

Aus dem Institut für Pathologie  
Funktionsbereich Cytopathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

**Aberrante Methylierung des *APC*-Promotors  
als Tumormarker für die molekularzytologische Diagnostik  
des Lungenkarzinoms an Bronchialaspiraten**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

Ariana Mostakiem

2016

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

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

Referent: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz

## Erklärung

von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H. J. Grote, Medizinische Fakultät der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf:

### Erklärung

In der vorliegenden Dissertation werden Befunde vorgestellt, die bereits in publizierter Form vorliegen.

International Journal of Cancer 2004; 110: 751-755

**Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli promoter 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer.**

Hans J. Grote<sup>1,\*</sup>, Viola Schmiemann<sup>1</sup>, Sibylle Kiehl<sup>2</sup>, Alfred Böcking<sup>1</sup>, Rainer Kappes<sup>3</sup>, Helmut E. Gabbert<sup>2</sup> and Mario Sarbia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytopathology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany

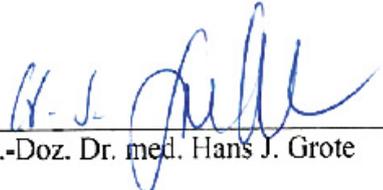
<sup>2</sup>Institute of Pathology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany

<sup>3</sup>Department of Pulmonology, Florence Nightingale Hospital, Düsseldorf, Germany

\*Corresponding author

Im Namen aller Autoren bedauert Herr Priv.-Doz. Dr. med. Hans J. Grote ausdrücklich, dass Frau Ariana Mostakiem nicht in die Autorenliste aufgenommen worden ist und ihre substantiellen Beiträge zur Publikation daher erst in der vorliegenden Dissertation gewürdigt werden können.

Darmstadt, den 10.03.2015

  
Priv.-Doz. Dr. med. Hans J. Grote

-----**Meinen Eltern gewidmet**-----

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie	1
1.2	Ätiologie	2
1.3	Histologische Typen	4
1.4	Diagnostik	6
1.4.1	Bildgebende Verfahren	6
1.4.2	Thoraxsonographie	6
1.4.3	Computertomographie	6
1.4.4	Spiral- CT	7
1.4.5	Bronchoskopie	7
1.4.6	Sputumzytologie	8
1.5	Diagnostische Ablauf	8
1.6	Biomarker	11
1.6.1	Epigenetik in der Cancerogenese	12
1.6.2	Promotor-Hypermethylierungen von Tumorsuppressorgenen als Biomarker des Lungenkarzinoms	13
1.6.3	Das APC-Gen	15
1.7	Zielsetzung	16
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Klinische Proben	18
2.2	Bronchialaspirate	20
2.2.1	Vorbehandlung und Aufbereitung der Bronchialaspirate für die zytologische Diagnostik	20
2.2.2	Quantifizierung der Tumorzellen	20
2.3	Humane Zelllinien und ihre Kultivierung	21
2.4	Chemikalien	22
2.5	Färbungen, Lösungen und Puffer	22
2.5.1	Sacomanno Fixativ	22
2.5.2	Papanicolaou-Färbung	23
2.5.3	Lösung für die Bisulfitkonversion	24
2.5.4	Lösungen für Elektrophorese	24
2.6	Molekularbiologische Kits	24
2.7	Enzyme	24
2.8	Geräte und Apparaturen	25
2.9	Oligonukleotide	25
2.10	Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.11	Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung	26
2.12	Methylierung der DNA mit SssI Methylase	27
2.13	DNA-Bisulfitkonversion	27
2.14	Ethanol-fällung der DNA	29
2.15	Quantitative Methylierungs-spezifische PCR (QMSP)	30
2.16	DNA-Agarosegelelektrophorese	32
2.17	Statistische Auswertung	32

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Nachweisgrenze und APC/MYOD1- <i>Cutoff</i> vor Beginn der Untersuchungen am Patientenkollektiv	33
3.2.	APC -Promotor-Hypermethylierung in Bronchialaspiraten	34
3.2.1	Prozentuale Häufigkeit der Methylierung in einzelnen Tumorentitäten sowie nicht-Tumor Proben (Schwellenwert des APC/ MYOD1 Verhältnisses x100 von $\geq 5$ )	34
3.2.2	Prozentuale Häufigkeit der Methylierung bei verschiedenen zytologischen Diagnosekategorien (Schwellenwert APC/ MYOD1 x 100 $\geq 5$ )	36
3.2.3	Methylierungsgrad	37
3.3	Etablierung eines besser geeigneten APC/ MYOD1 Schwellenwertes zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen Lungenerkrankungen	38
3.3.1	Sensitivität und Spezifität der aberranten APC -Methylierung als Biomarker (APC/ MYOD1 x 100 $\geq 35$ )	38
3.3.2	APC-Promotor 1A-Hypermethylierung (APC/ MYOD1 x100 $\geq 35$ ) bei verschiedenen zytologischen Diagnosegruppen	40
3.4	Die Anwendung der APC-Methylierungsuntersuchung bei zytologisch falsch negativen und nicht eindeutigen Fällen	41
3.5	Klinikopathologische Korrelation	42
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1	Aberrante Promotor-Methylierung als molekularbiologischer Tumormarker für die Lungenkarzinom-Diagnostik	43
4.1.1	DNA-Hypermethylierung als ein Teil des Zusammenspiels genetischer und epigenetischer Veränderungen bei der Cancerogenese	43
4.1.2	Promotor-Methylierung in Untersuchungsmaterial der pulmonalen Exfoliativzytologie	45
4.1.3	Aberrante Hypermethylierung des APC-Promotors	47
4.1.4	Anwendung der APC-Hypermethylierung als molekularer Biomarker für Lungenkarzinome	49
4.1.5	Klinisch-pathologische Korrelation	51
4.2	Ausblick	53
4.2.1	Früherkennungsmaßnahmen des Lungenkarzinoms	53
4.2.2	Nähere Zukunft der Hypermethylierungsdiagnostik bei Lungenkarzinom	54
4.2.3	Kombinierte Lungenkarzinomdiagnostik mit verschiedenen adjuvanten Verfahren	56
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>59</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

**Danksagung**

**Lebenslauf**

**Eidesstattliche Erklärung**

# 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit molekularpathologischen Untersuchungen an einer auch epidemiologisch wichtigen Tumorentität, nämlich an Lungenkarzinomen. Im Folgenden sollen zunächst einige Charakteristika dieser Tumoren dargestellt werden.

## 1.1 Epidemiologie

Das Lungenkarzinom ist weltweit der häufigste zu Tode führende Tumor des Mannes. In den USA steht das Lungenkarzinom an erster Stelle unter den häufigsten Krebstodesursachen bei Männern und Frauen. Bereits 1987 hat in den USA durch den zunehmenden Nikotinkonsum bei Frauen das Lungenkarzinom das Mammakarzinom in der Krebsmortalität überholt und macht derzeit 25% der gesamten Krebsmortalität bei Frauen aus.

Während die Inzidenz des Lungenkarzinoms bei Männern inzwischen wieder abnimmt, steigt sie bei den Frauen weiterhin an (Jemal *et al.* 2004). Für das Jahr 2005 lag die Mortalität für bösartige Neubildungen der Bronchien und der Lunge (ICD-10 C34) bei insgesamt 40641, 28959 Männer und 11682 Frauen (Statistisches Bundesamt 2009). Die Lungenkarzinom-Mortalität bei Frauen stieg hier seit 1998 um 11,8%. Die höchste Mortalität weist bei beiden Geschlechtern die Altersgruppe der 80- bis 85-Jährigen auf mit 439/100.000 Einwohner bei den Männern und 100/100.000 Einwohner bei den Frauen (Statistisches Bundesamt 2003). Insgesamt wurde die Zahl der Todesfälle in den USA für das Jahr 2008 auf ca. 160.000 und in Europa auf ca. 340.000 geschätzt (American Cancer Society 2008, Ferlay *et al.* 2010).

In Europa und Nordamerika liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für alle Patienten in einem Bereich von 5,5%-15,7 % (Alberg *et al.* 2007, National Institute for Clinical Excellence 2005). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Lungenkrebs beträgt in Deutschland etwa 15% bei Männern und 18% für Frauen. Sie variiert in Abhängigkeit vom Stadium der Tumorerkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose (GEKID 2006), welches bei 77% der Fälle mit Nachweis von Lymphknoten- oder Fernmetastasen bereits fortgeschritten ist (Horner *et al.* 2009).

## 1.2 Ätiologie

Das inhalative Zigarettenrauchen ist mit ca. 85% Hauptursache des Lungenkarzinoms, wobei der Anteil von Krebstodesfällen durch berufsbedingte Karzinogene gering ist. Im Zigarettenrauch sind mehr als 50 Karzinogene nachweisbar, insbesondere polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) und Nitrosamine, daneben andere Tumorpromotoren und Ko-Karzinogene (Hecht 1999). Der Anteil der Raucher in der deutschen Bevölkerung über 18 Jahre betrug 2004 ca. 34 Prozent, wobei zwei Drittel der Raucher täglich dem Nikotinkonsum nachkommen. Der Anteil der Männer (36,5%) unter den Rauchern in der Erwachsenenbevölkerung ist zwar wesentlich höher als die der Frauen (27%). In einem längeren Zeitraum betrachtet, gleichen sich die Raucherquoten aber an, da bei den Jugendlichen und jungen Erwachsenen ein großer Zuwachs der weiblichen Raucher festzustellen ist. Im internationalen Vergleich stehen deutsche Kinder und Jugendliche weiterhin auf den vorderen Plätzen, allerdings ist mittlerweile ein Abwärtstrend zu erkennen. Im Jahr 2007 rauchten 18% der männlichen und 17% der weiblichen Jugendlichen im Alter zwischen 12 und 17 Jahren. Das Durchschnittsalter, in dem Mädchen und Jungen mit dem Rauchen beginnen, lag im Jahr 2005 zwischen dem 13. und 14. Lebensjahr (Deutsches Krebsforschungszentrum 2007).

Zwischen der Zahl der täglich konsumierten Zigaretten, der Dauer des Zigarettenkonsums und dem Lungenkrebsrisiko besteht eine dosisabhängige Wechselwirkung. Das Lungenkrebsrisiko erhöht sich bei einem lebenslangen Raucher im Vergleich zum Nichtraucher etwa 20-30fach (European Network 2002). Rauchen erhöht das Lungenkrebsrisiko für alle histologischen Typen des Lungenkarzinoms, wobei das relative Risiko für die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen und kleinzelligen Karzinomen größer ist als für Adenokarzinome (s.u.). Letztere treten häufiger bei Frauen auf (Simonato *et al.* 2001). Zwar reduziert eine Nikotinkarenz von zwei bis neun Jahren bei Männern und Frauen das relative Risiko, an ein Lungenkarzinom zu erkranken, signifikant, erreicht jedoch auch nach einer Karenz von über 30 Jahren nicht das Niveau des Nichtrauchers (Simonato *et al.* 2001).

Der Internationalen Agentur für Krebsforschung (engl. IARC) liegt eine Zusammenfassung von mehr als 50 epidemiologischen Studien zu Lungenkrebs und Passivrauchen vor (Statistisches Bundesamt 2009). Der Meta-Analyse nach besteht für eine Frau, die jemals einer Passivexposition durch den Partner ausgesetzt war, ein etwa um 24% höheres Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, im Vergleich zur einer Frau, die dieser Exposition niemals ausgesetzt war. Bei Männern liegt dieses

Risiko bei ca. 37 Prozent. Studien, die die Dauer des Zusammenlebens oder die Anzahl der durch den Partner gerauchten Zigaretten untersuchten, zeigten ebenfalls ein erhöhtes Risiko in der höchsten Expositionskategorie (Statistisches Bundesamt 2009, Brennan *et al.* 2004). Man konnte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Passivrauchen in der Kindheit durch die Eltern und Lungenkrebs zeigen, wobei die Evidenz für diesen Zusammenhang weniger übereinstimmend ist als im Erwachsenenalter (Statistisches Bundesamt 2009, Vineis *et al.* 2004). Ähnliche Ergebnisse zeigen die neuen Meta-Analysen zum Passivrauchen am Arbeitsplatz. Das Risiko, ein Lungenkarzinom zu entwickeln, erhöhte sich bei Frauen, die berufsbedingt Passivrauch ausgesetzt sind, um ca. 19% und bei Männern nicht signifikant um 12% (Statistisches Bundesamt 2009).

Eine neue Analyse zur Wechselbeziehung zwischen Lungenkrebs und Passivrauchen am Arbeitsplatz zeigt, dass sich das Lungenkrebsrisiko bei Personen, die sich viele Jahre in stark verrauchten Arbeitsräumen aufhielten, verdoppelt (Stayner *et al.* 2007). Man muss davon ausgehen, dass sich das Risiko eines Lungenkarzinom bei einer langjährigen, regelmäßig die gesamte Arbeitsschicht andauernden Exposition wie bei Arbeiten in Gaststätten, Kneipen und Diskotheken verdoppelt.

Rauchbedingte Erkrankungen verursachten 2003 volkswirtschaftlichen Kosten von ca. 21 Milliarden Euro in Deutschland. Ungefähr ein Drittel der Gesamtkosten, insgesamt ca. 7,5 Milliarden Euro, entfiel auf die direkte medizinische Versorgung, 4,7 Milliarden Euro wurden für indirekte Krankheitskosten veranschlagt, und weitere 8,8 Milliarden Euro für den den Arbeitsausfall (Neubauer *et al.* 2006). Durch den vorzeitigen Tod von Rauchern, gehen jährlich 1,6 Millionen Lebensjahre verloren, dabei entfällt die Hälfte auf das erwerbsfähige Alter. Fast ein Drittel des Arbeitsausfalls entsteht durch frühzeitigen Tod, die restlichen zwei Drittel sind durch Arbeitsunfähigkeit und Frühverrentung verursacht (Neubauer *et al.* 2006).

Weiter gilt ein Kausalzusammenhang für Tumoren des Atemtraktes durch berufliche Exposition gegenüber folgenden Stoffen als gesichert: Asbest, Arsen, Chrom-6-Verbindungen, Dichlor-diäthylsulfid, Haloether, ionisierende Strahlen, Kokerei-Rohgase, Nickel, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Quarzstaub. Stoffe und Stoffgruppen, die als sicher bzw. wahrscheinlich humankanzerogen eingestuft sind, werden nach deutscher Einstufung (Kanzerogenitätsklassen 1 und 2 der DFG-Senatskommission) beziehungsweise gemäß IARC-Einstufung (Klasse 1 und 2A) gelistet (Kotschy-Lang, 2001).

Das Wachstum der anerkannten berufsbedingten Krebserkrankungen ist vor allem auf Spätfolgen einer Exposition gegenüber Asbest in den 50er bis 70er Jahren und auf die Einbeziehung der Lungenkreberkrankungen durch Radon der ehemaligen Uranerzbergleute der Wismut AG infolge der Wiedervereinigung Deutschlands zurückzuführen. Für die meisten der genannten beruflich bedingter Karzinogene gilt hingegen, dass das Karzinomrisiko in den letzten Jahren durch Arbeitsschutzmaßnahmen deutlich reduziert wurde und daher zahlenmäßig eine untergeordnete Rolle spielt (Popp *et al.* 2003). Rauchgewohnheiten stellen in Zusammenhang mit beruflichen Kanzerogenen nicht nur konkurrierende Risikofaktoren dar, sondern führen bei Einwirkung von Radon (Bergleute der ehemaligen Wismut AG), Asbest und Arsen zu einer überadditiven Gefährdung (Popp *et al.* 2003). Bis vor wenigen Jahren dürfte Tabakrauch nach Allergenbelastungen quantitativ die bedeutsamste Noxe der Innenraumluft am Arbeitsplatz dargestellt haben. Der Arbeitsplatz war gleichzeitig nicht selten auch ein Ort höchster Exposition, da sich hier mehr Raucher pro Raum aufhalten konnten und die Aufenthaltsdauer meist länger war als an anderen Orten (Raab und Stegbauer 2004; Radon und Nowak 2004).

### **1.3 Histologische Typen**

Histologisch lässt sich das Lungenkarzinom in zwei Gruppen eingeteilt. Man unterscheidet das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) von der Gruppe der nicht-kleinzelligen Karzinome (NSCLC). Je nachdem, welcher Tumortyp vorliegt, erfolgt die onkologische Therapie im Kontext auch vom Tumorstadium und eventueller vorbestehender Lungenerkrankungen.

Das *kleinzellige Lungenkarzinom* (engl.: SCLC = small cell lung cancer) macht aktuell etwa 20% aller bösartigen Lungentumoren aus. Es entsteht aus den neuroendokrinen APUD Zellen. In der Lunge ist es meist zentral lokalisiert. Die Metastasierung erfolgt sehr früh auf lymphogenen oder hämatogenen Bahnen ins Gehirn, Knochen, Leber und Nebennierenrinde (Tumorzentrum München, 2000).

*Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome* (engl.: NSCLC = non small cell lung cancer) machen mit etwa 80% den größten Teil der Lungenkarzinome aus. Hierunter werden alle Lungenkarzinome zusammengefasst, die keine kleinzelligen Anteile aufweisen und nicht typischen Karzinoidtumoren entsprechen (Beaulieu und Marik 2009):

- Das *Plattenepithelkarzinom* (engl.: squamous cell carcinoma, SCC) entwickelt sich aus Progenitorzellen des Bronchialepithels. Entstehungsort ist in 90% der Fälle zentral an den großen Lappen-, Segment- oder Subsegmentbronchien, nur in etwa 10% der Fälle ist es peripher lokalisiert. Es stellt mit 40-45% das häufigste nichtkleinzellige Bronchialkarzinom dar.
- Das *Adenokarzinom* geht ebenfalls aus Progenitorzellen des bronchioalveolären Epithels hervor. Es besteht ein weniger enger Zusammenhang zum Rauchen, als dies beim Plattenepithelkarzinom der Fall ist. Es ist meist peripher in der Lunge lokalisiert. Charakteristisch ist eine frühe Metastasierung in Gehirn, Leber und Nebennierenrinde. Eine Sonderform stellt das seltene bronchioloalveoläre oder lepidische Karzinom dar. Es wächst langsam und innerhalb von anatomischen Strukturen und ähnelt daher röntgenologisch gelegentlich einer Pneumonie.
- In die Gruppe der *großzelligen Karzinome* fallen alle Lungenkarzinome, in denen histologisch definitiv keine kleinzellige oder plattenepitheliale Strukturmerkmale nachweisbar sind. Die Diagnose erfolgt daher durch Ausschlussverfahren.  
Dank Immunhistochemie ist heute oft trotz fehlender konventionell morphologischer Differenzierungsmerkmale eine Zuordnung zu den morphologischen Haupttypen möglich.

Eine weitere histomorphologische und immunhistochemische Subtypisierung über die Kategorien SCLC bzw. NSCLC hinaus ist in den letzten Jahren auch an kleinen Biopsien wichtiger geworden, da insbesondere für das Adenokarzinom neue Therapiemodalitäten zugelassen sind. Diese basieren unter anderem auf Mutationsanalysen des Epidermal growth factor receptor (EGFR)-Gens (Goeckenjan *et al.* 2010). Findet sich in der Lunge ein Karzinom, so ist differentialdiagnostisch stets auch an eine Metastase eines anderweitig entstandenen Primärtumors zu denken, da die Lunge eine häufige Metastasierungsregion repräsentiert. Ohne näher auf dieses Problemfeld eingehen zu wollen, helfen auch hier oft morphologische Sondermethoden wie der Einsatz immunhistochemischer Marker weiter (z. B. durch Verwendung von cdx-2, TTF-1, PSA, ER und PR bzw. den differentiellen Zytokeratinen), die in unserer Einrichtung regelhaft bei solchen differentialdiagnostischen Fragen angewandt werden.

## **1.4 Diagnostik**

### **1.4.1 Bildgebende Verfahren**

Die Röntgen-Thoraxaufnahme in 2 Ebenen stellt nach wie vor die Grundlage der bildgebenden Diagnostik dar. Sie wird bei einem Verdacht durchgeführt. Meist erkennt man das Lungenkarzinom als Rundherd, anderweitig begrenzte Raumforderung, Atelektase oder Mediastinalverbreiterung, die von einem Pleuraerguss begleitet sein kann. Liefert die Thoraxaufnahme positive oder auch negative Aufnahmen mit Abweichung zur Klinik, ist es obligatorisch, eine weiterführende Diagnostik durchzuführen (Goeckenjan *et al.* 2010)

### **1.4.2. Thoraxsonographie**

Die Thoraxsonographie dient in erster Linie der Abklärung thoraxwandnaher Prozesse bzw. der Lokalisation und Quantifizierung von Ergüssen. Sie besitzt bei der Abklärung einer lokalen Thoraxwandinfiltration einen hohen prädiktiven Wert (Wahidi *et al.* 2005, Evans *et al.* 2005). Sie ist der Röntgenübersicht im Erkennen eines Pleuraergusses überlegen (Mayo und Doelken 2006; Beaulieu und Marik 2009). Limitationen ergeben sich durch Schallauslöschung an knöchernen und lufthaltigen Strukturen sowie durch die begrenzte Eindringtiefe und Auflösung.

### **1.4.3 Computertomographie**

Die Computertomographie soll hauptsächlich als Untersuchung von Thorax und Abdomen erfolgen, die mit Kontrastmittel verstärkt wird. Dabei erfolgt die Kontrastmittellabgabe über die Portalvenen der Leber. Das Lungenkarzinom kann mittels CT auf verschiedene Weise diagnostiziert werden. Das Auftreten von Infiltration oder Metastasierung ermöglichen die Diagnose eines malignen Prozesses. Weiterhin lassen sich aus strukturellen Merkmalen, Kontrastmittelaufnahme oder Entwicklungsprozessen in Verlaufsuntersuchungen eindeutige Anhaltspunkte für einen malignen Tumor ziehen. Durch die CT erhält man detaillierte Informationen über die Lokalisation von Läsionen, aus diesen Grund soll sie immer vor invasiven Maßnahmen, speziell vor einer Bronchoskopie oder Mediastinoskopie, ablaufen, um diese

effektiver durchführen zu können. Eine Vielzahl von Studien charakterisieren die Kontrastmittelaufnahme als einen wichtigen Parameter zur Feststellung der Dignität eines solitären Rundherdes (Swensen *et al.* 2000, Goeckenjan *et al.* 2010)

#### **1.4.4 Spiral-CT**

Die Spiral-CT ist ein Schnittbildverfahren, bei dem der Körper des Patienten in seiner Achse sowohl in Zeit als auch in Raum erfasst wird. Dies ermöglicht eine rasche und konstante Erfassung weiterer Untersuchungsabschnitte. In den vergangenen Jahren werden Mehrschicht-Spiral-CT-Geräte in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt, welche innerhalb wenigen Sekunden sowohl Teilkörper- als auch Ganzkörper-Untersuchungen ermöglichen. Die Weiterentwicklung sind sogenannte Volumen-CTs (ab 128-Zeilen-CTs), die binnen kürzester Zeit weite Bereiche des Körpers bzw. den gesamten Körper bei geringster Strahlenbelastung abdecken (Kalender *et al.* 2000).

#### **1.4.5 Bronchoskopie**

Die Bronchoskopie gehört zu den Standardverfahren, die bei Verdacht auf Lungentumoren verwendet werden (Honeybourne *et al.* 2001). Hier wird ein biegsames Rohr in Sedierung über die Nase in die Luftröhre bis in die Bronchien vorgeschoben. Ein optisches System aus Glasfasern erlaubt die Betrachtung der Schleimhäute. Mit diesem Gerät ist ebenso die Entnahme von Gewebs- oder Zellproben (Biopsien) möglich, die dann histologisch und zytologisch, ggfls. auch unter Einsatz von Sondermethoden wie der Immunhistochemie, beurteilt werden können (Tolosa *et al.* 2003). Im gleichen Untersuchungsgang kann zusätzlich noch Sekret aus tiefer gelegenen Bronchialabschnitten abgesaugt werden und ähnlich dem abgehustetem Sputum zytologisch auf Krebszellen untersucht werden. Ferner können auffällige Oberflächen mithilfe einer Bürstenzytologie untersucht werden. Auf diese Weise kann dann eine definitive Aussage über das Vorliegen eines Tumors getroffen werden. Die Exfoliativzytologie der Lunge stellt somit ein nicht- bzw. minimal-invasives Verfahren zur Diagnostik der Bronchialkarzinome dar. Allerdings ist ihre Sensitivität besonders bei Tumoren der Lungenmantelregion nicht höher als ca. 70%, so dass sich die Frage nach dem Einsatz adjuvanter Methoden stellt. Neben der konventionellen Zytologie stehen hierfür an diagnostischen Schwerpunkten auch ergänzende Verfahren der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) mit dem LaVysion-Kit, einem vierfach-FISH-Ansatz (Savic *et al.*

2006, Voss *et al.* 2010, Halling *et al.* 2006, Schramm *et al.* 2011), bzw. die DNA-Bildzytometrie zur Verfügung (Maounis *et al.* 2006, Petersen *et al.* 2009, Schramm *et al.* 2011), mit denen sich viele Fälle eindeutig in Richtung einer manifesten Tumorbildung entscheiden lassen.

#### **1.4.6 Sputumzytologie**

Abschließend soll noch kurz auf die Sputumzytologie eingegangen werden, die in den diagnostischen Abläufen in den letzten Jahrzehnten klar in den Hintergrund getreten ist. Die Gewinnung und Untersuchung des Sputums stellt eine nicht invasive Möglichkeit dar, einen Tumor der Lunge zu identifizieren und ggf. zu typisieren. Die Gewinnung des Sputums erfolgt morgens durch mehrfaches Abhusten. Eventuell bedarf es hierzu einer Reizung durch Inhalation mit Broncholytikum oder Abklopfen. Da es sich bei der Sputumzytologie im Gegensatz zur Bronchoskopie um ein nicht-invasives Verfahren handelt, ist sie grundsätzlich nicht nur als adjuvantes Verfahren in der Diagnostik von Patienten mit Tumorverdacht geeignet, sondern käme auch vom Prinzip her für das Lungenkrebscreening asymptomatischer Patienten mit erhöhtem Lungenkrebsrisiko (Raucher, berufliche Karziogenexposition) in Betracht. Allerdings schränkt die in der diagnostischen Routine umstrittene und von vielen als zu gering angesehene Sensitivität ihre Nutzung stark ein (Schreiber und McCrory 2003). Auch in Deutschland hat sie sich zum Screening, beispielsweise zum Monitoring von Asbest-Exponierten oder starken Rauchern, nicht durchgesetzt. Die Sputumzytologie ist aber durchaus geeignet, bei Patienten mit Lungenkarzinomverdacht, welche Auswurf haben, bereits vor einer Bronchoskopie mit dann hoher Sensitivität und Spezifität Tumorzellen zu detektieren (Böcking *et al.* 1992) - sowohl konventionell-zytologisch oder unter Hinzunahme adjuvanter Methoden (Varella-Garcia *et al.* 2010, Kettunen *et al.* 2006), die nicht nur an bronchoskopisch gewonnenen zytologischen Präparaten, sondern auch an Sputum anwendbar wären.

### **1.5. Diagnostischer Ablauf**

Fast alle Lungenkarzinompatienten weisen bereits initiale klinische Krankheitssymptome auf. Der Primärtumor verursacht 1/3 der Symptome. Weitere 1/3 der Symptome sind systemisch bedingt wie z.B. Anorexie, Gewichtsverlust. Metastasenort-spezifische Symptome bilden ein weiteres Drittel der Krankheitssymptome (Carbone *et al.* 1970, Spiro *et al.* 2007).

Als Basisdiagnostik des Lungenkarzinomes kann folgendes Untersuchungsprogramm angesehen werden:

- Anamnese, klinische Untersuchung
- Laboruntersuchung
- Röntgenthorax (p.a. und seitlich)
- Spiral-CT Thorax
- Bronchoskopie
- Sonographie Abdomen

Der erste Verdacht auf ein Lungenkarzinom wird aufgrund der Symptome und eines auffälligen Befundes in der Röntgenaufnahme des Thoraxes gestellt. Die Basislaboruntersuchungen beinhalten das Blutbild inkl. Differenzialblutbild, die Elektrolyte, die Nieren- und Leberparameter sowie die Gerinnungswerte. Bei der Anamnese der Patienten sind besonders das Alter, der Tabakkonsum, maligne und nicht-maligne Vorerkrankungen, familiäre Vorbelastung und berufliche Expositionen, z.B. von Asbest, zu beachten (Hoffmann und Dienemann, 2000). Die Röntgenuntersuchung des Thorax wird als initiales radiologisches Verfahren eingesetzt (Hoffmann und Dienemann 2000).

Beim Vorliegen eines Herdes kann man ältere Aufnahmen zum Vergleich heranziehen. Ein wichtiges Malignitätskriterium stellt die langsame Größenzunahme eines Herdes dar, dabei bedeutet ein Zuwachs von 28% im Durchmesser eine Verdopplung der Tumormasse (Hoffmann und Dienemann 2000).

Die Computertomographie und deren Modernisierungen (v.a. das Spiral CT) stellen heute den zweiten Schritt in der bildgebenden Diagnostik dar. Sie dient der Feststellung von Anzahl, Lage und Größe der Raumforderung sowie der Bestimmung von Radiomorphologie und Densitometrie (Shea und Lillington 1994). Beruhend auf den Ergebnissen der Primärdiagnostik kann man eine Verdachtsdiagnose stellen. Die Verdachtsdiagnose Bronchialkarzinom liegt bei einem älteren Patienten mit Raucheranamnese nahe. Zusätzlich stützen eine Malignomanamnese oder ein bekannter Primärtumor und/oder multiple Rundherde einen Metastasenverdacht. Ab diesem Zeitpunkt müssen alle unklare Rundherde eingestuft werden und bedürfen einer weiterführenden diagnostischen Abklärung (Hoffmann und Dienemann 2000).

Zu den nicht-invasiven Verfahren der weiterführenden Diagnostik zählen die Kernspintomographie, welche bei seltenen Grenzbefunden (fragliche Herz- oder Gefäßinfiltration) die

Computertomographie ergänzt, aber nicht ersetzt, und die Positronenemissionstomographie (PET), die eine gute Unterscheidung zwischen malignen und benignen Prozessen oberhalb einer Mindestgröße erlaubt. Ein 100-prozentiger Malignitätsausschluss ist jedoch beim gegenwärtigen Stand der Technik allein aufgrund bildgebender Verfahren nicht möglich (Hoffmann und Dienemann 2000).

Als eine weitere, morphologische Methode im Rahmen der Rundherddiagnostik kommt die Sputum-Zytologie in Betracht. Die Angaben über ihre Sensitivität schwanken allerdings stark und hängen von der untersuchten Materialmenge und darüber hinaus offenbar auch von der Erfahrung der Befunder ab, welche derzeit in Deutschland zumindest nur recht eingeschränkt ist (Hoffmann und Dienemann 2000).

Bei Patienten mit unklarem Lungenherd und Symptomen, die an eine Beteiligung der zentralen Atemwege vermuten lassen, bietet sich eine Bronchoskopie in Kombination mit einer bronchioalveolären Lavage, Bronchialsekretgewinnung durch Bürstung, endobronchiale oder transbronchiale Biopsie an. Diese Vorgehensweise stellt zurzeit die Methode der Wahl dar (Johnsey *et al.* 2002).

Ziel einer bronchoskopischen Untersuchung ist neben der Inspektion der oberen Atemwege und des Bronchialbaumes eine Sicherung der zugrundeliegenden pathologischen Prozesse, welche folgende Sparten umfasst: bakteriologische, zytologische und histologische Materialgewinnung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Verdacht auf ein Lungenkarzinom und bestehenden Therapieoptionen grundsätzlich zur Erhöhung der Erfolgsaussichten der Bronchoskopie aufgrund besserer anatomischer Zuordnung eine CT-Untersuchung der Thoraxorgane durchgeführt werden sollte. Zur Diagnosesicherung zentraler Tumoren soll eine Bronchoskopie inklusive Probenentnahme erfolgen, wohingegen bei peripheren Tumoren > 2cm eine transthorakale Nadelaspiration zur Diagnosesicherung durchgeführt werden kann. Bei einem peripheren Tumor < 2cm kann die transthorakale Nadelaspirationsbiopsie oder die Bronchoskopie (dann incl. moderner Navigationsverfahren) verwendet werden (Goeckenjan *et al.* 2010).

Während man noch vor einigen Jahren häufig der Meinung war, jeden solitären Rundherd ohne diagnostische Verzögerung umgehend operativ entfernen zu sollen (Toomes *et al.* 1981), bleibt dies heute nur für den isolierten malignomverdächtigen Rundherd > 8-10 mm aktuell. Dieser

Wandel lässt sich durch die zunehmende Sensitivität und Spezifität oben genannter diagnostischer Methoden, wie z.B. der CT-gesteuerten Feinnadelbiopsie, begründen.

## 1.6 Biomarker

Aktuelle Trends gehen heute in Richtung der diagnostischen Erprobung sogenannter Biomarker. In der Literatur finden sich hierfür vielfältige -und uneinheitliche- Definitionen. Eine der geläufigsten Formulierungen stammt von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahre 1993: *“The term biomarker is used in a broad sense to include almost any measurements reflecting an interaction between a biological system and an environmental agent, which may be chemical, physical or biological.”* Somit können z.B. Hormonspiegel, Enzymkonzentrationen, Stoffwechselmetabolite und DNA-Addukte als Biomarker fungieren. Daneben können auch charakteristische Moleküle der Zellmembran oder des Zellkernes als Markersubstanzen Verwendung finden. Biomarker sind dadurch charakterisiert, dass sie die Beurteilung einer möglichen Belastung, eines induzierten Effektes oder einer speziellen Empfindlichkeit des Gewebes ermöglichen.

Die Krebserkrankung ist durch eine genomische Veränderung charakterisiert, die dynamisch ist, wobei die Progression der genetischen Alteration in Schüben verläuft und nicht gleichmäßig ist (Herbst *et al.* 2008). Dies hat für die molekulargenetische Tumordiagnostik zur Folge, dass das Spektrum genetischer Alterationen sowohl in Abhängigkeit vom Tumortyp als auch von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sein kann (Hanahan und Weinberg 2000, Barrett *et al.* 1999). Es ist darum davon auszugehen, dass eine Kombination verschiedener molekularer Biomarker erforderlich ist, um bösartige Lungentumoren mit hinreichender Spezifität und Sensitivität molekularbiologisch zu diagnostizieren. Die Bearbeitung und Auswertung sollten kostengünstig und schnell erfolgen können. Um eine hohe Sensitivität und Spezifität zu gewährleisten, sollten die als molekulare Biomarker verwendeten molekulargenetischen Alterationen bei Tumorpatienten eine hohe Prävalenz aufweisen, bereits im Frühstadium der Tumorerkrankung nachweisbar sein und bei Patienten ohne Tumorerkrankungen nicht auftreten.

Neben den klassischen Diagnostikverfahren setzte man bereits in den 90er Jahren molekulargenetische Methoden versuchsweise als Biomarker ein, um den Tumornachweis in der Lunge zu vereinfachen. Zu den molekulargenetischen Methoden gehört u.a. der Nachweis genomischer Imbalancen, von LOH und Mikrosatelliten-Alterationen sowie von Punktmutationen. Da diese Verfahren in ihrer Ausführung zu aufwendig und die genetischen Alterationen zu selten waren, eigneten sie sich nicht für den Einsatz in der Diagnostik, sondern blieben zunächst auf wissenschaftliche Anwendungen beschränkt. Das Untersuchungsmaterial für die Bestimmung eines molekularen Biomarkers sollte im Idealfall nicht-invasiv bzw. minimal-invasiv zu gewinnen sein und möglichst keine die üblichen Routineabläufe störenden Anforderungen stellen. Daher sind besonders Sputen, aber auch Bronchialsekrete, Bronchiallavagen und Bronchialbürstungen geeignet, die nach der üblichen Fixierung mit Saccomanno-Fixativ für die molekularbiologische Analyse verwertbar sind (Grote *et al.* 2003a).

### **1.6.1 Epigenetik in der Cancerogenese**

Epigenetische Veränderungen, zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchte Promotor-Hypermethylierung des APC-Gens gehört, haben einen entscheidenden Anteil an der Entstehung von Tumoren. Während klassische Genetik bedeutet, dass es die DNA-Sequenz ist, die die Vererbung und die Funktion von Genen bestimmt, behandelt die Epigenetik Modifikationen von Nucleotiden und stabile Chromatin-Strukturen (Knippers 2006). Im weitesten Sinn umfasst dies alle Prozesse, die mit der Genregulation und -expression zu tun haben. Im engeren Zusammenhang beschäftigt sich die Epigenetik jedoch damit, welche Mechanismen den regulatorischen Zustand der Gene beziehungsweise die Expression der Gene aufrechterhalten oder unterdrücken und wie dieser Zustand von Zelle zu Zelle weitergegeben wird. Dies entspricht der erblichen (d.h. auf die Tochterzellen übertragenen) Regulation der Genexpression. Es wird zunehmend deutlich, dass genetische und epigenetische Veränderungen in der Cancerogenese nicht unabhängig voneinander sind, sondern sich auf vielfältige Weise gegenseitig beeinflussen. So können Mutationen in Genen für epigenetische Regulatoren und Proteinen, welche epigenetische Muster etablieren, zahlreiche Zielgene durch Fehlregulationen beeinflussen (Plass *et al.* 2013). Die wichtigsten epigenetischen Mechanismen sind die Methylierung und Acetylierung von Histon-Proteinen, die DNA-Hypomethylierung, die Regulation der Transkription und der Translation durch z.B. MicroRNAs (miRNA) und die Methylierung des Cytosin der DNA in CpG-Inseln, insbesondere von

Genpromotoren (Jenuwein und Allis 2001, Esteller 2007, Esteller 2008, Suzuki *et al.* 2012):

Eine Gen liegt grundsätzlich im offenen, d.h. transkriptionsbereiten Zustand vor, wenn der Promotor nicht hypermethyliert ist, die Region unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionsursprungs Nucleosomen-arm ist, flankierende Histon-Moleküle an bestimmten Lysin-Resten hyperacetyliert sowie an Lysin 4 trimethyliert sind und weitere Histone stromabwärts im Bereich des Gens an Lysin 36 trimethyliert sind. Oft existiert weiter stromabwärts eine chromosomale Region mit aktiver Nucleosomen-Struktur und an Lysin 4 methylierten Histonen, welche als Verstärker der Genexpression fungiert.

Ein Gen ist transkriptionell inaktiv, wenn die CpG-reiche Promotorregion von Proteinen des *Polycomp group complex* eingenommen wird. Diese führen zu repressiven Veränderungen an Histon-Proteinen, wie der Trimethylierung von Lysin 27. Nucleosomen befinden sich auch im Bereich des Transkriptionsursprungs. Eine DNA-Methylierung kann zusätzlich diesen inaktiven Genzustand stabilisieren (Baylin und Jones 2011). Eine Promotormethylierung von Genen kommt normalerweise nur bei inaktivierten Genen des X-Chromosoms, stammzellspezifischen Genen sowie Genen mit vererbtem Methylierungszustand (imprinting) vor.

In der Cancerogenese wird oft eine Genom-weite Hypomethylierung beobachtet, welche aber meist mit Megabasen-langen CpG-armen Regionen vieler Chromosomen assoziiert ist. Diese ist verbunden mit einer lokalen Hypermethylierung von Promotoren und anderen CpG-Inseln, oft von Tumorsuppressorgenen.

Weiterhin wird eine verminderte Expression von microRNA-Transkripten, u.a. verursacht durch eine Hypermethylierung des Promotors, beobachtet. Diese haben durch Inaktivierung der mRNA von Onkogenen oft eine tumorsuppressive Wirkung, welche nun wegfällt (Baylin und Jones 2011).

### **1.6.2 Promotor-Hypermethylierungen von Tumorsuppressorgenen als Biomarker des Lungenkarzinoms**

Stand der Forschung war zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit, dass aberrante Promotor-Methylierungen in der Cancerogenese häufig sind und einen Hauptmechanismus der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen darstellen (Esteller *et al.* 2001; Virmani *et al.* 2002; Zöchbauer-Müller *et al.* 2002). Bei Lungentumoren ist ein Allel häufig deletiert, die Promotor-Methylierung ist ein Hauptmechanismus der Gen-Inaktivierung des weiteren Allels und darüber hinaus ein früher

Prozess bei der Tumorentstehung. In Promotor-Regionen mit CpG-Inseln (Cytosin-Phosphodiesterbindung-Guanin-reiche Regionen) liegen Cytosin-Bausteine dann als 5-Methylcytosin vor. Anders als bei genetischen Veränderungen bleibt jedoch die Nucleotid-Sequenz erhalten, so dass von einer so genannten epigenetischen Veränderung gesprochen wird.

Die rasch wachsende Liste von mutmaßlichen Tumorsuppressorgenen mit häufiger Promotormethylierung bei Lungentumoren umfasste ohne Anspruch auf Vollständigkeit zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit folgende, von der Arbeitsgruppe um John Minna und Adi Gazdar zusammengefasste Gene (Zöchbauer-Müller *et al.* 2002):

- APC: siehe Kapitel 1.6.3.,
- p16<sup>INK4a</sup>, lokalisiert auf Chromosom 9p21: p16 bindet an die cyclin-dependent protein kinase 4 und inhibiert so dessen Interaktion mit Cyclin D1,
- DAPK (death associated protein kinase), lokalisiert auf 9q21: Verlust von DAPK supprimiert die Apoptose,
- RASSF1A (RAS association family protein 1), lokalisiert auf 3p21: Reguliert unter anderem den Zellzyklus, die Apoptose sowie die Stabilität von Mikrotubuli,
- FHIT (fragile histidin triad), lokalisiert auf 3p14: induziert Apoptose und inhibiert das Wachstum von Tumorzellen (Pekarsky *et al.* 2004),
- RAR $\beta$  (retinoic acid receptor  $\beta$ -2), lokalisiert auf 3p24: Retinoid-Rezeptor-Gen, vermittelt z.B. eine Apoptose-induzierende Wirkung von Retinoiden,
- CDH1 (E-Cadherin), lokalisiert auf 16q22: Zell-Zell-Erkennung und Zell-Adhäsion,
- MGMT (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase): Gen eines DNA-Reperaturenzym, reduziert die Wirkung DNA-alkylierender Substanzen (Esteller *et al.* 2000b).

Darüber hinaus wurde die Methylierungsfrequenz von Tumorsuppressorgen-Promotoren verschiedener Genpanels untersucht:

In einer Studie an acht Genen zeigte sich eine Promotorhypermethylierung von RAR $\beta$ , TIMP-3, p16, MGMT, DAPK und CDH1 mindestens eines der Gene des Panels bei nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe (Zöchbauer-Müller *et al.* 2001b).

In einer weiteren Studie wurde das Methylierungsmuster von sieben Genen (APC, CDH13, GSTP1, MGMT, RAR $\beta$ , CDH1 und RASSF1A) bei 198 kleinzelligen Lungenkarzinomen, nicht

kleinzelligen Lungenkarzinomen und Karzinoiden untersucht. Es zeigte sich, dass sich die Methylierungsmuster der neuroendokrinen Neoplasien (Kleinzeller und Karzinoide) deutlich von den nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen unterscheiden (Toyooka *et al.* 2001).

### 1.6.3 Das APC-Gen

Das APC-Gen (adenomatous polyposis coli) liegt auf Chromosom 5q22 (Bodmer *et al.* 1987). Es erstreckt sich über 15 Exone (Thliveris 1996) und kodiert für ein Protein mit 2843 Aminosäuren (Horii *et al.* 1993). Das APC-Gen hat zwei Promotorregionen: 1A und 2B, wobei in erster Linie Promotor 1A aktiv ist (Lambertz *et al.* 1993). Exon 10A wird alternativ gespleißt und trägt bei Transkription weitere 18 Aminosäuren zum APC-Protein bei. Exon 15 enthält mehr als 75% der codierenden Sequenz und ist der häufigste Ort von somatischen Mutationen und Keimbahnmutationen. Neben Mutationen des APC-Gens, die sehr früh in der Entwicklung von Neoplasien auftreten (Powell *et al.* 1992) und mit der Entwicklung von familiären und sporadischen intestinalen Neoplasien assoziiert sind (Wong *et al.* 1996), wurde eine Hypermethylierung der APC-Promotorregion in einer Reihe von gastrointestinalen Tumoren beobachtet, v.a. im Kolonkarzinom, Ösophaguskarzinom und Magenkarzinom (Esteller *et al.* 2000; Tsuchiya *et al.* 2000). Während die Promotorregion 1A in obigen Tumorentitäten sowie auch in normaler gastraler Mucosa hypermethyliert ist, ist dies für den Promotor 1B nicht berichtet. Die Hypermethylierung des 1A Promotors stellt also, neben den zahlenmäßig allerdings deutlich überwiegenden APC-Mutationen und LOH, einen alternativen Weg der Inaktivierung dar (Fearnhead *et al.* 2001). Die Inaktivierung des APC-Gens, welches in den Wnt (wingless-type MMTV integration site family) Signalweg eingreift, kann zu einer Anreicherung des Proto-Onkoproteins  $\beta$ -Catenin führen. Dies kann wiederum die Transkription der Onkogene *c-myc* und *cyclin D1* und damit die Progression des Zellzyklus bewirken (He *et al.* 1998, Shtutman *et al.* 1999, Fearnhead *et al.* 2001). Das APC-Gen besteht aus vielen Domänen, welche mögliche Interaktionsstellen mit anderen Proteinen darstellen. Zwischenzeitlich sind über die Rolle eines Antagonisten des Wnt Signalweges hinausgehende Funktionen von APC in der Zellmigration, Zelladhäsion, der Aufteilung der Chromosomen sowie der Formation des Spindelapparates während der Mitose, der Apoptose sowie der neuronalen Differenzierung bekannt geworden (Hanson und Miller 2005).

In Lungentumoren sind Mutationen des APC-Gens als Ursache eines Funktionsverlustes des Proteins selten (Ohgaki *et al.* 2004). Der Mechanismus zur Inaktivierung dieses Tumorsuppressorgens ist eher die Hypermethylierung des 1A-Promotors. An Zelllinien von Lungenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass eine APC-Promotorhypermethylierung mit einer Verringerung der Transkription einhergeht, welche nach Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-aza-2'-deoxycytidin wieder hergestellt werden konnte (Virmani *et al.* 2001). Studien an chirurgisch reseziertem Tumorgewebe und Zelllinien von nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) haben eine Hypermethylierung des APC-Promotors 1A in bis zu 96% der Fälle berichtet (Brabender *et al.* 2001, Virmani *et al.* 2001 und 2002, Usadel *et al.* 2002, Toyooka *et al.* 2003, Harden *et al.* 2003). Zusätzlich wurde eine abnorme Methylierung des APC-Promotors in 29%-58% der Fälle bei Zelllinien von kleinzelligen Lungenkarzinomen bestimmt (Virmani *et al.* 2001 und 2002). Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit waren keine Studien zur Methylierung des APC-Promotors an zytologischem Untersuchungsmaterial bekannt.

## **1.7 Zielsetzung**

Das Lungenkarzinom ist die Tumorerkrankung mit der höchsten Mortalität weltweit (Parkin *et al.* 2001, Ferlay *et al.* 2010). In Deutschland stellt es bei Männern die häufigste zu Tode führende Tumorerkrankung (Konietzko und Fabel 2000) dar, und auch bei Frauen ist die Zahl der durch Lungenkrebs verursachten Todesfälle seit Jahren im Anstieg begriffen. Fehlende Frühsymptome führen nicht selten dazu, dass das Lungenkarzinom erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt wird und sich die Prognose dementsprechend ungünstig verhält. Oft sind bis zur endgültigen Diagnose mehrere für den Patienten belastende, invasive Untersuchungen erforderlich (Schreiber und McCrory 2003). Die Bronchoskopie der Lunge stellt zwar ein nicht- bzw. minimal-invasives Verfahren zur Diagnostik des Lungenkarzinoms dar, allerdings weisen die bislang zur Verfügung stehenden, konventionellen histologischen und zytologischen Untersuchungstechniken eine noch unbefriedigende Treffsicherheit auf. Dies betrifft besonders Tumoren der Lungenmantelregion, welche seit Jahren auf dem Vormarsch sind (Parkin *et al.* 2001). Daher kommt der Entwicklung adjuvanter, molekularbiologischer Tests an zytologischem Restmaterial zur Ergänzung herkömmlicher Diagnoseverfahren und Verbesserung der Frühdiagnose von präkanzerösen Läsionen und malignen Lungentumoren eine hohe Bedeutung zu.

Vor diesem Hintergrund fokussiert die vorliegende Arbeit das epigenetische Phänomen der aberranten Promotorhypermethylierung des *APC*-Gens. Das Ziel dieser Untersuchung war, bei hoher publizierter Prävalenz in Lungentumor-Resektaten, die Prävalenz dieser epigenetischen Alteration in Bronchialaspiraten zu bestimmen und ihre Eignung als Tumormarker zur Verbesserung der zytologischen Diagnose von Lungenkarzinomen zu prüfen. Die Spezifität und Sensitivität der *APC*-Hypermethylierung zum Nachweis von Tumorzellen wurde im Fall-Kontroll-Studiendesign an Bronchialaspiraten von Nicht-Tumorpatienten und Tumorpatienten mit verschiedenen histologischen Subtypen und zytologischen Diagnosegruppen untersucht.

Zu der konkret durchgeführten Studie, deren Methodik und Ergebnisse im Folgenden vorgestellt werden sollen, liegt ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf vor (Studennummer 2418 vom 15.7.2004).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Klinische Proben

Es wurden retrospektiv Bronchialaspirate (Bronchialsekrete, Bronchiallavagen und bronchoalveoläre Lavagen) von 149 Patienten mit gesichertem Lungenkarzinom und von 63 Patienten mit gutartigen Lungenerkrankungen am Institut für Cytopathologie der Universität Düsseldorf gesammelt. Alle Patienten hatten sich im Zeitraum von Juli 2001 bis Oktober 2002 einer Bronchoskopie in der Klinik für Pulmonologie des Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf (seinerzeitiger Chefarzt: Dr. Kappes) unterzogen.

Die Gruppe der Patienten mit malignen Tumoren bestand aus 106 Männern und 43 Frauen im Alter zwischen 26 und 89 Jahren mit einem Median von 64 Jahren. Die Tumortypisierung erfolgte gemäß den damals gültigen (Travis et al. 1999), inzwischen revidierten (Travis et al. 2004) internationalen Richtlinien der WHO unter Verwendung der zytologischen und histologischen Gutachten. Die Stufung der zytologischen Diagnosen wurde anhand einer standardisierten Klassifikation der Zytopathologie durchgeführt (Böcking 1998). Die Zellpopulationen wurden wie folgt einer diagnostischen Kategorie zugewiesen:

- Keine abnormen oder verdächtigen Zelle: „negativ“,
- Wenige abnorme Zellen: „zweifelhaft“,
- Zahlreiche abnorme oder wenige atypische Zellen: „dringend verdächtig“,
- Bösartige Zellen nachweisbar: „positiv“.

Die histologischen Subtypen der Lungentumoren beinhalteten 47 Plattenepithelkarzinome (SCC, squamous cell carcinoma), 40 Adenokarzinome (AC, adenocarcinoma) und 18 andere nicht-kleinzellige Karzinome (NSCLC<sub>andere</sub>, non-small cell lung cancer), nämlich 5 adenosquamöse Karzinome, 4 großzellige Karzinome und 9 unklassifizierte NSCLC, ferner 38 kleinzellige Karzinome (SCLC, small cell lung cancer) und 6 kombinierte SCLC (cSCLC). Drei Patienten hatten rezidivierende Lungentumoren. Zehn der Patienten unterzogen sich zweimal der Bronchoskopie in einem Zeitraum von sechs Monaten, so dass von diesen zehn Patienten zwei Bronchialsekrete vorhanden sind. Unter diesen befinden sich jeweils 1 AC, 3 NSCLC<sub>andere</sub>, 2 SCLC

sowie vier negative Kontrollen. Somit wurden insgesamt 155 Proben von Tumorpatienten (47 SCC, 41 AC, 21 NSCLC<sub>andere</sub>, 40 SCLC und 6 kombinierte SCLC) und 67 Proben von Patienten mit benignen Lungenerkrankungen in die Studie aufgenommen.

Die Gruppe der Patienten mit gutartigen Lungenerkrankungen umfasste 37 Männer und 26 Frauen im Alter zwischen 19 und 82 Jahren mit einem Median von 65 Jahren. Die Fälle mit gutartigen Lungenerkrankungen wurden als chronisch-obstruktive Bronchitis (n= 32), Pneumonie (n= 16), Tuberkulose (n= 7), Lungenembolie (n= 5), Lungenfibrose (n= 2) und Sarkoidose (n= 1) beurteilt.

**Tab. 2.1:** Klinisch-Pathologische Daten des Untersuchungskollektivs

		Tumorfreie Patienten (n= 63)	Tumorpatienten (n= 149)
	<b>Alter</b> (Median und Range)	65 (19-82)	64 (29-89)
	<b>Geschlecht</b>		
	weiblich	26	43
	männlich	37	106
	<b>Pack years</b> (Mittelwert / SD)	41,3± 33,2	51,7± 28,3
	<b>Rauchgewohnheiten</b>		
	Raucher	22	96
	Ex-Raucher	19	36
	Nicht- Raucher	16	5
	Niemals- Raucher	6	1
	Nicht Spezifiziert		11
	<b>Histologie</b>		
	AC		41
	SCC		47
	SCLC		40
	NSCLC <sub>sonstige</sub>		21
	cSCLC		6
	<b>Staging</b>		
	I		15
	II		11
	III		31
	IV		39
	Limited disease		11
	Extensive disease		28
	Nicht spezifiziert		20

Informationen hinsichtlich der Rauchgewohnheiten, arbeitsbedingter Asbestbelastung und der klinischen Einstufung der malignen Tumore nach dem TNM-System wurden aus den Akten der Klinik für Pulmonologie des Florence-Nightingale-Krankenhauses sowie aus der Datenbank des Instituts für Cytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf generiert.

## **2.2 Bronchialaspirate**

### **2.2.1 Vorbehandlung und Aufbereitung der Bronchialaspirate für die zytologische Diagnostik**

Die Bronchialsekrete wurden unmittelbar nach der Bronchoskopie in 50 ml Röhren übertragen, die 20 ml Saccomanno Fixativ (50% Ethanol, 2% Polyethylenglycol 1500, 60 mg/l Rifampicin) enthielten. Beim Eintreffen im Labor wurden zunächst alle Proben für die Routinediagnostik aufbereitet, um aus einem Teil des Zellsediments 4 konventionelle Papanicolaou-gefärbte Proben für die mikroskopische Untersuchung zu erhalten. Die restlichen Zellen wurden in Saccomanno-Fixativ resuspendiert und im Kühlschrank bei 4 °C für spätere molekularbiologische Untersuchungen in 1,5 ml Röhren aufbewahrt.

### **2.2.2 Quantifizierung der Tumorzellen**

Die Anzahl der vorhandenen Tumorzellen in einem Bronchialsekret wurde beurteilt durch die Auswertung der jeweiligen Papanicolaou-Färbungen durch einen der Dozenten des Institutes für Zytopathologie (Priv.-Doz. Dr. med. H.J. Grote). Bei der semiquantitativen Bestimmung der im Bronchialaspirat vorhandenen Tumorzellen wurden alle vier zytologischen Ausstrichpräparate berücksichtigt. Bronchialaspirate, die von der konventionellen Zytopathologie als „sicher positiv“ diagnostiziert wurden, wurden durch eine semiquantitative Bestimmung der Tumorzellzahl in zwei Gruppen eingeordnet worden:

- 1) Wenige Tumorzellgruppen bzw. Einzeltumorzellen oder kleine Gruppen von Tumorzellen sind maximal an drei Stellen vorhanden,
- 2) Mehrere Tumorzellgruppen bzw. Einzeltumorzellen oder kleine Gruppen von Tumorzellen sind an mindestens vier Stellen vorhanden oder es liegen große Tumorzellgruppen vor.

### **2.3 Humane Zelllinien und ihre Kultivierung**

Der für diese Untersuchung benötigte Zellstamm Wi-38 (ATTC Nr.: CCL-75, Ursprungsgewebe: humane Lunge, Morphologie: Fibroblasten) wurde von Dr. G. G. Maul, Wistar Institut, Philadelphia, USA, zur Verfügung gestellt. Die humane Zelllinie NCI-H522 (ATCC no. CRL-5810, Ursprungsgewebe: humane Lunge, Adenokarzinom) wurde von der American Type Cell Culture (ATCC) bezogen und entsprechend den Herstellerangaben wie nachfolgend erläutert kultiviert. Die DNA der Wi-38 Zellen wurde isoliert (s. 2.10), mit *SssI*-Methylase behandelt (s. 2.12) und diente später als Positivkontrolle.

Die Kultivierung der Zelllinien Wi-38 und NCI-H522 erfolgte im Inkubator bei 37 °C in Dulbecco´s Modified Eagle Medium mit stabilisiertem Glutamin, 15% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum) als Nährstoff, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>. Von dem Nährmedium wurden 15 ml in 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen gegeben, in denen die Zellen adhärent wuchsen. Das Nährmedium wurde alle 2-5 Tage durch frisches ersetzt. Dazu wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS, phosphate buffered saline) gewaschen. Anschließend erfolgte zur Trennung der Zellen von ihrer Wachstumsunterlage die Spülung der Zellen mit 3 ml EDTA-Trypsinlösung.

Die Zugabe von 12 ml frischem Medium bewirkte die Inaktivierung des Verdauungsenzyms Trypsin. Zur Anlegung von Subkulturen wurden je 3 ml Zellsuspension in neue Kulturflaschen gesetzt und mit 12 ml Medium aufgefüllt. Zur Langzeitlagerung wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden die Trypsin behandelten Zellen in 1 ml eiskaltem FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) suspendiert, in 2 ml Kryoröhrchen gegeben und im Tiefkühlmedium bei -80 °C eingefroren. Das zugesetzte DMSO diente dabei als eine Art Gefrierschutzmittel für die Zellen. Die Stocklösungen wurden nach 24 Stunden bei -80 °C in flüssigen Stickstoff überführt.

## 2.4 Chemikalien

Agarose SeaKem LE	Biorad, München
Bromphenolblau (BPB)	Pharmacia Biotec, Schweden
DNA-Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Seromed Biochrom, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Xylencyanol (XC)	USB, Ohio, USA
Zellkulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe

Alle in den Versuchen verwendeten und nicht in dieser Liste aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt, oder Sigma, Deisenhofen, mit der Qualität p.A. bezogen.

## 2.5 Färbungen, Lösungen und Puffer

### 2.5.1 Saccomanno Fixativ

Ethanol 99,5%	4997ml
Aqua dest.	4603ml
Carbowax-Lösung	400ml
Rifampicin- Lösung	200ml

Ansatz für die Carbowax- Lösung:	50% Ethanol	400ml
	Polyethylenglycol 1500 geschmolzen	200ml

Ansatz für die Rifampicin- Lösung: 4 Tabletten à 150gr mit 200ml 50% Ethanol

## 2.5.2 Papanicolaou-Färbung

1. 30 sec. 80%iger Alkohol
2. 30 sec. 70%iger Alkohol
3. 30 sec. 50%iger Alkohol
4. 30 sec. Aqua dest.
5. 3 bis 6 Minuten Hämatoxylin (Harris)
6. 30 sec. Aqua dest.
7. 0,25%ige wässrige Salzsäure 6-mal eintauchen)
8. 6 Minuten fließendes Wasser
9. 30 sec. Aqua dest.
10. 30 sec. 50%iger Alkohol
11. 30 sec. 70%iger Alkohol
12. 30 sec. 80%iger Alkohol
13. 30 sec. 95%iger Alkohol
14. 90 sec. Orange G 6
15. 30 sec. 95%iger Alkohol
16. 30 sec. 95%iger Alkohol
17. 90 sec. EA 50 ( Polychromfarbstoffgemisch nach Papanicolaou)
18. 30 sec. 95%iger Alkohol
19. 30 sec. 95%iger Alkohol
20. 30 sec. 95%iger Alkohol
21. 30 sec. absoluter Alkohol
22. 30 sec. Xylol-Alkohol (zu gleichen Anteilen)
23. 30 sec. Xylol
24. Eindecken in Caedax, Eukitt oder Kanadabalsam

### **2.5.3 Lösung für die Bisulfitkonversion**

10 N NaOH: 4 g in 10 ml Aqua dest.

10 mM Hydrochinon: 0,11 g in 100 ml Aqua dest.

3 M Natriumbisulfit, pH 5,0: 6,24 g in 20 ml Aqua dest.

pH-Wert mit 10 N NaOH auf pH 5.0 einstellen

### **2.5.4 Lösungen für Elektrophorese**

Laufpuffer für Agarose-Gele (TBE-Puffer)

8,9 mM Tris

8,9 mM Borat

2 mM EDTA

5 x DNA Ladepuffer

2,5 mM Tris-HCl pH 8,0

50 mM EDTA pH 8,0

90% Glycerin

0,01% Bromphenolblau

0,01% Xylencyanol

## **2.6 Molekularbiologische Kits**

Purgene DNA Isolation Kit Gentra Systems, MN, USA

Wizard DNA Clean-Up Promega, WI, USA

## **2.7 Enzyme**

LightCycler-Fast Start DNA Master, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Hybridization Probes Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

*SssI*-Methylase NE BioLabs, Frankfurt a.M.

## 2.8 Geräte und Apparaturen

LightCycler Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LightCycler Capillaries Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tischzentrifuge 4515D Eppendorf, Hamburg

BioPhotometer Eppendorf, Hamburg

Perfect Blue Mini M PEQLAB GmbH, Erlangen

Labor-pH-Meter 765 Knick, Berlin

UV-Leuchttisch TFX Vilber Lourmat, Frankreich

Thermomixer Comfort Eppendorf, Hamburg

## 2.9 Oligonukleotide

Alle TaqMan®-Sonden und Oligonukleotide für den Promotor-Methylierungsnachweis wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bezogen (s. Tab. 2.2). Die Stocklösungen wiesen eine Konzentration von 100 pmol/μl auf und wurden bei -20 °C gelagert. Die Gebrauchslösungen der Oligonukleotide wurden auf 10 pmol/μl eingestellt. Die TaqMan®-Sonden wurden auf eine Konzentration von 4 pmol/μl verdünnt.

**Tab. 2.2:** Oligonukleotide und TaqMan®-Sonden für den *APC*-Promotor und eine CpG-freie Region von *MYOD1*.

Gen-Promotor	Primär Sequenz	Hybr. Temp.	Anzahl CpG	Größe (bp)
APC	F: 5' -GAA CCA AAA CGC TCC CCA T-3' R: 5' -TTA TAT GTC GGT TAC GTG CGT TTA TAT-3' TaqMan: 5'-6FAM-CCC GTC GAA ACC CCG CCG ATT A-TAMRA-3'	60 °C	8	74
MYOD1	F: 5'-CCA ACT CCA AAT CCC CTC TCT TTA T -3' R: 5'-TGA TTA ATT TAG ATT GGG TTT AGA GAA GGA -3' TaqMan: 5'-6FAM-TCC CTT CCT ATT CCT AAA TCC AACCTA AAT ACC TCC - TAMRA -3'	58 °C	0	161

## **2.10 Isolierung von Nukleinsäuren**

DNA aus Kulturzellen und pulmonaler Exfoliativzytologie wurde über Proteinpräzipitation mit Hilfe des Purgene DNA Isolation Kits<sup>®</sup> (Gentra Systems, Minneapolis, USA) nach Herstellerangaben extrahiert. Die Kulturzellen des Zellstamms Wi-38 wurden nach Absaugen des Mediums mit Trypsin versetzt und unter Zugabe von 2 ml frischem Medium/FCS mit 1.500 x g für 10 Minuten bei 4 °C pelletiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 2 ml Zell-Lysispuffer mit 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) überführt und 30 Minuten lang bei 65 °C inkubiert. Die Proben der Bronchialaspirate wurden bei 750 g zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Ca. 50 µl resuspendierte Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen und nochmals 5 Minuten bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt, das pulmonale Material mit 250 µl Lysepuffer und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Die auf Raumtemperatur abgekühlten Proben wurden mit 100 µl Proteinpräzipitations- Lösung 20 Sekunden lang gut vermischt und 5 Minuten bei 5 °C inkubiert. Die ausgesalzten Proteine wurden bei 16000 U/min für 3 Minuten abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 300 µl 100% Isopropanol versetzt und gemischt. Bei Raumtemperatur wurden die Proben 5 Minuten lang inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 16000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Verwerfen des Überstands in 70% EtOH resuspendiert und für 1 Minute bei 16000 U/Min zentrifugiert. Nach erneutem Abkippen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet.

Die so extrahierte DNA wurde abschließend über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst. Die DNA-Ausbeute wurde daran anschließend photometrisch bestimmt (s. 2.11).

## **2.11 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung**

Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde mittels Photometer (Bio- Photometer<sup>®</sup>, Eppendorf) bestimmt. Bei der Messung im Photometer ist die Absorption der Strahlung bei entsprechender Wellenlänge der DNA-Konzentration proportional. Das Absorptionsmaximum der DNA liegt bei 260 nm. Nach Sambrook und Russel (2001) entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Proteine absorbieren bei 280

nm. Die Verunreinigung der DNA mit Proteinen wird aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm berechnet. Die Reinheit der Probe sollte bei 1,8 liegen.

## 2.12 Methylierung der DNA mit *SssI*-Methylase

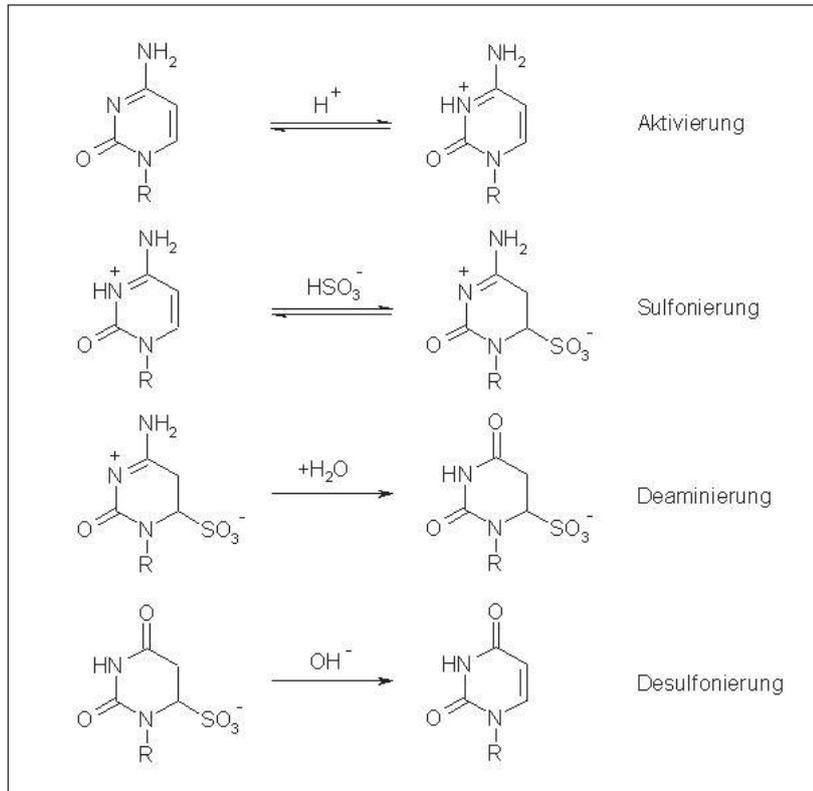
Der Reaktionsansatz für einen 50 µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg DNA  
5 µg 10x Reaktionspuffer  
0,25 µl 200x SAM (S-Adenosylmethionin)  
0,5 µl *SssI*-Methylase

Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und die Methylase anschließend durch Erhitzen bei 65 °C für 20 min inaktiviert.

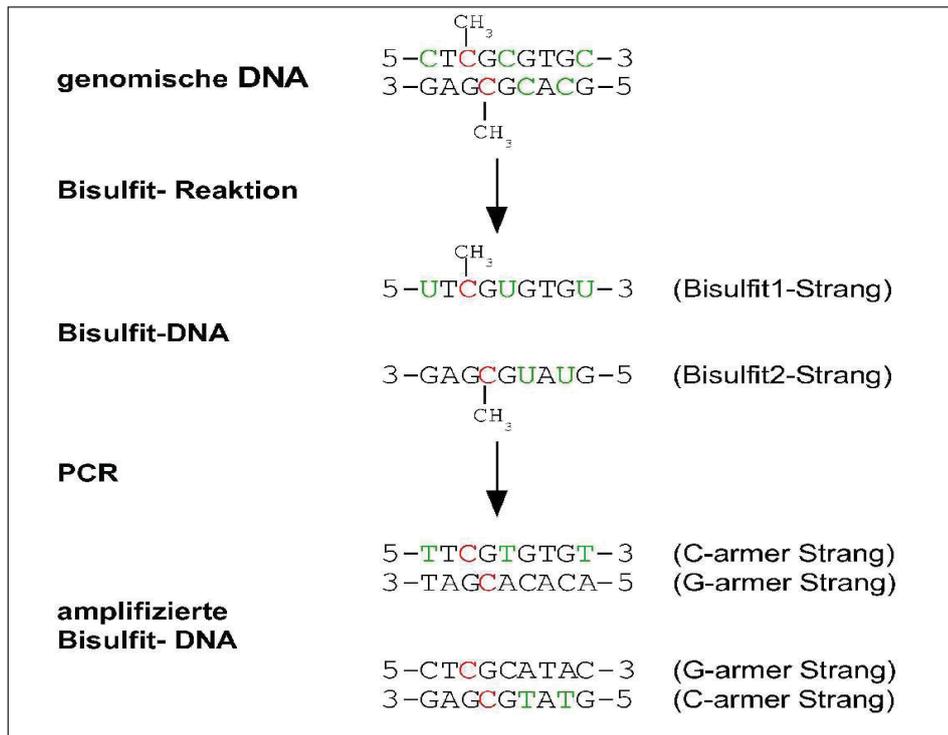
## 2.13 DNA-Bisulfitkonversion

Da aberrante Methylierungen mit einer Änderung der Genexpression assoziiert sind, aber keine Alteration der DNA-Sequenz verursachen, muss zu ihrem Nachweis die DNA vorher mit Bisulfit behandelt werden, durchgeführt als Bisulfitkonversion modifiziert nach Herman *et al.* 1996. Durch die Vorbehandlung der DNA mit Bisulfit werden unmethylierte Cytosin-Reste zu Uracil desaminiert, methylierte Cytosin-Reste dagegen nicht (Frommer *et al.* 1992) (s. Abb. 2.1). Im endgültigen PCR-Produkt tritt daher Thymin an die Stelle des unmethylierten Cytosins. Es kommt also zu einer vom Methylierungsstatus abhängigen Sequenzänderung, die dann mittels PCR sichtbar gemacht werden kann, wie in Abbildung 2.2 dargestellt.



**Abb. 2.1:** Chemische Umwandlung von 5-Methylcytosin in Uracil durch die Behandlung mit Natriumbisulfit und anschließende alkalische Desulfonierung (nach Tetzner, 2006)

Für die Bisulfitkonversion diente das Protokoll von Herman und Mitarbeitern (Herman *et al.* 1996) als Vorlage: Es wurde pro Probe je 1  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit 0,3 M NaOH-Lösung für 15 Minuten bei 37 °C denaturiert. Anschließend wurden dem 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz 30  $\mu\text{l}$  10 mM Hydrochinonlösung und 520  $\mu\text{l}$  3 M Natriumbisulfitlösung hinzugegeben. Es folgte die Inkubation der Probe für 16 Stunden bei 50 °C. Die Aufreinigung der DNA wurde mittels Wizard DNA Purification Kit nach Herstellerangaben ausgeführt. Dazu wurde die DNA mit 1 ml „Binding puffer“ versetzt und auf Säulen gegeben. Die Filter wurden für 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die DNA wurde mit 2 ml 80% Isopropanol gewaschen und in 50  $\mu\text{l}$   $H_2O$  eluiert. Danach wurde die DNA mit einer Endkonzentration von 0,3 M NaOH für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit Ethanol gefällt (s. 2.14) und in 20  $\mu\text{l}$   $H_2O$  resuspendiert.



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der Bisulfit-Konversion. Cytosine der genomischen DNA werden durch die Bisulfit-Reaktion in Uracil umgewandelt (grüne Basen). Cytosine können in CpG-Dinukleotiden als 5-Methyl-Cytosin, methyliert vorliegen und werden in der Bisulfit-Reaktion nicht umgewandelt (rote Basen) (nach Tetzner, 2006).

## 2.14 Ethanolfällung der DNA

Ziel der Ethanolfällung ist zum einen die Volumenreduktion der DNA, zum anderen dient sie der Entfernung der zugesetzten NaOH-Lösung. Zu diesem Zweck wurde die DNA-Lösung mit einem Zehntel ihres Volumens an 3 M NaAc (pH 5,2) und dem 2,5fachen ihres Volumens an EtOH<sub>absolut</sub> versetzt und gut vermischt. Die bei -25 °C für mindestens 2 Stunden inkubierten Proben wurden anschließend für 30 Minuten bei 16000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und dem DNA-Sediment 70%iges EtOH hinzugefügt. Die Proben wurden bei 16000 g für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen, die DNA getrocknet und in doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert.

## 2.15 Quantitative Methylierungs-spezifische PCR (QMSP)

Die quantitative Methylierungs-spezifische PCR (QMSP) ist ein Verfahren zur Beobachtung und Quantifizierung des exponentiellen Anstiegs der DNA-Amplifikate während einer PCR-Reaktion. Bei der QMSP bindet die sog. TaqMan®-Sonde als drittes Oligonukleotid zwischen den beiden *Primer*-Stellen an die *Template*-DNA (Holland *et al.* 1991). Die Sonde ist mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen, Reporter und Quencher, markiert. Ihr 3'-Ende ist durch eine Phosphatgruppe blockiert, damit es nicht als *Primer* fungieren kann. Während eines PCR-Zyklus hybridisieren sowohl *Primer* als auch die Sonde an die denaturierte *Template*-DNA. Wenn beide Farbstoffe an der Sonde gebunden sind, wird die Emission des Reporter-Farbstoffs durch den Quencher-Farbstoff absorbiert; es ist keine Emission messbar. Während des Extensionsschrittes jedes PCR Zyklus trennt die TaqDNA-Polymerase durch ihre 5' -3'-Exonukleaseaktivität den Reporter-Farbstoff vom Oligonukleotid (Holland *et al.* 1991). Sobald der Reporter-Farbstoff vom Quencher-Farbstoff getrennt ist, ist eine Absorption durch die fehlende Nähe der Farbstoffe nicht mehr möglich und die Emission des Reporter-Farbstoffs kann registriert werden. Dieser Effekt beruht vor allem auf dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bzw. Fluoreszenz (Förster 1948, Lakowitz *et al.* 1988). Das freigesetzte Fluoreszenzsignal steigt proportional zur DNA-Synthese an. Die genaue Durchführung der QMSP nach Bisulfitkonversion zum Nachweis des Methylierungsstatus des *APC*-Promotors wird nachstehend erläutert.

Jede PCR erfolgte mit Positiv- und Negativkontrollen. Als Positivkontrolle diente DNA der Zelllinie Wi-38, die zuvor mit *SssI*-Methylase behandelt wurde und somit komplett methyliert vorlag. Eine Probe aus Mastermix und sterilem Aqua dest. ohne DNA-Zugabe fungierte als Negativkontrolle. Zur Qualitätskontrolle der Bisulfitkonversion wurde eine CpG-freie Sequenz aus der Promotorregion des *Myogenic Differentiation Antigen 1 (MYOD1)* als interne Referenz eingeführt.

Mit dieser internen Kontrolle konnten Rückschlüsse auf den Erfolg der Bisulfitkonversion und den Erhaltungszustand der DNA gezogen werden. Die modifizierte DNA wurde nur dann für die weiteren Untersuchungen verwendet, wenn die *MYOD1*-PCR und somit auch die Desaminierung der unmethylierten Cytosine zu Uracil während der Bisulfitkonversion erfolgreich war. Darüber

hinaus konnten die zu untersuchenden Proben durch Normalisierung mit der internen Kontrolle quantifizierbar gemacht werden. So ermöglichte diese interne Referenz einen Vergleich von verschiedenen QMSP-Läufen untereinander und gleichzeitig die Einrichtung eines Schwellenwertes zur Steigerung der Spezifität des Markergens.

Für die PCR wird zunächst ein sogenannter Master Mix vorbereitet (Ansatz für eine Probe). Er weist folgende Bestandteile auf:

- je 1,2 µl 10 pmol *Primer* Lösung, 600 nM Endkonzentration
- 1 µl 4 pmol TaqMan®-Sonde, 200 nM Endkonzentration
- 2 µl 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>,
- 2 µl Light Cycler-Fast Start DNA Master Hybridization Probes
- 10,6 µl steriles Aqua dest.
- 10 pmol *Primer*-Lösung: 20 µl 100 pmol *Primer*-Stocklsg. + 180 µl steriles Aqua dest.
- 4 pmol Sonden-Lösung: 3 µl 100 pmol Sonden-Stocklsg. + 72 µl steriles Aqua dest.

Ein 20 µl QMSP-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 2µl (50 ng) Bisulfit-konvertierte DNA
- 600 nM je *Primer*
- 200 nM TaqMan®-Sonde
- 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2 µl LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes.

Detaillierte Angaben zu den Oligonukleotiden, TaqMan®-Sonden, Hybridisierungstemperaturen und PCR-Fragmentlängen sind in der Tabelle 2.2 (s. o.) zusammengestellt. Der QMSP-Ansatz wird in eine Glaskapillare gegeben, bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge für ca. 10 Sekunden zentrifugiert und anschließend in den LightCycler gegeben (s. Abb. 2.4). Die Ablaufbedingungen, unter denen die QMSP-Reaktion in LightCycler Kapillaren in einem LightCycler durchgeführt worden sind, lassen sich aus der Tabelle 2.3 zu entnehmen.

**Tab. 2.3:** Ablaufbedingungen für die QMSP

Zyklenzahl	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
1	95 °C, 10 Min.		
60	95 °C, 10 Min.	58 °C, 5 Sek.	72 °C, 8 Sek.
1			40 °C, 30 Sek.

Der Grad der *APC*-Promotor-Methylierung wurde mittels Endpunkt-Analyse bestimmt. Dabei wurde das prozentuale Methylierungslevel als Quotient aus dem *APC*-PCR-Produkt und *MYOD1*-PCR-Produkt, multipliziert mit 100, definiert.

## 2.16 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die qualitative Auswertung der QMSP erfolgte durch Auftragen der PCR-Produkte auf einem analytischen Agarosegel. Dazu wurden jeweils 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl DNA Ladepuffer versetzt und auf einem 1,8% Agarosegel in 1x TBE-Puffer bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid in das Agarosegel, welches in die DNA interkaliert, kann das Gel auf einem UV-Tisch ausgewertet werden. Durch den Vergleich mit einer DNA-Leiter wurde die Größe des PCR-Produktes bestimmt. Es sollte für *APC*-Promotor 74 bp betragen

## 2.17 Statistische Auswertung

Für den Vergleich beobachteter Häufigkeitsverteilung mit der theoretischen Häufigkeitsverteilung wurde der Chi-Quadrat Test verwendet. Für den Vergleich der zentralen Tendenz von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney U Test herangezogen. Die Ergebnisse des Chi-Quadrat Tests und Mann-Whitney-U-Tests wurden als  $\chi^2$ - bzw. U-Werte angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf  $P < 0,05$  festgelegt. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nachweisgrenze und *APC/MYOD1-Cutoff* vor Beginn der Untersuchungen am Patientenkollektiv

Um die Sensitivität der quantitativen real-time PCR zu bestimmen, wurden zunächst Verdünnungsreihen mit extrahierter DNA der humanen Zelllinie NCI-H522 durchgeführt. Von dieser Zelllinie eines humanen Adenokarzinoms der Lunge ist bekannt, dass der APC-Promotor hypermethyliert ist (Virmani *et al.* 2002). Die NCI-H522 DNA wurde mit extrahierter, nicht methylierter DNA der Zelllinie Wi-38 (humane pulmonale Fibroblasten) oder von Lachs-Spermatozyten in den Verhältnissen 1:100, 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000, 1:5000, 1:7500 verdünnt. Nach Bisulfit-Konversion wurde anschließend eine QMSP unter Verwendung eines Lightcyclers und der Primer für den APC-Promotor durchgeführt. Bei suffizienter positiver (Wi-38 DNA nach Behandlung mit SssI DNA Methyltransferase) und negativer Kontrolle (Probe ohne DNA) konnte gezeigt werden, dass die Methylierungsuntersuchungen in der Lage waren, ein methyliertes Allel unter 5.000 unmethylierten Allelen nachzuweisen.

Da von vorneherein nicht davon auszugehen war, dass bereits eine geringe APC-Methylierung auf das Vorliegen eines malignen Tumors hindeuten würde, wurde die Aussagekraft der Methylierungsuntersuchung durch die genomische Sequenzierung der DNA von 14 Bronchialsekreten mit anschließender Natriumsulfitumwandlung untersucht. Diese zeigte sowohl 7 Fälle ohne methylierte CpG-Inseln (2 Fälle mit gutartigen Lungenerkrankungen, 2 Adenokarzinome (AC), 1 nicht kleinzelliges Karzinom (NSCLC) (nicht subtypisierbar)), als auch 7 Fälle mit 1-8 methylierten CpG-Inseln (3 Fälle mit gutartigen Lungenerkrankungen, 2 AC, 1 NSCLC, 1 kleinzelliges Karzinom (SCLC)) (vgl. Abb. 3.1). Die erstgenannten Fälle zeigten ein *APC/MYOD1* Verhältnis von  $0,9 \pm 1,2$ , während die letztgenannten Fälle ein wesentlich höheres *APC/MYOD1* Verhältnis von  $30,6 \pm 27,5$  zeigten. Um eine hohe Spezifität bei Tumordiagnose im Falle einer *APC*-Hypermethylierung zu erhalten, wurde anhand dieser Werte zunächst ein Schwellenwert des *APC/MYOD1*-Verhältnisses  $\geq 5$  festgelegt. Dies entspricht dem durchschnittlichen *APC/MYOD1*-Verhältnis der oben genannten sequenzierten unmethylierten Fälle plus drei Standardabweichungen und bildet den Schwellenwert zur Dichotomisierung von

methylierten zu nicht methylierten Fällen. Dieser Schwellenwert musste, wie sich im weiteren Verlauf zeigte, revidiert werden.

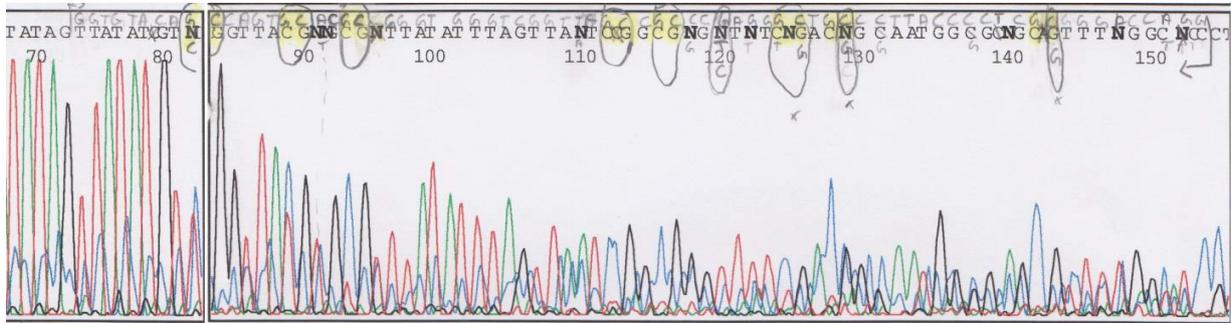


Abb. 3.1: Sequenz des PCR-Produktes aus dem APC-Promotor eines pulmonalen Adenokarzinoms. Es sind 8 CpG Dinukleotide erfasst (gelb markiert), welche nach Bisulfit-Konversion sämtlich erhalten, d.h. methyliert sind.

### 3.2 *APC*-Promotor-Hypermethylierung in den Bronchialsekreten

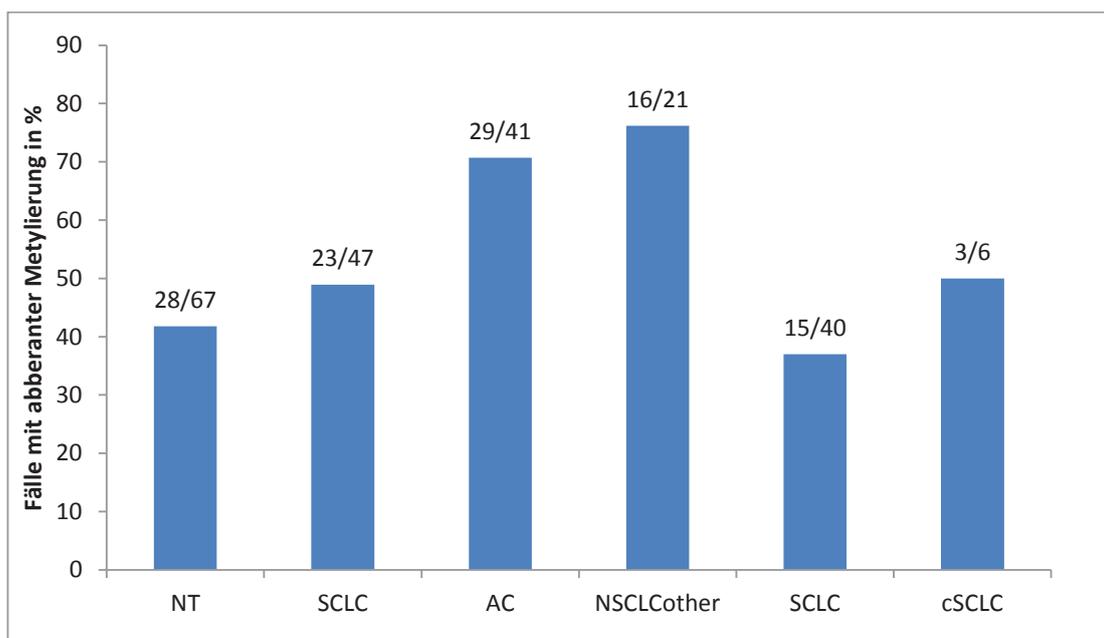
Wir untersuchten den Methylierungsstatus des *APC*-Promotors 1A in 155 Bronchialsekreten von Patienten mit einem primären Lungentumor und 67 Bronchialsekreten von Patienten, bei denen eine gutartige Lungenerkrankung diagnostiziert worden war. Für jede untersuchte Untergruppe (kein Tumor, Plattenepithelkarzinome (SCC), AC, NSCLC (nicht subtypisierbar), SCLC, kombinierte SCLC (cSCLC)) wurden die Bronchialaspirate dem zytologischen Routineeingang des Instituts für Cytopathologie fortlaufend entnommen, um die Beeinflussung bei der Probenauswahl möglichst gering zu halten, d.h. Selektionsprobleme so gut wie möglich zu vermeiden, und die diagnostische Routinesituation widerzuspiegeln.

#### 3.2.1 Prozentuale Häufigkeit der Methylierung in einzelnen Tumorentitäten sowie nicht-Tumor Proben (Schwellenwert des *APC*/MYOD1 Verhältnisses (x100) von $\geq 5$ )

Eine *APC*-Hypermethylierung fand sich bei einem zunächst festgelegten Schwellenwert des *APC*/MYOD1 Verhältnisses von  $\geq 5$  bei 41,8 % (28/67) der Nichttumorfälle, 48,9% (23/47) der SCC, 70,7% (29/41) der AC, 76,2% (16/21) der NSCLC, 37,5% (15/40) der SCLC und 50% (3/6) der kombinierten SCLC. Die statistische Analyse belegte eine signifikant häufigere *APC*-

Promotormethylierung bei AC und NSCLC als bei SCLC ( $p < 0,005$ ), nicht-Tumor-Fällen ( $p < 0,01$ ) und SCC ( $p < 0,05$ ). Der Unterschied zwischen AC und NSCLC auf der einen Seite und SCC auf der anderen Seite war statistisch nicht mehr signifikant, wenn man nur die Fälle mit vielen Tumorzellen bzw. Tumorzellgruppen berücksichtigt ( $p \geq 0,1$ ). Es gab keine signifikante Korrelation zwischen der Methylierungsfrequenz und der vorab semiquantitativ beurteilten Anzahl der Tumorzellen bzw. Tumorzellgruppen ( $p > 0,25$ ).

Die Prävalenz einer *APC*-Promotor-Hypermethylierung (Schwellenwert  $APC/MYOD1 \times 100 \geq 5$ ) in Bronchialaspiraten ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Hier wurden die Risikopatienten ohne Lungenkarzinom (NT) und die Tumorpatienten nach dem histologischen Subtyp ihres Karzinoms gruppiert und die prozentuale Methylierungshäufigkeit innerhalb der jeweiligen Gruppe aufgetragen.

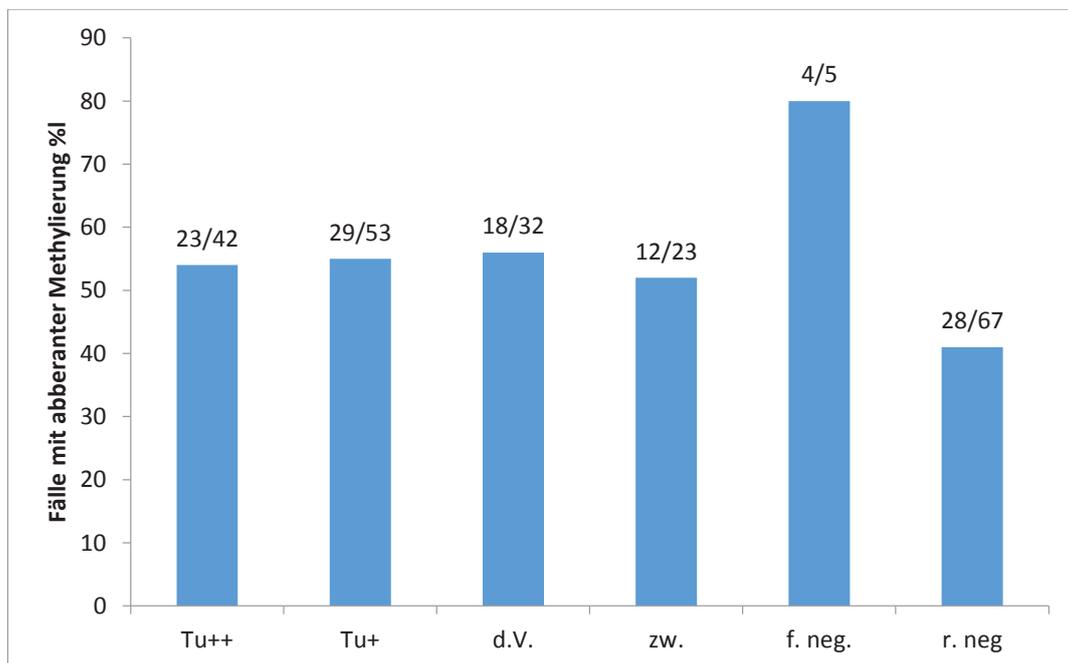


**Abb. 3.2:** Häufigkeit einer aberranten Promotor-Methylierung von *APC* (Schwellenwert  $APC/MYOD1 \times 100 \geq 5$ ) in Bronchialaspiraten von Risikopatienten ohne Lungenkarzinom (NT) und Tumorpatienten in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp (AC: Adenokarzinom, SCC: Plattenepithelkarzinom, NSCLCother: Nicht-Kleinzelliges Karzinom, SCLC: Kleinzelliges Karzinom, cSCLC: kombiniertes Kleinzelliges Karzinom).

### 3.2.2 Prozentuale Häufigkeit der Methylierung bei verschiedenen zytologischen Diagnosekategorien (Schwellenwert $APC/MYOD1 \times 100 \geq 5$ )

Die prozentuale Häufigkeit der aberranten *APC*-Promotor-Methylierung (Schwellenwert des *APC/MYOD1* Verhältnisses ( $\times 100$ ) von  $\geq 5$ ) in Abhängigkeit von der zytologischen Diagnosegruppe ist in Abbildung 3.3 veranschaulicht.

In Bronchialaspiraten mit zytologisch sicher positiver Diagnose, „Tu++“ (vgl. Kapitel 2.2.2) und „Tu+“, war eine *APC*-Hypermethylierung mittels QMSP bei 54% (23/42) bzw. 55% (29/53) nachweisbar, außerdem in 56% (18/32) der „dringend verdächtigen“ Fälle. Bei der zytologischen Diagnosegruppe „zweifelhaft“ konnte eine aberrante Promotor-Methylierung von *APC* in 52% (12/23) der Fälle detektiert werden und bei 80% (4/5) der Fälle ohne zytologisch nachweisbare Tumorzellen (Diagnosegruppe „negativ“) aber mit Tumordiagnose im Follow-up sowie bei 41% (28/67) der Fälle ohne zytologisch nachweisbare Tumorzellen und ohne Tumordiagnose im Follow-up.



**Abb. 3.3:** Prozentuale Häufigkeit einer Methylierung des *APC*-Promotors 1A (Schwellenwert  $APC/MYOD1 \times 100 \geq 5$ ) in Bronchialaspiraten von 67 Risikopatienten ohne Lungenkarzinom und 155 Tumorpatienten in Abhängigkeit von der zytologischen Diagnosegruppe (Tu++: multiple Tumorzellen, Tu+: wenige Tumorzellen, d.V.: dringend verdächtige Fälle, zw.: zweifelhafte Fälle, f. neg.: falsch-negative Zytologie, r. neg.: richtig-negative Zytologie).

### 3.2.3 Methylierungsgrad

Der quantitative Grad der APC Hypermethylierung ( $APC/ MYOD1 \times 100$ ) (Methylierungsgrad) betrug 2,7 (0,0 bis 48,7; Mittelwert 7,2) bei gutartigen Lungenerkrankungen ( $n = 67$ ), 4,8 (0,0 bis 183,1, Mittelwert 23,4), bei SCC ( $n=47$ ), 20,0 (zwischen 0,0 und 192,6; mittel 37,7) bei AC ( $n=41$ ), 39,5 (0,0 bis 138,4; Mittelwert 48,8) bei anderen NSCLC ( $n=21$ ), 2,6 (0,0 bis 108,2; Mittelwert 12,8) bei SCLC ( $n=40$ ) und 5,1 (0,0 bis 120,3; Mittelwert 39,1) bei kombinierten SCLC ( $n=6$ ) (vgl. Abb. 3.4). Hierbei war ein höherer Methylierungsgrad bei AC und anderen NSCLC im Vergleich zu gutartigen Lungenerkrankungen statistisch signifikant ( $p= 0,002$  bzw.  $p= 0,0003$ ).

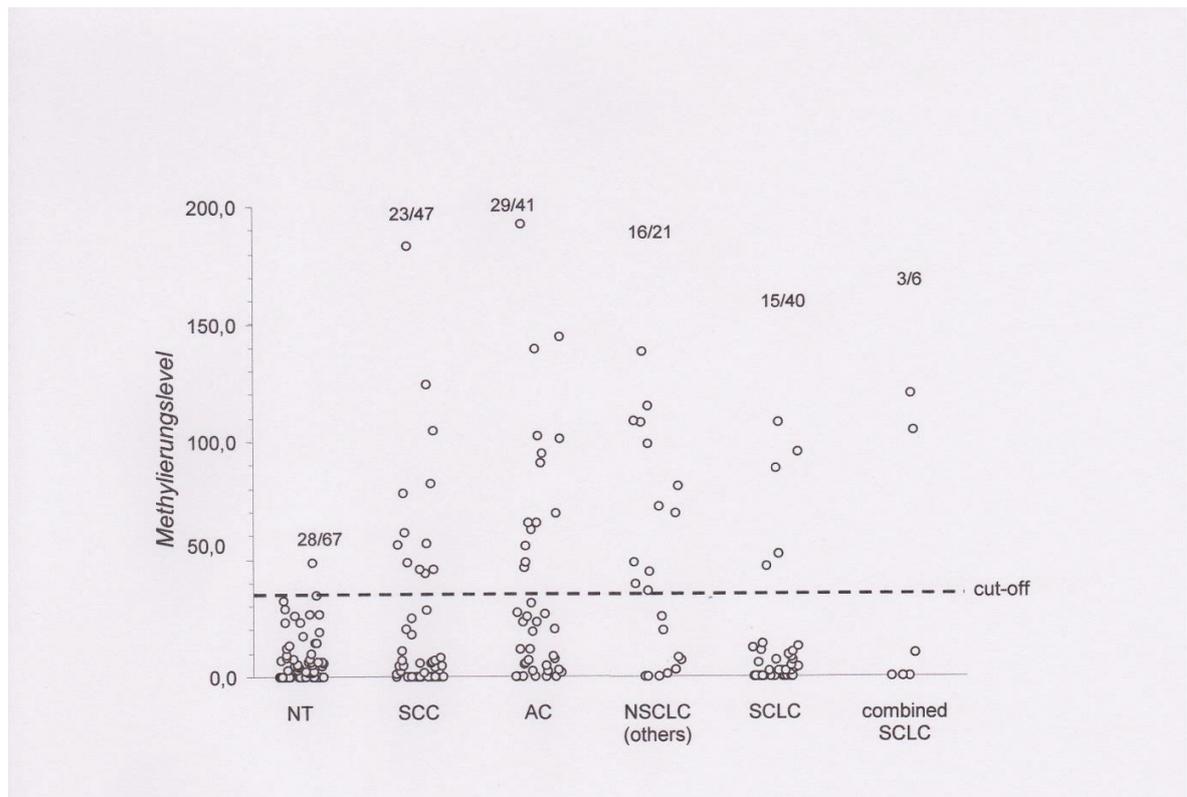
Bei den SCC und den SCLC nahm der quantitative Grad der *APC*-Hypermethylierung in annähernd gleichem Maße zu der Anzahl der im Bronchialsekret vorhandenen Tumorzellen/Gruppen zu. Dies blieb aber knapp statistisch nicht signifikant ( $p= 0,052$  bzw.  $p= 0,058$ ).

Von 10 Patienten wurden jeweils zwei Proben im Untersuchungszeitraum in die Studie einbezogen (4 gutartige Lungenerkrankungen, 1 AC, 3 andere NSCLC, 2 SCLC). Die Proben wurden in einem Zeitraum von 0- 169 Tagen entnommen (Median 14,5 Tage).

Das Bronchialsekret eines Patienten mit SCLC zeigte zunächst einen niedrigen APC-Methylierungsgrad ( $APC/ MYOD1 = 10,4$ ). 169 Tage später, nach verabreichter Chemotherapie rezidierte der Tumor und in einem weiteren Bronchialsekret wurde nun ein hoher APC-Methylierungsgrad ( $APC/ MYOD1= 52,3$ ) nachgewiesen.

Bei einem anderem Patienten nahm man während der Bronchoskopie zwei Bronchialaspirate unterschiedlicher Lungenregionen. Eine zytologisch tumorzell-positive Probe hatte einen hohen APC-Methylierungsgrad ( $APC/ MYOD1 = 44,4$ ), während die andere Probe einen niedrigen Methylierungsgrad zeigte ( $APC/ MYOD1 = 8,0$ ) und tumorzellnegativ war.

Bei den übrigen 8 Patienten betrug der Zeitraum zwischen den Bronchoskopien bis zu einem Monat. Der Methylierungsgrad der jeweiligen Bronchialsekrete zeigte eine gute Übereinstimmung (Korrelationskoeffizient  $r= 0,96$ ).



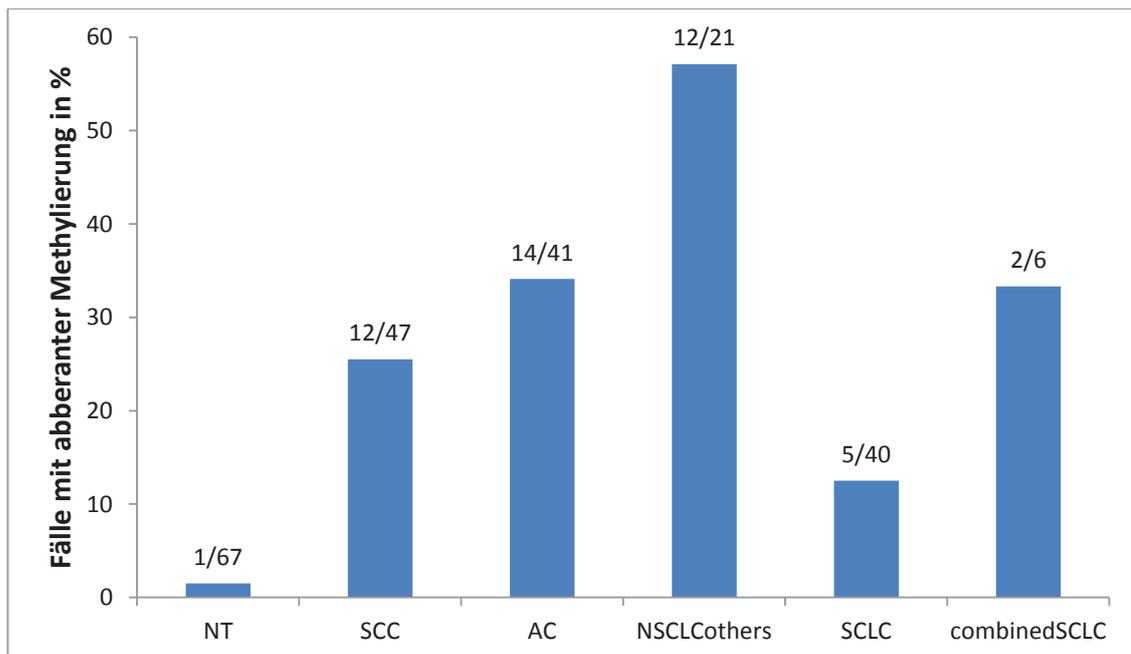
**Abb. 3.4:** *APC*-Promotor-Methylierungslevel in Bronchialaspiraten von Risikopatienten ohne Lungenkarzinom (NT) und Tumorpatienten in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp (AC: Adenokarzinom, SCC: Plattenepithelkarzinom, NSCLC(others): Nichtkleinzelliges Karzinom, SCLC: kleinzelliges Karzinom und cSCLC: kombiniertes kleinzelliges Karzinom). Die gestrichelte Linie repräsentiert den *Cut off* bei einem Methylierungslevel  $\geq 35$  (vgl. Kapitel 3.3).

### 3.3 Etablierung eines besser geeigneten *APC/ MYOD1* Schwellenwertes zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen Lungenerkrankungen

#### 3.3.1 Sensitivität und Spezifität der aberranten *APC*-Methylierung als Biomarker ( $APC/ MYOD1 \times 100 \geq 35$ )

Unter Verwendung des vor Auswertung der Fall-Kontrollstudie etablierten Schwellenwertes zur Diagnostik einer Hypermethylierung des *APC*-Promotors ( $APC/ MYOD1 \times 100 \geq 35$ ), weist die *APC*-Methylierung als Biomarker an der oben genannten Fall-Kontrollstudie eine Sensitivität von 55% (86/155) und eine Spezifität von 58% (28/67) zur Detektion eines malignen Lungentumors auf (vgl. auch Kapitel 3.2.1).

Nach Auswertung der APC-Methylierungsgrade in Bronchialaspiraten gutartiger und bösartiger Lungenerkrankungen (vgl. Kapitel 3.2.3) lagen 66 von 67 nicht-Tumor Proben relativ nahe beieinander. Das Punkt-Diagramm (Abb. 3.4) zeigt in der Endpunktanalyse des APC/MYOD1-Verhältnisses (x100) oberhalb oder gleich eines Methylierungsgrades von 35 lediglich ein Bronchialaspirat eines nicht-Tumor-Patienten mit Hypermethylierung des APC-Promotors. Es wird deshalb im Folgenden ein neuer Schwellenwert  $\geq 35$  zur Dichotomisierung einer APC-Hypermethylierung vorgeschlagen. Proben unterhalb dieses Schwellenwertes werden als nicht methyliert (negativ), Proben oberhalb dieses Wertes als positiv für eine aberrante *APC*-Promotor 1A Methylierung eingestuft. Dieser Schwellenwert ermöglicht eine relativ gute Unterscheidung zwischen Patienten mit gutartigen und malignen Lungenerkrankungen und ist damit auch in der Diagnostik als Biomarker des Lungenkarzinoms anwendbar.



**Abb. 3.5:** Prozentuale Häufigkeit einer aberranten Methylierung des APC-Promotors 1A (Schwellenwert  $APC/ MYOD1 \times 100 \geq 35$ ) in Bronchialaspiraten von Risikopatienten ohne Lungenkarzinom (NT) und Tumorpatienten in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp (AC: Adenokarzinom, SCC: Plattenepithelkarzinom, NSCLC(other): Nichtkleinzelliges Karzinom, SCLC: kleinzelliges Karzinom, *combined*SCLC.: kombiniertes kleinzelliges Karzinom).

Bei Verwendung des Schwellenwertes  $\geq 35$  findet man stark positive Proben bei 25,5% (12/47) der SCC, 34,1% (14/41) der AC, 57,1% (12/21) der sonstigen NSCLC, 12,5% (5/40) der SCLC, 33,3% (2/6) der kombinierten SCLC und 1,5% (1/67) der benignen Lungenerkrankungen (Abb. 3.5).

Die *APC*-Methylierung zeigt nun eine sehr gute Spezifität von 98,5% (66/67) sowie eine, nunmehr reduzierte Sensitivität von 29% (45/155). Eine Promotormethylierung des *APC*-Gens war in der Gruppe die kleinzelligen Karzinome allerdings selten. Lässt man diese aus der Auswertung heraus, beträgt die Sensitivität einer *APC*-Promotorhypermethylierung als Biomarker für NSCLC 34,8% (38/109).

### **3.3.2 *APC*-Promotor 1A-Hypermethylierung (*APC*/ *MYOD1* x100 $\geq$ 35) bei verschiedenen zytologischen Diagnosegruppen**

Unter Verwendung des Schwellenwertes  $\geq 35$  zeigten die zytologischen Diagnosegruppen „Tu++“ und „Tu+“ in 31% (13/42) bzw. 26% (14/53) der Tumorfälle einen positiven QMSP Befund. Ebenso konnten 25% (8/32) der „dringend verdächtigen“ Fälle als *APC*-methyliert verifiziert werden. Bei zytologisch „zweifelhafter“ oder „falsch-negativer“ Diagnose konnte eine *APC*-Promotorhypermethylierung in 26% (6/23) bzw. 80% (4/5) molekularbiologisch nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.6). Die Frequenz der *APC*-Hypermethylierung unter Verwendung des Schwellenwertes  $\geq 35$  wies bei Patienten mit einem Lungenkarzinom zwischen den verschiedenen zytologischen Diagnosegruppen überwiegend keine signifikanten Unterschiede auf ( $\chi^2 \leq 3,1$ ;  $P \geq 0,08$ ). Eine Ausnahme bildete die Prävalenz der *APC*-Hypermethylierung bei den „falsch-negativen“ Bronchialaspiraten. Diese fiel im Vergleich zu den Tumorfällen mit konventionellem zytologischem Nachweis abnormer oder atypischer Zellen deutlich höher aus ( $\chi^2 \geq 4,2$ ;  $P \leq 0,04$ ).

Die Bronchialaspirate der Kontrollgruppe, die zytologisch als „richtig-negativ“ eingestuft wurden, zeigten wesentlich seltener eine aberrante *APC*-Promotor-Methylierung (Methylierungslevel  $\geq 35$ ) als alle zytologischen Diagnosegruppen der Tumorpatienten, einschließlich der Fälle ohne morphologisch nachweisbare Tumorzellen ( $\chi^2 \geq 5,9$ ;  $P \leq 0,01$ ).

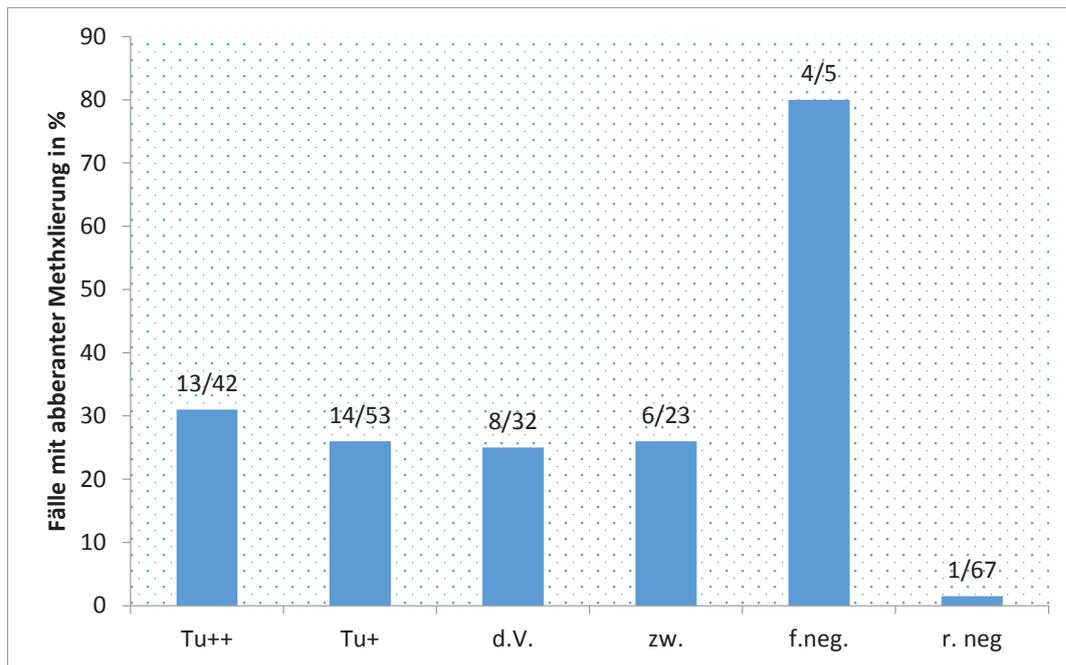


Abb. 3.6: Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit der aberranten APC-Promotor-Methylierung (Schwellenwert  $APC/ MYOD1 \times 100 \geq 35$ ) in Bronchialaspiraten von Risikopatienten ohne Lungenkarzinom und Tumorpatienten in Abhängigkeit der zytologischen Diagnosegruppe (Tu++: multiple Tumorzellen, Tu+: wenige Tumorzellen, d.V.: dringend verdächtige Fälle, zw.: zweifelhafte Fälle, f. neg.: falsch-negative Zytologie und r. neg.: richtig-negative Zytologie).

### 3.4. Die Anwendung der APC-Methylierungsuntersuchung bei zytologisch falsch negativen und nicht eindeutigen Fällen

Bei fünf Patienten, bei denen man histologisch ein primäres Lungenkarzinom diagnostiziert hatte, konnten zytologisch keine Tumorzellen nachgewiesen werden. Die QMSP des APC-Promotors zeigte bei 4/5 (80%) der Fälle (1 SCC, 3 andere NSCLC) einen sehr hohen Methylierungsgrad (Schwellenwert  $\geq 35$ ).

In der zytologischen Routine-Färbung nach Papanicolaou konnte man bei 62 Proben nur wenige Tumorzellen/Gruppen nachweisen, somit waren diese Fälle für die konventionelle Zytologie kritisch. Die QMSP der korrespondierenden Proben zeigte einen hohen Methylierungsgrad des APC-Promotors (Schwellenwert  $\geq 35$ ) in 28,9% der NSCLC (4/23 SCC, 4/13 AC, 5/9 anderen NSCLC) und in 11,8% der SCLC (2/17).

### 3.5 Klinikopathologische Korrelation

Die Häufigkeit der APC-Hypermethylierung korreliert statistisch nicht mit dem Geschlecht oder Alter. Jedoch gab es eine positive Korrelation zwischen dem quantitativen Methylierungsgrad des APC-Promotors und dem Alter sowohl in der Gruppe der Tumorpatienten als auch bei den nicht Tumorpatienten ( $p < 0,0001$  bzw.  $p < 0,01$ ). Ausführliche Informationen über die Rauchgewohnheiten lagen bei 165 Patienten vor (40/67 Patienten mit gutartigen Lungenerkrankungen; 125/155 bei Lungenkrebspatienten). Die Häufigkeit der APC-Hypermethylierung war weder davon abhängig, ob es sich um Raucher oder Ex- Raucher (mittlere Karenzzeit = 10,8 Jahre) handelte, noch von der Anzahl der Packungsjahre, die geraucht wurden ( $p > 0,5$ ). Ein vollständiges klinisches Staging lag in den Krankenakten für 108 Patienten vor (NSCLC: 5x Stadium IB, 2x Stadium IIB, 8x Stadium IIIB, 40x Stadium IV; SCLC: 11x limited disease und 29x extensive disease). Die Häufigkeit der APC-Methylierung unterschied sich nicht signifikant zwischen den Stadien I/II Stadium III bzw. IV innerhalb der NSCLC bzw. zwischen limited und extensive disease bei den SCLC ( $p > 0,5$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1 Aberrante *APC*-Promotor-Methylierung als molekularbiologischer Tumormarker für die Lungenkarzinom-Diagnostik

Wir untersuchten in dieser Studie die Methylierung innerhalb des *APC*-Promotors 1A bei 155 Bronchialsekreten von Patienten mit NSCLC und SCLC und 67 Bronchialsekreten von Patienten mit gutartigen Lungenerkrankungen. Durch die Anwendung der real-time PCR wurden sowohl die Häufigkeit als auch der quantitative Grad der *APC*-Methylierung im Hinblick auf ihren potentiellen Einsatz als molekularer Biomarker getestet und ausgewertet. Dabei galt ein Promotor als aberrant methyliert oder hypermethyliert, wenn in der PCR ein entsprechendes Produkt erzeugt werden konnte. Zunächst wurde amplifizierte DNA des *APC*-Promotors von 14 Bronchialaspiraten sequenziert. Die untersuchte Promotor-Region von *APC* wies bei positiver QMSP ein bis acht (von maximal acht) methylierten CpG Dinukleotiden auf (vgl. auch Abb. 3.1). Esteller sowie Dammann, die DNA aus Lungentumoren klonierten, beobachteten hingegen an Geweben ein homogenes Methylierungsmuster (Esteller et al. 2000, Dammann et al. 2000). Es konnte zunächst ein Schwellenwert zur Dichotomisierung der *APC*-Methylierung von  $\geq 5$  festgelegt werden. Dieser musste als Ergebnis der anschließenden Fall-Kontroll-Studie aber aufgrund unzureichender Spezifität nach der Endpunktauswertung auf  $\geq 35$  revidiert werden. Die Sensitivität der Oligonukleotide für die QMSP wurde in Verdünnungsreihen getestet und lag bei allen etablierten Primer/Sonden-Paaren bei 1:5.000. Dieser Wert entspricht durchaus der in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Sensitivität (Eads *et al.* 2000).

#### 4.1.1 DNA-Hypermethylierung als ein Teil des Zusammenspiels genetischer und epigenetischer Veränderungen bei der Cancerogenese

Während anfänglich epigenetische Veränderungen als Krebsursache kritisch hinterfragt wurden, gilt dies mittlerweile als weitgehend akzeptiert (zusammengefasst in Shen und Laird 2013):

- Viele Tumorsuppressorgene sind in malignen Tumoren durch Hypermethylierung der Promotorregionen inaktiviert. Die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens setzt die Deaktivierung beider Allele voraus (Knudson 1971). So kann beispielsweise die Funktion beider Allele durch Hypermethylierung alleine ausgeschaltet werden oder ein Allel durch

eine genetische Alteration wie Deletion, Punktmutation oder Heterozygotieverlust und das andere Allel durch eine epigenetische Veränderung herunterreguliert werden. Virmani und Mitarbeiter (2000) stellten fest, dass Heterozygotieverluste auf dem Chromosom 3 sehr häufig bei Lungentumorzellen (100% der SCLC und 67% der NSCLC) zu beobachten sind. Somit erfüllt die Kombination dieser genetischen Alteration mit der in Lungentumorzellen sehr häufig vorhandenen aberranten Methylierung das Knudson'sche Postulat einer biallelischen Inaktivierung von Tumorsuppressorgen ("Two-Hit-Hypothese").

- Regulatorische Proteine, die die Funktion von epigenetischen „writern“ oder „readern“ haben, sind zur Entstehung von malignen Tumoren bei Mäusen unbedingt notwendig. Laird und Mitarbeiter (1995) zeigten, dass die Aktivität der DNA-Methyltransferase bei einem tumorsuszeptiblen Mausmodell zur Entstehung intestinaler Tumoren beiträgt. Prokhortchouk und Mitarbeiter (2006) konnten durch Kreuzen von Kaiso (einem CpG-bindendem Protein) knock-out Mäusen und tumorsuszeptiblen Mäusen (Apc (Min/+)) eine zeitverzögerte Entstehung intestinaler Tumoren beobachten. Sansom und Mitarbeiter (2003) konnten nachweisen, dass die Funktion von Mbd2, einem Protein, welches weitere suppressive Proteine rekrutiert, in der intestinalen Tumorentstehung notwendig ist, da Mbd2-knock out Mäuse seltener intestinale Tumoren entwickeln.
- De Carvalho und Mitarbeiter (2012) konnten in einem kombinierten experimentellen und bioinformatischen Ansatz zeigen, dass DNA-Methylierung bestimmter Tumorsuppressorgene für das Überleben von maligne transformierten Zellen mit defekter DNA-Methyltransferase im Sinne einer erworbenen Abhängigkeit für diese Veränderungen notwendig war.
- Es wird zunehmend deutlich, dass der Methylierungsstatus sowie auch andere Prozesse, welche die Genexpression kontrollieren von einer großen Zahl regulatoriver Proteine aufrechterhalten werden. Störungen in der Funktion dieser Wartungsenzyme, ausgelöst z.B. durch Mutationen, beeinflussen somit auch die Genexpression, z.B. von Tumorsuppressorgen.

Zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit war weitgehend unbekannt, auf welchem Mechanismus die DNA-Hypermethylierung von Genen in Tumoren beruht. Als Möglichkeit wurde häufig eine Überexpression der DNA-Methyltransferase in Betracht gezogen (Belinsky *et al.* 1996;

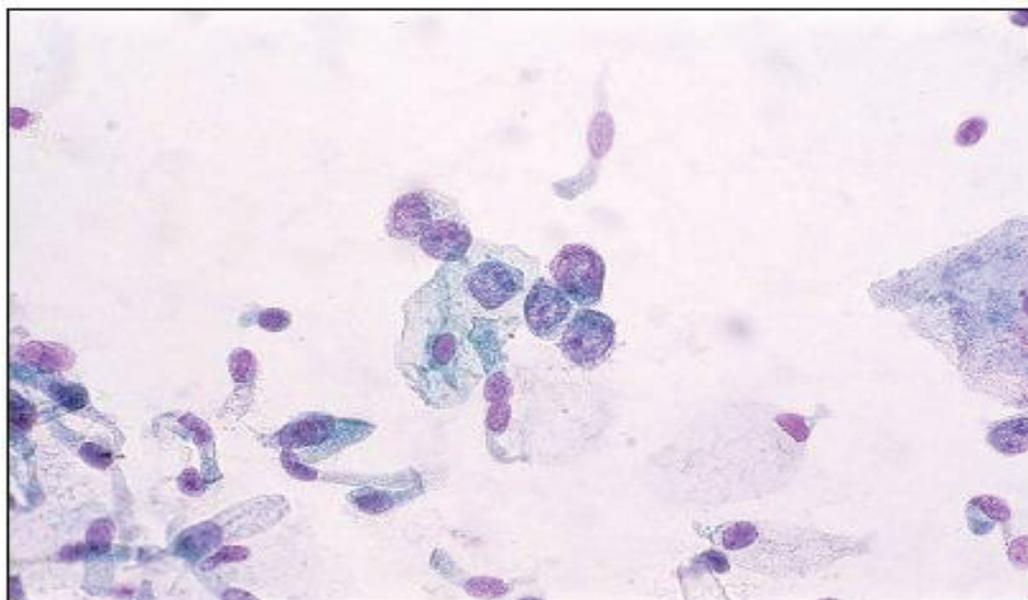
Baylin und Herman *et al.* 2000), wenngleich diese nicht in allen Tumoren beobachtet wurde, in denen eine Hypermethylierung in Erscheinung trat (Robertson und Jones 2000). Mass und Wang (1997) postulierten, dass Karzinogene Hypermethylierung verursachen und so Modifikationen der Chromatinstruktur hervorrufen. In diesem Kontext hat Smith (1998) die Hypothese vertreten, dass die DNA-Methyltransferase nach Bindung von karzinogenen Stoffen an die DNA aktiviert werden könnte. Eine alternative Erklärung für aberrante DNA-Methylierungen waren fehlerhafte Reparaturmechanismen aberrant methylierter DNA (Mompalao 2003).

Zwischenzeitlich ist bekannt (zusammengefasst bei Shen und Laird 2013), dass eine *de novo*-Methylierung durch die DNA-Methyltransferasen (DNMT1) 3A und 3B katalysiert wird. Das Methylierungsmuster wird durch DNMT1 in Zusammenarbeit mit oben genannten DNA-Methyltransferasen aufrechterhalten. Ein großer Teil des menschlichen Genoms enthält „Ozeane“ von DNA, welche lediglich wenige stark methylierte CpG-Dinukleotide enthalten. Eingestreut sind immer wieder kleine CpG-reiche „Inseln“ im Promotorbereich von ca. 50% aller humanen Gene, welche in der Regel nicht methyliert sind. Diese Gene sind meist aktiv exprimiert bzw. sind transkriptionsbereit. CpG-Inseln werden zum Teil durch Asymmetrie des DNA-Doppelstranges von Cytosin und Guanin in Nukleotiden und begleitender R-Schleifenbildung vor der *de novo*-Methylierung durch DNMT3B (Ginno *et al.* 2012) sowie durch aktive Demethylierung mittels Enzyme der TET (ten eleven translocation)-Familie geschützt (Williams *et al.* 2011). Methylierte DNA wird von Proteinen mit Methyl-Bindungsdomänen (MeB) oder Zink-Finger-Gruppen erkannt. Diese haben teil an der durch DNA-Methylierung induzierten Repression der Transkription von Tumorsuppressorgenen (Shen und Laird 2013).

#### **4.1.2 Promotor-Methylierung in Untersuchungsmaterial der pulmonalen Exfoliativzytologie**

Die Verwendung von Promotor-Hypermethylierungen als molekularer Biomarker für die Früherkennung und Diagnostik des Lungenkarzinoms gewann seit ca. dem Jahr 2000 an Bedeutung. Damals gelang es Palmisano und Mitarbeitern erstmals, die aberrante Methylierung von Gen-Promotoren in Sputen zum Nachweis von Lungentumoren einzusetzen (Palmisano *et al.* 2000). Als Untersuchungsmaterial eignen sich hier insbesondere Bronchialaspirate oder Sputen, da die Proben auf minimal-invasivem oder nicht-invasivem Wege entnommen werden können.

Die Fixierung der Proben im Saccomanno-Fixativ erhält die DNA in einem hochmolekularen und chemisch unmodifizierten Zustand und erlaubt problemlos die Untersuchung aberranter Promotor-Methylierungen (Grote *et al.* 2003a). Im Gegensatz dazu ist DNA aus Formalin-fixierten Gewebeprobe chemisch modifiziert und oft stark degradiert, was die Durchführung molekularer Analysen erschwert (Srinivasan *et al.* 2002). Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten zytologischen Untersuchungsmaterial handelt es sich außerdem um Restmaterial nach morphologischer Zytodiagnostik, so dass die üblichen Routineabläufe in der Diagnostik nicht gestört werden. Bedingt durch die geringe Anzahl von Tumorzellen in einem Überschuss von Nicht-Tumorzellen (s. Abb. 4.1) ist für die Durchführung der molekulargenetischen Tests an Präparaten der pulmonalen Exfoliativzytologie eine hohe Sensitivität Grundvoraussetzung. Des Weiteren erfordern Tumorscreening-Methoden und Therapieindikationen eine hohe Spezifität. Somit sollte eine geeignete molekularbiologische Untersuchungsmethode sowohl eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität aufweisen.



**Abb. 4.1:** Bronchiallavage eines Patienten aus der Studie mit Adenokarzinom. Wenige Tumorzellen liegen neben einem Überschuss von Nicht-Tumorzellen vor. Die Zellen des Adenokarzinoms zeigen vergrößerte exzentrische Kerne und eine zugunsten der Kerne verschobene Kern-Plasma-Relation. Papanicolaou-Färbung. 630x Vergrößerung.

#### 4.1.3 Aberrante Hypermethylierung des *APC*-Promotors

Der *APC*-Promotor 1A wies bei Anwendung des initial festgelegten Schwellenwertes ( $APC/MYOD1 \times 100 \geq 5$ ) eine Hypermethylierung in 55,5% der untersuchten Bronchialsekrete von Tumorpatienten auf und zeigte eine präferenzielle Methylierung bei Patienten mit Adenokarzinom (70,7%) und anderen NSCLC (76,2%). Patienten mit SCLC zeigten eine niedrigere Methylierungsfrequenz von 37%. Das Methylierungslevel hängt auch von der Zahl der im Bronchialaspirat enthaltenen Tumorzellen ab, es spiegelt nicht notwendigerweise den Grad der Methylierung im jeweiligen Tumorgewebe wieder. Trotzdem liegt die Methylierungsfrequenz in Bronchialsekreten etwa noch im Bereich der Beobachtungen vergleichbarer Studien, die unter Verwendung einer QMSP Tumorresektate und Zelllinien von NSCLC untersuchten. Sie fanden eine Hypermethylierung des *APC*-Promotors in 72-96% (meist 84%) der NSCLC und 58% der SCLC (Brabender *et al.* 2001, Virmani *et al.* 2002, Usadel *et al.* 2002, Harden *et al.* 2003). Andere Arbeiten, in denen eine traditionelle MSP verwendet wurde, detektierten *APC*-Hypermethylierungen in 0 bis 53% (im Mittel 45%) der NSCLC und 26% der SCLC (Virmani *et al.* 2001, Toyooka *et al.* 2003, Esteller *et al.* 2001, Yanagawa *et al.* 2003). Topaloglu und Mitarbeiter untersuchten die Methylierung des *APC*-Promotors an 31 Bronchialsekreten von NSCLC Patienten mittels QMSP. Sie fanden eine Methylierungsfrequenz von 16% (Topaloglu *et al.* 2004). Die deutliche Abweichung der Ergebnisse dieser Arbeit von Topaloglus Daten mag durch die Verwendung anderer *Primer*/Sonden-Paare und durch das Untersuchen eines kleineren Kollektivs erklärt werden. Neuere Arbeiten, welche ausschließlich die *APC*-Hypermethylierung an zytologischem Untersuchungsgut untersuchen, sind nicht mehr verfügbar. Die Analyse einer *APC*-Promotorhypermethylierung an Untersuchungsmaterial der bronchialen Exfoliativzytologie geschieht zur Erhöhung der Sensitivität einer Tumordetektion zukünftig im Rahmen eines Genpanels. Auszüge der entsprechenden Literatur werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

Bislang sind Informationen über eine mögliche physiologische, altersabhängige Methylierung des *APC*-Promotors im Lungenepithel begrenzt. Brabender und Mitarbeiter fanden eine *APC*-Hypermethylierung in 2 von 10 Fällen von histologisch normalem Lungengewebe (Brabender *et al.* 2001). Allerdings waren die untersuchten Personen signifikant jünger als die Kontrollgruppe der vorliegenden Studie, die eine *APC* Hypermethylierung in 41,8% der Fälle aufwies. Waki und Mitarbeiter überprüften den Methylierungsstatus des nicht-neoplastischen Lungengewebes von 30 Autopsiefällen mit einer konventionellen MSP. Sie detektierten eine *APC*-Promotormethylierung

in 33% der untersuchten Fälle, die ein Alter zwischen 22 und 87 Jahren besaßen (Waki *et al.* 2003). Allgemein wird eine altersabhängige Methylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich verschiedener Gene angenommen (Waki *et al.* 2003, Ahuja und Issa 2000). Ebenso konnte eine Promotorhypermethylierung verschiedener Gene, u.a. APC, in alternder Leber sowie Hepatitis C Infektion, aber auch dem hepatozellulärem Karzinom gezeigt werden (Nishida *et al.* 2008). Diese letzteren Ergebnisse legen nahe, dass eine Hepatitis C-Infektion eine die Promotorhypermethylierung im Rahmen des Alterungsprozesses beschleunigen kann und im Falle der Viruspersistenz bis zur Kanzerogenese führen kann. Brabender und Mitarbeiter schlugen ebenso eine altersabhängige Methylierung des APC-Promotors in normalem Lungengewebe vor, so wie sie in nicht tumoröser Darmmukosa beschrieben ist, (Brabender *et al.* 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen klar diese Hypothese, Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und dem quantitativem Grad der APC-Hypermethylierung sowohl bei Tumorpatienten ( $p < 0,0001$ ) als auch bei Nichttumorpatienten ( $p < 0,01$ ) gezeigt werden. Das Lungengewebe mag durch Umwelteinflüsse während der Lebenszeit beschädigt werden. Ob Zigarettenrauch in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt, bleibt noch zu erkunden (Brabender *et al.* 2001).

Die hohe Methylierungsfrequenz des *APC*-Promotors 1A in der Kontrollgruppe dieser Arbeit ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die aberrante Methylierung von *APC* ein früher Schritt in der Karzinogenese ist. Man muss daran denken, dass die hier untersuchte Kontrollgruppe zunächst unter Tumorverdacht bronchoskopiert wurde und die meisten Patienten Raucher oder Exraucher waren. Frühere Studien an Vorläuferläsionen eines Karzinoms des Verdauungsapparats - wie z.B. Barrett-Ösophagus und Dickdarm-Adenom - untermauern, dass Veränderungen der Methylierung und damit verbunden der Expression des *APC*-Gens früh in der Tumorgenese entstehen können (Kawakami *et al.* 2000, Esteller *et al.* 2000). Hierzu passt die Beobachtung von Licchesi *et al.* (2008). Sie wiesen eine zunehmende Promotorhypermethylierung von Antagonisten des Wnt-Signalweges - unter anderem APC - in angrenzendem normalem Lungengewebe, low grade atypischer adenomatöser Hyperplasie, high grade atypischer adenomatöser Hyperplasie und invasivem Adenokarzinom nach.

#### 4.1.4 Anwendung der *APC*-Hypermethylierung als molekularer Biomarker für Lungenkarzinome

Die Anwendung der *APC*-Hypermethylierung als Biomarker tritt als eine von mehreren vielversprechenden molekularen Strategien zur Früherkennung von Krebs hervor. Exfoliativzellen der Lunge (aus Bronchialsekreten, Bronchialabstrichen oder Sputum) sind als Biomarker für das Auffinden der Promotorhypermethylierung gut geeignet, weil die Proben durch minimal oder sogar nicht invasive Eingriffe zugänglich sind und weil die DNA hochmolekular konserviert ist.

Um den Marker *APC* für einen diagnostischen Test verwenden zu können, wurden die PCR-Läufe quantitativ ausgewertet. Signifikante quantitative Unterschiede des Methylierungslevels von *APC* zwischen der Kontroll- und der Tumorgruppe ermöglichten die Setzung eines Schwellenwertes (*Cut-off*) bei  $\geq 35$  (vgl. Abb. 3.4). Dies entspricht einem hohen Methylierungsgrad des *APC*-Promotors. Damit gelang es, die Spezifität von 58% (bei initialer Verwendung eines Schwellenwertes von  $\geq 5$ ) auf 98,5% zu steigern. Nur ein Fall in der Kontrollgruppe wies nach Einführung des Schwellenwertes eine aberrante Promotormethylierung von *APC* auf. Möglicherweise besteht bei diesem Patienten ein erhöhtes Karzinom-Risiko. Frühere Studien bei exfoliativen Zellen der Lunge, fokussiert auf p16, MGMT (*O*<sup>6</sup>-Methylquanin-DNA-Methyltransferase) und *APC* und stellten häufig eine Hypermethylierung der jeweiligen Gene bei Patienten mit primären Lungenkrebs aber auch in beträchtlicher Anzahl (bis zu 35%) bei Patienten ohne Anhalt für Malignität fest (Belinsky *et al.* 2002, Chen *et al.* 2002, Soria *et al.* 2002). Eine gewisse Anzahl der Patienten mit (scheinbar) falsch-positiven Ergebnissen erkrankten im Laufe der folgenden 3 Jahre an Lungenkrebs (Honorio *et al.* 2003, Palmisano *et al.* 2000). Die Studien verwendeten konventionelle MSP (Methylierungsspezifische PCR) bzw. eine modifizierte MSP mit gesteigerter Sensitivität, welche ausschließlich eine qualitative Analyse des Methylierungsstatus ermöglichte. Leider konnte in der vorliegenden Studie der *APC* positive Kontrollpatient nur über einen begrenzten Zeitraum verfolgt werden, bis zu welchem noch kein Tumor diagnostiziert wurde.

Die Sensitivität von aberranter *APC*-Promotormethylierung zur Detektion eines malignen Lungentumors bzw. eines nicht kleinzelligen Karzinoms in Bronchialsekreten lag in der vorliegenden Studie bei 29% bzw. 34,8%. Hierbei wurde ein Schwellenwert der *APC*-Methylierung etabliert, der, wie oben beschrieben, eine möglichst hohe Spezifität ermöglicht. Eine alleinige Anwendung der *APC*-Promotorhypermethylierung als diagnostischer Biomarker des

Lungenkarzinoms ist aufgrund der relativ niedrigen Sensitivität insgesamt wohl nicht sinnvoll. Es bietet sich aber die Kombination mit weiteren methylierten Genen an.

Unter Einbezug von Daten der vorliegenden Studie konnten Schmiemann et al. (2005) in einer Studie aus der Cytopathologie Düsseldorf die Sensitivität des Lungenkarzinom-Nachweises an einer einzelnen Bronchoskopie auf 81% erhöhen (vgl. auch Kapitel 4.2.3). Shivapurkar und Mitarbeiter (2007) untersuchten die Methylierungsfrequenz von 11 Genen zunächst an 40 Resektaten von nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen im Vergleich zu benachbartem normalem Gewebe. Hierbei erreichte 3OST2 (Heparansulfat 3-O-Sulfotransferase) mit 70% die höchste Frequenz, APC hatte mit 30% eine niedrigere Frequenz, die aber gut mit der APC-Methylierungsfrequenz der hier vorliegenden Studie übereinstimmt, allerdings verwendete die vorliegende Studie nicht Tumorgewebe, sondern Bronchialsekrete. Vier der 11 untersuchten Gene (3OST2, RASSF1A, p16 und APC) zeigten darüber hinaus eine brauchbare Methylierungsfrequenz an einer kleinen vorläufigen Serie von Sputen von Lungenkarzinompatienten und gesunden Kontrollen. Bei Hypermethylierung mindestens eines der vier untersuchten Gene konnte ein Lungenkarzinom mit 54% Sensitivität und 100% Spezifität detektiert werden.

Nikolaidis und Mitarbeiter (2012) konnten an einer sehr großen Fall-Kontroll-Studie von 655 Bronchialaspiraten des Liverpool Lung Project den sinnvollen Einsatz von Promotorhypermethylierung als Biomarker zeigen. Nach Vorauswahl von 10 Genen mit Hochdurchsatzverfahren wurden nach Testung der Leistungsfähigkeit dieser Gene an einer Trainingsgruppe letztlich die Promotorhypermethylierung von p16, TERT, WT1 und RASSF1A mittels quantitativer methylierungsspezifischer PCR bestimmt. Sie erreichte 82% Sensitivität bei einer Spezifität von 91%. APC war hierbei nicht unter den untersuchten Genen.

Schramm et al. (2011) belegten an einer Serie von 210 Patienten mit malignen Lungentumoren sowie benignen Lungenerkrankungen verschiedener zytologischer Diagnosegruppe den brauchbaren Einsatz der Promotorhypermethylierung von p16, RASSF1A und APC als Biomarker des Lungenkarzinoms an Bronchialaspiraten. Sie erreichten eine Sensitivität von 49,6% bei einer Spezifität von 98,4%.

Fünf Patienten, bei denen histologisch ein primäres Lungenkarzinom diagnostiziert wurde (1 SCC, 4 NSCLC<sub>others</sub>), zeigten in der vorliegenden Studie keine Tumorzellen in der konventionellen Zytologie. Die methylierungsspezifische real-time PCR zeigte einen sehr hohen Methylierungsgrad (*Cutoff*  $\geq 35$ ) in 4/5 (80%) dieser Fälle (1 SCC, 3 andere NSCLC). Bei 62

Proben fanden sich in der konventionellen Zytologie nur wenige Tumorzellen, so dass sie diagnostisch kritisch waren. Die QMSP der korrespondierenden Proben zeigten ein hohes *APC/MYOD1* Verhältnis in immerhin 28,9% der NSCLC (4/23 SCC, 4/13 AC, 5/9 anderen NSCLC) und in 11,8% der SCLC (2/17). Schramm et al. (2011) konnten an Bronchialaspiraten mit diagnostisch unklarer Zytologie bei 47,8% der Patienten mit einem malignen Lungentumor Promotorhypermethylierung mindestens eines Gens des untersuchten Panels (s.o.) nachweisen.

Diese Werte unterstreichen eine mögliche diagnostische Anwendung von aberranter APC-Promotormethylierung als Biomarker, auch gerade an Fällen, wo die zytologische Diagnose aufgrund lediglich weniger Tumorzellen schwierig oder unklar ist. Da die QMSP an Restmaterial nach zytologischer Diagnose durchgeführt wurde, erscheint ohne zusätzliche Belastung des Patienten durch weitere Probenentnahme eine Verbesserung der Sensitivität zur Diagnose eines Lungenkarzinoms möglich.

#### **4.1.5 Klinisch-pathologische Korrelation**

Bislang liegen nur wenige Informationen über einen möglichen Zusammenhang von aberranter *APC*-Promotor-Methylierung und Tabakkonsum vor. Zöchbauer-Müller und Mitarbeiter (2003) untersuchten in ihrer Arbeit die aberrante Methylierung von diversen Genen an unterschiedlichen Materialien der pulmonalen Zytologie und stellten eine erhöhte *APC*-Methylierungsquote bei starken Rauchern mit dysplastischen Veränderungen des Bronchialepithels fest. Zum Vergleich ermittelten sie die Methylierungshäufigkeit in Sputen von Nie-Rauchern und konnten eine statistisch signifikant niedrigere *APC*-Methylierungsrate zeigen (13% versus 26%). Diese Ergebnisse unterstützen durchaus den in Abschnitt 4.1.5 geäußerten Gedanken, dass eine *APC*-Methylierung ein frühes und häufiges Ereignis in der Tumorgenese darstellt und somit die Funktion eines möglichen Risikomarkers erfüllen könnte, indem es durch Karzinogene verursachte prä-maligne Läsionen des vorgeschädigten Bronchialepithels zu detektieren hilft. Hierzu passt die Beobachtung, dass ein Verlust der *APC*-Expression in bis zu 85% der primären NSCLCs und Lungenbiopsien von Rauchern zu verzeichnen ist (Xu *et al.* 1997; Xu *et al.* 1999; Ayoub *et al.* 1999). Ob die rauchenden oder nie-rauchenden Nicht-Tumorpatienten dieser Studie, bei denen eine aberrante *APC*-Methylierung zu verzeichnen war, ein erhöhtes Risiko haben, einen Lungentumor

zu entwickeln, wäre interessant zu beobachten, konnte hier aber nicht in einem separaten Follow-Up verwirklicht werden.

In dieser Fall-Kontroll-Studie zeigten die rauchenden und ehemals rauchenden Tumorpatienten eine hohe Methylierungsfrequenz. Die Häufigkeit der aberranten *APC*-Methylierung unter den Ex-Rauchern lässt vermuten, dass eine aberrante Methylierung auch nach Beendigung des Tabakkonsums über Jahre hinweg weiter bestehen bleibt. Zu diesem Ergebnis kamen auch die Autoren Belinsky *et al.* und Soria *et al.* sowie Zöchbauer-Müller und Mitarbeiter: In Übereinstimmung mit dieser Arbeit konnten sie keinen signifikanten Unterschied zwischen der Häufigkeit einer *APC*-Hypermethylierung in Sputen und Bronchialaspiraten von Rauchern und Ex-Rauchern aufzeigen (Belinsky *et al.* 2002; Soria *et al.* 2002; Zöchbauer-Müller *et al.* 2003). Eine Studie von Toyooka *et al.* (2003) wies in nicht-malignem Gewebe von Tumorpatienten eine bei Rauchern signifikant erhöhte Prävalenz der *APC*-Promotor-Methylierung im Vergleich zu Nie-Rauchern nach.

Ob eine *APC*-Promotor-Methylierung bei Nicht- oder Nie-Rauchern der Kontrollgruppe durch eine externe Exposition gegenüber Karzinogenen, z.B. Passiv-Rauchen, hervorgerufen wird oder mit der physiologischer Weise im Alter auftretenden Methylierung im Zusammenhang steht, ist bislang nicht geklärt. Sicherlich aber sind die Faktoren Alter bzw. Alterungsprozess und die im Laufe des Lebens durch Umwelteinflüsse und Schadstoffexposition erworbenen genetischen oder epigenetischen Veränderungen nicht getrennt voneinander zu betrachten und synergistisch wirksam im Sinne der Tumorgenese. Besonders da Issa und Mitarbeiter (2001) beschrieben, dass eine altersabhängige Methylierung eindeutig einer neoplastischen Umwandlung vorausgeht und in normal erscheinendem Gewebe von Tumorpatienten häufiger vorherrschend ist als bei Nicht-Tumorpatienten. Auch Baylin *et al.* (1998) beschrieben in ihrer Publikation eine altersassoziierte aberrante Methylierung einiger Gene. Folglich könnte der Alterungsprozess eine mögliche Erklärung für das Auftreten einer *APC*-Promotor-Methylierung auch bei Nicht-Tumorpatienten dieser Arbeit sein. In Studien verschiedener Arbeitsgruppen konnte eine altersabhängige Promotor-Methylierung für *RARβ2* im Kolon und für *APC* im Lungengewebe gezeigt werden (Youssef *et al.* 2004; Brabender *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang von aberranter Methylierung des *APC*-Promotors und Alter des Patienten nachgewiesen werden. Auch andere Autoren stellten keine altersbedingten Unterschiede hinsichtlich der Methylierungsrate von *APC* fest (Toyooka *et al.* 2003; Zöchbauer-Müller *et al.* 2001a; Zöchbauer-Müller *et al.* 2003). In Übereinstimmung mit publizierten Daten von Zöchbauer-Müller und

Mitarbeitern (2001a) wurden in dieser Studie keine geschlechtsspezifischen Unterschiede einer aberranten *APC*-Promotor-Methylierung aufgedeckt.

## **4.2 Ausblick**

Die Erforschung der Promotor-Hypermethylierung verschiedener Gene gewinnt im zunehmenden Maße an Beachtung, einerseits für die Frühdiagnose von prämaligen Läsionen und bösartigen Lungentumoren bzw. für die Tumorrisikoabschätzung, andererseits zur Verbesserung der Diagnostik symptomatischer Patienten. Besonders bei peripheren Lungentumoren, deren Zahl seit Jahren fortwährend ansteigt, ist eine frühe morphologische Diagnose erschwert. Durch die Einführung von Filterzigaretten und reizarmen Tabakmischungen wird der Zigarettenrauch bis in die tiefe Lungenperipherie inhaliert (Parkin *et al.* 2001). Neben dieser Entwicklung ist seit Jahren eine ansteigende Mortalität bei Frauen durch Lungenkarzinome zu beobachten. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass sich das Bild der rauchenden Frau, von der Zigarettenindustrie mit Assoziationen wie Freiheit, Emanzipation und Individualismus verknüpft, als gesellschaftsfähig und politisch korrekt „gemausert“ hat. Bei Fortsetzen dieser Tendenz würde in nicht allzu ferner Zukunft das Lungenkarzinom auch bei Frauen an erster Stelle der durch Krebs verursachten Todesfälle stehen (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland 2004).

### **4.2.1 Früherkennungsmaßnahmen des Lungenkarzinoms**

Somit erlangt die Verbesserung der Frühdiagnostik des Lungenkarzinoms auch durch den gesellschaftlichen Kontext zunehmende gesundheitspolitische Bedeutung. Die wachsende Kenntnis molekulargenetischer Mechanismen, die zur Entstehung von Lungentumoren führen, hat die Grundlage für die Entwicklung einer neuen Generation von Tumormarkern, sogenannten Biomarkern, geschaffen, die einen molekularbiologischen Ansatz zur Detektion von Tumorzellen realisieren. Wie diese Arbeit gezeigt hat, könnte die aberrante Methylierung des *APC*-Promotors, die eine sehr häufige Alteration im Bronchialaspirat bei Patienten mit Lungenkarzinomen darstellt, möglicherweise im Sinne einer Schädigung des Bronchialepithels als Risikomarker in pulmonalen Spülflüssigkeiten Anwendung finden. Die Kombination von *APC* mit anderen Genen in einem

Marker-Panel könnte auch als Screening für Hochrisikopatienten eingesetzt werden. In Anlehnung an den Beitrag von Belinsky würde die Etablierung eines Screening-Verfahrens zur non-invasiven Detektion von methylierten Genen in Sputen einen aussichtsvollen Ansatz zur Identifizierung von Hochrisikopatienten bieten (Belinsky *et al.* 2004). Allerdings sind weitere Studien erforderlich, um zu untersuchen, inwieweit bei Hochrisikopatienten wie starken Rauchern Gene im Untersuchungsmaterial (Sputum, Bronchialaspirat oder Bronchialbürstungen) aberrante Methylierungen aufweisen, bevor Krebs klinisch manifest wird.

Hubers und Mitarbeiter untersuchten, welchen Einfluss die Dauer der Sputumsammlung auf die Sensitivität der Hypermethylierung der Promotorgene *APC*, *RASSF1A*, *CYGB* hat. Hierfür wurden Proben von 53 Patienten mit Lungentumoren und von 47 Patienten aus der Kontrollgruppe an 9 aufeinanderfolgenden Tagen entnommen und untersucht. Sie zeigten, dass die Sensitivität signifikant höher war (64%), wenn die Sputumproben über 6 oder 9 Tage genommen wurden, als bei Proben, die an 3 aufeinander folgenden Tagen genommen wurden (43%) (Hubers *et al.* 2012). Ein molekularbiologischer Test, wie das in dieser Arbeit zum Einsatz gekommene adjuvante Verfahren des QMSP-Assays an zytologischem Restmaterial, hat gegenüber der morphologischen Diagnostik den Vorteil, dass sogenannte „*screening errors*“ aufgrund der Methodik molekulargenetischer Untersuchungen vermieden werden, da es von eventuellen Fehlern des Begutachters, die bei der zytologischen oder histologischen Befundung unterlaufen können, weitgehend unabhängig ist.

#### **4.2.2 Nähere Zukunft der Hypermethylierungsdiagnostik beim Lungenkarzinom**

Insgesamt kann in dieser Arbeit nicht auf alle Aspekte der molekularen Lungenkrebsdiagnostik Bezug genommen werden, da sich im Grunde Tag für Tag neue diagnostische und therapeutische Erkenntnisse ergeben, die zum Teil auch schnell in Testverfahren umgesetzt werden. Allein im Bereich der Epigenetik stehen nicht nur die oben angesprochenen Untersuchungen an den Genen *APC*, *p16<sup>INK4A</sup>* und *RASSF1A* zur Verfügung, sondern beispielsweise auch solche, die Veränderungen zur Stammzell- und Progenitorzellregulierung (p15, p16), zur DNA-Reparatur (*MLH1*), zum Verlust an Zelladhäsion (E-Cadherin) sowie weitere Mechanismen aus dem Wnt-Pathway testen (*SOX2*), an dem auch *APC* teilnimmt (Herman *et al.* 2003, Jones und Baylin 2007, Esteller 2008, Baylin und Jones 2011).

Ein eigentlicher „Stein des Weisen“, also eine Anwendung, mit der man mit einer einzigen oder wenigen kombinierten Hypermethylierungsuntersuchungen zu einem exakten diagnostischen Ergebnis käme, ist weder gefunden, noch in Sicht, auch wenn man über eher deskriptive Arbeiten, in der nicht weniger als 30 Gene simultan auf Hypermethylierung untersucht wurden (Pesek et al. 2011), eigentlich hinaus ist. Ein solcher immenser Aufwand führt nämlich aufgrund seiner Datenfülle letztendlich solange nicht weiter, wie hinter ihm nicht ein diagnostischer oder therapeutischer Sinn steht.

Wichtig ist hingegen, bestimmte entscheidende diagnostisch-therapeutische Abzweige molekularpathologisch zu begleiten, z.B. um diejenigen Patienten identifizieren zu helfen, denen trotz eines relativ früh entdeckten Bronchialkarzinoms im Stadium I ein Rezidiv droht. Hierzu wurde ein aus vier Hypermethylierungs-Testungen zusammengesetztes Panel entwickelt und hochrangig im New England Journal of Medicine publiziert (Brock et al. 2008). Diesem gehören *p16*, *CDH13*, *RASS1FA* und auch *APC* an; eine solitäre Betrachtung einer *APC*-Hypermethylierung war zwar nicht mit besonders erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeiten verbunden, wohl aber in Verbindung mit einer *p16*- oder *CDH13*-Hypermethylierung.

Von Interesse sind auch Anwendungen therapeutischer Art, z.B. durch die Gabe von Inhibitoren der DNA-Methylierung und der Histondeacetylierung („Epigenetische Therapie“), wie sie Ende 2011 in einer Phase I/II-Studie vorgelegt wurden; dabei zeigten sich bei fortgeschrittenen NSCLC-Fällen verbesserte Überlebensraten bzw. längere Zeiträume eines progressionsfreien Verlaufes (Jürgens et al. 2011).

Insgesamt bedeutet dieses, dass man sich durchaus in Zukunft bei gegebener konkreter Indikation auch einen Einsatz von Hypermethylierungsuntersuchungen in der klinischen Diagnostik beim Lungenkarzinom vorstellen kann, ähnlich wie auch Testungen auf eine EGFR-Genmutation oder eine FISH-Untersuchung auf eine *EML4-ALK*-Fusionsgenbildung heute bereits zum Spektrum der diagnostischen Medizin gehören - allerdings sind in den gängigen aktuellen S3-Leitlinien (Goeckenjan et al. 2010) noch keine solchen Testungen als Standard anerkannt. Im Gegenteil ist es so, dass molekulare oder andere adjuvante Methoden, also auch FISH oder DNA-Bildzytometrie (s. unten), hier noch kaum erwähnt sind und lediglich in einer Textpassage zur Sputumzytologie, nämlich „Weitere Verbesserungen der Sputumdiagnostik konnten zwischenzeitlich z. B. mit

computerunterstützter zytometrischer Bildanalyse (...) und molekularbiologischen Methoden erzielt werden (...). Große prospektive Studien, die eine Neubewertung der Sputumzytologie auf der Basis dieser Techniken als Screeningverfahren zuließen, stehen noch aus.“ Es steht allerdings zu erwarten, dass die nächste Revision der S3-Leitlinie zu diesem Thema wesentlich mehr Informationen und diagnostische Implikationen enthalten wird.

#### **4.2.3 Kombinierte Lungenkarzinomdiagnostik mit verschiedenen adjuvanten Verfahren**

Schmiemann und Mitarbeiter (2005) konnten bereits unter Einbeziehung der Daten der hier vorgelegten Arbeit zeigen, dass der Einsatz einer Kombination solcher Gene, deren Promotor-Methylierungen eine hohe Spezifität für das Vorliegen eines Tumors aufweisen, als Marker-Panel eine Erhöhung der Sensitivität des Tumornachweises im Vergleich zu konventioneller morphologischer Diagnostik ermöglicht. Durch die Kombination von drei Markergenen (*APC*, *RASSF1A* und *p16<sup>INK4a</sup>*) als Panel mit konventioneller morphologischer Diagnostik gelang es ihnen, die Sensitivität des Lungenkarzinomnachweises einer Bronchoskopie auf 81% zu erhöhen; ein Teil der hier vorgelegten Untersuchungen bzgl. des APC-Gens war Bestandteil der oben genannten Studie. In einer neuen Studie aus der Düsseldorfer Cytopathologie wurden diese Untersuchungen neu aufgenommen und an einem neuen Patientenkollektiv mit weiteren Methoden kombiniert angewandt.

Als adjuvante Methoden zur Ergänzung der zytologischen Lungenkarzinom-Diagnostik stehen nämlich bislang nicht nur Analysen zur Hypermethylierung von Genen, sondern insbesondere die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und auch die DNA-Bildzytometrie mit guten Daten für Sensitivität und Spezifität zur Verfügung (aktuell zusammengefasst bei Schramm *et al.* 2011).

So wird von der Industrie eine 4-fach-Multicolor-FISH-Test gewerblich angeboten (LaVysion, Fa. Abbott), der vier Gensonden (5p15, 6p11-q11, 7p12 und 8q24) aus solchen Bereichen enthält, die bei Lungenkarzinomen häufig verändert sind (Sokolova *et al.* 2002), und gut diagnostisch genutzt werden kann, um in unklaren diagnostischen Fällen zu einem klinisch umsetzbaren Ergebnis zu gelangen (Savic *et al.* 2006, Varella-Garcia *et al.* 2004, Bubendorf *et al.* 2005, Voss *et al.* 2010). Ähnlich ist die DNA-Bildzytometrie auf diesem Gebiet gut etabliert und gut einsetzbar (Ono und Auer 1983, Auffermann und Böcking 1985, Carey *et al.* 1996, Maounis *et al.* 2006, Petersen *et al.* 2009); beide Methoden sind in der Cytopathologie in Düsseldorf unter bestimmten Indikationen in

regelmäßiger Anwendung und ergänzen sich gerade auf dem Gebiet der Lungenkarzinomdiagnostik gut (Schramm *et al.* 2011): In 147 Fällen, in denen für alle angewandten Methoden ein valides Ergebnis erzeugt werden konnte, ergaben sich Werte für Sensitivität und Spezifität für den FISH-Test von 76% bzw. 98% sowie für die DNA-Zytometrie von 77% bzw. 98%, wobei die Ergebnisse hoch korreliert waren (Kappa-Statistik:  $\kappa = 0.93$ ). Die Hinzunahme von QMSP-Untersuchungen von *APC*, *p16<sup>INK4A</sup>* und *RASSF1A* zeigten Werte von 49.6% Sensitivität bzw. 100% Spezifität und waren zu einer Detektion einiger weiterer positiver Fälle geeignet, so dass die Ergänzung von Zytologie, FISH und DNA-Zytometrie durch einen alltagstauglichen diagnostischen Test, basierend auf der Untersuchung aberranter Methylierungen von Genpromotoren, durchaus erstrebenswert ist. Allerdings bleibt die Methodik aufwendig und somit vermutlich auch in Zukunft ausgewählten Fällen vorbehalten.

## 5. Zusammenfassung

Die Promotor-Hypermethylierung ist ein wichtiger Mechanismus in der funktionellen Gen-Ausschaltung und bietet daher einen vielversprechenden Ausgangspunkt zur Entwicklung von molekularen Biomarkern. Ziel dieser Arbeit war, aberrante Promotormethylierung des *APC*-Gens (adenomatous polyposis coli) in Bezug auf Prävalenz und quantitativen Methylierungsgrad in Bronchialaspiraten von Patienten mit Tumorverdacht zu bestimmen.

Der Nachweis der *APC*-Promotormethylierung erfolgte an DNA aus Bronchialaspiraten nach Bisulfitkonversion mittels quantitativer methylierungsspezifischer real-time PCR (QMSP). Es wurden in einer retrospektiven Fall-Kontrollstudie unter Verwendung der QMSP sowohl 155 Bronchialaspirate von Patienten mit nicht-kleinzelligem (NSCLC) bzw. kleinzelligem Karzinom der Lunge als auch 67 Bronchialaspirate von Nichttumorpatienten untersucht. Die quantitative methylierungsspezifische PCR (QMSP) erlaubt den sensitiven und spezifischen Nachweis von Promotormethylierung und bietet die Möglichkeit, durch Hinzunahme eines Referenzgens, hier *MYOD1* (myogenic differentiation 1), den Methylierungsnachweis zu quantifizieren und somit einen Schwellenwert (*Cut off*) einzuführen, der eine bessere Diskriminierung zwischen benigner und maligner Lungenerkrankung gestattet. Eine aberrante Promotormethylierung von *APC* - vor Beginn der Fall-Kontroll-Studie zunächst definiert als Überschreiten eines Schwellenwertes ( $APC/MYOD1 \times 100$ ) von 5,- wurde insgesamt bei 71% der Bronchialaspirate von NSCLC Patienten, 38% von SCLC Patienten und 42% der Nicht-Tumorpatienten gefunden. Die Spezifität war mit 58% nicht geeignet, *APC*-Methylierung als Biomarker in der Lungenkarzinomdiagnostik zu verwenden. Nach Einführung eines Schwellenwertes bei einem Methylierungslevel  $\geq 35$  verblieb nur noch das Bronchialaspirat eines Nichttumorpatienten, welches eine hohe Methylierung des *APC*-Promotors aufwies (Spezifität 98,5%). 45 der 155 Bronchialaspirate von Tumorpatienten zeigten eine hohe Methylierung des *APC*-Promotors (Sensitivität 29%). Die Prävalenz aberranter *APC*-Promotormethylierungen in Bronchialaspiraten der Kontrollgruppe macht deutlich, dass *APC* für einen Tumornachweis eine sehr hohe Spezifität zeigt und daher, aufgrund der nicht ganz optimalen Sensitivität vorzugsweise in Kombination mit anderen Biomarkern als Tumormarker zur molekularbiologischen Diagnostik von Lungentumoren gut geeignet ist.

## 6. Literaturübersicht

1. Ahuja N, Issa JP: Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol* 2000; 15: 835-842
2. Alberg AJ, Ford JG, Sarnet JM: Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132: 29–55
3. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2008*. Atlanta, Georgia: American Cancer Society; 2008
4. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland (Hrsg.) (2004): *Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe*. Saarbrücken, 2004
5. Auffermann W, Böcking A: Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA-image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1985; 7: 218-226
6. Ayoub J, Jean-Francois R, Cormier Y, Meyer D, Ying Y, Major P, Desjardins C, Bradley WE: Placebo-controlled trial of 13-cis-retinoic acid activity on retinoic acid receptor-beta expression in a population at high risk: implications for chemoprevention of lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3546-3552
7. Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, Wong DJ, Galipeau PC, Paulson TG, Rabinovitch PS, Reid BJ: Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nat Genet* 1999; 22: 106-109
8. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP: Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998; 72: 141-196
9. Baylin SB, Herman JG: DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000; 16: 168-174
10. Baylin SB, Jones PA: A decade of exploring the cancer epigenome: biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 726–734
11. Beaulieu M, Marik PE: Bedside ultrasonography in the ICU. Part 2. *Chest* 2009; 128: 1766–1781
12. Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa JP: Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 4045-4050
13. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomano G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG: Aberrant methylation of p16 is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 249-255
14. Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, Crooks LA, Divine KK, Winters SA, Grimes MJ, Harms HJ, Tellez CS, Smith TM, Moots PP, Lechner JF, Stidley CA, Crowell RE:

Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res* 2002; 62(8): 2370-2377

15. Böcking A: Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathologie* (1998); 19: 253-258
16. Böcking A, Biesterfeld S, Chatelain R, Gien-Gerlach G, Esser E: Diagnosis of bronchial carcinoma on paraffin-embedded sections of sputum: sensitivity and specificity of an alternative to routine cytology. *Acta Cytol* 1992; 36: 37-47
17. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, Sheer D, Solomon E, Spurr NK: Localization of the gene familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987; 328: 614-616
18. Brabender J, Usadel H, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Wickramasinghe K, Lum CE, Park J, Salonga D, Singer J, Sidransky D, Holscher AH, Meltzer SJ, Danenberg PV: Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. *Oncogene* 2001; 20: 3528-3532
19. Brennan P, Buffler PA, Reynolds P, Wu AH, Wichmann HE, Agudo A, Pershagen G, Jockel KH, Benhamou S, Greenberg RS, Merletti F, Winck C, Fonham ET, Kreuzer M, DDarby SC, Forastiere F, Simonato L, Boffetta P: Secondhand smoke exposure in adulthood and risk of lung cancer among never smokers: a pooled analysis of two large studies. *Int J Cancer* 2004; 109: 125-131
20. Brock MV, Hooker CM, Ota E, Han Y, Guo M, Ames S, Glöckner S, Piantadosi S, Gabrielson E, Pridham G, Pelosky K, Belinsky SA, Yang SC, Baylin SB, Herman JG: DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1118-1128
21. Bubendorf L, Müller P, Joos L, Grilli B, Vogel S, Herzog M, Barascud A, Feichter G, Dalquen P, Tamm M: Multitarget FISH analysis in the diagnosis of lung cancer. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123: 516-523
22. Carbone PP, Frost JK, Feinstein AR: Lung cancer: perspectives and prospects. *Ann Intern Med* 2004; 73: 1003-1024
23. Carey FA, Gray E, O'Mahony M, Craig SR, Salto-Tellez M, Lamb D: A comparison of flow and image DNA cytometry in prediction of patient prognosis in surgically resected small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol.* 1996; 12: 137-143.
24. Chen JT, Chen YC, Wang YC, Tseng RC, Chen CY, Wang YC: Alterations of the p16(ink4a) gene in resected nonsmall cell lung tumors and exfoliated cells within sputum. *Int J Cancer* 2002; 98(5): 724-731
25. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP: Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-31

26. De Carvalho DD, Sharma S, You JS, Su SF, Taberlay PC, Kelly TK, Yang X, Liang G, Jones PA: DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer Cell* 2012; 21(5): 655-67
27. Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ): Passivrauchen - ein unterschätztes Gesundheitsrisiko. In: Deutsches Krebsforschungszentrum, Hrsg. Rote Reihe Tabakprävention und Tabakkontrolle, Band 5, Heidelberg: 2007
28. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW: MethyLight: A high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: E32
29. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research* 2001; 61(8): 3225-3229
30. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *New Eng J Med* 2000b; 343: 1350-1354
31. Esteller M, Sparks A, Toyotam M, Sanchez-Cespedes M, Capellam G, Peinado M, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG: Analysis of Adenomatous Polyposis Coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4366-4371
32. Esteller M: Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8(4): 286-98
33. Esteller M: Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148–1159
34. European Network of Cancer Registries: Cancer fact sheets, Vol 1, 2002
35. Evans AL, Gleeson FV: Radiology in pleural disease: state of the art. *Respirology* 2004; 9: 300–312
36. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF: The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7): 721-33
37. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E: Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46, 765-781
38. Förster T: Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann Phys* 1948; 2: 55–75
39. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89, 1827-1831
40. GEKID (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut.: Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken: GEKID, 2006

41. Ginno PA, Lott PL, Christensen HC, Korf I, Chédin F: R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Mol Cell* 2012; 45(6): 814-25
42. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lübke AS, Reinhold T, Späth-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeböller H, Böcking A, Bohle RM, Brüske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gütz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heussel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hübner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Müller KM, Müller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rube C, Schmittel A, Schönfeld N, Schütte W, Serke M, Stamatis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie* 2010; 64 (Suppl 2): e1-e164
43. Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, Rohr UP, Kappes R, Gabbert HE, Böcking A: Aberrant promoter methylation of p16INK4a, RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int J Cancer* 2005; 116: 720-725
44. Grote HJ, Schmiemann V, Sarbia M, Böcking A: DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: Which method to take? *Anal Cell Pathol* 2003a; 25: 83-88
45. Halling KC, Rickman OB, Kipp BR, Harwood AR, Doerr CH, Jett JR: A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of lung cancer in bronchoscopic specimens. *Chest* 2006; 130: 694-701
46. Hanahan D, Weinberg RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
47. Hanson CA, Miller JR: Non-traditional roles for the Adenomatous Polyposis Coli (APC) tumor suppressor protein. *Gene* 2005; 361: 1-12
48. Harden SV, Tokumaru Y, Westra WH, Goodman S, Ahrendt SV, Yang SC, Sidransky D: Gene promoter hypermethylation in tumor and lymph nodes of stage I lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1370-1375
49. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281(5382): 1509-12
50. Hecht SS: Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1194–1210
51. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SC: Molecular Origins of Cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1367-1380

52. Herman JG, Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042–2054
53. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG-islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826
54. Hoffmann H, Dienemann H: Der pulmonale Rundherd. *Prinzipien der Diagnostik. Deutsches Ärzteblatt* 2000; 97: 907-912
55. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88: 7276-7280
56. Honeybourne D, Babb J, Bowie P, Brewin A, Fraise A, Garrard C, Harvey J, Lewis R, Neumann C, Wathen CG, Williams T: British Thoracic Society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy. *Thorax* 2001; 56: i1–i21
57. Honorio S, Agathangelou A, Schuermann M, Pankow W, Viacava P, Maher ER, Latif F: Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast patients. *Oncogene* 2003; 22: 147-150
58. Horii A, Nakatsuru S, Ichii S, Nagase H, Nakamura Y: Multiple forms of the *APC* gene transcript and their tissue-specific expression. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 283-287
59. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2009
60. Hubers AJ, Heideman AM, Herder JM, Burgers SA, Sterk PJ, Kunst PW, Smit HJ, Postmus PE, Witte BI, Duin S, Snijders PJF, Smit EF, Thunnissen E: Prolonged sampling of spontaneous sputum improves sensitivity of hypermethylation analysis for lung cancer, *J Clin Pathol* 2012; 65: 541-545
61. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA: Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001; 61: 3573-3577
62. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Samuels A, Wand E, Feuer EJ, Thun MJ: Cancer statistics, *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8–29
63. Jenuwein T, Allis E: Translating the histone code. *Science* 2001; 293(5532): 1074-80
64. Johnsey L, Leef JL, Klein JS: The solitary pulmonary nodule. *Radiologic Clinics of North America* 2002; 40: 123-143
65. Jones PA, Baylin SB: The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683–692
66. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, Lee B, Tsai S, Delgado IE, Rudek MA, Belinsky SA, Herman JG,

Baylin SB, Brock MV, Rudin CM: Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non small cell lung cancer. *Cancer Discovery* 2011; 1: 598-607

67. Kalender WA, Kachelriess M, Ulzheimer S: Subsecond multislice spiral CT as an alternative to electron beam computerized tomography. *Z Kardiol* 2000; 89 (Suppl 1): 50-54
68. Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, Yin J, Fleisher AS, Abraham JM, Beer DG, Sidransky D, Huss HT, Demeester TR, Eads C, Laird PW, Ilson DH, Kelsen DP, Harpole D, Moore MB, Danenberg KD, Danenberg PV, Meltzer SJ: Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 2000; 92: 1805-1811
69. Kettunen E, Salmenkivi K, Vuopala K, Toljamo T, Kuosma E, Norppa H, Kaleva S, Huuskonen MS, Anttila S: Copy number gains on 5p15, 6p11-q11, 7p12, and 8q24 are rare in sputum cells of individuals at high risk of lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 54: 169-176
70. Knippers R: Epigenetik, Inaktivierung von X-Chromosomen und genomische Prägung. In: *Molekulare Genetik*, 531-550, Thieme, Stuttgart New York (2006)
71. Knudson AG: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68: 820-823
72. Konietzko N, Fabel H. (Hrsg.): *Weißbuch Lunge*. Thieme, Stuttgart New York (2000).
73. Kotschy-Lang N: Beruflich verursachte Lungentumoren. *Trauma Berufskrankh.* 2001; 3: 111-115
74. Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R: Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995; 81(2): 197-205
75. Lakowicz JR, Gryczynski I, Cheung HC, Wang C, Johnson CL: Distance distributions in native and random-coil troponin I from frequency-domain measurements of fluorescence energy transfer. *Biopolymers* 1988; 27, 821-830
76. Lambertz S, Ballhausen WG: Identification of an alternative 5' untranslated region of the adenomatous polyposis coli gene. *Hum Genet* 1993; 90: 650-652
77. Licchesi JD, Westra WH, Hooker CM, Machida EO, Baylin SB, Herman JG: Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung. *Carcinogenesis* 2008; 29(5): 895-904
78. Maounis NF, Chorti M, Apostolakis E, Ellina E, Blana A, Aggelidou M, Markidou S: Prognostic impact of Deoxyribonucleic acid (DNA) image analysis cytometry and immunohistochemical expression of Ki67 in surgically resected non-small cell lung cancers. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 507-514

79. Mass MJ, Wang L: Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 386:263-277
80. Mayo PH, Doelken P: Pleural ultrasonography. *Clin Chest Med* 2006; 27: 215–227
81. Momparler RL: Cancer epigenetics. *Oncogene*. 2003; 22: 6479-6483
82. National Institute for Clinical Excellence (NICE), National Collaborating Centre for Acute Care. *Diagnosis and treatment of lung cancer*. London, 2005
83. Neubauer S, Welte R, Beiche A, König HH, Büsch K, Leidl R: Mortality, morbidity and costs attributable to smoking in Germany: update and a 10-year comparison. *Tob Control* 2006; 15: 464-471
84. Nikolaidis G, Raji OY, Markopoulou S, Gosney JR, Bryan J, Warburton C, Walshaw M, Sheard J, Field JK, Liloglou T: DNA methylation biomarkers offer improved diagnostic efficiency in lung cancer. *Cancer Res* 2012; 72: 5692-5701
85. Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Boland CR, Goel A: Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47(3): 908-18
86. Ohgaki H, Kros JM, Okamoto Y, Gaspert A, Huang H, Kurrer MO: APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. *Cancer Lett* 2004; 207(2): 197-203
87. Ono J, Auer G: The significance of DNA measurements for the early detection of bronchial cell atypia. *Cytometry*. 1983; 3: 340-344
88. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA: Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000; 60: 5954-5958
89. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS: Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37: 4-66
90. Pekarsky Y, Garrison PN, Palamarchuk A, Zanesi N, Aqeilan RI, Huebner K, Barnes LD, Croce CM: Fhit is a physiological target of the protein kinase Src. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(11): 3775-3779
91. Pesek M, Kopeckova M, Benesova L, Meszarosova A, Mukensnabl P, Bruha F, Minarik M: Clinical significance of hypermethylation status in NSCLC: Evaluation of a 30-gene panel in patients with advanced disease. *Anticancer Res* 2011; 31: 4647-4652
92. Petersen I, Kotb WF, Friedrich KH, Schlüns K, Böcking A, Dietel M: Core classification of lung cancer: correlating nuclear size and mitoses with ploidy and clinicopathological parameters. *Lung Cancer* 2009; 65: 312-318

93. Plass C, Pfister SM, Lindroth AM, Bogatyrova O, Claus R, Lichter P: Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat Rev Genet* 2013; 14(11): 765-780
94. Popp W, Brüning Th, Straif K: Krebserkrankungen durch den Beruf. *Dt Ärztebl* 2003; 100: A 35-40
95. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler W: *APC* mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-237
96. Prokhortchouk A, Sansom O, Selfridge J, Caballero IM, Salozhin S, Aithozhina D, Cerchietti L, Meng FG, Augenlicht LH, Mariadason JM, Hendrich B, Melnick A, Prokhortchouk E, Clarke A, Bird A: Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol Cell Biol* 2006; 26(1): 199-208
97. Raab W, Stegbauer M: Tabakrauch am Arbeitsplatz. *Trauma Berufskrankh* 2004; 6: 144-146
98. Radon K, Nowak D: Passivrauchen - aktueller Stand des Wissens. *Dt Med Wochenschr* 2004; 129: 157-162
99. Robertson KD, Jones PA: DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21: 461-467
100. Sambrook J, Russel DW: *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2001
101. Sansom OJ, Berger J, Bishop SM, Hendrich B, Bird A, Clarke AR: Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis: *Nat Genet* 2003; 34(2): 145-7
102. Savic S, Glatz K, Schoenegg R, Spieler P, Feichter G, Tamm M, Bubendorf L: Multitarget fluorescence in situ hybridisation elucidates equivocal lung cytology. *Chest* 2006; 129: 1629-1635.
103. Schmiemann V, Böcking A, Kazimirek M, Onofre AS, Gabbert HE, Kappes R, Gerharz CD, Grote HJ: Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7728-7734
104. Schramm M, Wrobel C, Born, I Kazimirek M, Pomjanski N, William M, Kappes R, Gerharz CD, Biesterfeld S, Böcking A: Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: Improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolour FISH, DNA image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis. *Cancer (Cytopathology)* 2011; 119: 177-192
105. Schreiber G, McCrory DC: Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. *Chest* 123 Suppl. 2003; 1: 115S-128S

106. Shea J, Lillington GA: Preoperative staging of lung cancer. *The Western Journal of Medicine* 1994; 161: 508-509
107. Shen H, Laird PW: Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 2013; 153(1): 38-55
108. Shivapurkar N, Stastny V, Suzuki M, Wistuba II, Li L, Zheng Y, Feng Z, Hol B, Prinsen C, Thunnissen FB, Gazdar AF: Application of a methylation gene panel by quantitative PCR for lung cancers. *Cancer Lett* 2007; 247(1): 56-71
109. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A: The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(10): 5522-5527
110. Simonato L, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Boffetta P, Brennan P: Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of intercountry heterogeneity. *Int J Cancer* 2001; 91: 876–887
111. Smith SS: Stalling of DNA methyltransferase in chromosome stability and chromosome remodelling. *Int J Mol Med*. 1998; 1:147-156
112. Sokolova IA, Bubendorf L, O'Hare A, Legator MS, Jacobson KK, Grilli BSB, Dalquen P, Halling KC, Tamm M, Seelig SA, Morrison: A fluorescence in situ hybridization-based assay for improved detection of lung cancer cells in bronchial washing specimens. *Cancer (Cancer Cytopathol)*. 2002; 96: 306-315
113. Soria JC, Rodriguez M, Liu DD, Lee JJ, Hong WK, Mao L: Aberrant promoter methylation of multiple genes in bronchial brush samples from former cigarette smokers. *Cancer Res*. 2002; 62: 351-355
114. Spiro SG, Gould MK, Colice GL: Initial evaluation of the patient with lung cancer: Symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *ACCP Evidenced-Based Clinical Practice Guidelines*. *Chest* 2007; 132: 149S–160S
115. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 2002; 161: 1961-1971
116. Statistisches Bundesamt (ZwSt Bonn): Todesursachenstatistik. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, 2003
117. Statistisches Bundesamt: *Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland 2009*. Wiesbaden, SFG Servicecenter Fachverlage Reutlingen, 2009
118. Stayner L, Bena J, Sasco AJ, Smith R, Steenland K, Kreuzer M, Straif K: Lung cancer risk and workplace exposure to environmental tobacco smoke. *Am J Public Health* 2007; 97: 545-551
119. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M: DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol Oncol* 2012; 6(6): 567-78

120. Swensen SJ, Viggiano RW, Midthun, Müller NL, Sherrick A, Yamashita K, Naidich DP, Patz EF, Hartmann TE, Muhm JR, Weaver AI: Lung nodule enhancement at CT: multicenter study. *Radiology* 2000; 214: 73–80
121. Tetzner R: Entwicklung von Realtime- PCR-Methoden zur Analyse von DNA-Methylierung. Dissertationsschrift, Universität des Saarlandes, 2006
122. Thliveris A: Long-range physical map and deletion characterization of the 1100-kb NotI restriction fragment harboring the *APC* gene. *Genomics* 1996; 34: 268-270
123. Toloza EM, Harpole L, Detterbeck F, McCrory DC: Non-Invasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest* 2003; 123:137S–146S
124. Toomes H, Depphendal A, Manke HG, Vogt-Moykopf I: Der solitäre Lungenrundherd-Differentialdiagnose und Beurteilung. *Deutsches Ärzteblatt* 1981; 78: 1717-1722
125. Topaloglu O, Obaidul H, Tokumaru Y, Lee J, Ratovitski E, Sidransky D, Mool CS: Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2284-2288
126. Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, McLarren D, Feng Z, Fukuyama Y, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Tsukuda K, Sugio K, Shimizu M, Shimizu K: Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 103: 153-160
127. Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, Virmani AK, Girard L, Miyajima K, Harada K, Ariyoshi Y, Takahashi T, Sugio K, Brambilla E, Gilcrease M, Minna JD, Gazdar AF: DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther* 2001; 1(1): 61-67
128. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, 2004
129. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E: Histological typing of lung and pleural tumours. Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, 3. Auflage, 1999
130. Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, Endoh Y, Sakata K, Jin Z, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Wilson KT, James SP, Yin J, Fleisher AS, Zou T, Silverberg SG, Kong D, Meltzer SJ: Distinct methylation patterns of two *APC* gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene* 2000; 19: 3642-3646
131. Tumorzentrum München. Tumoren der Lunge und des Mediastinums. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. W. Zuckschwerdt Verlag München, 5. überarbeitete Auflage 2000
132. Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jerónimo C, Harden S, Engles J, Danenberg PV, Yang S, Sidransky D: Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 371-375

133. Varella-Garcia M, Kittelson J, Schulte AP, Vu KO, Wolf HJ, Zeng C, Hirsch FR, Byers T, Kennedy T, Miller YE, Keith RL, Franklin WA: Multi-target interphase fluorescence in situ hybridization assay increases sensitivity of sputum cytology as a predictor of lung cancer. *Cancer Detect Prev.* 2004; 28: 244-251
134. Varella-Garcia M, Schulte AP, Wolf HJ, Feser WJ, Zeng C, Braudrick S, Yin X, Hirsch FR, Kennedy TC, Keith RL, Baron AE, Belinsky SA, Miller YE, Byers T, Franklin WA: The detection of chromosomal aneusomy by fluorescence in situ hybridization in sputum predicts lung cancer incidence. *Cancer Prev Res.* 2010; 3: 447-453
135. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R: Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 99–106
136. Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, Padar A, Huang CX, Cunningham T, Farinas AJ, Milchgrub S, Euhus DM, Gilcrease M, Herman J, Minna JD: Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1 A in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1998-2004
137. Virmani AK, Rathi A, Zöchbauer-Müller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D, Maitra A, Heda S, Fong KM, Thunnissen F, Minna JD, Gazdar AF: Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 1303-1307
138. Virmani AK, Tsou JA, Siegmund KD, Shen LYC, Long TI, Laird PW, Gazdar AF, Laird Offringa IA: Hierarchical clustering of lung cancer cell lines using DNA methylation markers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 291-297
139. Voss JS, Kipp BR, Halling KC, Henry MR, Jett JR, Clayton AC, Rickman OB: Fluorescence in situ hybridization testing algorithm improves lung cancer detection in bronchial brushing specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 478-485
140. Wahidi MM, Ernst A: Role of the interventional pulmonologist in the intensive care unit. *J Intensive Care Med* 2005; 20: 141–146
141. Waki T, Tamura G, Sato M, Motoyama T: Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene* 2003; 22: 4128-4133
142. Williams K, Christensen J, Helin K: DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep* 2011; 13(1): 28-35
143. Wong MH, Hermiston ML, Syder AJ, Gordon JI: Forced expression of the tumor suppressor adenomatous polyposis coli protein induces disordered cell migration in the intestinal epithelium. *Cell Biology* 1996; 93: 9588-9593
144. Xu XC, Lee JS, Lee JJ, Morice RC, Liu X, Lippman SM, Hong WK, Lotan R: Nuclear retinoid acid receptor beta in brochial epithelium of smokers before and during chemoprevention. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 1317-1321

145. Xu XC, Sozzi G, Lee JS, Lee JJ, Pastorino U, Pilotti S, Kurie JM, Hong WK, Lotan R: Suppression of retinoic acid receptor beta in non-smallcell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 624-629
146. Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, Motoyama T Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 589-592
147. Youssef EM, Estecio MR, Issa JP: Methylation and Regulation of Expression of Different Retinoic Acid Receptor Beta Isoforms in Human Colon Cancer. *Cancer Biol Ther.* 2004; 3: 82-86
148. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD: 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3581-3585
149. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD: Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001b; 61: 249-255
150. Zöchbauer-Müller S, Lam S, Toyooka S, Virmani AK, Toyooka KO, Seidl S, Minna JD, Gazdar AF: Aberrant methylation of multiple genes in the upper aerodigestive tract epithelium of heavy smokers. *Int J Cancer* 2003; 107: 612-616
151. Zöchbauer-Müller S, Minna JD, Gazdar AF: Aberrant methylation in lung cancer: biological and clinical implications. *Oncologist* 2002; 7: 451-457

## Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
3OST2	Heparansulfat 3-O-Sulfotransferase
A	Adenin
AC	Adenokarzinom
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
ARMS	System der amplifizierungsresistenten Mutation
ATTC	<i>American Type Cell Culture</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
C	Cytosin
CDH1	E-Cadherin
CDH13	T-Cadherin
cdx-2	hier: Immunmarker zur Erkennung enterozytärer Differenzierung
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-Phosphodiesterbindung-Guanin (Dinukleotid)
CRBP	Zytoplasmatisch Retinolbindendes Protein
cSCLC	kombiniertes kleinzelliges Karzinom
CT	Computertomographie
CYGB	Cytoglobin
d.V.	dringender Verdacht
DAC	5-aza-2'-Deoxyzytidin
DAPK	<i>Death-associated</i> Proteinkinase
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EML4-ALK	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 - anaplastic lymphoma kinase</i>
ER	Östrogenrezeptor

EtOH	Ethanol
f.-neg.	fälsch-negativ
Fa.	Firma
FCS	Fetales Kälber Serum („ <i>fetal calf serum</i> “)
FHIT	<i>fragile histidin triad</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
g	Maß für die Erdbeschleunigung (bei der Zentrifugation)
G	Guanin
GSTP1	Glutathion S-Transferase P
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
IARC	<i>International Agency for Research in Cancer</i>
ICD-10	<i>International Classification of Diseases</i> , 10. Auflage
LIFE	Autofluoreszenz-Bronchoskopie
LOH	Heterozygotieverlust („ <i>Loss of heterozygosity</i> “)
MBD	5-Methylcytosin bindendes Protein
MdB	Methyl-Bindungsdomänen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
miRNA	Mikro-RNA
MSP	Methylierungs-spezifische PCR
MYOD1	<i>Myogenic Differentiation Antigen 1</i>
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NSCLC	Nicht-Kleinzelliges Karzinom
NT	Nicht-Tumorpatient
OD	Optische Dichte
p.A.	pro Analyse
p16	= CDK2, Cyclin abhängiger Kinaseinhibitor 2A („ <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> “)
PBS	Phosphatpuffer („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie

pH	pH-Wert
PR	Progesteronrezeptor
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
QMSP	Quantitative Methylierungs-spezifische PCR
r.-neg.	richtig-negativ
RAR $\beta$ 2	<i>retinoic acid receptor <math>\beta</math>-2</i>
RASSF1A	<i>RAS Association Domain Family Protein 1</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
rpm	<i>rounds per minute</i>
SAH	S-Adenosylhomocystin
SAM	S-Adenosylmethionin
SCC	Plattenepithelkarzinom
SCLC	Kleinzelliges Karzinom
SD	Standardabweichung
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i>
T	Thymin
TBB	Transbronchiale Biopsie
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TERT	Telomerase reverse Transcriptase
TIMP-3	Gewebsinhibitor für Metalloproteinase 3 ( <i>“tissue inhibitor of metalloproteinases-3“</i> )
Tris	Tris-(Hydroxymethyl) Aminomethan
TTF-1	<i>Thyroid transcription factor 1</i>
Tu	Tumorpatienten
Tu+	Bronchialaspirat mit wenigen Tumorzellen
Tu++	Bronchialaspirat mit zahlreichen Tumorzellen
WHO	Weltgesundheitsorganisation („ <i>World Health Organization</i> “)
WT1	Wilms-Tumor-Protein 1
XC	Xylencyanol

Im Text verwendete SI-Einheiten (bzw. Vielfache von ihnen) wie beispielsweise  $\mu\text{m}$ , pg oder mM (Mikrometer, Picogramm, Millimol) sind im Abkürzungsverzeichnis nicht aufgelöst.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt. Ich möchte an dieser Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. S. Biesterfeld ganz herzlich für seine sehr freundliche und motivierende Betreuung in den letzten Jahren danken. Er hat immer Zeit und Geduld mit mir gehabt und hat einen entscheidenden Beitrag dazu getragen, dass ich diese Arbeit fertig stellen konnte.

Ganz besonderen Dank gebührt meinen Eltern, und insbesondere meiner Mutter, Suraiya Mostakim, die trotz ihrer eigenen schweren Erkrankung der letzten Jahre immer für mich da war. Sie hat sich mich stets motiviert und durch die Betreuung meiner Tochter mir den zeitlichen Rahmen ermöglicht, diese Arbeit zu Ende zuschreiben. Leider konnte sie es selber nicht mehr miterleben, daher möchte ich ihr und meinem Vater, Mohammad Faruk Mostakim, der leider auch zu früh von uns gegangen ist, diese Arbeit widmen und mich auf diese Weise für alles, was sie mir und meinen Geschwistern ermöglicht haben, bedanken. Zu Dank bin ich auch meinen Geschwistern gegenüber verpflichtet, die mich als alleinerziehende Mutter in jeder Lebenslage unterstützt und motiviert haben. Auch bei meiner Tochter Anisa Hawa möchte ich mich bedanken, denn sie hat mir mit ihrem fröhlichen Wesen viel Kraft und Freude im Leben wiedergegeben.

Zum Schluss möchte ich mich bei IHM, dem EINZIGEN, unserem Schöpfer ALLAH bedanken. ER gibt mir die Kraft, das Leben trotz aller Hindernisse und Hürden von der positiven Seite her zu betrachten und ist mein ständiger Begleiter und Motivator. IHM gehört alles Dank und Lob.

ALLHAMDULILAH

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Ariana Mostakiem  
Geburtstag: 05.10.1979  
Geburtstort: Kabul / Afghanistan  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Kind: Anisa Hawa Jebran (\* 2008)

## Schulischer Werdegang:

1987-1990 Grundschole Brückenstr, Duisburg  
1990-1999 Mercator-Gymnasium, Duisburg (Abitur)

## Studium:

1999-2005 Zahnmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
9/ 2000 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
4/ 2002 Zahnärztliche Vorprüfung  
5/ 2005 Zahnärztliche Prüfung

## Berufliche Tätigkeit:

2005-2008 Assistenz Zahnärztin in Geldern, Praxis Dr. Krappen  
Seit 2008 Angestellte Zahnärztin in Duisburg, Praxis am  
Landschaftspark

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medi-zinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

---

Datum

Ariana Mostakiem