

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie,
Arbeitsbereich pneumologische Onkologie und Transplantationsmedizin der

Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

[Campus Charité Mitte]

DISSERTATION

Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration an zellfreien
Desoxyribonukleinsäuren aus der Bronchiallavage bei Patienten
mit Lungenkarzinom und Patienten mit benignen
Lungenerkrankungen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tim Carstensen

aus Hamburg

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. C. Witt**
- 2. Prof. Dr. med. U. Keilholz**
- 3. Prof. Dr. M. Thomas**

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	- 6 -
1.1	<i>Epidemiologie, Pathologie und Diagnostik des Lungenkarzinoms.....</i>	<i>- 6 -</i>
1.2	<i>Grundlagen der Kanzerogenese des Lungenkarzinoms.....</i>	<i>- 7 -</i>
1.3	<i>Mikrosatellitensequenzen, Mikrosatellitenalterationen und deren Analyse.....</i>	<i>- 10 -</i>
1.3.1	Formen der Mikrosatellitenalteration und Nomenklatur.....	- 11 -
1.3.2	MIN und Tumoren.....	- 12 -
1.4	<i>Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration.....</i>	<i>- 14 -</i>
1.4.1	Lungenkarzinome und Mikrosatellitenalterationen.....	- 14 -
1.4.2	Mikrosatellitenalterationen bei Rauchern und ehemaligen Rauchern.....	- 16 -
1.4.3	Mikrosatellitenalterationen bei benignen Lungenerkrankungen.....	- 16 -
1.5	<i>Zirkulierende und extrazelluläre Desoxyribonukleinsäuren.....</i>	<i>- 17 -</i>
1.6	<i>Untersuchungen zur Frühdiagnostik des Lungenkarzinoms mit molekularen Tumormarkern in Sputum und Bronchiallavage.....</i>	<i>- 19 -</i>
2	Aufgabenstellung.....	- 22 -
3	Material und Methoden.....	- 24 -
3.1	<i>Patientenkollektiv und Materialakquise.....</i>	<i>- 24 -</i>
3.1.1	Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkarzinom.....	- 24 -
3.1.2	Vergleichsgruppe.....	- 26 -
3.1.3	Fiberoptische Bronchoskopie inklusive Bronchiallavage (BL).....	- 28 -
3.1.4	Blutentnahme.....	- 28 -
3.2	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	<i>- 29 -</i>
3.2.1	Extraktion der Desoxyribonukleinsäuren.....	- 29 -
3.2.2	Prinzip der Polymerasekettenreaktion.....	- 33 -

3.2.3	Quantifizierung von DNA anhand der quantitativen real-time PCR (rt-qPCR).....	34 -
3.2.4	Mikrosatellitenanalyse	39 -
3.3	Statistische Auswertung.....	45 -
4	Ergebnisse.....	47 -
4.1	Untersuchungsmaterial BL	47 -
4.2	Nachweis zellfreier DNA in der BL	47 -
4.3	Quantifizierung der extrahierten, zellfreien DNA aus der BL.....	48 -
4.3.1	Etablierung der Standardkurve.....	48 -
4.3.2	Konzentration der DNA in den einzelnen Patientenproben	50 -
4.3.3	Verwendete Mengen an DNA-Template im Rahmen der Mikrosatellitenanalyse	52 -
4.3.4	Vergleich der Extraktionsmethoden	52 -
4.3.5	Vergleich der Tumorpatienten und der Kontrollpatienten hinsichtlich des DNA-Gehaltes in der BL	53 -
4.4	Mikrosatellitenalterationen in der zellfreien DNA aus der BL von Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkarzinom.....	54 -
4.4.1	Darstellung der Mikrosatellitenanalyse und ausgewählter Mikrosatellitenalterationen in der zellfreien DNA aus der BL.....	56 -
4.4.2	Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in Bezug auf die histologischen Subgruppen..	60 -
4.4.3	Zusammenhang zwischen endoskopisch imponierendem Wachstumsmuster des Tumors und den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse.....	61 -
4.4.4	Zusammenhang zwischen zytologischen Befunden und den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse.....	62 -
4.5	Mikrosatellitenalterationen in der zellfreien DNA aus der BL von Patienten ohne Nachweis einer malignen Grunderkrankung.....	63 -
4.6	Vergleich der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in der zellfreien DNA aus der BL in den Tumor- und Kontrollpatienten.....	65 -
4.7	Vergleich der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in der zellfreien und zellulären DNA aus der BL in Tumor- und Kontrollpatienten.....	66 -

4.8	<i>Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in der zellfreien DNA aus der BL und Zigarettenkonsum</i>	- 68 -
4.9	<i>Fehlende Analysen und nichtinformativ Mikrosatellitenmarker</i>	- 69 -
5	Diskussion	- 71 -
5.1	<i>Nachweis zellfreier DNA in der bronchialen Lavage</i>	- 71 -
5.2	<i>Quantifizierung der extrahierten, zellfreien DNA aus der bronchialen Lavage</i>	- 72 -
5.2.1	Interpretation der Ergebnisse.....	- 72 -
5.2.2	Methodenkritik.....	- 73 -
5.3	<i>Mikrosatellitenanalyse</i>	- 74 -
5.3.1	Interpretation der Ergebnisse.....	- 74 -
5.3.2	Methodenkritik.....	- 81 -
5.4	<i>Fazit</i>	- 83 -
6	Zusammenfassung	- 84 -
7	Literaturverzeichnis	- 86 -
8	Anhang	- 92 -
8.1	<i>Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration - Tabellen</i>	- 92 -
8.2	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	- 101 -
9	Danksagung	- 104 -
10	Erklärung	- 105 -
11	Lebenslauf	- 106 -

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Pathologie und Diagnostik des Lungenkarzinoms

Epidemiologie

Jedes Jahr erfolgt in Deutschland in etwa 45.000 Patienten die Erstdiagnose eines Lungenkrebses (1). Männer und Frauen sind etwa im Verhältnis 3:1 betroffen. Mit einem prozentualen Anteil von 14,3 % respektive 6,4 % bei Männern und Frauen ist das Lungenkarzinom in beiden Geschlechtern das dritthäufigste unter den jährlich neu diagnostizierten Krebserkrankungen in Deutschland (1). Betrachtet man die krebsbedingte Mortalität, so liegt das Lungenkarzinom bei Männern mit 26,0 % an erster Stelle und bei Frauen mit 11,2 % auf dem dritten Rang (1). Lungenkrebspatienten besitzen in Deutschland eine 5-Jahres-Überlebensrate von 15-18 % (1). Weltweit und für beide Geschlechter betrachtet ist das Lungenkarzinom die häufigste krebsbedingte Todesursache (2).

Maßgeblichen Anteil an der hohen Mortalität des Lungenkarzinoms hat die Tatsache, dass Lungenkarzinome bei etwa 80 % der betroffenen Patienten in einem fortgeschrittenen und inoperablen Stadium diagnostiziert werden. Der Zeitpunkt der Diagnosestellung besitzt eine entscheidende Bedeutung. Bei Diagnose eines Lungenkarzinoms in dem Frühstadium IA beträgt die 5-Jahres-Überlebens-Rate immerhin 67 % (3). Dagegen haben Patienten mit einem hämatogen metastasierten Tumorleiden bei Erstdiagnose eine 2-Jahres-Überlebens-Rate von 5 % und eine 5-Jahres-Überlebens-Rate von 1 % (3).

In Deutschland sind bei den Männern etwa 90 % und bei den Frauen etwa 60 % der Lungenkarzinome auf die chronische Exposition mit Tabakrauch zurückzuführen (1). Daneben besitzen berufsbedingte Schadstoffexposition und/oder Strahlenbelastung, sowie die Luftverschmutzung eine kausale Bedeutung (4).

Pathologie

Das Lungenkarzinom wird histomorphologisch gemäß Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt in die Gruppen der Nichtkleinzelligen (NSCLC) und Kleinzelligen (SCLC) Lungenkarzinome. Die NSCLCs umfassen etwa 85 % der Lungenkarzinome (m: 87 %, w: 82 %), die der SCLCs entsprechend 15 %. Das NSCLC wird weiterhin unterteilt in (5):

- Adenokarzinome (AC) (m: 37 %, w: 47 %)
- Plattenepithelkarzinome (SCC) (m: 32 %, w: 25 %)
- Großzellige Karzinome (LCC) (m: 18 %, w: 10 %)

Darüber hinaus werden noch weitere histologische Subgruppen unterschieden, die bezüglich der Häufigkeit aber eine untergeordnete Rolle spielen. Zu den seltenen pulmonalen Tumoren gehört auch das adenoidzystische Karzinom, welches nur in 0,1 -0,2 % aller primären Lungentumoren diagnostiziert wird (6).

Diagnostik

Die flexible Bronchoskopie steht im Zentrum des diagnostischen Algorithmus bei Verdacht auf ein Lungenkarzinom. Sie ermöglicht die visuelle Inspektion der zentralen Atemwege, sowie die Gewinnung von zytologischem und histologischem Material.

Ist das suspekte Areal endoskopisch darstellbar, so erbringt die Bronchoskopie via Gewebebiopsie in etwa 90 % der Fälle eine sichere Diagnose (7). Für peripher respektive extrabronchial lokalisierte Tumoren wurden Techniken, wie die Gewinnung von Bronchiallavage (BL), der endobronchiale Bürstenabstrich, sowie die transbronchiale Katheteraspiration, Nadelaspiration und Lungenbiopsie entwickelt. Trotz dieser Verfahren variiert die diagnostische Sensitivität in diesen Fällen zwischen 27 % und 87 % in Abhängigkeit von der Größe und der Lokalisation des Tumors. Für die BL liegt die diagnostische Sensitivität im Falle eines nicht sichtbaren Tumors zwischen 36 % und 52 % (8).

In den Fällen, in denen eine radiologisch malignitätssuspekte Läsion via Bronchoskopie nicht eindeutig diagnostiziert werden kann, ist die transthorakale Punktion mit Lokalisation durch ein bildgebendes Verfahren die Methode der Wahl. Die Technik besitzt ein höheres Komplikationsrisiko (Pneumothorax, Blutung) und wird durch den Patienten in der Regel schlechter toleriert.

1.2 Grundlagen der Kanzerogenese des Lungenkarzinoms

Allgemeine Grundlagen der Kanzerogenese

Kriterien der Malignität

Maligne Tumorerkrankungen sind genetische Erkrankungen, deren Zellen die unten genannten, charakteristischen Eigenschaften aufweisen.

- (1) Klonale Proliferation
- (2) Autonomes Wachstum – das Wachstum der Tumorzellverbände entzieht sich den physiologischen Kontroll- und Regulationsmechanismen
- (3) Infiltration und Destruktion angrenzender Gewebe
- (4) Fähigkeit zur Metastasierung

Neoplastische Transformation und klonales Wachstum

Die Entstehung eines malignen Tumors ist auf eine einzelne Vorläuferzelle zurückzuführen (9). Die Umwandlung einer Zelle in eine Tumorzelle wird als **neoplastische Transformation** bezeichnet und beruht auf der Akkumulation genetischer und epigenetischer Alterationen, die die Regulation von Zellwachstum, -differenzierung und -tod beeinflussen.

Die nachfolgende Tumorzellpopulation besteht grundsätzlich aus Klonen der gemeinsamen Vorläuferzelle, erkennbar an identischen genetischen Alterationen. Die Klonalität respektive das **klonale Wachstum** ist ein Charakteristikum der Tumorzellen.

Im Verlauf der Tumorprogression akkumulieren in den Tumorzellen zusätzliche, genetische Alterationen. Entsprechend resultiert eine genetische Heterogenität mit einzelnen Tumorsubklonen. Frühzeitig im Rahmen der Karzinogenese akquirierte, genetische Alterationen sind daher in allen Tumorzellen nachweisbar, spätere hingegen nur in einzelnen Subklonen.

Genetische und epigenetische Alterationen

Die schrittweise Akkumulation der genetischen Alterationen ist namensgebend für den Prozess der Tumorentstehung, die Mehrschritt-Karzinogenese (engl. multistep carcinogenesis). Die Zahl der erforderlichen, genetischen Alterationen wurde anhand eines mathematischen Modells, unter Einbeziehung der altersabhängigen Inzidenz, sowie des stochastischen Auftretens somatischer Mutationen, auf 4–8 Ereignisse geschätzt (10). Die genetischen und epigenetischen Alterationen betreffen vorwiegend Gene, die regulatorische Funktionen hinsichtlich Zellwachstum, Zellproliferation und -differenzierung respektive Zelltod ausüben. Dabei werden nach Kumar et al. die nachfolgend genannten, vier Gruppen von Genen unterschieden (5).

- (1) die Wachstums-stimulierenden Protoonkogene
- (2) die Wachstums-inhibierenden Tumorsuppressorgene
- (3) die DNA-Reparatur-Gene
- (4) Gene, die den programmierten Zelltod (Apoptose) regulieren

Als **Protoonkogene** werden die Vorläufer zellulärer Onkogene bezeichnet. Es handelt sich um Gene, deren Funktion im Bereich der Stimulation von zellulären Wachstums- und Differenzierungsprozessen liegt. Das Onkogen entsteht aus dem Protoonkogen durch Aktivierung mittels genetischer Alterationen, darunter Punktmutationen, Amplifikationen oder Translokationen. **Tumorsuppressorgene** (TSG) sind Gene, die gemeinsam mit den Protoonkogenen ein Gleichgewicht in der Wachstumsregulation

der Zelle bilden. Ihnen wohnt eine inhibierende Funktion inne. Entsprechend ist der Verlust der Funktion des TSG kanzerogen („loss of function-Mutation“). Die Wirkungsweise ist rezessiv. Nach der Hypothese von Knudson et al. führt erst die Inaktivierung beider Allele durch hereditäre und/oder somatische Mutationen zu dem entscheidenden Funktionsverlust des jeweiligen TSG (11). Genetische Alterationen der **DNA-Reparatur-Gene** bewirken nicht direkt die Transformation einer Zelle, da sie keine regulatorische Funktion bezüglich Wachstum, Differenzierung oder Zelltod besitzen. Hingegen wird die Entstehung genetischer Alterationen in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und Apoptosegenen durch den Verlust der Reparaturfunktion begünstigt. Die **Apoptose oder auch der programmierte Zelltod** ist ein physiologischer, zelleigener Prozess, im Rahmen dessen sich eine Zelle aktiv zerstört. Initiierend können sowohl interne als auch externe Signale wirken, beispielsweise irreparable Alterationen des Zellgenoms. Die Umgehung der Apoptose ist dementsprechend eine wichtige Grundlage für die Akkumulation genetischer Alterationen innerhalb einer Zelle. Gene, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, können ihrem Verhalten nach den Protoonkogenen oder den Tumorsuppressorgenen zugeordnet werden.

Genetische Alterationen beschreiben Veränderungen in der primären DNA-Sequenz. Zu den genetischen Alterationen gehören die Punktmutation, sowie die Insertion, die Deletion, die Amplifikation und die Translokation genetischen Materials. Die epigenetischen Alterationen beschreiben Veränderungen in der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind. Der zentrale Mechanismus epigenetischer Alterationen besteht in der Genexpressionsregulation durch Methylierung im Bereich der Genpromotoren.

Kanzerogenese des Lungenkarzinoms – relevante Fakten

Das Lungenkarzinom gehört zu den nicht-hereditären Tumorerkrankungen. Die Entstehung ist maßgeblich auf die chronische Exposition mit inhalativen Karzinogenen zurückzuführen.

Inhalative Karzinogene generieren histomorphologische und genetische Veränderungen des respiratorischen Epithels. Drei histomorphologische Alterationen werden als präneoplastische Veränderungen angesehen, die Epitheldysplasien (drei Schweregrade), die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH) und die diffuse idiopathische pulmonale neuroendokrine Zellhyperplasie (DIPNECH) (12).

Die im Rahmen der molekularen Pathogenese der Lungenkarzinome relevanten, genetischen Alterationen betreffen besonders die Aktivierung von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, schließen aber auch Veränderungen der Telomerase-Aktivität (Zellalterung), der zelleigenen Regulationsmechanismen der Angiogenese und der Apoptose, sowie Mikrosatelliteninstabilitäten (MIN) mit ein (Zusammenfassung unter (13;14)). Die epigenetischen Alterationen beeinflussen die Expression

multipler Gene durch die Hypermethylierung der Genpromotoren. In den Tumorzellen der Lungenkarzinome zeigten sich die Protoonkogene c-MYC, K-RAS, EGFR, c-MET und c-KIT häufig aktiviert. Oftmals deletierte beziehungsweise inaktivierte Tumorsuppressorgene (TSGs) umfassen p53, RB1, p16(INK4a) und multiple Loci auf dem kurzen Arm von Chromosom 3.

Für das Verständnis der vorliegenden Arbeit sind insbesondere Kenntnisse über den Verlust genetischen Materials (Abschnitt 1.4.1 Allelotypisierung) und Mikrosatelliteninstabilitäten (Abschnitt 1.4.1 MIN) in den Tumorzellen des Lungenkarzinoms erforderlich.

1.3 Mikrosatellitensequenzen, Mikrosatellitenalterationen und deren Analyse

Das humane Genom besteht zu einem substantiellen Teil aus repetitiven DNA-Sequenzen. Im Hinblick auf den Aufbau dieser Sequenzen, werden zwei Gruppen unterschieden. Einerseits repetitive DNA-Abschnitte, die an verschiedenen Positionen des Genoms wiederholt vorkommen und andererseits DNA-Sequenzen, die aus sich tandemartig wiederholenden, Basenabschnitten bestehen. Letztere machen etwa 20 % eukaryotischer DNA aus und werden auch als Satelliten-DNA bezeichnet.

Anhand der Gesamtgröße und der Größe der repetitiven Einheit werden nach Koreth et al. Satelliten-, Minisatelliten- und Mikrosatellitensequenzen differenziert (Tabelle 1) (15). Es existieren mehrere Synonyme für diese Mikrosatelliten (Short tandem repeats (STR), simple sequence repeat (SSR), variable number of tandem repeat (VNTR)).

	Gesamtgröße	Größe der repetitiven Einheit
Satelliten	> 30 kb	5-100 bp
Minisatelliten	0,5 – 30 kb	15 – 70 bp
Mikrosatelliten	∅ 100 bp	2 – 6 bp

Tabelle 1 Unterteilung der sich tandemartige wiederholenden DNA-Sequenzen nach Koreth et al. (15)

Die Mikrosatellitensequenzen werden weiter nach der Größe der sich wiederholenden Einheit in Di-, Tri-, Tetra-, Penta- und Hexanukleotidwiederholungen eingeteilt.

Die exakte Zahl der existierenden Mikrosatellitensequenzen innerhalb des menschlichen Genoms ist unbekannt. Betrachtet man jedoch allein Dinukleotidrepeat-Mikrosatelliten geht man derzeit von etwa 140.000 Loci aus (16). Die überwiegende Zahl der Mikrosatelliten befindet sich in nichtkodierenden DNA-Abschnitten (17).

Mikrosatelliten besitzen ein hohes Maß an Variabilität in Bezug auf die Zahl der Wiederholungen, bezeichnet als Längenpolymorphismus. Die Variabilität drückt sich sowohl in einer interindividuellen als auch in einer intraindividuellen Variabilität der beiden Allele aus. Die Existenz zweier unterschiedlich großer Allele innerhalb eines Individuums wird als Heterozygotie bezeichnet. Bei vorhandener Heterozygotie wird der Mikrosatellitenmarker als informativ bezeichnet. Die Informativität eines Mikrosatelliten ist abhängig von der in der Bevölkerung existierenden Zahl der Allele und deren Verteilung. Die Vererbung der beiden Allele erfolgt kodominant nach der Mendel'schen Vererbungslehre (15).

Mikrosatellitensequenzen eignen sich infolge der hohen Informativität, des ubiquitären Vorkommens innerhalb des Genoms und der Analysefähigkeit mittels Polymerasekettenreaktion für verschiedenste Anwendungen, darunter das positionelle Klonieren, der genetische Fingerabdruck und genetische Bevölkerungs- und Stammbaumanalysen (15).

In der vorliegenden Arbeit dient die Mikrosatellitenanalyse dem Nachweis tumorassoziierter, genetischer Alterationen innerhalb zellfreier und zellulärer DNA aus der BL.

1.3.1 Formen der Mikrosatellitenalteration und Nomenklatur

Der Begriff Mikrosatellitenalteration umfasst zwei differente Alterationen der Mikrosatellitensequenz, den Verlust der Heterozygotie (LOH) und die Mikrosatelliteninstabilität (MIN).

Prinzip der Mikrosatellitenanalyse

Die Mikrosatellitenanalyse ist eine PCR-basierte Methode. Mikrosatelliten lassen sich in Kenntnis der umgebenden DNA-Sequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) gut amplifizieren und sind daher der molekularbiologischen Analyse zugänglich. Bei vorhandener Heterozygotie können die beiden Allele durch eine hochauflösende Polyacrylamidgelelektrophorese separiert und im Vergleich mit DNA aus normalen, somatischen Zellen in Bezug auf Allelverluste (Verlust der Heterozygotie) oder Längenpolymorphismen (Mikrosatelliteninstabilität) untersucht werden. Der Nachweis sowohl einer MIN als auch eines LOH setzt die Existenz einer Zellpopulation mit einer identischen Alteration voraus, charakteristisch für das klonale Wachstum.

Verlust der Heterozygotie (LOH)

Das Genom einer somatischen Zelle besitzt einen diploiden Chromosomensatz, bestehend aus einem paternalen und einem maternalen Chromosomensatz. Einander entsprechende Gene werden als Allele

bezeichnet. Die Existenz zweier, identischer Allelsequenzen wird als Reinerbigkeit oder Homozygotie, die zweier nicht identischer Allele wird als Mischerbigkeit oder Heterozygotie bezeichnet.

Ein Verlust der Heterozygotie (LOH) resultiert aus der Deletion eines der beiden Allele. Die LOH-Analyse wird auch als Allelotypisierung bezeichnet.

Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Synonyme MSI, MIN, RER (replication error+), USM (ubiquitous somatic mutations), MMP (microsatellite mutator phenotype)

Als Mikrosatelliteninstabilität wird die Längenalteration der Mikrosatellitensequenzen innerhalb eines Tumorgewebes im Vergleich mit konstitutioneller DNA bezeichnet. Die Längenalteration resultiert aus der Expansion oder Kontraktion der Mikrosatellitensequenz durch Änderung der Zahl der tandemartigen Wiederholungen.

Die Längenalteration sowohl eines als auch beider Allele ist prinzipiell möglich. Im Rahmen der vorangehend skizzierten Mikrosatellitenanalyse resultieren im Vergleich mit der konstitutionellen DNA zusätzliche Banden (engl. band shifts). Die Längenalteration des einzelnen Mikrosatelliten wird in der vorliegenden Arbeit als Bandenshift bezeichnet.

Eine präzise Definition des Begriffes Mikrosatelliteninstabilität existiert in der aktuellen Literatur ausschließlich für das hereditäre, nichtpolypöse, kolorektale Karzinom (18). Für andere Tumorentitäten besteht weder Einigkeit bezüglich der zu analysierenden Mikrosatellitenmarker, noch über die geforderte Zahl an alterierten Mikrosatellitenmarkern, in deren Abhängigkeit eine Mikrosatelliteninstabilität angenommen wird. In der vorliegenden Arbeit wird in Anlehnung an Arzimanoglu et al. (19) bereits ab dem Nachweis eines singulären Bandenshifts von einer Mikrosatelliteninstabilität gesprochen.

In der Literatur existieren die oben angegebenen Synonyme für die Mikrosatelliteninstabilität. Als Abkürzung wird in der vorliegenden Arbeit MIN verwendet.

1.3.2 MIN und Tumoren

Die MIN wurde erstmalig in den Tumoren des hereditären, nichtpolypösen Kolorektalkarzinoms (HNPCC) nachgewiesen.

Das hereditäre, nonpolypöse Kolorektalkarzinom (HNPCC) ist für 0,3–3,0 % der kolorektalen Karzinome verantwortlich und damit die häufigste Form unter den hereditären, kolorektalen Karzinomen (20). Die

genetische Grundlage des HNPCC-Syndrom gilt heute als weitestgehend identifiziert (Zusammenfassung in (21)).

Bei den betroffenen Patienten besteht ein genetischer Defekt des DNA Mismatch Reparatur Systems (MMR), der einerseits eine Längeninstabilität der Mikrosatellitensequenzen bewirkt und andererseits zu einer genetischen Instabilität auf der Ebene der Nukleotide führt. Man nimmt an, dass die genetische Instabilität indirekt durch eine erhöhte Rate an genetischen Alterationen an der Karzinogenese des HNPCC beteiligt ist. Im Bereich der vier Hauptgene des MMR MLH1 (~ 50%), MSH2 (~ 40%), MSH6 (~ 10%) und PMS2 (< 5%) konnten mittlerweile mehr als 400 verschiedene Mutationen identifiziert werden. Der Defekt wird in den HNPCC-Familien durch eine Keimbahnmutation vererbt.

Die Aufgabe des MMR, eines postreplikativen Reparaturmechanismus, besteht in der Korrektur von Einzelbasen-Misspaarungen und Insertions-Deletions-Schleifen, die im Rahmen der Replikation entstehen können. Die resultierende MIN in diesen Tumoren weist die folgenden Charakteristiken auf. Betroffen sind Mikrosatellitensequenzen im Bereich des gesamten Genoms in hoher Frequenz mit Betonung der Mono- und Dinukleotidwiederholungen. Die Mikrosatellitenanalyse zeigt das typische RER+ laddering (multiple, additive Banden) (19). Genotypisch zeigen diese Tumoren nur ein geringes Maß an Aneuploidie und LOHs kommen in diesen MIN-positiven Tumoren seltener vor (19).

Neben dem HNPCC konnten in einzelnen Endometrium-, Magen- und Ovarialkarzinomen gleichartige MIN nachgewiesen werden. Diese Tumoren werden dem **HNPCC-Spektrum** zugeordnet (21). In einer Vielzahl dieser Tumoren konnte gehäuft eine fehlende Expression einzelner MMR Proteine nachgewiesen werden, die oftmals auf Hypermethylierungen des Genpromotors basierte (21).

MIN konnten außerdem in **NON-HNPCC Tumoren** respektive **Tumoren ohne Bezug zum HNPCC-Spektrum** nachgewiesen werden (22;23), darunter auch Lungenkarzinome.

Die molekularpathogenetischen Grundlagen dieser Form der MIN sind bisher nicht bekannt. Weber et al. schätzten die Basisrate der Entstehung einzelner Längeninstabilitäten von Mikrosatellitenmarkern auf 0,1 % bezüglich der Dinukleotidmarker und auf 1 % - 3 % bezüglich der Tri- und Tetranukleotidmarker (24). Die Mikrosatellitenanalyse in verschiedenen Tumorentitäten (22;23) legte eine höhere Rate nahe, von Boland et al. auf 0,67 % für Dinukleotidwiederholungen und 3 % - 5 % für Tri- und Tetranukleotidwiederholungen geschätzt (18), prinzipiell hinweisend auf einen Zusammenhang mit der molekularen Pathogenese der betroffenen Tumoren.

Insbesondere für maligne Tumoren der Lunge, der Blase und des Kopf-Hals-Bereiches konnte ein abweichendes Muster der MIN gezeigt werden (18). In diesen Tumoren sind im Vergleich mit den Tumoren des HNPCC deutlich weniger Mikrosatellitenmarker alteriert und es imponieren singuläre, additive Banden im Gegensatz zu dem oben genannten „RER+ laddering“ (14). Des Weiteren handelt es

sich bei den betroffenen Mikrosatellitenmarkern vorwiegend um Tri- und Tetranukleotidmarker und nicht um Mono- und Dinukleotidmarker (18). Insbesondere Tetranukleotidwiederholungen der Sequenz (AAAG)_n schienen empfänglich für Längenalterationen bei bestimmten NON-HNPCC-Tumoren zu sein (25). Mutationen im Bereich der MMR Gene konnten nicht gefunden werden (13).

Um diese Form der MIN abzugrenzen, wurde der Begriff **EMAST** (elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats) geprägt (18).

1.4 Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration

1.4.1 Lungenkarzinome und Mikrosatellitenalterationen

Allelotypisierung

Anhand zytogenetischer Analysen und der Allelotypisierung des Zellgenoms von Tumorzelllinien, sowie von Zellen aus nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungenkarzinomen konnte eine Vielzahl an häufig hemizygot deletierten, chromosomalen Regionen identifiziert werden.

Die umfangreichste Allelotypisierung an Tumorzelllinien führten Girard et al. durch (26). Insgesamt wurden 14 SCLC-Zelllinien und 22 NSCLC-Zelllinien mit 399 Mikrosatellitenmarkern, die sich über das gesamte Genom verteilten, analysiert. Durchschnittlich ergab die Allelotypisierung in 34 % respektive 36 % der Marker einen LOH-Nachweis in den SCLC- und NSCLC-Tumorzelllinien. 22 chromosomale Regionen, die in mehr als 60 % der Tumoren einen LOH aufwiesen, konnten identifiziert werden, darunter 13 Regionen, die bevorzugt SCLCs und sieben Regionen, die bevorzugt NSCLCs betrafen. Die verbleibenden zwei chromosomalen Regionen betrafen SCLC und NSCLC gleichermaßen.

Die Allelotypisierung von Tumorgewebe wurde in multiplen Publikationen durchgeführt (Zusammenfassung der Publikationen in Tabelle 31 des Anhangs). Der Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Publikationen ist nur sehr eingeschränkt möglich. Sowohl die Zahl und Lokalisation der Mikrosatellitenmarker als auch die Methodik variierten. Zusammenfassend zeigten sich in den hier zitierten Arbeiten LOH-Nachweise in 13 % bis 87,5 % der jeweils untersuchten SCLC-Tumorgewebe. Analog ließen sich in den einzelnen Arbeiten an NSCLC-Tumorgewebe ein oder mehrere LOHs in 15 % bis 81,2 % der analysierten Tumoren nachweisen.

Zu den am Häufigsten hemizygot respektive homozygot deletierten Regionen gehören die chromosomalen Loci 3p14-23 und 9p21.

Deletionen im Bereich des kurzen Arms von Chromosom 3 gehören zu den häufigsten Ereignissen in der molekularen Pathogenese des Lungenkarzinoms. Erstmalig wurden diese durch zytogenetische

Analysen nachgewiesen und später durch CGH und Allelotypisierung bestätigt (27). Sie können in nahezu 100 % der SCLCs und etwa 75 % der NSCLCs nachgewiesen werden (13). Darüber hinaus gehören die 3p-Deletionen zu den frühesten Ereignissen im Rahmen der Mehrschritt-Karzinogenese (13). Hibi et al. konnten mit Hilfe des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus drei Regionen im Bereich 3p identifizieren, die besonders häufig an den Deletionen beteiligt waren, nämlich 3p25, 3p21.3 und 3p14 (28). Im Bereich 3p14 befindet sich das FHIT-Gen, ein Tumorsuppressorkandidatengen. Innerhalb des FHIT-Lokus befinden sich die Mikrosatellitenmarker D3S1243 und D3S1300, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Deletionen im Bereich des kurzen Armes von Chromosom 9 gehören gleichermaßen zu den häufigen Ereignissen in der molekularen Pathogenese des Lungenkarzinoms. Die kritische Region, die durch die von uns verwendeten Mikrosatellitenmarker D9S171 und D9S942 flankiert wird, beinhaltet das CDKN2-Gen, welches das p16-Protein kodiert und ein bedeutendes Tumorsuppressorgen darstellt. Kishimoto et al. konnten durch Untersuchungen an präneoplastischen Läsionen zeigen, dass LOHs im Bereich 9p frühzeitig im Rahmen der Mehrschritt-Karzinogenese des Lungenkarzinoms vorkommen (29).

Mikrosatelliteninstabilitäten (MIN)

Die Existenz von MIN bei Lungenkarzinomen wurde in einer Vielzahl von Publikationen untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 32 und 33 des Anhangs zusammengefasst.

Fasst man sämtliche Untersuchungen zusammen, erhält man ein oder mehrere MIN in 19,2 % der NSCLC-Tumoren und in 28,2 % der SCLC-Tumoren. Die Vergleichbarkeit dieser Arbeiten ist sehr eingeschränkt, da die Autoren auch hier jeweils unterschiedliche Markerpanels (Zahl und Lokalisation der Mikrosatellitenmarker) eingesetzt haben. Entsprechend ausgeprägt schwankten auch die prozentualen Anteile der Tumoren mit MIN-Nachweis.

In den 11 Arbeiten zur MIN bei den NSCLC-Tumoren imponierten MIN in 2,3 % bis 64 % der analysierten Tumoren. In den fünf Arbeiten bei den SCLC-Tumoren imponierten MIN in 0 % bis 51 % der Tumoren. In allen Publikationen wurden eine MIN innerhalb eines Tumorgewebes angenommen, wenn ein oder mehr Mikrosatellitenmarker eine MIN aufwiesen. Bei genauer Betrachtung zeigte sich aber, dass nur in 1-10 % der Fälle MIN in multiplen Loci nachweisbar sind (13).

Bezüglich des bereits in Abschnitt 1.3 beschriebenen EMAS-Phänomen existieren mehreren Arbeiten. Die erhöhte Frequenz von MIN in Tri- und Tetranukleotidwiederholungen im Gewebe von malignen Tumoren der Lunge, der Harnblase und des Kopf-Hals-Bereiches wurde erstmalig von Mao et al. beschrieben (22). Die umfassendsten Untersuchungen bezüglich EMAS bei Lungenkarzinomen führten Xu et al. durch (25). 61 Mikrosatellitenmarker, ausschließlich Tetranukleotidwiederholungen, wurden in 47 NSCLC-Tumorgeweben analysiert. Insgesamt konnte in 30 der 47 Tumoren (64 %) mindestens eine

MIN nachgewiesen werden. In den Untersuchungen imponierten 12 Mikrosatellitenmarker, in denen sich gehäuft MIN nachweisen ließen. Die 12 Marker zeigten in 24 der 47 NSCLCs (51 %) mindestens eine Längeninstabilität. 11 dieser Marker wiesen die Wiederholungssequenz AAAG(n) auf, so dass die Autoren auf eine Prädisposition speziell dieser Tetranukleotidmarker für MIN im Rahmen des EMAST-Phänomens schlossen. Untersuchungen hinsichtlich EMAST bei SCLC-Tumoren wurden bisher nicht durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikrosatellitenmarker ACTBP-2, L17686, UT5320 und D20S82 sind Tetranukleotidwiederholungen mit der Wiederholungssequenz AAAG(n). Sie wurden in den Arbeiten zu dem EMAST-Phänomen verwendet und daher in unsere Untersuchungen eingeschlossen.

1.4.2 Mikrosatellitenalterationen bei Rauchern und ehemaligen Rauchern

Zwei Arbeitsgruppen führten nahezu zeitgleich Allelotypisierungen an bronchoskopisch gewonnenem Bronchialepithel bei chronischen Rauchern ohne Nachweis eines malignen Tumorleidens durch. Die DNA wurde jeweils mittels Mikrodissektion direkt aus dem Epithelgewebe gewonnen.

Mao et al. führten die Allelotypisierung bei insgesamt 54 Langzeitrauchern und neun Nichtrauchern (NR) in den chromosomalen Regionen 3p14, 9p21 und 17p13 durch (30). Wistuba et al. untersuchten 42 Raucher und 21 NR in acht chromosomalen Regionen, darunter auch 3p und 9p (31). In beiden Arbeiten zeigten sich MA in hohen Frequenzen. Mao et al. fanden in 76 % der Patienten in mindestens einem der analysierten Loci mindestens eine MA. Wistuba et al. fanden sogar in 86 % der Patienten in ein oder mehreren Biopsien mindestens eine MA. Demgegenüber konnten Mao et al. bei den neun Nichtrauchern lediglich einen LOH nachweisen, während Wistuba et al. keine MA detektierten.

Die Ergebnisse der beiden Arbeiten inklusive der verwendeten Mikrosatellitenmarker sind in der Tabelle 34 im Anhang zusammengefasst.

1.4.3 Mikrosatellitenalterationen bei benignen Lungenerkrankungen

Die Existenz von Mikrosatellitenalterationen wurde auch in benignen Lungenerkrankungen untersucht, darunter **chronisch-obstruktive Bronchitis** (COPD) (32), **Asthma bronchiale** (33), **Sarkoidose** (34) und **idiopathische Lungenfibrose** (35). Als Untersuchungsgut wurde in diesen Studien zelluläre DNA aus induziertem Sputum verwendet. In allen Arbeiten wurden parallel Untersuchungen an induziertem Sputum von gesunden, nach Alter, Geschlecht und Rauchgewohnheiten abgestimmten Kontrollpatienten durchgeführt. In keiner der vier Publikationen fanden sich in diesen Patienten MA.

In dem induzierten Sputum von 59 Patienten mit schwergradiger COPD konnten Sifakas et al. in 14 Patienten (24 %) ein oder mehrere MIN nachweisen (32). Angaben zum Nachweis von Heterozygotieverlusten wurden keine gemacht. Parasakis et al. untersuchten 22 Patienten mit moderatem Asthma bronchiale und fanden in 16 der Patienten mindestens eine MA (LOH/MIN) (33). Vasillakis et al. untersuchten 30 Patienten mit pulmonaler Sarkoidose (34). In 14 der 30 Patienten mit pulmonaler Sarkoidose (47 %) zeigte sich mindestens eine MA (MIN resp. LOH). Die Gruppe um Vasillakis et al. führte eine weitere Mikrosatellitenanalyse in Analogie zu den vorangehend genannten bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose (IPF) durch (35). Es wurden 26 Patienten mit IPF. 50 % der IPF-Patienten zeigten ein oder mehrere MA.

Die Ergebnisse der vier Publikationen inklusive der verwendeten Mikrosatellitenmarker sind in der Tabelle 35 im Anhang zusammengefasst.

1.5 Zirkulierende und extrazelluläre Desoxyribonukleinsäuren

Sowohl im Plasma respektive Serum als auch in einer Vielzahl anderer Körperflüssigkeiten konnten in der Vergangenheit extrazelluläre Nukleinsäuren nachgewiesen werden (Zusammenfassung in (17)). Ursprung, Mechanismus der Freisetzung und Bedeutung sind noch weitestgehend unklar, obgleich der erstmalige Nachweis bereits 1948 durch Mandel und Metais erfolgte (36). Auch die Frage, ob es sich bei den zellfreien Nukleinsäuren im Plasma/Serum im Vergleich mit zellfreien Nukleinsäuren in anderen Körperflüssigkeiten um Nukleinsäuren mit ähnlichem Freisetzungsmechanismus und ähnlichen Eigenschaften handelt, ist bisher noch unklar. Fleischhacker et al. empfahlen die Verwendung des Begriffes zirkulierende Nukleinsäuren (CNA) für extrazelluläre DNA in zirkulierenden Flüssigkeiten, wie Plasma/Serum oder der Lymphe, wohingegen die Nukleinsäuren nicht zirkulierender Flüssigkeiten, wie beispielsweise Liquor, Aszites, Urin, Sputum oder BL als zellfreie oder extrazelluläre Nukleinsäuren bezeichnet werden sollten (17).

Die umfassendsten Untersuchungen erfolgten an zirkulierenden Nukleinsäuren (CNA) aus dem Plasma und Serum. Insbesondere interessant an den CNA ist die Tatsache, dass sie potentiell aus dem gesamten Körper stammen und entsprechende Informationen beinhalten können, sowie mittels einer einfachen, durch den Patienten gut tolerablen Blutentnahme zu akquirieren sind.

Erste Hinweise auf einen anteiligen Ursprung der CNA aus malignen Zellen bei Tumorpatienten ergaben die Untersuchungen von Leon et al. (37), welche höhere DNA-Konzentrationen bei Tumorpatienten im Vergleich mit tumorfreien Probanden fanden. Stroun et al. konnten eine reduzierte Stabilität der DNA-Einzelstränge zeigen, ein Charakteristikum der Tumor-DNA (38). Sorenson et al. und Vasioukhin und Kollegen beschrieben erstmalig tumorassoziierte RAS-Mutationen im Plasma von Patienten mit

maligner Grunderkrankung (39;40). Andere tumorassoziierte, genetische Alterationen in verschiedenen Tumorentitäten folgten, so dass die anteilige Existenz von Tumor-DNA innerhalb der zirkulierenden Nukleinsäuren aus dem Plasma/Serum bei Tumorpatienten als bewiesen gilt (Zusammenfassung in (17)). Jahr et al. unternahm den Versuch den Anteil an Tumor-DNA unter den CNA durch eine quantitative, methylierungsspezifische PCR im Bereich der Promotorregion des CDKN2A-Gens zu quantifizieren. Der Anteil an Tumor-DNA variierte stark und betrug zwischen 3% und 93 % der CNA.

Bezüglich der Freisetzung werden drei mögliche Mechanismen diskutiert, Apoptose, Nekrose oder eine aktive Freisetzung der DNA aus der Zelle (Zusammenfassung der möglichen Mechanismen und der befürwortenden Argumente unter (17)).

Ebenso wie für Patienten mit anderen Tumorerkrankungen konnten auch für Patienten mit Lungenkarzinomen erhöhte DNA-Konzentrationen im Plasma/Serum detektiert werden, wenngleich die DNA-Konzentrationen sehr schwankten. Bei den Tumorpatienten wurden 3.7 ng/ml bis 594 ng/ml gefunden, bei den Kontrollpatienten 1.8 ng/ml bis 78 ng/ml (Zusammenfassung in (41)). Im Vergleich mit einer Kontrollgruppe konnten Sozzi et al. erhöhte DNA-Konzentrationen für NSCLC-Patienten mit operablen Frühstadien (42;43), Sirena et al. für Patienten mit fortgeschrittenen NSCLCs (44) und Chen et al. für Patienten mit SCLCs (45) zeigen.

Die Nachweisbarkeit von tumorspezifischen, genetischen und epigenetischen Veränderungen wurde in einer Vielzahl von Publikationen berichtet. Im Tumor nachweisbare, (epi-) genetische Alterationen konnten in 40 – 90 % der Fälle auch in der zirkulierenden DNA nachgewiesen werden (41). Beispielhaft seien die Untersuchungen von An et al. (p16-Methylierungen, (46)), Andriani et al. (p53-Mutationen/3p Deletionen/FHIT-Inaktivierungen, (47)) und Usadel et al. (APC-Methylierung, (48)) genannt.

MIN und LOH konnten ebenfalls in der zirkulierenden DNA aus Plasma/Serum nachgewiesen werden. Zusammenfassend ließen sich MIN und LOHs, die im Tumorgewebe identifiziert wurden, in 48 % – 94 % der Patienten auch im Plasma/Serum wieder finden. (41).

Zellfreie DNA aus Sputum bei Patienten mit Lungenkarzinomen wurde bisher ausschließlich durch die Arbeitsgruppe von Van der Drift isoliert (49). In ihren Untersuchungen an dem Sputum von 28 Lungenkarzinompatienten und 68 Kontrollpatienten konnten sie nachweisen, dass die DNA-Konzentration abhängig von dem Grad an Inflammation, nicht aber von der Existenz eines Tumorleidens abhängig ist. Als Hinweis auf die Existenz tumorassoziiertes DNA konnten Hypermethylierungen im Bereich des Tumorsuppressorgens RASSF1A nachgewiesen werden.

Zellfreie DNA aus der BL wurde bisher ausschließlich durch unsere Arbeitsgruppe isoliert und analysiert.

1.6 Untersuchungen zur Frühdiagnostik des Lungenkarzinoms mit molekularen Tumormarkern in Sputum und Bronchiallavage

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Frühdiagnostik des Lungenkarzinoms mit molekularen Tumormarkern in Sputum und BL beschränkten sich bisher weitgehend auf die DNA, die aus Sputum- und BL-Zellen gewonnen werden kann. Einzig van der Drift et al. untersuchten zellfreie DNA aus induziertem Sputum (49).

Molekulare Tumormarker - Sputum

Verschiedene, tumorassoziierte, genetische Alterationen wurden in ihrer Eignung als molekulare Tumormarker in der zellulären DNA aus dem Sputum analysiert, darunter K-ras-Mutationen, Hypermethylierungen von Genpromotoren, p53-Mutationen und MA.

In drei verschiedenen Studien erfolgte die simultane Untersuchung von K-ras-Mutationen im Tumorgewebe von Adenokarzinomen respektive im Sputum der Patienten (50-52). Mao und Somers et al. gelang der Nachweis identischer K-ras-Mutation in Sputum und Tumorgewebe in 80% respektive 45 % (50;51). Dabei konnten die Mutationen einen Monat bis vier Jahre vor der Diagnosestellung in den bereits vorher akquirierten Sputumproben identifiziert werden. In beiden Arbeiten zeigten sich im Sputum ausschließlich K-ras-Mutationen, die auch im Tumorgewebe existierten. Analoge Untersuchungen führten Zhang et al. in Plattenepithelkarzinomen durch (52).

Die Hypermethylierung eines Genpromotors ist ein Mechanismus der zur Inaktivierung des zugehörigen Gens führt, beispielsweise also zur Inaktivierung eines TSGs. In multiplen Studien wurde die Detektion dieser Hypermethylierungen im Bereich der Promotoren von TSGs auch in Sputumproben untersucht. Zwischen 55 % und 100 % der Sputumproben von Lungenkarzinom-Patienten wiesen diesbezüglich Positivität auf, in den tumorfreien Kontrollpatienten variierten die positiven Befunde zwischen 3 % und 35 % (53). Sensitivität und Spezifität sind u. a. abhängig von den untersuchten Genen. Vielversprechende Ergebnisse ergaben sich bei Untersuchungen des p16INK4 α -Genpromotors respektive Kombinationen mehrerer Genpromotoren.

Kersting et al. untersuchten als exfoliativ bezeichnetes Material (Sputum, bronchiale Lavage, bronchiale Bürstenzytologie) von 51 Patienten mit Nachweis eines Lungenkarzinoms, sowie von 25 chronischen Rauchern auf die Existenz von p53-Mutationen. In beiden Patientengruppen (7/51 vs. 3/25) konnten diese nachgewiesen werden, ein statistisch signifikanter Unterschied bestand allerdings nicht. Darüber hinaus ließen sich 60 % der p53-Mutationen nicht im korrespondierenden Tumorgewebe nachweisen. Dementsprechend zweifelten die Autoren daran, dass die p53-Mutationen auf den Tumor zurückzuführen sind, zumal Franklin et al. ebenfalls diese Mutationen bei tumorfreien, chronischen Rauchern detektieren konnten (54).

In Anbetracht des geringen Anteils an tumoröser DNA im Sputum führten nur zwei Arbeitsgruppen die **Mikrosatellitenanalyse** im Sputum durch. Miozzo et al. zeigten in fünf Patienten Mikrosatellitenalterationen in Tumorgewebe respektive Bronchialschleimhaut (55). In drei der fünf Patienten konnte die identische Alteration auch im Sputum detektiert werden. In den beiden verbleibenden Patienten gelang die Mikrosatellitenanalyse aufgrund geringer Materialmengen nicht.

Molekulare Tumormarker – Bronchiallavage

Auch in der zellulären DNA aus der BL wurden verschiedene genetische und epigenetische Alterationen in ihrer Eignung als molekulare Tumormarker untersucht. Simultane Analysen im Tumorgewebe respektive in der zellulären DNA erfolgten bezüglich K-ras-Mutationen, p53-Mutationen, Hypermethylierungen der p16-Promotorregion, Telomerase-Aktivität und MA (Zusammenfassung in (56)).

MA wurden durch vier Arbeitsgruppen in der BL untersucht. Ahrendt et al. führten simultane Untersuchungen an Tumorgewebe und BL von 50 Patienten mit resezierbarem NSCLC durch (57). Ihre Untersuchungen schlossen neben den MA auch p53-Mutationen, K-ras-Mutationen und p16-Methylierungen mit ein. Die Kombination der vier verschiedenen, molekularen Assays ergab eine Sensitivität von 53 %. Eine Kontrollgruppe wurde nicht untersucht. Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse beinhalteten ausschließlich MIN, Aussagen über den Nachweis von LOHs wurden nicht gemacht. Von den 23 Patienten, deren Primärtumor ein oder mehrere MIN aufwies, ließen sich allerdings nur in 14 % identische MIN in der BL nachweisen.

Field et al. untersuchten die zelluläre DNA aus der BL von 90 Patienten mit Verdacht auf ein Lungenkarzinom (58). In 15 der 43 der Patienten (35 %), bei denen sich die Diagnose bestätigte, gelang der Nachweis von ein oder mehreren MA. Bei den 47 tumorfreien Patienten fanden sich MA in 11 von 47 Patienten (23 %).

Powell et al. schlossen in ihre Untersuchungen 55 Patienten ein, die eine diagnostische Bronchoskopie erhielten, darunter 38 Patienten mit einem Lungenkarzinom (59). Sie fanden unter Verwendung von 22 Mikrosatellitenmarkern in 79 % der Tumorpatienten, aber auch in 59 % der tumorfreien Patienten Heterozygotieverluste in mindestens einem Mikrosatellitenmarker. Die Autoren unternahmen den Versuch, durch die Verwendung eines Score-Systems, dem LOH-Score, die Zahl der gefundenen Alterationen bezogen auf die Gesamtmenge der verwendeten, informativen Mikrosatellitenmarker (FAL) und den prozentualen Anteil der von dem jeweiligen LOH betroffenen Zellen in der Probe mit einzuschließen. Letzteres konnte durch die Verwendung der fluoreszenzbasierten Detektionsmethode erreicht werden. Für einen LOH-Score > 10 zeigten die Untersuchungen eine Sensitivität von 58 % bei einer 100-prozentigen Spezifität im Hinblick auf die Differenzierung zwischen den beiden Kollektiven.

Liloglou et al. führten eine Mikrosatellitenanalyse an 46 Patienten mit Nachweis eines Lungenkarzinoms und an 34 tumorfreien Patienten durch (60). Bei Verwendung der acht Mikrosatellitenmarker konnten sie in 86,9 % der Tumorpatienten mindestens eine MA nachweisen, allerdings auch in 76,5 % der tumorfreien Patienten. Es zeigte sich, dass die Marker hinsichtlich der Differenzierung der beiden Kollektive sehr unterschiedlich geeignet waren. Unter Verwendung von vier der acht Mikrosatellitenmarker (D3S1289, D3S1300, D13S171, D17S2179) konnte eine Sensitivität von 73,9 % bei einer Spezifität von immerhin 76,5 % erreichen. Die Autoren empfahlen die Verwendung des Begriffes Krebs-spezifische, genomische Instabilität (CSGI) für diejenigen Mikrosatellitenmarker, die besonders günstige Eigenschaften für die Frühdiagnostik aufwiesen.

Die Ergebnisse der vier Publikationen inklusive der verwendeten Mikrosatellitenmarker sind in der Tabelle 36 im Anhang zusammengefasst.

2 Aufgabenstellung

Die Bronchoskopie ist ein fester Bestandteil der Diagnostik bei Verdacht auf ein Lungenkarzinom. Ist der tumorsuspekte Befund bronchoskopisch darstellbar, wird in über 90 % der Fälle durch Biopsie eine Gewebediagnose erreicht (7), in allen anderen Fällen ist die Situation komplizierter. Neben den bronchoskopisch-bioptischen Verfahren erfolgt in der Regel eine Bronchiallavage mit nachfolgender zytologischer Analyse der zellulären Bestandteile. Die Bronchiallavage ist besonders bedeutsam, wenn die Biopsie nicht erfolgt oder nicht diagnostisch ist. Im Falle eines nicht sichtbaren Tumors erbringt sie jedoch nur in 36–52 % der Fälle eine zytologische Diagnose (8).

In der Fachliteratur herrscht prinzipiell Einigkeit darüber, dass die Tumorigenese auf einer schrittweisen Akkumulation von genetischen und epigenetischen Alterationen basiert. Diese genetischen Alterationen lassen sich als molekulare Tumormarker innerhalb verschiedener, klinischer Spezimina verwenden. Im Falle des Lungenkarzinoms erfolgten bisher Untersuchungen zu molekularen Tumormarkern in Nukleinsäure-Isolaten aus den Zellen des Sputums und der Bronchiallavage, sowie in zellfreien Nukleinsäuren im Plasma und Serum.

Zellfreie Nukleinsäuren in Plasma bzw. Serum konnten bereits 1948 nachgewiesen werden (36), Hinweise für die Existenz von Tumor-DNA gelang dagegen erstmalig 1989 Stroun und Kollegen (38). Mittlerweile gilt die anteilige Existenz von Tumor-DNA infolge der simultanen Detektion multipler, genetischer Alterationen in Tumor und zugehörigem Plasma/Serum als bewiesen. Zellfreie DNA wurde neben dem Plasma auch in anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen, u.a. dem Sputum (49), jedoch nicht in der BL.

Die Mikrosatellitenanalyse dient dem Nachweis von zwei unterschiedlichen, tumorassoziierten, genetischen Alterationen, dem Verlust der Heterozygotie (LOH) und der Mikrosatelliteninstabilität (MIN). Der Nachweis einer dieser Mikrosatellitenalterationen (MA) in einem klinischen Spezimen bedeutet die Existenz einer sich klonal vermehrenden Zellpopulation mit identischen, genetischen Alterationen, charakteristisch für maligne Zellen.

Die vorliegende Arbeit dient der Untersuchung der folgenden Fragen:

- (1) Ist in der bronchialen Lavage zellfreie DNA überhaupt und regelhaft nachweisbar?
- (2) Ist eine ausreichende Quantität an zellfreier DNA für eine molekularbiologische Diagnostik vorhanden?
- (3) Sind MA in der zellfreien DNA als Hinweis auf die Existenz von Tumor-DNA bei Patienten mit Lungenkarzinom nachweisbar?

- (4) Ist eine Differenzierung zwischen Tumor- und Kontrollpatienten durch die verwendeten Mikrosatellitenmarker möglich?
- (5) Wie stellen sich die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse im Vergleich zwischen zellfreier und zellulärer DNA dar?

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden in die Untersuchungen 59 Patienten eingeschlossen, darunter 30 Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkarzinom und 29 Patienten mit Indikation für eine bronchoskopische Untersuchung, jedoch ohne Nachweis einer malignen Grunderkrankung. Die Auswahl der Patienten erfolgte chronologisch fortlaufend. Es wurden nur Patienten mit definitiver Diagnose, d.h. mit einem histologisch gesicherten Lungenkarzinom respektive dessen Ausschluss, eingeschlossen.

Bei sämtlichen Patienten wurde eine ausführliche Anamnese erhoben. Besonders eingegangen wurde auf die Rauchgewohnheiten und die Tumoranamnese der Patienten. Es wurden weiterhin eine Röntgen-Thorax-Aufnahme, nicht älter als vier Wochen, Lungenfunktionswerte, nicht älter als 1 Woche und aktuelle Laborwerte (Blutbild, Gerinnung und Blutgruppe) gefordert. Lagen die Untersuchungsergebnisse nicht vor, wurden die fehlenden Untersuchungen vor Durchführung der Bronchoskopie ergänzt.

Alle Patienten erhielten eine ausführliche Aufklärung. Diese umfasste eine standardisierte Aufklärung für die Durchführung einer Bronchoskopie und darüber hinaus eine Aufklärung bezüglich unserer Studie und der für den Patienten relevanten Aspekte. Alle Teilnehmer erteilten im Anschluss schriftlich ihr Einverständnis über die Teilnahme an der Studie. Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission der Charité bewilligt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie hatten keinen Einfluss auf die Behandlung der Patienten, welche gemäß dem derzeitigen Behandlungsstandard erfolgte.

3.1.1 Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkarzinom

Unter den 30 Tumorpatienten befanden sich sechs Frauen und 24 Männer. Das Durchschnittsalter betrug 63 Jahre bei einer Standardabweichung von 7 Jahren. Bei sechs der Patienten wurde ein SCLC, bei 22 Patienten ein NSCLC und bei zwei Patienten ein adenoidzystisches Karzinom diagnostiziert. Wie bereits erwähnt, gehört das adenoidzystische Karzinom zu den seltenen primär pulmonalen Karzinomen, differenzierte Kenntnisse über die molekulargenetische Pathogenese des primär pulmonalen, adenoidzystischen Karzinoms sind in der Literatur bisher nicht vorhanden.

Lediglich ein NR ist unter den Patienten zu finden. Die 29 ehemals oder aktuell rauchenden Patienten weisen ein Rauchverhalten von durchschnittlich 46 Packungsjahren (py) auf. Ein Packungsjahr umfasst den täglichen Konsum von 20 Zigaretten über den Zeitraum eines Jahres.

In Tabelle 2 erfolgt die Auflistung der einzelnen Tumorpatienten und der relevanten, klinischen Charakteristiken.

Patient	Geschlecht	Alter	Raucherstatus [py]	Diagnose	Zytologie	Histologie	Stadium	Endoskopischer Befund
1	M	70	20	NSCLC	Negativ	PE	IA	S
2	M	70	75	NSCLC	Negativ	LCC	IIIB	S
3	M	67	50	NSCLC	Positiv	PE	IV	NS
4	W	68	15	NSCLC	Negativ	AC	IIIB	S
5	M	79	75	SCLC	Negativ	SCLC	k.A.	NS
6	M	70	20	NSCLC	Negativ	k.A.	k.A.	NS
7	M	59	20	NSCLC	Negativ	AC	IV	NS
8	W	66	60	NSCLC	Negativ	PE	IV	S
9	W	62	80	NSCLC	Negativ	k.A.	IIIA	S
10	M	76	40	NSCLC	Negativ	AC	IV	NS
11	M	69	30	NSCLC	Negativ	AC	IV	NS
12	M	76	30	NSCLC	Negativ	PE	IV	NS
13	W	70	k.A.	AzCa	Negativ	AzCa	IIIB	S
14	M	56	40	NSCLC	Negativ	PE	IIIA	S
15	M	73	40	NSCLC	Positiv	AC	IIIA	NS
16	M	51	50	SCLC	Positiv	SCLC	IV	S
17	W	74	50	NSCLC	Negativ	PE	IV	S
18	M	70	50	NSCLC	Negativ	k.A.	IV	S
19	M	66	40	NSCLC	Negativ	AC	IV	NS
20	M	63	40	NSCLC	Negativ	LCC	IIIB	NS
21	M	63	40	NSCLC	Negativ	AC	IV	S
22	M	65	80	AzCa	Negativ	AzCa	IV	S

Patient	Geschlecht	Alter	Raucherstatus [py]	Diagnose	Zytologie	Histologie	Stadium	Endoskopischer Befund
23	M	49	40	NSCLC	Negativ	AC	IIIA	NS
24	M	73	NR	NSCLC	Positiv	AC	IV	S
25	M	75	40	SCLC	Negativ	SCLC	IV	S
26	M	73	40	NSCLC	Negativ	PE	IIIA	NS
27	M	61	100	NSCLC	Positiv	PE	IIIA	S
28	M	64	60	SCLC	Positiv	SCLC	IV	S
29	W	62	40	SCLC	Positiv	SCLC	IV	S
30	M	71	40	SCLC	Negativ	SCLC	k.A.	S

Tabelle 2 Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkarzinom (AC = Adenokarzinom, PE = Plattenepithelkarzinom, AzCa = adenoidzystisches Karzinom, k.A. = keine Angabe, S = sichtbarer Tumor, NS = nicht sichtbarer Tumor)

3.1.2 Vergleichsgruppe

Die Vergleichsgruppe bestand aus 7 Frauen und 22 Männern. Das Durchschnittsalter lag bei 55 Jahren mit einer Standardabweichung von 14 Jahren. Neun Patienten waren Nichtraucher. Der Nikotinabusus der 20 Raucher betrug im Durchschnitt 24 Packungsjahre. Die Indikationen für die Durchführung einer Bronchoskopie umfassten die klassischen Indikationen, darunter die Abklärung einer pulmonalen Symptomatik (z.B. Husten, Hämoptysen) oder eines unklaren, bildgebenden Befundes, Materialgewinnung zur mikrobiologischen Diagnostik und Akquise einer bronchoalveolären Lavage bei Verdacht auf interstitielle Lungenerkrankungen oder Sarkoidose. Darüber hinaus wurden einige Patienten mit benigner Trachealstenose eingeschlossen, die eine bronchoskopische Erstdiagnostik oder Kontrolluntersuchung erhielten. Die definitive Diagnose, sowie weitere klinische Daten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Patient	Geschlecht	Alter	Raucherstatus [py]	Diagnose
31	m	59	20	Ausschluss Tumor
32	m	68	75	V.a. ILD

Patient	Geschlecht	Alter	Raucherstatus [py]	Diagnose
33	m	63	20	V.a. Sarkoidose
34	m	41	20	Ausschluss Tumor
35	m	33	15	Tuberkulose
36	m	69	25	Chronischer Husten
37	m	63	NR	Sarkoidose
38	m	62	8	Atypische Pneumonie
39	w	51	NR	Sarkoidose
40	w	33	10	Unklares Fieber
41	w	68	20	Bronchialzyste
42	m	50	30	Opportunistische Infektion (Aspergillus, ATM)
43	w	51	NR	ILD, ATM
44	w	59	20	ILD bei SS
45	m	62	44	Ausschluss Tumor
46	m	71	NR	Aspergillen, COPD
47	m	68	20	ILD
48	m	38	NR	Sarkoidose
49	w	75	NR	Purulente Tracheobronchitis
50	m	74	53	Ausschluss Tumor/TBC
51	m	79	26	Ausschluss TM, COPD
52	m	80	NR	Sarkoidose
53	w	49	28	Löfgren-Syndrom bei Sarkoidose
54	m	70	20	Benigne Trachealstenose
55	m	72	NR	Ausschluss Tumor
56	m	39	18	Benigne Trachealstenose

Patient	Geschlecht	Alter	Raucherstatus [py]	Diagnose
57	m	64	10	Chronischer Husten
58	m	30	6	Tracheale Papillomatose
59	m	68	NR	Ausschluss Tumor

Tabelle 3 Vergleichsgruppe

3.1.3 Fiberoptische Bronchoskopie inklusive Bronchiallavage (BL)

Die Bronchoskopie wurde in der Abteilung für Pneumologie des Universitätsklinikums Charité-Berlin, Campus Charité Mitte, durchgeführt.

Vor Untersuchungsbeginn erfolgte eine Prämedikation. Standardmäßig wurde nach Ausschluss von Kontraindikationen Midazolam i.v. (1-10 mg), Atropin i.v. (0,5 mg) und Dicodid s.c. (15 mg) verwendet. Bei Zeichen einer obstruktiven Ventilationsstörung wurde außerdem Solu-Decortin i.v. (100 mg) verabreicht. Die intravenös verabreichten Medikamente wurden über eine periphere Venenverweilkanüle appliziert.

Für die Bronchoskopie wurde der Zugang über den Mundraum gewählt. Es wurde ein flexibles Bronchoskop der Firma Pentax verwendet. Initial wurde der Oropharynx mit Lokalanästhetikum vorbehandelt. Die tieferen Atemwege wurden via Bronchoskop anästhesiert. Im Rahmen der Untersuchung wurde das gesamte Tracheobronchialsystem inspiziert. Bei allen Patienten wurde eine BL durchgeführt. Die Bronchiallavage beinhaltet Sekret aus dem Bereich der Trachea und der Hauptbronchien. Nach Aspiration des vorhandenen Sekrets wurde zusätzlich sterile, physiologische Kochsalzlösung eingebracht und möglichst komplett zurückgewonnen. Es wurden interindividuell variierende Mengen an Kochsalzlösung in der Größenordnung von 10 ml bis 20 ml appliziert. Das Material wurde sofort nach Abnahme bei +4°C gelagert.

3.1.4 Blutentnahme

Allen Patienten wurde vor der endoskopischen Untersuchung eine periphere Venenverweilkanüle angelegt. Es wurden pro Patient zwei Blutproben entnommen (1x EDTA-Röhrchen, 1x Serum-Röhrchen). Das entnommene Blut wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei +4°C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Extraktion der Desoxyribonukleinsäuren

DNA wurde aus Lymphozyten, sowie aus der zellfreien und zellulären Komponente der Bronchiallavage gemäß den nachfolgenden Protokollen isoliert. Die Separation der zellfreien und zellulären Komponente erfolgte durch eine Zentrifugation (10 min, RT, 350 x g, Zentrifuge Rotanta/S der Fa. Hettich). Die suffiziente Trennung wurde mikroskopisch in einzelnen Stichproben kontrolliert. Der Anteil der BL, der die zellfreie DNA enthält wird aufgrund der Separation durch Zentrifugation als Überstand bezeichnet. Jede DNA-Extraktion wurde anschließend mittels einer qualitativen PCR auf die Amplifizierbarkeit kontrolliert.

Extraktion der lymphozytären DNA

Die Extraktion lymphozytärer DNA erfolgte in zwei Schritten, der Gewinnung mononukleärer Blutzellen (Monozyten/Lymphozyten) aus der Blutprobe und der eigentlichen DNA-Isolation aus diesen Zellen.

Separation der mononukleären Blutzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation beruht auf der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Blutzellen. Ficoll Paque® besitzt eine höhere Dichte (1,077 g/l) als Lymphozyten und Monozyten und eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten. Bei Zentrifugation des Gemisches reichern sich die einzelnen Zellen gemäß ihrer Dichte in verschiedenen Schichten an.

Die Aufarbeitung der EDTA-Blutprobe begann mit einem Zentrifugationsschritt (10 min, 350 x g, Zentrifuge Rotanta/S der Fa. Hettich). Der Überstand der Probe, das Blutplasma, wurde mit einer Pasteurpipette aspiriert, die verbliebene Zellsuspension in 5,0 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation. Die Zellsuspension wurde behutsam auf eine 3,0 ml Ficoll-Paque-Lösung aufgeschichtet und zentrifugiert (30 min, 400 x g, RT, Zentrifuge Rotanta/S, Fa. Hettich). Die resultierende Schicht aus Lymphozyten und Monozyten wurde in eine Pasteurpipette aufgenommen, in ein neues Röhrchen überführt, mit NaCl 0,9% verdünnt und erneut zentrifugiert (8 min, RT und 200 x g, Zentrifuge Rotanta/S der Fa. Hettich). Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten, mononukleären Blutzellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Extraktion der DNA

Die Lymphozyten wurden einer Verdauung mit Proteinase K und dem Zellyse-Puffer nach Fritsch et al. unterzogen (61).

- (1) Aufnahme der Zellen in 500 µl der in Tabelle 4 dargestellten Proteinase K/Lysepuffer-Lösung
- (2) Inkubation unter Rotation bei 50°C über Nacht
- (3) Addition von 500 µl DEPC-Wasser

Zell-Lysepuffer nach Fritsch et al. (61)		
	Volumen	Endkonzentration
DEPC-aqua dest	420 µl	
NaCl _(aq) 5 M	10 µl	0,1 M NaCl
Tris 1 M, pH8	5 µl	0,01 M Tris, pH 8,0
EDTA 0,5 M	25 µl	25 mM EDTA
SDS 10%	25 µl	0,5% SDS
Proteolytisches Enzym		
Proteinase K (20mg/ml)	15 µl	600 µg/ml

Tabelle 4

Im Anschluss an den Zell- und Proteinverdau erfolgte die Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde in der Regel in drei Extraktionsschritten durchgeführt. Zu Beginn wurde mit reinem Phenol, dann mit Phenol-Chloroform-Isoamyl (25:24:1) und zuletzt mit Chloroform-Isoamyl (24:1) extrahiert. Es wurde auf pH 7,5-8,0 äquilibriertes Phenol verwendet. Üblicherweise war bereits nach dem zweiten Extraktionsschritt in der Interphase keine Proteinschicht mehr erkennbar, so dass zusätzliche Extraktionsschritte mit Phenol nicht mehr erforderlich waren. Die einzelnen Schritte wurden folgendermaßen durchgeführt.

- (1) Addition des jeweiligen organischen Lösungsmittelgemisches im Verhältnis 1:1
- (2) Inkubation für 40 Minuten bei Raumtemperatur unter Rotation
- (3) Zentrifugation (4°C, 5 min, 12.000 x g, Biofuge fresco der Fa. Heraeus)
- (4) Überführung der wässrigen Phase in ein neues Probenröhrchen

Die Ethanolpräzipitation wurde mit Natriumchlorid 5M und reinem Ethanol durchgeführt.

- (1) Addition von 0,1 Probenvolumina an Natriumchlorid 5M und 3,0 Probenvolumina an Ethanol 100%
- (2) Gewinnung hochmolekularer DNA und Überführung in neues Probenröhrchen
- (3) Präzipitation der verbleibenden DNA über Nacht bei -20°C
- (4) Waschen der beiden DNA-Isolate mit 1000 μl Ethanol 75 %
- (5) Aufnahme in 100 μl Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan-hydrochlorid-Lösung (10 mM)

Extraktion der DNA aus der Bronchiallavage (BL)

Initial erfolgte die Auftrennung in zelluläre und zellfreie Phase der BL. Für die Extraktion von DNA aus der zellfreien Phase wurden zwei alternative Methoden verwendet.

- Extraktion mit heißem Phenol und Isopropanol (hPIP-Extraktion)
- Extraktion mit dem QiaAMP® DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen (QiaAMP)

Separation von zellfreier und zellulärer Phase der BL

Die Separation erfolgte durch eine Zentrifugation (10 min, RT, 350 x g, Zentrifuge Rotanta/S der Fa. Hettich) in 50 ml Probenröhrchen. Der Überstand wurde mittels Pasteurpipetten überführt und in ein neues Probenröhrchen überführt. Das Volumen des Überstandes wurde dokumentiert. Für die DNA-Extraktion wurden Probenvolumina von 3,0 bis 6,0 Milliliter eingesetzt. Die vollständige Trennung zellulärer und zellfreier Bestandteile der BL wurde durch exemplarische, mikroskopische Untersuchungen kontrolliert.

DNA-Extraktion aus den Zellen der BL

Die DNA-Extraktion aus den Zellen der BL erfolgte analog zu der Extraktion der lymphozytären DNA. Die Methodik wurde bereits im Abschnitt 2.2.3. dargestellt.

DNA-Extraktion aus der zellfreien Phase der BL - Extraktion mit heißem Phenol und Isopropanol

Die Inkubation der zellfreien Phase der BL erfolgte umgehend nach der bronchoskopischen Untersuchung. Die Extraktionsmethode beinhaltet einen Extraktionsschritt mit heißem Phenol und zwei Präzipitationsschritte mit 5M NaCl/Isopropanol respektive Lösung D nach Chomczynski et al. (62).

Die zellfreie Phase der BL wurde 30 Minuten bei 65°C im Verhältnis 1:1 mit ebenfalls auf 65°C vorgewärmtem Phenol (pH 7,5-8,0) behandelt und in regelmäßigen Abständen behutsam gemischt. Dann wurde das Gemisch bei $+4^{\circ}\text{C}$ für 15 Minuten gekühlt und anschließend zentrifugiert (20 min, 4°C , 6000 x g, Varifuge RF, Fa. Heraeus Sepatech). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen.

Anschließend wurden 0,1 Probenvolumina NaCl 5M und 1,0 Probenvolumina Isopropanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei -80°C über Nacht gefällt und am Folgetag erneut zentrifugiert (30 min, $+4^{\circ}\text{C}$, 7000 x g, Sorvall RC 28s der Fa. Dupont mit Rotor F28/50). Der Überstand wurde verworfen, das verbleibende Salz/DNA-Gemisch in 500 μl Lösung D aufgenommen und in ein neues Probenröhrchen überführt. Es wurden 550 μl Isopropanol hinzugefügt und bei -80°C erneut über Nacht präzipitiert.

Am Folgetag wurde zentrifugiert (30 min, $+4^{\circ}\text{C}$, 12.000 x g, Biofuge fresco der Fa. Heraeus), der Überstand verworfen und das verbleibende Salz/DNA-Gemisch mit Ethanol 75% gewaschen und erneut zentrifugiert (20 min, $+4^{\circ}\text{C}$, 12.000 x g, Biofuge fresco der Fa. Heraeus). Die verbleibende DNA wurde in 30 μl Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid-Lösung (10 mM) aufgenommen und bei -80°C konserviert.

DNA-Extraktion aus der zellfreien Phase der BL - QiaAMP® DNA Blood Mini Kit

Die DNA-Extraktion mit dem QiaAMP® DNA Blood Mini Kit basiert auf der Passage des Zellysats durch eine Membran aus Silicagel, enthalten in einer Säule. Silicagel ist eine amorphe Kieselsäure, die besonders gute DNA-Bindungseigenschaften aufweist. Die verbleibenden Bestandteile der Probe passieren die Membran. Im Anschluss an die Probenapplikation erfolgen mehrere Waschschriffe der gebundenen DNA. Zuletzt erfolgt das Lösen der DNA von der Membran anhand des mitgelieferten Puffers. Die Ausführung der DNA-Extraktion erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellerprotokolls, mit Ausnahme der wenigen, nachfolgend genannten Modifikationen.

- (1) Aufarbeitung von insgesamt 1000 μl der BL pro QiaAMP Säule und Inkubation mit Proteinase K und Puffer AL bei 50°C für 60 Minuten (Vorteil: komplettere Zellyse, höhere DNA-Ausbeute)
- (2) Applikation der gesamten Probe mittels einer 10 ml Einmalspritze mit Luer-Lock-System (Probenvolumen 2,1 ml, positiver Druck durch Spritzenstempel) (Vorteil: einzeitige Applikation von 1000 μl)
- (3) dreimalige Wiederholung des zweiten Reinigungsschrittes (Puffer AW 2)

Die DNA wurde durch eine zweimalige Elution mit jeweils 75 μl des Puffers AE von der Silicagel-Membran gelöst.

Kontrolle der DNA-Extraktion

Die Kontrolle erfolgte mittels einer qualitativen PCR. Auf diesem Wege konnte die Existenz von DNA, sowie die erforderliche Reinheit für eine PCR-Amplifikation nachgewiesen werden. Als Zielsequenz wurde der Mikrosatellit D9S171 verwendet. Die Primersequenzen, die PCR-Bedingungen, sowie die Bestandteile des PCR-Ansatzes sind im Abschnitt Mikrosatellitenanalyse aufgeführt. Es wurde jeweils ein Mikroliter der jeweiligen DNA-Extraktionslösung eingesetzt.

Im Anschluss erfolgte eine Agarosegelelektrophorese (Endkonz.: 2%) in einer Minigelkammer. Die Darstellung der DNA erfolgte mittels Ethidiumbromid und UV-Licht. Als DNA-Marker wurde der pUC Mix Marker 8 eingesetzt (17 Fragmente, 19 - 1118 bp).

3.2.2 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung genau definierter DNA-Sequenzen *in vitro*. Die Erstbeschreibung der Methode erfolgte 1985 durch Saiki et al. (63).

Die Vervielfältigung läuft in einzelnen Zyklen ab, welche aus jeweils drei Schritten bestehen, der Denaturierung, dem Annealing und der Extension. Während der Denaturierung wird die DNA durch hohe Temperaturen in die beiden Einzelstränge aufgetrennt. Als nächster Schritt folgt bei einer niedrigeren Temperatur die Hybridisierung der Sequenz-spezifischen Primer mit dem DNA-Template, was als Annealing bezeichnet wird. Es wird für jeden der beiden Einzelstränge ein Oligonukleotid-Primer hinzugefügt. Die Primer dienen der DNA-Polymerase als Startsequenz. Beginnend an den Primern synthetisiert die DNA-Polymerase aus den vier Nukleotiden jeweils einen neuen komplementären Strang. Dabei gilt, dass der neue Strang nur in einer Richtung (5´-3´-Richtung) neu synthetisiert wird. Die Primer müssen so hergestellt werden, dass die jeweils neuen Einzelstränge sich überlappen. In den weiteren Zyklen werden dann nur noch die sich überlappenden Abschnitte vervielfältigt. Nach dem Annealing folgt ein weiterer Schritt, die Extension. Diese wird bei 72°C durchgeführt und dient der vollständigen Synthese bereits durch die DNA-Polymerase begonnener Abschnitte.

Durch diese Methode wird ein kurzer definierter Abschnitt der DNA exponentiell vervielfältigt. Die Zunahme an Produkt stellt im Idealfall eine Verdoppelung der vorhandenen DNA-Sequenzen in jedem Zyklus dar. Nach 30 Zyklen könnte also unter optimierten Bedingungen eine Vermehrung der Zielsequenz um den Faktor 2^{30} erreicht werden. Dadurch werden kurze DNA-Abschnitte der molekularbiologischen Analyse zugänglich gemacht.

Für die Durchführung der PCR werden verschiedene Komponenten benötigt. Die Hauptbestandteile eines PCR-Ansatzes sind die DNA-Probe (DNA-Template), die DNA-Polymerase, die Primer, Nukleotide und eine Puffer-Lösung. Die Primer und die Nukleotide CTP, ATP, GTP und TTP werden in empirisch ermittelten Konzentrationen (im Überschuss) hinzugegeben.

Als DNA-Polymerase wurde in unseren Experimenten die Amplitaq Gold® DNA-Polymerase verwendet. Sie wird in inaktivem Zustand hinzugefügt und erst durch starkes Erhitzen während der ersten Denaturierung aktiviert. Durch dieses Prinzip werden unspezifische Amplifikationen auf ein Minimum reduziert.

3.2.3 Quantifizierung von DNA anhand der quantitativen real-time PCR (rt-qPCR)

Die rt-qPCR ermöglicht die Quantifizierung einer definierten DNA-Zielsequenz durch Etablierung einer Standardkurve und Interpolation. Als Zielsequenz wurde eine 135 Basenpaare umfassende Sequenz im Bereich des endogenen Retrovirus ERV-3 gewählt, welche innerhalb eines diploiden Chromosomensatzes zwei Kopien aufweist und in Kenntnis dessen eine Quantifizierung der genomischen Zelläquivalente beziehungsweise des DNA-Gehaltes einer Probe ermöglicht. Die Methode wurde von Yuan et al. beschrieben und etabliert (64).

Überblick: rt-qPCR

Die Grundlage der rt-qPCR ist ein kontinuierliches Messen eines dem Zuwachs an PCR-Produkt proportional erzeugten Fluoreszenz-Signals während der gesamten PCR. Auf diese Weise kann die PCR-Kinetik eines jeden Ansatzes mit Startphase, exponentieller Phase und Plateauphase verfolgt werden. Der Beginn der exponentiellen Phase ist direkt abhängig von der Ausgangszahl an Kopien einer Probe und kann mit dieser in Beziehung gesetzt werden.

Die absolute Quantifizierung, d.h. die Bestimmung der Kopiezahl der Zielsequenz, wird erreicht durch den Vergleich eines charakteristischen Punktes während der exponentiellen Phase der PCR-Kinetik (C_T -Wert) zwischen Proben unbekannter Kopiezahl und einer Standardkurve aus Proben bekannter Kopiezahl. Der C_T -Wert (engl. threshold cycle) definiert den Zyklus bei dem die Fluoreszenz signifikant ansteigt beziehungsweise den Schwellenwert überschreitet. Der Fluoreszenz-Schwellenwert hängt von den Basisemissionen einer Probe in den Zyklen 3 - 15 ab und beträgt die zehnfache Standardabweichung dieser Emissionen.

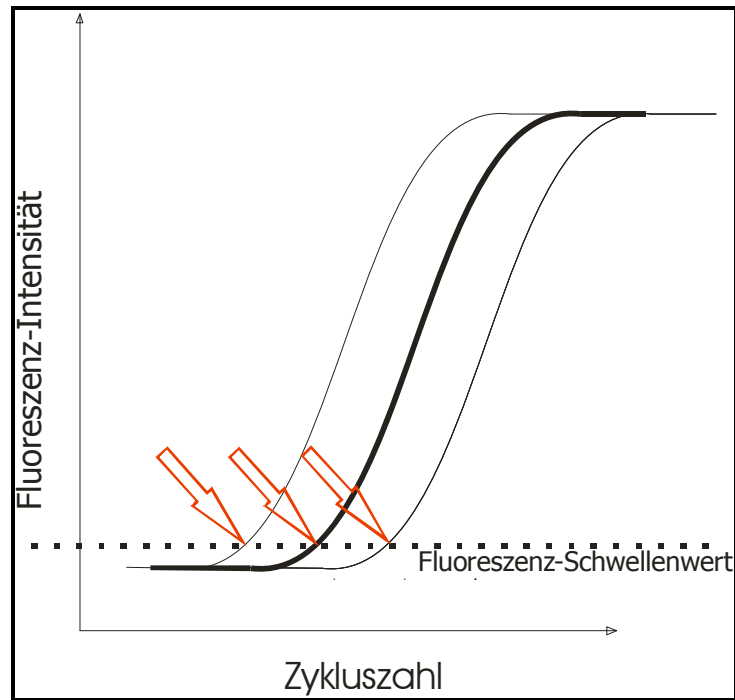


Abbildung 1 Graphik dreier typischer PCR-Kinetika mit unterschiedlichen DNA- Kopiezahl. (C_T - Wert gekennzeichnet durch \Rightarrow)

Mit einer Verdünnungsreihe aus Proben bekannter Kopiezahl der Zielsequenz der PCR wird eine Standardkurve erstellt. Für die Etablierung der Standardkurve wurde die Zielsequenz mittels eines Vektors kloniert und vervielfältigt. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mittels UV-Spektroskopie quantifiziert, eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen pipettiert und mittels der rt-qPCR quantifiziert.

Durchführung der rt-qPCR

Die PCR wurde mit den nachfolgend spezifizierten Bedingungen und Reagenzien durchgeführt. Es wurde jeweils ein Mikroliter an DNA-Template eingesetzt. Alle Proben inklusive die der Verdünnungsreihe wurden dreifach analysiert. Für die Durchführung wurde das ABI Prism™ 7700 Sequence Detection System der Fa. Applied Biosystems verwendet. Die Fluoreszenzanregung erfolgt durch einen Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Die resultierende Fluoreszenz wird mit einer CCD-Kamera gemessen.

Zielsequenz und Primersequenz

Als Zielsequenz der rt-qPCR wird ein Abschnitt aus dem endogenen Retrovirus ERV-3 benutzt. ERV-3 ist auf Chromosom 7 lokalisiert und existiert im humanen Genom nur an einem einzigen Genlocus (64). Das Retrovirus kodiert für drei Gene, gag (group associated gene), pol (reverse transkriptase) und

env (envelope). Aus dem Bereich des Envelope-Gens kann mit den Restriktionsenzymen Hind III und PST I ein 1,7 kb langes Fragment herausgeschnitten werden, welches die 135 bp umfassende Zielsequenz beinhaltet.

Die Primersequenzen wurden aus der Arbeit von Yuan et al. übernommen (64).

pHP10-Forward: 5´-CATgggAAGCAAgggAACTAATg

pHP10-Reverse: 5´-CCCAGcGAgCAATACAgAATTT

PCR-Bedingungen

Reagenzien	Endkonzentration
Aqua destillata	ad 25 µl
10 x PCR buffer	1x
25 mM MgCl	3,0 mM
10 mM dNTP	96 µM
PHP10-Forward	5pmol/tube
PHP10-Reverse	5pmol/tube
SYBR GREEN	Verdünnung: 1:40.000
DNA-Template	1 µl
Amplitaq Gold	0,75 Einheiten
V [µl]	25 µl

Tabelle 5 Bestandteile des PCR-Ansatzes der rt-qPCR

rt-qPCR-Bedingungen
3 min 94 °C
30 sec 60°C, 30 sec 94°C
45 Zyklen

Tabelle 6 Zwei-Schritt PCR

Fluoreszenz-Farbstoff

Das Fluoreszenz-Signal wurde durch den Farbstoff SYBR® Green der Firma Applied Biosystems generiert. SYBR® Green interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA. Nach Interkalierung wird ein deutlich verstärktes Fluoreszenz-Signal messbar. SYBR® Green besitzt, verglichen mit anderen interkalierenden Farbstoffen ein besonders günstiges Signal-Hintergrund-Verhältnis.

Die Etablierung der PCR beinhaltete auch die Identifikation der optimalen SYBR® Konzentration. Bei einer Verdünnung von 1:40.000 zeigten sich die besten Ergebnisse.

Herstellung eines Standards für die rt-qPCR

Für die Herstellung einer Verdünnungsreihe wurde die Zielsequenz mittels PCR mit den o.g. PCR-Bedingungen amplifiziert und in einen Plasmidvektor kloniert. Als DNA-Template wurde DNA aus humanen Lymphozyten verwendet. Anschließend erfolgte die Transformation eines Bakterienstammes, die Selektion transformierter Bakterien und deren Anzucht. Zuletzt isolierten wir die Plasmid-DNA und stellten durch Messung mittels UV-Spektroskopie eine Stammlösung definierter DNA-Konzentration her. Aus dieser Stammlösung wurden die Verdünnungsreihen erstellt.

Klonierung der Zielsequenz, Transformation eines Bakterienstammes und Selektion der transformierten Bakterien

Die Klonierung der Zielsequenz in einen Plasmidvektor erfolgte mit dem TOPO TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen. Das Prinzip des TOPO TA Cloning® Kits basiert auf einer Methode die Shuman et al etablierten (65). Nach Durchführung der Klonierung erhält man einen zyklischen Plasmidvektor für die Transformation eines Bakterienstammes.

Der Plasmidvektor wird in linearisierter Form synthetisiert. Beide 3'-Enden des Vektors besitzen die gleiche Sequenz 5'-CCCTT. Das jeweils endständige Desoxythymidin stellt einen Überhang dar und ist zusätzlich in Form einer energiereichen, kovalenten Bindung mit dem Enzym DNA Topoisomerase des Vaccinia-Virus verbunden. Diese energiereiche DNA/Protein-Bindung katalysiert durch Aufspaltung und konsekutive Energiefreisetzung die Ligation mit einem DNA-Doppelstrang. Voraussetzung sind eine 5'-Hydroxyl-Gruppe sowie ein Adenosin-Überhang. Diese Methode ist besonders für die Klonierung von PCR-Produkten geeignet, da die Taq-Polymerase 3'-Adenosin-Überhänge generiert. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieser 3'-Adenosin-Überhänge wird durch einen verlängerten, finalen Extensionsschritt deutlich vergrößert.

Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen. Als Vektor wurde der in dem Kit enthaltene 3,9 kb grosse Vektor pCR®2.1-TOPO® verwendet (Spezifikation:

siehe Herstellerprotokoll). Der Vektor pCR®2.1-TOP0® beinhaltet u.a. ein Gen für die Ampicillinresistenz (bp 2108–2968) und das LacZ α -Fragment (bp 1–571).

Für die Transformation wurde der im Kit enthaltene Bakterienstamm (DH5 α -T1 One Shot® Chemically Competent E. coli) verwendet.

Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte über die Vorbehandlung der zur Anzucht verwendeten Agarplatten mit Ampicillin (Endkonzentration: 50 μ g/l) und X-gal (Endkonzentration: 40 mg/ml). Ersteres dient der Elimination aller Bakterien, die keine Plasmidvektoren inklusive der Ampicillinresistenz aufgenommen haben. Letzteres dient der Selektion derjenigen Bakterien, die Plasmidvektoren mit der klonierten Zielsequenz aufgenommen haben. Das LacZ α -Fragment des Plasmidvektors befähigt das Bakterium zur Spaltung galaktosidischer Bindungen (Blaufärbung der Kolonie). Die Insertion des PCR-Produktes findet innerhalb des LacZ α -Gens statt und führt zu dessen Inaktivierung (Weißfärbung der Kolonie). Dementsprechend kann der Erfolg der Klonierung des aufgenommenen Vektors identifiziert werden.

Die definitive Selektion eines Bakterienklons erfolgte nach direkter PCR-Amplifikation verschiedener Kolonien. Es wurde ein Klon mit einer günstigen und früh einsetzenden Amplifikationskinetik ausgewählt und von diesem erneut ein Anteil der Kultur in 3 ml selektivem (50 μ g/l Ampicillin) LB Medium aufgenommen.

Isolation der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep® Spin Plasmid Kit nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen isoliert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung erfolgte eine Sequenzierung der Plasmid-DNA in der AG Dr. B. Jandrig, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch.

Quantifizierung der Plasmid-DNA anhand der UV-Spektroskopie

DNA-Mengen in Lösungen mit hohem DNA-Gehalt können durch die UV-Spektroskopie zuverlässig quantifiziert werden. Entscheidend für die Quantifizierung ist die Absorption bei 260 nm. Eine Nukleinsäurelösung mit einer optischen Dichte von 1,0 in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm entspricht einer DNA-Menge von 50 μ g/ml. Zusätzlich kann die Absorption bei 280 nm bestimmt und die 260/280-Ratio berechnet werden, um eine Aussage über die Verunreinigung durch Proteine zu erhalten.

Um die Quantifizierung möglichst präzise zu gestalten, wurden die Messungen in zwei Verdünnungen durchgeführt. Verwendet wurde das Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro (Firma Amersham).

Herstellung der Verdünnungsreihe

Die Plasmid-DNA wurde nach der Quantifizierung in einer Stammlösung mit 10^{10} Kopien/ml bei -20°C eingefroren. Für die Herstellung einer Standardkurve wurde jeweils ein frisches Aliquot entnommen und erneut durch die UV-Spektroskopie quantifiziert. Anschließend erfolgte die Herstellung einer fortlaufenden Verdünnungsreihe in den Verdünnungen $10^0 - 10^7$ Kopien pro Mikroliter. Drei repräsentative Verdünnungsreihen wurden für die Quantifizierung als Standard ausgewählt (Standardkurve I-III).

3.2.4 Mikrosatellitenanalyse

Überblick: Mikrosatellitenanalyse

Die Grundlage der Mikrosatellitenanalyse besteht in der Vervielfältigung eines Mikrosatellitenmarkers mittels PCR und anschließender Separation der beiden Allele durch eine hochauflösende, denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Für die Beurteilung ist die gleiche Prozedur in Wildtyp-DNA aus Blutlymphozyten erforderlich. Im Anschluss erfolgt die Auswertung durch Vergleich der Gelbanden. Voraussetzung ist die Heterozygotie eines Mikrosatellitenmarkers, auch bezeichnet als Informativität, d.h. die unterschiedliche Länge der beiden Allele.

Die Darstellung der Ergebnisse der PAGE erfolgte durch eine radioaktive Markierung der PCR-Produkte (Markierungsreaktion) und die Exposition eines Röntgenfilms mit dem gewaschenen und getrockneten Polyacrylamidgel (Autoradiographie).

Die Mikrosatellitenanalyse umfasst mehrere Schritte, die in Tabelle 7 abgebildet sind und nachfolgend erläutert werden.

<u>Polymerasekettenreaktion</u>
Markierungsreaktion
Mikrosatellitenmarker und PCR-Bedingungen
<u>Lyophilisation der PCR-Produkte</u>
<u>Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)</u>
Gelpräparation
Elektrophorese
Waschen und Trocknen des Polyacrylamidgels
<u>Autoradiographie</u>
<u>Auswertung</u>

Tabelle 7 Arbeitsschritte der Mikrosatellitenanalyse

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Markierungsreaktion

Die Markierung der PCR-Produkte erfolgte durch Bindung eines [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP (3000 Ci/mmol) an den 5-Hydroxyl-Terminus eines Primers, katalysiert durch die T₄-Polynukleotid-Kinase (Firma New England Biolabs® Inc.) in entsprechendem Puffer. Die Markierungsreaktion wurde unmittelbar vor dem Ansetzen der PCR durchgeführt und es wurde prinzipiell der Sense-Primer eingesetzt. Die Bestandteile und deren Endkonzentrationen werden in der Tabelle 8 genannt.

	Menge
Aqua destillata	ad 20 μl
10xT ₄ PNK Puffer	2 μl
Sense primer	Variabel (s. Tabelle X)
γ -ATP	Variabel
T ₄ -Polynukleotidkinase	2 μl = 20 I.E.

Tabelle 8

Die Menge an [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP wurde abhängig von der Zahl der PCR-Ansätze, der Halbwertszeit des radioaktiven Phosphors und dem zeitlichen Abstand des Synthesezeitpunktes ausgewählt.

Der Markierungsansatz wurde nun in einem auf 37°C erhitzten Wasserbad für 60 Minuten inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der T_4 -Polynukleotidkinase für 5 Minuten bei 65°C erhitzt. Es folgte die Zugabe zu der PCR-Stammlösung.

Mikrosatellitenmarker und PCR-Bedingungen

Alle PCR-Reaktionen im Rahmen der Mikrosatellitenanalyse erfolgten als 3-Schritt-PCR mit den in Tabelle 9 abgebildeten Reaktionszeiten und -temperaturen. Einzige Ausnahme bestand in der Annealing-Temperatur, die für jeden Mikrosatellitenmarker spezifisch etabliert wurde und in Tabelle 10 angegeben ist.

Für die Mikrosatellitenanalyse wurde der Thermozykler GeneAmp® PCR-System 9700 der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Mikrosatelliten ACTBP-2, D3S1300, D3S1234, D9S171 und D9S942 wurden von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH, die Mikrosatelliten L17686, UT5320 und D20S82 von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin synthetisiert.

5 min 95 °C
Zyklus 1 – 45
30 sec [Annealing-Temperatur]
30 sec 72 °C
30 sec 95 °C
5 min 72 °C

Tabelle 9

Marker	Primersequenz	Produkt größe	Annealing Temperatur	Reagenzien [in 25 µl Reaktionsvolumen]	
Dinukleotidrepeatmarker					
D3S1300	[s] CAC ATT CTA gTC AgC CTg AgA CA	132 bp	60°C	1xPCR buffer	96µM dNTP
	[as] AAA ATT gCA CCC CTA CCA CA			1,5mM MgCl ₂	0,8µM primer
D3S1234	[s] CCT gTg AgA CAA AgC AAg AC	99–121	60°C	1xPCR buffer	96µM dNTP
	[as] gAC ATT Agg CAC Agg gCT AA	bp		1,5mM MgCl ₂	0,8µM primer
D9S171	[s] AAg TgA ACC TCA TCT CTg TCT g	156 bp	66°C	1xPCR buffer	60µM dNTP
	[as] CAA CCC TAg CAC TgA Tgg TA			1,5mM MgCl ₂	0,8µM primer
D9S942	[s] gCA AgA TTC CAA ACA gTA	98 bp	52°C	1xPCR buffer	96µM dNTP
	[as] CTC ATC CTg Cgg AAA CCA TT			1,5mM MgCl ₂	0,8µM primer
Tetranukleotidrepeatmarker					
ACTBP-2	[s] AAT CTg ggC gAC AAg AgT gA	291 bp	59°C	1xPCR buffer	96µM dNTP
	[as] ACT TCT CCC CTA CCg CTA TA			1,5mM MgCl ₂	0,8µM primer
L17686	[s] TCA TAT TAT CTg AgT gTg ATT TgT Agg	295 bp	53°C	1xPCR buffer	96µM dNTP
	[as] TgC ACA ACA CAT ACA CgT TCT C			2,0mM MgCl ₂	0,4µM primer
UT5320	[s] ggA Agg AAg gAA ggA AAg gA	206 bp	58°C	1xPCR buffer	50µM dNTP
	[as] ggA gCT TgA gAT gAC CCT gA			1,5mM MgCl ₂	0,4µM primer
D20S82	[s] Tgg gCA ACA gAg TgA gAC C	240 bp	50°C	1xPCR buffer	50µM dNTP
	[as] gCC AgT gAC CTA ACA gAA ATC A			1,5mM MgCl ₂	0,4µM primer

Tabelle 10

Lyophilisation der PCR-Produkte

Die Lyophilisation ist ein Verfahren zur schonenden Entfernung wasserhaltiger Bestandteile einer Lösung. Dabei wird das Wasser in Form von Wasserdampf über ein Vakuum bei gleichzeitiger Zentrifugation entzogen. Die Lyophilisation war erforderlich, um die Konzentration der PCR-Produkte zu erhöhen. Auf diesem Wege konnten die notwendigen PCR-Produkt-Mengen in die 6–7 µl fassenden Geltaschen des Polyacrylamidgels appliziert werden.

Die Zentrifugation erfolgte bei 37°C in der Zentrifuge Univapo 150 H (Fa. UniEquip GmbH), das Vakuum wurde durch die Vakuumpumpe Unijet II Refrigerated Aspirator (Fa. UniEquip GmbH) erzeugt. Eine

vollständige Lyophilisation eines 25 µl PCR-Ansatzes wurde in der Regel bereits nach 60 Minuten erreicht. Anschließend wurden die PCR-Produkte in 6µl Ladebuffer (Formamid, Xylenecyanol und Bromphenolblau) aufgenommen und zur vollständigen Lösung über Nacht bei +4°C gelagert.

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Separation der PCR-Produkte wurde eine denaturierende PAGE etabliert. Die denaturierende PAGE ermöglicht die Trennung von DNA-Fragmenten, die sich in ihrer Größe nur in einem Basenpaar unterscheiden. Die denaturierende PAGE ist besonders günstig, wenn vorrangig nach Größe und nicht nach Sequenz separiert werden soll.

Gelpräparation

Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele erfolgte in Anlehnung an Vorarbeiten von Litt et al. (66) in der nachfolgenden Zusammensetzung (Tabelle 11).

Polyacrylamidgele entstehen durch radikalische Polymerisation der Acrylamide. Die Polymerisation wurde durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) initiiert und durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Es bilden sich lineare Polyacrylamidfäden. Das N,N'-Methylenbisacrylamid ermöglicht eine Quervernetzung zu einem dreidimensionalen Maschenwerk.

Es wurden Gele mit zwei unterschiedlichen Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentrationen verwendet um der abweichenden Produktgröße Rechnung zu tragen. Für die größeren PCR-Produkte (Mikrosatellitenmarker ACTBP-2/L17686/UT5320/D20S82, 206-295 bp) wurden Polyacrylamidgele mit einer Endkonzentration des Acrylamid-Bisacrylamid von 6 % verwendet. Für die kleineren PCR-Produkte (98-156 bp) wurde eine Endkonzentration von 7 % gewählt. Um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten, wurden die Polyacrylamidgele über Nacht gelagert.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Harnstoff ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)	26,9 g	5,6 mol/l
Formamid (HCONH_2)	25,6 ml	32%
10 X TBE - Puffer (Trisborat [0,9 mol/l]) (EDTA [0,02 mol/l])	8,0 ml	1X
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lsg. (40%, 19:1)	14 ml 12 ml	7% 6%
Tetramethylethyldiamin 99 % (TEMED) ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)	80 μl	0,1 %
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 25 % ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	200 μl	0,25 %
Aqua destillata	Ad 80 ml	

Tabelle 11

(Polyacrylamid-) Elektrophorese

Die PAGE wurde bei einer Leistung von 70 Watt für 3,5-5 Stunden durchgeführt, abhängig von der Größe der jeweiligen Produkte. Sie wurde in einer vertikalen Gelkammer der Fa. BRL Life Technologies (Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus) durchgeführt. Vorangehend erfolgte ein Vorlauf von 60 Minuten (70 Watt).

Ladepuffer: Formamid, Bromphenolblau, Xylenecyanol

Laufpuffer: TBE (1x)

Waschen und Trocknen des Polyacrylamidgels

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in einer Lösung bestehend aus 200 ml Essigsäure (100 %), 600 ml Methanol (100 %) und 3200 ml deionisiertem Wasser für 10 Minuten gewaschen und fixiert. Abschließend wurde es in einem Geltrockner (Model 583, Fa. Bio-Rad) für etwa 2 Stunden getrocknet.

Autoradiographie

Die Autoradiographie beschreibt die Exposition eines Röntgenfilmes mit dem getrockneten Polyacrylamidgel nach PAGE. Durch die radioaktive Markierung erfolgt die Schwärzung des Röntgenfilms.

Die Expositionszeiten betragen in der Regel 12 bis 24 Stunden, in Einzelfällen auch länger.

Materialien:

Medizinischer Röntgenfilm, Format 35 x 43 cm (x-ray Retina, Fotochemischen Werke-Berlin Köpenick)

Expositionskassetten 38 X 46 cm (Kodak)

Auswertung

Die Auswertung erfolgte visuell durch zwei unabhängige Untersucher.

- Ein LOH lag vor, wenn ein Allelsignal auf weniger als 50 % reduziert oder vollständig verloren gegangen war.
- MIN lag vor, wenn eine zusätzliche Bande bzw. Banden im Bereich der spezifischen Allele auftraten oder wenn ein Verschieben (shift) eines Allelsignals nachweisbar war

Für den Nachweis wurden konkordante Ergebnisse in Screening- und Bestätigungsanalyse gefordert, mindestens aber in zwei unterschiedlichen PCR-Reaktionen.

3.3 Statistische Auswertung

Für die Berechnung statistischer Signifikanzen wurden drei statistische Methoden verwendet, der U-Test nach Mann und Whitney (Rangsummen-Test), der exakte Test nach Fisher und der Chi²-Test. Die jeweiligen Gegenstände der Berechnung respektive das ggf. verwendete Statistik-Programm sind in Tabelle 12 dargestellt.

Test-Methode	Gegenstand der Berechnung	Statistik-Programm
U-Test nach Mann und Whitney	Vergleich der Extraktionsmethoden	-
	Vergleich DNA-Gehalt in Tumor- und Kontrollpatienten	-
Fisher's exakter Test	Vergleich NSCLC- und SCLC-Patienten bzgl. des Nachweises von MA in zellfreier (3.4.2) und zellulärer (3.7) DNA aus der BL	StatXact - Version 6
	Zusammenhang des endoskopischen Wachstumsmuster mit dem Nachweis von MA in zellfreier und zellulärer DNA aus der BL	StatXact - Version 6
Chi ² -Test	Vergleich der MA in der zellfreien DNA bei Tumor- und Kontrollpatienten	StatXact - Version 6

Tabelle 12

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungsmaterial BL

Die Extraktion der zellfreien DNA erfolgte nach Separation der zellulären Bestandteile durch Zentrifugation. Die vollständige Elimination der zellulären Bestandteile wurde exemplarisch durch mikroskopische Untersuchungen kontrolliert. Für die Extraktion der zellfreien DNA wurden untersuchungsabhängig variierende Mengen zwischen 3,0 ml und 6,0 ml an BL eingesetzt. Unterschiede des Volumens an akquirierter BL zwischen Tumor- und Kontrollpatienten bestanden nicht.

4.2 Nachweis zellfreier DNA in der BL

In allen 59 Patienten konnte DNA aus dem zellfreien Überstand der BL isoliert werden. Der Nachweis erfolgte qualitativ und quantitativ mittels PCR-basierter Methoden.

Nach jeder DNA-Extraktion erfolgte eine Erfolgskontrolle durch eine qualitative PCR gemäß dem unter Material und Methoden aufgeführten Protokoll. Beispielhaft ist in Abbildung 2 eine Agarosegel-Elektrophorese einer Kontroll-PCR abgebildet.

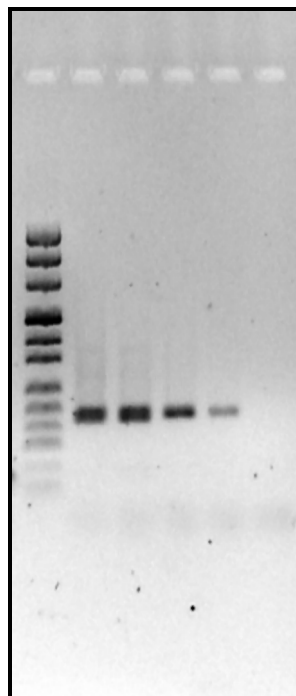


Abbildung 2 Darstellung einer Agarosegelelektrophorese einer Kontroll-PCR (Linie 1: pUC Mix Marker 8, Linie 2-5: DNA-Extraktionen, Linie 6: Negativkontrolle)

4.3 Quantifizierung der extrahierten, zellfreien DNA aus der BL

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte in dem Eluat nach Isolation aus dem zellfreien Überstand der BL. Für die DNA-Isolation wurden zwei Verfahren etabliert, die Extraktion mit heißem Phenol und Isopropanol (hPIP) und die Extraktion mit dem QiaAMP® DNA Blood Mini Kit.

Die DNA-Konzentration ist primär abhängig von dem verwendeten Isolationsverfahren. Die Einflussfaktoren sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Abhängigkeit des verwendeten Isolationsverfahrens.

	hPIP-Extraktion	Extraktion mit dem QiaAMP® DNA Blood Mini Kit
Volumen der eingesetzten BL	Variabel, 3,0 – 6,0 ml (siehe Abschnitt 3.1)	1,0 ml
Volumen des Eluats	30 µl	150 µl

Tabelle 13 Unterschiede in Bezug auf die beiden Extraktionsverfahren

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration ist die Etablierung einer Standardkurve erforderlich anhand derer durch Interpolation die Berechnung der Konzentrationen in den einzelnen Patientenproben erfolgt.

4.3.1 Etablierung der Standardkurve

Die Standardkurve wurde aus drei Verdünnungsreihen errechnet, die parallel zu den Patientenproben amplifiziert wurden. Die C_T -Werte der einzelnen Proben der Verdünnungsreihe werden in Tabelle 14 dargestellt. In der letzten Spalte werden die Mittelwerte der C_T -Werte gebildet.

		Standardkurve I	Standardkurve II	Standardkurve III	Mittelwert der Standardkurven
	Kopiezahl	C_T-Werte			
Verdünnungsreihe	10 ⁷	16,1	16,6	-	-
	10 ⁶	19,9	19,9	19,6	19,8
	10 ⁵	20,3	20,8	20,9	20,7
	10 ⁴	24,5	25,7	24,3	24,8
	10 ³	27,4	28,2	28,3	28,0
	10 ²	32,7	32,2	32,8	32,6
	10	36,0	35,3	36,3	35,9
	Effizienz	96,9%	102,7%	97,6%	

Tabelle 14 Ergebnisse der Amplifikation der Verdünnungsreihen und Berechnung des Mittelwertes der jeweiligen C_T-Werte

In Abbildung 3 erfolgt die Darstellung der C_T-Werte in Bezug auf die Kopiezahlen der jeweiligen Proben der Verdünnungsreihe. Die dargestellte Trendlinie respektive ihre Funktion stellt die Grundlage für die Berechnung der Kopiezahlen in den Proben mit unbekanntem DNA-Gehalt dar. Die Funktion der Trendlinie wird in Formel 1 dargestellt.

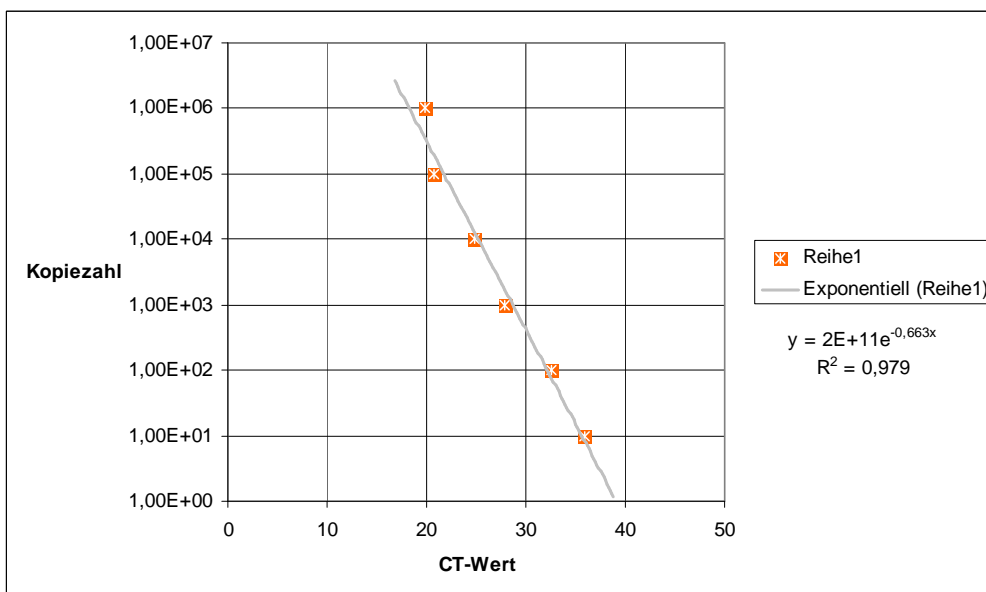


Abbildung 3

4.3.2 Konzentration der DNA in den einzelnen Patientenproben

Die Berechnung des DNA-Gehaltes erfolgt in mehreren Schritten, die nachfolgend erläutert werden.

Berechnung der Kopiezahl

In Formel 1 wird die Funktion der oben erläuterten Trendlinie dargestellt. Mit dieser Funktion lässt sich durch Verwendung des probenspezifischen C_T -Wertes die Kopiezahl der jeweiligen Probe berechnen.

$$Y = 2 \times 10^{(11)} \times e^{(-0,663 \times X)}$$

Formel 1

Berechnung des DNA-Gehaltes

Die Kenntnis der Kopiezahl ermöglicht eine Aussage über die Zahl der enthaltenen genomischen Zelläquivalente. Da das Molekulargewicht eines humanen Genoms bekannt ist, kann die DNA-Konzentration aus der Kopiezahl gemäß Formel 2 errechnet werden.

Molekulargewicht des humanen Genoms (haploid):	MG = 3,3 pg DNA
Kopiezahl ERV-3 / humanes Genom (haploid):	1 Kopie
DNA-Konzentration in der Extraktionslösung:	
[DNA] ng/µl = Kopiezahl X/µl x 3,3 pg x 0,001	

Formel 2 Berechnung der DNA-Konzentration aus der Kopiezahl

hPIP-Extraktion

Für diese Methode wurden die oben angegebenen Mengen an zellfreiem Überstand eines Patienten (\bar{x} = 3,9 ml) aus der BL verwendet. Die DNA wurde nach Extraktion in 30 µl Lösungspuffer aufgenommen. Die Methode wurde für die Extraktion der DNA von 28 Patienten genutzt, darunter 17 Tumorpatienten und 11 Kontrollpatienten. Die resultierenden DNA-Konzentrationen werden in Tabelle 15 dargestellt.

	Patienten- zahlen	Mittelwert [ng/µl]	Median [ng/µl]	Min-Max [ng/µl]
hPIP-Extraktion	28	55,4	5,1	0,01 – 476,5
Tumorpatienten	17	42,6	6,5	0,01 – 373,6
Kontrollpatienten	11	75,3	2,8	0,13 – 476,5

Tabelle 15 Berechnete DNA-Konzentrationen in Tumor- und Kontrollpatienten nach DNA-Isolation mit der hPIP-Extraktion

Die gefundenen DNA-Konzentrationen weisen eine ausgeprägte Streuung auf. In Anbetracht der deutlich voneinander abweichenden Werte des Mittelwertes und des Medians ist von einer asymmetrischen Verteilung des DNA-Gehaltes auszugehen.

Extraktion mit dem QiaAMP DNA Blood Mini Kit®

Für diese Methode wurde jeweils 1,0 ml der BL verwendet. Die extrahierte DNA verblieb in 150 µl eines Elutionspuffers. Die Methode wurde für die Isolation der DNA von 13 Tumorpatienten und 18 Kontrollpatienten angewendet.

Es zeigte sich gleichermaßen eine große Streubreite der DNA-Konzentration, Mittelwert und Median weichen ebenfalls deutlich voneinander ab (Darstellung in Tabelle 16).

	Patienten- zahlen	Mittelwert [ng/µl]	Median [ng/µl]	Min-Max [ng/µl]
Extraktion mit dem QiaAMP DNA Blood Mini Kit®	31	13,1	1,0	0,01 – 261,2
Tumorpatienten	13	22,5	1,2	0,07 – 261,2
Kontrollpatienten	18	6,3	0,9	0,01 – 39,9

Tabelle 16 Berechnete DNA-Konzentration in Tumor- und Kontrollpatienten nach DNA-Isolation mit dem QiaAMP DNA Blood Mini Kit®

4.3.3 Verwendete Mengen an DNA-Template im Rahmen der Mikrosatellitenanalyse

Im Rahmen der Mikrosatellitenanalyse wurde zunächst eine Screeninganalyse (s. auch Punkt 3.2.4.) durchgeführt. Hier wurden standardmäßig drei Mikroliter des DNA-Isolates eingesetzt. Entsprechend wiesen die eingesetzten DNA-Template-Mengen eine große Spannbreite auf und lagen zwischen 0,03 ng/ml und 1429,5 ng/ml pro PCR-Ansatz.

4.3.4 Vergleich der Extraktionsmethoden

Eine Vergleichbarkeit der beiden Methoden wird erreicht durch die Berechnung des DNA-Gehaltes eines definierten Volumens BL. Die DNA-Isolation in den einzelnen Methoden erfolgte entweder mit der einen oder der anderen Methode, ein Vergleich der beiden Methoden innerhalb einer Patientenprobe wurde nicht durchgeführt.

hPIP-Extraktion

$$X \text{ [ng/ml]} = Y \text{ [ng/}\mu\text{l]} \times 30 \mu\text{l} \times (1/ Z \text{ [ml]})$$

Extraktion mit dem QiaAMP DNA Blood Mini Kit®

$$X \text{ [ng/ml]} = Y \text{ [ng/}\mu\text{l]} \times 150 \mu\text{l} \times (1/Z \text{ [ml]})$$

Formel 3 Berechnung der DNA-Konzentration X pro Milliliter BL (Y = DNA-Konzentration in der Extraktionslösung, Z = Volumen der eingesetzten BL in Milliliter)

Die Ergebnisse der Berechnung sind in Tabelle 17 dargestellt. Die DNA-Extraktion mittels des QiaAMP® DNA Blood Mini Kit ermöglicht eine größere Ausbeute pro Milliliter BL, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant ist ($p > 0,05$).

Eine Aussage über die Effizienz der beiden Extraktionsverfahren bezüglich der Extraktion aus der BL ist anhand unserer Untersuchungen nicht möglich.

	Maximum	Q.75%	Median	Q.25%	Minimum	Mittelwert
hPIP-Extraktion (n = 24)	7146,9	300,3	38,7	14,3	0,1	481
QiaAMP® DNA Blood Mini Kit (n = 31)	39181,5	717	154,5	30,0	1,5	1964

Tabelle 17 DNA-Gehalt bezogen auf einen Milliliter BL [ng/ml BL]

4.3.5 Vergleich der Tumorpatienten und der Kontrollpatienten hinsichtlich des DNA-Gehaltes in der BL

Für den Vergleich der beiden Patientengruppen ist die DNA-Konzentration pro Volumeneinheit BL erforderlich. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tumor- und Kontrollpatienten konnte nicht festgestellt werden ($p > 0,05$).

	hPIP-Extraktion [ng/ml BL]	QiaAMP® DNA Mini Kit [ng/ml BL]
Tumorpatienten		
Median	66,3	184,5
Mittelwert	174,0	3372,6
Quantile (75 %/25 %)	291,0 / 24,6	684,0 / 40,5
Kontrollpatienten		
Median	23,1	127,5
Mittelwert	911,3	946,3
Quantile (75 %/25 %)	243,8 / 8,5	975,8 / 19,9

Tabelle 18

4.4 Mikrosatellitenalterationen in der zellfreien DNA aus der BL von Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkarzinom

In der zellfreien DNA aus der BL bei den Patienten mit diagnostiziertem Lungenkarzinom konnten insgesamt 13 Mikrosatellitenalterationen nachgewiesen werden. Die Mikrosatellitenalterationen verteilten sich auf acht der 30 Patienten, einem prozentualen Anteil von 26,7 % entsprechend.

In 11 der 13 gefundenen Alterationen konnte ein Verlust der Heterozygotie (LOH) nachgewiesen werden, während die verbleibenden zwei Alterationen das Bild einer MIN zeigten. In den Patienten mit der Diagnose NSCLC ließen sich keine, in der Gruppe der Patienten mit der Diagnose SCLC hingegen zwei Mikrosatelliteninstabilitäten nachweisen.

Die ausführliche Darstellung der Ergebnisse inklusive der nachgewiesenen Mikrosatellitenalterationen in der zellulären DNA aus der BL erfolgt in der Tabelle 19.

	Zytologie	Histologie	ACTBP-2		D3S1234		D3S1300		L17686		UT5320		D20S82		D9S171		D9S942	
			Bl	Blc	Bl	Blc	Bl	Blc	Bl	Blc	Bl	Blc	Bl	Blc	Bl	Blc	Bl	Blc
1		NSCLC																
2		NSCLC			L													
3	<input checked="" type="checkbox"/>	NSCLC																
4		NSCLC			L				L									
6		NSCLC				L		L										
7		NSCLC											L					
8		NSCLC																
9		NSCLC																
10		NSCLC																
11		NSCLC																
12		NSCLC	L	L														
14		NSCLC																

			ACTBP-2	D3S1234	D3S1300	L17686	UT5320	D20S82	D9S171	D9S942
	Zytologie	Histologie	Bl	Blc	Bl	Blc	Bl	Blc	Bl	Blc
15	<input checked="" type="checkbox"/>	NSCLC								
17		NSCLC								
18		NSCLC								
19		NSCLC								
20		NSCLC								
21		NSCLC								
23		NSCLC								
24	<input checked="" type="checkbox"/>	NSCLC								
26		NSCLC								
27	<input checked="" type="checkbox"/>	NSCLC								
5		SCLC								
16	<input checked="" type="checkbox"/>	SCLC								
25		SCLC	L	L L	L L	M				
28	<input checked="" type="checkbox"/>	SCLC	L						M	
29	<input checked="" type="checkbox"/>	SCLC				M		L		
30		SCLC			L L	M	M	L		
13		ADC						L		
22		ADC								

Tabelle 19 Ausführliche Darstellung der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse bei den Tumorpatienten (zellfreie UND zelluläre DNA aus der BL, L: LOH, M: MIN)

4.4.1 Darstellung der Mikrosatellitenanalyse und ausgewählter Mikrosatellitenalterationen in der zellfreien DNA aus der BL

Beispiel einer Mikrosatellitenanalyse

Die nachfolgenden Abbildungen stellen beispielhaft die Mikrosatellitenanalyse im Bereich des Mikrosatellitenmarker D9S171 des Patienten 20 aus zellfreier und zellulärer DNA aus der BL, sowie aus zellfreier DNA aus dem Serum dar. Die Abfolge der einzelnen Untersuchungen ist schematisch in Tabelle 20 dargestellt.

<p><u>Screeninganalyse</u></p> <p>Einmalige Analyse sämtlicher Materialien eines Patienten</p> <p>[Durchführung: alle Patienten]</p> <p>Polyacrylamidgelelektrophorese [Autoradiographie 1. Lauf]</p> <p>Polyacrylamidgelelektrophorese [Autoradiographie 2. Lauf]</p> <p><u>Bestätigungsanalyse</u></p> <p>Analyse mit unterschiedlichen Template-Mengen</p> <p>[Durchführung: bei Ausfällen/vermuteten Alterationen/Alterationen in der Screeninganalyse]</p> <p>Polyacrylamidgelelektrophorese [Autoradiographie 1. Lauf]</p> <p>Polyacrylamidgelelektrophorese [Autoradiographie 2. Lauf]</p>

Tabelle 20 Schema der Mikrosatellitenanalyse in unserem Labor. Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte.

In Abbildung 4 erfolgt die Darstellung des ersten Laufes der PAGE der Screeninganalyse. Die Hauptbanden sind durch die beiden Pfeile markiert. Die aufgetragene DNA-Menge der zellfreien DNA aus der BL ist deutlich höher. Eine Vergleichbarkeit ist in dieser Darstellung nur eingeschränkt gegeben.

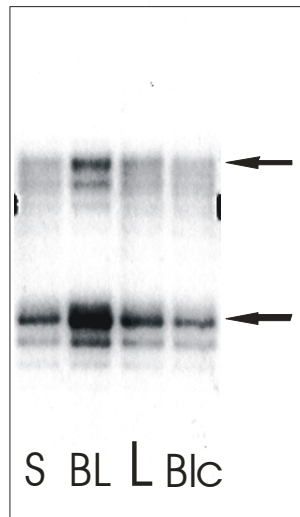


Abbildung 4 Darstellung 1. Lauf der PAGE der Screeninganalyse des Patienten 20 im Bereich des Mikrosatellitenmarker D9S171 (← = Markierung der beiden Allele, S = Serum, BL = zellfreie DNA aus der BL, BLc = zelluläre DNA aus der BL, L = lymphozytäre DNA)

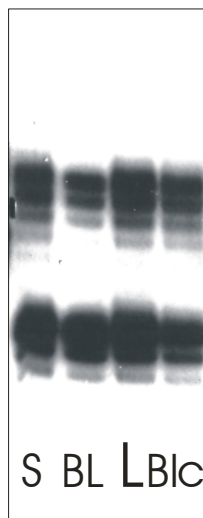


Abbildung 5 Darstellung 2. Lauf der PAGE der Screeninganalyse des Patienten 20 im Bereich des Mikrosatellitenmarker D9S171 (S = Serum, BL = zellfreie DNA aus der BL, BLc = zelluläre DNA aus der BL, L = lymphozytäre DNA)

In Abbildung 5 wird der 2. Lauf der PAGE der Screeninganalyse mit angepassten Volumina der aufgetragenen DNA-Mengen dargestellt. Die einzelnen PCR-Ergebnisse können visuell besser miteinander verglichen werden. In der vorliegenden Darstellung erscheint das leichte Allel der zellfreien DNA aus der BL unterrepräsentiert, so dass eine gezielte Bestätigungsanalyse dieser DNA

durchgeführt wurde. In Abbildung 6 wird der erste Lauf der PAGE der Bestätigungsanalyse dargestellt. Bei gegebener Vergleichbarkeit kann sowohl ein Verlust der Heterozygotie als auch eine Mikrosatelliteninstabilität sicher ausgeschlossen werden.

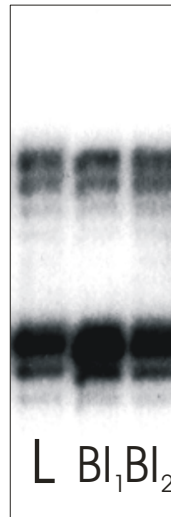


Abbildung 6 Wiederholung der PCR und PAGE, Patient 20, DS9171 mit differierenden Mengen an eingesetztem DNA-Template (BL₁=4 µl DNA-Template, BL₂=5µl DNA-Template)

Beispiele tumorassoziierter Veränderungen der Mikrosatellitenmarker – Verlust der Heterozygotie

Patient: 25

Mikrosatellitenmarker: D3S1300

Material: zellfreie DNA aus der BL

Erkrankung: SCLC, extensive disease bei hepatischer Metastasierung, Z.n. 1. Zyklus einer Polychemotherapie, endobronchial sichtbares Tumorwachstum

In Abbildung 7 erfolgt die Darstellung des zweiten Laufes der Bestätigungsanalyse. Im Vergleich mit der PCR-Analyse der lymphozytären DNA imponiert eindeutig ein LOH des schweren Allels des Mikrosatellitenmarkers D3S1300.

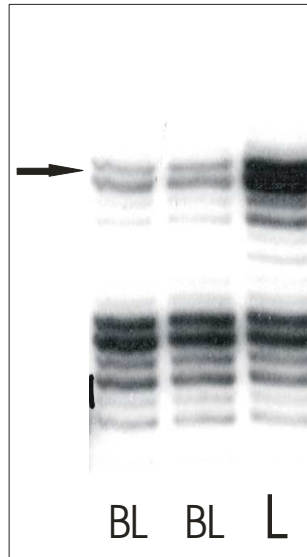


Abbildung 7 Darstellung zweiter Lauf der PAGE der Bestätigungsanalyse (→ = Markierung des deletierten Allels, BL = zellfreie DNA aus der BL, unterschiedliche Template-Mengen [4 µl, 5 µl])

Beispiele tumorassoziierter Veränderungen – Mikrosatelliteninstabilität (MIN)

Patient: 30

Mikrosatellitenmarker: L17686

Material: zellfreie DNA aus der BL

Erkrankung: SCLC, extensive disease, klinisches Restaging nach sechs Zyklen einer Polychemotherapie

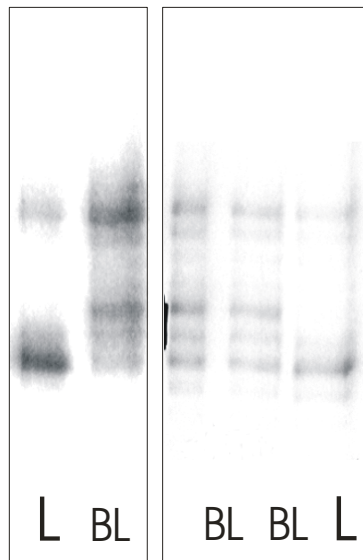


Abbildung 8 Darstellung von Screening- (links) und Bestätigungsanalyse (rechts) (BL = zellfreie DNA aus der BL, in der Bestätigungsanalyse zwei differierende Template-Mengen [4 μ l, 5 μ l])

In Abbildung 8 erfolgt die Darstellung des zweiten Laufes von Screening- und Bestätigungsanalyse. Im Vergleich mit der PCR-Analyse der lymphozytären DNA imponiert in den drei Proben aus Screening- (DNA-Template: 3 μ l) und Bestätigungsanalyse (DNA-Template: 4 μ l und 5 μ l) eine zusätzliche Bande.

4.4.2 Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in Bezug auf die histologischen Subgruppen

Unter den 30 Tumorpatienten befanden sich 22 Patienten mit einem Nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), sechs Patienten mit einem Kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) und zwei Patienten mit einem Adenoidzystischen Karzinom (ADC).

Bei Betrachtung der histologischen Subgruppen im Hinblick auf den Nachweis von MA zeigte sich, dass signifikant mehr Patienten mit Nachweis eines SCLC ein oder mehrere Mikrosatellitenalterationen aufwiesen als Patienten mit einem NSCLC ($p=0,02$). Im Falle der Patienten mit SCLC konnten in vier der sechs Patienten sieben Verluste der Heterozygotie (LOH) und zwei Mikrosatelliteninstabilitäten nachgewiesen werden. Demgegenüber zeigten sich in den 22 Patienten mit NSCLC drei Patienten mit jeweils einem LOH. Die vollständige Verteilung der nachgewiesenen Mikrosatellitenalterationen auf die histologischen Untergruppen ist in Tabelle 21 dargestellt.

Patienten mit einem	Mikrosatellitenalterationen	Anteil der Patienten mit Nachweis ≥ 1 MA
NSCLC (n=22)	3	3/22
Adenokarzinome (n=9)	1	1/9
Plattenepithelkarzinome (n=8)	1	1/8
Großzelliges Karzinom (n=2)	1	1/2
k.A. (n=3)	0	
SCLC (n=6)	9	4/6
Adenoidzystischen Karzinom (n=2)	1	1/2

Tabelle 21 **Verteilung der gefundenen Mikrosatellitenalterationen auf die histologischen Untergruppen**

4.4.3 Zusammenhang zwischen endoskopisch imponierendem Wachstumsmuster des Tumors und den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse

Bei bronchoskopisch sichtbarem, endobronchialen Tumorwachstum konnte in 38,9% der Patienten mindestens eine Mikrosatellitenalteration in der zellfreien DNA nachgewiesen werden, demgegenüber nur in 8,3 % der Patienten, bei denen sich kein endobronchiales Tumorwachstum darstellen ließ. Ein signifikanter Zusammenhang wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % nicht erreicht ($p=0,065$).

Der Nachweis von Mikrosatellitenalterationen in der zellulären DNA stellte sich unabhängig von dem endoskopisch imponierenden Wachstumsmuster dar ($p>0,05$) (Tabelle 22).

		Endobronchiales Tumorwachstum (n=18)	Extrabronchiales Tumorwachstum (n=12)
Zellfreie DNA - BL	Anteil der Patienten mit ≥ 1 MA	38,9 % (7/18)	8,3 % (1/12)
Zelluläre DNA - BL	Anteil der Patienten mit ≥ 1 MA	22,2 % (4/18)	25,0 % (3/12)

Tabelle 22 Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit des endoskopisch imponierenden Tumorwachstums (Untersuchungen in der zellfreien als auch zellulären DNA aus der BL)

4.4.4 Zusammenhang zwischen zytologischen Befunden und den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse

In sieben der 30 Tumorpatienten ergab die zytologische Analyse der BL durch die Kollegen der Pathologie maligne Zellen. Die restlichen 23 Tumorpatienten zeigten keine malignen oder malignitätssuspekten Zellen in der zytologischen Analyse. Die Häufigkeit des Nachweises von MA in zellfreier und zellulärer DNA stellte sich unabhängig von den zytologischen Befunden dar. Sowohl in der Gruppe der Zytologie-positiven als auch in der der Zytologie-negativen Tumorpatienten weisen etwa 30% (28,6 respektive 34,8%) der Patienten ein oder mehrere MAs auf (Tabelle 23).

Tumorpatienten	≥ 1 MA	Kein Nachweis einer MA
Zytologie-negativ	8/23 [34,8%]	15/23 [65,2%]
Zytologie-positiv	2/7 [28,6%]	5/7 [71,4%]

Tabelle 23

4.5 Mikrosatellitenalterationen in der zellfreien DNA aus der BL von Patienten ohne Nachweis einer malignen Grunderkrankung

In der zellfreien DNA aus der BL bei Patienten ohne Nachweis einer malignen Grunderkrankung konnten insgesamt sechs MA nachgewiesen werden (Tabelle 24). Die Mikrosatellitenalterationen verteilten sich auf fünf der 29 Patienten, einem prozentualen Anteil von 17,2 % entsprechend. Die Mikrosatellitenalterationen bestanden in 5 der 6 gefundenen Alterationen in einem Verlust der Heterozygotie (LOH). Die verbleibende Alteration zeigte das Bild einer Mikrosatelliteninstabilität (MIN). In den Mikrosatellitenmarkern D3S1300, D20S82 und D9S171 konnten keine Mikrosatellitenalterationen nachgewiesen werden.

Darüber hinaus zeigte der Patient 50 eine MA (LOH) im Bereich des Markers L17686, allerdings ausschließlich in der zellulären DNA aus der BL.

	ACTBP-2	D3S1234	D3S1300	L17686	UT5320	D20S82	D9S171	D9S942
	Blc Bl	Blc Bl	Blc Bl	Blc Bl	Blc Bl	Blc Bl	Blc Bl	Blc Bl
37	L							
44		L		M				
49	L L							
52					L			
54								L
50				L				

Tabelle 24 Patienten aus der Kontrollgruppe mit Nachweis einer Mikrosatellitenalteration in der zellfreien oder zellulären DNA aus der BL. Patient 50 zeigt ausschließlich einen Verlust der Heterozygotie in der zellulären DNA.

Das Durchschnittsalter der fünf Patienten betrug 69,4 Jahre. Unter den fünf Patienten mit nachgewiesenen Mikrosatellitenalterationen befanden sich drei der neun Nichtraucher (Pat 37, 49, 52) und zwei der sieben Frauen aus der Kontrollgruppe. Infolge der drei Nichtraucher liegt der

durchschnittliche Zigarettenkonsum dieser fünf Patienten bei acht Packungsjahren, während die beiden Raucher jeweils 20 Packungsjahre aufweisen. Die Grunderkrankungen der fünf Patienten sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Patient	Zahl der MA	Grunderkrankung	Packungsjahre (py)
37	1	Sarkoidose, atyp Mykobakteriose	NR
44	2	Sklerodermie	20 py
49	1	Schwere, purulente Bronchitis	NR
52	1	Sarkoidose	NR
54	1	Benigne Trachealstenose	20 py, ex 1992

Tabelle 25 Grunderkrankungen der Patienten aus der Kontrollgruppe mit Nachweis von ≥ 1 MA (unter Zahl der Mikrosatellitenmarker sind nur die Alterationen in der zellfreien DNA aus der BL aufgeführt)

Beispiel eines Verlustes der Heterozygotie bei einem Patienten der Kontrollgruppe

Patient: 54

Mikrosatellitenmarker: D9S942

Material: zellfreie DNA aus der BL

Erkrankung: Benigne Trachealstenose, bronchoskopische Verlaufskontrolle bei Zustand nach endotrachealer Stentimplantation, tumorfrei

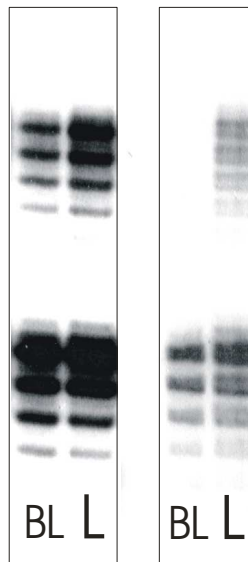


Abbildung 9 Deletion des größeren Allels des Mikrosatellitenmarker D9S942, dargestellt in der Screening- (links) und Bestätigungsanalyse (rechts) mit unterschiedlichen DNA-Template-Mengen (3 μ l, 5 μ l). In der Bestätigungsanalyse wurde aus Mangel an Material nur eine PCR durchgeführt (BL = zellfreie DNA aus der BL, L = lymphozytäre DNA)

4.6 Vergleich der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in der zellfreien DNA aus der BL in den Tumor- und Kontrollpatienten

Insgesamt konnten in der Gruppe der Tumorpatienten nahezu doppelt so viele MA detektiert werden wie in der Kontrollgruppe. Die Sensitivität für den Nachweis eines Lungenkarzinoms beträgt lediglich 26,7 %. Die Spezifität beträgt 83 % (siehe auch Tabelle 16).

Betrachtet man die Zahl der Patienten mit ≥ 1 MA in den Tumorpatienten und der Kontrollgruppe ist kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p=0,38$) (Tabelle 26).

	Tumorpatienten	Kontrollgruppe
Σ MA	13	6
≥ 1 MA [%]	26,7 % (8/30)	17,2 % (5/29)

Tabelle 26 Vergleich der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse (Σ MA: Summe der gefundenen Mikrosatellitenalterationen, ≥ 1 MA [%]: Prozentualer Anteil der Patienten mit Nachweis von mindestens einer Mikrosatellitenalteration)

Die einzelnen Mikrosatellitenmarker variieren in ihrer Diskriminationsfähigkeit (Abbildung 10). In unseren Untersuchungen erscheinen die Marker D3S1300 und D20S82 mit zwei MA in der Gruppe der Tumorpatienten und fehlenden MA in der Kontrollgruppe als geeignet.

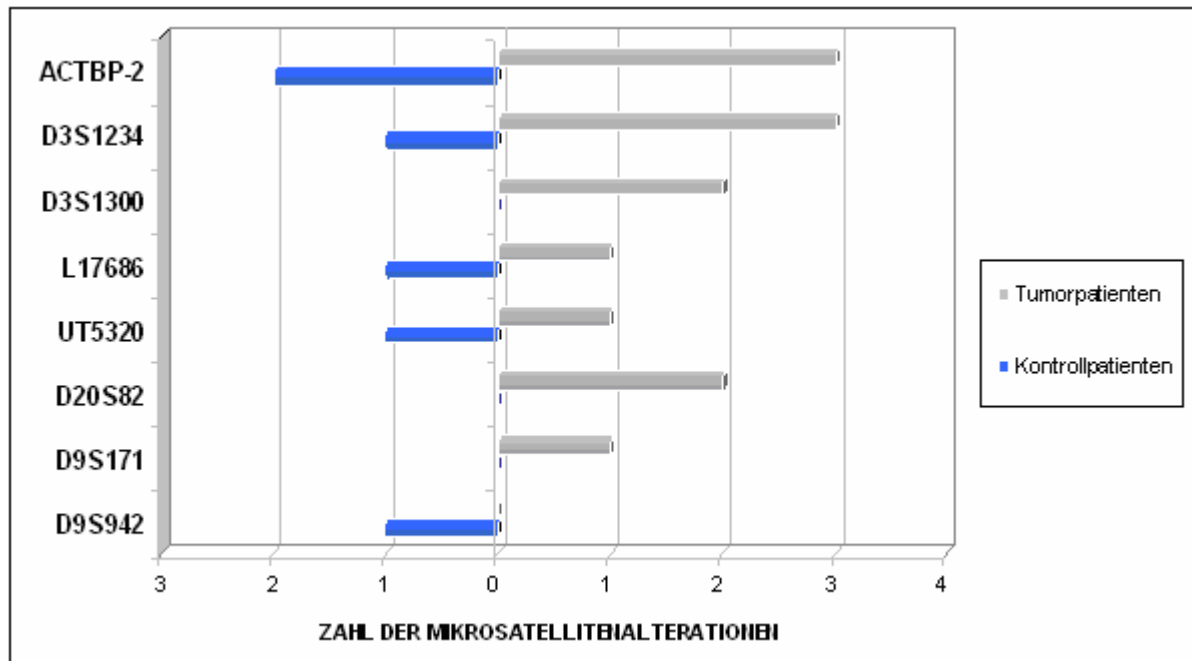


Abbildung 10 Zahlen der gefundenen Mikrosatellitenalterationen in den Tumor- und Kontrollpatienten in den einzelnen Mikrosatellitenmarkern

4.7 Vergleich der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in der zellfreien und zellulären DNA aus der BL in Tumor- und Kontrollpatienten

Sämtliche detektierten MA in der zellulären DNA aus der BL sind in Tabelle 19 (Tumorpatienten) und Tabelle 24 (Kontrollgruppe) dargestellt und in Tabelle 27 zusammengefasst. Im Vergleich der beiden Kompartimente zellfreie vs. zelluläre DNA aus der BL ist das Folgende festzustellen.

Die Untersuchungen in der zellulären DNA besitzen eine höhere Spezifität bei diskret geringerer Sensitivität im Hinblick auf die Unterscheidung zwischen Tumor- und Kontrollpatienten (Tabelle 16). Ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Patientenzahlen mit ein oder mehreren MA bestand ebenfalls nicht ($p=0,066$).

		Tumorpatienten	Kontrollgruppe
Zellfreie DNA	Σ MA	13	6
	≥ 1 MA [%]	26,7 % (8/30)	17,2 % (5/29)
	Sensitivität	26,7 %	
	Spezifität	82,8 %	
Zelluläre DNA	Σ MA	11	2
	≥ 1 MA [%]	23,3 % (7/30)	6,9 % (2/29)
	Sensitivität	23,3 %	
	Spezifität	93,1 %	

Tabelle 27 Vergleich der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in den beiden Kompartimenten

In der Gruppe der Tumorpatienten konnte in fünf Fällen eine übereinstimmende MA in zellfreier und zellulärer DNA der BL detektiert werden. Die verbleibenden Mikrosatellitenalterationen stellten sich jeweils nur in einem der beiden Kompartimente dar. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine Übereinstimmung (Tabelle 28). Eine Übereinstimmung wurde nur als solche dokumentiert, wenn reproduzierbar das gleiche Allel deletiert war. Bei nicht übereinstimmender Alleldeletion wurde ein Artefakt angenommen.

Auch in der zellulären DNA zeigte sich ein Übergewicht an detektierten MA in den SCLC-Patienten (gegenüber den NSCLC-Patienten. Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand aber nicht ($p=0,12$).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen in der zellfreien DNA zeigten die Ergebnisse der zellulären DNA keine Abhängigkeit von dem endoskopisch imponierenden Tumorwachstum (Tabelle 10).

Der Nachweis von MA zeigte sich in beiden Kompartimenten unabhängig von den zytologischen Ergebnissen in den jeweiligen Patienten.

In der zellulären DNA zeigten sich insgesamt drei MIN, alle im Bereich des Tetranukleotidrepeat-markers L17686 und ausschließlich bei Patienten mit einem SCLC.

In Patient 50, einem Patienten aus der Kontrollgruppe, ließ sich ausschließlich eine MA (LOH) in der zellulären DNA finden. Bei dem Patienten wurde bei einmaligen Hämoptysen der Ausschluss eines Lungenkarzinoms anhand einer CT-Untersuchung des Thorax, sowie einer Bronchoskopie durchgeführt.

	ACTBP-2	D3S1234	D3S1300	L17686
	Bl Blc	Bl Blc	Bl Blc	Bl Blc
12	L L			
25	L	L L	L L	M
30			L L	M M
49	L L			

Tabelle 28 Darstellung der gleichermaßen in zellfreier und zellulärer DNA aus der BL gefundenen Mikrosatellitenalterationen (Patienten 12, 25, 30 und 49)

4.8 Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in der zellfreien DNA aus der BL und Zigarettenkonsum

Der Nachweis von Mikrosatellitenalterationen stellt sich in unseren Untersuchungen unabhängig von dem Nikotinabusus der Patienten dar. In Abbildung 11 wurden jeweils die Kollektive der Patienten mit respektive ohne Nachweis von MA in der zellfreien DNA aus der BL (Trennung von Tumorpatienten und Kontrollgruppe) bezüglich ihres Nikotinkonsums verglichen. Bei den Tumorpatienten zeigt sich ein nahezu identischer Nikotinabusus in den beiden Gruppen. In der Kontrollgruppe finden sich unter den fünf Patienten, bei denen ein oder zwei MA nachgewiesen wurden, sogar drei der insgesamt neun Nichtraucher aus der Kontrollgruppe.

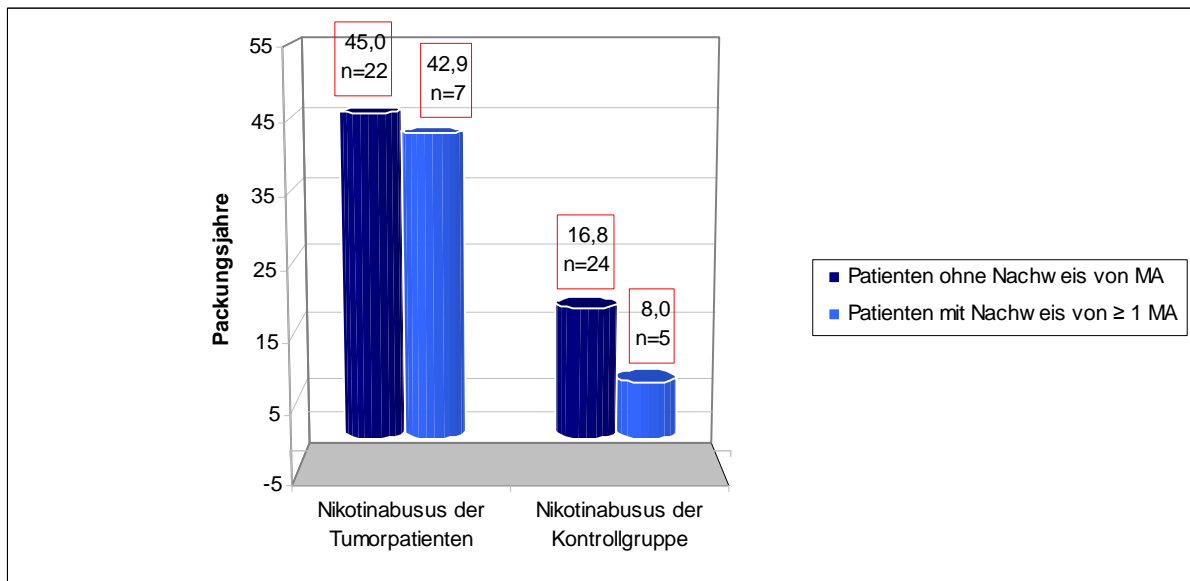


Abbildung 11 Nikotinabusus in Abhängigkeit von dem Nachweis von MA in der zellfreien DNA aus der BL getrennt nach Tumorpatienten und Kontrollgruppe (Angaben oberhalb der Säulen: durchschnittlicher Nikotinabusus in Packungsjahren, Patientenzahl)

4.9 Fehlende Analysen und nichtinformative Mikrosatellitenmarker

In den folgenden Tabellen sind die prozentualen Anteile nichtinformativer Mikrosatellitenmarker (Tabelle 29) und die aufgrund von einem Mangel an Untersuchungsmaterial nicht durchgeführten Mikrosatellitenanalysen (Tabelle 30) aufgeführt. Bezüglich Ersterem fällt insbesondere auf, dass die beiden Marker des kurzen Arms von Chromosom 3 in etwa einem Drittel der Patienten nicht informativ waren.

	ACTBP-2	D3S1234	D3S1300	L17686	UT5320	D20S82	D9S171	D9S942
Informativ [%]	89,8 %	66,1 %	64,4 %	91,5 %	89,8 %	94,5 %	71,2 %	81,6 %
Nicht-Informativ [%]	10,2 %	33,9 %	35,6 %	8,5 %	10,2 %	5,5 %	28,8 %	18,4

Tabelle 29 Prozentualer Anteil der hetero- und homozygoten Ausprägung der einzelnen Mikrosatellitenmarker in dem untersuchten Patientenkollektiv

Zellfreie DNA aus der BL	
Fehlende Analysen insgesamt	59/472 (12.5%)
Tumorpatienten	43/240 (17.9%)
Kontrollpatienten	16/232 (6.9%)
Zelluläre DNA aus der BL	
Fehlende Analysen insgesamt	47/472 (10.0%)
Tumorpatienten	33/240 (13.8%)
Kontrollpatienten	14/232 (6.0%)

Tabelle 30 Nicht durchgeführte Mikrosatellitenanalysen in den einzelnen Gruppen und Kompartimenten (59 eingeschlossene Patienten, acht Mikrosatellitenmarker, 472 Mikrosatellitenanalysen jeweils in zellulärer und zellfreier Phase der BL)

5 Diskussion

Der diagnostische Algorithmus bei Verdacht auf ein Lungenkarzinom beinhaltet grundsätzlich eine Bronchoskopie inklusive der Gewinnung von Bronchialsekret in Form einer Bronchiallavage. In diesem Kontext wird die Bronchiallavage derzeit ausschließlich für die zytologische Analyse bezüglich des Nachweises von malignen Zellen verwendet.

Die diagnostische Bedeutung der Bronchiallavage bei Verdacht auf eine pulmonale Neoplasie ist gegenwärtig verhältnismäßig gering. Im Falle eines endoskopisch nicht sichtbaren Lungentumors ist die BL nur in 36-52 % der Fälle diagnostisch (8).

Basierend auf den Kenntnissen zu zellfreien Nukleinsäuren in Serum und Plasma und anderen Körperflüssigkeiten bei Tumorpatienten sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob (i) zellfreie DNA in der BL regelhaft nachweisbar ist, (ii) in welcher Quantität sich diese extrahieren lässt und (iii) ob sich ein Hinweis für die Existenz von Tumor-DNA bei Patienten mit Lungenkarzinomen ergibt.

Zellfreie DNA aus der BL könnte ein neues Kompartiment für die auf molekularen Tumormarkern basierende Frühdiagnostik sein.

5.1 Nachweis zellfreier DNA in der bronchialen Lavage

In der vorliegenden Arbeit wurde, gemäß der aktuellen Literatur erstmalig, zellfreie DNA aus der bronchialen Lavage von 59 Patienten isoliert und durch molekularbiologische Untersuchungen weiter charakterisiert.

Der Nachweis zellfreier DNA gelang ausnahmslos bei allen Patienten. Die Extraktion der zellfreien DNA aus der BL erfolgte durch zwei verschiedene Methoden, die nacheinander etabliert wurden, die DNA-Extraktion mit heißem Phenol und Isopropanol (hPIP) und die Extraktion mit dem QiaAMP® DNA Blood Mini Kit (QiaAMP) in einer modifizierten Form.

Eine Vergleichbarkeit der beiden Extraktionsverfahren in Bezug auf die DNA-Ausbeute ist durch die Berechnung des DNA-Gehaltes pro Volumeneinheit der bronchialen Lavage möglich (Tabelle 17). In Kenntnis der jeweils in die Extraktion eingesetzten Volumina an Bronchiallavage konnte eine günstigere Ausbeute für die Verwendung des QiaAMP® DNA Blood Mini Kit gezeigt werden, wenngleich die Mengenunterschiede keine statistische Signifikanz erreichten ($p > 0,05$). Einschränkend ist zu sagen, dass kein direkter Vergleich der Extraktionsmethoden mit dem gleichen Ausgangsmaterial durchgeführt wurde. Neben der geringeren Ausbeute besitzt die hPIP-Extraktion weitere Nachteile. Sie erfordert einen höheren, logistischen Aufwand, da die ersten Extraktionsschritte umgehend nach Materialakquise

erfolgen müssen und ist insgesamt arbeits- und zeitintensiver. Aus diesen Gründen erfolgten nach Etablierung der QiaAMP-Extraktion sämtliche DNA-Isolationen aus der zellfreien BL mit diesem Verfahren.

Nach der Extraktion wurde die zellfreie DNA mit drei PCR-basierten Methoden analysiert, darunter eine quantitative Methode (rt-qPCR) und zwei qualitative Methoden (Erfolgskontrolle nach Extraktion, Mikrosatellitenanalyse), eine ausreichende Quantität und Qualität der isolierten, zellfreien DNA für PCR-Analysen kann dementsprechend angenommen werden.

5.2 Quantifizierung der extrahierten, zellfreien DNA aus der bronchialen Lavage

5.2.1 Interpretation der Ergebnisse

Die BL setzt sich aus steriler Kochsalzlösung und endobronchialen Sekret zusammen. Makroskopisch imponieren ausgeprägte Variationen des Bronchialsekretes hinsichtlich Menge, Charakter (putride, serös, blutig tingiert) und Viskosität. Entsprechend war bereits präanalytisch eine hohe Variabilität der Menge an zellfreier DNA zwischen den Proben sehr wahrscheinlich.

Die Quantifizierung der zellfreien DNA in der BL ergab Konzentrationen zwischen 0,1 ng/ml und 3,9 µg/ml, einer Streuung über fünf dekadische Potenzen entsprechend. Der Mittelwert betrug in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktionsmethode 481 ng/ml BL (hPIP) respektive 1964 ng/ml BL (QiaAMP), der Median lag bei 38,7 (hPIP) respektive 154,5 ng/ml BL (QiaAMP).

Vergleichswerte bezüglich der Konzentration zellfreier DNA in der BL sind in der aktuellen Literatur lediglich in einer Publikation aus unserer Arbeitsgruppe zu finden, deren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nachfolgten (67). Unter Verwendung gleicher Methoden für DNA-Extraktion (QiaAMP) und -Quantifizierung zeigte sich bei Schmidt et al. ein etwas niedrigerer DNA-Gehalt. Bei den Patienten mit Lungenkarzinom wurde ein Mittelwert von 85 ng/ml BL (n=9) und bei den Kontrollpatienten von 93 ng/ml BL nachgewiesen. Die potentielle Bedeutung der zellfreien DNA aus der BL für die Diagnostik wurde in der Arbeit von Schmidt et al. insbesondere durch den direkten Vergleich von Plasma und BL hervorgehoben. Die simultane Extraktion und Quantifizierung innerhalb eines Individuums ergab signifikant höhere Konzentrationen an zellfreier DNA in der BL.

Vergleiche mit Quantifizierungen zellfreier DNA aus Serum und Plasma anderer Publikationen besitzen aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Extraktions- aber auch Quantifizierungsmethoden nur eingeschränkte Aussagekraft. Die durchschnittlichen DNA-Konzentrationen in den Untersuchungen im

Serum und Plasma lagen zwischen 3,7 und 594 ng/ml bei Tumorpatienten und zwischen 1,8 und 78 ng/ml bei Kontrollpatienten (41).

Zellfreie DNA im Sputum wurde erst in einer einzigen Publikation beschrieben. Van der Drift et al. fanden DNA-Konzentrationen von 312 ± 61 ng/ml Sputum (Mittelwert \pm SD) bei Tumorpatienten und 1033 ± 227 ng/ml bei Kontrollpatienten (rt-qPCR, humanes β -Globin) (49).

Nachdem zellfreie DNA im Plasma und Serum nachgewiesen wurde und die anteilige Existenz von Tumor-DNA als bewiesen galt, wurde in einer Vielzahl von Publikationen untersucht, ob sich Tumor- und Nichttumorpatienten allein durch die DNA-Konzentration unterscheiden ließen. Die Antwort auf diese Frage ist bis heute nicht eindeutig beantwortet. Zusammenfassend konnten in den meisten Studien höhere DNA-Konzentrationen bei den Patienten mit Lungenkarzinom detektiert werden, wenngleich nicht immer eine statistische Signifikanz erreicht wurde. Zudem bestanden in der Regel unzureichende, diagnostische Sensitivitäten und Spezifitäten im Hinblick auf die Differenzierung von Tumor- und Kontrollpatienten.

Für die zellfreie DNA in der BL konnte in unseren Untersuchungen kein signifikanter Unterschied im DNA-Gehalt pro Volumeneinheit BL zwischen Tumor- und Kontrollpatienten identifiziert werden ($p > 0,05$, Tabelle [Abschnitt Ergebnis 3.3.5]). Die Aussagekraft unserer Untersuchungen ist aufgrund der geringen Patientenzahl und der hohen Varianz der DNA-Konzentrationen allerdings limitiert. Die Ergebnisse stimmen überein mit denen von Van der Drift, welcher in den DNA-Konzentrationen an zellfreier DNA im Sputum ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollpatienten nachweisen konnte (49).

5.2.2 Methodenkritik

Für die Quantifizierung der extrazellulären DNA aus der BL wurde eine quantitative real-time PCR (rt-qPCR) etabliert. Für den Nachweis sehr geringer DNA-Konzentrationen ist die Methode der rt-qPCR aufgrund der hohen Sensitivität, Akkuratess, Reproduzierbarkeit und Zeiteffektivität am Besten geeignet.

Die Methode wurde von Yuan et al. (64) beschrieben und für die vorliegende Verwendung modifiziert. Im Unterschied zu Yuan et al. wurde ein interkalierender Farbstoff (SYBR® Green) und keine FRET-Sonde (fluorescence resonance energy transfer) verwendet. Der Vorteil in der Verwendung einer FRET-Sonde liegt in der Steigerung der Spezifität. Um eine vergleichbare Spezifität zu gewährleisten, erfolgte einmalig die Verwendung einer FRET-Sonde im Rahmen der Etablierung der rt-qPCR. Darüber hinaus wurde eine Sequenzierung der PCR-Produkte der rt-qPCR und des klonierten Plasmides durchgeführt.

Die Präzision der Methode ist direkt abhängig von der Qualität der Standardkurve. Nach Etablierung des rt-qPCR-Assays wurden drei Verdünnungsreihen mit vorangehender, UV-spektroskopischer Quantifizierung der Stammlösung hergestellt und analysiert. Die Amplifikation erfolgte jeweils in drei PCR-Ansätzen. Relevante Intra- und Inter-Assay-Variationen konnten auf diese Weise ausgeschlossen werden. Die lineare Beziehung zwischen den gemittelten C_T -Werten der Standardkurven und der jeweiligen Kopiezahl, in halblogarithmischer Auftragung (senkrecht), ist im Ergebnisteil dargestellt (Abbildung 2 im Ergebnisteil). Die anhand der Standardkurve berechneten Effizienzen der rt-qPCR (96,9 %- 102,7 %) gleichen denen, die von Yuan et al. publiziert wurden. Eine Effizienz der rt-qPCR über 100 % , wie errechnet für die Standardkurve II (102,7 %), ist naturgemäß nicht möglich, eine Effizienz nahe 100 % ist anzunehmen.

5.3 Mikrosatellitenanalyse

5.3.1 Interpretation der Ergebnisse

Über den Nachweis zellfreier DNA in der BL hinaus, sollte die Frage nach der Existenz von Tumor-DNA bei Patienten mit diagnostiziertem Lungenkarzinom beantwortet werden.

Unter diesem Gesichtspunkt erschienen MA besonders geeignet. Für beide Formen der Mikrosatellitenalteration konnte in der Vergangenheit ein Vorkommen im Tumorgewebe von Lungenkarzinomen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.4). Darüber hinaus weist die Identifikation einer MA in zellfreier DNA aus einem klinischen Spezimen wie der BL darauf hin, das ein klonales Wachstum einer Zellpopulation mit einer tumorassoziierten, genetischen Alteration existiert. Diese Annahme gilt sowohl für den LOH als auch für die MIN. Die Kombination aus klonalem Wachstum und tumortypischer, genetischer Alteration wurde in der Vergangenheit als weitgehend tumorspezifisch angesehen (68). Diesbezüglich wurden sowohl Arbeiten zu dem LOH als auch der MIN respektive beiden in verschiedenen Tumorentitäten publiziert.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Mikrosatellitenanalyse zum Nachweis von MA für acht Mikrosatellitenmarker in sechs unterschiedlichen, chromosomalen Regionen etabliert. Die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Mikrosatellitenmarker erfolgte gemäß eigener Vorarbeiten und nach Auswertung der aktuellen Literatur.

Die Allelotypisierung von Tumorgewebe aus den verschiedenen, histologischen Subtypen des Lungenkarzinoms hat multiple Regionen ergeben, in denen regelmäßig Allelverluste nachweisbar sind (26). Im Vergleich der NSCLC und SCLC-Tumoren sind einzelne Regionen in ähnlicher Frequenz betroffen, während andere Regionen bevorzugt in einzelnen Subtypen auftreten (69;70). Die

Mikrosatellitenmarker im Bereich des kurzen Arms von Chromosom 3 (D3S1243, D3S1300) und Chromosom 9 (D9S171, D9S942) stellen regelmäßig deletierte Areale in beiden Subtypen dar. Insbesondere die Deletion im Bereich Chromosom 3p gehört zu den frühesten und häufigsten Ereignissen in der Karzinogenese des Lungenkarzinoms (71).

Bei den Mikrosatellitenmarkern ACTBP-2, L17686, D20S82 und UT5320 handelt es sich um Tetranukleotidrepeatmarker mit der Wiederholungssequenz $AAAG_{(n)}$, die gemäß der aktuellen Literatur eine erhöhte Frequenz für MIN bei Lungenkarzinomen aufweisen, was als EMAS_T bezeichnet wurde (25;72). Allelverluste konnten für diese Marker gleichermaßen gezeigt werden.

Diskussion der Befunde bei den Tumorpatienten

Durch die Mikrosatellitenanalyse konnte gezeigt werden, dass MA in der zellfreien DNA prinzipiell nachweisbar sind. Darüber hinaus lassen sich die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in Tumor- und Kontrollpatienten durch die nachfolgenden Argumente als Indiz für die Existenz von Tumor-DNA interpretieren.

- (1) Mehr Patienten mit \geq einer MA in der Gruppe der Tumorpatienten (8 vs. 5)
- (2) Mehr als doppelt so viele MA in der Gruppe der Tumorpatienten (13 vs. 6)

Ein drittes Argument wäre der Nachweis identischer MA in dem zugehörigen Tumorgewebe. Infolge eines Mangels an korrespondierenden Tumorgeweben konnten entsprechende Untersuchungen jedoch nur exemplarisch durchgeführt werden (Daten nicht dargestellt).

Auffällig an den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse in den Tumorpatienten ist, dass nur in acht der 30 Tumorpatienten MA in der zellfreien DNA identifiziert werden konnten. In den zugehörigen Tumorgeweben wäre eine deutlich höhere Zahl an MA zu erwarten gewesen. Entsprechend muss davon ausgegangen werden, dass die MA nur partiell in der zellfreien DNA defektiert werden konnten. Die Ursache hierfür ist am Ehesten in der gleichzeitigen Existenz von nicht-alterierter Wildtyp-DNA zu sehen, welche die MA ab einem bestimmten Mengenverhältnis (Sensitivität s. unten) maskiert. Mit dieser Interpretation lässt sich auch der Nachweis mehrerer MA in einigen wenigen Tumorpatienten gut vereinbaren. In diesen Patienten ist ein, im Sinne der Mikrosatellitenanalyse, günstiges Verhältnis von Tumor-DNA und normaler, nicht-alterierter Wildtyp-DNA anzunehmen.

Die Frage nach dem Anteil an Tumor-DNA stellte sich auch für die zellfreie DNA in Serum und Plasma. Jahr et al. führten diesbezüglich Untersuchungen durch und fanden prozentuale Anteile zwischen 3 % und 93 % an Tumor-DNA (73). Ähnliche Verhältnisse sind im Falle der zellfreien DNA aus der BL anzunehmen, Analysen gemäß Jahr et al. könnten hierüber Aufschluss erbringen.

Die Untersuchungen dienten dem Nachweis eines grundsätzlichen Prinzips, nämlich der Existenz von Tumor-DNA in der zellfreien DNA aus der BL. Daher ist die Spezifität der Methode für den Nachweis einer MA von größerer Bedeutung als deren Sensitivität. Dementsprechend wurden ausschließlich eindeutige und reproduzierbare MA dokumentiert, was ebenfalls zu einer falsch-niedrigen Rate an gefundenen MA geführt haben könnte.

Histologische Subgruppen im Vergleich bezüglich des Nachweises von MA

Die Mikrosatellitenanalyse ergab eine signifikant höhere Zahl an Patienten mit Nachweis von MA in der Gruppe der SCLC-Patienten im Vergleich mit den NSCLC-Patienten ($p=0,02$). Die Tendenz ist auch in der zellulären DNA aus der BL zu erkennen, eine statistische Signifikanz hingegen nicht ($p=0,12$). Eine Betrachtung der NSCLC-Subgruppen ist angesichts der niedrigen Zahlen an MA nicht sinnvoll.

In vier Publikationen erfolgten simultane Mikrosatellitenanalysen im Tumorgewebe von NSCLCs und SCLCs. In den Arbeiten von Allan (74) und Pylkkanen et al. (75) konnten gleichermaßen höhere Frequenzen an MA in den SCLC-Tumoren identifiziert werden. Beau-Faller et al. und Bruhn et al. hingegen fanden in beiden Subgruppen ähnliche Verhältnisse (76;77).

Der Grund für den vermehrten Nachweis von MA bei Patienten mit SCLC verbleibt unklar. Für die Interpretation müsste man zunächst die exakten Verhältnisse im Tumorgewebe der Patienten kennen.

Endoskopisches Wachstumsmuster der Tumoren und MA

In unseren Untersuchungen zeigte sich erwartungsgemäß eine höhere Prävalenz von MA in der zellfreien DNA von Tumorpatienten, deren Tumor sich endoskopisch darstellen ließ. Wenngleich der Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte, so erhöhte dieses Ergebnis dennoch die Plausibilität der Untersuchungen und unterstützt die Hypothese, dass die MA auf DNA aus dem Tumorgewebe zurückzuführen sind.

Interessanterweise zeigte sich dieser Zusammenhang nicht bei Betrachtung der MA in der zellulären DNA aus der BL. Die Bedeutung dieses Unterschiedes ist unklar. Für das Sputum ist bekannt, dass sich maligne Zellen bei zentraler Lokalisation des Tumors zytologisch häufiger nachweisen lassen. Entsprechend wäre der o.g. Zusammenhang auch für die Ergebnisse in der zellulären DNA aus der BL zu erwarten gewesen.

MA und Zytologie

Die zytologischen Befunde hatten keinen statistisch relevanten Einfluss auf die Häufigkeit des Nachweises von MA in der zellfreien und der zellulären DNA aus der BL (Tabelle 23).

Liloglou (60) und Field (58) et al. konnten in ihren Untersuchungen an zellulärer DNA aus der BL ebenfalls keinen Zusammenhang feststellen. Die Gruppe um Powell et al. unternahm den Versuch die Spezifität der MA in der zellulären DNA für Tumorpatienten zu erhöhen, indem sie für jeden Patienten einen LOH-Score errechneten (59). Dieser schloss die Zahl der alterierten Marker und den proportionalen Anteil an Zellen mit dem jeweiligen LOH (Berechnung nur mit der fluoreszenzbasierten Detektionsmethode möglich) mit ein. Der LOH-Score wiederum zeigte eine Korrelation mit den zytologischen Ergebnissen.

Diskussion der Befunde bei den Kontrollpatienten

Fünf der 29 tumorfreien Patienten, einem prozentualen Anteil von 17,2 % entsprechend, wiesen sechs MA in der zellfreien DNA auf. Wenngleich nur im Falle des Patienten 44 zwei MA nachweisbar waren und es sich ansonsten nur um einzelne MA handelte, erscheint die Zahl der betroffenen Patienten verhältnismäßig hoch. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass es sich nicht um eine gesunde Kontrollgruppe handelt. Das Einschlusskriterium bestand in der Indikation zur Bronchoskopie, sowie dem sicheren Ausschluss eines Lungenkarzinoms. Sämtliche Patienten besaßen daher entweder eine pulmonale Symptomatik oder eine Lungenerkrankung, die die Indikation zur Bronchoskopie nach sich zog.

Interessanterweise fanden sich unter den fünf Kontrollpatienten mit Nachweis von MA drei der neun Nichtraucher aus der Kontrollgruppe. Bei zwei dieser Patienten (Pat. 37/52) wurde eine Sarkoidose diagnostiziert. Die Existenz von MA bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose in zellulärer DNA aus induziertem Sputum wurde durch Vasillakis et al. untersucht und bestätigt (34), was die MA in diesen beiden Nichtrauchern erklären könnte. Bei dem dritten Nichtraucher (Pat. 49) handelte es sich um eine ältere Patientin (75 Jahre) mit einer schwergradigen, purulenten Tracheobronchitis. Die MA bei dieser Patientin zeigte sich als einzige der MA bei den Kontrollpatienten konkordant in zellfreier und zellulärer DNA. Die Ursache verbleibt unklar.

Bei den Patienten 44 und 54 wurde ein relevanter Nikotinabusus dokumentiert. Einerseits konnte sowohl in unseren als auch in den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen kein eindeutiger Zusammenhang bezüglich MA in zellfreier respektive zellulärer DNA aus Lavage und den Rauchgewohnheiten identifiziert werden (58;60). Andererseits konnten zwei Arbeitsgruppen MA in normalem und präneoplastischem Bronchialepithel in hoher Zahl bei aktiven und ehemaligen Rauchern ohne Tumorerkrankung nachweisen (30;31). In beiden Arbeiten wurden insbesondere auch die chromosomalen Regionen 3p14.2 und 9p21 analysiert.

Die Patientin 44 litt außerdem an einer systemischen Sklerodermie. Die Assoziation von MA mit chronisch inflammatorischen Prozessen und autoimmunen Erkrankungen wurde vermutet, basierend auf

Mikrosatellitenanalysen in Patienten mit COPD (32), idiopathisch pulmonaler Fibrose (35) und rheumatoider Arthritis (78).

Die fünf Kontrollpatienten mit Nachweis von MA zeigten im Durchschnitt ein höheres Alter als die Kontrollpatienten insgesamt (69 vs. 55 Jahre). Frauen waren in der Gruppe der Kontrollpatienten mit Nachweis von MA überrepräsentiert (2/5 vs. 5/22).

Vergleich der MA in der zellfreien DNA in Tumor- und Kontrollpatienten

Eine Differenzierung zwischen Tumor- und Kontrollpatienten lässt sich durch die Mikrosatellitenanalyse in zellfreier DNA mit den von uns verwendeten, acht untersuchten Mikrosatellitenmarkern nicht erreichen. Betrachtet man die Untersuchungen als diagnostischen Test und unterscheidet Patienten mit respektive ohne Nachweis von ein oder mehreren MA, ist sowohl die Sensitivität mit 26,7 % als auch die Spezifität mit 82,8 % für eine Differenzierung unzureichend.

Die Kombination der Mikrosatellitenanalyse mit den zytologischen Ergebnissen ergibt immerhin eine Sensitivität von 43 % (13/30) bei gleich bleibender Spezifität. Kombiniert man die Ergebnisse aus zellfreier und zellulärer DNA, sowie der Zytologie, so erhält man eine Sensitivität von 53 % (16/30) bei einer Spezifität von 79 %.

Es ist anzunehmen, dass sich die Sensitivität durch die Verwendung zusätzlicher Mikrosatellitenmarker, sowie durch den Einsatz der fluoreszenzbasierten Detektionsmethode weiter steigern lässt. Demgegenüber steht jedoch die verhältnismäßig hohe Zahl an Kontrollpatienten mit MA. Wenngleich wenig verwendbar in der Unterscheidung der beiden Kollektive, so sollte die Tatsache, dass in der Gruppe der Tumorpatienten mehr als doppelt so viele MA wie bei den Kontrollpatienten (13 vs. 6) detektiert wurden, nicht unerwähnt bleiben.

Die Bezeichnung Krebs-spezifische, genomische Instabilität (CSGI = cancer specific genomic instability) wurde durch Liloglou et al. geprägt (60). In ihren Untersuchungen zur MA in zellulärer DNA aus der BL konnten sie zeigen, dass die einzelnen Mikrosatellitenmarker eine sehr unterschiedliche Diskriminationsfähigkeit besaßen. Daher sprachen sie von CSGI in den Markern, die bevorzugt bei den Tumorpatienten MA aufwiesen, nicht aber bei den Kontrollpatienten.

In unseren Untersuchungen zeigten sich zwei Marker, deren Analyse jeweils zwei MA in den Tumorpatienten und keine bei den Kontrollpatienten (D9S171, D20S82) ergab. Angesichts der geringen Zahlen an MA und auch an eingeschlossenen Patienten ist die Herausstellung dieser beiden Marker jedoch mit Zurückhaltung zu betrachten.

MA in der zellfreien und zellulären DNA im Vergleich

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in der zellfreien und zellulären DNA ergaben sich mehrere, interessante Aspekte.

Grundsätzlich unterschieden sich die Ergebnisse hinsichtlich der Frequenz an MA respektive der betroffenen Patienten nur geringfügig. Die Mikrosatellitenanalyse in der zellfreien DNA zeigte eine etwas höhere Sensitivität für den Nachweis von MA in der Gruppe der Tumorpatienten, während die Mikrosatellitenanalyse in der zellulären DNA eine höhere Spezifität für Tumorpatienten aufwies.

Interessanterweise zeigten sich aber nur in sechs Fällen konkordante MA, die verbleibenden 20 MA dagegen verteilten sich auf die beiden Kompartimente (zellfreie und zelluläre DNA). Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Zusammensetzung der DNA in den beiden Kompartimenten differieren muss. Dabei ist prinzipiell vorstellbar, dass der Anteil an alterierter Tumor-DNA in einigen Fällen in der zellfreien und in anderen in der zellulären DNA höher ist und sich entsprechend MA nur, respektive vermehrt in einem der beiden Kompartimente nachweisen lassen. Unter den 10 Tumorpatienten, die eine MA in zellfreier oder zellulärer DNA besaßen, befanden sich sechs Patienten, die ausschließlich

- MA in der zellfreien DNA (n = 3)
- MA in der zellulären DNA (n = 2)
- konkordante MA (n = 1)

aufwiesen. Darüber hinaus zeigten sich aber auch drei Tumorpatienten, bei denen sich in einem Mikrosatellitenmarker in der zellfreien DNA und in einem anderen Mikrosatellitenmarker in der zellulären DNA eine MA nachweisen ließ. Eine potentielle Erklärung könnte darin bestehen, dass zellfreie und zelluläre DNA eine unterschiedliche Herkunft aufweisen, beispielsweise genetisch verschiedene Subpopulationen des Tumors.

Der Vollständigkeit halber sei noch der 10. Patient erwähnt, bei dem zwei Mikrosatellitenmarker konkordante MA aufwiesen und ein dritter Mikrosatellitenmarker eine weitere MA isoliert in der zellfreien DNA zeigte.

Untersuchungen zu MA in den Zellen aus der BL wurden in der Vergangenheit in vier Arbeiten publiziert (57-60). Dabei fokussierten Ahrendt et al. ihre Untersuchungen ausschließlich auf die MIN, Angaben über LOHs wurden nicht gemacht (57). Entsprechend sind die Ergebnisse dieser Arbeit nur bedingt vergleichbar. Field et al. fanden in 15 von 43 Tumorpatienten (35 %) ein oder mehrere MA (58). Als Detektionsmethode wurde die Silberfärbung verwendet, eine Methode die der fluoreszenzbasierten Methode gleichermaßen unterlegen ist. Die Ergebnisse stimmen mit den Unsrigen

verhältnismäßig gut überein, die etwas höhere Sensitivität (35 % vs. 23 %) lässt sich gut durch die Verwendung von 15 anstelle von acht Mikrosatellitenmarkern erklären. In ihrer Kontrollgruppe, die aus Patienten mit nicht bestätigtem Verdacht eines Lungenkarzinoms bestand, fanden sich sogar in 23 % der Patienten ein oder mehrere MA. Liloglou und Powell et al. verwendeten in ihren Untersuchungen die überlegene, fluoreszenzbasierte Defektionsmethode und fanden in 73,9 % respektive 79 % der Tumorpatienten ein oder mehrere MA (59;60). Besonders eindrucksvoll an den Untersuchungen von Liloglou et al. erscheint, dass die Ergebnisse mit nur vier Mikrosatellitenmarkern erreicht wurden, darunter auch der von uns verwendete Marker D3S1300 (60). In beiden Arbeiten wurden aber auch MA in 23 – 29 % der Kontrollpatienten nachgewiesen. Zusammenfassend lassen sich unsere Ergebnisse bezüglich MA in der zellulären DNA aus der BL gut in die bereits publizierten Ergebnisse einordnen.

EMAST in zellfreier und zellulärer DNA aus der BL

MIN zeigten sich unter den detektierten MA deutlich unterrepräsentiert. Unter den 19 MA in der zellfreien DNA respektive 13 MA in der zellulären DNA befanden sich jeweils nur drei MIN. Die Auswahl der verwendeten Mikrosatellitenmarker orientierte sich unter anderem an den Arbeiten zu den EMAST-Tumoren (25;72). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass selektierte Tetranukleotidrepeatmarker mit der Wiederholungseinheit AAAG(n) im Falle der Lungenkarzinome vermehrt MIN aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden vier dieser Marker eingesetzt.

In beiden Kompartimenten wurden jeweils drei MIN nachgewiesen. Diese verhältnismäßig niedrige Zahl an MIN stimmt gut mit den Resultaten von Ahrendt et al. überein (57). Ahrendt et al. fanden MIN in hoher Frequenz im Tumorgewebe. Aber nur in 14 % dieser Fälle konnte die MIN gleichermaßen in der zellulären DNA aus der BL nachgewiesen werden. Dabei zeigten die von uns verwendeten fünf EMAST-Marker eine MIN im Tumorgewebe in jeweils 2 – 14 % der untersuchten Patienten.

Erwähnenswert ist, dass fünf der nachgewiesenen MIN den EMAST-Marker L17686 betrafen, die sechste MIN imponierte im Dinukleotid-Mikrosatellitenmarker D9S171. Zwei der fünf MIN konnten in der zellfreien DNA detektiert werden, allerdings jeweils einer in der Gruppe der Tumor- und der Kontrollpatienten. Die verbleibenden drei MIN wurden in der zellulären DNA bei Tumorpatienten nachgewiesen. Demzufolge wäre eine Anwendung des Markers L17686 in der Diagnostik nur in der zellulären DNA sinnvoll.

EMAST wurde für die Lungenkarzinome bisher nur in NSCLC-Tumoren untersucht. Umso interessanter erscheint, dass der Mikrosatellitenmarker L17686, der in beiden Publikationen zu EMAST bei NSCLC-Tumoren verwendet wurde (25;72), in unseren Untersuchungen ausschließlich in SCLC-Tumoren MA aufwies. Analoge Untersuchungen im Tumorgewebe von SCLC-Tumoren könnten hier weitere Erkenntnisse bringen.

MA und Nikotinabusus

In unseren Untersuchungen stellte sich der Nachweis von MA in der zellfreien DNA unabhängig von dem Nikotinabusus der jeweiligen Patienten dar. Dabei ist zu beachten, dass nur zehn Nichtraucher in die Untersuchungen eingeschlossen wurden und dass die Einschätzung der Quantität des Nikotinabusus bei den aktiven und ehemaligen Rauchern einer gewissen Ungenauigkeit unterliegt. Dementsprechend ist nicht zu erwarten, mit den vorliegenden Daten differenziertere Zusammenhänge aufzudecken.

In Abbildung 11 konnte gezeigt werden, dass sich die Kollektive mit respektive ohne Nachweis von MA in Bezug auf den Nikotinabusus nicht statistisch relevant unterschieden. Field, Lilogou und Powell et al. konnten in ihren Untersuchungen zur MA in der zellulären DNA aus der BL ebenfalls keine Korrelation zwischen MA und Nikotinabusus aufzeigen (58-60).

In Kenntnis der Arbeiten von Wistuba (31) und Mao et al. (30) überrascht der fehlende Zusammenhang zunächst. In beiden Arbeitsgruppen erfolgte der Nachweis multipler MA in normalen und abnormalen, endobronchialen Epithelien bei aktiven und ehemaligen Rauchern, während die Kontrollpopulation aus Nichtrauchern keine MA aufwies. Dazu muss allerdings gesagt werden, dass die verwendete DNA durch Mikrodissektion gewonnen wurde. Entsprechend handelte es sich dabei ausschließlich um epitheliale DNA aus einem umschriebenen Areal mit allenfalls minimaler Kontamination durch DNA aus umgebenden Zellen. Zellfreie und zelluläre DNA hingegen stellen ein Gemisch dar, so dass MA, die nur in einem geringen Anteil der DNA vorhanden sind, maskiert werden.

5.3.2 Methodenkritik

Gemäß unserer Erwartungen stellt die zellfreie DNA aus der BL ein Gemisch aus Tumor- und Wildtyp-DNA dar. Für die Identifikation eines LOHs im Vergleich mit der MIN ist ein höherer Anteil an Tumor-DNA erforderlich.

Die Auswertung der Mikrosatellitenanalyse erfolgte in der vorliegenden Arbeit visuell durch zwei unabhängige Untersucher.

Für die Detektion eines LOHs wurde festgelegt, dass die Reduktion eines der beiden Allele um mindestens 50 % im Vergleich mit der unveränderten Wildtyp-DNA betragen muss. Theoretisch muss also die isolierte, zellfreie DNA aus der BL zu mindestens 50 % aus, im Sinne des jeweiligen LOHs, gleichartig veränderter DNA bestehen.

Für den Nachweis einer MIN mittels eines vergleichbaren Mikrosatellitenanalyse-Assays führten Mao et al. Verdünnungsreihen durch. Sie konnten zeigen, dass sich der Bandenshift auch bei einem prozentualen Anteil an Tumor-DNA zwischen 0,1 % und 0,5 % Tumor-DNA noch nachweisen ließ (22).

Übertragen auf Zelläquivalente ist also ein Tumorzelläquivalent auf 200 bis 1000 normale Zellen für den Nachweis erforderlich.

Eine hohe Spezifität wurde als besonders wichtig erachtet, da es sich um eine Studie zum Nachweis eines grundsätzlichen Prinzips handelte. Nach Etablierung der PCR für die jeweiligen Mikrosatellitenmarker wurden die PCR-Produkte grundsätzlich einmal sequenziert, um ein Mispriming oder Primer-Dimere auszuschließen. Die Auswertung erfolgte zweimalig durch zwei unabhängige Untersucher, bei divergenter Beurteilung wurde im Konsens entschieden. Einer Kontamination der PCR wurde durch Einhaltung der gängigen Sorgfaltspflichten bei Durchführung molekularbiologischer Analysen, sowie durch Wiederholungsanalysen vorgebeugt.

Bezüglich der Mikrosatellitenanalyse wurde die Generierung von artefiziellen MA, sowohl von LOHs als auch MINs, in Abhängigkeit von der DNA-Template-Menge in der Literatur beschrieben. Primerdimerisation oder Mispriming führten dabei zu der Entstehung neuer Banden im Sinne einer MIN, während die überproportionale Vervielfältigung eines der beiden Allele und damit Ausfall des anderen Allels (engl. allelic dropout) die Entstehung artefizieller LOHs bewirkte. Sieben et al. führten Mikrosatellitenanalysen mit unterschiedlichen Template-Mengen durch und konnten eine enge Korrelation mit der Artefaktentstehung nachweisen (79). Unterhalb von 5 ng DNA-Template zeigte sich eine exponentielle Steigerung. Ein Artefakt wurde durch Diskrepanzen des PCR-Musters im Rahmen der Wiederholungsanalysen definiert. Die quantitative Analyse unserer DNA-Isolate ergab, dass die Grenze von 5 ng DNA-Template in der vorliegenden Arbeit, z.T. sogar deutlich, unterschritten wurde. Um die Dokumentation artefizieller MA sicher auszuschließen, wurden nur MA als solche anerkannt, wenn sie sich in mehrfachen Mikrosatellitenanalysen (Screening- und Bestätigungsanalysen) und mit unterschiedlichen DNA-Template-Mengen reproduzieren ließen. Nicht reproduzierbare Ergebnisse wurden entsprechend nicht dokumentiert. Aus diesem Handlungsalgorithmus geht hervor, dass eine hohe Spezifität angestrebt wurde, potentiell auch auf Kosten der Sensitivität.

Die Mikrosatellitenanalyse erfolgte als PCR-basierte Methode mit anschließender PAGE und Autoradiographie. Die verwendete Methodik ist aufgrund ihres hohen Arbeits- und Zeitaufwands mittlerweile obsolet. Beide Faktoren wurden durch die Etablierung einer fluoreszenzbasierten Detektionsmethode im Rahmen der PCR-basierten Mikrosatellitenanalyse positiv beeinflusst (80). Die fluoreszenzbasierte Detektion ermöglicht außerdem die Reduktion der Untersucherabhängigkeit, sowie die Verbesserung der Sensitivität der Methode. Liloglou et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass mit der fluoreszenzbasierten Detektion ab einer Intensitätsreduktion einer Bande um 23 % im Vergleich mit nicht-alterierter DNA aus Blutlymphozyten ein LOH sicher identifiziert werden konnte (80). Des Weiteren erbrachte die Etablierung von Multiplex-PCR-Assays und damit der simultanen Analyse von multiplen Mikrosatellitenmarkern eine weitere Zeitersparnis. Letzteres ist

auch unter dem Aspekt des reduzierten DNA-Gehaltes und der Einsparung an Untersuchungsmaterial ein wesentlicher Vorteil.

5.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass extrazelluläre DNA regelhaft und in suffizienter Qualität und Quantität für PCR-basierte, molekularbiologische Untersuchungen aus der BL isoliert werden kann, sowohl bei Tumor- als auch bei Kontrollpatienten.

Der Ursprung der zellfreien DNA ist nicht bekannt. In Anbetracht der Tatsache, dass sich extrazelluläre DNA auch bei tumorfreien Patienten nachweisen lässt, ist anzunehmen, dass die extrazelluläre DNA mehrere Ursprünge hat und die Tumor-DNA nur einen Anteil ausmacht. Neben den Zellen des Tumorgewebes und des Respirationstraktes, könnte auch DNA aus Entzündungszellen enthalten sein. Van der Drift et al. konnten eine Korrelation zwischen der extrazellulären DNA, die sie aus dem Sputum extrahieren konnten, und dem Grad an Inflammation in der Sputumprobe zeigen (49). Ob sich diese Befunde aber auf die zellfreie DNA aus der BL übertragen lassen, ist nicht bekannt.

Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse deuten eindeutig auf die Existenz von Tumor-DNA hin. Simultane Untersuchungen an Tumorgewebe und extrazellulärer DNA aus der BL, sowie größere Patientenkollektive könnten dieses bestätigen.

Darüber hinaus ist eine Erweiterung des Panels an verwendeten, genetischen Markern zu erwägen. Einerseits könnten im Rahmen von Multiplex-PCRs eine größere Zahl von Mikrosatellitenmarkern untersucht werden, andererseits könnten andere, tumorassoziierte, genetische Alterationen, wie beispielsweise Promotormethylierungen und Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen in das zu untersuchende Markerpanel aufgenommen werden.

Die extrazelluläre DNA in der BL stellt ein neues Kompartiment für die Untersuchung molekularer Tumormarker bei Patienten mit dem Verdacht auf ein Lungenkarzinom dar. Weitere Untersuchungen sind allerdings vonnöten.

6 Zusammenfassung

Die frühzeitige Diagnosestellung ist der entscheidende, prognostische Faktor bei einem Lungenkrebsleiden. Folglich sind neue Erkenntnisse in der Lungenkarzinomdiagnostik von größter Relevanz.

Die Bronchoskopie ist ein zentraler Bestandteil dieser Diagnostik. Die Gewinnung von Bronchiallavage als Teil der bronchoskopischen Untersuchung ist ein supplementäres Verfahren, welches insbesondere bei nicht einsehbaren, extrabronchialen oder peripheren Lungenbefunden von Bedeutung ist und bisher ausschließlich der Akquise von zytologischem Material dient.

In der Vergangenheit konnte zellfreie DNA aus dem Serum und Plasma isoliert werden. Es gilt mittlerweile als bewiesen, dass diese zellfreie DNA bei Tumorpatienten zumindest anteilig auch aus dem Tumorgewebe stammt. Basierend auf diesen Kenntnissen sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob (i) und (ii) in welcher Quantität sich extrazelluläre DNA aus der BL isolieren lässt und (iii) ob sich tumorassoziierte, genetische Alterationen, nämlich die Mikrosatellitenalterationen (MA) in diesem neuen, diagnostischen Kompartiment detektieren lassen.

In die Untersuchungen wurden insgesamt 59 Patienten eingeschlossen, darunter 30 Patienten mit einem histologisch gesicherten Lungenkarzinom (24 NSCLC, 6 SCLC) und 29 tumorfreie Patienten mit Indikation zur Bronchoskopie.

Für die Isolation der extrazellulären DNA aus der BL wurden zwei Extraktionsmethoden etabliert, eine DNA-Extraktion mit heißem Phenol und Isopropanol und die DNA-Extraktion mit dem QiaAMP DNA Blood Mini Kit®. Die Extraktion extrazellulärer DNA gelang ausnahmslos in allen Patienten. Dabei zeigte sich die Extraktion mittels des QiaAMP DNA Blood Mini Kit® in Bezug auf Menge, Arbeits- und Zeitaufwand überlegen. Die extrazelluläre DNA wurde mit drei PCR-basierten Methoden erfolgreich analysiert (qualitative Extraktionskontrolle, quantitative real time-PCR und Mikrosatellitenanalyse), so dass von einer ausreichenden Qualität für molekularbiologische Untersuchungen ausgegangen werden kann.

Für die Quantifikation der extrahierten DNA wurde eine quantitative real time-PCR nach Yuan et al. etabliert (64). Die DNA-Konzentrationen variierten in hohem Maße zwischen den einzelnen Patienten. Bezogen auf einen Milliliter BL lagen die DNA-Konzentrationen zwischen 0,1 ng/ml und 3,9 µg, entsprechend einer Streuung über fünf dekadische Potenzen. Signifikante Unterschiede zwischen den Tumor- und Kontrollpatienten bestanden nicht.

Die Analyse zum Nachweis von Mikrosatellitenalterationen (MA) ergab insgesamt 19 MA in der zellfreien DNA aus der BL, darunter 13 MA in der Gruppe der Tumorpatienten und sechs MA in der Gruppe der tumorfreien Patienten. Dabei zeigten die Patienten mit einem SCLC signifikant mehr MA als

die Patienten mit einem NSCLC. Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse lassen auf die anteilige Existenz von Tumor-DNA in der zellfreien DNA aus der BL schließen, da einerseits deutlich mehr MA in der Gruppe der Tumorpatienten nachweisbar waren und andererseits mehr Tumorpatienten als Kontrollpatienten MA aufwiesen. Eine Diskrimination zwischen den beiden Patientengruppen konnte mit den vorliegenden Untersuchungen allerdings nicht erreicht werden.

Die Mikrosatellitenanalyse wurde parallel auch an DNA aus BL-Zellen durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben einerseits eine geringere Zahl an Tumorpatienten mit Nachweis von MA andererseits aber auch weniger MA in den tumorfreien Patienten. Darüber hinaus konnten nur sechs konkordante MA in der zellfreien und zellulären DNA detektiert werden, was auf eine unterschiedliche Herkunft der DNA in den beiden Kompartimenten hinweist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die zellfreie DNA aus der BL ein neues Kompartiment für die Lungenkarzinomdiagnostik mit molekularen Markern darstellt.

7 Literaturverzeichnis

Reference List

- (1) Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. 2008.
- (2) Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001 Jan;51(1):15-36.
- (3) Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997 Jun;111(6):1710-7.
- (4) Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2001 Mar;31(2-3):139-48.
- (5) Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease. 8th ed. Saunders; 2009.
- (6) Drings P, Hoffmann H, Dienemann H. Seltene Tumoren der Lunge. *Onkologe* 1999;5(11):941-7.
- (7) Popovich J, Jr., Kvale PA, Eichenhorn MS, Radke JR, Ohorodnik JM, Fine G. Diagnostic accuracy of multiple biopsies from flexible fiberoptic bronchoscopy. A comparison of central versus peripheral carcinoma. *Am Rev Respir Dis* 1982 May;125(5):521-3.
- (8) van der Drift MA, van der Wilt GJ, Thunnissen FB, Janssen JP. A prospective study of the timing and cost-effectiveness of bronchial washing during bronchoscopy for pulmonary malignant tumors. *Chest* 2005 Jul;128(1):394-400.
- (9) Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976 Oct 1;194(4260):23-8.
- (10) Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7(3):139-46.
- (11) Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Dec 1;90(23):10914-21.
- (12) Wistuba II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol* 2006;1:331-48.
- (13) Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 19;1378(1):F21-F59.
- (14) Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Dec;118(6):1136-52.
- (15) Koreth J, O'Leary JJ, O'D MJ. Microsatellites and PCR genomic analysis. *J Pathol* 1996 Mar;178(3):239-48.
- (16) Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 Feb 15;409(6822):860-921.

- (17) Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007 Jan;1775(1):181-232.
- (18) Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998 Nov 15;58(22):5248-57.
- (19) Arzimanoglou I, Gilbert F, Barber HR. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 1998 May 15;82(10):1808-20.
- (20) Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998 May 21;338(21):1481-7.
- (21) Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003 Mar 15;21(6):1174-9.
- (22) Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Oct 11;91(21):9871-5.
- (23) Wooster R, Cleton-Jansen AM, Collins N, Mangion J, Cornelis RS, Cooper CS, et al. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet* 1994 Feb;6(2):152-6.
- (24) Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 1993 Aug 1;2(8):1123-8.
- (25) Xu L, Chow J, Bonacum J, Eisenberger C, Ahrendt SA, Spafford M, et al. Microsatellite instability at AAAG repeat sequences in respiratory tract cancers. *Int J Cancer* 2001 Jan 15;91(2):200-4.
- (26) Girard L, Zochbauer-Muller S, Virmani AK, Gazdar AF, Minna JD. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res* 2000 Sep 1;60(17):4894-906.
- (27) Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, et al. 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* 2000 Apr 1;60(7):1949-60.
- (28) Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, et al. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 1992 Mar;7(3):445-9.
- (29) Kishimoto Y, Sugio K, Hung JY, Virmani AK, McIntire DD, Minna JD, et al. Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995 Aug 16;87(16):1224-9.
- (30) Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997 Jun 18;89(12):857-62.
- (31) Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997 Sep 17;89(18):1366-73.

- (32) Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, et al. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest* 1999 Jul;116(1):47-51.
- (33) Paraskakis E, Sourvinos G, Passam F, Tzanakis N, Tzortzaki EG, Zervou M, et al. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in bronchial asthma. *Eur Respir J* 2003 Dec;22(6):951-5.
- (34) Vassilakis DA, Sourvinos G, Markatos M, Psathakis K, Spandidos DA, Siafakas NM, et al. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 Nov;160(5 Pt 1):1729-33.
- (35) Vassilakis DA, Sourvinos G, Spandidos DA, Siafakas NM, Bouros D. Frequent genetic alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Sep;162(3 Pt 1):1115-9.
- (36) MANDEL P, METAIS P. [Not Available.]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948 Feb;142(3-4):241-3.
- (37) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977 Mar;37(3):646-50.
- (38) Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989;46(5):318-22.
- (39) Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994 Jan;3(1):67-71.
- (40) Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994 Apr;86(4):774-9.
- (41) Xue X, Zhu YM, Woll PJ. Circulating DNA and lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Sep;1075:154-64.
- (42) Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo VS, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001 Jun 15;61(12):4675-8.
- (43) Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003 Nov 1;21(21):3902-8.
- (44) Sirera R, et al. The analysis of serum DNA concentration by means of hTERT quantification: a useful prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2009;49(Suppl. 2):74.
- (45) Chen L, Krug L, Azzoli C. Biomarkers for small cell lung cancer (SCLC): DNA Methylation and GD2 synthase transcript levels. *Lung Cancer* 2005;49(Suppl. 2):316.
- (46) An Q, Liu Y, Gao Y, Huang J, Fong X, Li L, et al. Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Lett* 2002 Dec 15;188(1-2):109-14.
- (47) Andriani F, Conte D, Mastrangelo T, Leon M, Ratcliffe C, Roz L, et al. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int J Cancer* 2004 Jan 1;108(1):91-6.

- (48) Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jeronimo C, Harden S, Engles J, et al. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res* 2002 Jan 15;62(2):371-5.
- (49) van der Drift MA, Prinsen CF, Hol BE, Bolijn AS, Jeunink MA, Dekhuijzen PN, et al. Can free DNA be detected in sputum of lung cancer patients? *Lung Cancer* 2008 Sep;61(3):385-90.
- (50) Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994 Apr 1;54(7):1634-7.
- (51) Somers VA, Pietersen AM, Theunissen PH, Thunnissen FB. Detection of K-ras point mutations in sputum from patients with adenocarcinoma of the lung by point-EXACCT. *J Clin Oncol* 1998 Sep;16(9):3061-8.
- (52) Zhang LF, Gao WM, Gealy R, Weissfeld J, Elder E, Whiteside TL, et al. Comparison of K-ras gene mutations in tumour and sputum DNA of patients with lung cancer. *Biomarkers* 2003 Mar;8(2):156-61.
- (53) Thunnissen FB. Sputum examination for early detection of lung cancer. *J Clin Pathol* 2003 Nov;56(11):805-10.
- (54) Franklin WA, Gazdar AF, Haney J, Wistuba II, La Rosa FG, Kennedy T, et al. Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *J Clin Invest* 1997 Oct 15;100(8):2133-7.
- (55) Miozzo M, Sozzi G, Musso K, Pilotti S, Incarbone M, Pastorino U, et al. Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res* 1996 May 15;56(10):2285-8.
- (56) Hu YC, Sidransky D, Ahrendt SA. Molecular detection approaches for smoking associated tumors. *Oncogene* 2002 Oct 21;21(48):7289-97.
- (57) Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999 Feb 17;91(4):332-9.
- (58) Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, Prime W, Fielding P, Walshaw MJ, et al. Genetic alterations in bronchial lavage as a potential marker for individuals with a high risk of developing lung cancer. *Cancer Res* 1999 Jun 1;59(11):2690-5.
- (59) Powell CA, Klares S, O'Connor G, Brody JS. Loss of heterozygosity in epithelial cells obtained by bronchial brushing: clinical utility in lung cancer. *Clin Cancer Res* 1999 Aug;5(8):2025-34.
- (60) Liloglou T, Maloney P, Xinarianos G, Hulbert M, Walshaw MJ, Gosney JR, et al. Cancer-specific Genomic Instability in Bronchial Lavage: A Molecular Tool for Lung Cancer Detection. *Cancer Res* 2001 Feb 1;61(4):1624-8.
- (61) Fritsch EF, Maniatis T, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- (62) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156-9.

- (63) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.
- (64) Yuan CC, Miley W, Waters D. A quantification of human cells using an ERV-3 real time PCR assay. *J Virol Methods* 2001 Feb;91(2):109-17.
- (65) Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 1994 Dec 23;269(51):32678-84.
- (66) Litt M, Hauge X, Sharma V. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *Biotechniques* 1993 Aug;15(2):280-4.
- (67) Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M. Improved method for isolating cell-free DNA. *Clin Chem* 2005 Aug;51(8):1561-3.
- (68) Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 1997 Nov 7;278(5340):1054-9.
- (69) Virmani AK, Fong KM, Kodagoda D, McIntire D, Hung J, Tonk V, et al. Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types. *Genes Chromosomes Cancer* 1998 Apr;21(4):308-19.
- (70) Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A, et al. Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1997 Jun 15;57(12):2331-5.
- (71) Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* 2002 Oct 7;21(45):6915-35.
- (72) Ahrendt SA, Decker PA, Doffek K, Wang B, Xu L, Demeure MJ, et al. Microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats is associated with p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000 May 1;60(9):2488-91.
- (73) Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001 Feb 15;61(4):1659-65.
- (74) Allan JM, Hardie LJ, Briggs JA, Davidson LA, Watson JP, Pearson SB, et al. Genetic alterations in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung cancer. *Int J Cancer* 2001 Feb 1;91(3):359-65.
- (75) Pylkkanen L, Karjalainen A, Anttila S, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K. No evidence of microsatellite instability but frequent loss of heterozygosity in primary resected lung cancer. *Environ Mol Mutagen* 1997;30(2):217-23.
- (76) Bruhn N, Beinert T, Oehm C, Jandrig B, Petersen I, Chen XQ, et al. Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000 Apr;906:72-82.
- (77) Beau-Faller M, Weber JC, Schneider A, Guerin E, Gasser B, Ducrocq X, et al. Genetic heterogeneity in lung and colorectal carcinoma as revealed by microsatellite analysis in plasma or tumor tissue DNA. *Cancer* 2003 May 1;97(9):2308-17.

- (78) Kullmann F, Widmann T, Kirner A, Justen HP, Wessinghage D, Dietmaier W, et al. Microsatellite analysis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2000 May;59(5):386-9.
- (79) Sieben NL, ter Haar NT, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, Cleton-Jansen AM. PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. *Hum Pathol* 2000 Nov;31(11):1414-9.
- (80) Liloglou T, Maloney P, Xinarianos G, Fear S, Field JK. Sensitivity and limitations of high throughput fluorescent microsatellite analysis for the detection of allelic imbalance: application in lung tumors. *Int J Oncol* 2000 Jan;16(1):5-14.
- (81) Sanchez-Cespedes M, Monzo M, Rosell R, Pifarre A, Calvo R, Lopez-Cabrerizo MP, et al. Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 1998 Jan;9(1):113-6.
- (82) Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C, Goldstraw P, Pierotti MA, Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res* 1999 Oct;5(10):2689-92.
- (83) Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996 Sep;2(9):1033-5.
- (84) Gonzalez R, Silva JM, Sanchez A, Dominguez G, Garcia JM, Chen XQ, et al. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance. *Ann Oncol* 2000 Sep;11(9):1097-104.
- (85) Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993 Dec 15;53(24):5853-5.
- (86) Shridhar V, Siegfried J, Hunt J, del Mar AM, Smith DI. Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1994 Apr 15;54(8):2084-7.
- (87) Ryberg D, Lindstedt BA, Zienolddiny S, Haugen A. A hereditary genetic marker closely associated with microsatellite instability in lung cancer. *Cancer Res* 1995 Sep 15;55(18):3996-9.
- (88) Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. Microsatellite Instability and Other Molecular Abnormalities in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 1995 Jan 1;55(1):28-30.
- (89) Adachi J, Shiseki M, Okazaki T, Ishimaru G, Noguchi M, Hirohashi S, et al. Microsatellite instability in primary and metastatic lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995 Dec;14(4):301-6.
- (90) Ahrendt SA, Decker PA, Doffek K, Wang B, Xu L, Demeure MJ, et al. Microsatellite Instability at Selected Tetranucleotide Repeats Is Associated with p53 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 2000 May 1;60(9):2488-91.
- (91) Ninomiya H, Nomura K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Fujiwara M, et al. Genetic instability in lung cancer: concurrent analysis of chromosomal, mini- and microsatellite instability and loss of heterozygosity. *Br J Cancer* 2006 May 22;94(10):1485-91.
- (92) Merlo A, Mabry M, Gabrielson E, Vollmer R, Baylin SB, Sidransky D. Frequent Microsatellite Instability in Primary Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 1994 Apr 15;54(8):2098-101.

8 Anhang

8.1 Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration - Tabellen

Allelotypisierung bei NSCLC und SCLC

Autoren / Jahr	Histologie / Fallzahl [n]	Probe	MIN [%]	LOH [%]	MIN+LOH [%]	Marker (Lokalisation)
Allan et al. (74) 2001	NSCLC [22] SCLC [8]	Tumor	k.A.	32 % 75 %	k.A.	GPX1 (3p21) D3S1259 (3p25) D13S227 (13q14.3) P53 (17p13.1)
Beau-Faller et al. (77) 2003	NSCLC [16] SCLC [8]	Tumor	0/16 25 %	81,2 % 87,5 %	81,2 % 87,5 %	D3S1293/D3S3700 (3p21) D3S1283 (3p24) D5S346 (5q) D9S171 (9p) D9S179 (9q) RB (13q) TP53 (17p) D17S1818/D17S800 (17q) D20S108/D20S170 (20q)
Bruhn et al. (76) 2000	NSCLC [27] SCLC [16]	Tumor	15 % 6 %	15 % 13 %	26 % 19 %	UT762 (21) ACTBP-2 (5) AR (Xq11-12)
Sozzi et al. (42) 2001	NSCLC (33)	Tumor	k.A.	k.A.	61 % (20/33)	D3S1300 (3p14.2) D3S1289 (3p21) D3S1266 (3p23) D3S2338 (3p24.2) D3S1304 (3p25-26)
Andriani et al. (47) 2004	NSCLC [64]	Tumor	k.A.	62,5 %	62,5 %	D3S1300 (3p14.2) D3S1289 (3p21) D3S1266 (3p23) D3S2338 (3p24.2) D3S1304 (3p25-26)

Autoren / Jahr	Histologie / Fallzahl [n]	Probe	MIN [%]	LOH [%]	MIN+LOH [%]	Marker (Lokalisation)
Sanchez-Espedes et al. (81) 1998	NSCLC (22)	Tumor	0/22	54%	54 %	D3S1038 (3p) D3S1611 (3p) D3S1067 (3p) D3S1284 (3p)
Sozzi et al. (82) 1999	NSCLC (87)	Tumor	D21S1245 5 % FHIT- Lokus 2 %	D21S1245 34 % FHIT- Lokus 47 %	56 %	D21S1245 FHIT-Lokus: D3S1234 D3S1300 D3S4103 verwendet wurde jeweils nur ein Marker des FHIT- Locus
Chen et al. (83) 1996	SCLC (21)	Tumor	57 %	29 %	76 %	UT762 (21) ACTBP-2 (5) AR (Xq11-12)
Gonzalez et al. (84) 2000	SCLC (35)	Tumor	25 %	38 %	63 %	UT762 (21) ACTBP-2 (5) AR (Xq11-12)
Pylkkanen et al. (75)	NSCLC (87) SCLC (6)	Tumor	0/93	28 % 67 %	28 % 67 %	16 Marker

Tabelle 31

Mikrosatelliteninstabilitäten beim NSCLC

Autoren / Jahr	Fallzahl [n]	Probenart	MIN	LOH	Marker (Lokalisation)	
Peltomaki et al. (85) 1993	85	Tumor	2,3 % (2/87)	k.A.	D1S216 (1p) D5S404 (5q) D10S197 (10p) D17S787 (17q)	D3S1266 (3p) D8S255 (8p) D11S904 (11p)
Mao et al. (22) 1994	23	Tumor	9 % (2/23)	k.A.	ARA (X) D14S50 (14) SAT (6) ACTBP2 (6) UT762 (21)	AR (X) MD (19) DRPLA (12) FGA (4)
Shridhar et al. (86) 1994	38	Tumor	34 % (13/38)	29 % (11/38)	D3S1038 (3p25) D3S1076 (3p21.3-p23) Not73 (3p21.1) D3S659 (3p13) D3S1251 (3cen-p12) D13S131 (13q14.1) AR (Xq11-q12) MEN1 (11q)	D3S647 (3p23) D3S966 (3p21.3) D3S1289 (3p21.1) D3S1284 (3p13-p12) D3S1215 (3q13) HPRT (Xq26) RTT235 (11p) D3S1312 (3p14.1-p14.2)
Ryberg et al. (87) (1995)	137	Tumor	21 % (29/137)	k.A.	D3S647 (3p23) D3S1286 (3p24.2) AR (Xq12)	D3S966 (3p21.3) D3S1289 (3p21.1)
Fong et al. (88) (1995)	108	Tumor	6,5 % (7/108)	k.A.	D2S123 (2p) IFNA (9p) LPL (8p)	D9S126 (9p) DCC (18q) MYCL (1p)

Autoren / Jahr	Fallzahl [n]	Probenart	MIN	LOH	Marker (Lokalisation)
Adachi et al. (89) 1995	55	Tumor	29 % (16/55)	k.A.	D3S1284 (3p) D6S294 (6p) LPL (8p) D8S167 (8q) D9S162 (9p) D10S197 (10p) D12S83 (12p) D14S65 (14q) D14S78 (14q) TP53 (17p) DCC (18q)
Miozzo et al. (55) (1996)	51	Tumor	32 % (17/53)	k.A.	D3S1339 (3p21) D3S1340 (3p24) D3S135 (3p25) AR (Xq11-12)
Bruhn et al. (76) 2000	27	Tumor	15 % (4/27)	15 % (4/27)	ACTBP-2 (5q14.1) UT762 (21) AR (Xq11-12)
Ahrendt et al. (90) 2000	88	Tumor	35 % (31/88)	k.A.	L17686 (7q31-32) D8S321 (8) L17835 (7) D20S85 (20) D20S82 (20p12.3) UT5320 (8pter-qter) UT5307 (8) D9S242 (9p21) G29028 (19p13.11) D11S488 (11) ACTBP-2 (5q14.1) G08460 (5) CSFIR1 (5q33.4-34)
Xu et al. (25) 2001	47	Tumor	64 % (30/47)	k.A.	61 Marker, u.a. ACTBP2 (5q14.1) D9S242 (9q32-33) UT5320 (8pter-qter) D20S82 (20p12.3) L17686 (7q31-32)
Ninomiya et al. (91) 2006	52	Tumor	5,8 % (3/52)	46 % (24/52)	D1S80 (1p35-36) ApoB (2p24) D17S30 (17p13)

Tabelle 32

Mikrosatelliteninstabilitäten beim SCLC

Autoren / Jahr	Fallzahl [n]	Probenart	MIN	LOH	Marker (Lokalisation)
Mao et al. (22) 1994	10	Tumor	50 % (5/10)	k.A.	ARA (X) AR (X) D14S50 (14) MD (19) SAT (6) DRPLA (12) ACTBP2 (6) FGA (4) UT762 (21)
Merlo et al. (92) 1994	33	Tumor	45 % (15/33)	k.A.	22,5 ± 1,5 Marker pro Tumor (1p, 2p, 3p, 5q, 6p, 6q, 9p, 9q, 13q, 17p)
Adachi et al. (89) 1995	37	Tumor	0/37	k.A.	11 Marker (3p, 6p, 8p, 8q, 9p, 10p, 12p, 14q, 17p, 18q)
Chen et al. (83) 1996	21	Tumor	51 % (12/21)	29 % (6/21)	ACTBP-2 (5q14.1) UT762 (21) AR (Xq11-12)
Bruhn et al. (76) 2000	16	Tumor	6 % (1/16)	13 % (2/16)	ACTBP-2 (5q14.1) UT762 (21) AR (Xq11-12)

Tabelle 33

Mikrosatellitenalterationen bei aktiven und ehemaligen Rauchern

Autoren / Jahr	Fallzahl [n]	Probenart	LOH	MIN	Marker (Lokalisation)
Mao et al. (30) 1997	51 R 5 NR	Bronchialepithel (6 Biopsien)	76 % 20 %	k.A. k.A.	D3S1285 (3p14) D9S171 (9p21) TP53 (17p13)
Wistuba et al. (31) 1997	42 R 21 NR	Multiple Biopsien	86 % 0/21	64 %	FHIT, D3S4103 (3p14.2) D3S1766 (3p14.3-21.3) D3S1477, D3S1478, D3S1029 (3p21) D3S2432, D3S1351, D3S1537 (3p22- 24.2) L5.71CA (5q22) D9S171, IFNA (9p21) RB (Intron 2&20) (13q14) TP53, Pentarepeat (17q31.1)

Tabelle 34

Mikrosatellitenalterationen bei benignen Lungenerkrankungen

Autoren / Jahr	Erkrankung & Fallzahl [n]	Probenart	LOH	MIN	Marker (Lokalisation)	
Siafakas et al. (32) 1999	59 COPD 60 NON-COPD	Sputum (Zellen)	k.A. k.A.	24 % 0/60	ANK1 D3S1210 D13S71 HRM	D6S344 D17S250 THRA1
Paraskakis et al. (33) 2003	22 Asthma bronchiale 6 Kontroll- patienten	Sputum (Zellen)	15/22 (68%) 0/6	4/22 (18 %) 0/6	D5S207 D5S82 D6S2223 D6S259 D11S2072 D11S1253 D11S1876 D14S251 D14S292	D5S376 D6S1002 D6S429 D6S263 D11S480 D11S1383 D14S258 D14S72 D14S588
Vassilakis et al. (34) 1999	30 Pat. mit pulm. Sarkoidose 30 Kontroll- patienten	Sputum (Zellen)	9/30 (30%) 0/30	6/30 (20%) 0/30	THRA1 D17S855 ANK1 D9S290 D8S133	D17S579 D17S250 D9S59 HXB D8S137
Vassilakis et al. (35) 2000	26 Pat. mit IPF 26 Kontroll- patienten	Sputum (Zellen)	9 (39%) 0/26	5 (19%) 0/26	THRA1 D17S855 ANK1 D9S290 D8S133	D17S579 D17S250 D9S59 HXB D8S137

Tabelle 35

Mikrosatellitenalterationen in zellulärer DNA aus der BL

Autoren / Jahr	Fallzahl [n]	Probenart	LOH	MIN	MIN + LOH	Marker (Lokalisation)
Ahrendt et al. (57) 1999	50	Tumor (NSCLC) BL	k.A. k.A.	46 % 14 % (3/22)*	k.A. k.A.	L17686 (7q31-32) D8S321 (8) L17835 (7) D20S85 (20) D20S82 (20p12.3) UT5320 (8) UT5307 (8) D9S242 (9p21) G29028 (19p13.11) D11S488 (11) ACTBP-2 (5q14.1) G08460 (5) CSFIR1 (5q33.4-34) D3S1340 (3) D3S1351 (3)
Field et al. (58) 1999	43 47	Tumorpatienten BL Nicht- Tumorpatienten BL	 67 % k.A.	 14 % k.A.	 35 % 23 %	ACTBP-2 (5q14.1) D14S194 (14) D3S1215 (3) D3S1339 (3) D3S1351 (3) D4S194 (4) D4S392 (4) FGA (4) D6S271 (6) D9S286 (9) TCRD TP53 (17p)
Powell et al. (59) 1999	38 17	Tumorpatienten BL Nicht- Tumorpatienten BL	 79 % 59 %	 0/38 0/17	 79 % 59 %	D3S2387 (3p) D3S2409 (3p21) D3S1300 (3p14) D3S1285 (3p14) D3S1233 (3p13) D3S2406 (3p12) GATA62F03 (9p) D9S925 (9p22) D9S169 (9p21) D9S741 (9p21) D9S1118 (9p13) D11S2371 (11q13) D11S2002 (11q21) D11S2000 (11q22) D11S1986 (11q22) D11S1998 (11q23) D11S925 (11q23) D17S513 (19p12) D17S969 (17p12) D17S1303 (19p12) DD17S520 (17p12) D17S122 (17p11)

Autoren / Jahr	Fallzahl [n]	Probenart	LOH	MIN	MIN + LOH	Marker (Lokalisation)
Liloglou et al. (60) 2001	46	Tumorpatienten BL	67,4 %	6,5 %	73,9 %	D3S1289 (3) D3S1300 (3)
	34	Nicht- Tumorpatienten BL	2,9 %	20,6 %	23,5 %	D13S171 (13) D17S2179 (17) (nur CSGI-Marker)

Tabelle 36

8.2 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
AAH	atypische adenomatöse Hyperplasie
AC	Adenokarzinom
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AzCa	Adenoidzystisches Karzinom
bp	Basenpaare
BL	Bronchiallavage
BLc	zelluläre DNA aus der BL
CGH	comparative genomic hybridisation
CNA	Zirkulierende Nukleinsäuren (engl. circulating nucleic acids)
COPD	chronisch-obstruktive Bronchitis
CIS	Carcinoma-in-situ
CSGI	cancer specific genomic instability
DIPNECH	Diffuse idiopathische pulmonale neuroendokrine Zellhyperplasie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMAST	Elevated microsatellite alterations in selected tetranucleotides
ERV	endogenes Retrovirus
FAL	LOH-Zahl/Gesamtmenge der verwendeten, informativen Marker (engl. fractional allele loss)
g	Gravitationskraft 9.81 m/s ²
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses Kolorektalkarzinom
hPIP	DNA-Extraktion mit heißem Phenol und Isopropanol
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
kb	Kilobasen

LCC	large cell carcinoma, Großzelliges Karzinom
LOH	loss of heterozygosity, Verlust der Heterozygotie
MA	Mikrosatellitenalteration
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
MMP	microsatellite mutator phenotype
MMR	DNA Mismatch Reparatur System
MSI	microsatellite instability
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System
ng	Nanogramm
NSCLC	non small cell lung carcinoma, Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
NR	Nichtraucher
py	pack years, Packungsjahre
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pg	Pikogramm
QiaAMP	QiaAMP® DNA Blood Mini Kit
Q25%	25% iges Quantil
Q75%	75% iges Quantil
RER	replication error phenotype
RT	Raumtemperatur
rt-qPCR	real-time, quantitative PCR
S	zellfreie DNA aus dem Serum
SCC	sqamous cell carcinoma, Plattenepithelkarzinom
SCLC	small cell lung carcinoma, Kleinzelliges Lungenkarzinom
STR	short tandem repeat
SSR	simple sequence repeat
TBE	Trisborat-EDTA-Puffer

TEMED	Tetramethylethylendiamin
TSG	Tumorsuppressorgen
USM	ubiquitous somatic mutations
VNTR	variable number of tandem repeats
WHO	Weltgesundheitsorganisation

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Doktor Michael Fleischhacker**, **Herrn Doktor Bernd Schmidt** und **Herrn Professor Dr. Christian Witt** für die Bereitstellung des innovativen und interessanten Themas, sowie der erforderlichen Mittel.

Herrn Dr. Fleischhacker möchte ich für seine hilfreiche Unterstützung und seine vielen Ratschläge hinsichtlich der praktischen Tätigkeiten im Labor, sowie für die konstruktiven Diskussionen und Kritiken danken. Darüber hinaus möchte ich mich insbesondere auch für die schnelle und unkomplizierte Unterstützung in den letzten Wochen der Dissertationsverfassung bedanken.

Herrn Dr. Schmidt möchte ich vor allem für die Akquise des Untersuchungsgutes und für seine kontinuierliche Förderung und Forderung, sowie ebenfalls konstruktive Diskussion und Kritik danken.

Vielen Dank auch an **Frau Sabine Weickmann** für ihre Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei **Frau Eileen Engel** bedanken, die ihre Dissertation innerhalb des gleichen Themengebietes begann und mit der ich in sehr guter Teamarbeit das Projekt der zellfreien Nukleinsäuren in der Bronchiallavage begann.

Und nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank natürlich **meinen Eltern** und **meinem Bruder** für so vieles.

10 Erklärung

„Hiermit erkläre ich, Tim Carstensen, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Untersuchungen zur Mikrosatellitenalteration an zellfreien Desoxyribonukleinsäuren aus der Bronchiallavage bei Patienten mit Lungenkarzinom und tumorfreien Patienten“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt,

ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer

Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 16.05.2010

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.