ausschlaggebend für den Einfluss auf das Ergebnis sind die gewählten Parameter der Auswahlkriterien für die differentiell exprimierten Gene wie z.B. p- Value und „Fold Change“ (Shi L. et al, 2006).

In unserer Arbeit wurde zur Auswahl der differentiell exprimierten Gene der „Fold Change“ und der q-Value (niedrigste falschpositiv Rate bei der ein Gen signifikant ist) herangezogen und entspricht damit den Empfehlungen des MAQC- Projekts. Als letzter Schritt der Datenanalyse wurde im Rahmen unserer Arbeit mit dem Programm „hclust“ eine so genannte hierarchische Clusternanalyse durchgeführt. Die Originaldaten, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, wurden in der GEO DataSets- Datenbank unter www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi hinterlegt.

Wahrscheinlich führt eine Reihe von statistischen Verfahren zu validen Ergebnissen, trotzdem ist es weiterhin ausgesprochen schwierig, direkte Vergleiche zwischen verschiedenen Experimenten anzustellen oder Daten aus mehreren Versuchen zu vereinen (Kuo WP. et al, 2002). Es ist daher wichtig, eine erhöhte bzw. erniedrigte Expression von identifizierten Genen mit anderen Methoden zu bestätigen.

Deshalb wurden die ermittelten Ergebnisse in dieser Arbeit durch eine quantitative „Real Time“- PCR unter Verwendung der Taqman- Technologie, die sehr präzise Ergebnisse liefert, bestätigt. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit des von den Patienten stammenden Untersuchungsmaterials konnten nur ausgewählte Gene mittels „Real Time“- PCR verifiziert werden. Das Prinzip der relativen Quantifizierung der Genexpression zwischen Nichttumor und Tumorgewebe beruht darauf, in beiden Gewebetypen mit Hilfe von PCR- Amplifikationen die Expression interessanter Gene (Zielgene) relativ zu einem stabil exprimierten „Housekeeping“- Gen zu bestimmen. Spezielle Software ermöglicht die exakte Quantifizierung der Expression von Genen. In dieser Arbeit wurden als Zielgene für die Bestätigung einer differentiellen Expression für das Adenokarzinom 16 Gene, für das Plattenepithelkarzinom 14 Gene und für das kleinzellige Lungenkarzinom 12 Gene ausgewählt. Als „Housekeeping“- Gen wurde RPS11 gewählt, da die Expression des Genes in den untersuchten Proben am wenigsten variierte.

Für die Bestätigung der differentiell exprimierten Gene der progredienten Tumorproben wurden für das progrediente Adenokarzinom 11 Gene sowie für das progrediente Plattenepithelkarzinom ebenfalls 11 Gene als Zielgene ausgewählt. Als „Housekeeping“- Gen kam hier RPS11 nicht mehr in betracht, da es zwischen den Primärtumoren und den

progredienten Tumoren Unterschiede in der Expression aufzeigte. Deshalb wurde zur Bestätigung der Oligonukleotid- Analysen GAPDH als „Housekeeping“- Gen gewählt. Bei der Auswahl der Zielgene wurde darauf geachtet, dass neben bekannten Genen wie MYC, PTTG1 und CTNNB1 im Hinblick auf weitere Untersuchungen auch die Expression von Genen analysiert wurde, deren genaue Funktion nicht sicher geklärt ist, bzw. die bisher nicht näher bei Lungenkarzinomen untersucht wurden wie z.B. FOXG1B und FYN.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse aus den Array- Experimenten mit den Ergebnissen der „Real- Time“- PCR wurde festgestellt, dass die Tendenz d.h. Überexpression oder Unterexpression und oft auch die Größenordnung der differentiellen Expression mit der Taqman- Technologie bestätigt werden konnte.

Die doppelte Bestätigung der Expression, der im Rahmen dieser Studie untersuchten Gene liefert ein gutes Maß an experimentelle Absicherung, dass es sich nicht um falsch positive Messungen bei der Arrayanalyse gehandelt hat.

In der Studie von Canales konnte gezeigt werden, dass eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen der quantitative „Real Time“- PCR und der Mikroarrays vorliegt. Generell sind die Mikroarrays im Vergleich zur „Real Time“- PCR weniger sensitiv. Vor allem bei Genen, die niedrig exprimiert wurden, konnte eine geringere Sensitivität bei den Mikroarrays beobachtet werden (Canales RD. et al, 2006).

4.4.4. Proteinnachweis mittels Immunhistochemie

Auch auf Proteinebene konnte nachdem die Fixierung und Dehydrierung der Gewebeschnitte optimiert wurden, mittels immunhistochemischer Analyse die differentielle Expression bestätigt werden. So konnte in Kryo- und Paraffingewebeschnitten von Primärtumorproben und progredienten Tumorproben des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms β - Catenin nachgewiesen werden.

Der immunhistochemische Nachweis des β - Catenin - Proteins erfolgte mittels des DAB- Systems von DAKO (siehe Methodenteil). Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Methoden ist eine gesteigerte Sensitivität durch die verstärkende Wirkung eines biotinylierten Brückenantikörpers an den Primärantikörper. Diesem Schritt folgte eine Inkubation mit einem StreptAvidin- Peroxidase- Konjugat, das durch die Reaktion mit einem Substratchromogen (hier DAB 3', 3'-Diaminobenzidin

Tetrahydrochlorid) angefärbt wurde. Als Gegenfärbung zur besseren Visualisierung der antikörpergefärbten Bereiche wurde eine Hämatoxylin II- Färbung eingesetzt.

Aufgrund dieser immunhistochemischen Analyse war es möglich β - Catenin im histologischen Schnittpräparat nicht nur nachzuweisen, sondern in der Tumorzelle präzise zu lokalisieren. Als weiteres Protein wurde EGFR immunhistochemisch untersucht, mit dem Ziel Unterschiede bezüglich der Expression zwischen Primärtumor und progredienten Tumor aufzuzeigen. Ein großer Nachteil hierbei ist, dass der immunhistochemische Nachweis keine präzise quantitative Aussage zulässt und die

Interpretation der Signalstärke d.h. die Abgrenzung zwischen stark positiv, zweifach positiv und einfach positiv trotz Verwendung der Kontrollobjektträger mit Score- Zahlen für die Färbungsintensität von DAKO, sehr subjektiv ist.

4.4.5. Methoden der Mutationsanalyse

Bei der Mutationsanalyse von EGFR wurden mit den angewandten Methoden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. So konnten mittels SSCP- Analyse Tumorproben mit auffälligem Bandenmuster identifiziert werden, die aber in der HPLC- Analyse nicht bestätigt werden konnten. Demgegenüber wurden mittels DHPLC weitere fragliche Proben gefunden, die in den SSCP- Analysen keine Veränderungen zeigten.

Die SSCP- Analyse erlaubt die Suche auch nach unbekannten Mutationen und Polymorphismen. Dabei ist es jedoch erforderlich, die Analyse unter verschiedenen Bedingungen durchzuführen, was Zeit- und Arbeitsaufwand sowie die Kosten dieser Methode erhöht. Aber auch dann sind nicht alle Veränderungen mit diesem Verfahren erkennbar. Die Angaben über die Sensitivität der SSCP- Analyse sind sehr unterschiedlich und hängen nicht nur von der jeweiligen Sequenzvariante sondern auch von der Länge des untersuchten DNA- Fragmentes ab. Nach Auswertung verschiedener Untersuchungen kommen Hayashi und Yandell zu dem Ergebnis, dass bei einer Fragmentlänge unter 200 Basenpaaren mit einer Sensitivität von über 90% zu rechnen ist und diese bei Fragmentlängen von 300 – 400 Basenpaaren noch bei über 80% liegen (Hayashi K. & Yandell DW. 1993; Salazar LA. et al, 2002).

Die DHPLC wird ebenfalls zur Suche von bekannten als auch von unbekannten Mutationen und Polymorphismen angewandt. Die Sensitivität dieser Methode wird von verschiedenen Autoren mit 91 – 100% angegeben (Ellis LA. et al, 2000; Jones AC. et al, 1999; Gross E. et al, 1999). Da jedoch bei der DHPLC die Basensequenz nicht direkt ermittelt wird, sondern lediglich eine veränderte Bindung der DNA an die Chromatographiesäule, ist es möglich, dass bestimmte DNA- Veränderungen nicht oder nicht sicher erkannt werden. So zeigte die Arbeitsgruppe um Ellis, dass bei einem Vergleich zwischen SSCP- und DHPLC- Analyse einige Sequenzvarianten mittels der DHPLC- Methode übersehen und nur 95% der Mutationen nachgewiesen wurden. Mit Hilfe der SSCP- Analyse, welche unter zwei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurde, konnten dagegen alle Mutationen d.h. 100% nachgewiesen werden (Ellis GA. et al, 2000). Jones beschrieb, dass für den Nachweis von Mutationen mit Hilfe der DHPLC- Analyse die Temperatur der Chromatographiesäule entscheidend ist und bereits Abweichungen von 1-2°C von der berechneten Temperatur zu einem Sensitivitätsverlust führen (Jones AC. et al, 1999). Auch ist nicht ausgeschlossen, dass fehlerhaft eingebaute Basen sowohl in der SSCP als auch in der DHPLC irrtümlich als eine Sequenzvariante detektiert werden.

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der SSCP- und DHPLC- Analyse im Rahmen

unserer Studie und um keine Mutation zu übersehen, war es erforderlich, alle Tumorproben zu sequenzieren. Die Sequenzierung ist die exakteste Methode zur Suche nach Mutationen oder Polymorphismen, da hier die Basensequenz direkt bestimmt wird. Daher sind im Gegensatz zur SSCP- oder DHPLC- Analyse keine Nachuntersuchungen auffälliger Proben erforderlich.

4.5. Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen histologischen Subtypen des Lungenkarzinoms spezifische Genexpressionsprofile zeigen, die die biologischen Eigenschaften der Tumorzelle widerspiegeln. Die Daten der primären Lungenkarzinome bilden die Grundlage für eine molekulare Klassifizierung und für die Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen bei Lungenkarzinomen. Darüber hinaus war es möglich Unterschiede in der Genexpression während der Progression vom primären zum progredienten nichtkleinzelligen Lungenkarzinom nachzuweisen. Die Mikroarray- basierenden Expressionsprofile der progredienten Karzinome zeigen interessante neue Kandidatengene und Signalwege die mit der Progression des Lungentumors assoziieren. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Progression weder auf RNA- Ebene noch auf Proteinebene eine signifikanten Veränderung der EGFR- Expression stattfindet. Auch wurde keine Zunahme der Mutationsrate in der Kinasedomäne des EGFR- Gens während der Progression vom primären zum progredienten nichtkleinzelligen Lungenkarzinom beobachtet.

4.6. Ausblick

Das primäre Lungenkarzinom ist heute das häufigste zum Tod führende Malignom der Frauen und Männer weltweit. Trotz der weit reichenden Veränderungen in der Diagnostik und Therapie hat sich seine Prognose ohne Berücksichtigung des Patientenstadiums in den letzten Jahrzehnten kaum verändert.

Wie in unserer Studie gezeigt werden konnte, betreffen Veränderungen in der Genexpression überwiegend solche Gene, die direkt oder indirekt die Proliferation, das Wachstum und die Metastasierung der Tumorzellen regulieren. Trotz der Vielzahl der heute bekannten, zum Teil sehr detaillierten Informationen zu Defekten einzelner Gene sind weitere Studien notwendig, um klinische und therapeutisch verwertbare Aufschlüsse zur Bedeutung genetischer Veränderungen beim Lungenkarzinom zu erlangen.

Die genomische Heterogenität und Instabilität des Lungenkarzinoms sind wesentliche Hindernisse für eine molekulare Tumorthherapie. Jedoch geben neuere Ergebnisse klinischer Studien zu der Hoffnung Anlass, dass das Tumorwachstum nicht nur in experimentellen Modellen, sondern auch bei Tumorpatienten durch eine zielgerichtete Therapie z.B. mit Erlotinib oder Cetuximab gehemmt wird.

5. Zusammenfassung

Lungenkarzinome gehören zu den häufigsten bösartigen Tumoren. Es besteht daher großes Interesse daran, neue Einblicke in die molekulare Pathogenese dieser Tumorentität zu erhalten. Deshalb wurden im ersten Teil der Arbeit Genexpressionsanalysen von Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen im Vergleich zu Nichttumoren mittels Oligonukleotid- Array erstellt. So konnten durch einen Vergleich der Genexpressionsprofile 944 signifikant differentiell exprimierte Gene mit einem „Fold Change“ größer bzw. kleiner 2 identifiziert werden. Neben Genen wie MYC, PCNA, CyclinA und SFTB, die bekanntermaßen in Lungenkarzinomen eine differentielle Expression zeigen, wurden interessante Gene identifiziert, deren Bedeutung im Lungenkarzinom bisher weitgehend unbekannt ist, z.B. die Protoonkogene FOXG1B, FYN und die Komplementkomponente C3. Darüber hinaus wurde mittels Clusteranalysen gezeigt, dass die differentiell exprimierten Gene für eine molekulare Abgrenzung der Tumorsubtypen geeignet sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte ein Vergleich der Genexpressionsprofile von primären mit progredienten nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, mit dem Ziel neue Progressions- assoziierte Gene im Lungenkarzinom zu identifizieren. So konnten insgesamt 239 signifikant differentiell exprimierte Gene mit einem „Fold Change“ größer bzw. kleiner 1,5 identifiziert werden. Interessanterweise wurde die Überexpression von mehreren Genen des Wnt- Signalweges in den progredienten Lungenkarzinomen beobachtet, was auf eine Aktivierung dieses Signalweges während der Progression deutet. Zur Bestätigung der Array- Ergebnisse, wurde in den primären Lungenkarzinomen die differentielle Expression von insgesamt 42 Genen (Adenokarzinom 16 Gene, Plattenepithelkarzinom 14 Gene, kleinzelliges Lungenkarzinom 12 Gene) und in den progredienten Lungenkarzinomen die Expression von insgesamt 22 Genen (progredientes Adenokarzinom 11 Gene und progredientes Plattenepithelkarzinom 11 Gene) mittels „Real Time“- PCR unter Verwendung der Taqman- Technologie quantifiziert. Auf Proteinebene konnte die verstärkte Expression von β - Catenin im progredienten Karzinom bestätigt werden. Da sowohl eine erhöhte EGFR- Mutationsrate als auch eine Überexpression von EGFR in progredienten Karzinomen beschrieben wurde, erfolgte im dritten Teil der Arbeit mittels SSCP-, DHPLC- Analysen und Sequenzierung eine Mutationsanalyse des potentiellen Kandidatengens EGFR in den primären und progredienten Tumorproben. Darüber hinaus wurde immunhistochemisch ein Nachweis der EGF- Rezeptorexpression durchgeführt. Jedoch wurden keine Zunahme der Mutationsrate sowie keine Veränderungen in der EGFR- Expression während der Progression in den untersuchten Tumorkollektiven festgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Genexpressionsprofile erstellt, die interessante neue Einblicke in die Tumorentstehung und Tumorprogression zeigen.

Summary

In the first part of this study, we examined gene expression profiles of tumor cells from 29 patients with lung cancer (10 adenocarcinomas (AC), 10 squamous cell carcinomas (SCC), 9 small cell lung cancer (SCLC)) in comparison to lung tissue of 5 control patients without tumor. For expression analysis, microarrays covering 8793 defined genes (Human HG Focus Array, Affymetrix) were used. Comparing AC, SCC and SCLC with normal lung tissue, we found 205, 335 and 404 genes, respectively, that were at least 2-fold differentially expressed (estimated false discovery rate: < 2,6%). Each histological subtype showed a distinct expression profile. For example, in AC a pattern of differentially expressed cell adhesion molecules was found including 3 upregulated (ICAM1, ITGB2, ITGA3) and 8 downregulated genes (TSPAN-1, CHL1, EFS, DSC3, DSG3, E48, NELL2, PGALS7) (fold change: 2.1-12.3) which might play a role in metastasis of tumor cells. In SCC, 39 out of 172 overexpressed genes (fold change: 2.1-5.7) were associated with regulation of proliferation and cell cycle reflecting the high proliferative activity of these tumors. In addition, new candidate genes were identified for example the oncogenes FOXG1B and FYN in SCLC. Moreover, the findings demonstrate that molecular characterization of lung cancers and normal lung tissue can be based on gene expression data. To identify genes associated with lung cancer progression, in the second part of this study we examined gene expression profiles of tumor cells from 20 patients with primary, untreated non-small-cell lung cancer (10 adenocarcinomas (AC) and 10 squamous cell carcinomas (SCC)) in comparison to tumor tissue of 23 patients with stage IIIB or stage IV non-small-cell lung cancer (15 AC and 8 SCC). Based on differentially expressed genes, that were at least 1,5-fold differentially expressed (estimated false discovery rate: < 5%), primary cancer samples could be separated from recurrent tumor samples. Our analysis has identified 115 and 124 significantly differentially expressed genes in AC (113 ↑, 2 ↓) and SCC (29 ↑, 95 ↓) respectively. Interestingly, in recurrent lung cancer we found increased expression of several genes related to the wingless (CTNNB1, FZD6, RYK, MYC) signalling pathways. The expression data for selected genes (primary lung cancer 42 genes (AC 16, SCC 14, SCLC 12 genes), recurrent lung cancer 20 genes (AC 10 genes and SCC 10 genes)) were validated using quantitative real-time PCR. Moreover, we could show the higher expression of β -catenin protein in recurrent tumor samples by immunohistochemistry. Our data suggest, that deregulation of the Wnt signalling pathway plays a role in progression of lung cancer. Finally, we analysed the epidermal growth factor receptor (EGFR) in NSCLCs. The EGFR plays an important role in tumor formation and progression in non-small cell lung cancer. Furthermore, somatically acquired mutations in the EGFR gene in lung cancer are associated with progression. Therefore, were screened in the 43 NSCLCs (20 primary NSCLCs and 23 recurrent NSCLCs) Exons 18 – 21 of EGFR, the sites of hotspot mutations in lung cancer, but only silent mutations were found. In addition, we studied the EGFR expression in NSCLC immunohistochemistry. There was no difference between the EGFR expression between primary and recurrent lung carcinomas. In conclusion, our microarray-based expression profiling revealed interesting novel candidate genes. Further characterization of these genes will lead to a better understanding of the mechanism of lung tumor formation and progression.

6. Danksagung

Die vorliegende Dissertation ist durch Mithilfe zahlreicher Personen entstanden, denen ich für die angenehme Mitarbeit danken möchte.

Zuallererst möchte ich dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Dr. med. U.-P. Rohr für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie und der Vergabe des interessanten Themas danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. R. Kronenwett für das Interesse an dieser Arbeit, den hilfreichen fachlichen Ratschlägen sowie der Übernahme der Begutachtung dieser Dissertation.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. med. H. Geddert für die pathologische Begutachtung der histologischen Färbungen sowie für die umfassende Unterstützung und Gesprächsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. med. H. Bojar für die freundliche Unterstützung und fachliche Beratung.

Mein Dank gilt auch Herrn M. Roskopf vom Institut für Bioinformatik, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.

Ferner möchte ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Instituts danken, besonders Frau S. Bork, Frau B. Junge und Frau S. Pechtel danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung, Kollegialität und gute Zusammenarbeit.

Eine große Stütze während der gesamten Zeit an meiner Arbeit zu diesem Thema war mir meine Familie, der ich sehr herzlich für die stete Unterstützung und Motivation danken möchte.

7. Literaturverzeichnis

- Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ (1999) Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59 (11): 2615 - 2622
- Ajona D, Castano Z, Garayoa M, zudaire E, Pajares MJ, Martinez A, Cuttitta F, Montuenga LM, Pio R (2004) Expression of complement factor H by Lung Cancer Cells: effects on the activation of the alternative pathway of complement. *Cancer Research* 64: 6310 - 6318
- Alberg AJ, Samet JM (2003) Epidemiology of lung cancer *Chest* 123: 21 – 49
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) *Molekularbiologie der Zelle*. Verlag: WILEY-VCH, 4. Auflage
- Albig W, kioschis P, Poustka A, Meergans K, Doenecke D (1997) Human histone gene organization: nonregular arrangement within a large cluster. *Genomics* 40: 314 - 322
- Alkhamesi NA, Ziprin P, Pfistermuller K, Peck DH, Darzi AW (2005) ICA-1 mediated peritoneal carcinomatosis, a target for therapeutic intervention. *Clinical & Experimental Metastasis* 22: 449 – 459
- Amatschek S, Koenig U, Auer H, Steinlein P, Pacher M, Gruenfelder A, Dekan G, Vogel S, Kubista E, Heider KH, Stratowa C, Schreiber M, Sommergruber W (2004) Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 64: 844 - 856
- Angeloni D, Lindor NM, Pack S, Latif F, Wei MH, Lerman MI (1999) CALL gene is haploinsufficient in a 3p-syndrome patient. *Am J Med Genet* 86: 482 - 485
- Argaves WS, Tran H, Burgess WH, Dickerson K (2006) Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *The Journal of Cell Biology* 111 (6): 3155 - 3164
- Asea A, Kraeft SK, Jones EAK, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6: 435 - 442
- Bai RY, Koester C, Ouyang T, Hahn SA, Hammerschmidt M, Peschel C, Duyster J (2002) SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGF-beta signalling. *Nature Cell Biol* 4: 181 – 190
- Balsara BR, Testa JR (2002) Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* 21: 6877 - 6883
- Bausero MA; Page DT, Osinaga E, Asea A (2004) Surface expression of Hsp25 and Hsp72 differentially regulates tumor growth and metastasis. *Tumor Biol* 25: 243 – 251

- Betz C, Papadopoulos T, Buchwald J, Dammrich J, Muller-Hermelink HK (1995) Surfactant protein gene expression in metastatic and micrometastatic pulmonary adenocarcinomas and other non-small-cell lung carcinomas: detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 55 (19): 4283 – 4286
- Bisgaard AM, Kirchhoff M, Tümer Z, Jepsen B, Brondum-Nielsen K, Cohen M, Hamborg-Petersen B, Bryndorf T, Tommerup N, Skovby F (2006) Additional chromosomal abnormalities in patients with a previously detected abnormal karyotype, mental retardation, and dysmorphic features. *American Journal of Medical Genetics Part A* 140A: 2180 - 2187
- Blumenthal RD, Hansen HJ, Goldenberg DM (2005) Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic antigen). *Cancer Res* 65 (19): 8809 – 8817
- Bobos M, Hytioglou P, Kostopoulos I, Karkavelas G, Papadimitriou CS (2006) Immunohistochemical distinction between merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. *Am J Dermatopathol* 28 (2): 99 - 104
- Bonay M, Soler P, Riquet M, Battesti JP, Hance AJ, Tazi A (1994) Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10 (4): 453 - 461
- Bosken CH, Wei Q, Amos CI, Spitz MR (2002) An analysis of DNA repair as a determinant of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 1091 - 1099
- Botzler C, Issels R, Multhoff G (1996) Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 43: 226 – 230
- Boudreau N, Bissell MJ (1998) Extracellular matrix signalling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol* 10: 640 - 646
- Bowers DJ, Calvano JE, Alvarez SM, Coyle SM, Macor MA, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF (2006) Polymorphisms of heat shock protein-70 (HSPA1B and HSPA1L Loci) do not influence infection or outcome risk in critically ill surgical patients. *Shock* 25 (2): 117 – 122
- Brabletz T, Jung A, Hermann K, Gunther K, Hohenberger W, Kirchner T (1998) Nuclear expression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract* 194: 701 – 704
- Bredin CG, Sundquist KG, Hauzenberger D, Klominek J (1998) Integrin dependent migration of lung cancer cells to extracellular matrix components. *Eur Respir J* 11: 400 - 407
- Brison O (1993) Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1155: 25 - 41

- Brodt P (1991) Adhesion mechanisms in lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 10 (1): 23 - 32
- Bromen K, Pohlabeln H, Jahn I, Ahrens W, Jöckel KH (2000) Aggregation of lung cancer in families: results from a population- based case- control study in Germany. *Am J Epidemiol* 15 (6): 497 – 505
- Bryan J, Edwards R, Matsudaira P, Otto J, Wulfkühle J (1993) Fascin, an echinoid actin-bundling protein, is a homolog of the Drosophila singed gene product. *Cell Biology* 90: 9115 – 9119
- Bunn PA Jr (2004) The potential role of proteasome inhibitors in the treatment of lung cancer. *Clin Cancer Res* 10 (12Pt2): 4263s-4265s
- Bunn PA Jr, Dziadziuszko R, Varella-Garcia M, Franklin WA, Witta SE, Kelly K, Hirsch FR (2006) Biological Markers for Non-small cell lung cancer patient selection for Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy. *Clin Cancer Res* 12 (12): 3552 - 3656
- Burke L, Flieder DB, Guinee DG, Brambilla E, Freedman AN, Bennett WP, Jones RT, Borkowski A et al. (2005) Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non- small- cell lung carcinoma. *Clinical Cancer Res* 11: 232 – 241
- Cai D, Latham VM, Zhang X, Shapiro GL (2006) Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin- dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 66 (18): 9270 – 9280
- Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsoodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang W, Goodsaid FM (2006) Evaluation of DNA microarrays results with quantitative gene expression platforms. *Nature Biotechnology* 24 (9): 1115 - 1122
- Carystinos GD, Bier A, Batist G (2002) The role of connexin-mediated cell-cell communication in breast cancer metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 6 (4): 431 – 440
- Cassoni P, Sapino A, Stella A, Bussolati G (1998) Antiproliferative effect of oxytocin through specific oxytocin receptors in human neuroblastoma and astrocytoma cell lines. *Exp Med Biol* 449: 245 - 246
- Catusse C, Polette M, Coraux C, Burlet H, Birembaut P (2000) Modified basement membrane composition during bronchopulmonary tumor progression. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48 (5): 663 - 669
- Caudroy S, Cucherousset J, Lorenzato M, Zahm JM, Martinella- Catusse C, Polette M, Birembaut P (2004) Implication of zstatin in tumor progression of human bronchopulmonary carcinomas. *Hum Pathol* 35 (10): 1218 - 1222

- Chan GKT, Schaar BT, Yen TJ (1998) Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1. *JCB* 143 (1): 49 – 63
- Chang WC, Everley LC, Pfeiffer GR 2nd, Cooper HS, Barusevicius A, Clapper ML (2005) Sulindac sulfone is most effective in modulating beta-catenin-mediated transcription in cells with mutant APC. *Ann NY Acad Sci* 1059: 41 - 55
- Chao EC, Lipkin SM (2006) Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair- deficient carcinogenesis. *Nucleic Acids research* 34 (3): 840 – 852
- Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T (2003) Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 299: 721 - 725
- Chmara M, Wozniak A, Ochman K, Kobierska G, Dziadziuszko R, Sosinska-Mielcarek K, Jassem E, Skokowski J, Jassem J, Limon J (2004) Loss of heterozygosity at chromosomes 3p and 17p in primary non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 24 (6): 4259 - 4263
- Cho HP, Liu Y, Gomez M, Dunlap J, Tyers M, Wang Y (2005) The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules. *Molecular and Cellular Biology* 25 (11): 4541 – 4551
- Ciardiello F, De Vita F, Orditura M, Tortora G (2004) The role of EGFR inhibitors in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 16: 130 - 135
- Clements NC Jr, Nelson MA, Wymer JA, Savage C, Aguirre M, Garewal H (1995) Analysis of K- ras gene mutations in malignant and non-malignant endobronchial tissue obtained by fiberoptic bronchoscopy. *Am J Respir Crit Care Med* 152 (4 Pt 1): 1374 – 8
- Coe BP, Lockwood WW, Girard L, Chari R, MacAulay C, Lam S, Gazdar AF, Minna JD, Lam WL (2006) Differential disruption of cell cycle pathways in small cell and non-small cell lung cancer. *BJ Cancer* 94: 1927 – 1935
- Colditz G, DeJong W, Hunter D, Trichopoulos D, Willett W (1996) (Hrsg.): Harvard Report on Cancer Prevention. *Cancer Causes and Control* 7: 3-59
- Conde E, Angulo B, Morente M, Torres-Lanzas J, Lopez-Encuentra A, Lopez-Rios F, Sanchez-Cespedes M (2006) Molecular context of the EGFR mutations: Evidence for the activation of mTOR/S6K signalling. *Human Cancer Biology* 12 (3): 710 – 717
- Cong F, Schweizer L, Varmus H (2004) Wnt signals across the plasma membrane to activate the β -catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* 131: 5103 – 5115
- D'Angelo MA, Anderson DJ, Richard E, Hetzer MW (2006) Nuclear pores form de novo from both sides of the nuclear envelope. *Science* 312: 440 - 443

- Damstrup L, Pedersen MW, Bastholm L, Elling F, Poulsen S (2002) Epidermal growth factor receptor mutation type III transfected into a small cell lung cancer cell line is predominantly localized at the cell surface and enhances the malignant phenotype. *Int J Cancer* 97: 7 – 14
- Dannenberg Lo, Chen HI, Tian H, Edenberg HJ (2006) Differential regulation of the alcohol dehydrogenase 1B (ADH1B) and ADH1C genes by DNA methylation and histone deacetylation. *Alcohol Clin Exp Res* 30 (6): 928 - 937
- de las Penas R, Sanchez-ronco M, Alberola V, Taron M, Camps C, Garcia-Carbonero R, Massuti B, Queralt C, Botia M, Garcia-Gomez R, Isla D, Cobo M, Santarpia M, Cecere F, Mendez P, Sanchez J, Rosell R (2006) Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann of Oncology* 17: 668 - 675
- DeLuca JG, Dong Y, Hergert P, Strauss J, Hickey JM, Salmon ED, McEwen BF (2005) Hec1 and Nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites. *Mol Biol of the Cell* 16: 519 - 531
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274 (5286): 430 - 432
- Derksen PW, Tjin E, Meijer HP (2004) Illegitimate WNT signalling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6122 – 6127
- Deutsche Krebsgesellschaft E.V.(2002) Qualitätssicherung in der Onkologie (Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen) *W. Zuckerschwerdter Verlag* 107 - 140
- Dobashi Y, Goto A, Fukayama M, Abe A, Ooi A (2004) Overexpression of CDK4 / Cyclin D1, a possible mediator of apoptosis and an indicator of prognosis in human primary lung carcinoma. *Int J Cancer* 110: 532 – 541
- Drabkin HA, Mendez MJ, Rabbitts PH, Varkony T, Bergh J, Schlessinger J, Erickson P & Gemmill RM (1992) Characterization of the submicroscopic deletion in the small-cell lung carcinoma (SCLC) cell line U2020. *Genes Chromosomes Cancer* 5: 67-74
- Driscoll JA, Worzel B, MacLean D (2003) Classification of gene expression data with genetic programming. *Genetic Programming Theory and Practice Edited, Kluwer Academic* 25 - 42
- Dy GK, Adjei AA (2001) Novel targets for lung cancer therapy: part1. *J Clin Oncol* 20: 2881 – 2894
- Dy GK, Adjei AA (2002) Novel targets for lung cancer therapy: part2. *J Clin Oncol* 20: 3016 – 3028
- Ebina M, Steinberg SM, Mulshine JL, Linnoila RI (1994) Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 54 (9): 2496 – 2503

- Eigenbrodt E, Kallinowski F, Ott M, Mazurek S, Vaupel P (1998a) Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumors. *Anticancer Res* 18 (5a): 3267 - 3274
- Eigenbrodt E, Mazurek S, Friis RR (1998) Double role of pyruvate kinase M2 in the regulation of phosphometabolite pools. *Cell growth and oncogenesis, Birkhäuser Verlag Basel* pp. 15 - 30
- Ellis LA, Taylor CF, Taylor GR (2000) A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. *Human Mutation* 15: 556 – 564
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD (1996) Laser capture microdissection. *Science* 274: 998 - 1001
- Esposito V, Baldi A, De Luca A, Tonini G, Vincenzi B, Santini D, Persichetti P, Mancini A, Citro G, Baldi F, Groeger AM, Caputi M (2005) Cell cycle related proteins as prognostic parameters in radically resected non-small cell lung cancer. *J. Clin. Pathol.* 58: 734 – 739
- Evans W E, Relling MV (1996) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286 (5439): 487 - 491
- Ewis AA, Kondo K, Dang F, Nakahori Y, Shinohara Y, Ishikawa M, Baba Y (2006) Surfactant protein B gene variations and susceptibility to lung cancer in chromate workers. *American Journal of Industrial Medicine* 49: 367 - 373
- Falk J, Thoumine O, Dequidt C, Choquet D, Faivre-Sarrailh C (2004) NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts. *Molecular Biology of the Cell* 15: 4695 – 4709
- Farkas B, Hantschel M, Magyarlaki M, Becker B, Scherer K, Landthaler M, Pfister K, Gehrman M, Gross C, Mackensen A, Multhoff G (2003) Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res* 13: 147 - 152
- Fathi Z, Corjay MH, Shapira H, Wada E, Benya R, Jensen R, Viallet J, Sausville EA, Battey JF (1993) BRS-3: A novel Bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 268 (8): 5979 - 5984
- Fay MJ, Du J, Longo KA, North WG (1999) Oxytocin does not induce a rise in intracellular free calcium in human breast cancer cells. *Mol Pathol Pharmacol* 103: 115 - 128
- Fischer H, Salahshor S, Stenling R, Björk J, Lindmark G, Iselius L, Rubio C, Lindblom A (2001) COL11A1 in FAP polyps and in sporadic colorectal tumors. *BMC Cancer* 1 (17): 1471 – 2407
- Fischer H, Stenling R, Rubio C, Lindblom A (2001) Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. *Carcinogenesis* 22 (6): 875 – 878

- Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438: 1116 - 1122
- Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF (1987) elevated levels of glucose transport and transport messenger RNA are induced by ras or scr oncogenes. *Science* 235: 1492 - 1495
- Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD (2003) Lung cancer 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 58: 892 – 900
- Ford JG, Li Y, O'Sullivan MM, Demopoulos R, Garte S, Taioli E, Brandt-Rauf PW (2000) glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung cancer risk in african-americans. *Carcinogenesis* 21(11): 1971 – 1975
- Frants SGM, Marynen P, Hartmann D, Fryns JP, Steyaert J, Schachner M, Rolf B, Craessaerts K, Snellix A, Hollanders K, D'Hooge R, De Deyn PP, Froyen G (2003) CALL interrupted in a patient with non-specific mental retardation: gene dosage-dependent alteration of murine brain development and behaviour. *Hum Molec Genet* 12: 1463 - 1474
- Fujita M, Furukawa Y, Tsunoda T, Tanaka T, Ogawa M, Nakamura Y (2001) Up-regulation of the ectodermal-neural cortex 1 (ENC1) gene, a downstream target of the β -catenin/T-cell factor complex, in colorectal carcinomas. *Cancer Research* 61: 7722 – 7726
- Garfinkel L, Stellman SD (1988) Smoking and lung cancer in women: findings in a prospective study. *Cancer Research* 48 (23): 6951 – 5
- Gibbs JB, Oliff A, Kohl NE (1994) farnesyltransferase Inhibitors: Ras Research Yields a Potential Cancer Therapeutic. *Cell* 77: 175 – 178
- Gil A, Andres-Pons A, Fernandez E, Valiente M, Torres J, Ververa J, Pulido R (2006) Nuclear localization of PTEN by a RAN-dependent mechanism enhances apoptosis: involvement of an n-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. *Molecular Biology of the Cell* 17: 4002 - 4013
- Giles RH, van Es JH, Clevers H (2003) Caught up in a Wnt signalling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653: 1 - 24
- Goeze A, Schlüns K, Wolf G, Thäsler Z, Petersen S, Petersen I (2002) Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Journal of Pathology* 196: 8 – 16
- Görlich D, Kutay U (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 607 - 660
- Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR (2001) Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105: 863 - 875

- Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ (2005) c- Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nature cell biology* 7 (3): 311 – 318
- Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, Lamb ML, Kohman LJ, Poiesz BJ (1999) Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non- small- cell lung cancer. *J Clin Oncol* 17 (2): 668 - 675
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54 (18): 4855 - 78
- Greenblatt MS, Beaudet JG, Gump JR, Godin KS, Trombley L, Koh J, Bond JP (2003) Detailed computational study of p53 and p16: using evolutionary sequence analysis and disease- associated mutations to predict the functional consequences of allelic variants. *Oncogene* 22: 1150 - 1163
- Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M (1999) A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 105: 72 - 78
- Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley J (1995) The human lumican gene. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (37): 21942 – 21949
- Guggner M, Kappeler A, Vonlanthen S, Altermatt HJ, Ris HB, Lardinois D, Borner MM, Heighway J, Betticher DC (2001) Alterations of cell cycle regulators are less frequent in advanced non-small cell lung cancer than in respectable tumors. *Lung Cancer* 33 (2-3): 229 - 239
- Hang J, Dasso M (2002) Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem* 277: 19961 – 19966
- Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA (1996) Discovery of a novel, potent, and Scr family-selective tyrosine kinase inhibitor. *J Biol Chem* 271 (2): 695 - 701
- Hansen HH, Dombernowsky P, Hirsch FR (1978) Staging procedures and prognostic features in small cell anaplastic bronchogenic carcinoma. *Semin Oncol* 5 (3): 280 – 287
- Haubner R, Wester HJ, Senekowitsch-Schmidtke R, Diefenbach B, Kessler H, Stöcklin G, Schwaiger M (1997) RGD- Peptides for tumor targeting: Biological evaluation of radioiodinated analogs and introduction of a novel glycosylated peptide with improved biokinetics. *J Lab Compd Radiopharm* 40: 383 - 385
- Haubner R (2006) Alpha(v)beta- (3)-integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33 (13): 54 - 63

- Hayashi K, Yandell DW. (1993) How sensitive is PCR- SSCP?
Hum Mutat 2 (5): 338 - 346
- Hendler FJ & Ozanne BW (1984) Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest* 74: 647-651
- Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, Oesch F (1998) Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility; Recent Results.
Cancer Res 154: 47 – 85
- Herbst RS, Bunn PA Jr (2003) Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 9: 5813 – 5824
- Hermeking H (2003) The c-MYC oncogene as a cancer drug target. *Curr Cancer Drug Targets* 3: 163 - 175
- Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, Suyama M, Takagi H, Nakamura Y & Takahashi T (1992) Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 7: 445-449
- Hibi K, Westra WH, Borges M, Goodman S, Sidransky D, Jen J (1999) PGP9.5 as a candidate tumor marker for non-small-cell lung cancer.
Am J of Pathol 155 (3): 711 - 715
- Hilska M, Collan Y, Peltonen J, Gullichsen R, Pääjnen H, Laato M (1998) The distribution of collagen types I, III and IV in normal and malignant colorectal mucosa.
Eur J Surg 164: 457 - 464
- Hirsch FR, Garcia MV, Bunn PA, Di Maria MV, Veve R, Bremnes RM, Baron AE, Zeng C, Franklin WA (2003) Epidermal Growth Factor Receptor in non-small cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J of Clinical Oncology* 21 (20): 3798 - 3807
- Huang CL, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, Ueno M (2005) Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor-an expression in non-small-cell lung cancer.
Journal of Clinical Oncology 23 (34): 8765 – 8773
- Huang Q, Zu Y, Fu X, Wu T (2005) Expression of heat shock protein 70 and 27 in non-small cell lung cancer and its clinical significance.
Technolog Med Sci 25 (6): 693 - 695
- Huber W, von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M (2002) Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18 (1): 96 – 104
- Huber W, von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M (2003) Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2 (1): Article 3

- Hugh TJ, Dillon SA, O'Dowd G, Getty B, Pignatelli M, Poston GJ, Kinsella AR (1999) β -catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 82: 504 - 511
- Hughes TA, Brady HJ (2006) Regulation of Axin2 expression at the levels of transcription, translation and protein stability in lung and colon cancer. *Cancer Lett* 233 (2): 338 – 347
- Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD, Gazdar AF (1995) Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *J Am Med Assoc* 273: 558 - 563
- Hommura F, Dosaka-Akita H, Kinoshita I, Mishina T, Hiroumi H, Ogura S, Katoh H, Kawakami Y (1999) Predictive value of expression of p16^{INK4A}, retinoblastoma and p53 proteins for the prognosis of non- small- cell lung cancers. *British J Cancer* 81 (4): 696 – 701
- Hommura F, Furuuchi K, Yamazaki K, Ogura S, Kinoshita I, Shimizu M, Moriuchi T, Katoh H, Nishimura M, Dosaka-Akita H (2002) Increased Expression of β -catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer* 94 (3): 752 - 758
- Hong WK & Ullrich A (2000) The role of EGFR in solid tumors and implications for therapy. *Oncology Biotherapeutics* 1: 2 - 24
- Horton MA (1997) The $\alpha\beta$ 3 integrin “vitronectin receptor”. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 721 - 725
- Hynes RO (1992) Integrines: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 69: 11 - 25
- Iijima H, Tomizawa Y, Dobashi K, Saito R, Nakajima T, Mori M (2004) Allelic losses on chromosome 3p are accumulated in relation to morphological changes of lung adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* 91: 1143 - 1148
- Ikeda K, Iyama K, Ishikawa N, Egami H, Nakao M, Sado Y, Ninomiya Y, Baba H (2005) Loss of expression of type IV collagen $\alpha 5$ and $\alpha 6$ chains in colorectal cancer associated with the hypermethylation of their promoter region. *American Journal of Pathology* 168 (3) 856 – 865
- Ikeda S, Fujimori M, Shibata S, Okajima M, Ishizaki Y, Kurihara T, Miyata Y, Iseki M, Shimizu Y, Tokumoto N, Ozaki S, Asahara T (2006) Combined immunohistochemistry of β -catenin , cytokeratin 7, and cytokeratin 20 is useful in discriminating primary lung adenocarcinomas from metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 6: 31
- Iniesta P, Gonzalez-Quevedo R, Moran A, Garcia-Aranda C, de Juan C, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Diaz-Rubio E, Balibera JL, Benito M (2004) Relationship between 3p deletions and telomerase activity in non-small-cell lung cancer: prognostic implications. *British Journal of Cancer* 90: 1983 – 1988

- Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, Suehisa H, Ouchida M, Aoe K, Aoe M, Kiura K, Shimizu N, Date H (2006) Presence of Epidermal Growth Factor Receptor Gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66 (16): 7854 - 7858
- Italiano A, Vandenbos FB, Otto J, Mouroux J, Fontaine D, Marcy PY, Cardot N, Thyss A, Pedeutour F (2006) Comparison of the epidermal growth factor receptor gene and protein in primary non-small cell lung cancer and metastatic sites: implications for treatment with EGFR- inhibitors. *Ann of Oncology* 17: 981 - 985
- Iwaya K, Ogawa H, Kuroda M, Izumi M, ishida T, Mukai K (2003) Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta- catenin is associated with lung metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis* 20: 525 - 529
- Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL (2006) DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chem. Rev* 106: 302 – 323
- Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M (1998) Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like protease. *EMBO J* 17: 6124 – 6134
- Ji H, Davis RW (2006) Data quality in genomics and microarrays. *Nature Biotechnology* 24 (9): 1112 – 1113
- Ji P, Agrawal S, Diedrichs S, Baumer N, Becker A, Cauvet T, Kowski S, Beger C, Welte K, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C (2005) Cyclin A1, the alternative A-type cyclin, contributes to G1/S cell cycle progression in somatic cells. *Oncogene* 24: 2739 - 2744
- Ju Z, Kapoor M, Newton K, Cheon K, Ramaswamy A, Lotan R, Strong LC, Koo JS (2005) Global detection of molecular changes reveals concurrent alteration of several biological pathways in nonsmall cell lung cancer cells. *Mol Genet Genomics* 274 (2): 141 – 154
- Johnson JP (1999) Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18: 345 - 357
- Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC (1999) Optimal Temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to Single-Stranded Conformation Polymorphism and heteroduplex analysis. *Clinical Chemistry* 45 (8): 1133 - 1140
- Kadoya T, Yamamoto H, Suzuki T, Yukita A, Fukui A, Michiue T, Asahara T, Tanaka K, Asashima M, kikuchi A (2002) Desumoylation Activity of Axam, a novel Axin-binding protein, is involved in downregulation of β -catenin. *Molecular and Cellular Biology* 22 (11): 3803 - 3819
- Kanashiro CA, Schalley AV, Groot K, Armatis P, Bernardino LF, Varga JL (2003) Inhibition of mutant p53 expression and growth of DMS-153 small cell lung carcinoma by antagonists of growth hormone-releasing hormone and bombesin. *PNAS* 100 (26): 15836 – 15841

- Kanno S, Oda N, Abe M (2000) Roles of two VEGF receptors, Flt-1 und KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 19: 2138 -2146
- Kasprzak A, Przewozna M, surdyk-Zasada J, Zabel M (2003) The expression of selected neuroendocrine markers and of anti-neoplastic cytokines (IL-2 and IL-12) in lung cancer. *Folia Morphol* 62 (4): 497 - 499
- Katoh M, Katoh M (2004) Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 25 (5): 1495 - 1500
- Kaye FJ (2002) RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer. *Oncogene* 21: 6908 – 6914
- Kazantseva IA, Machmudova GK (1990) Complex assessment of tumor cell proliferation in various forms of lung cancer. *Acta Histochem Suppl* 39: 155 – 162
- Kerr KM, Lamb D (1984) Actual growth rate and tumor cell proliferation in human pulmonary neoplasms. *Br J Cancer* 50 (3): 343 - 349
- Kettunen E, Anttila S, Seppanen JK, Karjalainen A, Edgren H, Lindstrom I, Salovaara R, Nissen AM, Salo J, Mattson K, Hollmen J, Knuutila S, Wikman H (2004) Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamos cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 149: 98 – 106
- Khoor A, Whitsett JA, Stahlman MT, Halter SA (1997) Expression of surfactant protein B precursor and surfactant protein B mRNA in adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol* 10 (1): 62 - 67
- Kidd M, Modlin IM, Mane SM, Camp RL, Eick G, Latich I (2006) The role of genetic markers-NAP1L1, MAGE-D2, and ;TA1-in defining small-intestinal carcinoid neoplasia. *Annals of Surgical Oncology* 13 (2): 253 – 262
- Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, Tsunoda T, Okada K, Kakiuchi S, Zembutsu H, Furukawa Y, Kawamura M, Kobayashi K, Imai K, Nakamura Y (2003) Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene* 22 (14): 2192 - 2205
- Kim YH, Girard L, Giacomini CP, Wang P, Hernandez- Boussard T, Tibshirani R, Minna JD, Pollack JR (2006) Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene* 25: 130 – 138
- Kinsella AR, Lepts GC, Hill CL, Jones M (1994) Reduced e-cadherin expression correlates with increased invasiveness in colorectal carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 12: 335 - 342

- Kishimoto Y, Sugio K, Hung JY, Virmani AK, McIntire DD, Minna JD, Gazdar AF (1995) Allele- specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non- small- cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 8 (16): 1224 – 9
- Kitagawa Y, Wong F, Lo P, Elliott M, Verburgt LM, Hogg JC, Daya M (1996) Overexpression of Bcl- 2 and mutations in p53 and K- ras in resected human non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15 (1): 45 – 54
- Kiyohara C, Takayama K, Nakanishi Y (2006) Association of genetic polymorphisms in the base excision repair pathway with lung cancer risk: A meta- analysis. *Lung Cancer* [Epub ahead of print]
- Konishi H, Takahashi T, Kozaki KI, Yatabe Y, Mitsudomi T, Fujii Y, Sugiura T, Matsuda H, Takahashi T & Takahashi T (1998) Detailed deletion mapping suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 17p13.3, distal to p53, in the pathogenesis of lung cancers. *Oncogene* 17: 2095-2100
- Kops GJPL, Kim Y, Weaver BAA, Mao Y, McLeod I, Yates JR, Tagaya M, Cleveland DW (2005) ZW 10 links mitotic chekpoint signalling to the structural kinetochore. *JCB* 169 (1): 49 - 60
- Kordeli E, Lambert S, Bennett V (1995) Ankyrin_G. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of ranvier. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (5): 2352 - 2359
- Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T (2004) Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 64: 8919 – 8923
- Kouri RE, McKinney CE, Slomiany DJ, Snodgrass DR, Wray NP, McLemore TL (1982) Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res* 42: 5030 – 5037
- Kozma C, Slavotinek AM, Meck JM (2004) Segregation of at(1;3) translocation in multiple affected family members with both types of adjacent-1 segregants. *Am J Med Genet* 124A: 118 - 128
- Krystal GW, Armstrong BC, Battey JF (1990) N-myc mRNA forms an RNA-RNA Duplex with endogenous antisense transcripts. *Molecular and Cellular Biology* 10 (8): 4180 – 4191
- Krystal GW, Honsawek S, kiewlich D, Liang C, Vasile S, Sun L, McMahon G, Lipson KE (2001) Indolinone tyrosine kinase inhibitors block kit activation and growth of small cell lung cancer cells. *Cancer Research* 61: 3660 – 3668
- Kuersten S, Ohno M, Mattaj IW (2001) Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol* 11: 497 - 503

- Kuo WP, Jenssen TK, Butte AJ, Ohno-Machado L, Kohane IS (2002) Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* 18 (3): 405 - 412
- Kwiatkowski DJ, Bruns GAP (1988) Human Profilin: Molecular cloning, sequence comparison, and chromosomal analysis. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (12): 5910 - 5915
- Lampe AK, Bushby KMD (2006) Collagen VI related muscle disorders. *J Med Genet* 42: 673 - 685
- Latif F, Tory K, Modi WS, Graziano SL, Gamble G, Douglas J, Heppell-Parton, Rabbitts PH, Zbar B & Lerman MI (1992) Molecular characterization of a large homozygous deletion in the small cell lung cancer cell line U2020: a strategy for cloning the putative tumor suppressor gene. *Genes Chromosomes Cancer* 5: 119 -127
- Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, Kelm O, Hung RJ, Taniere P, Brennan P, Boffetta P, Zaridze DG, Hainaut P (2005) TP 53 and KRAS Mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: Distinct patterns in never, former and current smokers. *Cancer Res* 65 (12): 5076 – 5083
- Lee EA, Keutmann MK, Dowling ML, Harris E, Chan G, Kao GD (2004) Inactivation of the mitotic checkpoint as a determinant of the efficacy of microtubule-targeted drugs in killing human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3 (6): 661 – 669
- Lerner EC, Qian Y, Blaskowich MA, Fossum RD, Vogt A, Sun J, Cox AD, Der CJ, Hamilton AD, Sefti SM (1995) Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem* 270 (45): 26802 - 26806
- Leschinger M, Helsenberg K, Langer F, Schuette WHW (2005) Gemcitabin in der First- line-Therapie des lokal fortgeschrittenen und metastasierten nicht- kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC): Ergebnisübersicht randomisierter Phase-III-Studien. *Onkologie* 28 (suppl 1): 1 – 28
- Levitzi A (2003) Protein kinase inhibitors as a therapeutic modality. *Acc Chem Res* 36 (6): 462 – 469
- Liao C, Li SQ, Wang X, Muhrad S, Bjartell A, Wolgemuth DJ (2004) Elevated levels and distinct patterns of expression of A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in male germ tumors. *Int J Cancer* 108: 654 - 664
- Li D, Murny RJ (2000) Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occluding. *J Cell Biol* 148: 791 - 800
- Li H, Pamukcu R, Thompson WJ (2002) beta-Catenin signalling: therapeutic strategies in oncology. *Cancer Biol Ther* 1 (6): 621 - 625

- Li L, Ernstring BR, Wishart MJ, Lohse DL, Dixon JE (1997) A Family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *JBC* 272 (47): 29403 - 29406
- Li S, Rossel R, Urban A, Font A, Ariza A, Armengol P, Abad A, Navas JJ, Monzo M (1994) K- ras gene point mutation: a stable tumor marker in non- small- cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 11 (1-2): 19 – 27
- Li YJ, Wei ZM, Meng YX, Ji XR (2005) Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 11 (14): 2117 - 2123
- Lin CS, Park T, ChenZP, Leavitt J (1993) Human plastin genes: Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (4): 2781 – 2792
- Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R (2003) Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G2-M-Phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 9: 1145 – 1154
- Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, Lockhart DJ (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature genetics supplement* 21: 20 - 24
- Liu A, Stadelmann C, Moscarello M, Bruck W, Sobel A, Mastronardi FG, Casaccia-Bonnell P (2005) Expression of Stathmin, a developmentally controlled cytoskeleton-regulating molecule, in demyelinating disorders. *Journal of Neuroscience* 25 (3): 737 – 747
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108: 837 - 847
- Liu FS, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ESC, Hung MJ, Lu CH, Chiou LC (2003) KAI1 Metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer. *Clinical Cancer Research* 9: 1393 - 1398
- Liu J, Kern JA (2002) Neuregulin- 1 activates the JAK- STAT pathway and regulates lung epithelial cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 306 – 313
- Lockhart DJ, Winzeler EA (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405: 827 - 836
- Loprevite M, Favoni RE, De Cupis A, Scolaro T, Semino C, Ardrizzoni AM (2004) In vitro study of farnesyltransferase inhibitor SCH 66336, in combination with chemotherapy and radiation in non-small cancer cell lines. *Oncol Rep* 11 (2): 407 – 414
- Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA (2004) Activation of the Wnt signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3118 - 3123

- Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D (2004) Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119: 97 – 108
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell Biol.* 22: 1184 - 1193
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brian BS, Brannigan W, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG; Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non- small- cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129 – 39
- Lynch TJ, Adjei AA, Bunn PA, Eisen TG, Engelman J, Goss GD, Haber DA, Heymach JV, Jänne PA, Johnson BE, Johnson DH, Lilenbaum RC, Meyerson M, Sandler AB, Sequist LV, Settleman J, Wong KK, Hart CS (2006) Summary Statement: Novel agents in the treatment of lung cancer: advances in Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Agents. *Clin Cancer Res* 12 (14): 4365 – 4370
- Ma J, Gao M, Lu Y, Feng X, Zhang J, Lin D, Xiao T, Hu Z, Yuan J, Su K, Shipley J, Xue J, Gao Y (2006) Gain of 1q25-32, 12p23-24.3, and 17q12-22 facilitates tumorigenesis and progression of human squamous cell lung cancer. *J Pathol* 210: 205 - 213
- Malaney S, Daly RJ (2001) The ras signalling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6 (1): 101 - 113
- Malone JP, Alvares K, Veis A (2005) Structure and assembly of the heterotrimeric c- propeptides of type I collagen: significance of the $\alpha 2(I)$ chain. *Biochemistry* 44: 15269 - 15279
- Mamot C, Rochlitz FC (2005) Iressa, Tarceva und Erbitux – Medikamente einer neuen Generation. *Schweiz Med Forum* 5: 475 – 479
- Manegold C (2002) Die Medikamentöse Therapie des nicht- kleinzelligen Lungenkarzinoms. Manegold C (HRSG) *Therapieoptionen beim nicht- kleinzelligen Lungenkarzinom UNI- MED- Science, Bremen* 102 – 116
- Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D (1994) Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci* 91: 9871 - 9875
- Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG (2004) Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissue is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer. *Eur J Cancer* 40 (18): 2717 – 2725
- Marquett IB, Saxena A, White MD, DiMano JM, Srivastava D (2004) Thymosin $\beta 4$ activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 432: 466 - 472

- Matter B, Wang G, Jones R, Tretyakova N (2004) Formation of diastereomeric benzo[a]pyrene diol epoxide- guanine adductes in p53 gene- derived DNA sequences. *Chem Res Toxicol* 17: 731 – 741
- Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM (2005) Wnt signalling in lung cancer. *Cancer Lett* 222 (1): 1 - 10
- Mendelsohn J (2002) Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 20: 1S – 13S
- Menssen A, Hermeking H (2003) Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: Identification and analysis of c-MYC target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 6274 - 6279
- Mertens F, Johansson B & Mitelman F (1994) Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 221 – 230
- Mitra AP, Almal AA, George B, fry DW, Lenahan PF, Pagliarulo V, Cote RJ, Datar RH, Worzel WP (2006) The use of genetic programming in the analysis of quantitative gene expression profiles for identification of nodal status in bladder cancer. *BMC Cancer* 6: 159
- Miura K, Bowman ED, Simon R, Peng AC, Robles AI, Jones RT, Katagiri T, He P, Mizukami H, Charboneau L, Kikuchi T, Liotta LA, Nakamura Y, Harris CC (2002) Laser Capture Microdissection and microarray expression analysis of lung adenocarcinoma reveals tobacco smoking- and prognosis-related molecular profiles. *Cancer Res* 62: 3244 - 3250
- Miwa T, Manabe Y, Kurokawa K, Kamada S, Kanda N, Bruns G, Ueyama H, Kakunaga T (1991) Structure, chromosome location, and expression of the human smooth muscle (enteric type) γ - actin gene: evolution of six human actin genes. *Molecular and Cellular Biology* 11 (6): 3296 – 3306
- Miyata H, Doki Y, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Fujiwara Y, Yamamoto H, Nishioka K, Kishi K, Monden M (2000) CDC25B and p53 are independent implicated in radiation sensitivity for human esophageal cancers. *Clinical Cancer Research* 6: 4859 – 4865
- Modlin IM, Kidd M, Latich I, Zikusoka MN, Eick GN, Mane SM, Camp RL (2006) genetic differentiation of appendiceal tumor malignancy: a guide for the perplexed. *Ann Surg* 244 (1): 52 -60
- Moll R, Moll I (1998) Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch* 432: 487 – 504
- Morin JP (2005) Claudin proteins in human cancer: Promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* (21) 65: 9603 – 9606
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787 – 1790

- Moyer VD, Cistulli CA, Vaslet CA, Kane AB (1994) Oxygen radicals and asbestos carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 102: 131 - 136
- Muller T, Choidas A, Reichmann E, Ullrich A (1999) Phosphorylation and free pool of beta- catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J Biol Chem* 274: 10173 - 10183
- Nacht M, Dracheva T, Gao Y, Fujii T, Chen Y, Player A, Akmaev V, Cook B, Dufault M, Zhang M, Zhang W, Guo M, Curran J, Han S, Sidransky D, Buetow K, Madden SL (2001) Molecular characteristics of non-small cell lung cancer. *PNAS* 98 (26): 15203 – 15208
- Nakagawa H, Yagihashi S (1994) Exprsion of type IV collagen and its degrading enzymes in squamous cell carcinoma of lung. *Jpn J Cancer Res* 85 (9): 934 – 938
- Nakamaki T, Hamano Y, Hisatake J, Yokoyama A, Kawakami K, Tomoyasu S, Honma Y, Koeffler HP (2003) Elevated levels of cycA1 and A(A2) mRNA in acute myeloid leukaemia are associated with increased survival. *Br J Haematol* 123: 72 – 80
- Nakano KY, Iyama KI, Mori T, Yoshioka M, Hiraoka T, Sado Y, Ninomiya Y (2001) Loss of alveolar basement membrane type IV collagen $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains in bronchioalveolar carcinoma of the lung. *J Pathol* 194: 420 - 427
- Nalepa G, Rolfe M, Harper JW (2006) Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Reviews* 5: 596 – 613
- Neumann F, Teutsch N, Kliszewski S, Bork S, steidl U, Brors B, Schimkus N, Roes N, Germing U, Hildebrandt B, royer-Pokora B, Eils R, Gattermann N, Haas R, Kronenwett R (2005) Gene expression profiling of Philadelphia chromosome (Ph9-negative CD34+ hematopoietic stemm and progenitor cells of patients with Ph-positive CML in major molecular remission during therapy with imatinib. *Leukemia* 19: 458 – 460
- Nicolson G (1988) Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta* 948: 175 - 244
- Nigam AK, Savage FJ, Boulos PB, Stamp GWH, Liu D, Pignatelli M (1993) Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Brit J Cancer* 68: 507 - 514
- Nishida T, Kaneko F, Kitagawa M, Yasuda H (2001) Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific Isopeptidase, a homologue of rat Axam, which is an axin- binding protein promoting β - catenin degradation. *JBC* 276 (42): 39060 - 39066
- Obermann EC, went P, Zimpfer A, Tzankov A, Wild PJ, Stoehr R, Pileri SA, Dirnhofer S (2005) Expression of minichromosome maintenance protein 2 as amarker for proliferation and prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: a tissue microarray and clinico-pathological analysis. *BMC Cancer* 5 (162): 1 - 8

- Oefner PJ, Huber CG, Umlauft F, Berti GN, Stimpfl E, Bonn GK (1994) High-resolution liquid chromatography of fluorescent dye-labeled nucleic acids. *Anal Biochem* 223 (1): 39 – 46
- Oefner PJ, Underhill PA. (1995) Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 57: 266 - 272
- Ohno J, Horio Y, Sekido Y, Hasegawa Y, Takahashi M, Nishizawa J, Saito H, Ishikawa F, Shimokata K (2001) Telomerase activation and p53 mutations in urethane- induced A/J mouse lung tumor development. *Carcinogenesis* 22 (5): 751 – 756
- Okuducu AF, Janzen V, Hahne JC, Ko Y, Wernert N (2003) Influence of histochemical stains on quantitative gene expression analysis after laser-assisted microdissection. *Int J Mol Med* 11 (4): 449 - 453
- O'Neal Wise D, Krahe R, Oakley BR (2000) The γ - tubulin gene family in humans. *Genomics* 67: 164 – 170
- Oner F, Savas I, Numanoglu N (2004) Immunglobulins and complement components in patients with lung cancer. *Tuberk Toraks* 52 (1): 19 - 23
- Onganer PU, Seckl MJ, Djamgoz MBA (2005) Neuronal characteristics of small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 93: 1197 - 1201
- Onn A, Choe DH, Herbst RS, Correa AM, Munden RF, Truong MT, Vaporciyan AA, Isobe T, Gilcrease MZ, Marom EM (2005) Tumor cavitation in stage I non- small cell lung cancer: Epidermal growth factor receptor expression and prediction of poor outcome. *Radiology* 237: 342 - 347
- Orre LM, Fält S, Szeles A, Lewensohn R, Wennborg A, Flygare J (2006) Rad51- related changes in global gene expression. *BBRC* 341: 334 – 342
- Otsuki T, Yata K, Takata-Tomokuni A, Hyodoh F, Miura Y, Sakaguchi H, Hatayama T, Hatada S, Tsujioka T, Sato Y, Murakami H, Sadahira Y, Sugihara T (2004) Expression of protein gene product 9.5 (PGP9.5)/ubiquitin-C-terminal hydrolase 1 (UCHL-1) in human myeloma cells. *British Journal of Haematology* 127: 292 – 298
- Pabon C, Modrusan Z, Ruvolo MV, Coleman IM, Daniel S, Yue H, Arnold LJ (2001) Optimized T7 amplification system for microarray analysis. *Biotechniques* 31 (4): 874 - 879
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497 – 1500
- Pan W (2002) A comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicated microarray experiments. *Bioinformatics* 18 (4): 546 - 554

- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H (2004) EGF receptor mutations are common in lung cancers from 'never smokers' and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13306 - 13311
- Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H (2005) Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Medicine* 2 (3): 225 - 235
- Papathanassiou AE, MacDonald NJ, Bencsura A, Vu HA (2006) F1F0-ATP synthase functions as a co-chaperone of Hsp90-substrate protein complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (1): 419 - 429
- Parkin M, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55 (2): 74 – 108
- Patterson S, Robert C, Whittle C, Chakrabarti R, Doerig C, Chakrabarti D (2005) Pre-replication complex organization in the atypical DNA replication cycle of *Plasmodium falciparum*: Characterization of the mini-chromosome maintenance (MCM) complex formation. *J Molbiopara* 145: 50 – 59
- Patterson TA, Lobenhofer EK, Fulmer-Smentek SB, Collins PJ, Chu TM, Bao W, Fang H, Kawasaki ES, Hager J, Tikhonova IR, Walker SJ, zhang L, Hurban P, de Longueville F, Fuscoe JC, Tong W, Shi L, Wolfinger RD (2006) Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. *Nature Biotechnology* 24 (9): 1140 - 1150
- Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen H S (2002) The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol* 12: 745 - 760
- Perez-Plasencia C, Duenas-Gonzalez A (2006) Can the state of cancer chemotherapy resistance be reverted by epigenetic therapy? *BMC Molecular Cancer* 5:27 - 34
- Perez – Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, et al. (2004) Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non- small- cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22: 3238 – 47
- Perrone F, Di Maio M, Budillon A, Normanno N (2005) Targeted therapies and non-small cell lung cancer: methodological and conceptual challenge for clinical trials. *Curr Opin Oncol* 17: 123 - 129
- Petersen I, Hidalgo A, Petersen S, Schluns K, Schewe C, Pacyna-Gengelbach M, Goeze A, Krebber B, Knosel T, Kaufmann O, Szymas J, von Deimling A (2000) Chromosomal imbalances in brain metastases of solid tumors. *Brain Pathol.* 10 (3): 395 – 401

- Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried T & Dietel M (1997) Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br J Cancer* 75: 79 - 86
- Petersen S, Wolf G, Bockmühl U, Gellert K, Dietel M, Petersen I (1998) Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumour progression and metastatic phenotype. *Br J Cancer* 77:270 - 276
- Petty RD, Nicolson MC, Kerr KM, Collie-Duguid E, Murray GI (2004) Gene expression profiling in non-small cell lung cancer: from molecular mechanisms to clinical application. *Clin Cancer Res* 10: 3237 – 3248
- Piedra J, Martinez D, Castano J, Miravet S, Dunach M, Herreros AG (2001) Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276: 20436 - 20443
- Pilewski JM, Bumbalo TS, Davis AG, Siegfried JM (2000) Hepatocyte growth factor promotes tumor growth in a novel in vivo model of human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 556 – 562
- Pitha-Rowe I, Petty WJ, Feng Q, Koza-Taylor PH, DiMattia DA, Pinder L, Dragnev KH, Memoli N, Memoli V, Turi T, Beebe J, Kitareewan S, Dmitrovsky E (2004) Microarray analyses uncover UBE1L as a candidate target gene for lung cancer chemoprevention. *Cancer Res* 64: 8109 – 8115
- Poli R, Langdon WB (1998) Schema theory for genetic programming with one-point crossover and point mutation. *Evol Comput* 6 (3): 231 - 252
- Pollmann MA, Shao Q, Laird DW, Sandig M (2005) Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis. *Breast Cancer Research* 7: 522 – 534
- Pozo K, Stephenson FA (2006) GRIF-1-kinesin-1 interactions: a confocal microscopy study. *Biochemical Society Transactions* 34: Part 1
- Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131: 1619 – 1628
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K. (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341
- Puga A, Nebert DW, McKinnon RA, Menon A G (1997) Genetic polymorphisms in human drug-metabolizing enzymes: potential uses of reverse genetics to identify genes of toxicological relevance. *Crit Rev Toxicol* 27 (2): 199 - 222

- Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH (2005) Transendothelial migration of melanoma cells involves n-cadherin-mediated adhesion and activation of the β -catenin signalling pathway. *Molecular Biology of the Cell* 16: 4386 – 4397
- Rabbitts P, Bergh J, Douglas J, Collins F & Waters J (1990) A submicroscopic homozygous deletion at the D3S3 locus in a cell line isolated from a small cell lung carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2: 231-238
- Rachwal WJ, Bongiorno PF, Orringer MB, Whyte RI, Ethier SP, Beer DG (1995) Expression and activation of erbB-2 and epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinomas. *Br J Cancer* 72 (1): 56 – 64
- Radinsky R (1995) Modulation of tumor cell gene expression and phenotype by the organ-specific metastatic environment. *Cancer Metastasis Rev* 14 (4): 323 - 338
- Rahn JJ, Chow JW, Horne GJ, Mah BK, Emerman JT, Hoffman P, Hugh JC (2005) MUC1 mediates transendothelial migration in vitro by ligating endothelial cell ICAM-1. *Clinical & Experimental Metastasis* 22: 475 – 483
- Ratschiller D, heighway J, Gugger M, Kappeler A, Pirnia F, Schmid RA, Borner MM, Betticher DC (2003) CyclinD1 overexpression in bronchial epithelia of patients with lung cancer is associated with smoking and predicts survival. *J of Clin. Oncology* 21(11): 2085 - 2093
- Regnier V, Vagnarelli P, Fukagawa T, Zerjal T, Burns E, Trouche D, Earnshaw W, Brown W (2005) CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Molecular and Cellular Biology* 25 (10): 3967 - 3981
- Reinacher- Schick A, Gumbiner BM (2001) Apical membrane localization of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein and subcellular distribution of the beta-catenin destruction complex in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 152: 491 – 502
- Reuveni H, Klein S, Levitzki A (2003) The inhibition of Ras farnesylation leads to an increase in p27Kip1 and G1 cell cycle arrest. *Eur J Biochem* 270 (13): 2759 - 2772
- Richardson GE & Johnson BE (1993) The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 20: 105-127
- Rintoul RC, Sethi T (2002) Extracellular matrix regulation of drug resistance in small- cell lung cancer. *Clinical Science* 102: 417 – 424
- Rivera A, Mavila A, Bayless KJ, Davis GE, Maxwell SA (2006) Cyclin A2 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci* 63: 1425 - 1439
- Rodenhuis S & Slebos RJ (1992) Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 52: 2665s-2669s

- Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B (2002) The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (30): 27501 – 27509
- Rohr UP, Rehfeld N, Pflugfelder L, Geddert H, Müller W, Steidl U, Fenk R, Gräf T, Schott M, Thiele KP, Gabbert HE, Germing U, Kronenwett R, Haas R (2004) Expression of the tyrosine kinase c-kit is an independent prognostic factor in patients with small cell lung cancer. *Int. J Cancer* 111: 259 - 263
- Rohr UP, Rehfeld N, Geddert H, Pflugfelder L, Bruns I, Neukirch J, Rohrbeck A, Grote HJ, Steidl U, Fenk R, Opalka B, Gabbert HE, Kronenwett R, Haas R (2005) Prognostic relevance of fragile histidine triad protein expression in patients with small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 11: 180 – 185
- Rosell R, Cobo M, Isla D, Sanchez JM, Taron M, Altavilla G, Santarpia M, Moran T, Catot S, Etxaniz O (2005) Applications of genomics in NSCLC. *Lung Cancer* 50 (2): 33 - 40
- Rosell R, Li S, Skacel Z, Mate JL, Maestre J, Canela M, Tolosa E, Armengol P, Barnadas A & Ariza A (1993) Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene* 8: 2407 - 2412
- Röckman A, Baffoe-Bonnie AB, Gillanders E, Fredriksson H, Autio V, Ikonen T, Gibbs KD, Jones MP, Gildea D, Freas-Lutz D, Markey C, matikainen MP, Koivisto PA, Tammela TLJ, Kallioniemi OP, Trent J, Bailey-Wilson JE, Schleutker J (2005) Hereditary prostate cancer in Finland: fine-mapping validates 3p26 as a major predisposition locus. *Hum Genet* 116: 43 - 50
- Rubin MA, Varambally S, Beroukhir R, Tomlins SA, Rhodes DR, Paris PL, Hofer MD, Storz-Schweizer M, Kuefer R, Flechter JA, His BL, Byrne JA, Pienta KJ, Collins C, Sellers WR, Chinnaiyan AM (2004) Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. *Cancer Research* 64: 3814 - 3822
- Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E (1997) Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in respectable non- small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res* 3 (4): 515 – 22
- Salazar LA, Hirata MH, Hirata RD (2002) Increasing the sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis of the LDLR gene mutations in brazilian patients with familial hypercholesterolemia. *Clin Chem Lab Med* 40 (5): 441 - 445
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19:183 - 232
- Sandig M, Voura EB, Kalnins VI, Siu CH (1997) Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton* 38: 351 - 364

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463 - 5467
- Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR (2004) The biology of the epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clinical Cancer Research* 10: 4227- 4232
- Schiller JH, Harrington D, Belani CP (2002) Comparison of four chemotherapy regimes for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 346: 92 - 98
- Schmitt AM, Shi J, Wolf AM, Lu CC, King LA, Zou Y (2006) Wnt-RYK signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* 439: 31 - 37
- Schmitt TJ, Robinson ML, Doyle J. (2000) Single nucleotide polymorphism (SNP), insertion & deletion detection on the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System. *Transgenomic Inc. Application Note* 112.
- Schwarzer S. (2000) DHPLC spürt Mutationen auf. *LaborPraxis*. Okt 2000
- Schweisfurth H, Kurbjuhn H (2004) Diagnostik des Lungenkarzinoms. *Brandenburgisches Ärzteblatt* 10: 319 - 320
- Schymeinski J, Nedbal S, Miosge N, Pöschl E, Rao C, Beier DR, Skarnes WC, Timpl R, Bader BL (2002) Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Molecular and Cellular Biology* 22 (19): 6820 – 6830
- Sekido Y, Takahashi T, Ueda R, Takahashi M, Suzuki H, Nishida K & Tsukamoto T (1993) Recombinant human stem cell factor mediates chemotaxis of small cell lung cancer cell lines aberrantly expressing the c-kit protooncogene. *Cancer Res* 53: 1709-1714
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD (1998) Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys. Acta* 1378: F21 – F59
- Selvakumar P, Sharma RK (2006) Phosphorylation and dephosphorylation of human myristoyltransferase type 1. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 707 - 712
- Sengupta P, Xu Y, Wang L, Widom R, Smith BD (2005) Collagen $\alpha 1(I)$ gene (COL1A1) is repressed by RFX family. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (22): 21004 – 21014
- Shapiro GI (2004) Preclinical and clinical development of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Clin Cancer Res.* 10 (12Pt2): 4270 - 4275
- Sharp S, Workman P (2006) Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv Cancer Res.* 95: 323 - 348
- Shaw GL, Falk RT, Deslauriers J, Frame JN, Nesbitt JC, Pass HI, Issaq HJ, Hoover RN, Tucker MA (1995) Debrisoquine metabolism and lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4(1): 41 - 48

- Shaw GL, Falk RT, Frame JN, Weiffenbach B, Nesbitt JC, Pass HI, Caporaso NE, Moir DT, Tucker MA (1998) Genetic polymorphism of CYP2D6 and lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7 (3): 215 - 219
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstorm DW, Stone EM. (1993) The sensitivity of single-strand-conformation-polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-332
- Shen JL, Yan CH, Liu Y, Yan XQ, Zhang XL, Jin Y, Zhang KF, Sang ZF, Zhang GY, Li P, Fu SB (2003) Studies of TGF-beta/Smads expression in lung cancer. *Yi Chuan Xue Bao* 30(7): 681 – 686
- Shepherd FA, Ginsberg RJ, Feld R, Evans WK, Johansen E (1991) Surgical treatment for limited small-cell lung cancer. The University of Toronto Lung Oncology Group experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 101 (3): 385 - 393
- Shepherd FA, Pereira JP, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M et al. (2005) Erlotinib in previously treated non- small- cell lung cancer. *N Engl J Med* 353: 123 – 132
- Shi L., MAQC Consortium (2006) The Microarray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nature Biotechnology* 24 (9): 1151 - 1161
- Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, Nishiwaki T, Kato J, Shinoda N, Sato A, Kimura M, Koyama H, Toyama T, Ishiguro H, Kudo J, Terashita Y, Konishi S, Fujii Y (2002) Expression of PTTG (Pituitary Tumor Transforming Gene) in Esophageal Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 32 (7): 233 – 237
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Di Minna J, Gazdar AF (2005) Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancer. *J of the National Cancer Institute* 97 (5): 339 – 346
- Shippy R, Fulmer-Smentek S, Jensen RV, Jones WD, Wolber PK, Johnson CD, Pine PS, Boysen C, Guo X, Chudin E, Sun YA, Willey JC, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Setterquist RA, Wilson M, Lucas AB, Novoradovskaya N, Papallo A, Turpaz Y, Baker SC, Warrington JA, Shi L, Herman D (2006) Using RNA sample titrations to assess microarray platform performance and normalization techniques. *Nature Biotechnology* 24 (9): 1123 - 1131
- Shivapurkar N, Reddy Y, Chaudhary PM, Gazdar AF (2003) Apoptosis and lung cancer: A Review. *J Cell Biochem* 88: 885 - 898
- Shoichet SA, Kunde SA, Viertel P, Schell-Apacik C, von Voss H, Tommerup N, Ropers HH, Kalscheuer VM (2005) Haploinsufficiency of novel FOXG1B variants in a patient with severe mental retardation, brain malformations and microcephaly. *Hum Genet* 117: 536 - 544

- Siegfried JM, Weissfeld LA, Luketich JD, Weyant RJ, Gubish CT, Landreneau RJ (1998) The clinical significance of hepatocyte growth factor for small- cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 66 (6): 1915 - 8
- Sikkink SK, Liloglou T, Maloney P, gosney JR, Field JK (2003) In- depth analysis of molecular alterations within normal and tumor tissue from an entire bronchial tree. *Int J Oncol* 22 (3): 589 – 95
- Simon HU, Mills GB, Kozlowski M (1994) Molecular characterization of hNRP, a cDNA encoding a human nucleosome-assembly-protein-I-related gene product involved in the induction of cell proliferation. *Biochem J* 297 (3Pt): 389 – 397
- Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA (1998) Laser-Capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *TIG* 14 (7): 272 - 276
- Sithanandam G, Smith GT, Masuda A, Takahashi T, Anderson LM, Fornwald LW (2003) Cell cycle activation in lung adenocarcinoma cells b the ErbB3 / phosphatidylinositol 3- kinase / Akt pathway. *Carcinogenesis* 24 (10): 1581 – 1592
- Slebos RJC, Evers SG, Wagenaar SS & Rodenhuis S (1989) Cellular protooncogenes are infrequently amplified in untreated non-small cell lung cancer (NSCLC). *Br J Cancer* 59: 76-80
- Smith AL, Hung J, Walker L, Rogers TE, Vuitch F, Lee E, Gazdar AF (1996) Extensive areas of aneuploidy are present in the respiratory epithelium of lung cancer patients. *Br J Cancer* 73 (2): 203 – 209
- Smythe WR, Williams JP, Wheelock MJ, Johnson KR, Kaiser LR, Albelda SM (1999) Cadherin and catenin expression in normal human bronchial epithelium and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 24: 157 – 168
- Speina E, Zielinska M, Barbin A, Gackowski D, Kowalewski J, Graziewicz MA, Siedlecka JA, Olinski R, Tudek B (2003) Decreased repair activities of 1,N(6)-ethenoadenine and 3,N(4)-ethenocytosine in lung adenocarcinoma patients. *Cancer Res* 63: 4351 – 4357
- Speina E, Arczewska KD, Gackowski D, Zielinska M, Siomek A, Kowalewski J, Olinski R, Tudek B, Kusmirek JT (2005) Contribution of hMTH1 to the maintenance of 8-oxoguanine levels in lung DNA of non-small-cell lung cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 97: 384 - 395
- Steel MD, Puddicombe SM, Hamilton LM, Powell RM, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE, Collins JE (2005) β -catenin/T-cell factor-mediated transcription is modulated by cell density in human bronchial epithelial cells. *IJBCB* 37: 1281 – 1295
- Stein-Werblowsky R (1983) The haematogenous spread of tumor: A prevental process. *J Cancer Res Clin Oncol* 105: 158 – 161
- Stracke ML, Murata J, Aznavoorian S, Liotta LA (1994) The role of the extracellular matrix in tumor cell metastasis. *In Vivo* 8: 49 - 58

- Sträuli P, Haemmerli G (1980) Interaction of locomotive and lytic activities of tumor cells in invasion. In: Grundmann E. Metastatic tumor growth. *Cancer campaign*. Fischer, Stuttgart New York, Vol.4, pp 1 - 9
- Sudakin V, Chan GKT, Yen TJ (2001) Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *JCB* 154 (5): 925 – 936
- Sugita M, Geraci M, Gao B, Powell RL, Hirsch FR, Johnson G, Lapadat R, Gabrielson E, Bremnes R, Bunn PA, Franklin WA (2002) Combined use of oligonucleotide and tissue microarrays identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. *Cancer Res* 62: 3971 - 3979
- Sugio K, Uramoto H, Ono T, Hanagiri T, Sugaya M, Ichiki Y, So T, Nakata S, Morita M, Yasumoto K (2006) Mutations within the tyrosine kinase domain of EGFR gene specifically occur in lung adenocarcinoma patients with a low exposure of tobacco smoking. *British Journal of Cancer* 94: 896 – 903
- Sun M, Xiong M (2003) A mathematical programming approach for gene selection and tissue classification. *Bioinformatics* 19 (10): 1243 - 1251
- Suzuki M, Shigematsu H, Hiroshima K, Iizasa T, Nakatani Y, Minna JD, Gazdar AF, Fujisawa T (2005) Epidermal growth factor receptor expression status in lung cancer correlates with its mutation. *Hum Pathol* 36 (10): 1127 - 34
- Talbot SG, Estilo C, Maghami E, Sarkaria S, Pham DK, O-charoenrat P, Socci ND, Ngai I, Carlson D, Ghossein R, Viale A, Park BJ, Rusch VW, Singh B (2005) Gene expression profiling allows distinction between primary and metastatic squamous cell carcinomas in the lung. *Cancer Res* 65 (8): 3063 – 3071
- Tamura K, Zhang X, Murakami Y, Hirohashi S, Xu HJ, Hu SX, Benedict WF & Sekiya T (1997) Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human nonsmall- cell lung cancer. *Int J Cancer* 74: 45-49
- Tanaka H, Fujii Y, Hirabayashi H, Miyoshi S, Sakaguchi M, Yoon HE, Matsuda H (1998) Disruption of the RB pathway and cell- proliferative activity in non- small- cell lung cancers. *Int J Cancer* 79: 111 – 115
- Tanaka H, Iguchi N, Toyama Y, Kitamura K, Takahashi T, Kaseda K, Maekawa M, Nishimune Y (2004) Mice deficient in the axonemal protein tektin-t exhibit male infertility and immotile-cilium syndrome due to impaired inner arm dynein function. *Molecular and Cellular Biology* 24 (18): 7958 – 7964
- Tang W, Arnett DK, Devereux RB, Panagiototu D, Province MA, Miller MB, Simone G, Gu C, Ferrell RE (2005) Identification of a novel 5-base pair deletion in calcineurin b (PPP3R1) promoter region and its association with left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 150: 845 - 851

- Taverna D, Crowley D, Connolly M, Bronson RT, Hynes RO (2005) A direct test of potential roles for $\beta 3$ and $\beta 5$ integrins in growth and metastasis of murine mammary carcinomas. *Cancer Res.* 65 (22): 10324 – 10329
- Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Speri G, Ahnen D, Pamukcu R (2000) Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated β -catenin. *Cancer Research* 60: 3338 - 3342
- Tilstone C (2003) DNA microarrays: Vital statistics. *Nature* 424: 610 - 612
- Tissir F, Bar I, Jossin Y, Backer OD, Goffinet AM (2005) Protocadherin Celsr3 is crucial in axonal tract development. *Nature Neuroscience* 8 (4): 451 – 455
- To- Figueras J, Gene M, Gomez-Catalan J, Galan MC, Fuentes M, Ramon JM, Rodamilans M, Huguet E, Corbella J (1997) Glutathion S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis* 18 (8): 1529 – 1533
- Todd S, Franklin WA, Varella-Garcia M, Kennedy T, Hilliker Jr C, Hahner L, Anderson M, Wiest JS, Drabkin HA & Gemmill RM (1997) Homozygous deletions of human chromosome 3p in lung tumors. *Cancer Res* 57: 1344 - 1352
- Tomizawa Y, Iijima H, Sunaga N, Sato K, Takise A, Otani Y, Tanaka S, Suga T, Saito R, Ishizuka T, Dobashi K, Minna JD, Nakajima T, Mori M (2005) Clinicopathologic significance of the mutations of the EGFR gene in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11 (19): 6816 – 6822
- Tong W, Lucas AB, Shippy R, Fan X, Fang H, Hong H, Orr MS, Chu TM, Guo X, Collins PJ, Sun YA, Wang SJ, Bao W, Wolfinger RD, Shchegrove S, Guo L, Warrington JA, Shi L (2006) Evaluation of external RNA controls for the assessment of microarray performance. *Nature Biotechnology* 24 (9): 1132 - 1139
- Townsend DM, Tew KD (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22: 7369 – 7375
- Tsakonas A, Dounias G, Jantzen J, Axer H, bjerregaard B, von Keyserlingk DG (2004) Evolving rule-based systems in two medical domains using genetic programming. *Artif Intell Med* 32 (3): 195 - 216
- Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC et al. (2005) Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353: 133 – 44
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS* 98 (9): 5116 - 5121
- Ullmann R, Morbini P, Halbwedel I, Bongiovanni M, Gogg-Kammerer M, Papotti M, Gabor S, Renner H, Popper HH (2004) Protein expression profiles in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the lung generated using tissue microarrays. *Journal of Pathology* 203: 798 - 807

- Yamagishi N, Ishihara K, Hatayama T (2004) Hsp105 α suppresses Hsc70 chaperone activity by inhibiting Hsc70 ATPase activity *JBC* 279 (40): 41727 - 41733
- Yamamoto H, Ihara M, Matsuura Y, Kikuchi A (2003) Sumoylation is involved in β -catenin-dependent activation of Tcf-4. *The EMBO Journal* 22 (9): 2047 - 2059
- Yasuo T, Makoto D, Kunio M, Ryoichi T, Atsushi S, Kazuyuki N, Toshikazu N, Kazuhiko Y (2002) A two-way interaction between hepatocyte growth factor and interleukin-6 in tissue invasion of lung cancer cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 220 – 226
- Yin X, Zhang H, Burrows F, Zhang L, Shores CG (2005) Potent activity of a novel dimeric heat shock protein 90 inhibitor against head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11 (10): 3889 - 3896
- Vergnes L, Peterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K (2004) Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *PNAS* 101 (28): 10428 - 10433
- Viallet J, Sausville EA (1996) Involvement of signal transduction pathways in lung cancer Biology. *J Cell Biochem Suppl* 24: 228 – 36
- Vikhanskaya F, Siddique MM, Lee MK, Brogini M, Sabapathy K (2005) Evaluation of the combined effect of p53 codon 72 polymorphism and hotspot mutations in response to anticancer drugs. *Clin Cancer Res* 11 (12): 4348 – 4356
- Volm M, Drings P, Wodrich W, van Kaick G (1993) Expression of oncoproteins in primary human non-small cell lung cancer and incidence of metastases. *Clin Exp Metastasis* 11 (4): 325 - 329
- Volm M, Rittgen W, Drings P (1998) Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 77 (7): 663 - 669
- Voura EB, Ramjeesingh RA, Montgomery AMP, Siu CH (2001) Involvement of integrin $\alpha_v\beta_3$ and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Molecular Biology of the Cell* 12: 2699 - 2710
- Waldmann T, Scholten I, Kappes F, Hu HG, Knippers R (2004) The DEK protein- an abundant and ubiquitous constituent of mammalian chromatin. *Gene* 343 (1): 1 – 9
- Wang W, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Cairns BR, Crabtree GR (1996) Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev.* 10: 2117 - 2130
- Wang X, Ferreira AM, Shao Q, Laird DW, Sandig M (2005) β_3 Integrins facilitate matrix interactions during transendothelial migration of PC3 prostate tumor cells. *The Prostate* 63: 65 – 80
- Werdich XQ and JS Penn (2005) Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events. *Angiogenesis* 8: 315 - 326

- Wernert N (2004) Lasermikrodissektion in der molekularen Onkologie des Prostatakarzinoms. *Der Urologe [A]*, Springer Verlag 43: 646 - 652
- WHO Library Cataloguing-in-Publication Data (1. Lung neoplasms – epidemiology 2. Smoking 3. Health services accessibility 4. Gender identity 5. Sex factors 6. Research I. World Health Organization) (2004)
WHO ISBN 92 4 159252 4 NLM classification: W 84.3
- Whitsett JA (2004) Functional genomics of lung disease.
Am J Respir Cell Mol Biol 31: 1 - 81
- Wiethöge T, Junker K, Johnen G, Krismann M, Müller KM (2000) Pathologie und Molekularbiologie bösartiger pulmonaler Tumoren. *Pathologie* 21: 404 – 423
- Woeneckhaus M, Klein-Hitpass L, Grepmeier U, Merk J, Pfeifer M, Wild PJ, Bettstetter M, Wuensch P, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstaedter F, Dietmaier W (2006) Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J Pathol* (in press)
- Wuyts W, Radersma R, Storm K, Vits L (2005) An optimized DHPLC protocol for molecular testing of the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple osteochondromas. *Clin Genet* 68: 542 – 547
- Xi L, Coello MC, Little VR, Raja S, Gooding WE, Yousem SA, El-Hefnawy T, Landrenau RJ, Luketich JD, Godfrey TE (2006) A combination of molecular markers accurately detects lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 12 (8): 2484 – 2491
- Xiao W, Oefner PJ. (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography: A Review. *Hum Mutat* 17: 439 - 474
- Xiao W, Stern D, Jain M, Huber CG, Oefner PJ. (2001) Multiplex capillary denaturing high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Biotechniques* 30: 1332 – 1338
- Xu HT, Wang L, Lin D, Liu Y, Liu N, Yuan XM, Wang EH (2006) Abnormal beta-catenin and reduced axin expression are associated with poor differentiation and progression in non-small cell lung cancer. *Am J Clin Pathol* 125 (4): 534 – 541
- Yanagisawa HA, Kamiya R (2004) A tektin homologue is decreased in Chlamydomonas mutants lacking an axonemal inner-arm dynein. *Mol Biol Cell* 15: 2105 - 2115
- Yang R, Nakamaki T, Lubbert M, Said J, Sakashita A, Freyaldenhoven BS, Spira S, Huynh V, Muller C, Koeffler HP (1999) CycA1 expression in leukaemia and normal hematopoietic cells. *Blood* 93: 2067 - 2074
- Zamecnik J, Kodet R (2002) Value of thyroid transcription factor-1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: a study of 109 cases. *Virchows Arch* 440 (4): 353- 361

- Zapala MA, Lockhart DJ, Pankratz DG, Garcia AJ, Barlow C, Lockhart DJ (2002) Software and methods for oligonucleotide and cDNA array. *Genombiology* 3 (6): software 0001.1-0001.9
- Zheng P, Vassena R, Latham K (2006) Expression and downregulation of Wnt signalling pathway genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Mol. Reproduction and Development* 73: 667 - 677
- Zhu C-Q, Cutz JC, Liu N, Lau D, Shepherd FA, Squire JA, Tsao MS (2006) Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 94: 1452 - 1459

8. Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 15. Oktober 2006

(Astrid Rohrbeck)