

Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich Cytopathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Funktionsbereich Cytopathologie

Leitung: Dr. med. Martin Schramm und Dr. med. Natalia Pomjanski (FIAC)

**Bestimmung von Promotorhypermethylierungen der Gene
APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A und 3-OST-2
mittels Quantitativer Methylierungsspezifischer PCR in der
adjuvanten zytologischen Diagnostik maligner Lungentumoren.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christian Wrobel
(2016)

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

gez.:

Dekan:	Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Erstgutachter:	Prof. Dr. med. Alfred Böcking
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

M. Schramm, C. Wrobel, I. Born, M. Kazimirek, N. Pomjanski, M. William, R. Kappes, C. D. Gerharz, S. Biesterfeld, and A. Böcking, "Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis," *Cancer Cytopathol*, vol. 119, no. 3, pp. 177–192, Jun. 2011.

Zusammenfassung

Maligne Lungentumoren zeigen seit Jahren weltweit die höchste Inzidenz und Mortalität unter allen Krebserkrankungen. Die Erstdiagnose wird meist in einem bereits nicht mehr lokalen und damit späten Stadium gestellt. Auch die bisher gebräuchlichen diagnostischen Methoden (bronchoskopisch gewonnene Spülung, Bürstenbiopsie, transbronchiale Nadelaspirationsbiopsie oder Zangenbiopsie) haben eine steigerungsfähige Sensitivität (48 – 74 %) oder sind in größerem Maße invasiv (transthorakale Biopsie). Molekulare Biomarker können an bereits gewonnenem Material vielversprechend zur Frühdiagnose von Lungenkarzinomen beitragen. Die Hypermethylierung von Genpromotoren stellt einen wichtigen epigenetischen Mechanismus zur Unterdrückung der Expression von Tumorsuppressorgenen dar und trägt damit zur Kanzerogenese des Lungenkarzinoms bei.

Gegenstand dieser Arbeit war die Analyse von Promotormethylierungen der Tumorsuppressorgene APC, p16^{INK4A}, RASSF1A und 3-OST-2 mittels Quantitativer Methylierungsspezifischer *real-time* PCR (QMSP) mit dem Ziel der Etablierung eines Biomarkerpanels mit hoher Sensitivität und Spezifität zur frühen Detektion maligner Lungentumoren an wenig invasiv gewonnenem Material (Bronchialaspirate). Methylierungen im Genom finden sich an Cytosinbasen, welche wiederum gehäuft in Promotorregionen als CpG-Nukleotide vorliegen. Eine Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit (Bisulfitkonversion) führt zu einer Desaminierung von Cytosin zu Uracil, methyliertes Cytosin bleibt dabei unbeeinflusst. Dies bedingt eine Sequenzänderung der DNA und ermöglicht durch das Design spezifischer Primer eine Methylierungsspezifische PCR (MSP). Eine fluoreszierende Gensonde, platziert zwischen den beiden Primern, ermöglicht durch Messung der Fluoreszenzänderung während der PCR einen quantitativen Nachweis.

Es wurden 210 Patienten (70 je zytologischer Diagnosegruppe: *Positiv*, *negativ* und *unklar* bezüglich des Nachweises maligner Tumorzellen) in einer klinischen Diagnosestudie mit prospektivem Einschluss und verblindeter, retrospektiver Evaluation untersucht. 178 Bronchialaspirate von 178 Patienten (108 Patienten mit primärem malignen Lungentumor, 9 Patienten mit Tumor anderer Genese, 61 Nicht-Tumorpatienten) konnten mittels QMSP ausgewertet werden. Das 3-Marker-Genpanel aus APC, p16^{INK4A} und RASSF1A erreichte eine Sensitivität von 51 % (55/108) und zeigte sich mit 98 % (60/61) hoch spezifisch in der Detektion maligner Lungentumoren. Als alleiniger diagnostischer Test wäre die Sensitivität des Panels nicht ausreichend, es bietet sich aber als anschließender Test nach zytologischer Diagnostik (Reflextest) an. Die Kombination von Routinezytologie und QMSP erreichte eine Sensitivität von 71 % (77/108) in der Detektion maligner Lungentumoren bei extrem hoher, 98 %iger Spezifität (60/61). V. a. in der Gruppe der *unklaren* zytologischen Diagnosen zeigte die QMSP (51 % Sensitivität, 18/35) ihren Mehrwert. An dieser Stelle wäre eine Anwendung in der klinischen Routinediagnostik gut möglich. Diese Ergebnisse bestätigten frühere, retrospektive Studien zur Etablierung des 3-Marker-Genpanels dieses Instituts.

Die Sensitivität des Genpanels sollte durch die Erweiterung um den Marker 3-OST-2 gesteigert werden, welcher sich zuvor in der Literatur als vielversprechend darstellte. Die Analyse des 3-OST-2-Promotors mittels QMSP zeigte auch unter den Nicht-Tumorpatienten eine Hypermethylierung in 58 von 61 Fällen, womit die Definition eines *cut-off*-Levels nötig war. Unter Wahrung einer akzeptablen Spezifität von 95 % (58/61) zeigte der 3-OST-2-Genmarker eine Sensitivität von 16 % (17/108) hinsichtlich der Detektion maligner Lungentumoren. Die vielversprechenden Erwartungen der Literatur hinsichtlich 3-OST-2 konnten in dieser Studie also nicht bestätigt werden. Die Erweiterung des Genpanels um 3-OST-2 steigerte dessen Sensitivität von 51 % auf 56 % (61/108), dies jedoch auf Kosten der Spezifität (Senkung auf 95 %, 58/61), was als Folge mehr falsch positive Diagnosen bedeuten würde. Nach Einschätzung dieser Arbeit eignet sich die Hypermethylierungsanalyse des 3-OST-2-Promotors mittels QMSP und dem hier verwandten Primer-Sonden-Set somit nicht zur Erweiterung des etablierten 3-Marker-Genpanels zur Detektion maligner Lungentumoren.

Abkürzungen / Einheiten

° C	Grad Celsius	HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
3-OST-2	3-O-Sulfotransferase-2	HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
AC	Adenokarzinom (<i>adenocarcinoma</i>)	HOXA9	<i>homeobox A9</i>
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>	KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>	LINE	<i>long interspersed nuclear element</i>
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)	LTR	<i>long terminal repeat</i>
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften	m	Meter
BAL	Bronchoalveoläre Lavage	mA	Milliampere
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>	MOAP-1	<i>modulator of apoptosis 1</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>	MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
bp	Basenpaar (DNA)	MBD	<i>methyl-CpG binding domain</i>
bzw.	beziehungsweise	MBP	<i>methyl-CpG binding protein</i>
CDH1	Cadherin-1 (E-Cadherin)	MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
CDH13	Cadherin-13 (H-Cadherin)	mg	Milligramm
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>	MGMT	O6-Methylguanin DNA Methyltransferase
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>	miRNA	<i>micro RNA</i>
CI	Konfidenzintervall (<i>confidence interval</i>)	ml	Milliliter
CMSP	Konventionelle MSP (<i>conventional MSP</i>)	mRNA	<i>messenger RNA</i>
cSCLC	kombiniertes kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>combined small cell lung cancer</i>)	MSP	Methylierungsspezifische PCR (<i>methylation specific PCR</i>)
CT	Computertomographie	MYOD1	<i>myogenic differentiation antigen 1</i>
d. h.	das heißt	NaCl	Natriumchlorid
DAPK	<i>death associated protein kinase</i>	ng	Nanogramm
DNA	Desribonukleinsäure	nm	Nanometer
DNES	diffuses neuroendokrines System	NNK	Nikotin-Nitrosaminketon
DNMT	DNA Methyltransferase	o. g.	oben genannten/r
DOT1L	<i>DOT1-like histone H3K79 methyltransferase</i>	oNSCLC	nicht-subklassifizierbares / nicht- kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>other than non small cell lung cancer</i>)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	p16 ^{Ink4A}	entspricht CDKN2A
EML4	<i>echinoderm microtubule associated protein-like 4</i>	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>	PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>
FAM	<i>6-carboxyfluorescein</i>	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	QMSP	Quantitative MSP (<i>quantitative MSP</i>)
FHIT	<i>fragile histidine triad protein</i>	RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	RARβ2	retinoic acid receptor beta 2
FRET	Fluoreszenz Resonanzenergietransfer	Ras	<i>rat sarcoma protein</i>
g	Gramm	RASSF	<i>ras association domain family</i>
GAG	Glykosaminoglykan	RASSF1A	<i>ras association domain family member 1A</i>
GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase 3β	RB1	Retinoblastomprotein 1
		RNA	Ribonukleinsäure

ROC	<i>receiver operating characteristic</i>	TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR	TERT	Telomerase reverse Transkriptase
RUNX3	<i>runt-related transcription factor 3</i>	TP53	Tumorprotein 53
SCC	Plattenepithelkarzinom (<i>squamous cell cancer</i>)	TUSC2	<i>tumor suppressor candidat 2</i>
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>small cell lung cancer</i>)	u. a.	unter anderem
SEMA3B	Semaphorin-3B	UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
SEMA3F	Semaphorin-3F	V	Volt
SINE	<i>short interspersed nuclear element</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
sog.	sogenannt/e/er	WT1	Wilms Tumor 1 Protein
SOX2	<i>SRY box 2</i>	x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (1 x g =9,80665 m/s ²)
Sp1	<i>specificity protein 1</i>	z. B.	zum Beispiel
SRY	<i>sex determining region of Y</i>	µg	Mikrogramm
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin	µl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie maligner Lungentumoren	1
1.2 Ätiologie maligner Lungentumoren	1
1.3 Histologie und Klassifikation des Lungenkarzinoms	2
1.3.1 Plattenepithelkarzinome	2
1.3.2 Adenokarzinome	3
1.3.3 Großzellige Lungenkarzinome	4
1.3.4 Kleinzellige Lungenkarzinome	5
1.3.5 Karzinoidtumoren	5
1.4 Tumorbiologie und Karzinogenese	6
1.4.1 Ausgewählte Tumorsuppressorgene	6
1.4.2 Ausgewählte Onkogene	7
1.4.3 Tumorstroma	8
1.4.4 Tumorstammzellen	9
1.4.5 Aneuploidie in Tumorzellen	9
1.5 Epigenetik	11
1.5.1 DNA-Methylierung	11
1.5.2 Histonmodifikationen	13
1.5.3 MicroRNAs	14
1.6 Diagnostik maligner Lungentumoren	15
1.6.1 Bildgebende Verfahren	15
1.6.2 Bronchoskopie und pathomorphologische Diagnostik	15
1.6.3 Molekulare Biomarker	17
1.6.3.1 DNA-Hypermethylierung als Biomarker	17
1.6.3.2 DNA-Hypomethylierung als Biomarker	20
1.6.3.3 DNMTs als Biomarker	21
1.7 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Patienten und Materialien	23
2.1 Untersuchungsmaterial	23
2.2 Studiendesign und eigener Anteil	24
2.3 Chemikalien	25
2.4 Enzyme	26
2.5 Lösungen, Puffer und Sonstiges	26
2.6 Molekularbiologische Kits	26
2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
2.8 Nukleinsäuren	28

2.8.1 Oligonukleotide: Primer und Sonden.....	28
2.8.2 DNA	28
3. Methoden	29
3.1 Extraktion von DNA aus nach Saccomanno fixierten Bronchialaspiraten	29
3.2 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung	30
3.3 Bisulfit-Konversion	30
3.4 Quantitative Methylierungsspezifische PCR (QMSP)	33
3.4.1 Theoretische Grundlagen	33
3.4.2 Anwendung in der vorliegenden Studie	35
3.4.3 PCR-Ansatz	36
3.4.4 PCR-Bedingungen.....	37
3.4.5 Auswertung	37
3.5 Qualitätskontrolle der QMSP	39
3.5.1 Gelelektrophorese des PCR-Produkts	39
3.5.2 Sequenzierung des PCR-Produktes.....	40
3.6 Statistische Auswertung	40
4. Ergebnisse	41
4.1 Auswertung und Darstellung des Patientenkollektivs (<i>follow-up</i>).....	41
4.1.1 Mittels QMSP auswertbare Fälle des Patientenkollektivs	43
4.2 Ergebnisse der Zytologischen Diagnostik	46
4.3 Promotorhypermethylierung von APC, p16 ^{Ink4A} und RASSF1A.....	48
4.3.1 Promotorhypermethylierung des APC-Gens.....	49
4.3.2 Promotorhypermethylierung des p16 ^{Ink4A} -Gens.....	51
4.3.3 Promotorhypermethylierung des RASSF1A-Gens	53
4.3.4 Kombination der Promotorhypermethylierung (Genpanel)	57
4.4 Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors.....	64
4.4.1 Ermittlung eines <i>cut-off</i> -Levels.....	64
4.4.2 Anwendung des gewählten <i>cut-off</i> -Levels	66
4.4.3 Erweiterung des QMSP-Panels um den 3-OST-2-Genpromotor	67
5. Diskussion	68
5.1 Quantitative und konventionelle MSP im Vergleich.....	69
5.2 Bedeutung der Verwendung von zytologischem Untersuchungsmaterial.....	71
5.3 Unterschiede der Hypermethylierung bei verschiedenen Tumorentitäten	79
5.3.1 Der APC-Genpromotor	79
5.3.2 Der p16 ^{Ink4A} -Genpromotor	79
5.3.3 Der RASSF1A-Genpromotor	80
5.4 Klinisch-pathologische Korrelation.....	81

5.4.1 Promotorhypermethylierung und Alter	81
5.4.2 Promotorhypermethylierung und Geschlecht	82
5.4.3 Promotorhypermethylierung und Raucherstatus	82
5.4.4 Lokalisation	84
5.4.5 Tumorstadium	85
5.4.6 Differenzierungsgrad	86
5.5 Feldkanzerogenese, Feldeffekt und Promotorhypermethylierung in Vorläuferläsionen	86
5.6 Verwendung des Genpanels als Biomarker in der Lungenkarzinomdiagnostik	88
5.7 QMSP-Hypermethylierungsanalyse zur Verbesserung der zytologischen Diagnostik	90
5.8 Implementierung des 3-OST-2-Genpromotors in das QMSP-Panel	92
6. Schlussfolgerungen.....	95
7. Literaturverzeichnis.....	96
8. Anhang	111

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie maligner Lungentumoren

Maligne Lungentumoren haben seit vielen Jahren weltweit die höchste Inzidenz (23,1/100.000) und Mortalität (19,7/100.000) unter allen Krebserkrankungen. 2012 gab es weltweit 1,82 Millionen Neuerkrankungen (13,0 % aller Krebsneuerkrankungen) und 1,59 Millionen Menschen starben 2012 an einem Malignom der Lunge (19,4 % aller Todesfälle an Krebs) [1].

In Deutschland erkrankten 2010 ca. 52.000 Menschen an einem malignen Lungentumor (10,9 % aller Krebsneuerkrankungen), 42.346 Menschen starben 2010 aufgrund dieser Erkrankung (15,5 % aller Sterbefälle an Krebs). 35.040 der Neuerkrankten 2010 waren männlich (Inzidenzrate: 87,4/100.000), 17.030 weiblich (Inzidenzrate: 40,9/100.000). Mit ca. 36.000 männlichen und 19.600 weiblichen prognostizierten Neuerkrankten in 2014 wird ein Trend hinsichtlich vermehrter Inzidenz bei Frauen deutlich [2]. Bei Männern war das Lungenmalignom 2010 in Deutschland die zweithäufigste, bei Frauen die dritthäufigste Krebserkrankung (13,9 bzw. 7,6 % aller Krebserkrankungen). Bei Männern ist es mit 24,9 % aber die mit Abstand häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen. Bei Frauen machen maligne Lungentumoren 13,6 % aller Krebssterbefälle aus. 2010 starben 29.381 Männer (Mortalität: 73,3/100.000) und 13.627 Frauen (Mortalität: 32,7/100.000) an dieser Krebserkrankung. Männer erkrankten im Mittel mit 70 und Frauen mit 68 Jahren. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Männern mit 16 % und bei Frauen mit 21 % im Vergleich zu malignen Tumoren anderer Entität sehr niedrig [2].

1.2 Ätiologie maligner Lungentumoren

Der mit Abstand wichtigste Faktor in der Ätiologie der meisten malignen Lungentumoren, v. a. hinsichtlich Karzinomen der Lunge, ist der inhalative Tabakkonsum. Dies ist in vielen Studien und Metaanalysen bewiesen worden [3]–[5]. Es wurde zudem gezeigt, dass die Häufigkeit des Auftretens maligner Tumoren der Lunge sowohl mit der kumulativen Menge an gerauchten Zigaretten, als auch mit den kumulativen Jahren des Rauchens korreliert. Das Risiko an einem Lungentumor zu erkranken ist bei Rauchern 20 – 30fach erhöht [6]. Ca. 80 % der Lungenmalignome bei Männern und ca. 50 % der Fälle bei Frauen gehen zurück auf das Tabakrauchen [7], dabei ist das Risiko von Frauen und Männern an einem Malignom der Lunge zu erkranken annähernd gleich [8]. Auch Passivrauchen erhöht das Erkrankungsrisiko. Das Risiko ein Malignom der Lunge zu entwickeln ist bei Nichtrauchern, die dauerhaft passiv Tabakrauch ausgesetzt sind, 30 – 50 % erhöht [3], [9].

Weitere Risikofaktoren zeigen sich hinsichtlich einer berufsbedingten Exposition (Asbest, Nickel,

Chrom, Silicate, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe), ebenso hinsichtlich der Luftverschmutzung (Feinstaub, Dieselabgase) sowie ionisierender Strahlung (Radon) [10].

Eine genetische Prädisposition für die Entwicklung von Lungenmalignomen ist anzunehmen. Eine umfassende Metaanalyse aus dem Jahr 2005 zeigte deutliche Hinweise auf eine genetische Prädisposition [11], mit der Einschränkung, dass die o. g. Risikofaktoren in den untersuchten Familien gehäuft vorkamen. Im Gegensatz hierzu zeigte eine große Zwillingsstudie (eineieiige vs. zweieiige Zwillinge) keinen Hinweis auf eine genetische Prädisposition von Malignomen der Lunge [12].

1.3 Histologie und Klassifikation des Lungenkarzinoms

Lungenkarzinome stellen die große Mehrzahl der malignen Lungentumoren dar. Daher und aufgrund dessen, dass auch die meisten Patienten der vorliegenden Arbeit an einem Lungenkarzinom erkrankt waren, soll der Fokus im Folgenden auf Karzinome der Lunge gelegt werden. Die deutlich vereinfachte Einteilung in nicht-kleinzellige und kleinzellige Karzinome der Lunge ist weiterhin gebräuchlich. Zu den nicht-kleinzelligen Karzinomen werden Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, adenosquamöse Karzinome und großzellige Karzinome gezählt. Sie machen etwa 80 % aller Lungenkarzinome aus. In diesem Kapitel sollen die Charakteristika der häufigsten Lungenkarzinome näher betrachtet werden. Tabelle 1.1 zeigt deren aktuelle histologische Klassifikation der WHO (2015).

1.3.1 Plattenepithelkarzinome

Plattenepithelkarzinome haben einen Anteil von 20 – 30 % an allen Lungenkarzinomen [13]. Sie treten häufiger bei Männern auf und korrelieren stärker mit inhalativem Tabakkonsum als andere Subtypen [14]. Plattenepithelkarzinome manifestieren sich in zwei Drittel der Fälle zentral in größeren Bronchien, können diese verlegen, zu Atelektasen der Lunge führen sowie zentral nekrotisieren und Höhlen mit Anschluss an das Bronchialsystem bilden [15], [16]. Eine Metastasierung ist häufig in hilären Lymphknoten zu finden, Fernmetastasen treten eher spät auf. Das Plattenepithelkarzinom weist als einziger histologischer Subtyp eine klar definierte präinvasive Phase in Form der Plattenepitheldysplasie bzw. des *Carcinoma in situ* auf. Histologisch zeigen diese Karzinome je nach Differenzierungsgrad unterschiedlich ausgeprägte interzelluläre Verbindungen, Hornperlen und intrazelluläre Keratinbildung [13], [16].

<p>Adenokarzinome</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Lepidisches Adenokarzinom 2. Azinäres Adenokarzinom 3. Papilläres Adenokarzinom 4. Mikropapilläres Adenokarzinom 5. Solides Adenokarzinom 6. Invasiv muzinöses Adenokarzinom <ol style="list-style-type: none"> a. Gemischt invasiv muzinöses und nicht-muzinöses Adenokarzinom 7. Kolloidales Adenokarzinom 8. Fetales Adenokarzinom 9. Enterisches Adenokarzinom 10. Minimal invasive Adenokarzinome <ol style="list-style-type: none"> a. Muzinös b. Nicht-muzinös 11. Präinvasive Läsionen <ol style="list-style-type: none"> a. Atypische adenomatöse Hyperplasie b. Adenokarzinom in situ <ol style="list-style-type: none"> i. Nicht-muzinös ii. Muzinös <p>Plattenepithelkarzinome</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Keratinisierendes Plattenepithelkarzinom 2. Nicht-keratinisierendes Plattenepithelkarzinom 3. Basaloides Plattenepithelkarzinom 4. Präinvasive Läsionen <ol style="list-style-type: none"> a. Plattenepithelkarzinom in situ <p>Neuroendokrine Lungentumoren</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kleinzelliges Lungenkarzinom <ol style="list-style-type: none"> a. Kombiniertes kleinzelliges Lungenkarzinom 2. Großzellig-neuroendokrines Lungenkarzinom <ol style="list-style-type: none"> a. Kombiniertes großzelliges neuroendokrines Lungenkarzinom 3. Karzinoid <ol style="list-style-type: none"> a. Typisches Karzinoid b. Atypisches Karzinoid 4. Präinvasive Läsionen <ol style="list-style-type: none"> a. Diffuse idiopathische pulmonale neuroendokrine Zellhyperplasie 	<p>Großzellige Lungenkarzinome</p> <p>Adenosquamöse Lungenkarzinome</p> <p>Pleomorphe Lungenkarzinome</p> <p>Spindelzellige Lungenkarzinome</p> <p>Riesenzellige Lungenkarzinome</p> <p>Karzinom Sarkome</p> <p>Pulmonale Blastome</p> <p>Andere und nicht-klassifizierbare Lungenkarzinome</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Lymphoepitheliomartiges Karzinom 2. NUT Karzinome <p>Karzinome des Speicheldrüsentyps</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Adenoid-zystisches Karzinom 2. Mukoepidermoidkarzinom 3. Epithelial-myoepitheliales Karzinom 4. Pleomorphes Adenom <p>Papillome</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Plattenepithelpapillom <ol style="list-style-type: none"> a. Exophytisch b. Invertiert 2. Glanduläres Papillom 3. Gemischt <p>Adenome</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sklerosierendes Pneumozytom 2. Alveoläres Adenom 3. Papilläres Adenom 4. Muzinöses Zystadenom
--	--

Tabelle 1.1: Histologische Klassifikation der Lungenkarzinome nach WHO 2015 [13]

1.3.2 Adenokarzinome

Der Anteil der Adenokarzinome unter den Karzinomen der Lunge liegt bei 30 – 40 % [13]. Damit hat das Adenokarzinom in den letzten Jahren das Plattenepithelkarzinom der Lunge von Platz eins der Statistik verdrängt [13], [17]. Dies gründet sich auf ein verändertes Design der Zigaretten: Filter und reizarmer Tabak, verleiten zu einer tieferen Inhalation der Schadstoffe bis in die Lungenperipherie, was zu einer vermehrten Exposition des bronchoalveolären Epithels (Ausgangspunkt der Adenokarzinome) führt. [6], [17], [18]. Adenokarzinome sind mit Abstand die häufigsten Karzinome bei Nichtrauchern. Unter den Nichtrauchern sind vor allem Frauen von einem Lungenkarzinom

betroffen; hormonelle und verschiedene Umwelteinflüsse werden ursächlich diskutiert [19], [20]. Adenokarzinome treten auch insgesamt häufiger bei Frauen als bei Männern auf [21].

Sie manifestieren sich meist peripher, können aber auch zentral lokalisiert sein [16]. Fernmetastasen finden sich früh und gehäuft in Knochen, Gehirn, Leber und Nebennieren [22] bei einem eher langsamen Wachstum des Primarius mit geringer Tumormasse [16].

Die in den Jahren 2004 und 2015 erneuerte WHO-Klassifikation enthielt vor allem in der Gruppe der Adenokarzinome Änderungen [13]: Die *atypische adenomatöse Hyperplasie*, eine Ansammlung von atypischen proliferierenden Pneumozyten in der Alveolenwand von ca. 5 mm Durchmesser, sowie das *Adenokarzinom in situ*, mit einem Durchmesser von weniger als 3 cm und histologisch proliferierenden Pneumozyten Typ II oder Clara-Zellen, bei denen nur extrem selten eine Muzinproduktion auftritt, gehören zu den präinvasiven Läsionen. Bei den invasiven Läsionen wird zusätzlich ein minimalinvasives Adenokarzinom aufgeführt, welches über einen Durchmesser von maximal 3 cm, eine Invasionstiefe von weniger als 5 mm und einem lepidischen nur extrem selten muzinösen Wachstum definiert ist. Sowohl Patienten mit einer präinvasiven Vorstufe als auch mit einem minimalinvasiven Adenokarzinom zeigen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 100 %. Bei den invasiven Adenokarzinomen wird histologisch zwischen lepidischem, azinärem, papillärem, mikropapillärem und solidem Wachstum differenziert. Das lepidische Wachstum zeichnet sich durch eine tapetenartige Auskleidung der Alveolen durch Tumorzellen aus, die von Typ 2 Pneumozyten und Clara-Zellen abstammen und keine Muzinproduktion zeigen (früher als bronchoalveoläres Karzinom bezeichnet). Das azinäre, also drüsenartige Wachstum ist charakteristisch für das Adenokarzinom. Zusätzlich kann eine papilläre Komponente, d. h. eine Ausbildung von zotten- oder papillenartigen Strukturen hinzukommen. Die Zellen zeigen reihenartige Verbände, oft mit apikalem intrazellulärem Muzin und kleinen basal liegenden Kernen. Karzinome des soliden Typs zeigen eine ausgeprägte Muzinproduktion und drüsenartige Strukturen fehlen. Die Grenzen zwischen den einzelnen Wachstumsarten sind häufig fließend.

1.3.3 Großzellige Lungenkarzinome

Großzellige Lungenkarzinome machen 5 – 10 % aller malignen Lungentumoren aus [13]. Häufig manifestieren sie sich in der Lungenperipherie und zeigen in vielen Fällen ausgeprägte nekrotische Anteile [13]. Sie stellen undifferenzierte epitheliale maligne Lungentumoren dar, die sich lichtmikroskopisch weder den Plattenepithel- noch den Adenokarzinomen zuordnen lassen. Ihre Zellen sind groß und polygonal mit einem großen Kern und einem prominenten Nucleolus [13], [16].

Eine weitere Entität ist das großzellig-neuroendokrine Lungenkarzinom, welches durch sein neuroendokrines Wachstumsmuster (organoide Nester sowie trabekuläre, rosetten- und palisadenartige Muster, ein variables Chromatinmuster und eine hohe Mitoserate) histologisch auffällt und mittels neuroendokrinen Markern (Chromogranin A, neuronenspezifische Enolase, Synaptophysin, Somatostatin) bestätigt werden kann. Es wird zu den neuroendokrinen Lungenkarzinomen gezählt und

macht hier ca. 3 % aus [13], [23].

1.3.4 Kleinzellige Lungenkarzinome

Der Anteil kleinzelliger Lungenkarzinome an den malignen Lungentumoren beträgt 15 – 20 % [13]. Sie zeigen ebenfalls eine hohe Korrelation mit dem inhalativen Tabakkonsum [24]. Zwei Drittel der Fälle kleinzelliger Karzinome zeigen sich als zentrale Läsion mit einer hohen Rate an hilären Lymphknotenmetastasen, häufig auch mit einer erheblichen Tumormasse und großen nekrotischen Anteilen [24], [25]. Sie zeigen außerdem eine frühe Fernmetastasierung in Knochen, Gehirn, Leber und Nebenniere [24].

Die kleinzelligen Lungenkarzinome gehören ebenfalls zur Gruppe der neuroendokrinen Lungentumoren und gehen aus dem DNES hervor [26]. Aufgrund dieser Zugehörigkeit zeigen sie häufig paraneoplastische Syndrome [16], [24].

Histologisch stellen sich kleinzellige Karzinome als Nester von kleinen polygonalen Zellen mit wenig Zytoplasma sowie salz- und pfefferkornartigem Chromatin dar. Die Mitoserate ist hoch und nekrotische Anteile sind vermehrt auszumachen [13], [16], [27]. Zusätzlich können Anteile eines nicht-kleinzelligen Karzinoms vorliegen, was dann als kombiniertes kleinzelliges Karzinom bezeichnet wird [13].

1.3.5 Karzinoidtumoren

Karzinoide der Lunge machen ca. 1 – 2 % aller Lungentumoren aus [13]. Auch die Karzinoide gehören zu der Gruppe der neuroendokrinen Tumoren und können mit paraneoplastischen Syndromen einhergehen [24].

Karzinoide treten zu 60 % zentral auf und zeigen ein endobronchiales Wachstum mit entsprechenden pulmonalen Symptomen in ca. 50 % der Fälle. Periphere Karzinoide sind oft ein radiologischer Zufallsbefund oder manifestieren sich durch paraneoplastische Syndrome [28].

Karzinoide zeigen ein solides histologisches Wachstumsmuster mit einer weiten Bandbreite an lichtmikroskopischen Merkmalen: spindelförmige Zellen; palisadenartige, trabekuläre, adenoide, papilläre und rosettenförmige Wachstumsmuster; Sklerose und Verkalkung [13], [28]. Das Zytoplasma färbt sich eosinophil und das Chromatin stellte sich feingranulär dar [28].

Der Unterschied zwischen dem typischen Karzinoid und dem atypischen Karzinoid besteht definitorisch in der erhöhten Mitoserate und/oder Auftreten von nekrotischen Anteilen des letzteren [28].

Die Lunge ist aufgrund ihrer Lage im Blutkreislauf und ihrer Feinstruktur häufiges Ziel für Metastasen

von malignen Tumoren andere Genese. Ca. 30 % aller Metastasefälle manifestieren sich in der Lunge. Die häufigsten Entitäten mit Absiedlungen in der Lunge sind maligne Tumoren der Niere, des Colons, der Mamma, der Blase und der Prostata [13].

Auf weitere maligne Lungentumoren soll aufgrund ihrer Seltenheit hier nicht eingegangen werden.

1.4 Tumorbiologie und Karzinogenese

Hanahan & Weinberg zeigten in ihren Artikel *Hallmarks of cancer* aus dem Jahr 2000 sechs wesentliche Eigenschaften für einen Katalog der Krebs-Charakteristika auf [29]: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Immunität gegen wachstumshemmende und Apoptose fördernde Signale, unbegrenztes Replikationspotential, Apoptosehemmung, Förderung der Angiogenese sowie gesteigerte Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung. Hiermit zeigten sie ein Konstrukt zur Erklärung und zum besseren Verständnis der Komplexität und Diversität von Krebserkrankungen auf. Im Sinne einer klonalen, „Darwinistischen“ Evolution auf zellulärer Ebene führt die Aufeinanderfolge mehrerer genetischer Veränderungen mit Selektionsvorteil von normalem Epithel zum Karzinom. Im Jahr 2011 bestätigten *Hanahan & Weinberg* ihren Katalog und erweiterten diesen im Zuge neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse [30]: Neuprogrammierung des Energiemetabolismus und Entgehen der Immunabwehr. Außerdem zeigten sie auf, dass das peritumorale Gewebe wie die extrazelluläre Matrix, Fibroblasten und Makrophagen oder andere Zellen der Immunabwehr eine wichtige Rolle in der Tumorprogression spielt. Im Folgenden sollen hinsichtlich der malignen Lungentumoren relevante genetische Alterationen aufgezeigt werden.

Spontane DNA-Mutationen spielen eine grundlegende Rolle in der Karzinogenese von Lungentumoren. Hierunter fallen Mechanismen wie Punktmutationen, Deletionen, Translokationen und Verlust der Heterozygotie [29], [30]. Es sind etliche Loci auf fast allen Chromosomen beschrieben, die Bedeutung für die Karzinogenese von Lungentumoren haben.

1.4.1 Ausgewählte Tumorsuppressorgene

Bei 96 % aller malignen Lungentumoren und 78 % aller präkanzerösen Läsionen der Lunge kann ein Verlust der Heterozygotie des Chromosomenarms 3p (kurzer Arm) nachgewiesen werden [31]. Auf diesem Chromosomenabschnitt befinden sich mehrere Tumorsuppressorgene. Für FHIT (3p14.2) wurden Apoptose induzierende Eigenschaften nachgewiesen [32]. RASSF1A (3p21.3) hat ebenso Apoptose fördernde Eigenschaften sowie Einfluss auf die Zellzyklusregulation und stabilisiert darüber hinaus Mikrotubuli [33]. TUSC2 (3p21.3) wird eine inhibierende Funktion hinsichtlich einiger

Thyrosinkinase (EGFR, PDGFR, c-Abl, c-Kit und AKT) sowie Einfluss auf p53 zugeschrieben [34], [35]. Tumorsuppressorgene der Semaphorin-Familie, SEMA3B und SEMA3F (3p21.3) können Apoptose induzieren, inhibieren Zellproliferation, Angiogenese, Zelladhäsion und haben damit Einfluss auf die Zellmigration [36]–[39].

TP53 ist ein Protein, welches eine essentielle Rolle in der Zellzyklusregulation spielt. Es ist in der Lage CDKs (Cyclin abhängige Kinasen) zu induzieren, welche die Zelle in die G1-Phase versetzen können und damit DNA-Reparaturen ermöglichen oder direkt die Apoptose der beschädigten Zelle hervorrufen [40], [41]. Mutationen im TP53-Gen (17p13) werden sehr häufig in malignen Lungentumoren gefunden, bis zu 50 % in nicht-kleinzelligen und bis zu 70 % in kleinzelligen Lungenkarzinomen [42]. Der Mechanismus der Mutation wurde früh erkannt und ist gut untersucht. Die TP53-Mutation korreliert stark mit dem inhalativen Tabakkonsum, wobei der polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren, nach Stoffwechselaktivierung zum Epoxid, eine Bindung zu Guanosin eingeht und somit Transversionen zu Thymin hervorrufen kann [43].

Weitere Mutationen von Tumorsuppressorgenen in Lungenkarzinomen finden sich häufig im CDKN2A-RB1-Signalweg. Alterationen im RB1-Gen (13q1) zeigen sich bei bis zu 90 % der kleinzelligen im Vergleich zu 10 – 15 % der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome [44]. Bemerkenswert ist, dass sich Mutationen im CDKN2A-Gen in bis zu 70 % der nicht-kleinzelligen Karzinome zeigen [44]. Das RB1-Gen kodiert das Retinoblastom-Protein, das CDKN2A-Gen kodiert einen CDK-Inhibitor (p16^{Ink4A}). Beide fungieren in einem Kontrollmechanismus beim Übergang der G1- zur S-Phase im Zellzyklus [45].

Die beschriebenen Alterationen in Tumorsuppressorgenen ereignen sich zunächst nur auf einem Chromosom. Wird danach auch das zweite, noch funktionstüchtige Allel geschädigt – hier sind chromosomale Verluste (Aneuploidie, siehe Abschnitt 1.4.5), DNA-Mutationen oder aber epigenetische Mechanismen (siehe Abschnitt 1.5) vorstellbar - kommt es zu einer Förderung der Tumorgenese. *Knudson et al.* beschrieb dies als *second-hit*-Hypothese [46].

1.4.2 Ausgewählte Onkogene

Mutationen können zur Aktivierung von Onkogenen führen, welche durch die Stimulation oder Hochregulation von Mitose induzierenden Signalen das Wachstum und die Replikation der Zellen fördern. Für Tumorzellen sind diese Signale eine essentielle Überlebensgrundlage [47] und bieten somit auch die Möglichkeit zur gezielten Tumortherapie [48]. Diese Veränderungen werden auch als „Treibermutationen“ in der Tumorentstehung- und progression bezeichnet.

Der EGFR (7p11) ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor in der Zellmembran, welcher in 40 – 80 % der nicht-

kleinzelligen Lungenkarzinome überexprimiert oder überaktiv ist [49]. Der EGFR gehört zur ErbB-Familie, welche aus eng verwandten Tyrosinkinase-Rezeptoren besteht: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4). Mutationen in dieser Rezeptorfamilie sind häufig an der Karzinogenese verschiedenster Tumoren beteiligt [50]. Die Aktivierung des EGFR setzt mehrere intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in Gang, die wiederum zur DNA- und RNA-Synthese führen und damit Zellproliferation, -adhäsion und -migration beeinflusst [51]. Unter den Lungenkarzinomen gibt es gewisse Gruppen, die hinsichtlich einer hohen Rate an EGFR-Mutationen hervorstechen: Adenokarzinome, Frauen, Personen die niemals geraucht haben und Ostasiaten [52]–[54].

Ein weiteres Onkogen, welches häufig aktiviert in Lungenkarzinomen vorliegt, ist KRAS (12p12). Es ist als Protein Teil der intrazellulären Signaltransduktionskaskade RAS/RAF/MEK/MAPK, welche regulatorische Aufgaben hinsichtlich der Embryogenese, Differenzierung und Wachstum der Zelle sowie der Apoptose übernimmt [55]. Eine KRAS-Mutation wird vor allem in Adenokarzinomen gefunden, hier bis zu 30 % [56]. In ca. 4 % der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome, hier vornehmlich Adenokarzinome, kann als Folge einer Translokation ein EML4-ALK-Fusionsprotein (2p) gefunden werden. Durch die Verschmelzung wird der Tyrosinkinaseanteil (ALK) permanent aktiv, was zu einer dauerhaften mitotischen Aktivität der Zelle führt [57], [58]. Weitere Onkogene mit gewisser Relevanz hinsichtlich maligner Lungentumoren sind SOX2, MYC, PI3K und andere [59].

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Tumorsuppressor- und Onkogenen bei einzelnen Tumorpatienten bieten nicht nur Möglichkeiten einer gezielten Therapie des Lungenkarzinoms (Stichwort: individualisierte Tumorthherapie), sondern können ggf. auch Aussagen über Differenzierung und Prognose individueller Tumoren treffen [48], [59].

1.4.3 Tumorstroma

Die direkte, bindegewebige Umgebung, das Stroma des Tumors, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle hinsichtlich Wachstum, Invasion und Metastasierung. Es findet eine komplexe und verflochtene Interaktion zwischen Tumorzellen, Stromazellen (z. B. Fibroblasten, Makrophagen), Zellen des Immunsystems, Endothelzellen und der extrazellulären Matrix statt [60]. Die Angiogenese ist hier ein zentraler Aspekt, da ohne Blutgefäße keine Nährstoffversorgung und somit auch kein Wachstum des Tumors möglich ist. Einer der wichtigsten Mediatoren der Angiogenese ist VEGF (*vascular endothelial growth factor*). VEGF stimuliert in erster Linie Endothelzellen zur Proliferation und Migration und damit zur Bildung neuer Gefäße, reguliert aber auch die Permeabilität des Endothels, hemmt die Apoptose und führt auch zur Migration von Monozyten und Makrophagen. Die Produktion und Freisetzung von VEGF wird wiederum durch Hypoxie, weitere Mediatoren und auch der Aktivierung verschiedener Onkogene bewirkt [61]–[63]. Hinsichtlich der Lungenkarzinome lässt sich

sowohl in nicht-kleinzelligen als auch in kleinzelligen Karzinomen eine erhöhte VEGF-Expression finden [64]. Auch VEGF bietet hinsichtlich der Prognosebestimmung und gezielten Therapie einige Ansatzpunkte [59].

1.4.4 Tumorstammzellen

Das Modell der Tumorstammzellen besagt, dass alle Zellen eines Tumors von nur einigen wenigen Zellen abstammen. Diese Tumorstammzellen seien im Erbgut veränderte Abkömmlinge von körpereigenen pluripotenten Zellen. Sie besäßen die Möglichkeit, sich in eine oder mehrere histologische Richtungen zu differenzieren [65]. Die aberrante Expression von Genen in Tumorstammzellen zeigt auffällige Parallelen zu Vorläuferzellen in der physiologischen Organogenese der Lunge [66], [67]. Alterationen im Hedgehog-, Wnt- oder Notch-Signalweg spielen hier und ebenfalls hinsichtlich der Karzinogenese von Lungentumoren eine bedeutende Rolle [68]. Auch diese Signalwege liefern interessante Ansätze im Sinne einer gezielten Tumorthherapie oder der Prognoseermittlung [59].

1.4.5 Aneuploidie in Tumorzellen

Aneuploidie ist definiert als aberrante Anzahl von Chromosomen, welche nicht einem Vielfachen des haploiden Satzes entspricht (Polyploidie). Aneuploidie in Embryonen führt häufig zum Tod des Organismus. Bestimmte Aneuploidien bei Embryonen oder Feten sind mit schweren Erkrankungen oder Syndromen sowie Infertilität assoziiert, wohingegen fokale Aneuploidien zu Krebs führen können. Die bekanntesten humanen Aneuploidien sind die Trisomien 21 (Down Syndrom), 18 (Edward Syndrom) und 13 (Patau Syndrom), alle anderen autosomalen Trisomien sind schon im Embryonalstadium letal, wie auch alle autosomalen Monosomien [69].

In jedem malignen tumorösen Gewebe können aneuploide Zellen gefunden werden. Das Auftreten der Aneuploidie wird sowohl als Folge, aber auch als Ursache der Tumorgenese aufgefasst. Letzteres wird u. a. von *Duesberg et al.* und *Torres et al.* beschrieben [69], [70]: Fehler in der Mitose mit Folge einer Aneuploidie ist ein Ereignis mit regelmäßiger Häufigkeit (schätzungsweise in 1 zu 100.000 Zellteilungen). Die meisten Zellen sind aufgrund der entweder fehlenden oder übermäßigen Erbinformation nicht (über)lebensfähig. Sehr wenige Zellen können dennoch existieren und proliferieren. Destruierende Imbalancen in der Proteinsynthese können dann auch DNA-Reparaturmechanismen oder den mitotischen Spindelapparat beeinflussen, wodurch die Zelle weitere Schäden in der Erbinformation sammelt. Einige dieser Zellen erwerben somit z. B. die Fähigkeit zur Hyperproliferation, Apoptosehemmung, Invasion oder andere, welche zur Tumorentstehung beitragen. Auf dieser Grundlage könnten aneuploide Veränderungen des Erbguts auch zur Frühdiagnose eines malignen Tumors beitragen. Verfahren wie die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) oder die

DNA-Bildzytometrie stellen Möglichkeiten zur Detektion dieser dar und stützen die o. g. Theorie mit ihren Ergebnissen in der klinisch-diagnostischen Routine [71].

1.5 Epigenetik

Die Epigenetik spielt eine wesentliche Rolle in der Biologie und Genese von Lungenkarzinomen und wird hier separat behandelt, da sich die vorliegende Arbeit mit DNA-Methylierungen befasst.

Der Begriff Epigenetik beschreibt einen stabilen, erblichen Phänotyp, der auf Alterationen der Chromosomen beruht, die keine Änderungen in der DNA-Basensequenz sind. Diese Änderungen sind zudem reversibel [72]. Im Wesentlichen sind es DNA-Methylierungen, Histonmodifikationen und nicht-codierende micro-RNAs, die epigenetisch eine Rolle spielen. Fehler in diesen Vorgängen, die vorwiegend die Differenzierung der Zellen regulieren, können zu Krebserkrankungen führen [73]. Auch hier gilt, dass erst mehrere, epigenetische und genetische Alterationen zusammen zu einer Krebserkrankung führen können [74], [75].

1.5.1 DNA-Methylierung

Eine Methylierung der DNA findet sich im menschlichen Genom vor allem an der Base Cytosin in CpG-Dinukleotiden (Cytosin-Phosphordiesterbindung-Guanin), es entsteht 5-Methylcytosin (siehe Abb. 1.1).

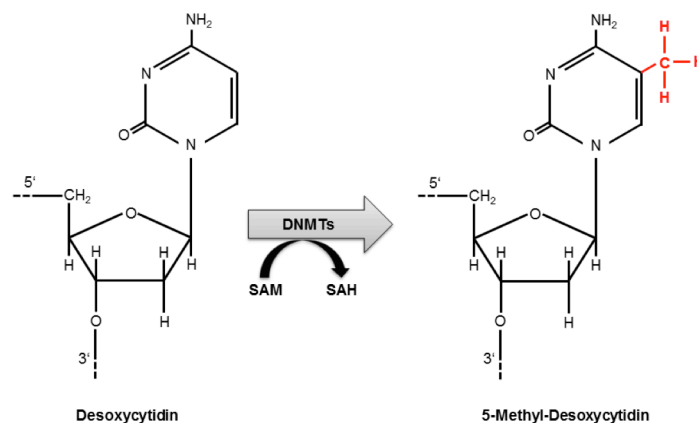


Abb. 1.1: Methylierung der Base Cytosin zu 5-Methylcytosin

Cytosin und 5-Methylcytosin sind hier in ihrer Nukleosidform, gebunden an Desoxyribose, dargestellt, wie sie im DNA-Strang vorliegen. Die Reaktion wird durch DNMTs (DNA-Methyltransferasen) katalysiert. Die Methylgruppe (rot) liefert ein Co-Enzym: SAM = S-Adenosylmethionin, SAH = S-Adenosylmethionin.

Diese Reaktion wird durch verschiedene DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. DNMT3A und DNMT3B sind für die *de-novo* Methylierung der humanen DNA verantwortlich, DNMT1 ist bei der DNA-Replikation aktiv und sorgt für die Instandhaltung der physiologisch korrekten DNA-Methylierung [76], [77].

Insgesamt sind ca. 70 – 80 % aller CpG-Dinukleotide methyliert, womit 5-Methylcytosin ca. 1 % aller

Basen der humanen DNA ausmacht [78]. CpG-Dinukleotide sind im menschlichen Genom nicht gleichmäßig verteilt. Man findet sie u. a. in langen repetitiven Sequenzen (z. B. Retrotransposons, rDNA, centromerische Repeats, und weiteren) [79]. In diesen repetitiven Sequenzen liegen die CpG-Dinukleotide hochgradig methyliert vor, was zur Stabilität der DNA beiträgt [80]. Eine DNA-Hypomethylierung in diesen Bereichen führt zu einer Instabilität der DNA, was wiederum zur Karzinogenese beitragen kann (siehe Abschnitt 1.6.3.2).

Ca. 10 – 20 % der CpG-Dinukleotide findet man in sogenannten CpG-Inseln. CpG-Inseln sind kurze Sequenzen (ca. 500 - 1000 bp) mit einem Gehalt von 55 % oder mehr an CpG-Dinukleotiden, die sich in der 5'-Region (Promotorregion, Exon 1) von ca. 60 % aller kodierenden humanen Gene finden [81], [82]. CpG-Dinukleotide in der Genpromotorregion bleiben auch nach Entwicklung und Differenzierung der Zelle in den meisten Fällen unmethyliert [80]. Hiervon gibt es aber auch Ausnahmen, wie z. B. die Inaktivierung eines X-Chromosoms bei Frauen [79] oder das genomische Imprinting [83].

Hypermethylierte CpG-Inseln werden in vielen Promotorregionen fast aller malignen Tumoren gefunden [84]. In vielen Studien konnte eine Hypermethylierung der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen bewiesen werden, welche zu einer verminderten oder fehlenden Expression (*silencing*) dieser Gene führt: Wie z. B. APC, RASSF1A, CDKN2A (p16^{Ink4A}) oder DAPK [85]–[87].

Es scheint mehrere Mechanismen zu geben, welche von einer Methylierung eines Genpromotors zur Inaktivierung des entsprechenden Gens führen. Letztendlich wird die Bildung des DNA-Transkriptions-Komplexes verhindert. Dies kann einerseits über eine direkte Inhibierung der Bindung von Transkriptionsfaktoren durch die Methylierung selbst geschehen [88], oder durch *methyl-CpG binding proteins* (MBPs), einer Proteinfamilie, die speziell an hypermethylierte Bereiche bindet [89]. Hier gibt es wiederum zwei Untergruppen, einerseits Proteine mit einer *methyl-CpG binding domain* (MBD), andererseits Proteine die über eine Zinkfingerdomäne an hypermethylierte DNA binden. Beide Gruppen inhibieren die Transkription über ihre spezielle Proteindomäne [90], [91]. Diese Domänen katalysieren z. B. die Deacetylierung oder Methylierung von Histonen und damit eine Veränderung in der Chromatinstruktur der DNA, was die Bildung des DNA-Transkriptions-Komplexes verhindert und damit die Expression des jeweiligen Gens stilllegt [92], [93].

Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über einige Gene in Lungenkarzinomen, die in verschiedenen Studien eine hohe Rate aberranter Methylierung ihres Promotors zeigten. Dabei erhebt die Tabelle keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Wie Tabelle 1.2 verdeutlicht, ist das Interesse hier vornehmlich auf Tumorsuppressorgene gerichtet, die durch ihr Abschalten (*silencing*) im Sinne des Modells nach Hanahan & Weinberg eine Tumorgenese fördern [29], [30].

Gen	Locus	Funktion	Grad der Methylierung		Referenzen
			NSCLC	SCLC	
3-OST-2	16p12	Heparasulfat-Modifikation	70 %		[94]
APC	5q21-q22	Zellzyklus-Regulation	42 – 48 %	58 %	[95]–[97]
CDH1	16q22.1	Zelladhäsion	34 – 87 %	42 %	[98]–[100]
CDH13	16q24.2	Zelladhäsion	29 – 32 %	15 %	[95], [98], [99]
CDKN2A (p16/INK4a)	9p21	Zellzyklus-Regulation	22 – 64 %	9 %	[96], [99], [101]–[104]
DAPK	9q34.1	Apoptose	34 – 44 %		[105], [106]
FHIT	3p14.2	Purinmetabolismus	34 – 52 %	64 %	[96], [101], [107]
MGMT	10q36.1	DNA-Reparatur	38 – 64 %	13 %	[99], [108], [109]
RARβ2	3p24	Zellzyklus-Regulation	26 – 29 %	47- 62 %	[95], [97], [99], [110]
RASSF1A	3p21.3	Signaltransduktion	34 – 45 %	70 – 79 %	[94], [96], [99], [107], [111], [112]
RUNX3	1p36.1	Zellproliferation, Apoptose	25 – 46 %	5 %	[107], [113], [114]

Tabelle 1.2: Auswahl einiger Gene mit Promotorhypermethylierung in Lungenkarzinomen.

Das Untersuchungsmaterial der zugrunde liegenden Studien war ausschließlich reseziertes Tumorgewebe der Lunge.

1.5.2 Histonmodifikationen

Ein Histonoktamer (2 x H2A, H2B, H3 und H4) bildet zusammen mit einem, ihn umwickelnden, 146 bp langen DNA-Strang ein Nukleosom [115]. Nukleosome sind über 20 – 50 bp lange *linker*-DNA miteinander verknüpft und bilden in ihrer makromolekularen Struktur das Chromatin [116]. Je dichter die Nukleosome gepackt sind, desto weniger steht der DNA-Strang für Replikation, Transkription oder DNA-Reparatur zur Verfügung [115]. Reguliert wird die Dichte der Nukleosomen, damit auch die Genexpression, über lysinreiche Enden der Histone, welche reversibel z. B. durch Acetylierung oder Methylierung modifiziert werden können [117], [118]. Histon-Acetylierung führt zu einer Auflockerung des Chromatins und damit zur Genexpression, Deacetylierung der Histone hingegen führt zum Gegenteil [119]. Sowohl eine Methylierung der lysinreichen Histonenden als auch eine Demethylierung können je nach Stelle der Modifikation zu einer Genexpression oder einem *-silencing* führen [117].

Auch hinsichtlich der Karzinogenese von Lungentumoren konnten aberrante Histonmodifikationen aufgezeigt werden. Z. B. konnten *Kim et al.* eine gesteigerte Aktivität von DOT1L, einer Histon-Methyltransferase, in Lungenkarzinomen nachweisen [120]. Diese Überaktivität führt zu einer Methylierung von H3K79, die wiederum eine gestörte Expression regulatorischer Zellzyklus-Gene und Tumorsuppressorgene wie HOXA9 und RASSF1A zur Folge hat.

1.5.3 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind ca. 22 bp lange, nicht-codierende, regulatorische RNA-Fragmente, die an die 3'-Region von Messenger-RNA (mRNA) binden und somit zum Abbau dieser führen und die Translation verhindern [121]. In den letzten Jahren ist die Bedeutung der miRNAs für Prozesse wie Regulation der Genexpression, Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Apoptose und weitere deutlich geworden [121]. Aberrante Expression von miRNAs spielt somit auch eine wichtige Rolle in der Genese von Karzinomen [122].

Auch in der Karzinogenese von Lungentumoren konnte eine aberrante Expression von miRNAs nachgewiesen werden. Ein Beispiel für die Überexpression von miRNAs in Lungenkarzinomen ist das miR-17-92 Cluster, welches aus 7 miRNAs besteht mit teils noch unklaren Zielen (mRNA). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression zur Zellproliferation führt und zur Karzinogenese von Lungentumoren beiträgt [123]. Ein gut untersuchtes Beispiel einer Unterexpression von miRNAs in Lungenkarzinomen ist die let-7 miRNA Familie, welche zu einer verminderten Expression von KRAS führt. Es konnte gezeigt werden, dass let-7 miRNA in Gewebe aus Lungenkarzinomen weniger exprimiert wird als in gesundem Lungengewebe, und dies invers mit dem Vorhandensein des RAS-Proteins korreliert [124].

1.6 Diagnostik maligner Lungentumoren

1.6.1 Bildgebende Verfahren

Die Röntgenthoraxübersichtsaufnahme kann in der Frühdiagnostik maligner Lungentumoren als obsolet angesehen werden und wird in den aktuellen AWMF-Leitlinien (Gültigkeit 2010-2015) nicht empfohlen [125]. In einigen großen, randomisierten, multizentrischen Studien konnte keine Mortalitätsreduktion durch eine frühere Erkennung von malignen Lungentumoren mittels Röntgenübersichtsaufnahme des Thorax nachgewiesen werden [126]–[129]. Zudem konnte eine Studie in der retrospektiven Auswertung von Lungenkarzinompatienten zeigen, dass bis zu 3 cm große Tumoren in der Röntgenthoraxübersichtsaufnahme nicht erkannt wurden [130].

Im *National Lung Screening Trial* der USA konnte u. a. eine 20 %ige Reduktion der Mortalität des Lungenkarzinoms durch die *low-dose* Computertomographie (CT) im Vergleich zur herkömmlichen Röntgendiagnostik aufgezeigt werden [131]. Die *low-dose* CT zeigte sich extrem sensitiv (Erkennung von Rundherden ab 1 mm) was zu insgesamt 24 % positiven Resultaten aller durchgeführten CTs führte. Hiervon waren mehr als 96 % falsch positiv [134]. Demnach scheint die *low-dose* CT nur eine bedingt geeignete Screeningmethode für Lungenmalignome zu sein, da positive Befunde einer zu häufigen weiteren Abklärung bedürfen.

Bei einem harten klinischen Verdacht auf ein Malignom der Lunge (Thoraxschmerz, Husten, Gewichtsverlust, Luftnot, Hämoptysen, etc.) sollte nach AWMF-Leitlinien ein kontrastmittelverstärktes CT des Thorax und Oberbauchs angefertigt werden [125]. Dieses gibt Hinweise auf die Dignität des Befundes, zeigt Größe und Lage des Tumors verlässlich an und ermöglicht eine erste Einschätzung des N- und M-Status (TNM-Klassifikation, siehe Anhang) [132]–[134]. Die Magnetresonanztomographie (MRT) des Thorax und Oberbauchs ist in Sensitivität und Spezifität mit der CT vergleichbar und sollte im Einzelfall erwogen werden [135]. Die Diagnosesicherung des Befundes erfolgt mikroskopisch-morphologisch, wobei die Bronchoskopie inklusive Probengewinnung die wichtigste Methode darstellt [125].

1.6.2 Bronchoskopie und pathomorphologische Diagnostik

Die flexible Bronchoskopie ermöglicht einen direkten Einblick in das Bronchialsystem bis zur Ebene der Subsegmentbronchien. Sie ermöglicht nur bei größeren malignen Befunden der Lunge mit zentraler Lokalisation einen direkten Nachweis. Dieser kann mittels Autofluoreszenz, stark vergrößernder Bronchoskopie oder dem *Narrow-Band-Imaging* verbessert werden [136]. Auch bei einem direkten Tumornachweis ist die Diagnosesicherung durch eine Biopsieentnahme, welche dann bronchoskopisch erfolgt, erforderlich. Zudem ist es bronchoskopisch möglich, bronchoepitheliale

Zellen durch eine Bürstung oder Sekretabsaugung zu gewinnen. Bei weiter peripheren Befunden, die bronchoskopisch nicht direkt erreichbar sind, ist es möglich abgeschilferte Zellen des Bronchialepithels und ggf. eines malignen Befundes mittels bronchialer oder bronchoalveolärer Lavage zu gewinnen. Bei diesen Methoden wird ein Teil des Bronchialsystems bronchoskopisch gespült (meist 0,9 %iges NaCl) und die Flüssigkeit wieder abgesaugt, wobei sich die bronchoalveoläre Lavage durch ihr tieferes Vordringen bis in die Lungenalveolen von der Bronchiallavage unterscheidet. Die gewonnenen Zellen werden isoliert und danach mikroskopisch untersucht. Des Weiteren sind die Gewinnung transbronchialer Stanzbiopsien und Feinnadelaspirationsbiopsien üblich.

Die Ergebnisse der bronchoskopischen Diagnostik zeigen sich sehr variabel. Eine große Metaanalyse zeigte hierbei, dass zentrale Tumoren besser detektiert werden als periphere. Die gepoolte Sensitivität für Lavage, Bürstung, Nadelaspirationsbiopsie und Stanzbiopsie betrug 48 %, 49 %, 56 % und 74 % für zentrale sowie 43 %, 52 %, 67 % und 46 % für periphere Tumoren [137]. Insgesamt wurden mittels der vorgenannten endobronchialen Methoden 88 % der zentralen und 69 % der peripheren Tumoren erkannt. Allerdings werden Malignome mit einer Größe über 2 cm deutlich besser biopsiert. Die Sensitivität insbesondere der transbronchialen Feinnadelaspirationsbiopsie kann mittels endosonographischer gezielter Punktion, wie sie mittlerweile üblich ist, noch gesteigert werden [138]. Liegt ein verdächtiger peripherer Lungenbefund vor, kann dieser zuverlässig mittels einer perkutanen Feinnadelaspiration (unter sonographischer oder CT-gesteuerter Kontrolle) abgeklärt werden, wobei der Vorteil gegenüber bronchoskopischer Methoden insbesondere bei Läsionen < 3 cm zum Tragen kommt. Allerdings hat die transthorakale Punktion ein ernst zu nehmendes Risiko eines iatrogenen Pneumothorax [139]–[141].

Eine weitere Möglichkeit der zytologischen Diagnostik einer malignen Lungenerkrankung ist die Sputumzytologie, deren Vorteil es ist, dass das Untersuchungsmaterial nicht-invasiv gewonnen werden kann. Eine Metaanalyse großer Studien aus den 1970er und 1980er Jahren mit insgesamt über 240.000 Patienten zeigte keine Senkung der Mortalität durch das Screening für Lungenkarzinome mittels Sputumzytologie [142]. Die aktuellen AWMF-Leitlinien empfehlen die Anwendung der Sputumzytologie daher nicht in der Früherkennung maligner Lungenerkrankungen. Falls andere Verfahren aufgrund der Morbidität des Patienten nicht zur Verfügung stehen, stellt die Sputumzytologie jedoch die Methode der Wahl dar [125].

Eine befriedigende Früherkennung maligner Lungenerkrankungen mit hinreichender Sensitivität ist, wie oben geschildert, somit derzeit nicht realisierbar. Viele maligne Lungenerkrankungen werden erst nach mehrfach wiederholter Bronchoskopie gesichert und dann in einem späten Stadium diagnostiziert, welches erfolgreiche Therapiemaßnahmen stark einschränkt. Somit ist eine Verbesserung der Früherkennung des Lungenkarzinoms dringend notwendig, wobei molekulare Biomarker eine entscheidende Rolle spielen könnten.

1.6.3 Molekulare Biomarker

Biomarker sind von der WHO definiert als: „Jede Substanz, Struktur oder jeder Prozess, die im menschlichen Körper oder in seinen Produkten gemessen werden können und die Inzidenz einer Erkrankung oder das Outcome einer Behandlung vorhersagen oder beeinflussen können“ [143]. Ein molekularer Biomarker für Karzinome wäre demnach ein aus Körperflüssigkeiten, Zellen oder Gewebe gewonnener Indikator zur Frühdiagnose, Prognosestellung oder Vorhersage eines Therapieerfolgs [144], [145]. Ein „idealer Tumorbiomarker“ für die Diagnostik eines Malignoms sollte eine hohe Spezifität und Sensitivität haben und das am Besten bereits im Frühstadium der Erkrankung. Das Untersuchungsmaterial sollte einfach und kostengünstig gewonnen werden und möglichst lang und dabei ohne Informationsverlust aufbewahrt werden können. Hinsichtlich der Lungenmalignome bieten sich hier Sputen und Bronchialaspirate (Bronchiallavagen, bronchoalveoläre Lavagen), die in Saccomannos-Lösung (siehe Tabelle 2.4) fixiert wurden sowie auf Objektträger ausgestrichene und alkoholisch fixierte bronchiale Bürstungen und transbronchiale Feinnadelaspirationsbiopsien an. Der Vorteil gegenüber einem in Formalin fixierten Gewebestück ist, dass DNA in einer alkoholischen Fixierung in hochmolekularer und chemisch unmodifizierter Form erhalten bleibt [146].

In Kapitel 1.4 wurden verschiedene Alterationen der DNA-Sequenz besprochen, die eine Rolle in der Karzinogenese von Lungenmalignomen spielen. Es wurde aufgezeigt, dass diese Erkenntnisse Potential für die Entwicklung von Biomarkern hinsichtlich der Lungenkarzinome bieten. Auch in Kapitel 1.5 wurde aufgezeigt, dass neben der DNA-Methylierung auch andere epigenetische Mechanismen Potential als Biomarker beinhalten. Da sich diese Arbeit mit der DNA-Hypermethylierung von Genpromotoren befasst, sollen im Folgenden vornehmlich Erkenntnisse über diesen epigenetischen Mechanismus besprochen werden.

1.6.3.1 DNA-Hypermethylierung als Biomarker

DNA-Methylierungen bieten als Biomarker einige entscheidende Vorteile. 5-Methylcytosin-Basen sind eine kovalente Modifikation der DNA, somit stabil hinsichtlich Zeit, Temperatur und sonstigen Umwelteinflüssen [147]. Genspezifische DNA-Mutationen treten an verschiedenen Positionen des Genoms auf im Gegensatz zur DNA-Hypermethylierung, die reproduzierbar in überschaubaren Bereichen von Genpromotoren auftritt [81], [82]. Außerdem besteht eine DNA-Promotorhypermethylierung gleich an mehreren Cytosinbasen, was sie im Vergleich zu einzelnen Punktmutationen der DNA einfacher und kostengünstiger in der Detektierung macht [82]. DNA-Hypermethylierungen verschiedenster Gene zeigen bei Lungenkarzinomen eine hohe Prävalenz und

teilweise ein frühes Auftreten, was viele verschiedene Studien zeigten (Tabelle 1.2 sowie 5.1a – c). Somit kann in der Diagnostik eine hohe Sensitivität erreicht werden.

Ein weiterer Vorteil liegt in den Methoden zur Detektierung der DNA-Methylierung. Diese liefern valide und reproduzierbare Ergebnisse und sind dabei im Vergleich zu anderen molekularen Biomarkern auch kostengünstig [148]. Eine dieser Methoden zur Detektierung von DNA-Methylierungen ist die Quantitative Methylierungsspezifische PCR (QMSP), welche auch in dieser Arbeit Anwendung findet. Die QMSP gründet sich auf Arbeiten von *Eads et al.* [149] und ist eine Weiterentwicklung der Methylierungsspezifischen PCR (MSP) aus den Arbeiten von *Herman et al.* [150]. Im Gegensatz zur konventionellen MSP kommt bei der QMSP zusätzlich eine Methylierungsspezifische TaqMan®-Sonde zum Einsatz, welche zum einen die Spezifität des Verfahrens erhöht und zum anderen eine Quantifizierung des Methylierungsstatus erlaubt [97]. Eine wesentliche Voraussetzung für jede Methylierungsspezifische PCR war die Entwicklung der DNA-Bisulfitkonversion, bei welcher unmethylierte Cytosinbasen zu Uracil desaminiert werden [151]. *Frommer et al.* verbesserten diese zu einem in der Praxis anwendbaren Verfahren [152]. Weitere Einzelheiten zur Methodik finden sich in Kapitel 2.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Promotorregionen von APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A und 3-OST-2 auf aberrante Methylierungen an Bronchialaspiraten von Patienten mit Verdacht auf einen malignen Lungentumor untersucht. Das 3-Marker-Genpanel aus APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A wurde durch frühere Arbeiten des Instituts für Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf etabliert [153]–[156]. Zur Steigerung der Sensitivität sollte mit dieser Arbeit das Panel um 3-OST-2 erweitert werden. Im Folgenden soll auf diese 4 Gene, die Methylierung ihrer Promotorregion und ihr Bezug zu Lungenkarzinomen näher eingegangen werden.

APC

Das APC-Gen (*adenomatous polyposis coli*) kodiert für ein Protein welches als Untereinheit eines Degradationskomplexes (zusammen mit der Proteinkinase GSK-3 β und Axin) intrazelluläres β -Catenin deaktiviert und zum Abbau durch Proteasomen zwingt. β -Catenin kann somit nicht in den Nukleus eindringen und den Wnt-Signalweg aktivieren. Eine Unterexpression des APC-Gens führt somit zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs und dies wiederum zu einer erhöhten Proliferation, veränderten Adhäsion und Migration der Zelle [157]. Somit kann APC als Tumorsuppressorgen gelten. Alterationen im APC-Gen sind vor allem in der Genese von kolorektalen Tumoren bekannt (familiäre adenomatöse Polyposis, spontane kolorektale Karzinome, Gardner-Syndrom, etc.), wurden aber auch bei anderen Tumorentitäten beobachtet [158], [159]. In verschiedenen Studien konnte ein Verlust der Heterozygotie des APC-Gens (5q21) von ca. 40 % bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen nachgewiesen werden. Punktmutationen, die zu einer Inaktivierung des Gens führen, fanden sich jedoch nicht [160], [161]. Andererseits konnte aber eine gehäufte

Hypermethylierung des APC-Genpromotors in Lungenkarzinomen in vorausgegangenen Studien gezeigt werden [162]–[164]. Eine Hypermethylierung führt zu einer stark verminderten Expression des Gens durch eine Änderung der Chromatinstruktur und der damit verbundenen Verhinderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die CCAAT-Box [165]. Dies konnte auch für Lungenkarzinome und den APC-Genpromotor 1A nachgewiesen werden [162].

p16^{Ink4A}

p16^{Ink4A}, auch bekannt als CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), ist ein intrazelluläres Protein, das CDK4 und CDK6 (*cyclin-dependent kinase*) inhibiert und ist auf Chromosom 9p21.3 kodiert [166]. Der *p16/CyclinD1/CDK4/RB*-Signalweg (RB = *retinoblastoma protein*) spielt eine essentielle Rolle im Zellzyklus durch Inhibition des Übergangs von der G1- zur S-Phase. Normalerweise liegt RB hypophosphoryliert im Zytoplasma vor und kann in diesem Zustand den Transkriptionsfaktor E2F1 binden. RB kann durch den CyclinD1/CDK4-Komplex phosphoryliert werden, gibt dann den Faktor E2F1 frei, welcher wiederum in den Nukleus übertritt und die Transkription anstößt und somit die Zelle von der G1- in die S-Phase überführt [167], [168]. Da *p16^{Ink4A}* (CDKN2A) CDK4 inhibiert, kommt es bei verringerter Expression oder Inaktivierung von *p16^{Ink4A}* - z. B. durch Mutation, Deletion oder Hypermethylierung – zu einer gesteigerten Zellproliferation und ggf. zur Entstehung eines malignen Tumors [168]. Die Inaktivierung von *p16^{Ink4A}* spielt eine wesentliche Rolle bei einigen Malignomen [169]. Dies konnte für hereditäre Melanome [170], das Adenokarzinom des Pankreas [171], Karzinome des Magen-Darm-Traktes [172] und auch Lungenkarzinome nachgewiesen werden. Bei letzteren stellt die Hypermethylierung den hauptsächlichen Grund der *p16^{Ink4A}*-Inaktivierung dar [173].

RASSF1A

Die *ras-association domain family* (RASSF) beinhaltet 10 verschiedene Proteine (RASSF1 – RASSF10), welche sich durch die Gemeinsamkeit von speziellen Proteindomänen auszeichnen. Das Gen für RASSF1 (*ras-association domain family member 1*) liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p21.3) und kodiert für 7 verschiedene Isoformen RASSF1A – RASSF1G durch alternatives Splicing [174]. Der Promotor der RASSF1A-Isoform liegt innerhalb einer CpG-Insel und ist in vielen Tumorentitäten nachgewiesen hypermethyliert [175]. RASSF1A zählt mit seiner *ras-association domain* zu den Ras-Effektorproteinen, welche Ras binden und inaktivieren können [176]. Ras selbst ist eine membranständige GTPase, welche über den Ras/MAPK-Weg ein regulatorisches Element der Zellproliferation ist [177]. RASSF1A bindet zudem an Tubulin, stabilisiert des Mikrotubulinetzwerk der Zelle und ist damit auch regulatorisches Element der Mitose [178], [179]. Außerdem ist RASSF1A durch die Komplexbildung mit MOAP-1 (*modulator of apoptosis 1*) und Aktivierung von BAX [180], durch direkten Einfluss auf den *death receptor* sowie weiteren intrazellulären Regulationswegen massiv in die Apoptose der Zelle involviert [181]. Unter anderem durch die Interaktion mit Cyclin D1 hat RASSF1A zudem inhibitorischen Einfluss auf den Zellzyklus

[182]. Die Vielzahl an Interaktionen in den regulatorischen Signalwegen der Zelle macht deutlich, dass eine Inaktivierung von RASSF1A – z. B. durch eine Promotorhypermethylierung – zu einer Entartung dieser beitragen kann. Diese Inaktivierung von RASSF1A ist zuerst durch *Dammann et al.* für Lungen- und Mammakarzinome nachgewiesen worden [183]. Seitdem wurde die Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors in einer Vielzahl von Karzinomentitäten nachgewiesen, mit dem häufigsten Auftreten in hepatozellulären, kleinzelligen Lungen- und Prostatakarzinomen [184].

3-OST-2

Das 3-OST-2-Gen kodiert auf Chromosom 16p12 für eine O-Sulfotransferase, welche den letzten Schritt in der Modifikation von Glykosaminoglykanketten (GAG) katalysiert, welche wiederum Bestandteil von Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) sind [185]. HSPGs kommen ubiquitär in der extrazellulären Matrix sowie in der Membran von Säugetierzellen vor, und sind durch ihre Funktion als Co-Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (u. a. FGF = *fibroblast growth factor*, VEGF = *vascular endothelial growth factor*, HGF = *hepatocyte growth factor*), Zytokine und durch Bindung an die extrazelluläre Matrix (u. a. Kollagen, Laminin, Fibronectin) an Zellproliferation, -adhäsion und -migration entscheidend regulatorisch beteiligt [186], [187]. Ein Ausfall des letzten Schrittes in der Biosynthese von HSPGs, u. a. Sulfonierung an der 3-O-Position durch die 3-O-Sulfotransferase 2, bedeutet einen einschneidenden Funktionsverlust [187]. Eine Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors könnte diesen Funktionsverlust bewirken und wurde in verschiedenen malignen Erkrankungen beobachtet: Mammakarzinome [188], kolorektale Karzinome [188], [189], Magenkarzinome [190], Lungenkarzinome [94], [188], [191], Pankreaskarzinome [188], Prostatakarzinome [192] und Vorstufen (Dysplasien) von Zervixkarzinomen [193].

1.6.3.2 DNA-Hypomethylierung als Biomarker

In Abschnitt 1.5.1 wurde die physiologische Hypermethylierung von repetitiven Sequenzen sowie SINEs (*short interspersed nuclear elements*) und LINEs (*long interspersed nuclear elements*) des Genoms und ihrer Stabilisierung der DNA angesprochen [78]–[80]. *Ehrlich et al.* konnten zeigen, dass diese DNA-Abschnitte in Tumorzellen oft hypomethyliert sind [194]. Hypomethylierungen der DNA tragen über zwei Mechanismen zur Karzinogenese bei. Erstens führt eine Hypomethylierung zu einer erhöhten Transkription der DNA, was die Expression von Onkogenen bewirken kann. Zweitens führt sie zu einer Instabilität der DNA [195]. Chromosom 3 trägt wie in Abschnitt 1.4.1 erwähnt einige Tumorsuppressorgene (z. B. RASSF1A, FHIT, SEMA3B, SEMA3F und weitere). Eine Hypomethylierung, die zu einer Instabilität des Chromosoms führt, kann damit auch einen Verlust dieser Tumorsuppressorgene zur Folge haben. In Lungenkarzinomen zeigt sich eine Hypomethylierung vor allem in repetitiven Sequenzen (SINEs, LINEs, LTR *elements*, *segmental duplications* und *subtelomeric regions*), während nicht-repetitive Sequenzen weiterhin

hypermethyliert vorliegen [196].

1.6.3.3 DNMTs als Biomarker

DNA-Methyltransferasen und ihre Bedeutung für die DNA-Methylierung wurden in Abschnitt 1.5.1 schon angesprochen. Einige Studien haben gezeigt, dass die Aktivität der DNMTs in Lungenkarzinomzellen erhöht ist und dies mit einer erhöhten Tumoraggressivität und einer schlechten Prognose korreliert [197]–[199]. Eine Arbeit von *Kim et al.* zeigte, dass eine erhöhte Expression von DNMT1 Hinweise auf die Prognose von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen geben könnte [197]. *Lin et al.* konnten zeigen, dass eine aberrant hohe Expression von DNMTs in Lungenkarzinomen mit einer Vielzahl hypermethylierter Genpromotoren und zudem auch mit einer erhöhten Tumorprogression und schlechten Prognose korreliert [199].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Lungenkarzinom ist eine häufige Todesursache, seine Früherkennung ist aktuell unzureichend. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt insgesamt ca. 16 %, wobei diese stark vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose abhängt [10]. Die meisten malignen Lungenerkrankungen werden in einem Tumorstadium $> I$ diagnostiziert (TNM-Klassifikation, siehe Anhang), wobei die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium I bei 88 % liegt [13]. Der Früherkennung des Lungenkarzinoms kommt somit eine bedeutende Rolle zu.

In einer Arbeit dieses Instituts von *Schmiemann et al.* mit retrospektiven Design konnte ein 3-Marker-QMSP-Genpanel (APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A) zur Diagnostik von Lungenkarzinomen an Bronchialaspiraten von Patienten mit Verdacht auf eine maligne Lungenerkrankung etabliert werden [153]. Mit einer Sensitivität von 53 % und einer Spezifität von > 99 % stellte sich dieses QMSP-Genpanel als potentieller Biomarker in der Früherkennung von malignen Lungentumoren dar, der vor allem in Kombination mit der zytopathologischen und histopathologischen Diagnostik seinen Mehrwert zeigen konnte.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, das 3-Marker-Genpanel in einer weiteren Studie mit prospektivem Studieneinschluss und verblindeter retrospektiver Evaluation zu bestätigen und damit dessen Anwendung in der klinischen Routine in Verbindung mit der zytologischen Diagnostik aufzuzeigen. Zum anderen sollte das Panel um ein Gen (3-OST-2) erweitert werden, um dessen Sensitivität zu steigern. Ziel war es also ein Biomarkerpanel mit hoher Sensitivität und Spezifität zu etablieren, welches an wenig invasiv gewonnenem Untersuchungsmaterial (Bronchialaspiraten) Anwendung findet und damit zu einer besseren (früheren) und dennoch praktikablen Diagnostik des Lungenkarzinoms beiträgt.

Die Vorliegende Untersuchung bildete hierbei einen Arm der Studie von *Schramm et al.* [71]. Zusätzlich wurden hier weitere in der Cytopathologie etablierte Methoden (FISH und DNA-Bildzytometrie) parallel auf ihren diagnostischen Zugewinn hin untersucht (was aber nicht Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit ist). Die Ergebnisse dieser dreiarmligen Studie wurden bereits international publiziert [71].

2. Patienten und Materialien

2.1 Untersuchungsmaterial

Im Zeitraum von Mai 2008 bis Februar 2009 wurde fortlaufend von 843 Patienten mit Verdacht auf einen malignen Lungentumor im Rahmen der klinischen Routinediagnostik Untersuchungsmaterial aus der Abteilung für Pneumologie des Florence-Nightingale-Krankenhauses Düsseldorf gesammelt. Das Untersuchungsmaterial bestand aus Bronchialaspiraten, Bürstenabstrichen der Bronchuswand und transbronchialen Feinnadelaspirationsbiopsien aus peribronchialen Läsionen und Lymphknoten.

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (Quantitative Methylierungsspezifische PCR, QMSP) wurden lediglich Bronchialaspirate verwandt. Die im Folgenden beschriebene Aufarbeitung für die Krankenversorgung wurde von Mitarbeitern des Instituts für Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Die Bronchialaspirate wurden direkt nach ihrer Gewinnung mit Saccomannos-Fixativ im Verhältnis 1:5 versetzt und ins Institut für Cytopathologie geschickt. Hier wurde das Material für 15 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und das Sediment für 4 zytologisch-diagnostische Ausstriche verwandt. Die Ausstriche wurden gemäß Standardprotokollen für die Routinezytologie nach Papanicolaou gefärbt. Anschließend wurden die Ausstriche im Rahmen der Krankenversorgung von Pathologen des Instituts befundet. Hierbei erfolgte neben einer Klartextdiagnose (z. B. „das Zellbild entspricht einem mittelgradig differenzierten Adenokarzinom“) die Einteilung der Bronchialaspirate in diagnostische Kategorien gemäß des Vorliegens von zytologisch atypischen Zellen [200].

Es wurden folgende Diagnosekategorien unterschieden:

- *Diagnostisch unzureichend*: Das Untersuchungsmaterial erlaubt keine belastbare Diagnose, z. B. aufgrund falscher oder fehlender Fixierung oder starker Blutbeimengung mit Koagulation.
- *Negativ*: Das Untersuchungsmaterial enthält keine neoplastischen Zellen.
- *Zweifelhaft*: Das Untersuchungsmaterial enthält abnorme Zellen, ein maligner Tumor ist nicht auszuschließen. Diese Kategorie wird z. B. bei geringen oder mittleren Plattenepitheldysplasien gewählt, welche in der Nachbarschaft eines malignen Tumors vorkommen können.
- *Dringender Verdacht*: Das Untersuchungsmaterial enthält atypische Zellen, ein maligner Tumor ist wahrscheinlich. Meist liegen hier zu wenig atypische Zellen für eine sichere Tumordiagnose vor.
- *Positiv*: Sichere Diagnose eines meist malignen Tumors.

Das übrige Sediment wurde in Saccomannos-Fixativ resuspendiert und zunächst bei 4° C für die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit aufbewahrt.

2.2 Studiendesign und eigener Anteil

Studieneinschluss:

Diese Studie wurde als klinische Diagnosestudie mit prospektivem Einschluss und retrospektiver Evaluation (mit Teilaspekten einer Fall-Kontroll- sowie Kohortenstudie) angelegt und durchgeführt. Sie wurde durch die örtliche Ethikkommission geprüft und genehmigt (Votum Nr. 3059 vom 19.05.2008).

Es wurden nur Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen zum ersten Mal ein Verdacht auf ein Lungenkarzinom vorlag. Patienten in der Tumornachsorge wurden aus der Studie ausgeschlossen. Ebenso wurden diagnostisch unzureichende Proben nicht verwandt.

Insgesamt wurden 210 Patienten, entsprechend 210 Untersuchungsmaterialien, in die Studie eingeschlossen, und zwar jeweils 70 zeitlich aufeinanderfolgende Untersuchungsmaterialien der Diagnosegruppen zytologisch *positiv*, *negativ* und *diagnostisch unklar* (*dringend verdächtige* und *zweifelhafte Diagnosen* zusammengefasst). Im Falle der Einsendung mehrerer endobronchialer Untersuchungsmaterialien pro Patient wurde das diagnostisch relevante (= höchstgradig verdächtige oder positive) Untersuchungsmaterial eingeschlossen. Eine weitere Auswahl wurde nicht vorgenommen. (Flussdiagramm der Studie siehe Abb. 4.3).

Jedes Untersuchungsmaterial wurde im Rahmen der Studie mittels Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH), DNA-Bildzytometrie und Quantitativer Methylierungsspezifischer PCR (QMSP) untersucht. Die Untersuchungen mittels FISH und DNA-Bildzytometrie waren nicht Teil der vorliegenden Arbeit und sollen daher hier auch nicht näher beschrieben werden. Eine Publikation dieser Ergebnisse, aus der auch das methodische Vorgehen ersichtlich wird, ist aber zusammen mit den Ergebnissen der Promotorhypermethylierung der hier vorgelegten Untersuchungen bereits erfolgt, *Schramm et al.* [71]. Die Analyse der Promotorhypermethylierung der Gene APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A und 3-OST-2 mittels QMSP wurde ausschließlich vom Autor dieser Arbeit durchgeführt und erfolgte verblindet.

Follow-up, Referenzstandard:

Zur Erhebung des *uollow-up* erfolgte 6 Monate nach der zytologischen Diagnostik Einsicht in die Patientenakten aus dem Archiv des Florence-Nightingale-Krankenhauses Düsseldorf um den jeweiligen Referenzstandard zum Vergleich mit den o. g. Untersuchungen zu ermitteln:

1. *Positiver Referenzstandard*

- a. Histologische Diagnose an Biopsie oder reseziertem Gewebe positiv, oder
- b. Zytologische Diagnose der Kategorie *positiv* und zusätzlich dazu passende klinische Befunde (Bildgebung und Bronchoskopie) und Schlussfolgerung (z. B. eingeleitete tumorspezifische Therapie).

2. *Negativer Referenzstandard*

- a. Histologische Diagnose an Biopsie oder reseziertem Material negativ, oder zytologische Diagnose der Kategorie *Negativ* und zusätzlich dazu Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild.
- b. Kein Nachweis eines malignen Tumors innerhalb des *follow-up*-Zeitraums.

11 Monate nach zytologischer Diagnostik erfolgte eine zweite Einsicht in die Patientenakten um den Verlauf bis dahin unklarer, eventuell prämaligener Läsionen zu erfassen. Patienten, die bis zu diesem Zeitpunkt hinsichtlich des Referenzstandards nicht genau definiert werden konnten, wurden von der Studie ausgeschlossen (Flussdiagramm der Studie siehe Abbildung 4.3).

2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Reinheitsgrad	Hersteller	Bestellnummer
2-Propanol (Isopropylalkohol)	> 99,8 %	Merk KGaA, Darmstadt	109634
Agarose, Biozym LE	Keine Angabe	Biozym GmbH, Oldendorf	840004
Borsäure	> 99,5 %	Merk KGaA, Darmstadt	100165
Bromphenolblau	Keine Angabe	Merk KGaA, Darmstadt	108122
Ethidiumbromid	s. a. 2.4 Lösungen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	2218
Glycerin	> 99 %	Merk KGaA, Darmstadt	818709
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	> 99 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	8040.2
Ethanol absolut	> 99,9 %	Merk KGaA, Darmstadt	100983
Rifa 150 Dragees (Rifampicin)	Keine Angabe	Grünenthal GmbH, Aachen	Keine Angabe
Tris(hydroxymethyl)-aminoethan	> 99,1 %	Merk KGaA, Darmstadt	108382
Xylencyanol	Keine Angabe	Merk KGaA, Darmstadt	110590

Tabelle 2.1: Übersicht der verwandten Chemikalien.

2.4 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Proteinase K (solution), RNA Grade (20 mg/ml)	invitrogen™, Karlsruhe	25530-049

Tabelle 2.2: Übersicht der verwandten Enzyme.

2.5 Lösungen, Puffer und Sonstiges

Bezeichnung	Zusammensetzung		Hersteller
DNA-Ladepuffer für Gelelektrophorese	30 % v/v	Glycerin	Einzelheiten siehe 2.2 Chemikalien
	0,25 % w/v	Bromphenolblau	
	0,25 % w/v	Xylencyanol	
Ethidiumbromid-Lösung	1 % v/v (10 mg/ml)	Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Saccomannos-Fixativ	50 % v/v	Ethanol	Einzelheiten siehe 2.2 Chemikalien Grünenthal
	2 % w/v	Polyethylenglykol	
	60 mg/l	Rifampicin-Lösung (Rifa 150 Dragees zermörsern und mit 200 ml 50% Ethanol aus dem Mörser lösen)	
TBE-Puffer (1 x)	89 mM	Tris	Einzelheiten siehe 2.2 Chemikalien
	89 mM	Borsäure	
	2 mM	EDTA	

Tabelle 2.3: Übersicht der verwandten Lösungen und Puffer.

2.6 Molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	ZYMO RESEARCH, Orange, USA	D5006
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	12 239 272 001
PUREGENE™ DNA Purification System Cell & Tissue Kit	Gentra Systems, MN, USA (jetzt: Quiagen, Hilden)	D-5000A (jetzt: 158767)

Tabelle 2.4: Übersicht der verwandten molekularbiologischen Kits.

2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Elektrophorese-Netzteil: Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham pharmacia biotech AB, Uppsala, Schweden	Nicht mehr verfügbar
Gelkammer: PerfectBlue TM Gelsystem Mini L	peQLab GmbH, Erlangen	40-1214
PCR-Arbeitshaube: CleneCab plus [®]	Herolab GmbH, Wiesloch	30 00 200
PCR-Gerät: LightCycler [®] 1.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Nicht mehr verfügbar
PCR-Reaktionsgefäße: LightCycler [®] Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	04 929 292 001
Photometer: Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg	6132 000.008
Pipette: Reference [®] (variable) 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg	4910 000.018
Pipette: Reference [®] (variable) 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg	4910 000.042
Pipette: Reference [®] (variable) 100 – 1.000 µl	Eppendorf AG, Hamburg	4910 000.069
Pipettenspitzen: TipOne 0,1 – 10 µl XL Filter Tips (sterile)	Starlab GMBH, Ahrensburg	S1120-3810
Pipettenspitzen: TipOne 10 – 100 µl Bevelled Filter Tips (sterile)	Starlab GMBH, Ahrensburg	S1120-1840
Pipettenspitzen: TipOne 101 – 1.000 µl XL Filter Tips (sterile)	Starlab GMBH, Ahrensburg	S1122-1830
Reaktionsgefäße: Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg	0030 120.086
Reaktionsgefäße: Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg	0030 120.094
Thermomixer: Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg	5355 000.011
UV-Tisch: TFX-20.M, 254 / 312 nm	VILBER LOURMAT, Marne-la-Vallée, Frankreich	Nicht vorhanden
UVVette [®] (Photometerküvetten), 220 – 1.600 nm, 50 – 2.200 µl	Eppendorf AG, Hamburg	0030 106.300
Vortex: Minishaker Vibro-Fix VF2	IKA-Labortechnik, Staufen	Nicht mehr verfügbar
Zentrifuge: Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg	Nicht mehr verfügbar

Tabelle 2.5: Übersicht der verwandten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

2.8 Nukleinsäuren

2.8.1 Oligonukleotide: Primer und Sonden

Gen	Sequenzen	Accession No. (Gen-Bank)	Position	Annealing Temp. [°C]	Länge des Produktes [bp]
MYOD1	V: 5'-CCA ACT CCA AAT CCC CTC TCT AT-3'	AF027148	4860 - 5021	58	161
	R: 5'-TGA TTA ATT TAG ATT GGG TTT AGA GAA GGA-3'				
	S: 5'-6FAM-TCC CTT CCT ATT CCT AAA TCC AAC CTA AAT ACC T-TAMRA-3'				
APC	V: 5'-GAA CCA AAA CGC TCC CCA T-3'	U02509	761 - 834	58	74
	R: 5'-TTA TAT GTC GGT TAC GTG CGT TTA TAT-3'				
	S: 5'-6FAM-CCC GTC GAA AAC CCG CCG ATT A-TAMRA-3'				
P16	V: 5'-TGG AGT TTT CGG TTG ATT GGT T-3'	U12818	129 - 199	58	70
	R: 5'-AAC AAC GCC CGC ACC TCC T-3'				
	S: 5'-6FAM-ACC CGA CCC CGA ACC GCG-TAMRA-3'				
RASSF1A	V: 5'-GGT TTT GCG AGA GCG CGT-3'	AC002481	17883 - 18052	61	169
	R: 5'-GCT AAC AAA CGC GAA CCG AAC-3'				
	S: 5'-6FAM-GGA GGC GTT GAA GTC GGG GTT C-TAMRA-3'				
3OST2	V: 5'-TCG GCG TAC GTA AGA GTT TGG-3'	AF105375	(-)226 - (-)153	63	74
	R: 5'-ATC TCC CGA TCC TAA ACG ATA AAA-3'				
	S: 5'-6FAM-AGC GTT CGA GTC GTT CGG TTG TTC G-TAMRA-3'				

Tabelle 2.6: Übersicht der verwandten Oligonukleotide: Primer und Sonden.

V = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer, S = TaqMan®-Sonde.

2.8.2 DNA

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
100 bp DNA Ladder (1µg/µl)	invitrogen™, Karlsruhe	15628
CpGenome Universal Methylated DNA (10 µg)	CHEMICON International, Phillipsburg, USA (jetzt: Millipore, Billerica, USA)	S7821 (jetzt: S7821)
Nicht-methylierte DNA	Mundschleimhaut gesunder Probanden	

Tabelle 2.7: Übersicht der verwandten DNA.

3. Methoden

3.1 Extraktion von DNA aus nach Saccomanno fixierten Bronchialaspiraten

Die Isolierung der DNA aus dem Zellmaterial der Bronchialaspirate erfolgte mit dem „PUREGENE™ DNA Purification System Cell & Tissue Kit“ der Firma Gentra Systems nach den Angaben des Herstellers. Das Verfahren beruht auf einer Lyse der Zellen mit anschließender Reinigung der DNA durch Aussalzen der Proteine.

Vorbereitung des Zellmaterials

Das Zellmaterial, aufbewahrt in Saccomannos-Fixativ in 2,0 ml Reaktionsgefäßen bei 4° C, wurde mit 3.000 x g für 5 Minuten (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert, und der Großteil des Überstands vorsichtig abgekippt. Das verbliebene Zellmaterial wurde durch den Vortex im verbliebenen Rest des Saccomannos-Fixativ resuspendiert und 50 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert.

Zellyse

Die 50 µl Zellsuspension wurde mit 250 µl „Cell Lysis Solution“ versetzt. Außerdem wurden 1,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzu pipettiert. Proteinase K ist eine unspezifische Serinprotease, die bei der DNA-Extraktion Schutz vor endogenen Nukleasen (DNase, RNase) bietet, da sie diese zersetzt. Diese Lösung wurde bei 65° C (Temperaturoptimum der Proteinase K), 20 – 30 Minuten lang gemischt und inkubiert (Eppendorf Thermomixer).

Aussalzen der Proteine

Durch Hinzufügen von 100 µl „Protein Precipitation Solution“, Inkubation für 10 – 20 Minuten bei 5° C und anschließendem Zentrifugieren mit 16.000 x g für 3 Minuten (Eppendorf Tischzentrifuge), konnten die Proteine als festes Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ausgefällt werden.

Ausfällung und Waschen der DNA

Der Überstand des Reaktionsgefäßes aus Schritt 3 enthielt die zu isolierende DNA. Er wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß, das bereits 300 µl Isopropanol (100 % Vol.) enthielt, pipettiert und bei Raumtemperatur 5 Minuten lang inkubiert. Durch Zentrifugieren mit 16.000 x g für 5 Minuten (Eppendorf Tischzentrifuge) konnten die Nukleinsäureketten am Boden des Reaktionsgefäßes ausgefällt werden, der Überstand wurde verworfen. Durch Hinzufügen von 300 µl Ethanol (70 % Vol.) und einminütiges Zentrifugieren bei 16.000 x g (Eppendorf Tischzentrifuge) wurde der Ansatz gereinigt. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur im Reaktionsgefäß getrocknet.

Lösen der DNA

Durch Zugabe von 50 µl sterilem Aqua dest. wurde die DNA im Reaktionsgefäß über Nacht bei 4° C erneut in Lösung gebracht.

Lagerung der DNA-Lösung

Die DNA-Lösung wurde bei -20° C aufbewahrt.

3.2 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung

Die Konzentration der DNA in der Lösung wurde photometrisch (Eppendorf BioPhotometer) bei 260 nm folgendermaßen bestimmt:

$$c\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right] = OD_{260} \times V \times F$$

c = Konzentration der Ausgangslösung

OD₂₆₀ = Absorption bei 260 nm

V = Verdünnungsfaktor (entspricht in diesem Fall 1)

F = Multiplikationsfaktor (entspricht für dsDNA 50 µg/ml)

Proteine absorbieren elektromagnetische Strahlung bei 280 nm. Daher kann einer Verunreinigung der DNA-Lösung durch Proteine durch Bildung eines Quotienten aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ detektiert werden. Für Werte zwischen 1,8 und 2,0 gilt die Probe als proteinfrei.

3.3 Bisulfit-Konversion

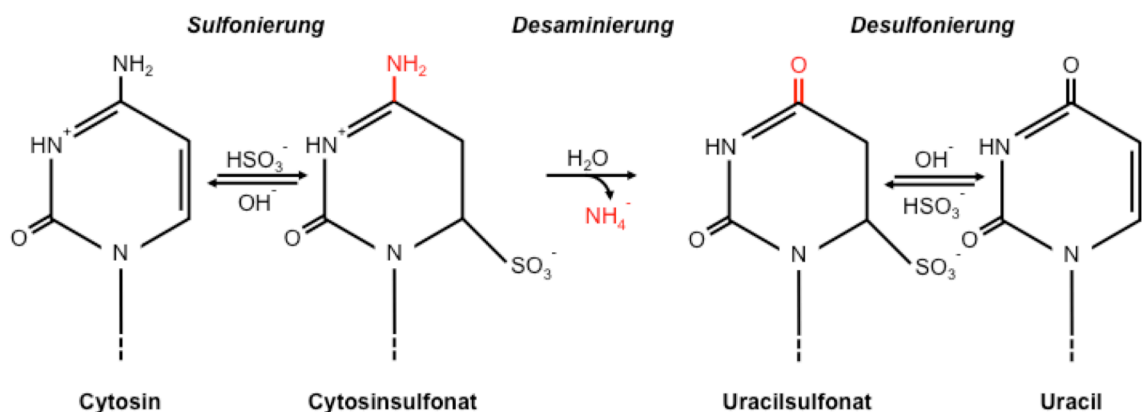


Abb. 3.1: Darstellung der Bisulfit-Konversion von Cytosin zu Uracil als Reaktionsgleichung in Strukturformeln
Der entscheidende Reaktionsschritt ist die hydrolytische Desaminierung an Position 4 des Pyrimidinrings (rot).

Die Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit katalysiert eine Desaminierung von Cytosinbasen zu Uracilbasen [151]. Dies zeigt Abb. 3.1 schematisch als Reaktionsgleichung. Cytosinbasen, welche am 5. Kohlenstoffatom eine Methylgruppe binden, d. h. methyliert sind, sind von der Umwandlung nicht

betroffen, wodurch sich methylierte und nicht-methylierte Cytosinbasen nach Konversion unterscheiden lassen [201]. Durch das richtige Design Methylierungsspezifischer Oligonukleotide (Primer und Sonden) lässt sich der Methylierungsstatus einzelner Genabschnitte nach erfolgter Bisulfit-Konversion mittels PCR untersuchen. Die Methylierungsspezifische PCR wurde, im Folgenden als MSP bezeichnet, methodisch von *Herman et al.* etabliert [150].

Die Bisulfit-Konversion wurde mittels „EZ DNA Methylation-Gold™ Kit“ der Firma ZYMO RESEARCH, nach Herstellerangaben und ohne Modifikationen, durchgeführt. Das Kit vereinigt die Bisulfit-Konversion mit anschließender Aufreinigung der DNA. Die Effizienz der Bisulfit-Konversion liegt bei > 99,9 % (Herstellerangaben EZ DNA Methylation-Gold™ Kit“, ZYMO RESEARCH).

Das Protokoll soll im Folgenden zur Erläuterung kurz skizziert werden. Nähere Angaben zu den Lösungen und Puffer des „EZ DNA Methylation-Gold™ Kit“ sind nicht möglich, da diese dem Patentschutz unterliegen.

Berechnung der DNA-Einsatzmenge

Es wurde jeweils 1 µg DNA eingesetzt. Durch die zuvor photometrisch bestimmte DNA-Konzentration (c , siehe Abschnitt 3.2) konnte das benötigte Volumen (V) errechnet werden:

$$V[\mu l] = \frac{1000 \text{ ng}}{c[\frac{\text{ng}}{\mu l}]}$$

Dieses Volumen wurde in ein 1,5 ml Reagenzgefäß pipettiert und mit sterilem Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt.

Vorbereitung des Materials

Zu der 20 µl DNA-Lösung wurde 130 µl „CT Conversion Reagent“ hinzugefügt. Das „CT Conversion Reagent“ musste vorher nach Herstellerangaben präpariert werden.

Denaturierung der DNA

Die Bisulfit-Konversion kann nur an denaturierter DNA erfolgen. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Erhitzen auf 98° C und Mischen für 10 Minuten (Eppendorf Thermomixer).

Inkubation mit Natriumbisulfit

Die Inkubation mit Natriumbisulfit (enthalten im „CT Conversion Reagent“ aus Schritt 1) erfolgte in zwei Phasen:

1. Erhitzen auf 64° C und Mischen für 2,5 Stunden (Eppendorf Thermomixer).
2. Abkühlen auf 4° C für 20 Stunden (Kühlschrank), hierbei renaturiert die DNA.

Aufreinigen der DNA

Durch Zusatz verschiedener im Kit erhaltener Puffer und wiederholtem Filtern der Lösung durch ein Säulensystem („Zymo-Spin™ IC Column“) wurde die DNA aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 20 µl sterilem Aqua dest. aus dem Filter des „Zymo-Spin™ IC Column“ in ein 1,5 ml Reagenzgefäß eluiert.

Lagerung der DNA-Lösung

Die Lösung der bisulfitkonvertierten DNA wurde bei -20° C aufbewahrt.

3.4 Quantitative Methylierungsspezifische PCR (QMSP)

3.4.1 Theoretische Grundlagen

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) stellt ein etabliertes Verfahren zur Amplifikation von bestimmten DNA-Sequenzen dar [202]. Der PCR-Reaktionsansatz besteht grundlegend aus einer thermostabilen DNA-Polymerase (meist Taq-Polymerase [203]), der Ausgangs-DNA (Template-DNA), zwei passenden Oligonukleotid-Primern, welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren und als Ausgangspunkte der Elongation durch die DNA-Polymerase dienen, Mononukleotiden von Purin- und Pyrimidinbasen und einem Magnesiumchlorid haltigem Puffer, in welchem die Reaktion abläuft.

Die PCR läuft in mehreren Zyklen ab (ca. 20 – 60, je nach Zweck der PCR). Ein Zyklus besteht aus drei Teilen: Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Um eine Denaturierung, d. h. eine Entwindung und Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge, zu erreichen, wird der PCR-Ansatz auf ca. 95° C erhitzt. Nach einer Abkühlung auf ca. 55 – 65° C (Temperaturoptimum der Primer, abhängig von ihren thermodynamischen Eigenschaften) hybridisieren die Primer mit der zu amplifizierenden denaturierten DNA. Erhitzt man den Ansatz dann auf ca. 72° C (Temperaturoptimum der Taq-Polymerase) beginnt die Elongation, die DNA-Polymerase beginnt am 3'-Ende des Primer in 5'→3'-Richtung einen DNA-Strang komplementär zum Ausgangsstrang zu synthetisieren.

Um eine bestimmte, vielleicht nur wenige hundert Basenpaare lange, DNA-Sequenz zu amplifizieren, benötigt man zwei verschiedene Oligonukleotid-Primer, einen komplementär zum codogenen Strang und einen komplementär zum nicht-codogenen Strang. Amplifiziert wird im Laufe der PCR diejenige DNA-Sequenz, welche zwischen den beiden Primern liegt. Die Primer werden dabei nach thermodynamischen Gesichtspunkten erstellt (Länge, Lage auf der Quell-DNA, Nukleotidsequenz und Hybridisierungs-Temperatur), um z. B. Haarnadelbildungen oder ein Binden der Primer untereinander zu reduzieren.

Die Methylierungsspezifische PCR (MSP) bietet eine Möglichkeit zum Nachweis differentiell-hypermethylierter DNA-Sequenzen [150], [152]. Eine Methylierung erfolgt durch DNA-Methyltransferasen gezielt an Cytosin in CpG-Dinukleotiden. CpG-Dinukleotide sind im gesamten humanen Genom statistisch unterrepräsentiert, kommen aber in den Promotorregionen von etwa 60 % der menschlichen Gene vermehrt vor. Die Methylierung geschieht sowohl physiologisch, z. B. im Rahmen von Alterung, als auch bei der malignen Transformation von Zellen. Im letzteren Fall liegt oft ein sehr dichtes Methylierungsmuster vor, d. h. fast alle CpG-Dinukleotide eines bestimmten untersuchten Gens sind methyliert. Durch Promotorhypermethylierung kann die Genexpression herunterreguliert werden (z. B. bei Tumorsuppressorgenen). Die Bisulfit-Konversion (siehe Abschnitt 3.3) schafft durch Umwandlung der Cytosin- in Uracilbasen eine Sequenzänderung der DNA. Sind die

Cytosinbasen der CpG-Dinukleotide methyliert, werden diese nicht von der Bisulfit-Konversion erfasst. Speziell entwickelte Primer können somit Methylierungs-spezifisch binden und die DNA-Sequenz wird durch die PCR nur bei hohem Methylierungsstatus amplifiziert. Abb. 3.2 zeigt dies schematisch.

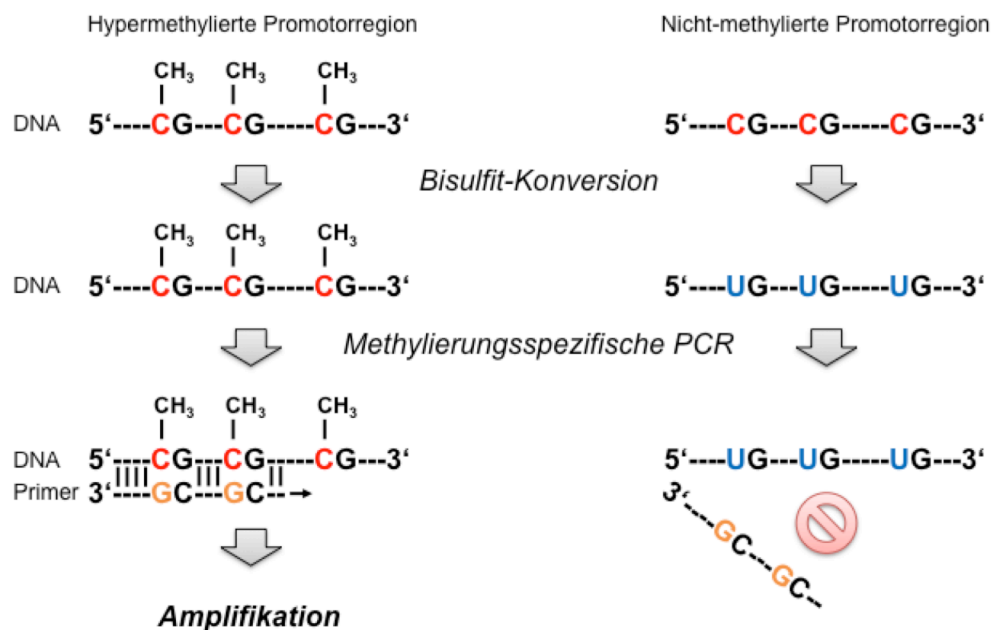


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Methylierungsspezifischen PCR

5-Methylcytosin bleibt bei der Behandlung mit Natrium-Bisulfit unverändert (links), während unmethylierte Cytosinbasen in Uridinbasen umgewandelt werden (rechts). Im Zuge der MSP binden die Methylierungsspezifischen Primer nur an methylierte (links), jedoch nicht an unmethylierte, nun in der DNA-Sequenz veränderte Promotorregionen (rechts). Eine Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts findet somit nur im Falle seiner Hypermethylierung statt. C = Cytidin, U = Uridin, G = Guanodin, CH₃ = Methylgruppe.

Bei der QMSP kommt eine sog. TaqMan[®]-Sonde zum Einsatz, welche ebenfalls Methylierungsspezifisch im Bereich zwischen den beiden Primern bindet. Diese Methode wurde im Jahr 2000 von *Eads et al.* etabliert [149]. Die TaqMan[®]-Sonde ist ein Oligonukleotid, welches am 5'-Ende einen sog. *Reporter* und am 3'-Ende einen sog. *Quencher* besitzt. Das 3'-Ende ist mit einer Phosphatgruppe versehen, damit die Sonde nicht als Primer fungieren kann und eine Elongation durch die DNA-Polymerase verhindert wird. Der *Reporter* (z. B. FAM) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz in Anwesenheit vom *Quencher* (z. B. TAMRA) unterdrückt wird. Hierbei dient nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) die emittierte Strahlung des Reporters bei räumlich enger Lagebeziehung zum *Quencher* zur Anregung desselben und wird damit absorbiert. Im Verlauf der PCR hybridisieren Primer und Sonde an die Template-DNA und die DNA-Polymerase beginnt die Neusynthese des komplementären DNA-Stranges am 3'-Ende des Primers. Trifft die DNA-Polymerase im Verlauf auf die Sonde, wird diese durch die 5'→3'- Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase zerschnitten; *Reporter* und *Quencher* werden somit räumlich getrennt, das Fluoreszenzsignal des Reporters wird nicht mehr unterdrückt und somit messbar (siehe Abb. 3.3). Eine

Quantifizierung des Methylierungsnachweises eines Zielgens wird durch die proportionale Zunahme der Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der Reaktion mit der Bildung des PCR-Produktes möglich oder weniger genau durch Endpunktanalyse der Fluoreszenz und Vergleich mit einem konstitutionell exprimierten nicht-methylierten Genpromotorabschnitt (z. B. von MYOD1).

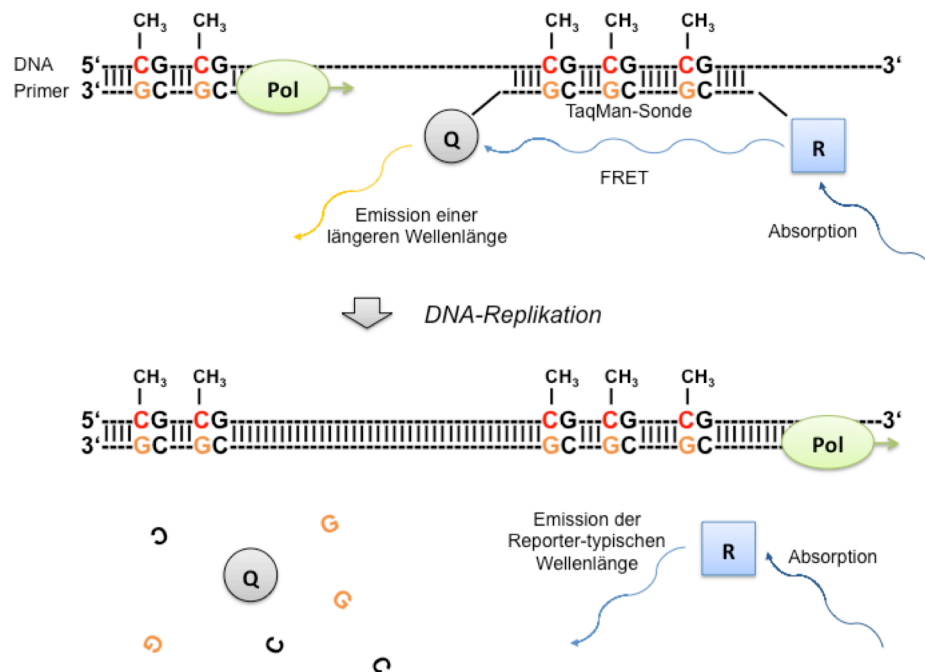


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise der TaqMan®-Sonde

Die TaqMan®-Sonde bindet spezifisch an hypermethylierte Promotorregionen und zwar zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer. In diesem Stadium wird die Fluoreszenz des Reporters (5'-Ende der Sonde) durch die enge räumliche Beziehung des Quenchers (3'-Ende der Sonde) unterdrückt, genauer in eine längere Wellenlänge überführt (oben). Beginnt die Taq-Polymerase nun die DNA-Replikation wird die Sonde durch deren 5'-3'-Exonuklease-Aktivität zerstört, Quencher und Reporter freigesetzt und somit räumlich getrennt. Der Reporter fluoresziert nun in seiner typischen Wellenlänge (unten). C = Cytidin, G = Guanosin, CH₃ = Methylgruppe, Pol = Taq-Polymerase, Q = Quencher, R = Reporter, FRET = Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer.

3.4.2 Anwendung in der vorliegenden Studie

Der Methylierungsstatus wurde mittels QMSP nach Bisulfit-Konversion der DNA an den Promotorregionen folgender Gene untersucht: APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A und 3-OST-2 (siehe Abschnitt 1.6.3.1). Die Durchführung der QMSP wurde mit dem „LightCycler® 1.5“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), dem PCR-Ansatz-Kit „LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und den PCR-Reaktionsgefäßen „LightCycler® Capillaries (20 µl)“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) realisiert. Näheres zu den DNA-Sequenzen der Primer und Sonden siehe Tabelle 2.6.

Von jeder Probe wurde eine DNA-Sequenz (161 bp) aus dem Promotorbereich des MYOD1-Gens (*myogenic differentiation antigen 1*) amplifiziert. Dieser Bereich enthält keine CpG-Dinukleotide und

diente damit als interne Qualitätskontrolle der Bisulfit-Konversion. Außerdem galt MYOD1 als Referenzgen für die Endpunktanalyse der Gene APC und 3-OST-2 (siehe Abschnitt 3.4.5).

Jeder QMSP-Lauf enthielt zur Validierung eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle und einen Leerwert. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um enzymatisch vollständig methylierte DNA (CpGenome™ Universal Methylated DNA, CHEMICON® INTERNATIONAL). Bei der Negativkontrolle handelte es sich um nicht-methylierte DNA (Mundschleimhautzellen). Beim Leerwert handelte es sich um einen PCR-Ansatz ohne DNA zur Überprüfung der Reinheit der verwendeten Reagenzien sowie der technisch sauberen Durchführung.

3.4.3 PCR-Ansatz

Alle nötigen Geräte, Materialien und Reagenzien (z. B. Pipetten, 1,5 ml Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, etc.) wurden vor jeder Herstellung des PCR-Ansatzes mit UV-Strahlung (CleneCab plus® PCR-Arbeitshaube, Herolab) für 30 Minuten (entspricht 12,6 Joule) sterilisiert, um Verunreinigungen des PCR-Ansatzes zu vermeiden. Der PCR-Ansatz wurde danach unter der PCR-Arbeitshaube pipettiert.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes gestaltete sich folgendermaßen (die Volumenangaben beziehen sich auf eine Probe):

Komponente	Spezifikationen	Volumen 1 [µl]	Volumen 2 [µl]
Wasser	Bestandteil des PCR-Kits, PCR-Reinheitsgrad	10,6	9,4
bisulfitkonvertierte DNA	2 µl der DNA-Lösung nach Bisulfit-Konversion entsprechen ca. 50 ng DNA	2,0	2,0
Vorwärts-Primer	Konzentration: 0,01 mM	1,2	1,2
Rückwärts-Primer	Konzentration: 0,01 mM	1,2	1,2
TaqMan®-Sonde	Konzentration: 0,004 mM	1,0	1,0
MgCl ₂	Bestandteil des PCR-Kits, Konzentration: 25 mM	2,0	3,2
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	Bestandteil des PCR-Kits, enthält u.a. DNA-Polymerase, Nukleotide	2,0	2,0
Gesamt		20,0	20,0

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.

Volumen 1: MYOD1, APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A. Volumen 2: 3-OST-2 (hier wurden stringenter Reaktionsbedingungen durch Erhöhung der MgCl₂-Konzentration geschaffen).

3.4.4 PCR-Bedingungen

1. Denaturierung der DNA

Der PCR-Ansatz wurde für 10 Minuten auf 95° C erhitzt.

2. Amplifizierung

In jeweils 60 Zyklen wurde die DNA amplifiziert. Ein Zyklus bestand aus Denaturierung, Hybridisierung von Primern und Sonde sowie Elongation durch die DNA-Polymerase. Die genauen PCR-Bedingungen für die einzelnen Gene zeigt folgende Tabelle:

	MYOD1, APC, p16 ^{Ink4A}	RASSF1A	3-OST-2
Denaturierung	95°C, 10 Sekunden	95°C, 10 Sekunden	95°C, 10 Sekunden
Hybridisierung	58°C, 5 Sekunden	61°C, 5 Sekunden	63°C, 5 Sekunden
Elongation	72°C, 8 Sekunden	72°C, 12 Sekunden	72°C, 8 Sekunden

Tabelle 3.2: PCR-Bedingungen für die untersuchten Gene MYOD1, APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A und 3-OST-2.

Die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur (*annealing temperature*) bei RASSF1A und 3-OST-2 hatte den Zweck, dass Primer und Sonde abhängig vom Methylierungsstatus spezifischer an die Template-DNA binden.

3. Abkühlung

Der PCR-Ansatz wurde auf 40° C heruntergekühlt.

3.4.5 Auswertung

Die Ergebnisse der QMSP wurden für die Untersuchung des Methylierungsstatus des APC Promotors mittels Endpunkt-Analyse unter Verwendung eines in unserer Arbeitsgruppe bereits vorab bestimmten Schwellenwertes (*cut-off*-Level) ermittelt [154]. Das Methylierungslevel wurde definiert als Verhältnis der absoluten Werte des Endpunktes des Zielgens zum Endpunkt des Referenzgens:

$$\text{Methylierungslevel [\%]} = \frac{\text{Endpunkt Zielgen APC}}{\text{Endpunkt Referenzgen MYOD1}} \times 100$$

Das *cut-off*-Level für das Zielgen APC wurde auf Basis der Publikation von *Grote et al.* auf 35 % festgelegt [154]. Alle Werte ≥ 35 % wurden als positiv gewertet. Die Ergebnisse der QMSP für die Untersuchung des Methylierungsstatus der Promotoren der Zielgene p16^{Ink4A} und RASSF1A wurden

mittels Kreuzpunkt-Analyse (Crossing Point) bestimmt. Alle Werte > 0 wurden als positiv gewertet. Sobald einer der drei Methylierungsmarker (APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A) nach den o. g. Kriterien positiv gewertet wurde, galt das untersuchte Bronchialaspirat als Test-positiv.

Ob die Methylierungsanalyse des 3-OST-2 Promotors nach der Kreuzungspunkt- oder Endpunktanalyse erfolgen musste, wurde - ggf. unter Etablierung eines optimalen *cut-off*-Levels - in dieser Arbeit untersucht (siehe Abschnitt 4.4).

Abb. 3.4 zeigt beispielhaft Graphen entsprechender QMSP-Läufe, die zur Auswertung dienen.

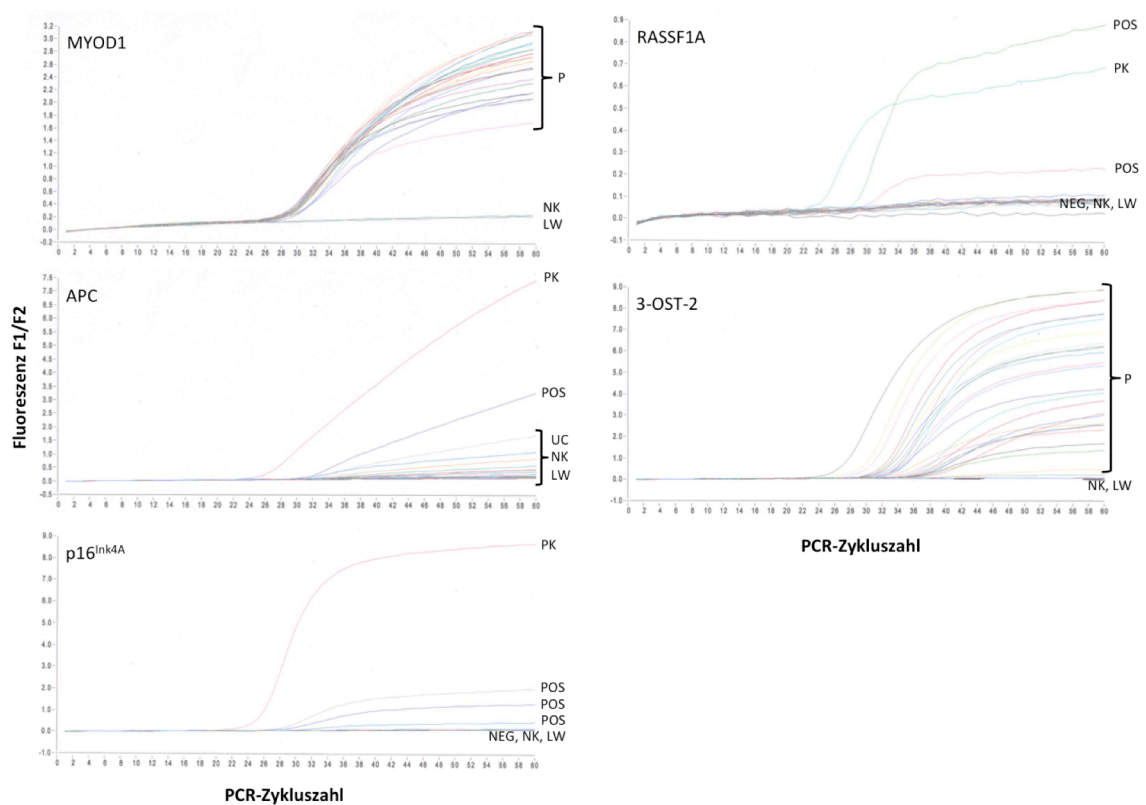


Abb. 3.4: Beispielhafte Darstellung von QMSP-Läufen der untersuchten Genpromotoren (APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A und 3-OST-2) und des Referenzgens MYOD1.

Ordinate = Fluoreszenz der Sonde, Abszisse = PCR-Zykluszahl. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle, LW = Leerwert (PCR-Ansatz ohne DNA), P = Probe, POS = Positive Probe, NEG = negative Probe.

3.5 Qualitätskontrolle der QMSP

3.5.1 Gelelektrophorese des PCR-Produkts

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung verschieden großer und verschieden geladener Moleküle nach Anlegen einer Spannung durch ein Poren enthaltendes Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Negativ geladene Moleküle (DNA ist durch enthaltene Phosphatgruppen insgesamt negativ geladen) wandern durch die Poren des Gels zur Anode, positiv geladene Moleküle zur Kathode. Kleinere Moleküle wandern schneller als größere Moleküle.

Die Auftrennung des PCR-Produktes durch Gelelektrophorese diente der Überprüfung der Anzahl verschiedener, amplifizierter DNA-Sequenzen pro QMSP-Ansatz über die Anzahl der sichtbaren Banden (gewünscht war nur eine amplifizierte DNA-Sequenz, nämlich die durch Einsatz der spezifischen Primer erwartete), sowie der Länge der amplifizierten DNA-Sequenz durch Vergleich mit einem bekannten Längenstandard (100 bp DNA-Leiter).

Die Gelelektrophorese erfolgte mittels Agarose-Gel (3 % Vol. Agarose) in einem TBE-Puffer (1 x). Der Agarose-Anteil von 3 % wurde so hoch gewählt, um eine möglichst scharfe Auftrennung der PCR-Produkte auch im Bereich von < 100 bp zu erhalten. Das PCR-Produkt wurde mit 1/5 Volumen DNA-Ladepuffer (2 µl Ladepuffer auf 10 µl PCR-Produkt) versetzt und 10 µl hiervon in eine Gelkammer hinein pipettiert. Die Elektrophoresebedingungen waren wie folgt: 100 V, 100 mA für 90 Minuten (Elektrophorese-Netzteil, amersham pharmacia biotech; Gelkammer, peQLab Biotechnologie GmbH).

Das Agarose-Gel enthielt Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml (Zugabe nach Aufkochen der Agarose-TBE-Lösung in der Mikrowelle, und vor dem Gießen des Gels), um die DNA-Sequenzen sichtbar zu machen. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert danach durch Anregung mit UV-Licht (UV-Tisch TFX-20.M, 254 / 312 nm, VILBER LOURMAT). Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte eine Fotodokumentation unter UV-Licht.

Die Gelelektrophorese erfolgte aus jedem QMSP-Lauf. In keinem Fall zeigte sich ein von seiner erwarteten Länge abweichendes PCR-Produkt oder mehrere Banden in der Elektrophorese. Abb. 3.3 zeigt exemplarisch eine Gelelektrophorese aus einem QMSP-Lauf für den APC-Genpromotor.

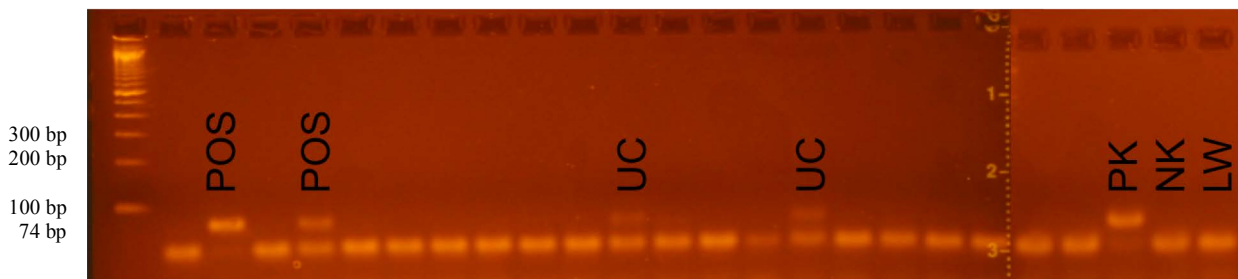


Abbildung 3.5: Gelelektrophorese eines QMSP-Laufs des APC-Genpromotors.

Von links: DNA-Leiter (100bp), 21 Patientenproben, Positivkontrolle (PK), Negativkontrolle (NK), Leerwert (LW = reiner PCR-Ansatz ohne DNA). Die untere Bande beinhaltet Primer und Sonden des PCR-Ansatzes (siehe LW). Die obere Bande stellt das PCR-Produkt dar, in diesem Fall APC mit einer Länge von 74 bp. POS = positiver Fall, UC = Fall unterhalb des QMSP-Cut-Off-Levels.

3.5.2 Sequenzierung des PCR-Produktes

Zur Kontrolle der amplifizierten Basensequenz wurde das QMSP-Produkt stichprobenartig zur Sequenzierung an das BMFZ der Universität Düsseldorf gegeben (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf). Die Sequenzierungsanalyse zeigte in jeder Stichprobe des QMSP-Produktes der einzelnen Genpromotoren (APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A, 3-OST-2) die erwartete Basensequenz.

3.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Hypermethylierung der einzelnen Genpromotoren (APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A) wurden diese in nicht-methyliert (benigne) und methyliert (maligne) dichotomisiert. Unterschiede in unverbundenen Gruppen wurden mittels Fishers exaktem Test (Fisher's Exact Test), einer Abwandlung des Chi-Quadrat-Tests für kleine Stichproben, auf Signifikanz untersucht. Unterschiede in verbundenen Gruppen wurden mittels McNemar-Test untersucht. Die Bedingungen für beide Tests waren die Folgenden: Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ und Power $\beta = 0,80$.

Die Ergebnisse des 3-OST-2-Genpromotors wurden mittel ROC-Analyse (*receiver operating characteristic*) untersucht, um ein *cut-off*-Level definieren zu können. Erläuterungen hierzu siehe Abschnitt 4.4.

4. Ergebnisse

4.1 Auswertung und Darstellung des Patientenkollektivs (*follow-up*)

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über das Patientenkollektiv und beschreibt dessen Verteilung hinsichtlich Alter, Geschlecht, Raucher-Status, Tumorstadium, Tumorlokalisation und histo- bzw. zytogenetischer Klassifikation.

	Benigne Lungenerkrankungen (n = 63)	Primäre maligne Lungentumoren (n = 124)	Andere (n = 23)
Alter	65 (26-88)	66 (34-88)	66 (26-83)
Geschlecht			
Weiblich	30 (48)	48 (39)	7 (30)
Männlich	33 (52)	76 (61)	16 (70)
Raucher-Status			
Raucher	34 (54)	100 (81)	8 (35)
Packyears	40 (6-150)	40 (10-150)	40 (30-60)
Niemals geraucht	10 (16)	10 (8)	5 (22)
Keine Daten	19 (30)	14 (11)	10 (43)
Tumorstadium ^a			
0		1 (1)	
IA		4 (4)	
IB		14 (13,5)	
IIB		5 (5)	
IIIA		13 (12,5)	
IIIB		27 (26)	
IV		37 (36)	
Nicht eindeutig ^b		2 (2)	
Limited disease		7 (35)	
Extensive disease		13 (65)	
Tumorlokalisation			
Zentral		84 (68)	
Peripher		38 (30,5)	
Sonstige ^c		2 (1,5)	
Histologie / Cytologie ^d			
SCC		31 (25)	0 (0)
AC		52 (42)	5 (22)
oNSCLC		17 (14)	2 (8,5)
SCLC		20 (16)	0 (0)
cSCLC		3 (2)	0 (0)
Sonstige ^e		1 (1)	16 (69,5)

Tabelle 4.1: Übersicht des Patientenkollektivs (verändert übernommen aus *Schramm et al.* [74]).

Die Daten stellen den jeweiligen Median (Grenzen) oder n (%) dar. SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; SCLC = Kleinzelliges Lungenkarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbares / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; cSCLC = kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom.

^a Tumorstadium nach UICC-Klassifikation (siehe Anhang); das Tumorstadium ist hier ausschließlich für Patienten mit einem primären Lungenkarzinom angegeben. ^b Tumorstadium nicht eindeutig: Ein Patient verstarb, ein anderer verließ das Krankenhaus vor Abschluss des Stagings. ^c Tumorlokalisation nicht eindeutig: Bei einem Patienten wurde ein diffus metastasiertes SCLC festgestellt, ein anderer Patient zeigte ein nodal metastasiertes histogenetisch pulmonales AC ohne bekannten Primärherd. ^d Die Tumorklassifikation wurde in 9 Fällen ausschließlich auf der Grundlage der zytologischen Diagnostik festgelegt. ^e Primäres pulmonales Sarkom (in Kategorie der primären malignen Lungentumoren). Andere: Siehe Erläuterungen im Text.

Zu den Patienten mit *benignen Lungenerkrankungen* (n = 63) zählten solche mit akuter oder chronischer Bronchitis (35), Pneumonie (9), interstitiellen Lungenerkrankungen (7), Vernarbungen (3), pulmonaler Embolie (3), Pleuritis (1), Hämoptysen (1), Atelektasen (1), gastroösophagealem Reflux (1), Hamartom (1) oder mediastinalem Neurinom (1).

Die zweite Gruppe beinhaltete ausschließlich Patienten mit *primären malignen Tumoren der Lunge* (n = 124). Die Verteilung der einzelnen Tumorentitäten ist in Abb. 4.1 dargestellt. Das exakte Tumorstadium (UICC-Klassifikation, siehe Anhang) konnte bei 2 Patienten nicht genau ermittelt werden. Ein Patient verstarb, ein anderer verließ das Krankenhaus bevor das Staging abgeschlossen werden konnte. Bei weiteren zwei Patienten war die Tumorlokalisation nicht eindeutig. Einer dieser Patienten war an einem diffus metastasierten, kleinzelligem Lungenkarzinom erkrankt, ein anderer an einem histogenetisch pulmonalen Adenokarzinom mit mediastinalen und zervikalen Metastasen, jedoch ohne bekannten pulmonalen Primärherd. Ein Patient zeigte eine seltene Histologie, die eines primären Lungensarkoms.

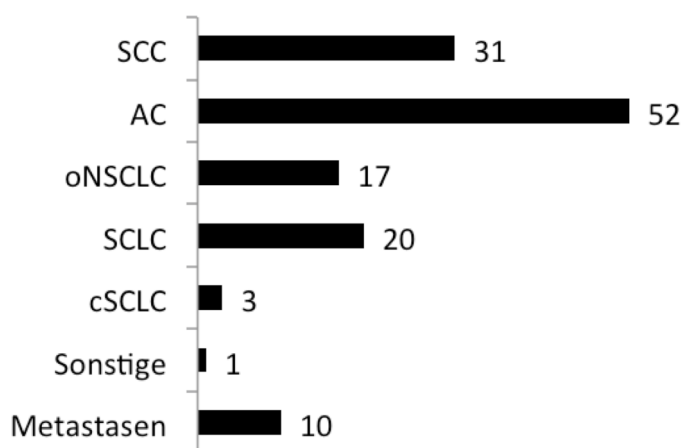


Abb. 4.1: Verteilung maligner Lungentumoren im Patientenkollektiv.
 SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbares / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; cSCLC = kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. Sonstige: primäres Lungensarkom. Metastasen: Patienten dieser Gruppe sind in Tabelle 4.1 sowie im Text aufgeschlüsselt.

Die Gruppe *Andere* (n = 23) umfasst u. a. Patienten mit pulmonal metastasierten extrapulmonalen Karzinomen. Zu diesen zählten kolorektale Karzinome (n = 3), ein Magen-, ein Mamma-, ein Vulva- und ein Zervix-Karzinom. Außerdem sind hier eine Lungenbeteiligung bei Non-Hodgkin-Lymphom (n = 2), ein atypisches Karzinoid, ein metastasiertes malignes Melanom sowie Patienten ohne gültigen Referenzstandard (n = 12) klassifiziert. Bei 5 Patienten aus der Gruppe derer ohne Referenzstandard fehlte die Patientenakte, 2 Patienten starben während der Diagnoseerhebung, bei 2 weiteren Patienten zeigte das *follow-up* keine Erstdiagnose eines Lungenkarzinoms (Studienausschlusskriterium), wiederum 2 Patienten lehnten weitere Schritte zur Ermittlung einer Diagnose ab und ein Patient wurde

aufgrund einer lediglich tumorverdächtigen, zytologischen Diagnose therapiert. Die definierten Kriterien eines positiven Referenzstandards wurden im letzten Fall somit nicht erreicht.

4.1.1 Mittels QMSP auswertbare Fälle des Patientenkollektivs

In insgesamt 9 Fällen entsprach der Abnahmeort des für die späteren Untersuchungen mittels QMSP vorliegenden Materials nicht dem Abnahmeort des Untersuchungsmaterials zur Ermittlung der Malignität des Befundes. Diese Fälle wurden in der folgenden Auswertung nicht berücksichtigt. In 14 weiteren Fällen war der DNA-Gehalt des Untersuchungsmaterials nach Extraktion (siehe Abschnitt 3.1) zu gering. Auch diese 14 Patienten wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Insgesamt verblieb für die Auswertung mittels QMSP (APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A, 3-OST-2) ein Kollektiv mit 178 Patienten. Von diesen 178 Patienten wiesen 117 einen malignen Lungentumor (108 einen primären, 9 einen malignen Lungentumor andere Genese) auf, 61 Patienten zeigten eine benigne Lungenerkrankung. Abbildung 4.2 gibt einen Überblick über die Verteilung der Tumorentitäten in der Gruppe der malignen Lungentumoren.

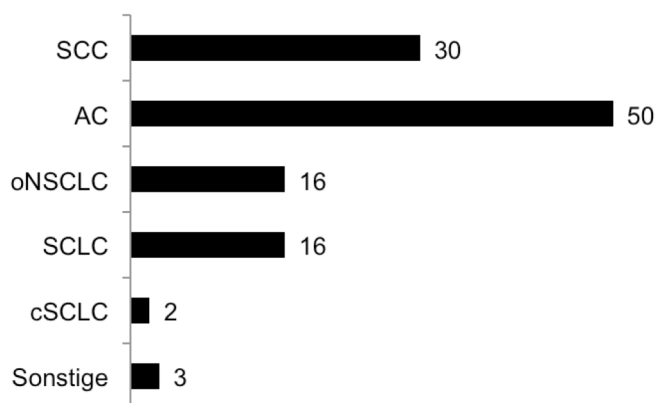


Abb. 4.2: Verteilung der Tumorentitäten in der Gruppe der malignen Lungentumoren (mittels QMSP auswertbare Fälle).

SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbares / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; cSCLC = kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. Sonstige: 2 Non-Hodgkin-Lymphome, 1 Sarkom.

Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die klinischen Daten der 117 Patienten mit malignen Lungentumoren und 61 Patienten mit benigner Lungenerkrankung, die mittels QMSP auswertbar waren.

	Benigne Lungenerkrankungen (n = 61)	Primäre maligne Lungentumoren (n = 108)	Andere (n = 9)
Alter			
< 65 Jahre	31 (51)	51 (47)	4 (44)
≥ 65 Jahre	30 (49)	57 (53)	5 (56)
Geschlecht			
Weiblich	30 (49)	43 (40)	6 (67)
Männlich	31 (51)	65 (60)	3 (33)
Raucherstatus			
Raucher	33 (54)	90 (83)	2 (22)
Niemals geraucht	10 (16)	6 (6)	4 (44)
Keine Daten	18 (30)	12 (11)	3 (33)
Tumorstadium ^a			
0		1 (1)	
IA		3 (3)	
IB		12 (11)	
IIB		5 (5)	
IIIA		11 (10)	
IIIB		24 (22)	
IV		33 (31)	
Sonstige ^b		3 (3)	
Limited disease		5 (5)	
Extensive disease		11 (10)	
Tumorlokalisation			
Zentral		73 (68)	
Peripher		34 (31)	
Sonstige ^c		1 (1)	
Histologie / Zytologie ^d			
SCC		30 (28)	
AC		45 (42)	5 (56)
NSCLC		14 (13)	2 (22)
SCLC		16 (15)	
cSCLC		2 (2)	
Sonstige ^e		1 (1)	2 (22)

Tabelle 4.2: Übersicht des Patientenkollektivs (mittels QMSP auswertbare Fälle).

Die Daten stellen n (%) dar. SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbares / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; cSCLC = kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom.

^a Tumorstadium nach UICC-Klassifikation (siehe Anhang); das Tumorstadium ist hier ausschließlich für Patienten mit einem primären Lungenkarzinom angegeben. ^b Tumorstadium nicht eindeutig: Ein Patient verstarb, ein anderer verließ das Krankenhaus vor Abschluss des Stagings; ein Patient mit einem pulmonalen Sarkom. ^c Tumorlokalisation nicht eindeutig: Bei einem Patienten wurde ein diffus metastasiertes SCLC festgestellt. ^d Die Tumorklassifikation wurde in 9 Fällen ausschließlich auf der Grundlage der zytologischen Diagnostik festgelegt. ^e Ein Patient mit einem pulmonalen Sarkom (primäre maligne Lungentumoren), 2 Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom (andere).

Der Median der Altersverteilung aller auswertbaren 178 Personen lag bei 65 Jahren. 86 (48 %) dieser Personen hatten zum Zeitpunkt der Probenentnahme das 65. Lebensjahr noch nicht erreicht, 92 Personen (52 %) hatten das 65. Lebensjahr erreicht oder überschritten. Aus der Gruppe der Personen mit primären malignen Lungentumoren (n = 108) hatten 51 (47 %) das 65. Lebensjahr noch nicht erreicht, 57 Personen (53 %) waren 65 Jahre oder älter.

Von den auswertbaren 178 Personen waren 99 männlich (56 %) und 79 weiblich (44 %). In der Gruppe der Personen mit primären malignen Lungentumoren (n = 108) fanden sich 65 Männer (60 %) und 43 Frauen (40 %).

Hinsichtlich des Rauchens konnte in der Studie nur zwischen Rauchern und Nichtrauchern (niemals geraucht) unterschieden werden. Eine weitergehende Differenzierung, z. B. nach Anzahl der

Packyears, war aufgrund der Daten des *follow-up* nicht sicher möglich. Unter den 178 auswertbaren Fällen war von 145 Personen der Raucherstatus bekannt. 125 (86 %) davon waren Raucher, 20 (14 %) Nichtraucher. In der Gruppe der Personen mit primär malignem Lungentumor gab es 96 auswertbare Fälle mit 90 (94 %) Rauchern und 6 (6 %) Nichtrauchern. Von den Nicht-Tumorpatienten (n = 43) waren 33 (77 %) Raucher und 10 (23 %) Nichtraucher.

Aus der Gruppe der Personen mit primär malignem Lungentumor zeigten 73 Personen (69 %) einen zentralen und 34 Personen (31 %) einen peripheren Befund, bei einer Person mit einem diffus metastasierenden, kleinzelligen Lungenkarzinom war hinsichtlich der Tumorlokalisation keine Zuordnung möglich.

In der Gruppe der auswertbaren Patienten mit primärem malignen Lungentumor zeigten 91 Personen ein nicht-kleinzelliges Karzinom (Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome oder nicht-subklassifizierbare / nicht-kleinzellige Lungenkarzinome). Eine Auswertung hinsichtlich des Tumorstagings nach UICC (siehe Anhang) konnte hier bei 88 Fällen erfolgen. Eine Person zeigte ein Stadium 0, bei zwei Personen war das Karzinomstadium nicht bekannt. 15 Patienten (17 %) zeigten ein Stadium IA – IB, 5 Patienten (6 %) ein Stadium IIA – IIB, 35 Patienten (40 %) ein Stadium IIIA – IIIB und 33 Patienten (37 %) ein Stadium IV.

Eine weitere Gruppe machten 16 Personen mit kleinzelligem Lungenkarzinom aus. Die Aufteilung erfolgte klinisch in die Karzinomstadien *limited disease* (n = 5, 31 %) und *extensive disease* (n = 11, 69 %); die Gruppe der Personen mit dem Karzinomstadium der *very limited disease* wurde hier mit der Untergruppe *limited disease* zusammengefasst. Bei zwei weiteren Patienten wurde ein kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Karzinom diagnostiziert. Klinisch ist der kleinzellige Tumoranteil prognostisch entscheidend.

Daten des Tumorgradings lagen bei 87 Personen mit einem primären malignen Lungentumor vor. Die Mehrheit der Personen zeigten ein Grad 3 (n = 46, 53 %), 24 Personen (28 %) ein Tumorgrad 2, 16 (18 %) einen Grad 4 und eine Person (1 %) einen Grad 1. Kleinzellige Karzinome sind per definitionem entdifferenziert (Grad 4).

4.2 Ergebnisse der Zytologischen Diagnostik

Wie im Abschnitt 2.1 erläutert, wurden die Patienten anhand der mikroskopischen Diagnose in drei Gruppen eingeteilt: *Positiv*, *negativ* und *diagnostisch unklar* (*dringend verdächtige* und *zweifelhafte* Diagnosegruppen) [200]. Je Gruppe wurden 70 konsekutive, zytologische Proben eingeschlossen. Wie im Abschnitt 4.1 angeführt, konnten 12 Patienten anhand der vorliegenden Daten nicht dem vorab definierten Referenzstandard zugeordnet werden. So blieben nach dem *follow-up* in der Gruppe mit *positiver Zytologie* 68 Patienten, in der Gruppe mit *negativer Zytologie* 66 Patienten und in der Gruppe mit *diagnostisch unklarer Zytologie* 64 Patienten; insgesamt 198 Patienten.

Nach *positiver Zytologie* ergab das *follow-up* aller 68 Patienten eine maligne Lungenerkrankung. 22 von 66 Patienten hatten in der Gruppe mit *negativer Zytologie* eine maligne Lungenerkrankung. In der Patientengruppe mit *unklarer Zytologie* zeigten 45 von 64 Patienten eine maligne Lungenerkrankung. Abb. 4.3 zeigt ein Flussdiagramm des Studiendesigns.

Bei 9 Patienten basierte der positive Referenzstandard auf zytologischer Diagnostik in Zusammenschau mit den klinischen Befunden. Eine histologische Diagnose lag nicht vor. Hiervon zeigten 5 Patienten ein Plattenepithelkarzinom, 2 Patienten ein Adenokarzinom, ein Patient ein kleinzelliges und ein weiterer ein nicht-kleinzelliges Karzinom.

Einige Patienten mussten von der Auswertung der QMSP-Daten ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 4.1), außerdem sollen hier nur die primären malignen Lungentumoren betrachtet werden. Von den 68 als *zytologisch positiv* gewerteten Untersuchungsmaterialien verblieben so 56 (56 Patienten mit Malignom). Von den 64 als *zytologisch negativ* eingestuften Patienten konnten 59 hinsichtlich der QMSP ausgewertet werden. Bei 17 dieser Patienten ergab das *follow-up* einen malignen Lungentumor. Von 64 Patienten mit zytologisch unklarer Diagnose (*zweifelhaft*: n = 25; *dringender Verdacht*: n = 39), konnten 54 (*zweifelhaft*: n = 24; *dringender Verdacht*: n = 30) Fälle mit der QMSP ausgewertet werden. Im *follow-up* zeigten 35 Patienten einen malignen Lungentumor (*zweifelhaft*: n = 10; *dringender Verdacht*: n = 25).

Unter den Patienten, die nach den o. g. Kriterien für beide diagnostischen Methoden (Zytologie und QMSP) auswertbar waren, ergab sich für die Zytologie eine Sensitivität von 52 % (56/108 Patienten mit primärem malignem Lungentumor) bei einer Spezifität von 100 % (61/61 Patienten mit benigner Lungenerkrankung). Dies ist eine sehr konservative Sichtweise der zytologischen Ergebnisse, denn sie vernachlässigt die Fälle mit *unklarer zytologischer Diagnose* und wertet diese als Test-negativ. Wertet man diese als Test-positiv für eine maligne Lungenerkrankung steigt die Sensitivität der Zytologie auf 84 % (91/108), die Spezifität würde jedoch auf 72 % (44/61) fallen, was für die klinische Routine inakzeptabel wäre. Dennoch haben die Fälle mit *unklarer zytologischer Diagnose* großen Wert, denn

hier muss weitere Diagnostik Anwendung finden um ein Malignom auszuschließen bzw. zu bestätigen.

Unter 73 Patienten mit zentral gelegenem, primärem Lungentumor zeigte die Zytologie eine Sensitivität von 60 % (*zytologisch positiv*: n = 44). Weitere 34 Patienten zeigten einen peripheren primären Lungentumor, welcher mit einer Sensitivität von 32 % (*zytologisch positiv*: n = 11) erkannt wurde. Dieser Unterschied zeigt sich statistisch signifikant (p = 0,01). Wertet man die zytologisch unklaren Fälle hingegen als statistisch positiv, zeigt sich wiederum keine statistische Signifikanz (p = 0,162) der Zytologie mit Sensitivität von 88 % (64/73) bei zentralen und 76 % (26/34) bei peripheren primären Lungentumoren.

Die Ergebnisse der QMSP in den einzelnen zytologisch-diagnostischen Untergruppen werden in den Folgekapiteln dargestellt.

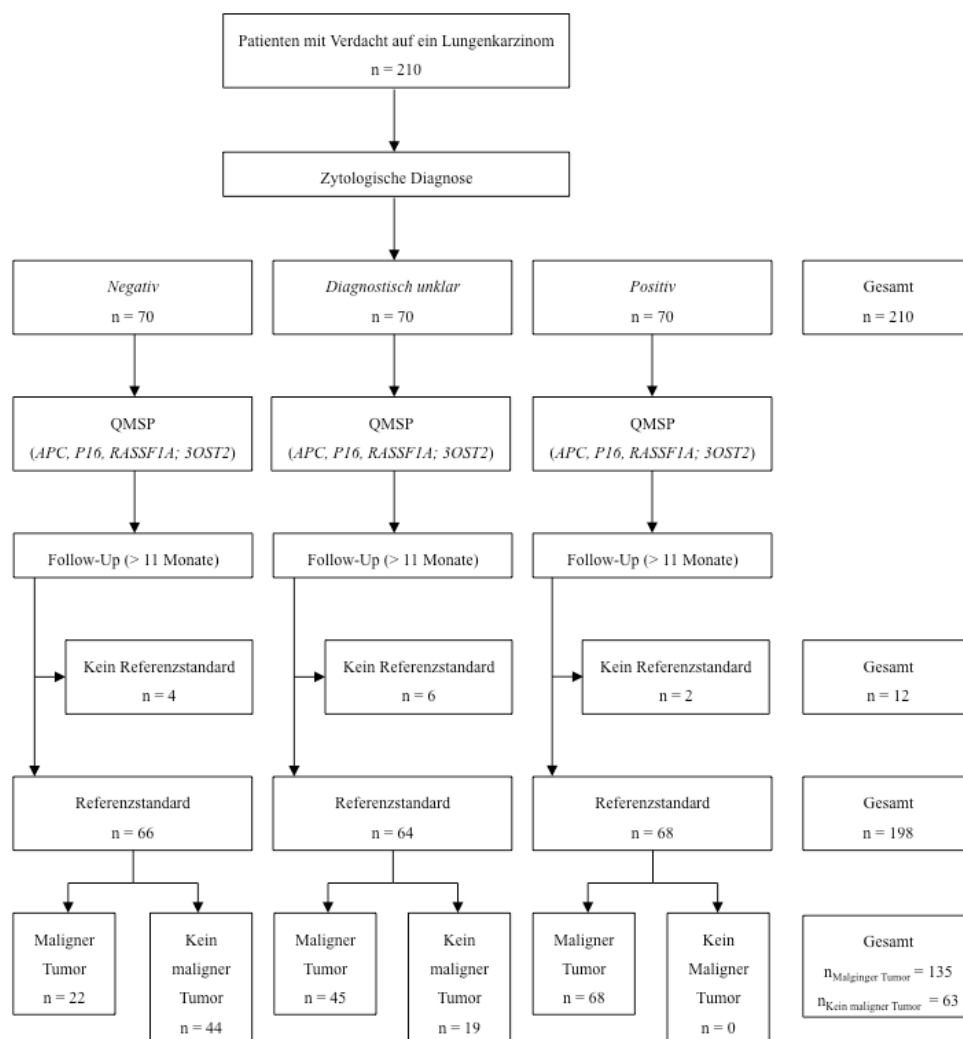


Abb. 4.3: Flussdiagramm Zytologie und Studiendesign.

Flussdiagramm der zytologischen Diagnostik im verwendeten Studiendesign, siehe auch Kapitel 4.2. Diese Abbildung basiert der Veröffentlichung von Schramm et al. 2011 [71].

4.3 Promotorhypermethylierung von APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A

Plattenepithelkarzinom

Pat. Nr.	APC	p16 ^{Ink4A}	RASSF1A	peripher	zentral
14					
33					
36					
40					
54					
80					
86					
110					
128					
133					
142					
144					
146					
147					
148					
152					
157					
158					
165					
166					
175					
177					
178					
179					
180					
190					
191					
194					
196					
198					

Andere

Pat. Nr.	APC	p16 ^{Ink4A}	RASSF1A	peripher	zentral
46					
139					
185					

Adenokarzinom

Pat. Nr.	APC	p16 ^{Ink4A}	RASSF1A	peripher	zentral
11					
16					
19					
21					
23					
28					
29					
32					
35					
48					
53					
55					
57					
61					
67					
71					
78					
79					
94					
95					
99					
101					
103					
104					
105					
107					
108					
113					
116					
119					
120					
127					
129					
137					
145					
153					
156					
160					
161					
164					
168					
174					
176					
182					
183					
184					
187					
188					
192					
197					

Nicht-subklassifizierbares nicht-kleinzelliges Karzinom

Pat. Nr.	APC	p16 ^{Ink4A}	RASSF1A	peripher	zentral
8					
9					
20					
25					
51					
85					
89					
96					
100					
102					
115					
130					
143					
163					
189					
193					

Kleinzelliges Karzinom

Pat. Nr.	APC	p16 ^{Ink4A}	RASSF1A	peripher	zentral
1					
26					
38					
50					
82					
83					
90					
109					
125					
140					
141					
154					
169					
172					
181					
186					

Kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Karzinom

Pat. Nr.	APC	p16 ^{Ink4A}	RASSF1A	peripher	zentral
77					
149					

Abb. 4.4: Darstellung aller Fälle eines malignen Lungentumors, aufgeschlüsselt nach Tumorentität.

Gezeigt ist ob eine Hypermethylierung eines der drei Gene APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A vorlag (schwarzes Feld) oder nicht (weißes Feld), außerdem in welcher Lokalisation der Tumor vorlag (Markierung durch ein schwarzes Feld). Lungenmetastasen eines extrapulmonalen Tumors sind unter der entsprechenden Histologie angegeben (z. B. Adenokarzinom des Colons).

Abb. 4.4 führt jeden einzelnen Fall eines malignen Lungentumors sortiert nach Tumorentität auf, der mittels QMSP auswertbar war. Dargestellt ist ob eine Hypermethylierung eines Promotors der Gene APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A, sowie in welcher Lokalisation der Tumor vorlag (peripher oder zentral).

Im folgenden Abschnitt werden die QMSP-Ergebnisse der Promotorhypermethylierung von APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A zunächst einzeln und später in Kombination dargestellt.

4.3.1 Promotorhypermethylierung des APC-Gens

Bei Personen mit primärem malignem Lungentumor zeigte die APC-Promotorregion in 21 von 108 Fällen eine Hypermethylierung, was einer Sensitivität von 19 % entspricht. In einem von 61 Fällen war der APC-Promotor auch bei Personen ohne malignen Lungentumor methyliert (männlich, 68 Jahre, Raucher, bestehende Diagnose eines kolorektalen Adenokarzinoms und Zustand nach Resektion 2 Monate vor Bronchoskopie und Probengewinnung, röntgenmorphologisch Behinderung der Lingula, zytologisch *zweifelhaft*). Dies entspricht einer Spezifität von 98 %. Die Häufigkeit der Hypermethylierung der APC-Promotorregion war bei den primären malignen Lungentumoren statistisch signifikant höher gegenüber den benignen Lungenerkrankungen ($p < 0,001$).

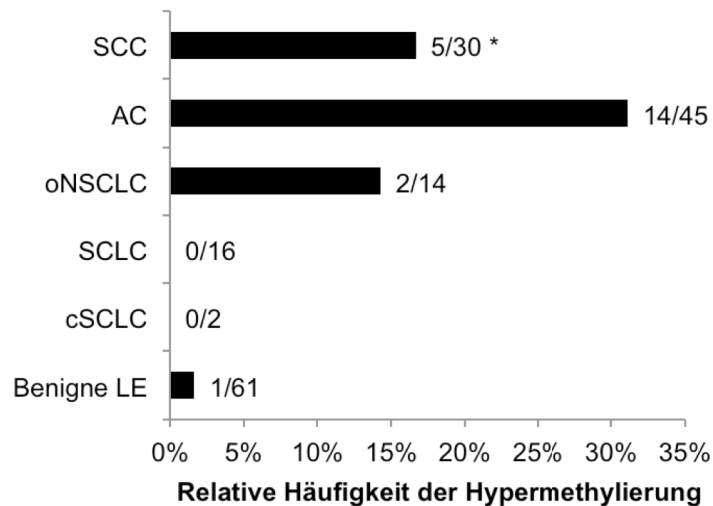


Abb. 4.5: Relative Häufigkeit der Hypermethylierung des APC-Genpromotors. SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbares / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; cSCLC = kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. * = statistische Signifikanz gegenüber der Gruppe benigner Lungenerkrankung.

Tumorentitäten:

Die Promotorhypermethylierung des APC-Gens zeigte die höchste relative Häufigkeit von 31 % (14/45) bei Personen mit einem Adenokarzinom der Lunge. Bei Plattenepithelkarzinomen, nicht-subklassifizierbaren / nicht-kleinzelligem Karzinom und kleinzelligem Karzinom der Lunge lag die Häufigkeit mit 17 % (5/30), 14 % (2/14) und 0 % (0/16) darunter (siehe Abb. 4.5).

Eine statistisch signifikant häufigere APC-Hypermethylierung gegenüber den benignen Lungenerkrankungen zeigte sich bei Adenokarzinomen ($p < 0,001$) und Plattenepithelkarzinomen ($p = 0,014$). Bei nicht-subklassifizierbaren / nicht-kleinzelligen Karzinomen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den benignen Lungenerkrankungen ($p = 0,108$).

Beim Vergleich zwischen einzelnen Tumorentitäten zeigte sich eine statistisch signifikant häufigere Methylierung bei Adenokarzinomen gegenüber den kleinzelligen Lungenkarzinomen ($p = 0,013$).

Alter, Geschlecht, Rauchverhalten:

Im Folgenden wurde die Gruppe der mittels QMSP auswertbaren Patienten mit primärem malignem Lungentumor ($n = 108$) hinsichtlich Alter, Geschlecht und Rauchverhalten untersucht. Von 51 Patienten jünger als 65 Jahre zeigten 12 (24 %), von 57 Patienten mit einem Lebensalter von 65 Jahren oder älter 9 (16 %) eine Hypermethylierung des APC-Genpromotors. 12 (18 %) der 65 männlichen Patienten und 9 (21 %) der 43 weiblichen Patienten zeigten eine APC-Hypermethylierung. 18 von 90 Rauchern (20 %) sowie einer von 6 Nichtrauchern (17 %) zeigte eine APC-Hypermethylierung. Weder hinsichtlich des Alters ($p = 0,339$), noch des Geschlechts ($p = 0,806$) oder des Raucherstatus ($p = 1$) gab es signifikante Unterschiede in der Hypermethylierung des APC-Genpromotors zwischen den jeweils betrachteten Gruppen.

Lokalisation:

Hinsichtlich der Tumorlokalisierung (zentral: $n = 73$, peripher: $n = 34$; bei einem Patienten Lokalisation nicht ermittelbar) zeigten 16 Patienten (22 %) mit zentralem und 5 Patienten (15 %) mit peripherem Lungentumor eine Hypermethylierung der APC-Promotorregion ($p = 0,444$, nicht signifikant).

Staging:

91 der 108 auswertbaren Patienten mit primärem malignem Lungentumor wiesen ein nicht-kleinzelliges Karzinom der Lunge auf. Bei 88 Patienten ließ sich das Tumorstadium nach UICC-Klassifikation (siehe Anhang) ermitteln (I: $n = 15$; II: $n = 5$; III: $n = 35$, IV: $n = 33$). Eine Hypermethylierung der APC-Promotorregion zeigte sich bei je einem Fall im Stadium I (7 %) sowie im Stadium II (20 %), in 9 Fällen (26 %) im Stadium III und in 10 Fällen (30 %) im Stadium IV. Die Unterschiede zwischen den vier Stadien sowie zwischen Stadium I und der Kombination der Stadien II - IV zeigten keine statistische Signifikanz ($p = 0,106$). Keiner der 16 Patienten mit einem kleinzelligen Karzinom (*limited disease*: $n = 5$, *extensive disease*: $n = 11$) zeigte eine Hypermethylierung der APC-Promotorregion.

Grading:

Bei 87 der 108 primären malignen Lungentumoren war eine histologische oder zytologische Bestimmung des Differenzierungsgrades möglich (Grad 1: n = 1, Grad 2: n = 24, Grad 3: n = 46, Grad 4: n = 16). Bei 13 schlecht differenzierten Tumoren (Grad 3, 28 %) und einem mittelgradig differenzierten Tumor (Grad 2, 4 %) ließ sich eine Hypermethylierung des APC-Genpromotors nachweisen. Gut differenzierte oder entdifferenzierte Tumoren (Grad 1 oder 4) zeigten keine APC-Hypermethylierung.

4.3.2 Promotorhypermethylierung des p16^{Ink4A}-Gens

Die Analyse des Methylierungsstatus der p16^{Ink4A}-Promotorregion zeigte eine Hypermethylierung in 20 von 108 Patienten mit einem primären malignen Lungentumor, einer Sensitivität von 18 % entsprechend. In keinem Fall gab es eine Promotorhypermethylierung unter den Personen mit benigner Lungenerkrankung (n = 61), entsprechend einer Spezifität von 100 %. Die häufigere Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Promotors bei primär malignen Lungentumoren gegenüber benignen Lungenerkrankungen war statistisch signifikant (p < 0,001).

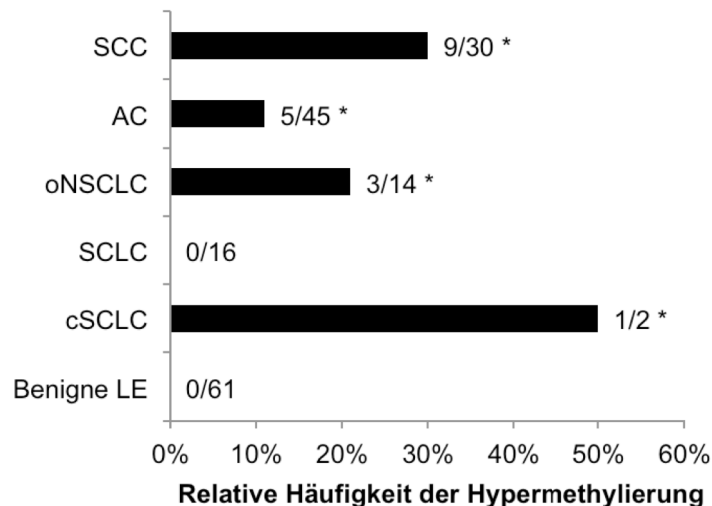


Abb. 4.6: Relative Häufigkeit der Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors. SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbares / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; cSCLC = kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. * = statistische Signifikanz gegenüber der Gruppe benigner Lungenerkrankung.

Tumorentitäten:

Das p16^{Ink4A}-Gen zeigte bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge mit 30 % (9/30) die höchste relative Häufigkeit der Promotorhypermethylierung. Bei Fällen mit nicht-subklassifizierbaren

/ nicht-kleinzelligem, Adeno- oder kleinzelligem Karzinom der Lunge war diese mit 21 % (3/14), 11 % (5/45) und 0 % (0/16) geringer. Außerdem zeigte sich eine Promotorhypermethylierung des p16^{Ink4A}-Gens bei Personen mit kombiniertem kleinzelligem / nicht-kleinzelligem Karzinom (relative Häufigkeit von 50 %) und bei einem Patienten mit einem primären Lungensarkom (Abb. 4.6).

Bei Plattenepithel- ($p < 0,001$), Adeno- ($p = 0,011$) und nicht-subklassifizierbaren / nicht-kleinzelligen Karzinomen der Lunge ($p = 0,005$) zeigte sich eine statistisch signifikant häufigere Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors gegenüber den benignen Lungenerkrankungen. Dies war auch bei Patienten mit kombiniertem kleinzelligem / nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom der Fall ($p = 0,032$). Hinsichtlich der Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Gens zeigte sich im Vergleich der einzelnen Tumorentitäten zwischen Plattenepithelkarzinomen und kleinzelligen Karzinomen eine statistische Signifikanz ($p = 0,018$).

Alter, Geschlecht, Rauchverhalten:

Im Folgenden wurde die Gruppe der mittels QMSP auswertbaren Patienten mit primärem malignem Lungentumor ($n = 108$) hinsichtlich Alter, Geschlecht und Rauchverhalten untersucht. Von 51 Patienten jünger als 65 Jahre zeigten 6 (12 %), von 57 Patienten mit einem Lebensalter von 65 Jahren oder älter 13 (23 %) eine Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors. 12 (18 %) der 65 männlichen Patienten und 7 (16 %) der 43 weiblichen Patienten zeigten eine p16^{Ink4A}-Hypermethylierung. 17 von 90 Rauchern (19 %) sowie einer von 6 Nichtrauchern (17 %) zeigte eine p16^{Ink4A}-Hypermethylierung. Weder hinsichtlich des Alters ($p = 0,205$), noch des Geschlechts ($p = 1$) oder des Raucherstatus ($p = 1$) gab es signifikante Unterschiede in der Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors zwischen den jeweils betrachteten Gruppen.

Lokalisation:

Hinsichtlich der Tumorlokalisation (zentral: $n = 73$, peripher: $n = 34$; bei einem Patienten Lokalisation nicht ermittelbar) zeigten 14 Patienten (19 %) mit zentralem und 5 Patienten (15 %) mit peripherem Lungentumor eine Hypermethylierung der p16^{Ink4A}-Promotorregion ($p = 0,790$, nicht signifikant).

Staging:

91 der 108 auswertbaren Patienten mit primärem malignem Lungentumor wiesen ein nicht-kleinzelliges Karzinom der Lunge auf. Bei 88 Patienten ließ sich ein Tumorstadium nach UICC-Klassifikation (siehe Anhang) ermitteln (I: $n = 15$; II: $n = 5$; III: $n = 35$, IV: $n = 33$). Eine Hypermethylierung der p16^{Ink4A}-Promotorregion zeigte sich bei je einem Fall im Stadium I (7 %) sowie im Stadium II (20 %), in 10 Fällen (29 %) im Stadium III und in 5 Fällen (15 %) im Stadium IV. Die Unterschiede zwischen den vier Stadien sowie zwischen Stadium I und der Kombination der Stadien II - IV zeigten keine statistische Signifikanz ($p = 0,285$). Keiner der 16 Patienten mit einem kleinzelligen Karzinom (*limited disease*: $n = 5$, *extensive disease*: $n = 11$) zeigte eine Hypermethylierung der p16^{Ink4A}-Promotorregion.

Grading:

Bei 87 der 108 Personen mit primärem malignem Lungentumor war eine histologische oder zytologische Bestimmung des Differenzierungsgrades möglich (Grad 1: n = 1, Grad 2: n = 24, Grad 3: n = 46, Grad 4: n = 16). Bei 9 schlecht differenzierten Tumoren (Grad 3, 20 %) und 6 mittelgradig differenzierten Tumoren (Grad 2, 25 %) ließ sich eine Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors nachweisen. Gut differenzierte oder entdifferenzierte Tumoren (Grad 1 oder 4) zeigten keine p16^{Ink4A}-Hypermethylierung.

4.3.3 Promotorhypermethylierung des RASSF1A-Gens

Der RASSF1A-Promotor zeigte sich in 31 von 108 Patienten mit einem primären malignen Lungentumor hypermethyliert, einer Sensitivität von 29 % entsprechend. Es zeigte sich keine Hypermethylierung unter den 61 Patienten ohne malignen Tumor der Lunge. Dies entspricht einer Spezifität von 100 %. Die Hypermethylierung der RASSF1A-Promotorregion war bei den primären malignen Lungentumoren statistisch signifikant häufiger als bei den benignen Lungenerkrankungen ($p < 0,001$).

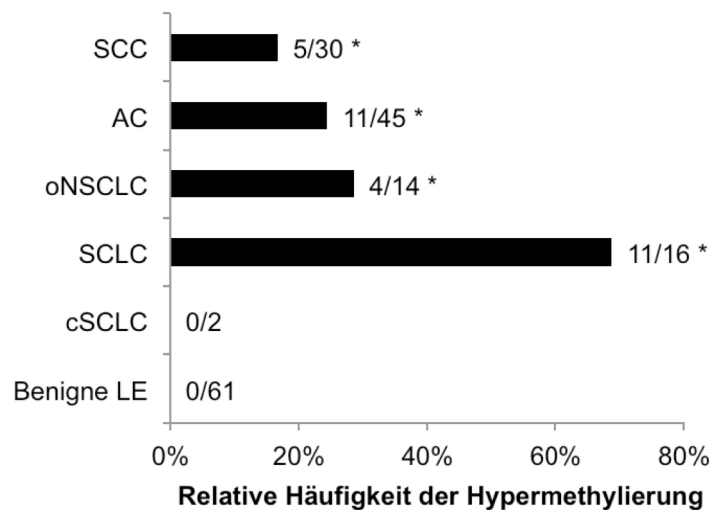


Abb. 4.7: Relative Häufigkeit der Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors. SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbares nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; cSCLC = kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. * = statistische Signifikanz gegenüber der Gruppe benigner Lungenerkrankung.

Tumorentitäten:

Das RASSF1A-Gen zeigte bei Patienten mit kleinzelligem Karzinom der Lunge mit 69 % (11/16) die höchste relative Häufigkeit der Promotorhypermethylierung. Bei Fällen mit nicht-subklassifizierbaren / nicht-kleinzelligen, Adeno- oder Plattenepithelkarzinom der Lunge war diese mit 29 % (4/14), 24 % (11/45) und 17 % (5/30) geringer (Abb. 4.7).

Bei kleinzelligen ($p < 0,001$), nicht-klassifizierbaren / nicht-kleinzelligen ($p < 0,001$), Adeno- ($p < 0,001$) und Plattenepithelkarzinomen der Lunge ($p = 0,003$) zeigte sich eine statistisch signifikant häufigere Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors gegenüber den benignen Lungenerkrankungen. Im Vergleich der einzelnen Tumorentitäten trat die Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors bei kleinzelligen Karzinomen statistisch signifikant häufiger auf als bei Adenokarzinomen ($p = 0,002$), und Plattenepithelkarzinomen ($p < 0,001$).

Alter, Geschlecht, Rauchverhalten:

Im Folgenden wurde die Gruppe der mittels QMSP auswertbaren Patienten mit primärem malignem Lungentumor ($n = 108$) hinsichtlich Alter, Geschlecht und Rauchverhalten untersucht. Von 51 Patienten jünger als 65 Jahre zeigten 14 (27 %), von 57 Patienten mit einem Lebensalter von 65 Jahren oder älter 17 (30 %) eine Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors. 17 (26 %) der 65 männlichen Patienten und 14 (33 %) der 43 weiblichen Patienten sowie 21 von 90 Rauchern (23 %) und 3 von 6 Nichtrauchern (50 %) zeigte eine RASSF1A-Hypermethylierung. Weder hinsichtlich des Alters ($p = 0,834$), noch des Geschlechts ($p = 0,519$) oder des Raucherstatus ($p = 0,163$) gab es signifikante Unterschiede in der Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors zwischen den jeweils betrachteten Gruppen.

Lokalisation:

Hinsichtlich der Tumorlokalisierung (zentral: $n = 73$, peripher: $n = 34$; bei einem Patienten Lokalisation nicht ermittelbar) zeigten 22 Patienten (30 %) mit zentralem und 8 Patienten (24 %) mit peripherem primärem malignem Lungentumor eine Hypermethylierung der RASSF1A-Promotorregion ($p = 0,645$, nicht signifikant).

Staging:

91 der 108 auswertbaren Patienten mit primärem malignem Lungentumor wiesen ein nicht-kleinzelliges Karzinom der Lunge auf. Bei 88 Patienten ließ sich ein Tumorstadium nach UICC-Klassifikation (siehe Anhang) ermitteln (I: $n = 15$; II: $n = 5$; III: $n = 35$; IV: $n = 33$). Eine Hypermethylierung der RASSF1A-Promotorregion zeigte sich bei zwei Fällen im Stadium I (13 %) sowie einem Fall im Stadium II (20 %), in 8 Fällen (23 %) im Stadium III und in 8 Fällen (24 %) im Stadium IV. Die Unterschiede zwischen den vier Stadien sowie zwischen Stadium I und der Kombination der Stadien II - IV zeigten keine statistische Signifikanz ($p = 0,285$).

16 der 108 auswertbaren Patienten mit primärem malignen Lungentumor wiesen ein kleinzelliges Karzinom der Lunge auf (*limited disease*: n = 5, *extensive disease*: n = 11). Unter den Patienten mit dem Tumorstadium *limited disease* zeigten 2 Fälle (40 %), mit dem Stadium *extensive disease* 9 Fälle (82 %) eine Hypermethylierung der RASSF1A-Promotorregion. Zwischen diesen beiden Gruppen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,245$).

Grading:

Bei 87 der 108 Personen mit primärem malignem Lungentumor war eine histologische oder zytologische Bestimmung des Differenzierungsgrades möglich (Grad 1: n = 1, Grad 2: n = 24, Grad 3: n = 46, Grad 4: n = 16). Bei je 11 schlecht (Grad 3, 24 %) sowie undifferenzierten Tumoren (Grad 4, 69 %) und 2 mittelgradig differenzierten Tumoren (Grad 2, 8 %) ließ sich eine Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors nachweisen. Gut differenzierte Tumoren (Grad 1) zeigten hier keine Hypermethylierung. An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass kleinzellige Lungenkarzinome per definitionem undifferenziert (Grad 4) sind.

Tabelle 4.3 listet die Ergebnisse der Hypermethylierung der 3 untersuchten Genpromotoren (APC, p16^{INK4A} und RASSF1A) und des 3-Marker-Genpanels in Kombination übersichtlich auf.

	Anzahl Patienten	APC	p16 ^{INK4A}	RASSF1A	Kombination ^c
Alter					
< 65 Jahre	51	12 (24)	6 (12)	14 (27)	25 (49)
≥ 65 Jahre	57	9 (16)	13 (23)	17 (30)	30 (53)
Geschlecht					
Weiblich	43	9 (21)	7 (16)	14 (33)	23 (53)
Männlich	65	12 (18)	12 (18)	17 (26)	32 (49)
Raucherstatus					
Raucher	90	18 (20)	17 (19)	21 (23)	45 (50)
Niemals geraucht	6	1 (17)	1 (17)	3 (50)	3 (50)
Zytologische Diagnose					
positiv	56	15 (27)	9 (19)	22 (39)	34 (61)
negativ	17	0 (0)	0 (0)	3 (18)	3 (18)
unklar	35	6 (17)	10 (29)	6 (17)	18 (51)
Tumorstadium ^a					
IA - IB	15	1 (7)	1 (7)	2 (13)	3 (20)
IIA - IIB	5	1 (20)	1 (20)	1 (20)	3 (60)
IIIA – IIIB	35	9 (26)	10 (29)	8 (23)	20 (57)
IV	33	10 (30)	5 (15)	8 (24)	16 (48)
Limited disease	5	0 (0)	0 (0)	2 (40)	2 (40)
Extensive disease	11	0 (0)	0 (0)	9 (82)	9 (82)
Tumorlokalisation ^b					
Zentral	73	16 (22)	14 (19)	22 (30)	40 (55)
Peripher	34	5 (15)	5 (15)	8 (24)	14 (41)
Tumorgrading					
I	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
II	24	1 (4)	6 (25)	2 (8)	7 (29)
III	46	13 (28)	9 (20)	11 (24)	24 (52)
IV	16	0 (0)	0 (0)	11 (69)	11 (69)
Histologie / Zytologie ^c					
SCC	30	5 (17)	9 (30)	5 (17)	14 (47)
AC	45	15 (30)	6 (12)	12 (24)	23 (46)
NSCLC	14	2 (13)	3 (19)	4 (25)	7 (44)
SCLC	16	0 (0)	0 (0)	11 (69)	11 (69)
cSCLC	2	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)
Sonstige ^d	1	0 (0)	1 (33)	0 (0)	1 (33)

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Promotorhypermethylierung im Überblick.

Die Daten stellen n (%) dar. Sie beziehen sich auf die Gruppe der Patienten mit einem primären malignen Lungentumor, die mittels QMSP auswertbar waren (n = 108). SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbares / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; cSCLC = kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom.

^a Tumorstadium nach UICC-Klassifikation (siehe Anhang); bei zwei Patienten war das Tumorstadium nicht eindeutig: Ein Patient verstarb, ein anderer verließ das Krankenhaus vor Abschluss des Stagings. ^b Bei einem Patienten war aufgrund eines diffus metastasierenden SCLC die Tumorlokalisation nicht eindeutig. ^c Die Tumorklassifikation wurde in 9 Fällen ausschließlich auf der Grundlage der zytologischen Diagnostik festgelegt. ^d Patient mit einem primären Sarkom der Lunge. ^e Das Markerpanel wurde bei Methylierung mindestens eines Gens als positiv gewertet.

4.3.4 Kombination der Promotorhypermethylierung (Genpanel)

Die Kombination der drei untersuchten Genpromotoren (APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A, im weiteren Text als Genpanel bezeichnet) ergab eine Sensitivität von 51 %. In 55 von 108 Fällen der Patienten mit einem primären malignen Lungentumor war eine Hypermethylierung von mindestens einer der drei untersuchten Promotorregionen festzustellen (Abb. 4.8). Die Spezifität entsprach in Kombination der Ergebnisse 98 %. Ein Nicht-Tumor Patient zeigte eine Hypermethylierung der APC-Promotorregion (1/61). Hypermethylierungen zeigten sich statistisch signifikant häufiger ($p < 0,001$) bei Patienten mit einem primären malignen Lungentumor im Vergleich zu Personen mit benigner Lungenerkrankung.

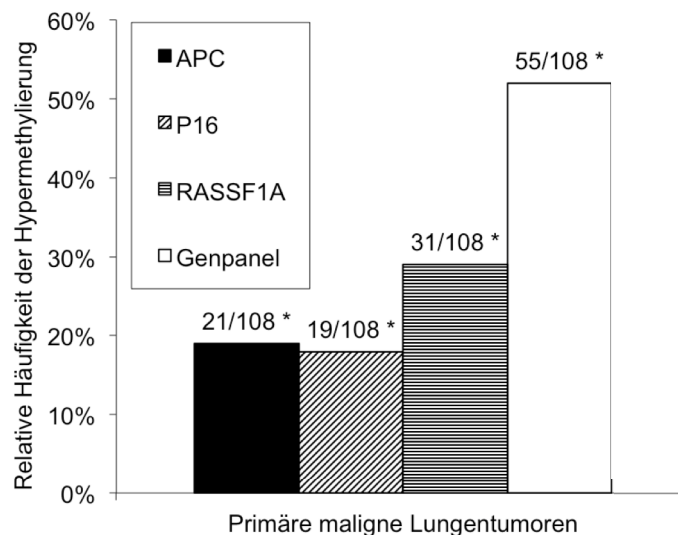


Abb. 4.8: Relative Häufigkeit der Hypermethylierung bei primären malignen Lungentumoren (n = 108). * = statistische Signifikanz gegenüber der Gruppe benigner Lungenerkrankung.

Tumorentitäten:

In der Kombination der drei untersuchten Genpromotoren und Wertung als Test-positiv bei Methylierung mindestens eines Promotors zeigte sich die höchste relative Häufigkeit der Hypermethylierung von 69 % (11/16) bei den kleinzelligen Karzinomen. Allerdings kommt hier ausschließlich eine Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors zum Tragen. Plattenepithel- sowie Adenokarzinome zeigten Promotorhypermethylierungen in der Häufigkeit von 47 % (14/30 bzw. 21/45), nicht-subklassifizierbare / nicht-kleinzellige Karzinome von 50 % (7/14). Abb. 4.9 stellt diese Ergebnisse im Überblick dar. Zudem zeigte der p16^{Ink4A}-Genpromotor eine aberrante Methylierung im Fall von einem kombinierten kleinzelligen / nicht-kleinzelligen Karzinom (1 / 2) sowie einem primären Sarkom der Lunge.

Sowohl kleinzellige Lungenkarzinome ($p < 0,001$), Plattenepithelkarzinome ($p < 0,001$), Adenokarzinome ($p < 0,001$) als auch nicht-subklassifizierbare / nicht-kleinzellige Karzinome ($p < 0,001$) zeigten gegenüber den benignen Lungenerkrankungen statistisch signifikant häufiger Hypermethylierungen der untersuchten Genpromotoren in ihrer Kombination.

Ein Vergleich zwischen den einzelnen Tumorentitäten zeigte keine statistische Signifikanz hinsichtlich des Genpanels. Im Vergleich zwischen den untersuchten Genpromotoren zeigte sich eine statistisch signifikant häufigerer Hypermethylierung bei RASSF1A gegenüber APC ($p = 0,002$) und p16^{Ink4A} ($p = 0,002$) in der Gruppe der Patienten mit kleinzelligem Karzinom.

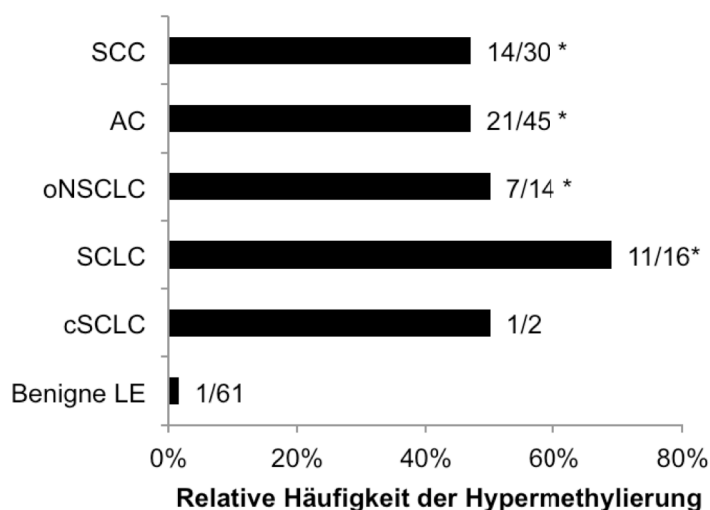


Abb. 4.9: Relative Häufigkeit der Hypermethylierung des Genpanels.

SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbares / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; cSCLC = kombiniertes kleinzelliges / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. * = statistische Signifikanz gegenüber der Gruppe benigner Lungenerkrankung.

Zytologie gesamt:

Die Zytologie konnte in der Gruppe der Patienten mit einem primären Malignom der Lunge ($n = 108$) 56 Patienten richtig positiv diagnostizieren, was einer Sensitivität von 52 % entspricht (Wertung *zytologisch unklarer* Diagnosen als Test-negativ). Zytologisch wurde kein Fall aus der Gruppe der Patienten mit benigner Lungenerkrankung ($n = 61$) als falsch positiv diagnostiziert, was einer Spezifität von 100 % entspricht. In der Kombination der Zytologie mit dem hier verwandten QMSP-Genpanel (APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A) konnte eine deutliche Steigerung der Sensitivität auf 71 % (77/108) erreicht werden. Die Spezifität der Kombination der beiden Methoden lag bei 98 % (60/61). Die Abb. 4.10 zeigt dies im Überblick.

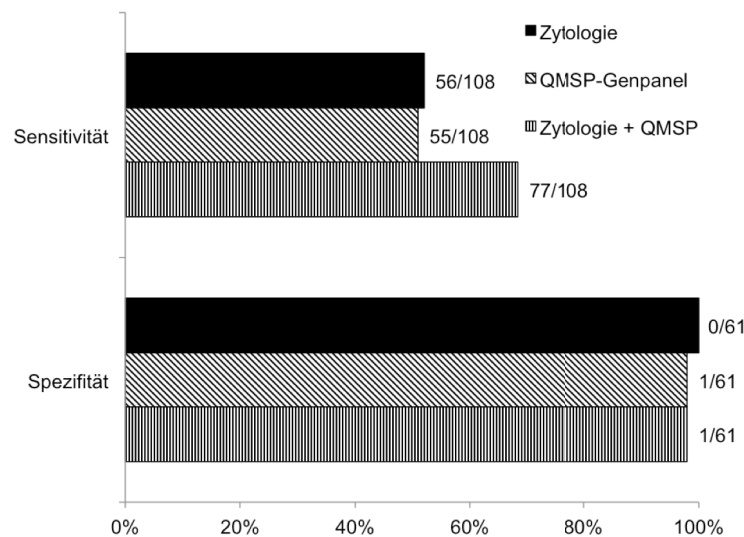


Abb. 4.10: Sensitivität und Spezifität von zytologischer Diagnostik und QMSP-Genpanel im Vergleich und in Kombination der beiden Methoden.
Wertung unklarer zytologischer Diagnosen als Test-negativ.

Positive Zytologie:

Unter den 56 als *zytologisch positiv* gewerteten Patienten (Fälle mittels QMSP auswertbar) zeigten alle einen malignen Lungentumor (positiver prädiktiver Wert = 100 %). 34 dieser Fälle zeigten eine Hypermethylierung mindestens eines der drei Gene des Panels. Dies entspricht einer relativen Häufigkeit von 61 %. Die einzelnen Gene zeigten folgende Methylierungshäufigkeiten: APC: n = 15, 27 %; p16^{Ink4A}: n = 9, 16 %; RASSF1A: n = 22, 39 %.

Negative Zytologie:

59 Patienten wurden der Diagnosegruppe *zytologisch negativ* zugeordnet. Aus dieser Gruppe zeigten 17 Patienten ein Malignom der Lunge und sind damit hinsichtlich der zytologischen Diagnose als falsch negativ anzusehen (negativer prädiktiver Wert = 54 %, bei Bewertung aller unklaren zytologischen Diagnosen als Test-negativ). In 3 Fällen zeigte sich eine Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors (relative Häufigkeit 15 %). Bei diesen 3 Fällen handelte es sich ausschließlich um Adenokarzinome der Lunge, 2 in peripherer und eines in zentraler Lokalisation. Ein Patient hatte ein Stadium IA, der zweite IIB und der dritte Fall IIIA nach UICC-Klassifikation (siehe Anhang). Unter diesen Patienten gab es 2 Männer und eine Frau, das Alter lag zwischen 49 und 70 Jahren. Die 42 Patienten mit benigner Lungenerkrankung zeigten in der Untersuchung mittels QMSP keine Hypermethylierung eines Promotors der drei genannten Gene.

Unklare Zytologie:

Weitere 54 Patienten, bei denen eine Untersuchung mittels QMSP möglich war, wurden als *zytologisch unklar* eingestuft (*zweifelhaft*: n = 24; *dringender Verdacht*: n = 30). Unter diesen 54 Fällen zeigten 35 Patienten ein Malignom. Hypermethylierungen der Promotorregion mindestens eines

der drei genannten Gene wurden in 18 Fällen festgestellt (APC: n = 6, 17 %; p16^{Ink4A}: n = 10, 29 %; RASSF1A: n = 6, 17 %), was einer relativen Häufigkeit von 51 % entspricht. Unter diesen 18 Fällen waren 12 mit der zytologischen Diagnose *dringender Verdacht* (APC: n = 4; p16^{Ink4A}: n = 8; RASSF1A: n = 3) und 6 mit der Diagnose *zytologisch zweifelhaft* (APC: n = 2; p16^{Ink4A}: n = 2; RASSF1A: n = 3). Unter den Patienten gab es keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zum gesamten Patientenkollektiv hinsichtlich der Tumorentität (6 Adenokarzinome, 7 Plattenepithelkarzinome, 2 nicht-subklassifizierbare nicht-kleinzellige Karzinome, 3 kleinzellige Karzinome), der Lokalisation (6 peripher, 12 zentral), des Stadiums (2 IA – IIB, 8 IIIA – IIIB, 4 IV; 3 *extensive disease*; 1 unbekannt), des Geschlechtes (12 männlich, 6 weiblich), des Alters (48 – 77 Jahre) oder des Rauchverhaltens (16 Raucher, 2 unbekannt). Unter den 19 Patienten mit benigner Lungenerkrankung zeigte sich in einem Fall eine Hypermethylierung des APC-Genpromotors (siehe auch Abschnitt 4.3.1).

Abb. 4.11 stellt die Ergebnisse des 3-Marker-Genpanels und der Einzelmarker in den verschiedenen zytologischen Diagnosegruppen zusammengefasst dar.

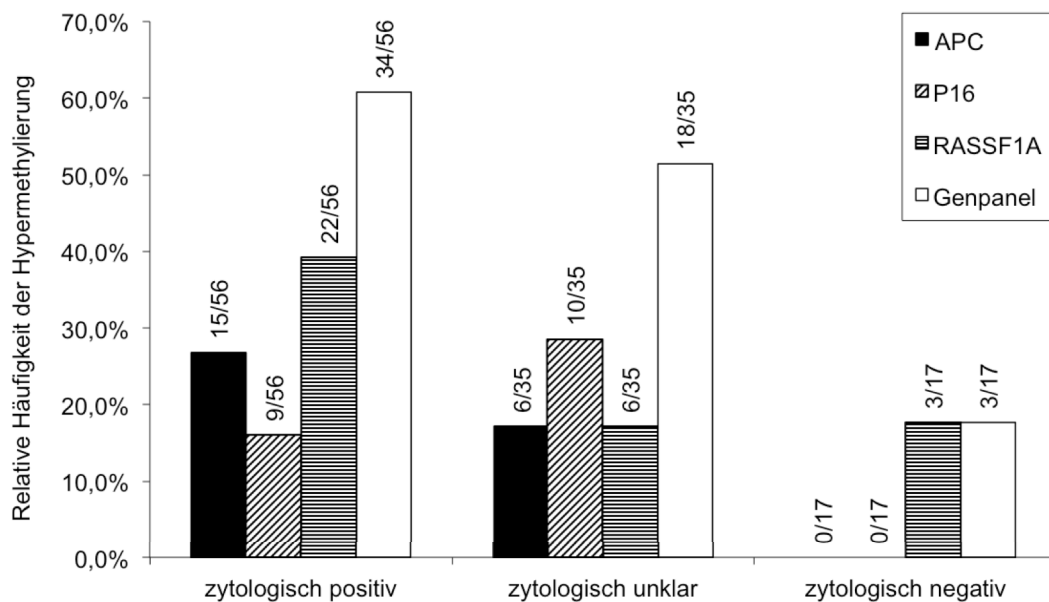


Abb. 4.11: Relative Häufigkeit der einzelnen Genpromotoren und des 3-Marker-Genpanels in den verschiedenen zytologischen Diagnosegruppen.

Alter, Geschlecht, Rauchverhalten:

Im Folgenden wurde die Gruppe der mittels QMSP auswertbaren Patienten mit primärem malignem Lungentumor (n = 108) hinsichtlich Alter, Geschlecht und Rauchverhalten untersucht. Von 51 Patienten jünger als 65 Jahre zeigten 25 (49 %), von 57 Patienten mit einem Lebensalter von 65 Jahren oder älter 30 (53 %) eine Hypermethylierung eines der drei Gene des Panels. 32 (49 %) der 65 männlichen Patienten und 23 (53 %) der 43 weiblichen Patienten zeigten eine Hypermethylierung mindestens eines Genpromotors. Bei 45 von 90 Rauchern (50 %) sowie 3 von 6 Nichtrauchern (50 %) waren Genpromotoren im Panel hypermethyliert. Weder hinsichtlich des Alters ($p = 0,847$), noch des Geschlechts ($p = 0,698$) oder des Raucherstatus ($p = 1$) gab es signifikante Unterschiede in der Hypermethylierung des Genpanels zwischen den jeweils betrachteten Gruppen. Abb. 4.12 zeigt diese Ergebnisse in der Übersicht.

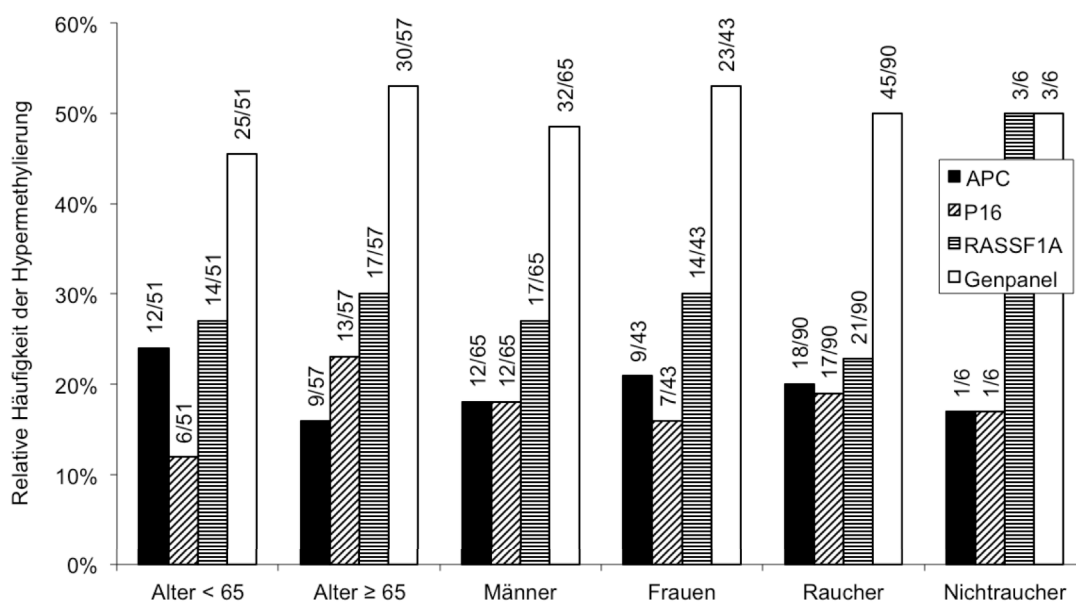


Abb. 4.12: Relative Häufigkeit der einzelnen Genpromotoren und des 3-Marker-Genpanels in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Raucherstatus. Hier zeigte sich keine statistische Signifikanz im Vergleich der einzelnen Gruppen.

Lokalisation:

Hinsichtlich der Tumorlokalisation (zentral: n = 73, peripher: n = 34; bei einem Patienten Lokalisation nicht ermittelbar) zeigten 40 Patienten (55 %) mit zentralem und 14 Patienten (40 %) mit peripherem malignem Lungentumor eine Hypermethylierung eines der drei untersuchten Genpromotoren ($p = 0,217$, nicht signifikant). Dies stellt die Abb. 4.13 graphisch dar.

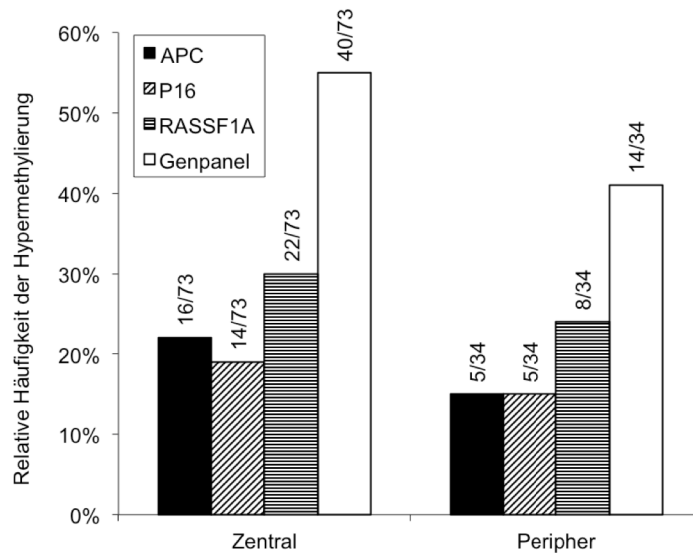


Abb. 4.13: Relative Häufigkeit der einzelnen Genpromotoren und des 3-Marker-Genpanels hinsichtlich der Lokalisation der primären malignen Lungentumoren. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz im Vergleich zwischen zentralen und peripheren malignen Tumoren.

Staging:

91 der 108 auswertbaren Patienten mit primärem malignem Lungentumor wiesen ein nicht-kleinzelliges Karzinom der Lunge auf. Bei 88 Patienten ließ sich ein Tumorstadium nach UICC-Klassifikation (siehe Anhang) ermitteln (I: n = 15; II: n = 5; III: n = 35, IV: n = 33). Hypermethylierungen mindestens eines der drei untersuchten Genpromotoren traten je bei 3 Fällen im Stadium I (20 %) sowie im Stadium II (60 %), in 20 Fällen (57 %) im Stadium III und in 16 Fällen (48 %) im Stadium IV auf (Abb. 4.14).

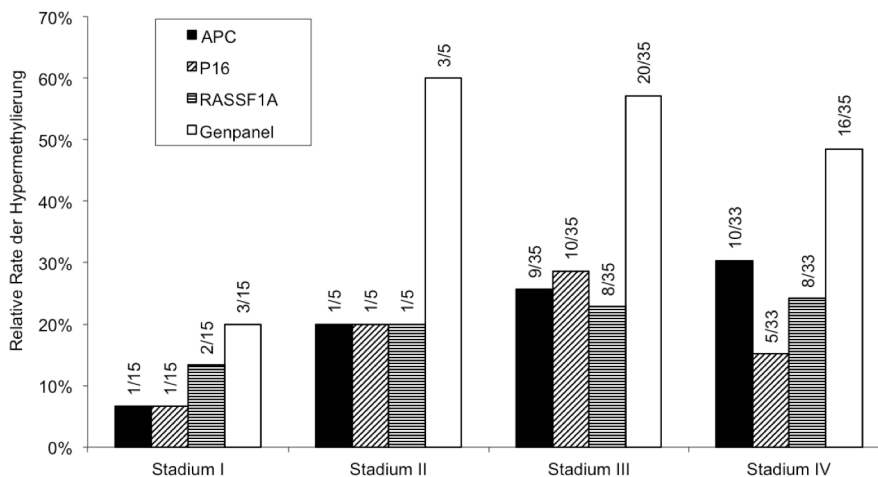


Abb. 4.14: Relative Häufigkeit der einzelnen Genpromotoren und des 3-Marker-Genpanels hinsichtlich des Stadiums des primären malignen Lungentumors. Signifikant zeigt sich hier der Unterschied zwischen Stadium I und III sowie I und der Kombination aus II – IV ($p = 0,029$ und $0,023$) im Genpanel.

Im Vergleich der einzelnen Stadien zeigten sich im Stadium III signifikant häufiger Hypermethylierungen im Genpanel als Stadium I ($p = 0,029$). Im Stadium I zeigten sich weiterhin signifikant seltener Hypermethylierungen als in der Kombination der Stadien II-IV ($p = 0,023$).

Kleinzellige Karzinome wurden bei 16 der 108 auswertbaren Patienten mit primärem malignem Lungentumor gefunden. 5 Patienten zeigten das Stadium einer *limited disease*, 11 Patienten das Stadium einer *extensive disease*. Hypermethylierungen zeigten sich hier nur beim RASSF1A-Genpromotor (siehe Abschnitt 4.3.3).

Grading:

Bei 87 der 108 Personen mit primärem malignem Lungentumor war eine histologische oder zytologische Bestimmung des Differenzierungsgrades möglich (Grad 1: $n = 1$, Grad 2: $n = 24$, Grad 3: $n = 46$, Grad 4: $n = 16$). Bei 24 Fällen eines schlecht differenzierten (Grad 3, 52 %), in 11 Fällen eines entdifferenzierten (Grad 4, 69 %) und bei 2 mittelgradig differenzierten Tumoren (Grad 2, 8 %) ließ sich eine Hypermethylierung eines Genpromotors im Genpanel nachweisen. Gut differenzierte Tumoren (Grad 1) zeigten keine Hypermethylierung. Diese Ergebnisse zeigt Abb. 4.15 in der Übersicht. An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass kleinzellige Lungenkarzinome per definitionem entdifferenziert (Grad 4) sind. Bei diesen 11 Fällen ging der Hypermethylierungsnachweis ausschließlich auf den RASSF1A-Promotor zurück.

Dichotomisiert man die Einteilung der Tumorgrade in Grad 1 – 2 (7/25, 28 %) und Grad 3 – 4 (35/62, 56 %), zeigt sich der Unterschied in der Hypermethylierung des 3-Marker-Genpanels statistisch signifikant ($p = 0,019$).

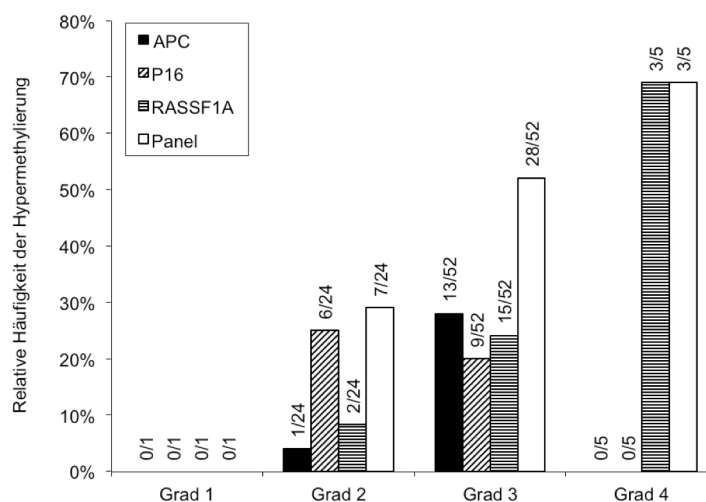


Abb. 4.15: Relative Häufigkeit der einzelnen Genpromotoren und des 3-Marker-Genpanels hinsichtlich des Differenzierungsgrades der primären malignen Lungentumoren. Statistisch signifikant war der Unterschied zwischen der Zusammenfassung der Grade 1 – 2 und 3– 4 ($p = 0,019$).

4.4 Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors

Zusätzlich zum 3-Marker-Genpanel aus APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A wurde das Patientenkollektiv dieser Arbeit auch auf Hypermethylierungen des 3-OST-2-Genpromotors untersucht. In den hier vorliegenden Bronchialaspiraten, welche mittels QMSP auswertbar waren (n = 178) zeigte sich in allen bis auf 3 Fällen eine Methylierung des 3-OST-2-Genpromotors, unabhängig von der Dignität der Lungenerkrankung, was die Definition eines *cut-off*-Levels nötig machte.

4.4.1 Ermittlung eines *cut-off*-Levels

Zur Ermittlung eines *cut-off*-Levels, für die Diskrimination zwischen benigner und maligner Lungenerkrankung, erfolgte die Analyse der 3-OST-2-QMSP-Daten mittels Endpunktanalyse, wie sie auch schon beim APC-Genpromotor angewandt wurde (siehe Abschnitt 3.4.5). Die Intensität des Fluoreszenzsignals des amplifizierten, methylierten 3-OST-2-Promotors am PCR-Endpunkt wurde im Verhältnis zum Referenzpromotor MYOD1 betrachtet (Fluoreszenz 3-OST-2 / Fluoreszenz MYOD1 x 100), und als Methylierungslevel definiert. Das Methylierungslevel (Abb. 4.16) schwankte bei Patienten mit maligner Lungenerkrankung zwischen 0 – 1.418,8 (Mittelwert 163,6) und bei Fällen mit benigner Lungenerkrankung zwischen 0 – 507,9 (Mittelwert 94,3).

Anhand einer ROC-Kurven-Analyse (*receiver operating characteristic*) sollte ein *cut-off*-Level für die Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors etabliert werden (Abb. 4.17). Anhand der Fläche unter der ROC-Kurve (AUC = *area under the curve*) und deren 95 % Konfidenzintervall (CI) konnte zunächst ermittelt werden, ob anhand des Methylierungslevels des 3-OST-2-Promotors signifikant zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung unterschieden werden konnte. Die AUC unterschied sich mit 0,659 (95 % CI: 0,580 - 0,737) signifikant ($p < 0,001$) von der Diagonalen (0,5), womit eine Diskrimination zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung mittels Analyse der Methylierung des 3-OST-2-Genpromotors möglich war.

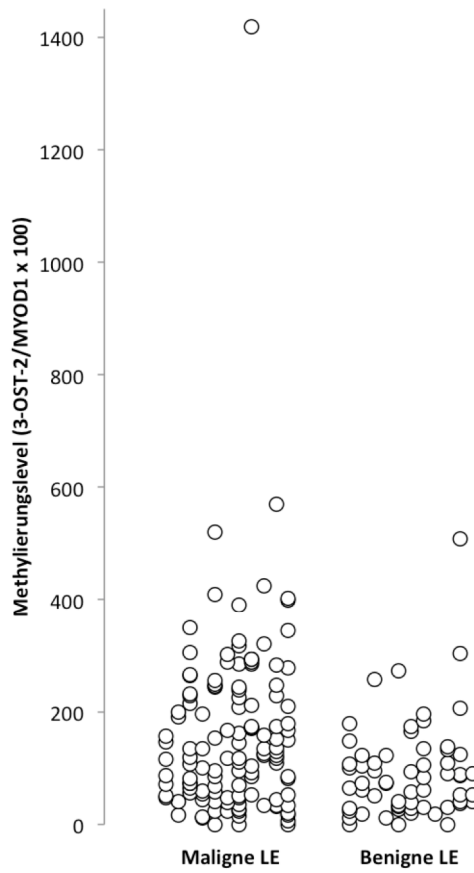


Abb. 4.16: Methylierungslevel des 3-OST-2-Genpromotors. Methylierungslevel (3-OST-2 / MYOD1 x 100) bei maligner Lungenerkrankung (n = 117) und benigner Lungenerkrankung (n = 61). LE = Lungenerkrankung.

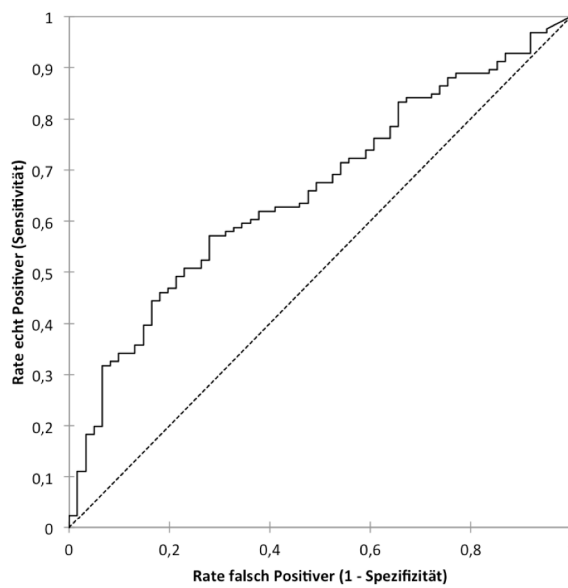


Abb. 4.17: ROC-Kurve zur Diskrimination zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung anhand der Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors. AUC (95 % CI): 0,659 (0,580 – 0,737).

Eine gängige Methode zur Ermittlung eines *cut-off*-Levels ist die Bestimmung des höchsten Youden's Index der ROC-Kurve (Summe der Sensitivität und Spezifität eines Punktes der Kurve minus eins). Hier liegt dieser bei einem Methylierungslevel von 110,4. Bei diesem Cut-Off-Level ergibt sich eine Sensitivität von 57 % bei einer Spezifität von 72 %. Da eine Spezifität von 72 % im Umkehrschluss eine Rate falsch positiver Patienten von 28 % bedeutet, ist dieser *cut-off*-Wert für einen klinischen Test zur Ermittlung einer malignen Lungenerkrankung inakzeptabel. Die wichtigste Eigenschaft eines solchen Testes ist eine möglichst geringe Rate falsch positiver Patienten. Bei einer Spezifität von 95 % hinsichtlich der Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors verbleibt eine Sensitivität von 18 % bei einem entsprechenden Methylierungslevel von 264,6 als *cut-off*-Wert. In der weiteren Analyse wurde dieses *cut-off*-Level verwandt.

4.4.2 Anwendung des gewählten *cut-off*-Levels

Bei dem unter Abschnitt 4.4.1 beschriebenen *cut-off*-Level zeigte sich die QMSP hinsichtlich der Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors bei 17 von 108 Patienten mit einem primären malignen Lungentumor positiv (Sensitivität 16 %). In der Gruppe der Patienten mit benigner Lungenerkrankung (n = 61) zeigten sich drei Patienten falsch positiv (Spezifität 95 %). Die Diskrimination zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung anhand der Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors war knapp statistisch signifikant (p = 0,046).

Tumorentitäten:

Unter den 17 richtig positiven Fällen zeigten 8 Patienten ein Adenokarzinom der Lunge (18 %, 8/45). Unter den verschiedenen Karzinomentitäten war das Adenokarzinom das einzige, welches hinsichtlich der Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors gegenüber den Patienten mit benigner Lungenerkrankung statistische Signifikanz zeigte (p < 0,05). Weiterhin zeigten sich 4 Fälle mit einer Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors unter den Patienten mit Plattenepithelkarzinom (13 %, 4/30), 3 Fälle unter den anderen nicht-subklassifizierbaren / nicht-kleinzelligen Karzinomen (21 %, 3/14) und 2 Fälle unter den kleinzelligen Lungenkarzinomen (13 %, 2/16).

Alter, Geschlecht, Rauchverhalten:

Unter den 17 Patienten mit einer Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors und primärem malignem Lungentumor waren 8 jünger als 65 Jahre (16 %, 8/51) und 9 Patienten \geq 65 Jahre (16 %, 3/57), 12 Patienten waren männlich (18 %, 12/65) und 5 Patienten weiblich (12 %, 5/43). Unter den 90 Rauchern zeigten 14 Patienten (16 %) und unter den 6 Nichtrauchern ein Patient (17 %) eine Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors. Weder hinsichtlich des Alters (p = 1), des

Geschlechtes ($p = 0,424$) noch hinsichtlich des Raucherstatus ($p = 1$) zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied.

Lokalisation:

Hinsichtlich der Tumorlokalisation (zentral: $n = 73$, peripher: $n = 34$; bei einem Patienten Lokalisation nicht ermittelbar) zeigten 11 Patienten (15 %) mit zentralem und 6 Patienten (18 %) mit peripherem primärem malignem Lungentumor eine Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors ($p = 0,780$, nicht signifikant).

Zytologie:

Bei Patienten mit primärem malignem Lungentumor wurde nach 12 *positiven*, 3 *unklaren* (3 *dringend verdächtigen*, keiner *zweifelhaften*) und 2 *negativer* Diagnosen eine Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors nachgewiesen ($n = 17$).

Falsch positive Patienten

Insgesamt zeigten 3 Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung ($n = 61$) eine Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors über dem festgelegten *cut-off*-Wert. Eine Patientin (71 Jahre, Raucher) zeigte röntgenmorphologisch einen Rundherd im linken Oberlappen der Lunge, welcher operativ saniert wurde und histogenetisch am ehesten einer tuberkulösen Veränderung entsprach, jedoch ohne Nachweis säurefester Stäbchen. Zytologisch wurde die Patientin in die Kategorie *zweifelhaft* eingeordnet. Ein weiterer Patient (männlich, 83 Jahre, Nichtraucher) zeigte eine Lungenembolie mit Koagelbildung im rechten Lungenoberlappen. Die Erhebung des Referenzstandards erfolgte hier auf klinischer Grundlage, zytologisch stellte sich der Patient *negativ* dar. Der dritte Patient zeigte ebenfalls eine Hypermethylierung des APC-Genpromotors und wurde in Abschnitt 4.3.1 bereits aufgeführt.

4.4.3 Erweiterung des QMSP-Panels um den 3-OST-2-Genpromotor

Erweitert man das 3-Marker-QMSP-Genpanel aus APC, $p16^{\text{Ink4A}}$ und RASSF1A um den 3-OST-2-Genpromotor, zeigten 61 von 108 tumorpositiven Patienten dieses Patientenkollektivs eine Hypermethylierung mindestens eines der 4 Genpromotoren. In der Gruppe der Patienten mit benigner Lungenerkrankung ($n = 61$) zeigten 3 Patienten eine Hypermethylierung des 3-OST-2-, einer dieser Patienten zusätzlich des APC-Genpromotors. Somit zeigte das 4-Marker-QMSP-Genpanel aus APC, $p16^{\text{Ink4A}}$, RASSF1A und 3-OST-2 in diesem Patientenkollektiv eine Sensitivität von 56 % und eine Spezifität von 95 %. Auch das 4-Marker-Genpanel konnte signifikant zwischen beiden Gruppen unterscheiden ($p < 0,001$).

5. Diskussion

Die Promotorhypermethylierung verschiedener Tumorsuppressorgene und der damit verbundene Verlust der Genexpression ist ein häufiges Ereignis in der Genese des Lungenkarzinoms. Ein quantitativer Methylierungsnachweis kann sowohl an Tumorsektaten als auch an bioptischem zytologischem oder histologischem Untersuchungsmaterial erfolgen und ist hochspezifisch für eine maligne Transformation (Referenzen siehe Tabelle 5.1a-c). Besonders zytologisches Untersuchungsmaterial ist wenig invasiv entnommen und ermöglicht daher zusätzlich zur morphologischen Tumordiagnose eine parallele quantitative Methylierungsanalyse an gleichem Untersuchungsmaterial. Diese kann gerade bei morphologisch-diagnostisch nicht sicherem Tumornachweis die zytologische Diagnose stützen. Die vorliegende Arbeit untersucht erneut die diagnostische Anwendbarkeit des im Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bereits etablierten Genpanels aus APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A und prüft die Erweiterbarkeit des Panels durch Hinzunahme von 3-OST-2.

In dem hier vorliegenden Patientenkollektiv konnte in 21, 19 bzw. 31 Fällen von 108 Patienten mit einem primären malignen Lungentumor eine Hypermethylierung des APC-, p16^{Ink4A}- bzw. RASSF1A-Genpromotors nachgewiesen werden. 55 von 108 Patienten mit einem malignen Tumor der Lunge zeigte in der kombinierten Auswertung die Hypermethylierung mindestens eines Promotors des Genpanels, was einer Sensitivität von 51 % entspricht. Unter den 61 Patienten mit benigner Lungenerkrankung zeigte sich 1 Patient mit einer Hypermethylierung des APC-Genpromotors, einer Spezifität des Genpanels von 98 % entsprechend. Diese Ergebnisse bestätigen eine frühere Studie des Instituts für Cytopathologie mit gleichem Genpanel aus APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A, welche eine Sensitivität von 53 % und eine Spezifität von > 99 % zeigte [153].

Unter den zum Vergleich herangezogenen Studien (Referenzen siehe Tabelle 5.1) zeigten sich teils extreme Unterschiede in den Ergebnissen. Dies ist auf Unterschiede im verwendeten Studiendesign, PCR-Protokoll, in den untersuchten Materialien sowie im Einzelfall auch auf andere Faktoren wie gravierende Unterschiede im Patientenkollektiv zurückzuführen. Zum Vergleich und zur Einordnung der eigenen Ergebnisse werden diese im Folgenden differenzierter diskutiert.

5.1 Quantitative und konventionelle MSP im Vergleich

Herman et al. entwickelten aufbauend auf der Bisulfitkonversion (siehe Abschnitt 3.3) die Methylierungsspezifische PCR (MSP, siehe Abschnitt 3.4) [150]. Selbst diese anfängliche Methode zeigte schon hohe Sensitivitäten mit einer Detektion von einem methylierten Allel unter 1.000 nicht-methylierten Allelen [150]. *Palmisano et al.* entwickelten diese Methode zu einer 2-Schritt-MSP weiter (*nested-PCR*) [204]. Bei dieser Methode kommt vor der Methylierungsspezifischen eine weitere nicht-Methylierungsspezifische PCR zum Einsatz, deren Primer die zu untersuchende Region des entsprechenden Genpromotors flankieren, womit DNA-Fragmente < 1.000 bp amplifiziert werden [204]. Dies steigerte die Sensitivität deutlich auf ein detektierbares, methyliertes Allel unter 10.000 nicht-methylierten [205]. Andererseits senkte die 2-Schritt-MSP damit jedoch erheblich die Spezifität, was in der klinischen Anwendung zu falsch positiven Befunden führen würde. Zudem führten beide genannten Methoden schon ab einem Methylierungslevel von 10 % zu positiven Ergebnissen [150], [204]. Eine zu häufige Amplifikation des Untersuchungsmaterials hebt das regelhafte Vorkommen von methylierten CpG-Dinukleotide im untersuchten DNA-Abschnitt über die detektierbare Schwelle, führt zu falsch positiven Ergebnissen und wird somit klinisch unbrauchbar.

Eads et al. entwickelten die MSP zu einem quantitativen Methylierungsnachweis weiter (QMSP) [149]. Durch eine Fluoreszenz-markierte DNA-Sonde, welche zwischen den beiden Primern hybridisiert, wird eine Quantifizierung der Methylierung möglich (siehe Abschnitt 3.4). Zudem erhöht sich durch die Sonde die Spezifität der Methode [149]. Verschiedene Methylierungslevel können durch die Quantifizierung in eine relative Beziehung zu Referenzgenen (hier MYOD1, siehe Abschnitt 3.4) gesetzt werden. Somit lassen sich Schwellenwerte (*cut-off-Level*) für die Diskrimination zwischen einer positiven und einer negativen Probe definieren.

Im Folgenden wird die QMSP (quantitative MSP) mit der CMSP (konventionelle MSP) verglichen, wobei aufgrund sekundärer Bedeutung für die vorliegende Arbeit unter CMSP Studien hier 1-Schritt- und 2-Schritt-MSP subsummiert werden. Bei der Auswahl der hier angeführten Studien (Referenzen siehe Tabelle 5.1a-c) wurde darauf geachtet, die Anzahl der unterschiedlichen, in den Studien verwendeten PCR-Protokolle (Primer, Sonden) klein zu halten, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Betrachtet man ausschließlich die Studien unter den hier angeführten, welche die QMSP zur Analyse der Genpromotorhypermethylierung verwendeten, zeigten sich diese durchweg spezifischer im Vergleich zu den CMSP-Studien. Dies bedingt eine wesentlich geringere Rate an falsch positiven Fällen und stellt den entscheidenden Vorteil der QMSP als Methode hinsichtlich der Diagnostik von malignen Lungentumoren dar.

QMSP-Studien zur Hypermethylierung des APC-Genpromotors wiesen Spezifitäten von 94 – 100 % (Mittelwert = 95 %) auf [94], [100], [153], [154], [163], [164], [206], [207], worin sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit einer Spezifität von 98 % sehr gut einordnen. Im Vergleich dazu lagen CMSP-

Studien mit Spezifitäten von 69 – 100 % (Mittelwert = 85 %) deutlich darunter [95], [99], [162], [208], [209]. Ausgenommen ist hier die Studie von *Jin et al.* [210], welche trotz QMSP-Protokoll nur eine Spezifität von 65 % aufwies. Der Grund für diese starke Abweichung wird am zu niedrig gewählten *cut-off*-Level für die Methylierung des APC-Gens liegen, was auch die höchste Sensitivität (38 %) unter den aufgeführten QMSP-Studien erklärt.

Ähnliches zeigte sich hinsichtlich des p16^{Ink4A}-Genpromotors mit Spezifitäten von 83 – 100 % (Mittelwert = 97 %) in der Literatur [94], [153], [155], [210]–[215], was gegenüber den CMSP-Studien mit Raten von 56 – 100 % (Mittelwert = 87 %) deutlich höher war [95], [99], [205], [208], [209], [216]–[226]. Studien mit QMSP-Protokoll zeigten hinsichtlich der Hypermethylierung des RASSF1A-Promotors mit 96 – 100 % (Mittelwert = 99 %) die höchsten Spezifitäten der untersuchten drei Gene [94], [153], [156], [206], [207], [210]–[213], [227]–[229]. Allerdings war hier der Unterschied zu CMSP-Studien mit Werten von 92 – 100 % (Mittelwert = 96 %) weniger deutlich [95], [99], [107], [205], [208], [209], [216], [218], [222], [224], [226], [230]. Sowohl für den Nachweis einer Hypermethylierung des Promotors von p16^{Ink4A} als auch von RASSF1A zeigte die vorliegende Arbeit eine Spezifität von 100 %, was zu dem aufgezeigten Ergebnissen der verschiedenen QMSP-Studien passt.

Die Höhere Spezifität der QMSP bedingt meist jedoch geringere Detektierungsraten der Hypermethylierung der untersuchten Genpromotoren (Sensitivität) bei Patienten mit einem primären malignen Lungentumor. Diese Tatsache ist bei einem Werkzeug in der Diagnostik für maligne Erkrankungen viel eher in Kauf zu nehmen, als falsch positive Befunde (geringere Spezifitäten).

QMSP-Studien wiesen im Falle des APC-Genpromotors bei Lungentumorpatienten relative Raten der Hypermethylierung (Sensitivitäten) von 16 – 31 % (Mittelwert = 24 %) auf [94], [100], [153], [154], [163], [164], [206], [207], CMSP-Studien im Vergleich dazu 23 – 45 % (Mittelwert = 40 %) [95], [99], [162], [208], [209]. Hinsichtlich der Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors betrug der Unterschied zwischen QMSP- und CMSP-Studien 12 – 45 % (Mittelwert = 22 %) [94], [153], [155], [210]–[215] zu 6 – 64 % (Mittelwert = 34 %) [95], [99], [205], [208], [209], [216]–[226]. Bei der Analyse des RASSF1A-Promotors waren Studien mit QMSP-Protokoll mit Werten von 27 – 73 % (Mittelwert = 44 %) [94], [100], [153], [156], [206], [207], [210]–[213], [227]–[229] gegenüber Studien mit CMSP-Protokoll mit Werten von 6 – 51 % (Mittelwert = 33 %) [95], [99], [107], [205], [208], [209], [216], [218], [222], [224], [226], [230] hinsichtlich der Sensitivität sogar überlegen. Die eigenen Ergebnisse des Hypermethylierungsnachweises des APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A-Promotors mit Sensitivitäten von 19, 18 und 29 % harmonisieren auch in dieser Hinsicht mit den Ergebnissen der aufgeführten QMSP-Studien.

5.2 Bedeutung der Verwendung von zytologischem Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden Bronchialaspirate von Patienten mit malignen und benignen Lungenerkrankungen untersucht. Das Untersuchungsmaterial wurde zuvor in Saccomannos-Lösung fixiert. Die hier aufgeführten Studien mit QMSP-Protokoll und zytologischem Untersuchungsmaterial (Sputum, Bronchialaspirate; Referenzen siehe Tabelle 5.1a-c) verwendeten ebenfalls Saccomannos-Fixativ bis auf eine Studie von *Topaloglu et al.*, in welcher die zentrifugierten Zellpellets bei -80°C konserviert wurden [100]. In den übrigen Studien (Referenzen siehe Tabelle 5.1a-c) wurde das Material (zytologisch oder Gewebe) meist mittels flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C bis -140°C konserviert. Bei einigen Studien stammte das Material für die PCR aus Paraffinblöcken von reseziertem Tumorgewebe [95], [209], [215], [216], [223], [228], [229]. Das Gewebe aus Paraffinblöcken wurde mittels Formalin fixiert, welches DNA stark degradiert und damit die Bisulfitkonversion beeinträchtigt, demgegenüber bleibt DNA in Saccomannos-Fixativ oder $< -80^{\circ}\text{C}$ gefrorenem Untersuchungsmaterial in einem chemisch unmodifizierten Zustand konserviert [146].

Zwischen den Studien mit zytologischem oder histologischem Untersuchungsmaterial gab es deutliche Unterschiede in den Ergebnissen der Promotorhypermethylierung. Die hier verwandten Bronchialaspirate implizieren einen geringeren Gehalt an Tumorzellen und einen höheren Gehalt an gesunden Zellen im Vergleich zu reseziertem Tumorgewebe, was hohe Anforderungen hinsichtlich der Sensitivität an die verwandte Methode stellt. Studien mit QMSP-Protokoll und zytologischem Untersuchungsmaterial (Sputum, Bronchialaspirate, bronchiale Bürstungen) zeigten Sensitivitäten von 16 – 31 % (Mittelwert = 22 %) und Spezifitäten von 94 – 100 % (Mittelwert = 98 %) hinsichtlich der Hypermethylierung des APC-Genpromotors [94], [100], [153], [154], [206], [207]. Für den $p16^{\text{Ink4A}}$ - bzw. RASSF1A-Genpromotor zeigten sich relative Raten der Hypermethylierung von 12 – 24 % (Mittelwert = 19 %) bzw. 38 – 44 % (Mittelwert = 42 %) bei Patienten mit einem malignen Lungentumor (Sensitivität) und Werte von 100 % bzw. 96 – 100 % (Mittelwert = 98 %) in den tumorfreien Kontrollgruppen (Spezifität) [94], [153], [155], [156], [206], [207], [211], [212], [227]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Sensitivität bzw. Spezifität für APC 19 % bzw. 98 %, für $p16^{\text{Ink4A}}$ 18 % bzw. 100 % und RASSF1A 29 % bzw. 100 %) bestätigen im Wesentlichen die Werte aus der Literatur. Die geringere relative Rate der Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors von 29 % bleibt teilweise unklar, könnte jedoch im geringen Anteil an kleinzelligen Karzinomen dieses Patientenkollektivs (16 von 108 primären malignen Lungentumoren, 15 %) begründet sein. *Grote et al.* zeigten der Literatur entsprechende Sensitivitäten in der Detektierung einer RASSF1A-Promotorhypermethylierung von 44 % [156]. Hier war der Anteil der kleinzelligen Lungenkarzinome mit 29 % (46 von 157 malignen Lungentumoren) wesentlich höher. Andererseits zeigten *Schmiemann et al.* ähnlich häufig Hypermethylierungen des RASSF1A-Genpromotors (41 %) bei einem wesentlich geringeren Anteil an kleinzelligen Karzinomen (19 %, 17 von 89 malignen Lungentumoren) [153]. Beide Studien verwandten das gleiche QMSP-Protokoll mit gleichen Primern und Sonden wie die

vorliegende Arbeit.

Im Vergleich dazu zeigten QMSP-Studien an reseziertem Tumorgewebe für alle drei Genpromotoren höhere relative Raten der Hypermethylierung (APC: 25 – 30 % (Mittelwert = 27 %) [94], [163], [164], p16^{Ink4A}: 14 – 45 % (Mittelwert = 25 %) [94], [210], [213]–[215], RASSF1A: 27 – 73 % (Mittelwert = 48 %) [94], [210], [213], [228], [229]). Dies ist wohl in der deutlich höheren Anzahl von Karzinomzellen im Resektat begründet, wodurch der Schwellenwert der Detektion häufiger überschritten wird. In den meisten der genannten Studien wurde benachbartes, histologisch-karzinomfreies Gewebe des Resektats als Negativkontrolle der QMSP verwandt. Das 100 % bzw. im Mittel 96 % korrekt als karzinomfrei erkannte Material für den APC- und RASSF1A-Promotor bzw. den p16^{Ink4A}-Genpromotor bestätigt die hohe Spezifität der QMSP und zeigt ihre sehr gute Diskriminationsfähigkeit zwischen benigne und maligne. Die Resultate der QMSP an zytologischem und reseziertem Untersuchungsmaterial sind demnach vereinbar, was darauf hinweist, dass maligne Tumoren der Lunge anhand der QMSP an zytologischem Untersuchungsmaterial in hohen Raten nachgewiesen werden können.

Zwei der hier angeführten Studien mit QMSP-Protokoll machten den direkten Vergleich zwischen zytologischem und reseziertem Untersuchungsmaterial. *Topaloglu et al.* untersuchten in Ihrer Studie die Hypermethylierung von acht Genpromotoren (u. a. APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A) an 31 Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [100]. Von diesen Patienten stand sowohl das Resektat als auch eine direkt vor der Operation gewonnene bronchoalveoläre Lavage (BAL) zur Verfügung. Hier zeigte die QMSP eine wesentlich geringere relative Rate der Hypermethylierung aller drei Gene an der BAL gegenüber dem Resektat: APC 16 vs. 55 %, p16^{Ink4A} 3 vs. 23 % und RASSF1A 12 vs. 45 %. Eine karzinomnegative Kontrollgruppe lag nur für die BAL vor und zeigte bei allen drei Genpromotoren eine Spezifität von 100 %. Die Studie von *Shivarpurkar et al.* machte den direkten Vergleich an Sputum und reseziertem Tumorgewebe der selben Patienten mit einem QMSP-Genpanel, welches auch APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A enthielt [94]. Die Spezifität zeigte sich hier in allen Fällen (definitionsgemäß) mit 100 % stabil. Die Sensitivität hinsichtlich der Detektion einer Hypermethylierung der Genpromotoren überstieg bei allen drei Genen an reseziertem Tumorgewebe (APC 30 %, p16^{Ink4A} 45 %, RASSF1A 45 %) die Sensitivität an Sputen (APC 23 %, p16^{Ink4A} 23 %, RASSF1A 39 %). Dies bestätigt den oben beschriebenen Trend einer geringeren Sensitivität der QMSP an zytologischem Untersuchungsmaterial bei gleichbleibender Spezifität, was in der geringeren Tumorzellzahl im zytologischen Material begründet ist. Wichtiger ist jedoch, dass es in beiden Studien keinen Fall einer Hypermethylierung im zytologischen Material gab, wenn diese nicht auch gleichzeitig im Resektat vorlag [94], [100]. Dies zeigt, dass die QMSP im Falle der drei Genpromotoren APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A an zytologischem Material ein reliables und bei ggf. erforderlicher Etablierung von diagnostischen Schwellenwerten ein tumorspezifisches Verfahren zur Detektion von Lungenkarzinomen ist.

Weitere Studien zeigen die Reliabilität der Detektierung einer Genpromotorhypermethylierung an

zytologischem gegenüber reseziertem Untersuchungsmaterial mit einem CMSP-Protokoll für die drei hier untersuchten Gene APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A [216]–[218], [220], [222]. Auch hier zeigte sich die Sensitivität der Methode an zytologischem Material geringer. In diesen Studien gab es zusammengenommen nur einen Fall in dem eine Hypermethylierung eines Genpromotors (p16^{Ink4A}) in zytologischem Material, jedoch nicht im Resektat auftrat [216]. Es ist bekannt, dass eine p16^{Ink4A} Methylierung bei Rauchern ohne Nachweis eines malignen Lungentumors vorliegen kann [221].

Unter den zytologischen Materialien gibt es zwei wesentliche Gruppen, Sputum und bronchoskopisch gewonnenes Material (bronchiale Bürstungen, Bronchiallavagen und bronchoalveoläre Lavagen). Der Vorteil von bronchoskopischem Material ist die standardisierte Methode der selektiven Probenentnahme z. B. aus in der Bildgebung verdächtigen Lungenabschnitten. Der Nachteil ist, dass die Methode zeit- und kostenaufwändig ist und der Patient meist sediert oder anästhesiert werden muss. Sputum hingegen kann durch den Patienten selbst gesammelt werden. Dies erfordert jedoch eine recht hohe Compliance des Patienten, denn um verwertbare Proben zu erhalten sollte mehrfach morgendlich gesammeltes, und ggf. durch einen NaCl-Vernebler induziertes Sputum gepoolt werden. Eine Studie von *Cirincione et al.*, welche nicht-induziertes, einmalig morgens gewonnenes Sputum von Patienten mit maligner Lungenerkrankung untersuchte, zeigte mit nur 6 %iger Sensitivität für die Hypermethylierung des p16^{Ink4A}- und RASSF1A-Genpromotors auffällig niedrige Werte (Spezifität 86 bzw. 99 %). Das resezierte Tumorgewebe derselben Patienten hingegen wies relative Raten der Hypermethylierung von 41 bzw. 52 % auf [224]. Zudem ist Sputum durch Zellen aus dem gesamten oberen Aerodigestivtrakt verunreinigt, was zu mehr falsch positiven Ergebnissen führen kann [221], [231]. Unter den hier vorliegenden Studien mit QMSP-Protokoll zeigten sich jedoch durchaus vergleichbare Ergebnisse für Sputen und bronchoskopisch gewonnenes Untersuchungsmaterial. Im Mittel zeigten sich Spezifitäten von > 99 % für bronchoskopisch gewonnene Materialien und 97 %, 100 % bzw. 97 % für Sputen für den APC-, p16^{Ink4A}- bzw. RASSF1A-Genpromotor. Die mittleren Sensitivitäten lagen bei 21 %, 15 % und 37 % bei bronchoskopisch gewonnenem Material gegenüber 24 %, 23 % und 40 % bei Sputen (Referenzen siehe Tabelle 5.1a-c). In wie weit die leicht niedrigeren Spezifitäten und leicht höheren Sensitivitäten der (Q)MSP an Sputen auf einen Feldeffekt der Karzinogenese zurückzuführen sind wird in Abschnitt 5.6 diskutiert.

Tabelle 5.1

Seite 75 – 78

Tabelle 5.1a: Ausgewählte Studien zur Hypermethylierung des APC-Genpromotors.....	75
Tabelle 5.1b: Ausgewählte Studien zur Hypermethylierung des p16 ^{Ink4A} -Genpromotors.....	75
Tabelle 5.1c: Ausgewählte Studien zur Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors	77
Tabelle 5.1: Legende.....	78

Tabelle 5.1a: Ausgewählte Studien zur Hypermethylierung des APC-Genpromotors

Autor / Referenz	Probe	Methode	Spezifität	Sensitivität	AC ^a	SCC ^a	oNSCLC ^a	SCLC ^a
Grote et al., 2004 [154]	BA, BB	QMSP	99 % (1/67)	29 % (45/155)	34 % (14/41)	26 % (12/47)	57 % (12/21)	13 % (5/40)
Schmiemann et al., 2005 [153]	BA, BB	QMSP	99 % (1/102)	16 % (14/85)	24 % (8/33)	19 % (3/16)	17 % (3/18)	0 % (0/17)
Vorliegende Arbeit	BA, BB	QMSP	98 % (1/61)	19 % (22/117)	30 % (15/50)	17 % (5/30)	13 % (2/16)	0 % (0/16)
Topaloglu et al., 2004 [100]	BA	QMSP	100 % (0/10)	16 % (5/31)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Shivapurkar et al., 2007 [94]	Sputum	QMSP	100 % (0/25)	23 % (3/13)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Hubers et al., 2014 [207]	Sputum	QMSP	94 % (5/90)	31 % (30/98)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Hubers et al., 2012 [206]	Sputum	QMSP	96 % (2/47)	17 % (9/35)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Shivapurkar et al., 2007 [94]	Gewebe	QMSP	100 % (0/40) ^b	30 % (12/40)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Jin et al., 2009 [210]	Gewebe	QMSP	65 % (22/63) ^b	38 % (27/72)	42 % (18/43)	30 % (7/23)	k. M.	k. M.
Brabender et al., 2001 [163]	Gewebe	QMSP	100 % (0/10)	25 % (23/91)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Usadel et al., 2002 [164]	Gewebe	QMSP	entfällt ^c	25 % (23/93)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Toyooka et al., 2001 [99]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	34 % (54/158)	53 % (41/77)	16 % (6/38)	k. M.	16 % (7/43)
Zhang et al., 2011 [208]	Gewebe	CMSP	87 % (10/78) ^b	56 % (44/78)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Safar et al., 2005 [209]	Gewebe	CMSP	69 % (10/32) ^b	23 % (24/105)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Toyooka et al., 2003 [95]	Gewebe	CMSP	86 % (12/84) ^b	41 % (211/514)	54 % (161/299)	22 % (43/194)	53 % (11/21)	k. M.
Virmani et al., 2001 [162]	Gewebe	CMSP	100 % (0/18) ^b	46 % (22/48)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.

Tabelle 5.1b: Ausgewählte Studien zur Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors

Autor / Referenz	Probe	Methode	Spezifität	Sensitivität	AC ^a	SCC ^a	oNSCLC ^a	SCLC ^a
Schmiemann et al., 2005 [153]	BA, BB	QMSP	100 % (0/102)	12 % (10/85)	6 % (2/33)	38 % (6/16)	57 % (12/21)	6 % (1/17)
Grote et al., 2005 [155]	BA, BB	QMSP	100 % (0/54)	24 % (18/75)	12 % (3/25)	56 % (14/25)	k. M.	4 % (1/25)
Vorliegende Arbeit	BA, BB	QMSP	100 % (0/61)	17 % (20/117)	12 % (6/50)	30 % (9/30)	19 % (3/16)	0 % (0/16)
Nikolaidis et al., 2012 [211]	BA	QMSP	100 % (1/322)	16 % (54/333)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Topaloglu et al., 2004 [100]	BA	QMSP	100 % (0/10)	3 % (1/31)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
De Jong et al., 2009 [212]	BB	QMSP	100 % (0/18)	20 % (2/10)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.

Autor / Referenz	Probe	Methode	Spezifität	Sensitivität	AC ^a	SCC ^a	oNSCLC ^a	SCLC ^a
Shivapurkar et al., 2007 [94]	Sputum	QMSP	100 % (0/25)	23 % (3/13)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Shivapurkar et al., 2007 [94]	Gewebe	QMSP	100 % (0/40) ^b	45 % (18/40)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Jin et al., 2009 [210]	Gewebe	QMSP	98 % (1/63) ^b	14 % (10/72)	9 % (4/43)	22 % (5/23)	k. A.	k. M.
Gu et al., 2006 [213]	Gewebe	QMSP	entfällt ^c	22 % (34/155)	23 % (18/77)	25 % (13/52)	12 % (3/25)	k. M.
Hong et al., 2007 [214]	Gewebe	QMSP	89 % (9/81)	27 % (22/81)	15 % (5/34)	35 % (14/40)	43 % (3/7)	k. M.
Ota et al., 2006 [215]	Gewebe	QMSP	entfällt ^c	18 % (43/244)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Kim et al., 2004 [216]	BA	CMSP	94 % (8/127)	16 % (14/85)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Ahrendt et al., 1999 [217]	BA	CMSP	entfällt ^c	24 % (12/50)	37 % (7/19)	22 % (5/23)	0 % (0/8)	k. M.
Guo et al., 2004 [218]	BA	CMSP	100 % (0/20)	20 % (4/20)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Chan et al., 2002 [219]	BA	CMSP	entfällt ^c	26 % (11/43)	k. A.	k. A.	k. M.	k. M.
Kersting et al., 2000 [220]	BA, BB	CMSP	88 % (3/25)	22 % (11/51)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Belinsky et al., 2002 [221]	BB	CMSP	56 % (18/41)	44 % (23/52)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Belinsky et al., 2006 [205]	Sputum	CMSP	73 % (25/92)	40 % (39/98)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Belinsky et al., 2007 [222]	Sputum	CMSP	entfällt ^c	40 % (29/72)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Destro et al., 2004 [223]	Sputum	CMSP	96 % (4/100)	32 % (16/50)	k. A.	k. A.	k. M.	k. M.
Cirincione et al., 2006 [224]	Sputum	CMSP	82 % (20/112)	6 % (1/18)	k. A.	k. A.	k. M.	k. M.
Kersting et al., 2000 [220]	Gewebe	CMSP	84 % (5/25)	35 % (18/51)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Belinsky et al., 2007 [222]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	47 % (34/72)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Kim et al., 2004 [216]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	28 % (24/85)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Ahrendt et al., 1999 [217]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	38 % (19/50)	47 % (9/19)	39 % (9/23)	13 % (1/8)	k. M.
Chan et al., 2002 [219]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	64 % (48/75)	55 % (24/44)	68 % (21/31)	k. M.	k. M.
Toyooka et al., 2001 [99]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	25 % (40/158)	26 % (20/77)	42 % (16/38)	k. M.	9 % (4/43)
Zhang et al., 2011 [208]	Gewebe	CMSP	94 % (5/78) ^b	26 % (20/78)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Safar et al., 2005 [209]	Gewebe	CMSP	75 % (8/32) ^b	40 % (42/105)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Toyooka et al., 2003 [95]	Gewebe	CMSP	95 % (4/84) ^b	25 % (129/514)	18 % (55/299)	35 % (67/194)	33 % (7/21)	k. M.
Xie et al., 2006 [225]	Gewebe	CMSP	75 % (9/36)	64 % (43/67)	60 % (9/15)	73 % (19/26)	40 % (4/10)	67 % (11/16)

Autor / Referenz	Probe	Methode	Spezifität	Sensitivität	AC ^a	SCC ^a	oNSCLC ^a	SCLC ^a
Destro et al., 2004 [223]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	48 % (24/50)	45 % (15/33)	52 % (9/17)	k. M.	k. M.
Cirincione et al., 2006 [224]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	41 % (12/29)	60 % (3/5)	41 % (9/22)	k. M.	k. M.
Wang et al., 2004 [226]	Gewebe	CMSP	91 % (11/119)	51 % (61/119)	43 % (26/60)	53 % (26/49)	60 % (6/10)	k. M.

Tabelle 5.1c: Ausgewählte Studien zur Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors

Autor / Referenz	Probe	Methode	Spezifität	Sensitivität	AC ^a	SCC ^a	oNSCLC ^a	SCLC ^a
Grote et al., 2006 [156]	BA, BB	QMSP	100 % (0/46)	44 % (66/151)	26 % (11/42)	27 % (13/48)	33 % (7/21)	88 % (35/40)
Schmiemann et al., 2005 [153]	BA, BB	QMSP	100 % (0/102)	41 % (35/85)	33 % (11/33)	25 % (4/16)	28 % (5/18)	82 % (14/17)
van der Drift et al., 2012 [227]	BA	QMSP	96 % (1/28)	43 % (55/129)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Vorliegende Arbeit	BA, BB	QMSP	100 % (0/61)	29 % (32/117)	24 % (12/50)	17 % (5/30)	25 % (4/16)	69 % (11/16)
Topaloglu et al., 2004 [100]	BA	QMSP	100 % (0/10)	13 % (4/31)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Nikolaïdis et al., 2012 [211]	BA	QMSP	98 % (2/322)	44 % (146/333)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
De Jong et al., 2009 [212]	BA	QMSP	100 % (0/18)	40 % (4/10)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Shivapurkar et al., 2007 [94]	Sputum	QMSP	100 % (0/25)	39 % (5/13)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Hubers et al., 2012 [206]	Sputum	QMSP	96 % (2/47)	42 % (22/53)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Hubers et al., 2014 [207]	Sputum	QMSP	96 % (4/90)	41 % (40/91)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Shivapurkar et al., 2007 [94]	Gewebe	QMSP	100 % (0/40) ^b	45 % (18/40)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Jin et al., 2009 [210]	Gewebe	QMSP	100 % (0/63) ^b	49 % (35/72)	58 % (25/43)	39 % (9/23)	k. M.	k. M.
Gu et al., 2006 [213]	Gewebe	QMSP	entfällt ^c	27 % (42/155)	38 % (29/77)	21 % (11/52)	8 % (2/25)	k. M.
Hoque et al., 2010 [228]	Gewebe	QMSP	entfällt ^c	48 % (50/104)	56 % (25/45)	54 % (25/46)	54 % (7/13)	k. M.
Ji et al., 2011 [229]	Gewebe	QMSP	100 % (0/15)	73 % (70/96)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Kim et al., 2004 [216]	BA	CMSP	94 % (5/127)	18 % (15/85)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Guo et al., 2004 [218]	BA	CMSP	100 % (0/20)	30 % (6/20)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Belinsky et al., 2006 [205]	Sputum	CMSP	93 % (6/92)	12 % (12/98)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Belinsky et al., 2007 [222]	Sputum	CMSP	entfällt ^c	26 % (19/72)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Cirincione et al., 2006 [224]	Sputum	CMSP	99 % (1/112)	6 % (1/18)	k. A.	k. A.	k. M.	k. M.

Autor / Referenz	Probe	Methode	Spezifität	Sensitivität	AC ^a	SCC ^a	oNSCLC ^a	SCLC ^a
Toyooka et al., 2001 [99]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	49 % (77/158)	38 % (29/77)	34 % (13/38)	k. M.	81 % (35/43)
Zhang et al., 2011 [208]	Gewebe	CMSP	92 % (6/78) ^b	40 % (31/78)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Safar et al., 2005 [209]	Gewebe	CMSP	94 % (2/32) ^b	15 % (16/105)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Toyooka et al., 2003 [95]	Gewebe	CMSP	94 % (5/84) ^b	37 % (190/514)	36 % (108/299)	36 % (70/194)	57 % (12/21)	k. M.
Kim et al., 2004 [216]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	38 % (32/85)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Belinsky et al., 2007 [222]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	43 % (31/70)	k. A.	k. A.	k. A.	k. M.
Cirincione et al., 2006 [224]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	52 % (15/29)	60 % (3/5)	55 % (12/22)	k. M.	k. M.
Wang et al., 2004 [226]	Gewebe	CMSP	97 % (3/119)	39 % (46/119)	33 % (20/60)	45 % (22/49)	40 % (4/10)	k. M.
Liu et al., 2007 [230]	Gewebe	CMSP	entfällt ^c	47 % (57/122)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Yanagawa et al., 2007 [107]	Gewebe	CMSP	97 % (3/101)	42 % (42/101)	44 % (27/62)	38 % (15/39)	k. M.	k. M.

Tabelle 5.1: Studien zur Hypermethylierung des APC- (5.1a), p16^{Ink4A}- (5.1b) und RASS1A-Genpromotors (5.1c) und deren Sensitivitäten bzw. Spezifitäten, falls möglich mit Angaben zu einzelnen Tumorentitäten. **Abkürzungen: BA = Bronchialaspirat; BB = bronchialer Bürstenabstrich; QMSP = Quantitative Methylierungsspezifische PCR; CMSP = Konventionelle Methylierungsspezifische PCR; SCC = Plattenepithelkarzinom; AC = Adenokarzinom; oNSCLC = nicht-subklassifizierbare / nicht-kleinzellige Lungenkarzinome; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; k. A.: Zu den einzelnen Tumorentitäten wurden keine genauen Angaben gemacht; k. M.: Es lag kein Material dieser Tumorentität vor. **Anmerkungen:** **a:** Angegeben ist die relative Rate der Hypermethylierung des Genpromotors in %, Angaben in Klammern = (n_{positiv}/n_{gesamt}). **b:** Als negative Kontrolle diente hier dem Tumor benachbartes Lungengewebe. **c:** Es wurde keine entsprechende negative Kontrolle durchgeführt.**

5.3 Unterschiede der Hypermethylierung bei verschiedenen Tumorentitäten

5.3.1 Der APC-Genpromotor

In der vorliegenden Studie zeigte sich eine statistisch signifikant häufigere Hypermethylierung ($p = 0,014$) des APC-Genpromotors von Adenokarzinomen (14/45, 31 %) gegenüber kleinzelligen Karzinomen (0/16, 0 %). Auch Plattenepithelkarzinome (5/30, 17 %) und nicht-subklassifizierbare / nicht-kleinzellige Karzinome (2/14, 14%) zeigten sich gegenüber kleinzelligen Karzinomen häufiger hypermethyliert, jedoch ohne statistische Signifikanz. Es sind nur wenige Studien vorhanden, welche ebenfalls die Methylierung des APC-Genpromotors in kleinzelligen Karzinomen untersuchten. Vorangegangene Studien des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf an Bronchialaspiraten zeigten ähnliche Ergebnisse. So berichten *Schmiemann et al.* ebenfalls eine erhöhte Methylierung des APC-Genpromotors bei Adeno-, Plattenepithel- und nicht-subklassifizierbaren / nicht-kleinzelligen Karzinomen (24 %, 19 % und 17 %), wohingegen eine aberrante Methylierung bei kleinzelligen Lungenkarzinomen nicht nachgewiesen werden konnte [153]. In der Arbeit von *Grote et al.* zeigte sich ebenfalls der Trend einer Hypermethylierung bei nicht-kleinzelligen Karzinomen (Adenokarzinome 34 %, Plattenepithelkarzinome 26 %) gegenüber den kleinzelligen Lungenkarzinomen (13 %) [154].

Auch *Toyooka et al.* konnten eine signifikant höhere Methylierungsrate des APC-Genpromotors bei Adenokarzinomen (53 %) gegenüber den kleinzelligen Karzinomen (16 %) feststellen [99]. Dies konnte die Arbeitsgruppe in einer weiteren Studie 2003 bestätigen (Adenokarzinome 54 %, kleinzellige Karzinome 22 %) [95]. Beide Studien wurden mit einem CMSP-Protokoll an reseziertem Tumorgewebe durchgeführt, woraus im Vergleich zur QMSP höhere Methylierungsraten resultierten. Dennoch ist auch hier ein Trend hinsichtlich einer höheren Methylierungsrate bei Adeno- und Plattenepithelkarzinomen gegenüber kleinzelligen Lungenkarzinomen offensichtlich. Außerdem zeigten die beiden aufgeführten Studien eine signifikant höhere Methylierungsrate von Adenokarzinomen gegenüber Plattenepithelkarzinomen [95], [99]. Dies konnte durch keine andere hier angeführte Studie bestätigt werden (Referenzen siehe Tabelle 5.1a).

5.3.2 Der p16^{Ink4A}-Genpromotor

Der p16^{Ink4A}-Genpromotor zeigte sich im vorliegenden Patientenkollektiv ausschließlich in nicht-kleinzelligen Karzinomen der Lunge hypermethyliert; in keinem Fall (0/16) konnte eine Hypermethylierung in einem kleinzelligen Lungenkarzinom nachgewiesen werden. In der Literatur gibt es wiederum äußerst wenige Daten zur Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors in kleinzelligen Lungenkarzinomen. Zwei vergleichbare Studien aus dem Institut für Cytopathologie an zytologischem Untersuchungsmaterial zeigten hier Sensitivitäten der QMSP von 4 und 6 % [153],

[155]. Diese Ergebnisse bestätigen eine Tendenz aus der Studie von *Toyooka et al.*, die eine Sensitivität für kleinzellige Lungenkarzinome von 9 % zeigte; hier wurde eine CMSP an reseziertem Tumorgewebe durchgeführt [99]. Eine andere Tendenz mit einer Sensitivität der CMSP für kleinzellige Karzinome von 67 % zeigte eine Studie von *Xie et al.* [225]. Jedoch war dieses PCR-Protokoll mit einer p16^{Ink4A}-Promotorhypermethylierung von 25 % der Patienten mit benigner Lungenerkrankung wenig spezifisch, womit diese Resultate kritisch gesehen werden müssen.

Im vorliegenden Patientenkollektiv war eine p16^{Ink4A}-Genpromotorhypermethylierung von 30 % (9/30) bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom häufig. Dies erreichte im Vergleich zu Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge annähernd statistische Signifikanz ($p = 0,07$), was Ergebnisse früherer Studien aus dem Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf an Bronchialaspiraten bestätigen, welche mittels QMSP-Protokoll in 38 % bzw. 56 % der Plattenepithelkarzinome eine Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors detektierten [153], [155]. In beiden Studien zeigte sich eine statistische Signifikanz gegenüber Adenokarzinomen (relative Häufigkeit von 6 bzw. 12 %). Die meisten Studien (QMSP und CMSP), welche unterschiedliche Typen nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome untersuchten, zeigten eine Präferenz für Plattenepithelkarzinome [95], [99], [210], [213], [214], [219], [223], [225], [226]. Statistische Signifikanz gegenüber der Hypermethylierung in Adenokarzinomen konnte jedoch nur die Studie von *Toyooka et al.* aufzeigen [99]. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Promotors in nicht-kleinzelligen Karzinomen der Lunge, hier präferenziell in Plattenepithelkarzinomen, ein häufiges Ereignis ist und dieser Marker somit obligater Bestandteil eines Genpanels zur Detektierung von primären malignen Lungentumoren mittels QMSP sein sollte.

5.3.3 Der RASSF1A-Genpromotor

Der RASSF1A-Genpromotor zeigte im vorliegenden Kollektiv von Patienten mit einem primären malignen Lungentumor mit einer relativen Rate der Hypermethylierung (Sensitivität) von 69 % (11/16) eine deutliche Präferenz für kleinzellige Karzinome. Diese Präferenz zeigte sich gegenüber Adenokarzinomen ($p = 0,002$) und Plattenepithelkarzinomen ($p < 0,001$) statistisch signifikant. Auch dies bestätigt die Ergebnisse aus früheren Studien des Instituts für Cytopathologie an zytologischem Untersuchungsmaterial mit einer Prävalenz von 82 % bzw. 88 % bei kleinzelligen Karzinomen [153], [156]. Der Unterschied zu nicht-kleinzelligen Karzinomen war auch hier statistisch signifikant. Auch *Hubers et al.* zeigten an Sputen von Patienten mit einem Lungenkarzinom eine signifikant höhere Hypermethylierungsrate des RASSF1A-Genpromotors (QMSP-Protokoll) in kleinzelligen gegenüber nicht-kleinzelligen Karzinomen [207]. Die Studie von *Toyooka et al.* (CMSP-Protokoll), wies mit einer Prävalenz der Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors von 81 % ebenfalls eine signifikante Präferenz für kleinzellige Karzinome auf. Diese Tendenz wurde auch von *Dammann et al.* beobachtet [112], [183].

Im vorliegenden Patientenkollektiv zeigte sich auch eine Hypermethylierung des RASSF1A-

Genpromotors in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, welche gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant war. Der Unterschied von Adenokarzinomen (24 %) gegenüber Plattenepithelkarzinomen (17 %) erreichte keine statistische Signifikanz ($p = 0,567$). Diese Tendenz wiesen auch einige der hier angeführten Studien auf (Referenzen siehe Tabelle 5.1c). Vier der hier aufgeführten Studien zeigten eine signifikant häufigere Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors bei Adeno- im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomen [210], [213], [229], [230]. Der RASSF1A-Genpromotor sollte aufgrund seiner hohen Rate an Hypermethylierungen in kleinzelligen Lungenkarzinomen und bei Untersuchung mit QMSP-Protokoll extrem hohen Spezifität obligater Bestandteil eines Genpanels zur Detektierung von primären malignen Lungentumoren sein.

5.4 Klinisch-pathologische Korrelation

Im vorliegenden Patientenkollektiv ließen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen der Hypermethylierung eines der drei untersuchten Genpromotoren oder des gesamten 3-Marker-Genpanel und den Faktoren Alter, Geschlecht, Rauchverhalten und Tumorlokalisation feststellen. Auch die Daten aus der Literatur zeigen überwiegend diese Resultate (Referenzen siehe Tabelle 5.1a-c), einzelne der hier angeführten Studien zeigten hinsichtlich der genannten Faktoren jedoch statistisch signifikante Unterschiede. Speziell das inhalative Rauchen von Zigaretten und das Alter sind Faktoren, die oft kontroverse Ergebnisse zwischen den einzelnen Studien zeigten und dort ebenso diskutiert wurden. Auch hier sollen diese Kontroversen im Folgenden aufgegriffen und diskutiert werden.

Hinsichtlich der Faktoren Tumorstadium und Tumorgrad zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede im vorliegenden Patientenkollektiv, die im Folgenden diskutiert werden.

5.4.1 Promotorhypermethylierung und Alter

Grote et al. zeigten eine statistisch signifikant zunehmende Methylierung (QMSP) des APC-Genpromotors mit steigendem Alter, sowohl bei Patienten mit einem malignen Lungentumor ($n = 155$), als auch bei Patienten ohne Tumor ($n = 67$) [154]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch *Brabender et al.* die eine erheblich geringere Methylierungshäufigkeit des APC-Genpromotors an einem jüngeren Patientenkollektiv von 10 gesunden Patienten nachweisen konnten [163]. Ein Zusammenhang zwischen Alter und Methylierung des APC-Genpromotors konnte bei verschiedensten Tumor- und Nicht-Tumorgeweben nachgewiesen werden [232]–[236]. Werden die Ergebnisse nach QMSP-Analyse aber in positiv bzw. negativ für eine maligne Lungenerkrankung dichotomisiert, ergibt sich in der Literatur (Referenzen siehe Tabelle 5.1a) wie auch in dieser Arbeit, kein statistisch signifikanter Unterschied < 65 Jahren und ≥ 65 Jahren.

Es gibt Hinweise, dass *de-novo*-DNA-Methyltransferasen (DNMT, siehe Abschnitt 1.5.1) in überalterten Zellen eine wesentlich höhere Aktivität zeigen, was *Lopatina et al.* an immortalisierten Fibroblasten zeigen konnten [237]. Dies könnte eine Erklärung einer altersabhängigen erhöhten Promotorhypermethylierung auf molekularer Ebene sein. Weiterhin gibt es Hinweise auf einige Genelemente (z. B. Sp1 = *specificity protein 1*) in der Region vor entsprechenden Promotoren, die vor einer Hypermethylierung durch DNMTs schützen [238], sowie Genelemente (*short interspersed nuclear elements* wie Alu und B1) die zu ungewöhnlichen Chromatinstrukturen führen, welche wiederum ein Ansatzpunkt für *de-novo*-DNA-Methyltransferasen sind [239], [240]. Dies könnte auf molekularer Ebene erklären, warum einige Genpromotoren in der alternden Zelle zunehmend methyliert vorliegen, andere hingegen davor geschützt sind. In der Literatur sind derartige Veränderungen für die in dieser Arbeit untersuchten Promotoren bislang nicht beschrieben.

Hinsichtlich der Hypermethylierung des p16^{Ink4A}- oder RASSF1A-Genpromotors zeigte sich nur in einer der hier aufgeführten Studien eine Auffälligkeit hinsichtlich des Alters. *Jin et al.* zeigte einen Trend eines höheren Methylierungslevels im Alter bei Patienten ohne maligne Lungenerkrankung für den RASSF1A-Genpromotor mit knapp verfehlter statistischer Signifikanz ($p = 0,067$) [210]. Ein Alterszusammenhang hinsichtlich der Hypermethylierung des p16^{Ink4A}- und RASSF1A-Genpromotors lässt sich somit nicht belegen.

5.4.2 Promotorhypermethylierung und Geschlecht

In einer Studie des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von *Grote et al.* zeigte sich eine statistisch signifikant häufigere Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors bei Männern (38 %, $n = 106$) gegenüber Frauen (14 %, $n = 45$) mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [156]. In einer Studie von *Belinsky et al.* zeigte sich eine erhöhte relative Rate an Hypermethylierungen für den p16^{Ink4A}-Genpromotor in Sputen von Männern ($n = 49$) im Gegensatz zu Frauen ($n = 23$) mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [222]. Da nur zwei der in Tabelle 5.1a-c aufgeführten Studien Unterschiede zeigten, ist ein Einfluss des Geschlechts auf die Hypermethylierung der hier untersuchten Genpromotoren zu wenig belegt. Zudem zeigte sich in beiden Studien ein höherer Anteil von Rauchern unter den männlichen Patienten, sodass die Unterschiede zumindest zum Teil auf diesen Faktor zurück zu führen sein dürften.

5.4.3 Promotorhypermethylierung und Raucherstatus

Im hier vorliegenden Patientenkollektiv zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Hypermethylierung der 3 untersuchten Genpromotoren, einzeln und in ihrer Kombination, zwischen

Rauchern (n = 90) und Patienten mit primärem malignen Lungentumor, die niemals rauchten (n = 6). Allerdings ist die Zahl der Nichtraucher unter den Tumorkranken gering.

Die meisten hier aufgeführten Studien zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Hypermethylierung des APC-Genpromotors hinsichtlich des inhalativen Zigarettenrauchens (Referenzen siehe Tabelle 5.1a). Die Studie von *Toyooka et al.* stellt eine Ausnahme dar. Hier wurde ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Promotormethylierung des APC-Gens zwischen Rauchern und Nichtrauchern aufgezeigt [95]. Diese Ergebnisse sind mit den vorliegenden Daten aufgrund des Studiendesigns nur bedingt vergleichbar, denn dort wurde eine CMSP an reseziertem Tumorgewebe von 158 Patienten mit einem Malignom der Lunge angewandt. Zudem bezieht sich der Unterschied nur auf Patienten mit einem Adenokarzinom. Eine ähnliche Auswertung der vorliegenden Daten ist aufgrund der zu geringen Anzahl an entsprechenden Patienten statistisch nicht aussagekräftig. Ein Zusammenhang zwischen Rauchen und Hypermethylierung des APC-Genpromotors in malignen Lungentumoren scheint nach aktueller Studienlage eher unwahrscheinlich, bleibt aber nicht abschließend beantwortet.

Unter den hier aufgeführten Studien zeigten nur wenige, in speziellen Untergruppen statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich des inhalativen Rauchens von Zigaretten und der Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors. Im untersuchten Patientenkollektiv (81 nicht-kleinzellige Lungenkarzinome) von *Hong et al.* zeigte sich eine statistisch signifikant häufigere p16^{Ink4A}-Promotorhypermethylierung (QMSP) bei starken Rauchern (> 40 PY) im Vergleich zu Patienten, die niemals rauchten [214]. In der Studie von *Jin et al.* zeigte sich statistisch signifikant häufiger eine p16^{Ink4A}-Hypermethylierung (QMSP) in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen von Rauchern im Vergleich zu Lungenkarzinomen von Nichtrauchern [210]. *Toyooka et al.* zeigten in ihrer Studie, dass in der Gruppe der Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge die Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors (CMSP) statistisch signifikant häufiger bei starken Rauchern (> 50 PY) gegenüber Nichtrauchern auftrat [95].

Eine Metaanalyse von *Zhang et al.* schloss 19 verschiedene Studien (mit Überschneidungen zu den hier aufgeführten Studien, siehe Tabelle 5.1b) ein und konnte zeigen, dass die Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors bei nicht-kleinzelligen Karzinomen der Lunge bei Rauchern 2,25fach häufiger auftrat als bei Nichtrauchern [241]. Diese Korrelation konnte in gesundem Lungengewebe von Karzinompatienten und bei Patienten (Rauchern) mit benigner Lungenerkrankung nicht aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Analyse der Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors mittels QMSP/CMPS ein sinnvolles diagnostisches Werkzeug in der Früherkennung von Lungenkarzinomen, vor allem bei Rauchern, sein kann. Darüber deutet sich ein Zusammenhang Tabakrauch-bedingter Karzinogenexposition und Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Promotors in der Karzinogenese des Lungenkarzinoms an, möglicherweise über den Mechanismus einer gesteigerten Expression von DNA-Methyltransferasen (siehe unten).

Schmiemann et al. berichteten eine signifikant höhere Rate der Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern [153]. Keine weitere der in Tabelle 5.1c angeführten Studien konnte diesen Trend bestätigen. Eine aktuelle Metaanalyse von *Wu et al.* konnte jedoch einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors und dem inhalativen Tabakrauchen feststellen [242]. Diese Metaanalyse beinhaltete 19 Studien (mit Überschneidungen zu den hier aufgeführten Studien, siehe Tabelle 5.1c) und konnte zeigen, dass bei Rauchern mit einem Lungenkarzinom 1,3fach häufiger eine Hypermethylierung vorliegt als bei Nichtrauchern mit Karzinom. Dies erscheint sehr gering und es bleibt festzuhalten, dass die Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors auch in Lungenkarzinomen von Nichtrauchern ein häufiges Ereignis ist und dem Rauchen hier vermutlich nur eine geringe ursächliche Wirkung zuzuschreiben bleibt.

Wie unter Abschnitt 1.5.1 bereits angeführt, katalysieren verschiedene DNA-Methyltransferasen (DNMTs) die Methylierung von Cytosin. In einigen Studien konnte eine Überexpression von DNMT1 in Rauchern mit einem Karzinom, u. a. auch Patienten mit Lungenkarzinom, festgestellt werden [199], [243]–[245]. In einer Studie von *Lin et al.* konnte im Mausmodell die DNMT1-Expression in Lungengewebe mittels Applikation von NNK (Nikotin-Nitrosaminketon), einem wesentlichen im Tabakrauch enthaltenen Karzinogen, deutlich gesteigert werden [245]. Diese Studie zeigte auch im Tumorgewebe von Lungenkarzinompatienten einen deutlichen Zusammenhang zwischen Rauchen und gesteigerter DNMT1-Expression [245], was einen möglichen Mechanismus für den Zusammenhang zwischen inhalativem Rauchen und der Hypermethylierung verschiedener Genpromotoren aufzeigt.

Einige Studien zeigten eine Hypermethylierung einzelner Genpromotoren im Untersuchungsmaterial von Rauchern ohne malignen Lungentumor. Dies begründeten die Autoren mit einem durch das Rauchen verursachten Feldeffekt oder einer Feldkanzerogenese. Da die Begrifflichkeiten verwandt, jedoch klar zu trennen sind, und immer wieder teils falsch in den angeführten Studien gebraucht wurden, wird dies weiter unten in Abschnitt 5.5 ausführlicher diskutiert.

5.4.4 Lokalisation

Eine Schwäche der aktuellen diagnostisch-zytologischen Routine stellen periphere Malignome der Lunge dar. Diese sind mittels Bronchoskopie nur schwer zu erreichen und die Diagnostik an dem gewonnenen Untersuchungsmaterial weist gegenüber zentral liegenden Tumoren ein geringere Sensitivität auf [137]. In der Literatur zeigten sich je nach Entnahmemethode differierende Detektierungsraten für zentrale maligne Läsionen, vorwiegend Plattenepithel- und kleinzellige Karzinome, von 48 %, 59 % und 56 % für Bronchiallavagen, bronchiale Bürstenabstriche und blind ausgeführte, transbronchiale Feinnadelaspirate. Detektionsraten bis 94 % sind eher optimistisch.

Periphere maligne Tumoren hingegen, vorwiegend Adenokarzinome, zeigten Raten von 43 %, 52 % und 67 % für Bronchiallavagen, bronchiale Bürstenabstriche und blind ausgeführte transbronchiale Feinnadelaspirate [137], [246], [247]. Die schlechtere Erfassung peripherer Tumoren, insbesondere der Lavagen zeigte sich auch am vorliegenden Patientenkollektiv, was unter Abschnitt 5.6 ausführlich diskutiert wird. Endosonographisch gesteuerte transbronchiale Feinnadelaspirate zeigen eine höhere Sensitivität, sollen aber hier nicht weiter betrachtet werden, da für die QMSP-Untersuchungen der vorliegenden Studie Bronchialaspirate verwandt wurden [138].

Das hier angewandte QMSP-Panel zeigte einen zwar vorhandenen aber statistisch nicht signifikanten Unterschied ($p = 0,217$) zwischen der Detektierung primär maligner Lungentumoren in zentraler (Sensitivität 55 %) und peripherer (Sensitivität 41 %) Lage. Wahrscheinlich enthält das Bronchialaspirat peripherer Läsionen weniger, stark degenerativ veränderte, abgeschilferte oder lysierte Zellen mit noch (partiell) erhaltener DNA, die durch die zytologische Diagnostik nicht zu erkennen sind. Sie besitzen aber bereits genetische und epigenetische Alterationen - wie z. B. Hypermethylierungen von Genpromotoren.

Auch in der Einzelanalyse der 3 verschiedenen Genpromotoren konnte keine statistische Signifikanz hinsichtlich der Tumorlokalisation ermittelt werden. Andere Studien an zytologischem Untersuchungsmaterial mit QMSP-Protokoll konnten ebenfalls zeigen, dass periphere maligne Lungentumoren in gleichem Maße wie zentrale Läsionen detektiert werden und die Lokalisation des Malignoms nur eine untergeordnete Rolle spielt [153], [211]. *Van der Drift et al.* stellten eine signifikant häufigere Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors in zentralen gegenüber peripheren Lungenmalignomen fest [227]. Wie bereits unter Abschnitt 5.3 diskutiert zeigt die Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors eine Präferenz für kleinzellige Karzinome, welche oft zentral in der Lunge auftreten. Zudem konnte diese Tendenz durch keine weitere Studie gezeigt werden.

5.4.5 Tumorstadium

In der Einzelanalyse der Genpromotorhypermethylierung von APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A zeigten sich keine Unterschiede zwischen den vier Tumorstadien (Klassifikation nach UICC, siehe Anhang) sowie zwischen Stadium I und der Kombination der Stadien II – IV hinsichtlich nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome dieses Patientenkollektivs. Zudem zeigte sich in dieser Arbeit auch kein Unterschied bei kleinzelligen Lungenkarzinomen der Stadien *limited* und *extensive disease* (Einteilung nach UICC, siehe Anhang). Somit konnte also kein Unterschied in frühen gegenüber späteren Tumorstadien festgestellt werden was wiederum die Anwendung der QMSP in der Früherkennung von Lungenkarzinomen erlaubt. Die Sicherheit dieser Aussage ist in der vorliegenden Arbeit aber aufgrund relativ geringer Zahl von Tumoren im Stadium I oder *limited disease* (20 von 108) eingeschränkt. In der Kombination (APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A) zeigte das 3-Marker-Genpanel signifikant weniger aberrante Methylierungen im Tumorstadium I gegenüber der Kombination der Stadien II – IV ($p =$

0,023). Unter den angeführten Studien mit QMSP-Protokoll an zytologischem Untersuchungsmaterial (Referenzen siehe Tabelle 5.1a-c) zeigten ausschließlich 2 Studien signifikante Unterschiede der Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors im Tumorstadium I gegenüber der Kombination der Stadien II – IV [94], [211]. *Destro et al.* konnten gleiches in einer Studie mit CMSP-Protokoll an Sputen für den p16^{Ink4A}-Genpromotor zeigen [223]. Eine signifikant geringere Hypermethylierung der Genpromotoren in früheren Tumorstadien ist durch die geringere Tumorgröße mit seltenerem Bronchuseinbruch und die daraus wahrscheinlich resultierende geringere Anzahl maligner Zellen im Untersuchungsmaterial erklärbar, würde aber gegen einen Vorteil in der Früherkennung des Lungenkarzinoms durch diese Methode sprechen. Eine frühere Studie dieses Instituts von *Schmiemann et al.*, welche das gleiche 3-Marker-Genpanel wie die vorliegende Arbeit verwandte, zeigte ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumorstadien wie die meisten anderen hier aufgeführten Studien (Referenzen siehe Tabelle 5.1a-c). Zusammenfassend zeichnet sich somit ab, dass die QMSP überwiegend Tumorstadium-unabhängig ist und sich somit zur Detektion früher Stadien von Malignomen der Lunge eignet.

5.4.6 Differenzierungsgrad

Für keinen Genpromotor der Gene APC, p16^{Ink4A} oder RASSF1A konnte in der Einzelbetrachtung ein Unterschied in der Hypermethylierung zwischen unterschiedlichen Differenzierungsgraden (Grad 1 – Grad 4) festgestellt werden. In der Kombination der 3 Marker zeigte sich jedoch eine signifikant häufigere Hypermethylierung in den Tumorgraden 3 + 4 gegenüber der Tumorgrade 1 + 2 ($p = 0,019$). Der Differenzierungsgrad eines Tumors gibt an, wie sehr dieser sich von seinem Ausgangsgewebe unterscheidet, wobei Grad 1 (gut differenziert) geringe Unterschiede, Grad 4 (entdifferenziert) massive Unterschiede klassifiziert. Da der Verlust der Differenzierungsfähigkeit einer Tumorzelle auf Alterationen der DNA (siehe Kapitel 1.4) gründet, wäre eine häufigere Hypermethylierung in höheren Tumorgraden zu erwarten, wie in dieser Arbeit gesehen.

Nur wenige der hier aufgeführten Studien (Referenzen siehe Tabelle 5.1a-c) untersuchten einen Zusammenhang zwischen Hypermethylierung von Genpromotoren und dem Tumorgrad. Keine dieser Studien zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang [100], [154], [163], [164], [223].

5.5 Feldkanzerogenese, Feldeffekt und Promotorhypermethylierung in Vorläuferläsionen

In fast allen hier zitierten Studien wird immer wieder der Begriff der Feldkanzerogenese und ein Zusammenhang mit der Hypermethylierung einzelner Genpromotoren diskutiert. Dieser Begriff wurde von *Slaughter et al.* geprägt und beschrieb ursprünglich das Auftreten molekularer Veränderungen in peritumoralem, histologisch normal erscheinendem Gewebe, die denen im Karzinom entsprechen

[248]. *Auerbach et al.* führten einen verwandten aber klar zu trennenden Begriff ein, den Feldeffekt [249]. Dieser beschreibt das ubiquitäre, flächenhafte Auftreten von epithelialen Veränderungen im Respirationstrakt, verursacht durch Noxen wie z. B. das inhalative Rauchen von Tabak. Die aktuell beste Definition der Begrifflichkeiten und Erläuterung für den Respirationstrakt auf molekularer Ebene lieferten *Steiling et al.* in ihrem *Review* [250]. Hier wird von drei hauptsächlichen Mechanismen ausgegangen, durch welche Zellen im gesamten Respirationstrakt genetische oder epigenetische Alterationen entwickeln: 1. *Klonale Expansion*: Klone einer Karzinomstammzelle können sich durch Migration über das gesamte respiratorische Epithel ausbreiten. 2. *Effekt des Tumors auf seine direkte Umgebung*: Tumorzellen entlassen proinflammatorische Mediatoren in Ihre direkte Umgebung, welche eine chronische Entzündung unterhalten, die wiederum zu molekularen Alterationen führt. 3. *Individuelle expositionsbedingte Reaktion des Epithels*: Durch die Exposition spezifischer Noxen (z. B. inhalativer Tabakkonsum) treten interindividuelle aber über das respiratorische Epithel verteilt ähnliche molekulare Alterationen auf.

Bezogen auf epigenetische Veränderungen bedeutet dies, dass z. B. Hypermethylierungen einzelner Genpromotoren im gesund erscheinenden respiratorischen Epithel auch weit entfernt vom, oder sogar vor Auftreten eines Karzinoms nachgewiesen werden könnten. Für die Etablierung eines Hypermethylierungsmarkers in der Diagnostik von Lungenkarzinomen ist dies zunächst ein Problem, denn dieser sollte gut zwischen benignem und malignem Untersuchungsmaterial unterscheiden können. Das Auftreten einer Hypermethylierung des APC-Genpromotors bei Patienten ohne Lungenkarzinom wurde obenstehend schon diskutiert und scheint eine Assoziation mit dem Alter zu haben. Einige Studien zeigten eine erhöhte Rate an Hypermethylierungen des p16^{Ink4A}- und RASSF1A-Genpromotors bei Rauchern ohne Nachweis eines Lungenkarzinoms. *Kersting et al.* untersuchten eine Gruppe von 25 chronischen Rauchern ohne Nachweis eines Lungenkarzinoms auf die Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors. Sowohl in der BAL als auch im Sputum dieser Patienten konnte eine Hypermethylierung in 12 bzw. 16 % der Patienten festgestellt werden [220]. *Belinsky et al.* zeigten für den p16^{Ink4A}-Genpromotor eine relative Rate der Hypermethylierung von 44 % in der Gruppe der Raucher ohne Nachweis eines Lungenkarzinoms (bronchiale Bürstungen), eine Hypermethylierung des RASSF1A-Promotors trat hingegen in keinem Fall auf [221]. Im Gegensatz zu dieser Studie konnte die Studie von *Kersting et al.* signifikant zwischen Karzinom- und Kontrollgruppe unterscheiden. *Belinsky et al.* und *Cirincione et al.* zeigten an Sputen von Rauchern ohne Nachweis eines Karzinoms der Lunge eine Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors in 27 bzw. 18 %, des RASSF1A-Genpromotors hingegen nur in 7 bzw. 1 % der Fälle [205], [224]. Das häufige Auftreten einer Hypermethylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors deuteten die Autoren der genannten Studien einerseits als ein frühes Ereignis in der Genese des Lungenkarzinoms und zudem als ein durch inhalativen Konsum von Tabak erzeugten Feldeffekt. Für den RASSF1A-Genpromotor konnte dies nicht beobachtet werden, woraus die Autoren der Studien schlossen, dass dies ein später Schritt in der Genese des Lungenkarzinoms sei. Die genannten Studien verwandten das gleiche CMSP-Protokoll für die genannten Genpromotoren.

In der vorliegenden, sowie in drei weiteren Studien des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf konnte keine Hypermethylierung der p16^{Ink4A}- und RASSF1A-Genpromotoren in der Kontrollgruppe festgestellt werden [153], [155], [156]. Der Grund hierfür liegt im verwandten QMSP-Protokoll und der schon ausführlich diskutierten höheren Spezifität der Methode im Vergleich zu CMSP-Protokollen. Die in diesen Studien herangezogenen Kontrollgruppen stellten ebenfalls eine Population mit hohem Risiko für ein Lungenkarzinom dar, denn sie beinhalteten einen hohen Anteil an Rauchern, zudem war der Verdacht auf ein Lungenkarzinom ein Studieneinschlusskriterium. In einigen Studien an zytologischem Untersuchungsmaterial mit QMSP-Protokoll zeigten sich dennoch hypermethylierte Genpromotoren (p16^{Ink4A} und RASSF1A) bei Patienten ohne nachgewiesene maligne Lungenerkrankung. Durch die Möglichkeit der Quantifizierung der PCR konnte im Gegensatz zur CMSP ein *cut-off*-Level (siehe Abschnitt 3.4.5 und 5.1) definiert, sowie zwischen maligne und benigne differenziert werden [94], [100], [211], [212]. Für den p16^{Ink4A}- bzw. RASSF1A-Genpromotor zeigten sich bei QMSP-Studien keine bzw. im Mittel 2 % falsch positive Befunde an zytologischem Untersuchungsmaterial [94], [100], [153], [155], [156], [206], [207], [211], [212], [227]. Somit kann festgehalten werden, dass ein möglicher Feldeffekt die QMSP nicht oder nur gering beeinflusst, was es wiederum ermöglicht, sicher zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung zu unterscheiden.

5.6 Verwendung des Genpanels als Biomarker in der Lungenkarzinomdiagnostik

Das Genpanel bestehend aus APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A zeigte keine Präferenz für eine spezielle Tumorentität. Die gehäufte Hypermethylierung der einzelnen Genpromotoren für eine Tumorentität (APC bei Adenokarzinomen, p16^{Ink4A} bei Plattenepithelkarzinomen und RASSF1A bei kleinzelligen Karzinomen) gleicht sich in der Kombination aus, womit eine Detektion im gesamten Spektrum der Lungenkarzinome gewährleistet ist. Hierbei wird bereits die Hypermethylierung eines Genpromotors als positiver Ausfall des Panels gewertet. Das hier verwandte 3-Marker-Genpanel zeigte sich hinsichtlich der Detektierung von Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen, nicht-subklassifizierbaren / nicht-kleinzelligen Karzinomen und kleinzelligen Karzinomen mit Sensitivitäten von 47 %, 47 %, 50 % und 69 % gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p < 0,001$). Hier sei nochmals erwähnt, dass die höchste relative Rate der Hypermethylierung (69 % bei kleinzelligen Karzinomen) ausschließlich auf dem RASSF1A-Genpromotor basierte.

Sowohl mit der CMSP als auch der QMSP zeigten die meisten Studien eine Hypermethylierung des APC-Genpromotors im Untersuchungsmaterial von Personen ohne maligne Lungenerkrankung oder dem Tumor benachbartem, benignem Lungengewebe [94], [95], [100], [153], [154], [163], [206]–[209]. Es wurde bereits diskutiert, dass die Hypermethylierung des APC-Genpromotors eine Altersassoziation aufweist, und diese sowohl in malignem als auch benignem Lungengewebe

nachweisbar ist. Die aberrante APC-Promotormethylierung könnte aber auch einen frühen Schritt in der Karzinogenese von Lungentumoren darstellen, was für Vorläuferläsionen von Dickdarm- und Ösophaguskarzinomen belegt ist [251], [252]. Dies könnte APC eine Rolle als Risikomarker in der Diagnostik für Lungenkarzinome zukommen lassen. Zudem ist zu beachten, dass die Patienten aus dem vorliegenden Kollektiv mit dem Verdacht auf ein Lungenkarzinom untersucht wurden.

Das gleichzeitige Auftreten der aberranten Methylierung des APC-Promotors, sowohl in malignem als auch in benignem Lungengewebe, spricht zunächst gegen seine Verwendung als Biomarker zur Diskrimination zwischen benignen und malignen Prozessen der Lunge. Unter Verwendung einer Quantitativen MSP (QMSP) ist die Definition eines *cut-off*-Levels möglich, was zwar die Sensitivität senkt, aber wiederum die Verwendung des APC-Methylierungsstatus als Tumormarker in der klinischen Routine erlaubt.

Unter den 61 Patienten mit benigner Lungenerkrankung der vorliegenden Studie zeigte sich die Hypermethylierung des APC-Genpromotors bei einem Patienten von 68 Jahren. Bei diesem Patienten bestand zum Untersuchungszeitpunkt seit 3 Monaten die Diagnose eines kolorektalen Karzinoms. In der Röntgenthoraxübersichtsaufnahme des Patienten wurden zunächst Filiae des kolorektalen Karzinoms vermutet, welche sich jedoch nach Resektion als inflammatorischer Pseudotumor der Lunge herausstellten. Das Methylierungslevel des APC-Promotors lag hier mit 90 % im Verhältnis zu MYOD1 deutlich über dem *cut-off*-Level von 35 % (siehe Abschnitt 3.4.5 und 5.1). Eine altersassoziierte APC-Methylierung ist im vorliegenden Fall eher unwahrscheinlich, da das Lebensalter des Patienten mit 68 Jahren nur unwesentlich über dem Durchschnittsalter der Nicht-Tumorpatienten von 65 Jahren liegt. Eine weitere Beobachtung des Patienten war leider nicht möglich, da er nicht mehr im Krankenhaus vorstellig wurde. Hypermethylierungen des APC-Genpromotors sind bei kolorektalen Karzinomen nachgewiesen [236], [253]. Zudem ist bekannt, dass bei diesen Malignomen freie Tumor-DNA im Serum nachweisbar ist [254]. Eine Kontamination der Lavage bei vorangehender transbronchialer Biopsientnahme, bei der es oftmals leicht blutet, ist möglich.

Sowohl in dieser Studie, als auch in vorangegangenen Studien des Institutes für Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf konnte gezeigt werden, dass sich Sensitivität und Spezifität der QMSP hinsichtlich der Hypermethylierung des APC-Genpromotors an zytologischem Untersuchungsmaterial nicht erheblich von den Ergebnissen an reseziertem Tumormaterial unterscheiden. Zudem konnte bestätigt werden, dass die Hypermethylierung gehäuft bei nicht-kleinzelligen Karzinomen, vor allem Adenokarzinomen, auftritt. Zusammenfassend eignet sich der Nachweis einer Hypermethylierung des APC-Genpromotors mittels QMSP an zytologischem Untersuchungsmaterial als Biomarker für die Diagnostik von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, allerdings nur mit der Definition eines geeigneten *cut-off*-Levels, um eine ausreichende Spezifität zu erreichen.

Der Nachweis einer aberranten Methylierung des p16^{Ink4A}- und des RASSF1A-Genpromotors mittels QMSP zeigte sich im vorliegenden Patientenkollektiv hochspezifisch (keine falsch positiven

Befunde), womit dieser sich für die Anwendung als Biomarker zur Diskrimination zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung eignet. Sowohl die Hypermethylierung des p16^{Ink4A}- als auch des RASSF1A-Genpromotors korreliert in Bronchialaspiraten und Tumorresektat (siehe Abschnitt 5.3.2 und 5.3.3). Die aberrante Methylierung des p16^{Ink4A}-Genpromotors zeigte sich in der vorliegenden Arbeit gehäuft in Plattenepithelkarzinomen der Lunge. Reine kleinzellige Lungenkarzinome zeigten hingegen ausschließlich eine Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors. Zusammen mit dem APC-Gen deckt das hier verwandte 3-Marker-Genpanel somit die wesentlichen Karzinomtypen der Lunge ab. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Faktoren wie Alter, Geschlecht, Tumorlokalisierung, Tumorstadium und Differenzierungsgrad wenig bis keinen Einfluss auf das QMSP-Genpanel haben, was vorteilhaft für eine Anwendung in der klinischen Routine ist. In zwei umfangreichen Metaanalysen hinsichtlich der Hypermethylierung des p16^{Ink4A}- und des RASSF1A-Genpromotors konnte das inhalative Rauchen von Zigaretten als Einflussfaktor aufgezeigt werden, wobei der Einfluss auf die Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors sehr gering war [241], [242]. Ein durch das Rauchen induzierter Feldeffekt im respiratorischen Epithel hatte hingegen im vorliegenden Patientenkollektiv keinen Einfluss auf das QMSP-Genpanel, was einerseits der hohen Spezifität, andererseits der Möglichkeit einer Quantifizierung der Methode zuzuschreiben sein dürfte.

Somit bleibt festzuhalten, dass sich das angewandte QMSP-Protokoll zur Detektierung einer Promotorhypermethylierung von APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A als hochspezifischer Test zur Diskrimination zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung anhand von Bronchialaspiraten eignet. Die Sensitivität des Panels war jedoch mit 51 % nicht ausreichend, um als alleiniger Test in der klinischen Diagnostik Anwendung zu finden. In der Kombination mit der routinemäßigen zytologischen Diagnostik jedoch eröffnen sich vielversprechende Anwendungsbereiche, was im nächsten Abschnitt ausführlich diskutiert wird.

5.7 QMSP-Hypermethylierungsanalyse zur Verbesserung der zytologischen Diagnostik

Beim Verdacht auf eine maligne Lungenerkrankung ist die Gewinnung von zytologischem Untersuchungsmaterial (Bronchialaspirat, bronchiale Bürstung, transbronchiale Nadelaspirationsbiopsie) und anschließende zytologisch-mikroskopische Beurteilung durch einen Pathologen immer noch ein wesentlicher Pfeiler in der diagnostischen Routine. Es werden jedoch bis zu 50 % der malignen Lungenerkrankungen nicht erfasst [137], [246], [247].

In dem hier vorliegenden Kollektiv von Patienten mit einem primären malignen Lungentumor zeigte die zytologische Diagnostik eine Sensitivität von 52 % (56 von 108 Patienten mit maligner Lungenerkrankung) bei einer Spezifität von 100 % (61 von 61 Patienten mit benigner Lungenerkrankung). In Kombination mit dem hier angewandten QMSP-Genpanel ließ sich die

Sensitivität auf 71 % steigern (77 von 108 Patienten mit maligner Lungenerkrankung). Die Spezifität dieser Kombination wäre mit 98 % (60 von 61 Patienten mit benigner Lungenerkrankung) immer noch sehr hoch. Eine deutliche Anhebung der Sensitivität der zytologischen Diagnostik konnte auch in einigen Studien mit QMSP-Protokoll und zytologischem Untersuchungsmaterial erreicht werden. *Schmiemann et al.* zeigten eine Verbesserung der Sensitivität der Zytologie durch zusätzliche Anwendung des gleichen QMSP-Genpanels (APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A) von 44 auf 68 % an Bronchialaspiraten von 85 Patienten mit maligner Lungenerkrankung [153]. *Nikolaidis et al.* konnten mit einem QMSP-Genpanel (p16^{Ink4A}, RASSF1A, WT1, TERT) an Bronchialaspiraten von 139 Lungenkarzinompatienten die Sensitivität der zytologischen Diagnostik von 45 auf 82 % steigern [211]. *Hubers et al.* zeigten an Sputen von 158 Patienten mit einer malignen Lungenerkrankung eine Steigerung der Sensitivität der Zytologie von 22 auf 52 % durch die Anwendung einer QMSP zur Detektierung einer Hypermethylierung des RASSF1A-Genpromotors [207]. Diese Tendenz bestätigten auch Studien von *Grote et al.*, *Shivapurkar et al.* sowie *van der Drift et al.* [94], [155], [156], [227]. Die genannten Studien zeigten mit 92 – 100 % durchweg eine hohe Spezifität, womit sich die Kombination von Zytologie und QMSP in den genannten Fällen in der klinischen Routinediagnostik geeignet hätte.

Das hier verwandte QMSP-Panel (APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A) zeigte mit 61 % (34 von 56 Patienten mit einer malignen Lungenerkrankung) in der Gruppe der als *zytologisch positiv* diagnostizierten Patienten die höchste Sensitivität. In der Gruppe der Patienten die als *zytologisch negativ* diagnostiziert wurden (n = 59) zeigten sich im *follow-up* 17 Patienten mit einer malignen Lungenerkrankung. Von diesen 17 zytologisch falsch negativ diagnostizierten Fällen konnten 3 mittels QMSP-Genpanel diagnostiziert werden (Sensitivität 18 %), wobei zu erwähnen ist, dass in diesen Fällen ausschließlich der RASSF1A-Genpromotor hypermethyliert war. *Schmiemann et al.* zeigten in dieser Untergruppe ähnliche Ergebnisse (10 von 27 Fällen) [153]. Eine Verwendung des 3-Marker-QMSP-Genpanels erscheint in dieser Patientengruppe aufgrund seiner geringen Detektierungsrate positiver Befunde nicht sinnvoll.

Die interessanteste Gruppe ist die der als *zytologisch unklar* diagnostizierten Patienten (n = 54), denn hier müssen in der klinischen Routine weitere diagnostische Maßnahmen zur Abklärung erfolgen. In dieser Gruppe zeigten 35 Patienten im *follow-up* eine maligne Lungenerkrankung, die mit einer Sensitivität von 51 % (18/35) durch die QMSP als positiv bestätigt werden konnten. Das QMSP-Genpanel aus APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A war also auch in dieser Untergruppe in der Lage signifikant ($p < 0,001$) zwischen benigner und maligner Lungenerkrankung zu unterscheiden und über die Hälfte der *zytologisch unklaren* Patienten mit einer malignen Lungenerkrankung als richtig positiv zu verifizieren. Auch die früheren Studien des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf legten eine Anwendung der QMSP als Reflextest im Anschluss nach *unklarer* (*zweifelhafter* oder *dringend verdächtiger*) Zytologie nahe [153]–[156]. *Schmiemann et al.* zeigte 29

(57 %) durch das QMSP-Genpanel (APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A) richtig positiv erkannte Fälle in der Gruppe der Patienten mit unklarer zytologischer Diagnose und malignem Lungentumor (n = 51). Somit besteht der Mehrwert der QMSP in der klinischen Anwendung insbesondere in der Gruppe der Patienten mit *unklarer* (*zweifelhafter* oder *dringend verdächtiger*) Zytologie.

Ilse et al., Institut für Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, zeigten kürzlich in einer Studie zur Hypermethylierung des SHOX2 (*stature homebox gene 2*) Genpromotors (QMSP an Bronchialaspiraten) ein weiteres Gen mit großem Potential für den Einsatz in einem Biomarker-Genpanel zu Detektion von malignen Lungentumoren [255]. Sie erzielten hier eine Sensitivität von 64 % (48/75 Patienten mit einem Malignom der Lunge) und eine Spezifität von 98 % (42/43 Nicht-Tumor Patienten). Die zytologische Diagnostik in Kombination mit der SHOX2-Hypermethylierungsanalyse bei Patienten mit der zytologischen Diagnose *unklar* oder *negativ* zeigte eine Sensitivität von 69 % (52/75 Patienten mit einem Malignom der Lunge) und eine Spezifität von 98 % (42/43 Nicht-Tumor Patienten). Dies verdeutlicht nochmals den Nutzen der Hypermethylierungsanalyse als Reflextest der Zytologie.

5.8 Implementierung des 3-OST-2-Genpromotors in das QMSP-Panel

Das 3-Marker-Genpanel aus APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A sollte in dieser Arbeit um ein zusätzliches Gen erweitert werden. In der Studie von *Shivapurkar et al.* zeigte sich die Analyse der Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors mittels QMSP als vielversprechender Marker zur Detektion maligner Lungenerkrankungen [94]. An 40 Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom konnte nach Definition eines *cut-off*-Levels in 28 Tumorsektaten eine Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors (Sensitivität 70 %), in der Kontrollgruppe (peritumorales gesundes Gewebe) hingegen jedoch in keinem Fall, nachgewiesen werden. In derselben Studie wurden auch 13 Sputen von Patienten mit einem Lungenkarzinom und 25 Sputen von Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung untersucht, mit dem Ergebnis einer Sensitivität von 31 % (4/13) und einer Spezifität von 100 % (0/25) dieses Tests.

In der vorliegenden Arbeit wurde das gleiche 3-OST-2-Primer-Sonden-Set für die QMSP angewandt wie in der o. g. Studie von *Shivapurkar et al.* [94]. Die Ergebnisse in der Hypermethylierung des 3-OST-2 Genpromotors wichen jedoch deutlich von denen der genannten Studie ab. *Shivapurkar et al.* definierten das höchste Methylierungslevel in der Kontrollgruppe (benachbartes Karzinomgewebe) als *cut-off*-Wert. Würde man im vorliegenden Patientenkollektiv (Bronchialaspirate) das *cut-off*-Level für die Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors so definieren, ergäbe sich eine Sensitivität von nur 2 % (2/117). Auch die ROC-Kurvenanalyse und Ermittlung von Youden's Indices resultierten in für diagnostische Anwendungen inakzeptabel schlechter Spezifität. Daher wurde in dieser Arbeit eine

Spezifität von 95 % (3/61) festgelegt, wodurch sich eine Sensitivität von 16 % (17/108) hinsichtlich der Diskrimination zwischen primär maligner und benigner Lungenerkrankung im vorliegenden Patientenkollektiv ergab. Unter den 11 getesteten Genmarkern in der Studie von *Shivapurkar et al.* war die 3-OST-2-Methylierung in der Karzinomgruppe (n = 40, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) am häufigsten und in der Kontrollgruppe (n = 40, peritumorales gesundes Gewebe) am niedrigsten. Deren Analyse konnte am besten zwischen maligne und benigne diskriminieren (ROC-Analyse: AUC 0,909 [95 % CI = 0,843 – 0,974]) [94]. Die Bronchialaspirate des Patientenkollektivs dieser Arbeit zeigten sowohl in der Gruppe der Patienten mit maligner als auch mit benigner Lungenerkrankung hohe Methylierungslevel des 3-OST-2-Genpromotors. Hier konnte zwar signifikant, aber für eine diagnostische Anwendung nicht ausreichend zwischen den beiden Gruppen unterschieden werden (ROC-Analyse: AUC 0,659 [95 % CI = 0,580 - 0,737]). Abschließend bleiben an zytologischem Untersuchungsmaterial die extremen Unterschiede in der Spezifität der 3-OST-2-QMSP dieser Arbeit und der Studie von *Shivapurkar et al.* ungeklärt. Beide Studien verwandten das gleiche QMSP-Primer-Sonden-Set. Zudem konnte gezeigt werden, dass die (Q)MSP (APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A) im Regelfall an Bronchialaspiraten spezifischer ist als an Sputen (siehe auch Abschnitt 5.2).

Hubers et al. untersuchten ebenfalls die Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors an Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [256]. Von 20 Patienten mit einer malignen Lungenerkrankung zeigten 10 (Sensitivität 50 %), in der Kontrollgruppe (Patienten mit benigner Lungenerkrankung, n = 31) zeigten 4 Patienten eine Hypermethylierung (Spezifität 87 %) in der genannten Studie. Diese Studie definierte das *cut-off*-Level anhand des höchsten Youden's Index der ROC-Analyse [256]. In der vorliegenden Arbeit ergäbe sich bei dem so definierten *cut-off*-Level eine Sensitivität von 57 % bei einer Spezifität von 72 %. Somit sind die Ergebnisse der Studie von *Hubers et al.* wesentlich näher an den hier vorliegenden als die der Studie von *Shivapurkar et al.* [94], [207]. Dennoch bleibt auch hier der deutliche Unterschied in der Spezifität unklar, denn auch in der Studie von *Hubers et al.* wurde das gleiche QMSP-Primer-Sonden-Set verwandt.

Eine weitere Studie von *Hwang et al.* untersuchte die Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors mittels CMSP-Protokoll an 289 Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (reseziertes, in Paraffin konserviertes Karzinomgewebe). Hier zeigte sich eine relative Rate von 31 % (95/289) hinsichtlich der Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors, eine Kontrollgruppe gab es nicht [191]. Außerdem konnten *Hwang et al.* in ihrer Arbeit an verschiedenen bronchoepithelialen Zellkulturen zeigen, dass ein Abschalten der 3-OST-2-Expression (siRNA-Assay) die Zellmigration und -proliferation steigert. Die Transfektion von Lungenkarzinom-Zelllinien mit 3-OST-2-cDNA (liposomaler Gentransfer) und der damit verbundenen Expression von 3-OST-2 konnte den gegenteiligen Effekt erzeugen [191]. Zudem konnten *Hwang et al.* an 26 Tumorsektaten (diesmal kryokonserviert bei -80° C) eine signifikante negative Korrelation zwischen 3-OST-2-Promotorhypermethylierung (Nachweis mittels QMSP) und der Genexpression (mRNA-Nachweis

mittels quantitativer RT-PCR) aufzeigen [191]. Die 289 Patienten mit maligner Lungenerkrankung wurden auch hinsichtlich klinisch-pathologischer Gesichtspunkte untersucht. Wie auch bei der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei Alter, Geschlecht, Tumorentität und Tumorstadium keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors. Raucher zeigten jedoch eine signifikant häufigere Hypermethylierung gegenüber Nichtrauchern. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich dieser Unterschied hingegen nicht signifikant ($p = 0,214$).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich der Nachweis einer Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors mittels QMSP eignet um das bestehende 3-Marker-Genpanel aus APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A hinsichtlich der Diagnose eines Lungenkarzinoms an Bronchialspiraten zu verbessern. Die vielversprechenden Ergebnisse des 3-OST2-Genmarkers aus der Studie von *Shivapurkar et al.* konnten jedoch nicht bestätigt werden [94]. Obwohl mittels QMSP-Analyse der Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors signifikant zwischen primär maligner und benigner Lungenerkrankung im vorliegenden Patientenkollektiv unterschieden werden konnte, musste das *cut-off*-Level für eine akzeptable Spezifität des Tests von 95 % extrem hoch angesetzt werden, wodurch die Sensitivität des Tests auf 16 % sank. Eine Erweiterung des 3-Marker-Genpanels um 3-OST-2 führte zwar zu einer geringen Verbesserung der Sensitivität des Genpanels (51 vs. 56 %), dies jedoch auf Kosten der Testspezifität (98 vs. 95 %). Da in der Gruppe der Patienten mit benigner Lungenerkrankung in 58 von 61 Fällen eine Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors mittels QMSP nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass falsch positive Ergebnisse auch in einer zukünftigen Anwendung auftreten werden. Damit ist der Nachweis einer Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors mittels QMSP und hier verwandtem Primer-Sonden-Set zu Diskrimination zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung an Bronchialspiraten zunächst ungeeignet. *Hwang et al.* konnten jedoch in ihrer umfangreichen Arbeit einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der 3-OST-2-Promotorhypermethylierung, der Unterexpression des Genproduktes und zellphysiologischen Veränderungen in Adhäsion, Migration und Proliferation des Bronchialepithels herstellen [191]. Zudem konnte die Studie eine Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors in 95 von 298 nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen mittels MSP nachweisen. Demnach bleibt die Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors ein interessanter Biomarkerkandidat in der Diagnostik von primär malignen Lungentumoren und sollte weiter verfolgt werden. Der nächste Schritt wäre z. B. die Entwicklung neuer Primer für die QMSP, welche spezifischer zwischen unmethyliertem und methyliertem 3-OST-2-Genpromotor unterscheiden.

6. Schlussfolgerungen

Gegenstand dieser Arbeit war die Bestätigung eines 3-Biomarker-Genpanels bestehend aus APC, p16^{Ink4A} und RASSF1A zur Detektion maligner Lungentumoren anhand der Analyse von Genpromotorhypermethylierungen, welches zuvor durch das Institut für Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf etabliert wurde. Zudem wurde untersucht, ob sich die Rate der Detektion des Panels durch ein weiteres Gen - 3-OST-2 - verbessert lässt.

Die Hypermethylierung der genannten 3 Genpromotoren wurde mittels Quantitativer Methylierungsspezifischer *real-time* PCR (QMSP) in einer Diagnosestudie mit prospektivem Studieneinschluss und verblindeter retrospektiver Evaluation an 178 Bronchialaspiraten von 178 Patienten (108 Patienten mit primärem malignem Lungentumor, 9 Patienten mit Tumor andere Genese, 61 Nicht-Tumor Patienten) untersucht. Das 3-Biomarker-Genpanel erreichte hier eine Sensitivität von 51 % bei einer Spezifität von 98 % und konnte somit als hochspezifischer Biomarkertest zur Detektion von malignen Lungentumoren bestätigt werden. Der Mehrwert dieses diagnostischen Tests konnte v. a. in der Kombination mit der Routinezytologie gezeigt werden, wodurch eine Sensitivität von 71 % bei einer Spezifität von 98 % erreicht wurde. Es konnte wiederum gezeigt werden, dass sich bei Patienten in der zytologischen Diagnosegruppe *unklar* eine Verwendung des 3-Biomarker-Genpanels als Reflextest in der klinischen Routinediagnostik besonders anbietet.

Am o. g. Patientenkollektiv wurde in dieser Arbeit auch die Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors mittels QMSP untersucht. Hierzu wurden der Literatur äquivalente Primer und Sonden gewählt, welche dort vielversprechende Ergebnisse erzielten. Bis auf 3 Proben zeigte sonst jede Probe eine Hypermethylierung des 3-OST-2-Genpromotors, was die Definition eines *cut-off*-Levels nötig machte. Die Wahrung einer akzeptablen Spezifität von 95 % führte zu einer geringen Sensitivität von 16 % hinsichtlich der Detektion von malignen Lungentumoren. Das 4-Biomarker-Genpanel (APC, p16^{Ink4A}, RASSF1A und 3-OST-2) erreichte eine Sensitivität von 56 % bei einer Spezifität von 95 %. Nach Einschätzung dieser Arbeit liefert die Hypermethylierungsanalyse des 3-OST-2-Genpromotors mit dem hier verwandten QMSP-Protokoll keinen Mehrwert für das etablierte Biomarker-Genpanel zur Detektion maligner Lungentumoren, denn die Steigerung der Sensitivität war gering und ging auf Kosten der Spezifität, was in der klinischen Routinediagnostik zu viele falsch positive Fälle bedingen würde.

7. Literaturverzeichnis

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, and F. Bray, "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–386, Mar. 2015.
- [2] P. Kaatsch, C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, J. Cernaj, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Kranzhöfer, E. Kriehoff-Henning, B. Kunz, A. Penzkofer, K. Treml, K. Wittenberg, N. Baras, B. Barnes, J. Bertz, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, M. Franke, J. Haberland, K. Kraywinkel, A. Wienecke, U. Wolf, and A. Stang, in *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010*, 9th ed., Berlin: Robert Koch-Institut, 2013, pp. 56–59.
- [3] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, "Tobacco smoke and involuntary smoking," *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, vol. 83, pp. 161–274, 2004.
- [4] S. Gandini, E. Botteri, S. Iodice, M. Boniol, A. B. Lowenfels, P. Maisonneuve, and P. Boyle, "Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis," *Int. J. Cancer*, vol. 122, no. 1, pp. 155–164, Jan. 2008.
- [5] Centers for Disease Control (CDC), "The Surgeon General's 1989 Report on Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress," *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 38 Suppl 2, pp. 1–32, Mar. 1989.
- [6] D. M. Parkin, F. I. Bray, and S. S. Devesa, "Cancer burden in the year 2000. The global picture," *Eur. J. Cancer*, vol. 37 Suppl 8, pp. S4–66, Oct. 2001.
- [7] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, "Global cancer statistics," *CA Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 2, pp. 69–90, Apr. 2011.
- [8] S. De Matteis, D. Consonni, A. C. Pesatori, A. W. Bergen, P. A. Bertazzi, N. E. Caporaso, J. H. Lubin, S. Wacholder, and M. T. Landi, "Are women who smoke at higher risk for lung cancer than men who smoke?," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 177, no. 7, pp. 601–612, Apr. 2013.
- [9] P. Brennan, P. A. Buffler, P. Reynolds, A. H. Wu, H. E. Wichmann, A. Agudo, G. Pershagen, K.-H. Jöckel, S. Benhamou, R. S. Greenberg, F. Merletti, C. Winck, E. T. H. Fontham, M. Kreuzer, S. C. Darby, F. Forastiere, L. Simonato, and P. Boffetta, "Secondhand smoke exposure in adulthood and risk of lung cancer among never smokers: a pooled analysis of two large studies," *Int. J. Cancer*, vol. 109, no. 1, pp. 125–131, Mar. 2004.
- [10] A. J. Alberg, M. V. Brock, J. G. Ford, J. M. Samet, and S. D. Spivack, "Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines," *Chest*, vol. 143, no. 5 Suppl, p. e1S–29S, May 2013.
- [11] A. Matakidou, T. Eisen, and R. S. Houlston, "Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk," *Br. J. Cancer*, vol. 93, no. 7, pp. 825–833, Oct. 2005.
- [12] M. M. Braun, N. E. Caporaso, W. F. Page, and R. N. Hoover, "Genetic component of lung cancer: cohort study of twins," *Lancet*, vol. 344, no. 8920, pp. 440–443, Aug. 1994.
- [13] W. D. Travis, E. Brambilla, A. P. Burke, A. Marx, and A. G. Nicholson, "Tumours of the Lung," in *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, 4th ed., Lyon: IARC, 2015, pp. 9–140.
- [14] S. A. Kenfield, E. K. Wei, M. J. Stampfer, B. A. Rosner, and G. A. Colditz, "Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer," *Tob. Control*, vol. 17, no. 3, pp. 198–204, Jun. 2008.
- [15] J. F. Tomaszewski Jr, A. F. Connors Jr, E. S. Rosenthal, and I. L. Hsiue, "Peripheral vs central squamous cell carcinoma of the lung. A comparison of clinical features, histopathology, and survival," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 114, no. 5, pp. 468–474, May 1990.
- [16] S. L. Robbins, V. Kumar, and R. S. Cotran, "Diseases of Organ Systems: The Lung," in *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.*, 8th ed., Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2009, pp. 677–738.
- [17] M. L. G. Janssen-Heijnen and J.-W. W. Coebergh, "The changing epidemiology of lung cancer in Europe," *Lung Cancer*, vol. 41, no. 3, pp. 245–258, Sep. 2003.
- [18] H. Ito, K. Matsuo, H. Tanaka, D. C. Koestler, H. Ombao, J. Fulton, A. Shibata, M. Fujita, H. Sugiyama, M. Soda, T. Sobue, and V. Mor, "Nonfilter and filter cigarette consumption and the

- incidence of lung cancer by histological type in Japan and the United States: analysis of 30-year data from population-based cancer registries,” *Int. J. Cancer*, vol. 128, no. 8, pp. 1918–1928, Apr. 2011.
- [19] S. Couraud, G. Zalcman, B. Milleron, F. Morin, and P.-J. Souquet, “Lung cancer in never smokers – A review,” *European Journal of Cancer*, vol. 48, no. 9, pp. 1299–1311, Jun. 2012.
- [20] J. Subramanian and R. Govindan, “Lung cancer in never smokers: a review,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 5, pp. 561–570, Feb. 2007.
- [21] E. Radzikowska, P. Głaz, and K. Roszkowski, “Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases,” *Ann. Oncol.*, vol. 13, no. 7, pp. 1087–1093, Jul. 2002.
- [22] K. R. Hess, G. R. Varadhachary, S. H. Taylor, W. Wei, M. N. Raber, R. Lenzi, and J. L. Abbruzzese, “Metastatic patterns in adenocarcinoma,” *Cancer*, vol. 106, no. 7, pp. 1624–1633, Apr. 2006.
- [23] M. Fasano, C. M. Della Corte, F. Papaccio, F. Ciardiello, and F. Morgillo, “Pulmonary Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma: From Epidemiology to Therapy,” *J. Thorac. Oncol.*, pp. 1133–1141, Aug. 2015.
- [24] W. D. Travis, “Advances in neuroendocrine lung tumors,” *Ann. Oncol.*, vol. 21 Suppl 7, pp. vii65–71, Oct. 2010.
- [25] V. T. DeVita, Lawrence, and S. A. Rosenberg, “Small Cell and Neuroendocrine Tumors of the Lung,” in *DeVita, Hellman, and Rosenberg’s cancer: principles & practice of oncology*, 9th ed., Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011, pp. 848–870.
- [26] M. C. Champaneria, I. M. Modlin, M. Kidd, and G. N. Eick, “Friedrich Feyrter: a precise intellect in a diffuse system,” *Neuroendocrinology*, vol. 83, no. 5–6, pp. 394–404, Oct. 2006.
- [27] S. A. Nicholson, M. B. Beasley, E. Brambilla, P. S. Hasleton, T. V. Colby, M. N. Sheppard, R. Falk, and W. D. Travis, “Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 26, no. 9, pp. 1184–1197, Sep. 2002.
- [28] W. D. Travis, “Lung tumours with neuroendocrine differentiation,” *Eur. J. Cancer*, vol. 45 Suppl 1, pp. 251–266, Sep. 2009.
- [29] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The hallmarks of cancer,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000.
- [30] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011.
- [31] I. I. Wistuba, C. Behrens, A. K. Virmani, G. Mele, S. Milchgrub, L. Girard, J. W. Fondon 3rd, H. R. Garner, B. McKay, F. Latif, M. I. Lerman, S. Lam, A. F. Gazdar, and J. D. Minna, “High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints,” *Cancer Res.*, vol. 60, no. 7, pp. 1949–1960, Apr. 2000.
- [32] Z. Siprashvili, G. Sozzi, L. D. Barnes, P. McCue, A. K. Robinson, V. Eryomin, L. Sard, E. Tagliabue, A. Greco, L. Fusetti, G. Schwartz, M. A. Pierotti, C. M. Croce, and K. Huebner, “Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 94, no. 25, pp. 13771–13776, Dec. 1997.
- [33] A. Agathangelou, W. N. Cooper, and F. Latif, “Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 9, pp. 3497–3508, May 2005.
- [34] L. Ji and J. A. Roth, “Tumor suppressor FUS1 signaling pathway,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 3, no. 4, pp. 327–330, Apr. 2008.
- [35] W.-G. Deng, H. Kawashima, G. Wu, G. Jayachandran, K. Xu, J. D. Minna, J. A. Roth, and L. Ji, “Synergistic tumor suppression by coexpression of FUS1 and p53 is associated with down-regulation of murine double minute-2 and activation of the apoptotic protease-activating factor 1-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer cells,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 709–717, Jan. 2007.
- [36] M. Ito, G. Ito, M. Kondo, M. Uchiyama, T. Fukui, S. Mori, H. Yoshioka, Y. Ueda, K. Shimokata, and Y. Sekido, “Frequent inactivation of RASSF1A, BLU, and SEMA3B on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer,” *Cancer Lett.*, vol. 225, no. 1, pp. 131–139, Jul. 2005.
- [37] Y. Tomizawa, Y. Sekido, M. Kondo, B. Gao, J. Yokota, J. Roche, H. Drabkin, M. I. Lerman, A. F. Gazdar, and J. D. Minna, “Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis

- after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, no. 24, pp. 13954–13959, Nov. 2001.
- [38] E. Brambilla, B. Constantin, H. Drabkin, and J. Roche, “Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration,” *Am. J. Pathol.*, vol. 156, no. 3, pp. 939–950, Mar. 2000.
- [39] O. Kessler, N. Shraga-Heled, T. Lange, N. Gutmann-Raviv, E. Sabo, L. Baruch, M. Machluf, and G. Neufeld, “Semaphorin-3F is an inhibitor of tumor angiogenesis,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 3, pp. 1008–1015, Feb. 2004.
- [40] R. H. J. Breuer, P. E. Postmus, and E. F. Smit, “Molecular pathology of non-small-cell lung cancer,” *Respiration*, vol. 72, no. 3, pp. 313–330, Jun. 2005.
- [41] M. S. Greenblatt, W. P. Bennett, M. Hollstein, and C. C. Harris, “Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis,” *Cancer Res.*, vol. 54, no. 18, pp. 4855–4878, Sep. 1994.
- [42] F. Hommura, H. Dosaka-Akita, I. Kinoshita, T. Mishina, H. Hiroumi, S. Ogura, H. Katoh, and Y. Kawakami, “Predictive value of expression of p16INK4A, retinoblastoma and p53 proteins for the prognosis of non-small-cell lung cancers,” *Br. J. Cancer*, vol. 81, no. 4, pp. 696–701, Oct. 1999.
- [43] G. Mountzios, P. Fouret, and J.-C. Soria, “Mechanisms of Disease: signal transduction in lung carcinogenesis -- a comparison of smokers and never-smokers,” *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, vol. 5, no. 10, pp. 610–618, Oct. 2008.
- [44] G. A. Otterson, R. A. Kratzke, A. Coxon, Y. W. Kim, and F. J. Kaye, “Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB,” *Oncogene*, vol. 9, no. 11, pp. 3375–3378, Nov. 1994.
- [45] B. Vincenzi, G. Schiavon, M. Silletta, D. Santini, G. Perrone, M. Di Marino, S. Angeletti, A. Baldi, and G. Tonini, “Cell cycle alterations and lung cancer,” *Histol. Histopathol.*, vol. 21, no. 4, pp. 423–435, Apr. 2006.
- [46] A. G. Knudson, “Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 68, no. 4, pp. 820–823, Apr. 1971.
- [47] I. B. Weinstein, “Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer,” *Science*, vol. 297, no. 5578, pp. 63–64, Jul. 2002.
- [48] G. Mountzios, M.-A. Dimopoulos, J.-C. Soria, D. Sanoudou, and C. A. Papadimitriou, “Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer: a review of published data,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 75, no. 2, pp. 94–109, Aug. 2010.
- [49] F. R. Hirsch, M. Varella-Garcia, and F. Cappuzzo, “Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer,” *Oncogene*, vol. 28 Suppl 1, pp. S32–37, Aug. 2009.
- [50] H. Zhang, A. Berezov, Q. Wang, G. Zhang, J. Drebin, R. Murali, and M. I. Greene, “ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies,” *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 8, pp. 2051–2058, Aug. 2007.
- [51] K. Oda, Y. Matsuoka, A. Funahashi, and H. Kitano, “A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 1, p. 2005.0010, 2005.
- [52] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris, and H. Varmus, “EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from ‘never smokers’ and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 101, no. 36, pp. 13306–13311, Sep. 2004.
- [53] S. Fujino, T. Enokibori, N. Tezuka, Y. Asada, S. Inoue, H. Kato, and A. Mori, “A comparison of epidermal growth factor receptor levels and other prognostic parameters in non-small cell lung cancer,” *Eur. J. Cancer*, vol. 32A, no. 12, pp. 2070–2074, Nov. 1996.
- [54] H. Shigematsu, L. Lin, T. Takahashi, M. Nomura, M. Suzuki, I. I. Wistuba, K. M. Fong, H. Lee, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, Z. Feng, J. A. Roth, J. Herz, J. D. Minna, and A. F. Gazdar, “Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 97, no. 5, pp. 339–346, Mar. 2005.
- [55] J. R. Molina and A. A. Adjei, “The Ras/Raf/MAPK pathway,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 1, no. 1, pp. 7–9, Jan. 2006.
- [56] S. Rodenhuis and R. J. Slebos, “Clinical significance of ras oncogene activation in human lung

- cancer,” *Cancer Res.*, vol. 52, no. 9 Suppl, p. 2665s–2669s, May 1992.
- [57] M. Soda, Y. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama, and H. Mano, “Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer,” *Nature*, vol. 448, no. 7153, pp. 561–566, Aug. 2007.
- [58] B. Solomon, M. Varella-Garcia, and D. R. Camidge, “ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 4, no. 12, pp. 1450–1454, Dec. 2009.
- [59] J. E. Larsen and J. D. Minna, “Molecular biology of lung cancer: clinical implications,” *Clin. Chest Med.*, vol. 32, no. 4, pp. 703–740, Dec. 2011.
- [60] C. Sautès-Fridman, J. Cherfils-Vicini, D. Damotte, S. Fisson, W. H. Fridman, I. Cremer, and M.-C. Dieu-Nosjean, “Tumor microenvironment is multifaceted,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 30, no. 1, pp. 13–25, Mar. 2011.
- [61] S. Ylä-Herttuala, T. T. Rissanen, I. Vajanto, and J. Hartikainen, “Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 49, no. 10, pp. 1015–1026, Mar. 2007.
- [62] N. Ferrara, “Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress,” *Endocr. Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 581–611, Aug. 2004.
- [63] G. Korpany, E. Smyth, L. A. Sullivan, R. A. Brekken, and D. N. Carney, “Antiangiogenic therapy in lung cancer: focus on vascular endothelial growth factor pathway,” *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, vol. 235, no. 1, pp. 3–9, Jan. 2010.
- [64] D. Stefanou, A. Batistatou, E. Arkoumani, E. Ntzani, and N. J. Agnantis, “Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas,” *Histol. Histopathol.*, vol. 19, no. 1, pp. 37–42, Jan. 2004.
- [65] T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman, “Stem cells, cancer, and cancer stem cells,” *Nature*, vol. 414, no. 6859, pp. 105–111, Nov. 2001.
- [66] A. E. Bonner, W. J. Lemon, T. R. Devereux, R. A. Lubet, and M. You, “Molecular profiling of mouse lung tumors: association with tumor progression, lung development, and human lung adenocarcinomas,” *Oncogene*, vol. 23, no. 5, pp. 1166–1176, Feb. 2004.
- [67] A. C. Borczuk, L. Gorenstein, K. L. Walter, A. A. Assaad, L. Wang, and C. A. Powell, “Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways,” *Am. J. Pathol.*, vol. 163, no. 5, pp. 1949–1960, Nov. 2003.
- [68] M. S. Wicha, S. Liu, and G. Dontu, “Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 4, pp. 1883–1890; discussion 1895–1896, Feb. 2006.
- [69] E. M. Torres, B. R. Williams, and A. Amon, “Aneuploidy: cells losing their balance,” *Genetics*, vol. 179, no. 2, pp. 737–746, Jun. 2008.
- [70] P. Duesberg, “Chromosomal chaos and cancer,” *Sci. Am.*, vol. 296, no. 5, pp. 52–59, May 2007.
- [71] M. Schramm, C. Wrobel, I. Born, M. Kazimirek, N. Pomjanski, M. William, R. Kappes, C. D. Gerharz, S. Biesterfeld, and A. Böcking, “Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis,” *Cancer Cytopathol.*, vol. 119, no. 3, pp. 177–192, Jun. 2011.
- [72] R. Holliday, “DNA methylation and epigenetic mechanisms,” *Cell Biophys.*, vol. 15, no. 1–2, pp. 15–20, Oct. 1989.
- [73] P. A. Jones and S. B. Baylin, “The fundamental role of epigenetic events in cancer,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 3, no. 6, pp. 415–428, Jun. 2002.
- [74] P. A. Jones and P. W. Laird, “Cancer epigenetics comes of age,” *Nat. Genet.*, vol. 21, no. 2, pp. 163–167, Feb. 1999.
- [75] A. P. Feinberg, R. Ohlsson, and S. Henikoff, “The epigenetic progenitor origin of human cancer,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, no. 1, pp. 21–33, Jan. 2006.
- [76] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, and E. Li, “DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development,” *Cell*, vol. 99, no. 3, pp. 247–257, Oct. 1999.
- [77] G.-D. Kim, J. Ni, N. Kelesoglu, R. J. Roberts, and S. Pradhan, “Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases,” *EMBO J.*, vol. 21, no. 15, pp. 4183–4195, Aug. 2002.

- [78] M. Ehrlich, M. A. Gama-Sosa, L. H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune, and C. Gehrke, "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 10, no. 8, pp. 2709–2721, Apr. 1982.
- [79] A. Bird, "DNA methylation patterns and epigenetic memory," *Genes Dev.*, vol. 16, no. 1, pp. 6–21, Jan. 2002.
- [80] M. M. Suzuki and A. Bird, "DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 9, no. 6, pp. 465–476, Jun. 2008.
- [81] M. Gardiner-Garden and M. Frommer, "CpG islands in vertebrate genomes," *J. Mol. Biol.*, vol. 196, no. 2, pp. 261–282, Jul. 1987.
- [82] D. Takai and P. A. Jones, "Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, no. 6, pp. 3740–3745, Mar. 2002.
- [83] E. Li, C. Beard, and R. Jaenisch, "Role for DNA methylation in genomic imprinting," *Nature*, vol. 366, no. 6453, pp. 362–365, Nov. 1993.
- [84] S. B. Baylin and P. A. Jones, "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 10, pp. 726–734, Oct. 2011.
- [85] D. G. Burbee, E. Forgacs, S. Zöschbauer-Müller, L. Shivakumar, K. Fong, B. Gao, D. Randle, M. Kondo, A. Virmani, S. Bader, Y. Sekido, F. Latif, S. Milchgrub, S. Toyooka, A. F. Gazdar, M. I. Lerman, E. Zabarovsky, M. White, and J. D. Minna, "Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 93, no. 9, pp. 691–699, May 2001.
- [86] I. Park, D. Qian, M. Kiel, M. W. Becker, M. Pihajja, I. L. Weissman, S. J. Morrison, and M. F. Clarke, "Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells," *Nature*, vol. 423, no. 6937, pp. 302–305, May 2003.
- [87] A. M. Michie, A. M. McCaig, R. Nakagawa, and M. Vukovic, "Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer," *FEBS J.*, vol. 277, no. 1, pp. 74–80, Jan. 2010.
- [88] F. Watt and P. L. Molloy, "Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter," *Genes Dev.*, vol. 2, no. 9, pp. 1136–1143, Sep. 1988.
- [89] A. P. Bird and A. P. Wolffe, "Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin," *Cell*, vol. 99, no. 5, pp. 451–454, Nov. 1999.
- [90] B. Hendrich and A. Bird, "Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 11, pp. 6538–6547, Nov. 1998.
- [91] G. J. P. Fillion, S. Zhenilo, S. Salozhin, D. Yamada, E. Prokhortchouk, and P.-A. Defossez, "A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 1, pp. 169–181, Jan. 2006.
- [92] Q. Feng and Y. Zhang, "The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 7, pp. 827–832, Apr. 2001.
- [93] S. A. Sarraf and I. Stancheva, "Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly," *Mol. Cell*, vol. 15, no. 4, pp. 595–605, Aug. 2004.
- [94] N. Shivapurkar, V. Stastny, M. Suzuki, I. I. Wistuba, L. Li, Y. Zheng, Z. Feng, B. Hol, C. Prinsen, F. B. Thunnissen, and A. F. Gazdar, "Application of a methylation gene panel by quantitative PCR for lung cancers," *Cancer Lett.*, vol. 247, no. 1, pp. 56–71, Mar. 2007.
- [95] S. Toyooka, R. Maruyama, K. O. Toyooka, D. McLerran, Z. Feng, Y. Fukuyama, A. K. Virmani, S. Zochbauer-Muller, K. Tsukuda, K. Sugio, N. Shimizu, K. Shimizu, H. Lee, C.-Y. Chen, K. M. Fong, M. Gilcrease, J. A. Roth, J. D. Minna, and A. F. Gazdar, "Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 103, no. 2, pp. 153–160, Jan. 2003.
- [96] D.-S. Kim, S.-I. Cha, J.-H. Lee, Y.-M. Lee, J. E. Choi, M.-J. Kim, J.-S. Lim, E. B. Lee, C.-H. Kim, T. I. Park, T.-H. Jung, and J. Y. Park, "Aberrant DNA methylation profiles of non-small cell lung cancers in a Korean population," *Lung Cancer*, vol. 58, no. 1, pp. 1–6, Oct. 2007.
- [97] A. K. Virmani, J. A. Tsou, K. D. Siegmund, L. Y. C. Shen, T. I. Long, P. W. Laird, A. F. Gazdar, and I. A. Laird-Offringa, "Hierarchical clustering of lung cancer cell lines using DNA methylation markers," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 11, no. 3, pp. 291–297, Mar. 2002.

- [98] D. S. Kim, M. J. Kim, J. Y. Lee, Y. Z. Kim, E. J. Kim, and J. Y. Park, "Aberrant methylation of E-cadherin and H-cadherin genes in nonsmall cell lung cancer and its relation to clinicopathologic features," *Cancer*, vol. 110, no. 12, pp. 2785–2792, Dec. 2007.
- [99] S. Toyooka, K. O. Toyooka, R. Maruyama, A. K. Virmani, L. Girard, K. Miyajima, K. Harada, Y. Ariyoshi, T. Takahashi, K. Sugio, E. Brambilla, M. Gilcrease, J. D. Minna, and A. F. Gazdar, "DNA methylation profiles of lung tumors," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 1, no. 1, pp. 61–67, Nov. 2001.
- [100] O. Topaloglu, M. O. Hoque, Y. Tokumaru, J. Lee, E. Ratovitski, D. Sidransky, and C. Moon, "Detection of Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in the Tumor and Bronchoalveolar Lavage of Patients with Lung Cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 7, pp. 2284–2288, Apr. 2004.
- [101] S. Nakata, K. Sugio, H. Uramoto, T. Oyama, T. Hanagiri, M. Morita, and K. Yasumoto, "The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance," *Cancer*, vol. 106, no. 10, pp. 2190–2199, May 2006.
- [102] W. Sterlacci, A. Tzankov, L. Veits, B. Zelger, M. P. Bihl, A. Foerster, F. Augustin, M. Fiegl, and S. Savic, "A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 6, no. 10, pp. 1649–1657, Oct. 2011.
- [103] L. Buckingham, L. Penfield Faber, A. Kim, M. Liptay, C. Barger, S. Basu, M. Fidler, K. Walters, P. Bonomi, and J. Coon, "PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II nonsmall cell lung cancer patients," *Int. J. Cancer*, vol. 126, no. 7, pp. 1630–1639, Apr. 2010.
- [104] R. Dammann, M. Strunnikova, U. Schagdarsurengin, M. Rastetter, M. Papritz, U. E. Hattenhorst, H.-S. Hofmann, R.-E. Silber, S. Burdach, and G. Hansen, "CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma," *Eur. J. Cancer*, vol. 41, no. 8, pp. 1223–1236, May 2005.
- [105] X. Tang, F. R. Khuri, J. J. Lee, B. L. Kemp, D. Liu, W. K. Hong, and L. Mao, "Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 92, no. 18, pp. 1511–1516, Sep. 2000.
- [106] W. Niklinska, W. Naumnik, A. Sulewska, M. Kozłowski, W. Pankiewicz, and R. Milewski, "Prognostic significance of DAPK and RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer (NSCLC)," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 47, no. 2, pp. 275–280, Dec. 2009.
- [107] N. Yanagawa, G. Tamura, H. Oizumi, N. Kanauchi, M. Endoh, M. Sadahiro, and T. Motoyama, "Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers," *Lung Cancer*, vol. 58, no. 1, pp. 131–138, Oct. 2007.
- [108] M. Ekim, V. Caner, N. Büyükpınarbaşı, E. Tepeli, L. Elmas, and G. Bağcı, "Determination of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation in non-small cell lung cancer," *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, vol. 15, no. 5, pp. 357–360, May 2011.
- [109] J. Brabender, H. Usadel, R. Metzger, P. M. Schneider, J. Park, D. Salonga, D. D. Tsao-Wei, S. Groshen, R. V. Lord, N. Takebe, S. Schneider, A. H. Hölscher, K. D. Danenberg, and P. V. Danenberg, "Quantitative O(6)-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome," *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 223–227, Jan. 2003.
- [110] Y. Tomizawa, H. Iijima, T. Nomoto, Y. Iwasaki, Y. Otani, S. Tsuchiya, R. Saito, K. Dobashi, T. Nakajima, and M. Mori, "Clinicopathological significance of aberrant methylation of RARbeta2 at 3p24, RASSF1A at 3p21.3, and FHIT at 3p14.2 in patients with non-small cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 46, no. 3, pp. 305–312, Dec. 2004.
- [111] A. Agathangelou, S. Honorio, D. P. Macartney, A. Martinez, A. Dallol, J. Rader, P. Fullwood, A. Chauhan, R. Walker, J. A. Shaw, S. Hosoe, M. I. Lerman, J. D. Minna, E. R. Maher, and F. Latif, "Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours," *Oncogene*, vol. 20, no. 12, pp. 1509–1518, Mar. 2001.
- [112] R. Dammann, T. Takahashi, and G. P. Pfeifer, "The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas," *Oncogene*, vol. 20, no. 27, pp. 3563–3567, Jun. 2001.

- [113] T. Y. Kim, H. J. Lee, K. S. Hwang, M. Lee, J. W. Kim, Y.-J. Bang, and G. H. Kang, "Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma," *Lab. Invest.*, vol. 84, no. 4, pp. 479–484, Apr. 2004.
- [114] K. Sato, Y. Tomizawa, H. Iijima, R. Saito, T. Ishizuka, T. Nakajima, and M. Mori, "Epigenetic inactivation of the RUNX3 gene in lung cancer," *Oncol. Rep.*, vol. 15, no. 1, pp. 129–135, Jan. 2006.
- [115] M. A. Dawson, T. Kouzarides, and B. J. P. Huntly, "Targeting epigenetic readers in cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, no. 7, pp. 647–657, Aug. 2012.
- [116] E. Segal and J. Widom, "What controls nucleosome positions?," *Trends Genet.*, vol. 25, no. 8, pp. 335–343, Aug. 2009.
- [117] I. V. Yang and D. A. Schwartz, "Epigenetic control of gene expression in the lung," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 183, no. 10, pp. 1295–1301, May 2011.
- [118] D. S. Schrupp, "Targeting epigenetic mediators of gene expression in thoracic malignancies," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1819, no. 7, pp. 836–845, Jul. 2012.
- [119] A. J. Bannister and T. Kouzarides, "Regulation of chromatin by histone modifications," *Cell Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 381–395, Mar. 2011.
- [120] W. Kim, R. Kim, G. Park, J.-W. Park, and J.-E. Kim, "Deficiency of H3K79 histone methyltransferase Dot1-like protein (DOT1L) inhibits cell proliferation," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 8, pp. 5588–5599, Feb. 2012.
- [121] A. S. Flynt and E. C. Lai, "Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 9, no. 11, pp. 831–842, Nov. 2008.
- [122] C. M. Croce, "Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 10, no. 10, pp. 704–714, Oct. 2009.
- [123] Y. Hayashita, H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido, and T. Takahashi, "A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 21, pp. 9628–9632, Nov. 2005.
- [124] S. M. Johnson, H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown, and F. J. Slack, "RAS is regulated by the let-7 microRNA family," *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 635–647, Mar. 2005.
- [125] G. Goeckenjan, H. Sitter, M. Thomas, D. Branscheid, M. Flentje, F. Griesinger, N. Niederle, M. Stuschke, T. Blum, K.-M. Deppermann, J. H. Ficker, L. Freitag, A. S. Lübke, T. Reinhold, E. Späth-Schwalbe, D. Ukena, M. Wickert, M. Wolf, S. Andreas, T. Auberger, R. P. Baum, B. Baysal, J. Beuth, H. Bickeböller, A. Böcking, R. M. Bohle, I. Brüske, O. Burghuber, N. Dickgreber, S. Diederich, H. Dienemann, W. Eberhardt, S. Eggeling, T. Fink, B. Fischer, M. Franke, G. Friedel, T. Gauler, S. Gütz, H. Hautmann, A. Hellmann, D. Hellwig, F. Herth, C. P. Heussel, W. Hilbe, F. Hoffmeyer, M. Horneber, R. M. Huber, J. Hübner, H.-U. Kauczor, K. Kirchbacher, D. Kirsten, T. Kraus, S. M. Lang, U. Martens, A. Mohn-Staudner, K.-M. Müller, J. Müller-Nordhorn, D. Nowak, U. Ochmann, B. Passlick, I. Petersen, R. Pirker, B. Pokrajac, M. Reck, S. Riha, C. Rübe, A. Schmittel, N. Schönfeld, W. Schütte, M. Serke, G. Stamatis, M. Steingraber, M. Steins, E. Stoelben, L. Swoboda, H. Teschler, H. W. Tessen, M. Weber, A. Werner, H.-E. Wichmann, E. Irlinger Wimmer, C. Witt, H. Worth, and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und die Deutsche Krebsgesellschaft, "Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer," *Pneumologie*, vol. 64 Suppl 2, pp. e1–164, Mar. 2010.
- [126] B. J. Flehinger, M. R. Melamed, M. B. Zaman, R. T. Heelan, W. B. Perchick, and N. Martini, "Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Memorial Sloan-Kettering study," *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 130, no. 4, pp. 555–560, Oct. 1984.
- [127] R. S. Fontana, D. R. Sanderson, W. F. Taylor, L. B. Woolner, W. E. Miller, J. R. Muhm, and M. A. Uhlenhopp, "Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic study," *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 130, no. 4, pp. 561–565, Oct. 1984.
- [128] J. K. Frost, W. C. Ball, M. L. Levin, M. S. Tockman, R. R. Baker, D. Carter, J. C. Eggleston, Y. S. Erozan, P. K. Gupta, and N. F. Khouri, "Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Johns Hopkins study," *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 130, no. 4, pp. 549–554, Oct. 1984.

- [129] J. Wilde, "A 10 year follow-up of semi-annual screening for early detection of lung cancer in the Erfurt County, GDR," *Eur. Respir. J.*, vol. 2, no. 7, pp. 656–662, Jul. 1989.
- [130] J. H. Austin, B. M. Romney, and L. S. Goldsmith, "Missed bronchogenic carcinoma: radiographic findings in 27 patients with a potentially resectable lesion evident in retrospect," *Radiology*, vol. 182, no. 1, pp. 115–122, Jan. 1992.
- [131] National Lung Screening Trial Research Team, D. R. Aberle, A. M. Adams, C. D. Berg, W. C. Black, J. D. Clapp, R. M. Fagerstrom, I. F. Gareen, C. Gatsonis, P. M. Marcus, and J. D. Sicks, "Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening," *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 5, pp. 395–409, Aug. 2011.
- [132] S. J. Swensen, R. W. Viggiano, D. E. Midthun, N. L. Müller, A. Sherrick, K. Yamashita, D. P. Naidich, E. F. Patz, T. E. Hartman, J. R. Muhm, and A. L. Weaver, "Lung nodule enhancement at CT: multicenter study," *Radiology*, vol. 214, no. 1, pp. 73–80, Jan. 2000.
- [133] S. L. S. MacDonald and D. M. Hansell, "Staging of non-small cell lung cancer: imaging of intrathoracic disease," *Eur J Radiol*, vol. 45, no. 1, pp. 18–30, Jan. 2003.
- [134] A. J. de Langen, P. Raijmakers, I. Riphagen, M. A. Paul, and O. S. Hoekstra, "The size of mediastinal lymph nodes and its relation with metastatic involvement: a meta-analysis," *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 29, no. 1, pp. 26–29, Jan. 2006.
- [135] M. Puderbach, C. Hintze, S. Ley, M. Eichinger, H.-U. Kauczor, and J. Biederer, "MR imaging of the chest: a practical approach at 1.5T," *Eur. J. Radiol.*, vol. 64, no. 3, pp. 345–355, Dec. 2007.
- [136] T. Nakajima and K. Yasufuku, "Early lung cancer: methods for detection," *Clin. Chest Med.*, vol. 34, no. 3, pp. 373–383, Sep. 2013.
- [137] G. Schreiber and D. C. McCrory, "Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence," *Chest*, vol. 123, no. 1 Suppl, p. 115S–128S, Jan. 2003.
- [138] S. Colella, P. Vilman, L. Konge, and P. F. Clementsen, "Endoscopic ultrasound in the diagnosis and staging of lung cancer," *Endosc Ultrasound*, vol. 3, no. 4, pp. 205–212, Oct. 2014.
- [139] A. Manhire, M. Charig, C. Clelland, F. Gleeson, R. Miller, H. Moss, K. Pointon, C. Richardson, E. Sawicka, and BTS, "Guidelines for radiologically guided lung biopsy," *Thorax*, vol. 58, no. 11, pp. 920–936, Nov. 2003.
- [140] C. J. Dennie, F. R. Matzinger, J. R. Marriner, and D. E. Maziak, "Transthoracic needle biopsy of the lung: results of early discharge in 506 outpatients," *Radiology*, vol. 219, no. 1, pp. 247–251, Apr. 2001.
- [141] Y. Ohno, H. Hatabu, D. Takenaka, T. Higashino, H. Watanabe, C. Ohbayashi, and K. Sugimura, "CT-guided transthoracic needle aspiration biopsy of small (< or = 20 mm) solitary pulmonary nodules," *AJR Am J Roentgenol*, vol. 180, no. 6, pp. 1665–1669, Jun. 2003.
- [142] R. L. Manser, L. B. Irving, G. Byrnes, M. J. Abramson, C. A. Stone, and D. A. Campbell, "Screening for lung cancer: a systematic review and meta-analysis of controlled trials," *Thorax*, vol. 58, no. 9, pp. 784–789, Sep. 2003.
- [143] K. Strimbu and J. A. Tavel, "What are Biomarkers?," *Curr. Opin. HIV AIDS*, vol. 5, no. 6, pp. 463–466, Nov. 2010.
- [144] V. Kulasingam and E. P. Diamandis, "Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies," *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, vol. 5, no. 10, pp. 588–599, Oct. 2008.
- [145] M. J. Duffy, "Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 18, no. 3, pp. 175–184, May 2007.
- [146] H. J. Grote, V. Schmiemann, M. Sarbia, and A. Böcking, "DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: which method to take?," *Anal. Cell. Pathol.*, vol. 25, no. 2, pp. 83–88, Jan. 2003.
- [147] M. Ehrlich and R. Y. Wang, "5-Methylcytosine in eukaryotic DNA," *Science*, vol. 212, no. 4501, pp. 1350–1357, Jun. 1981.
- [148] M. F. Fraga and M. Esteller, "DNA methylation: a profile of methods and applications," *BioTechniques*, vol. 33, no. 3, pp. 632, 634, 636–649, Sep. 2002.
- [149] C. A. Eads, K. D. Danenberg, K. Kawakami, L. B. Saltz, C. Blake, D. Shibata, P. V. Danenberg, and P. W. Laird, "MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 8, p. E32, Apr. 2000.

- [150] J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myöhänen, B. D. Nelkin, and S. B. Baylin, "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 93, no. 18, pp. 9821–9826, Sep. 1996.
- [151] R. Shapiro, R. Servis, and M. Welcher, "Reactions of Uracil and Cytosine Derivatives with Sodium Bisulfite," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 92, no. 2, pp. 422–424, Jan. 1970.
- [152] M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, and C. L. Paul, "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 89, no. 5, pp. 1827–1831, Mar. 1992.
- [153] V. Schmiemann, A. Böcking, M. Kazimirek, A. S. C. Onofre, H. E. Gabbert, R. Kappes, C. D. Gerharz, and H. J. Grote, "Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 21, pp. 7728–7734, Nov. 2005.
- [154] H. J. Grote, V. Schmiemann, S. Kiel, A. Böcking, R. Kappes, H. E. Gabbert, and M. Sarbia, "Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli promoter 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 110, no. 5, pp. 751–755, Jul. 2004.
- [155] H. J. Grote, V. Schmiemann, H. Geddert, U. P. Rohr, R. Kappes, H. E. Gabbert, and A. Böcking, "Aberrant promoter methylation of p16(INK4a), RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 116, no. 5, pp. 720–725, Sep. 2005.
- [156] H. J. Grote, V. Schmiemann, H. Geddert, A. Böcking, R. Kappes, H. E. Gabbert, and M. Sarbia, "Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer," *Cancer*, vol. 108, no. 2, pp. 129–134, Apr. 2006.
- [157] P. Polakis, "The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1332, no. 3, pp. F127–147, Jun. 1997.
- [158] K. H. Goss and J. Groden, "Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor," *J. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. 9, pp. 1967–1979, May 2000.
- [159] S. D. Markowitz and M. M. Bertagnolli, "Molecular Origins of Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 25, pp. 2449–2460, Dec. 2009.
- [160] J. Sanz-Ortega, B. Bryant, J. Sanz-Esponera, J. A. Asenjo, M. C. Saez, A. Torres, J. L. Balibrea, M. E. Sobel, and M. J. Merino, "LOH at the APC/MCC gene (5Q21) is frequent in early stages of non-small cell lung cancer," *Pathol. Res. Pract.*, vol. 195, no. 10, pp. 677–680, 1999.
- [161] C. A. Cooper, V. J. Bubb, N. Smithson, R. L. Carter, S. Gledhill, D. Lamb, A. H. Wyllie, and F. A. Carey, "Loss of heterozygosity at 5q21 in non-small cell lung cancer: a frequent event but without evidence of apc mutation," *J. Pathol.*, vol. 180, no. 1, pp. 33–37, Sep. 1996.
- [162] A. K. Virmani, A. Rathi, U. G. Sathyanarayana, A. Padar, C. X. Huang, H. T. Cunningham, A. J. Farinas, S. Milchgrub, D. M. Euhus, M. Gilcrease, J. Herman, J. D. Minna, and A. F. Gazdar, "Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas," *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, no. 7, pp. 1998–2004, Jul. 2001.
- [163] J. Brabender, H. Usadel, K. D. Danenberg, R. Metzger, P. M. Schneider, R. V. Lord, K. Wickramasinghe, C. E. Lum, J. Park, D. Salonga, J. Singer, D. Sidransky, A. H. Hölscher, S. J. Meltzer, and P. V. Danenberg, "Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival," *Oncogene*, vol. 20, no. 27, pp. 3528–3532, Jun. 2001.
- [164] H. Usadel, J. Brabender, K. D. Danenberg, C. Jerónimo, S. Harden, J. Engles, P. V. Danenberg, S. Yang, and D. Sidransky, "Quantitative Adenomatous Polyposis Coli Promoter Methylation Analysis in Tumor Tissue, Serum, and Plasma DNA of Patients with Lung Cancer," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 2, pp. 371–375, Jan. 2002.
- [165] G. Deng, G.-A. Song, E. Pong, M. Slesinger, and Y. S. Kim, "Promoter methylation inhibits APC gene expression by causing changes in chromatin conformation and interfering with the binding of transcription factor CCAAT-binding factor," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 8, pp. 2692–2698, Apr. 2004.
- [166] S. Stone, P. Jiang, P. Dayananth, S. V. Tavtigian, H. Katcher, D. Parry, G. Peters, and A. Kamb, "Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus," *Cancer Res.*, vol. 55, no. 14, pp. 2988–2994, Jul. 1995.
- [167] C. J. Sherr and F. McCormick, "The RB and p53 pathways in cancer," *Cancer Cell*, vol. 2, no.

- 2, pp. 103–112, Aug. 2002.
- [168] H. Rayess, M. B. Wang, and E. S. Srivatsan, “Cellular senescence and tumor suppressor gene p16,” *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 8, pp. 1715–1725, Apr. 2012.
- [169] W. H. Liggett and D. Sidransky, “Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 3, pp. 1197–1206, Mar. 1998.
- [170] L. Liu, N. J. Lassam, J. M. Slingerland, D. Bailey, D. Cole, R. Jenkins, and D. Hogg, “Germline p16INK4A mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma,” *Oncogene*, vol. 11, no. 2, pp. 405–412, Jul. 1995.
- [171] D. Bartsch, D. W. Shevlin, W. S. Tung, O. Kisker, S. A. Wells, and P. J. Goodfellow, “Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas,” *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 14, no. 3, pp. 189–195, Nov. 1995.
- [172] H. Igaki, H. Sasaki, T. Kishi, H. Sakamoto, Y. Tachimori, H. Kato, H. Watanabe, T. Sugimura, and M. Terada, “Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 203, no. 2, pp. 1090–1095, Sep. 1994.
- [173] A. Merlo, J. G. Herman, L. Mao, D. J. Lee, E. Gabrielson, P. C. Burger, S. B. Baylin, and D. Sidransky, “5’ CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers,” *Nat. Med.*, vol. 1, no. 7, pp. 686–692, Jul. 1995.
- [174] R. Dammann, U. Schagdarsurengin, M. Strunnikova, M. Rastetter, C. Seidel, L. Liu, S. Tommasi, and G. P. Pfeifer, “Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis,” *Histol. Histopathol.*, vol. 18, no. 2, pp. 665–677, Apr. 2003.
- [175] R. Dammann, U. Schagdarsurengin, C. Seidel, M. Strunnikova, M. Rastetter, K. Baier, and G. P. Pfeifer, “The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update,” *Histol. Histopathol.*, vol. 20, no. 2, pp. 645–663, Apr. 2005.
- [176] S. Wohlgemuth, C. Kiel, A. Krämer, L. Serrano, F. Wittinghofer, and C. Herrmann, “Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis,” *J. Mol. Biol.*, vol. 348, no. 3, pp. 741–758, May 2005.
- [177] M. Cheng, V. Sexl, C. J. Sherr, and M. F. Roussel, “Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1),” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 95, no. 3, pp. 1091–1096, Feb. 1998.
- [178] R. Rong, W. Jin, J. Zhang, M. S. Sheikh, and Y. Huang, “Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G2/M arrest,” *Oncogene*, vol. 23, no. 50, pp. 8216–8230, Oct. 2004.
- [179] L. Liu, S. Tommasi, D.-H. Lee, R. Dammann, and G. P. Pfeifer, “Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor,” *Oncogene*, vol. 22, no. 50, pp. 8125–8136, Nov. 2003.
- [180] S. Baksh, S. Tommasi, S. Fenton, V. C. Yu, L. M. Martins, G. P. Pfeifer, F. Latif, J. Downward, and B. G. Neel, “The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death,” *Mol. Cell*, vol. 18, no. 6, pp. 637–650, Jun. 2005.
- [181] F. J. Reu, D. W. Leaman, R. R. Maitra, S. I. Bae, L. Cherkassky, M. W. Fox, D. R. Rempinski, N. Beaulieu, A. R. MacLeod, and E. C. Borden, “Expression of RASSF1A, an epigenetically silenced tumor suppressor, overcomes resistance to apoptosis induction by interferons,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 5, pp. 2785–2793, Mar. 2006.
- [182] A. M. Richter, G. P. Pfeifer, and R. H. Dammann, “The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1796, no. 2, pp. 114–128, Dec. 2009.
- [183] R. Dammann, C. Li, J. H. Yoon, P. L. Chin, S. Bates, and G. P. Pfeifer, “Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3,” *Nat. Genet.*, vol. 25, no. 3, pp. 315–319, Jul. 2000.
- [184] L. B. Hesson, W. N. Cooper, and F. Latif, “The role of RASSF1A methylation in cancer,” *Dis. Markers*, vol. 23, no. 1–2, pp. 73–87, Feb. 2007.
- [185] N. W. Shworak, J. Liu, L. M. Petros, L. Zhang, M. Kobayashi, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and R. D. Rosenberg, “Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 8, pp. 5170–5184, Feb. 1999.
- [186] N. Perrimon and M. Bernfield, “Specificities of heparan sulphate proteoglycans in

- developmental processes,” *Nature*, vol. 404, no. 6779, pp. 725–728, Apr. 2000.
- [187] S. Sarrazin, W. C. Lamanna, and J. D. Esko, “Heparan sulfate proteoglycans,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 7, Jul. 2011.
- [188] K. Miyamoto, K. Asada, T. Fukutomi, E. Okochi, Y. Yagi, T. Hasegawa, T. Asahara, T. Sugimura, and T. Ushijima, “Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers,” *Oncogene*, vol. 22, no. 2, pp. 274–280, Jan. 2003.
- [189] Y. Tokuyama, T. Takahashi, N. Okumura, K. Nonaka, Y. Kawaguchi, K. Yamaguchi, S. Osada, A. Gazdar, and K. Yoshida, “Aberrant methylation of heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 2 genes as a biomarker in colorectal cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 12, pp. 4811–4818, Dec. 2010.
- [190] C. Bernal, F. Aguayo, C. Villarroel, M. Vargas, I. Díaz, F. J. Ossandon, E. Santibáñez, M. Palma, E. Aravena, C. Barrientos, and A. H. Corvalan, “Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 19, pp. 6264–6269, Oct. 2008.
- [191] J.-A. Hwang, Y. Kim, S.-H. Hong, J. Lee, Y. G. Cho, J.-Y. Han, Y.-H. Kim, J. Han, Y. M. Shim, Y.-S. Lee, and D.-H. Kim, “Epigenetic inactivation of heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2 in lung cancer and its role in tumorigenesis,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11, p. e79634, Nov. 2013.
- [192] S. Mahapatra, E. W. Klee, C. Y. F. Young, Z. Sun, R. E. Jimenez, G. G. Klee, D. J. Tindall, and K. V. Donkena, “Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 10, pp. 2882–2895, May 2012.
- [193] E. H. Lim, S. L. Ng, J. L. Li, A. R. Chang, J. Ng, A. Ilancheran, J. Low, S. C. Quek, and E. H. Tay, “Cervical dysplasia: assessing methylation status (Methylight) of CCNA1, DAPK1, HS3ST2, PAX1 and TFPI2 to improve diagnostic accuracy,” *Gynecol. Oncol.*, vol. 119, no. 2, pp. 225–231, Nov. 2010.
- [194] M. Ehrlich, “DNA hypomethylation in cancer cells,” *Epigenomics*, vol. 1, no. 2, pp. 239–259, Dec. 2009.
- [195] I. P. Pogribny and F. A. Beland, “DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 14, pp. 2249–2261, Jul. 2009.
- [196] T. A. Rauch, X. Zhong, X. Wu, M. Wang, K. H. Kernstine, Z. Wang, A. D. Riggs, and G. P. Pfeifer, “High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, no. 1, pp. 252–257, Jan. 2008.
- [197] H. Kim, Y. M. Kwon, J. S. Kim, J. Han, Y. M. Shim, J. Park, and D.-H. Kim, “Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer,” *Cancer*, vol. 107, no. 5, pp. 1042–1049, Sep. 2006.
- [198] D. Vallböhmer, J. Brabender, D. Yang, P. M. Schneider, R. Metzger, K. D. Danenberg, A. H. Hölscher, and P. V. Danenberg, “DNA methyltransferases messenger RNA expression and aberrant methylation of CpG islands in non-small-cell lung cancer: association and prognostic value,” *Clin. Lung Cancer*, vol. 8, no. 1, pp. 39–44, Jul. 2006.
- [199] R.-K. Lin, H.-S. Hsu, J.-W. Chang, C.-Y. Chen, J.-T. Chen, and Y.-C. Wang, “Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5’CpG methylation and poor prognosis in lung cancer,” *Lung Cancer*, vol. 55, no. 2, pp. 205–213, Feb. 2007.
- [200] A. Böcking, “Standardisierung der zytopathologischen Diagnostik,” *Der Pathologe*, vol. 19, no. 3, pp. 236–241, May 1998.
- [201] R. Y. Wang, C. W. Gehrke, and M. Ehrlich, “Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 8, no. 20, pp. 4777–4790, Oct. 1980.
- [202] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim, “Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia,” *Science*, vol. 230, no. 4732, pp. 1350–1354, Dec. 1985.
- [203] M. A. Innis, K. B. Myambo, D. H. Gelfand, and M. A. Brow, “DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 85, no. 24, pp. 9436–9440, Dec. 1988.
- [204] W. A. Palmisano, K. K. Divine, G. Saccomanno, F. D. Gilliland, S. B. Baylin, J. G. Herman, and S. A. Belinsky, “Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum,” *Cancer Res.*, vol. 60, no. 21, pp. 5954–5958, Nov. 2000.
- [205] S. A. Belinsky, K. C. Liechty, F. D. Gentry, H. J. Wolf, J. Rogers, K. Vu, J. Haney, T. C.

- Kennedy, F. R. Hirsch, Y. Miller, W. A. Franklin, J. G. Herman, S. B. Baylin, P. A. Bunn, and T. Byers, "Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Sputum Precedes Lung Cancer Incidence in a High-Risk Cohort," *Cancer Res*, vol. 66, no. 6, pp. 3338–3344, Mar. 2006.
- [206] A. J. Hubers, D. A. M. Heideman, G. J. M. Herder, S. A. Burgers, P. J. Sterk, P. W. Kunst, H. J. Smit, P. E. Postmus, B. I. Witte, S. Duin, P. J. F. Snijders, E. F. Smit, and E. Thunnissen, "Prolonged sampling of spontaneous sputum improves sensitivity of hypermethylation analysis for lung cancer," *J. Clin. Pathol.*, vol. 65, no. 6, pp. 541–545, Jun. 2012.
- [207] A. J. Hubers, M. A. van der Drift, C. F. M. Prinsen, B. I. Witte, Y. Wang, N. Shivapurkar, V. Stastny, A. S. Bolijn, B. E. A. Hol, Z. Feng, P. N. R. Dekhuijzen, A. F. Gazdar, and E. Thunnissen, "Methylation analysis in spontaneous sputum for lung cancer diagnosis," *Lung Cancer*, vol. 84, no. 2, pp. 127–133, May 2014.
- [208] Y. Zhang, R. Wang, H. Song, G. Huang, J. Yi, Y. Zheng, J. Wang, and L. Chen, "Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer," *Cancer Lett.*, vol. 303, no. 1, pp. 21–28, Apr. 2011.
- [209] A. M. Safar, H. Spencer, X. Su, M. Coffey, C. A. Cooney, L. D. Ratnasinghe, L. F. Hutchins, and C.-Y. Fan, "Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 12, pp. 4400–4405, Jun. 2005.
- [210] M. Jin, K. Kawakami, Y. Fukui, S. Tsukioka, M. Oda, G. Watanabe, T. Takechi, T. Oka, and T. Minamoto, "Different histological types of non-small cell lung cancer have distinct folate and DNA methylation levels," *Cancer Sci.*, vol. 100, no. 12, pp. 2325–2330, Dec. 2009.
- [211] G. Nikolaidis, O. Y. Raji, S. Markopoulou, J. R. Gosney, J. Bryan, C. Warburton, M. Walshaw, J. Sheard, J. K. Field, and T. Liloglou, "DNA methylation biomarkers offer improved diagnostic efficiency in lung cancer," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 22, pp. 5692–5701, Nov. 2012.
- [212] W. K. De Jong, G. F. Verpooten, H. Kramer, J. Louwagie, and H. J. M. Groen, "Promoter methylation primarily occurs in tumor cells of patients with non-small cell lung cancer," *Anticancer Res.*, vol. 29, no. 1, pp. 363–369, Jan. 2009.
- [213] J. Gu, D. Berman, C. Lu, I. I. Wistuba, J. A. Roth, M. Frazier, M. R. Spitz, and X. Wu, "Aberrant promoter methylation profile and association with survival in patients with non-small cell lung cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 24, pp. 7329–7338, Dec. 2006.
- [214] Y. S. Hong, M. S. Roh, N. Y. Kim, H. J. Lee, H. K. Kim, K. E. Lee, J. Y. Kwak, and J. Y. Kim, "Hypermethylation of p16INK4a in Korean non-small cell lung cancer patients," *J. Korean Med. Sci.*, vol. 22 Suppl, pp. S32–37, Sep. 2007.
- [215] N. Ota, K. Kawakami, T. Okuda, A. Takehara, C. Hiranuma, K. Oyama, Y. Ota, M. Oda, and G. Watanabe, "Prognostic significance of p16(INK4a) hypermethylation in non-small cell lung cancer is evident by quantitative DNA methylation analysis," *Anticancer Res.*, vol. 26, no. 5B, pp. 3729–3732, Oct. 2006.
- [216] H. Kim, Y. M. Kwon, J. S. Kim, H. Lee, J.-H. Park, Y. M. Shim, J. Han, J. Park, and D.-H. Kim, "Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 12, pp. 2363–2370, Jun. 2004.
- [217] S. A. Ahrendt, J. T. Chow, L. H. Xu, S. C. Yang, C. F. Eisenberger, M. Esteller, J. G. Herman, L. Wu, P. A. Decker, J. Jen, and D. Sidransky, "Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 91, no. 4, pp. 332–339, Feb. 1999.
- [218] M. Guo, M. G. House, C. Hooker, Y. Han, E. Heath, E. Gabrielson, S. C. Yang, S. B. Baylin, J. G. Herman, and M. V. Brock, "Promoter hypermethylation of resected bronchial margins: a field defect of changes?," *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 15, pp. 5131–5136, Aug. 2004.
- [219] E. C. Chan, S. Y. Lam, K. W. Tsang, B. Lam, J. C. M. Ho, K. H. Fu, W. K. Lam, and Y. L. Kwong, "Aberrant promoter methylation in Chinese patients with non-small cell lung cancer: patterns in primary tumors and potential diagnostic application in bronchoalveolar lavage," *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, no. 12, pp. 3741–3746, Dec. 2002.
- [220] M. Kersting, C. Friedl, A. Kraus, M. Behn, W. Pankow, and M. Schuermann, "Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers," *J. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. 18, pp. 3221–3229, Sep. 2000.
- [221] S. A. Belinsky, W. A. Palmisano, F. D. Gilliland, L. A. Crooks, K. K. Divine, S. A. Winters, M. J. Grimes, H. J. Harms, C. S. Tellez, T. M. Smith, P. P. Moots, J. F. Lechner, C. A. Stidley, and R. E. Crowell, "Aberrant Promoter Methylation in Bronchial Epithelium and Sputum from

- Current and Former Smokers,” *Cancer Res.*, vol. 62, no. 8, pp. 2370–2377, Apr. 2002.
- [222] S. A. Belinsky, M. J. Grimes, E. Casas, C. A. Stidley, W. A. Franklin, T. J. Bocklage, D. H. Johnson, and J. H. Schiller, “Predicting gene promoter methylation in non-small-cell lung cancer by evaluating sputum and serum,” *Br. J. Cancer*, vol. 96, no. 8, pp. 1278–1283, Apr. 2007.
- [223] A. Destro, P. Bianchi, M. Alloisio, L. Laghi, S. Di Gioia, A. Malesci, U. Cariboni, G. Gribaudo, G. Bulfamante, A. Marchetti, S. Bosari, M. Infante, G. Ravasi, and M. Roncalli, “K-ras and p16(INK4A) alterations in sputum of NSCLC patients and in heavy asymptomatic chronic smokers,” *Lung Cancer*, vol. 44, no. 1, pp. 23–32, Apr. 2004.
- [224] R. Cirincione, C. Lintas, D. Conte, L. Mariani, L. Roz, A. M. Vignola, U. Pastorino, and G. Sozzi, “Methylation profile in tumor and sputum samples of lung cancer patients detected by spiral computed tomography: a nested case-control study,” *Int. J. Cancer*, vol. 118, no. 5, pp. 1248–1253, Mar. 2006.
- [225] G. Xie, A. Hou, L. Li, Y.-N. Gao, and S. Cheng, “Aberrant p16 promoter hypermethylation in bronchial mucosae as a biomarker for the early detection of lung cancer,” *Chin. Med. J.*, vol. 119, no. 17, pp. 1469–1472, Sep. 2006.
- [226] J. Wang, J. J. Lee, L. Wang, D. D. Liu, C. Lu, Y.-H. Fan, W. K. Hong, and L. Mao, “Value of p16INK4a and RASSF1A promoter hypermethylation in prognosis of patients with resectable non-small cell lung cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 18 Pt 1, pp. 6119–6125, Sep. 2004.
- [227] M. A. van der Drift, C. F. M. Prinsen, G. J. Knuiman, J. P. Janssen, P. N. R. Dekhuijzen, and F. B. J. M. Thunnissen, “Diagnosing peripheral lung cancer: the additional value of the Ras-association domain family 1A gene methylation and Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog mutation analyses in washings in nondiagnostic bronchoscopy,” *Chest*, vol. 141, no. 1, pp. 169–175, Jan. 2012.
- [228] M. O. Hoque, M. Brait, E. Rosenbaum, M. L. Poeta, P. Pal, S. Begum, S. Dasgupta, A. L. Carvalho, S. A. Ahrendt, W. H. Westra, and D. Sidransky, “Genetic and epigenetic analysis of erbB signaling pathway genes in lung cancer,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 5, no. 12, pp. 1887–1893, Dec. 2010.
- [229] M. Ji, H. Guan, C. Gao, B. Shi, and P. Hou, “Highly frequent promoter methylation and PIK3CA amplification in non-small cell lung cancer (NSCLC),” *BMC Cancer*, vol. 11, p. 147, Apr. 2011.
- [230] Y. Liu, W. Gao, J. M. Siegfried, J. L. Weissfeld, J. D. Luketich, and P. Keohavong, “Promoter methylation of RASSF1A and DAPK and mutations of K-ras, p53, and EGFR in lung tumors from smokers and never-smokers,” *BMC Cancer*, vol. 7, p. 74, May 2007.
- [231] R. Díez-Pérez, J. Campo-Trapero, J. Cano-Sánchez, M. López-Durán, M. A. Gonzalez-Moles, J. Bascones-Ilundain, and A. Bascones-Martinez, “Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review),” *Oncol. Rep.*, vol. 25, no. 5, pp. 1203–1209, May 2011.
- [232] N. Ahuja, Q. Li, A. L. Mohan, S. B. Baylin, and J. P. Issa, “Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer,” *Cancer Res.*, vol. 58, no. 23, pp. 5489–5494, Dec. 1998.
- [233] T. Tsuchiya, G. Tamura, K. Sato, Y. Endoh, K. Sakata, Z. Jin, T. Motoyama, O. Usuba, W. Kimura, S. Nishizuka, K. T. Wilson, S. P. James, J. Yin, A. S. Fleisher, T. Zou, S. G. Silverberg, D. Kong, and S. J. Meltzer, “Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia,” *Oncogene*, vol. 19, no. 32, pp. 3642–3646, Jul. 2000.
- [234] K. So, G. Tamura, T. Honda, N. Homma, T. Waki, N. Togawa, S. Nishizuka, and T. Motoyama, “Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia,” *Cancer Sci.*, vol. 97, no. 11, pp. 1155–1158, Nov. 2006.
- [235] T. Waki, G. Tamura, M. Sato, and T. Motoyama, “Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples,” *Oncogene*, vol. 22, no. 26, pp. 4128–4133, Jun. 2003.
- [236] F. Coppedè, F. Migheli, A. Lopomo, A. Failli, A. Legitimo, R. Consolini, G. Fontanini, E. Sensi, A. Servadio, M. Seccia, G. Zocco, M. Chiarugi, R. Spisni, and L. Migliore, “Gene promoter methylation in colorectal cancer and healthy adjacent mucosa specimens: correlation with physiological and pathological characteristics, and with biomarkers of one-carbon metabolism,” *Epigenetics*, vol. 9, no. 4, pp. 621–633, Apr. 2014.
- [237] N. Lopatina, J. F. Haskell, L. G. Andrews, J. C. Poole, S. Saldanha, and T. Tollefsbol, “Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in

- aging and immortalized fibroblasts,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 84, no. 2, pp. 324–334, Jan. 2002.
- [238] M. Brandeis, D. Frank, I. Keshet, Z. Siegfried, M. Mendelsohn, A. Nemes, V. Temper, A. Razin, and H. Cedar, “Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation,” *Nature*, vol. 371, no. 6496, pp. 435–438, Sep. 1994.
- [239] D. Sinnett, C. Richer, J. M. Deragon, and D. Labuda, “Alu RNA secondary structure consists of two independent 7 SL RNA-like folding units,” *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 14, pp. 8675–8678, May 1991.
- [240] P. A. Yates, R. W. Burman, P. Mummaneni, S. Krussel, and M. S. Turker, “Tandem B1 elements located in a mouse methylation center provide a target for de novo DNA methylation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 51, pp. 36357–36361, Dec. 1999.
- [241] B. Zhang, W. Zhu, P. Yang, T. Liu, M. Jiang, Z.-N. He, S.-X. Zhang, W.-Q. Chen, and W. Chen, “Cigarette smoking and p16INK4 α gene promoter hypermethylation in non-small cell lung carcinoma patients: a meta-analysis,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 12, p. e28882, Dec. 2011.
- [242] X.-M. Wu, Y. Chen, Y. Shao, X.-L. Zhou, and W.-R. Tang, “Association between cigarette smoking and RASSF1A gene promoter hypermethylation in lung cancer patients: a meta-analysis,” *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 15, no. 19, pp. 8451–8454, Jun. 2014.
- [243] S. A. Belinsky, K. J. Nikula, S. B. Baylin, and J. P. Issa, “Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 93, no. 9, pp. 4045–4050, Apr. 1996.
- [244] I. Rhee, K. W. Jair, R. W. Yen, C. Lengauer, J. G. Herman, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, S. B. Baylin, and K. E. Schuebel, “CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1,” *Nature*, vol. 404, no. 6781, pp. 1003–1007, Apr. 2000.
- [245] R.-K. Lin, Y.-S. Hsieh, P. Lin, H.-S. Hsu, C.-Y. Chen, Y.-A. Tang, C.-F. Lee, and Y.-C. Wang, “The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients,” *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 2, pp. 521–532, Feb. 2010.
- [246] M. A. van der Drift, G.-J. van der Wilt, F. B. J. M. Thunnissen, and J. P. Janssen, “A prospective study of the timing and cost-effectiveness of bronchial washing during bronchoscopy for pulmonary malignant tumors,” *Chest*, vol. 128, no. 1, pp. 394–400, Jul. 2005.
- [247] F. J. F. Herth, R. Eberhardt, and A. Ernst, “The future of bronchoscopy in diagnosing, staging and treatment of lung cancer,” *Respiration*, vol. 73, no. 4, pp. 399–409, 2006.
- [248] D. P. Slaughter, H. W. Southwick, and W. Smejkal, “Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin,” *Cancer*, vol. 6, no. 5, pp. 963–968, Sep. 1953.
- [249] O. Auerbach, A. P. Stout, E. C. Hammond, and L. Garfinkel, “Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 265, pp. 253–267, Aug. 1961.
- [250] K. Steiling, J. Ryan, J. S. Brody, and A. Spira, “The field of tissue injury in the lung and airway,” *Cancer Prev. Res. (Phila.)*, vol. 1, no. 6, pp. 396–403, Nov. 2008.
- [251] M. Esteller, A. Sparks, M. Toyota, M. Sanchez-Cespedes, G. Capella, M. A. Peinado, S. Gonzalez, G. Tarafa, D. Sidransky, S. J. Meltzer, S. B. Baylin, and J. G. Herman, “Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer,” *Cancer Res.*, vol. 60, no. 16, pp. 4366–4371, Aug. 2000.
- [252] K. Kawakami, J. Brabender, R. V. Lord, S. Groshen, B. D. Greenwald, M. J. Krasna, J. Yin, A. S. Fleisher, J. M. Abraham, D. G. Beer, D. Sidransky, H. T. Huss, T. R. Demeester, C. Eads, P. W. Laird, D. H. Ilson, D. P. Kelsen, D. Harpole, M. B. Moore, K. D. Danenberg, P. V. Danenberg, and S. J. Meltzer, “Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 92, no. 22, pp. 1805–1811, Nov. 2000.
- [253] T. D. Silva, V. M. Vidigal, A. V. Felipe, J. M. DE Lima, R. A. Neto, S. S. Saad, and N. M. Forones, “DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer,” *Oncol Lett*, vol. 6, no. 6, pp. 1687–1692, Dec. 2013.
- [254] T. Lecomte, N. Ceze, E. Dorval, and P. Laurent-Puig, “Circulating free tumor DNA and colorectal cancer,” *Gastroenterol. Clin. Biol.*, vol. 34, no. 12, pp. 662–681, Dec. 2010.
- [255] P. Ilse, S. Biesterfeld, N. Pomjanski, C. Wrobel, and M. Schramm, “Analysis of SHOX2 methylation as an aid to cytology in lung cancer diagnosis,” *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 11, no. 5, pp. 251–258, Oct. 2014.

- [256] A. J. Hubers, P. Brinkman, R. J. Boksem, R. J. Rhodius, B. I. Witte, A. H. Zwinderman, D. A. M. Heideman, S. Duin, R. Koning, R. D. M. Steenbergen, P. J. F. Snijders, E. F. Smit, P. J. Sterk, and E. Thunnissen, "Combined sputum hypermethylation and eNose analysis for lung cancer diagnosis," *J. Clin. Pathol.*, vol. 67, no. 8, pp. 707–711, Aug. 2014.

8. Anhang

8.1 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung maligner Lungentumoren nach UICC

Die folgenden Angaben stammen aus: L. Sobin, M. Gospodarowicz, and C. Wittekind, "Lung and Pleural Tumours," in *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th ed., Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2009, pp. 136–146.

T/M	N0	N1	N2	N3
T1a (< 2 cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1b (> 2 – 3 cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2a (> 3 – 5 cm)	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2b (> 5 – 7 cm)	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1a	IV	IV	IV	IV
M1b	IV	IV	IV	IV

Tabelle 8.1: Stadieneinteilung (*staging*) maligner Lungentumoren nach UICC

Erläuterungen zu Tabelle 8.1 (TNM-Klassifikation):

T – Primärtumor

- TX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden *oder* Tumor wurde anhand von malignen Zellen im Sputum oder Bronchialaspiraten nachgewiesen, jedoch nicht durch eine Bildgebung oder Bronchoskopie visualisiert.
- T0: Kein Nachweis eines Primärtumors.
- T1: Primärtumor kleiner als 3 cm in der größten Ausdehnung, von Lungengewebe oder Pleura umgeben, ohne Nachweis einer Invasion proximaler als der Lappenbronchus
T1a: Primärtumor kleiner als 2 cm in der größten Ausdehnung^a
T1b: Primärtumor größer als 2 cm aber nicht mehr als 3 cm in der größten Ausdehnung
- T2: Primärtumor größer als 3 cm aber nicht mehr als 7 cm in der größten Ausdehnung *oder* Primärtumor mit mindestens einer der folgenden Eigenschaften^b:
- Bezieht einen Hauptbronchus mit mehr als 2 cm Abstand zur Carina mit ein
 - Infiltriert die viscerale Pleura
 - Ist mit einer Atelektase oder obstruktiver Pneumonie assoziiert, welche sich auf hiläre Region ausdehnen jedoch nicht die ganze Lunge betreffen
- T2a: Primärtumor größer als 3 cm aber nicht mehr als 5 cm in der größten Ausdehnung
T2b: Primärtumor größer als 5 cm aber nicht mehr als 7 cm in der größten Ausdehnung
- T3: Primärtumor größer als 7 cm in der größten Ausdehnung *oder* Primärtumor mit mindestens einer der folgenden Eigenschaften:
- Infiltration von Brustwand, Diaphragma, N. phrenicus, Pleura mediastinalis oder parietalem Pericard
 - Bezieht einen Hauptbronchus mit weniger als 2 cm Abstand zur Carina^a mit ein, jedoch nicht die Carina selbst
 - Ist mit einer Atelektase oder obstruktiver Pneumonie assoziiert, welche die ganze Lunge betreffen
 - Absiedlung(en) des Tumors im selben Lobus der Lunge

T4: Tumor jeder Größe der mindestens einer der folgenden Strukturen infiltriert: Mediastinum, Herz, große Thoraxgefäße, Trachea, Ösophagus, N. laryngeus recurrens, Wirbelsäule, Carina; sowie Tumoren jeder Größe, die Absiedlung(en) in mindestens einem anderen ipsilateralen Lobus der Lunge aufweisen.

N – Regionale Lymphknoten

N0: Kein Nachweis einer regionalen Lymphknotenmetastase.

N1: Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten sowie intrapulmonalen Lymphknoten.

N2: Metastasen in ipsilateralen mediastinalen oder subcarinalen Lymphknoten.

N3: Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsilateralen oder kontralateralen skalenären oder supraclavikulären Lymphknoten.

M – Fernmetastasen

M0: Kein Nachweis von Fernmetastasen.

M1: Fernmetastasen

M1a: Kontralaterale Absiedlung(en) des Tumors, pleurale Absiedlung(en) oder maligne Pleura- oder Perikardergüsse.

M1b: Fernmetastasen

^a Der seltene oberflächlich spreitende Tumor jeder Größe, dessen invasive Komponente auf die Bronchuswand beschränkt ist, wird auch als T1a klassifiziert.

^b T2 Tumoren mit diesen Eigenschaften werden als T2a klassifiziert, wenn sie kleiner als 5 cm, als T2b, wenn sie größer als 5 cm aber nicht mehr 7 cm in der größten Ausdehnung sind.

^c Die meisten Pleura- oder Perikardergüsse sind tumorbedingt. In seltenen Fällen sind auch mehrere mikroskopische Untersuchungen dieser Ergüsse negativ für maligne Zellen, der Erguss unblutig und ein Exsudat. Ist dies der Fall, und spricht auch das klinische Bild gegen einen tumorbedingten Erguss, sollte der Patient als M0 klassifiziert werden.

Eidesstattliche Versicherung

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

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift