

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité-  
Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

**Genexpressionsanalysen beim  
nichtkleinzelligen Lungenkarzinom  
im Vergleich zu gesundem Lungengewebe  
mittels der Oligonukleotid-Mikroarray Technologie**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Gerit Müller-Hagen  
aus Leipzig

**Gutachter:**

- 1. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Beinert.....**
- 2. Prof. Dr. Chr. Peschel .....**
- 3. Prof. Dr. I. Petersen.....**

**Datum der Promotion: 01.06.2008.....**

<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Epidemiologie von Lungenkarzinomen	7
1.2 Histologische Subtypen und Stadien des Lungenkarzinoms	8
1.2.1 Histologische Einteilung	8
1.2.2 TNM Klassifikation und Stadieneinteilung	10
1.3 Diagnostik und Therapie des Lungenkarzinoms	11
1.3.1 Diagnostik des Lungenkarzinoms	11
1.3.2 Therapie des Lungenkarzinoms	12
1.4 Genetische Veränderungen bei der Genese des Lungenkarzinoms	14
1.4.1 Aktivierung von Proto-Onkogenen und Wachstumsfaktoren	16
1.4.1.1 Die Ras Genfamilie	16
1.4.1.2 Myc Onkogene	16
1.4.1.3 Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren	17
1.4.2 Verlust der Funktion von Tumorsuppressorgenen und der Wachstumskontrolle	18
1.4.2.1 Tumorsuppressorgene in der 3p Region	18
1.4.2.2 Der p16INK4-Cyclin D1-CDK4-RB Signalweg	19
1.4.2.3 Der p53-MDM2-p14ARF Signalweg	19
1.4.2.4 Der TGF- $\beta$ Signalweg, Smad 2 und Smad 4	20
1.4.2.5 Der APC Gen/Wnt Signalweg	20
1.4.3 Gestörte DNA Reparatur und Zellzykluskontrolle	20
1.4.4 Änderung des Methylierungsmusters	21
1.4.5 Defekter Apoptosemechanismus und Entkommen vor der Immunkontrolle	21
1.5 Angiogenese und Lungenkarzinom	22
1.6 Genexpressionsanalyse	22
1.6.1 <i>Serial analysis of gene expression (SAGE)</i>	23
1.6.2 <i>Suppression subtractive hybridization (SSH)</i>	24
1.6.3 Mikroarrays	24
1.6.3.1 cDNA-Mikroarrays	25
1.6.3.2 Oligonukleotid-Mikroarrays	26
1.6.3.3 SURF Array	28
1.6.4 Verarbeitung der Mikroarray-Genexpressionsdaten	28
1.6.4.1 Normalisation, <i>Refining</i> und Kondensation	28
1.6.4.2 Genexpressionsanalysen	29
1.6.4.3 Standardisierung der Datenverarbeitung	31
<b>2 Zielstellung</b>	<b>32</b>
<b>3 Patienten, Material und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1 Vorgehensweise	33
3.2 Patienten und Tumorproben	33
3.2.1 Tumorproben	33
3.2.2 Probanden	35
3.3 Methoden der Genexpressionsanalyse mittels <i>GeneChip</i> <sup>®</sup>	38
3.3.1 Verwendete Materialien	38
3.3.2 Überblick	40
3.3.3 Isolation der gesamten RNA mittels RNeasy Mini-/Micro Kit	41
3.3.4 Qualitätskontrolle	42
3.3.5 Amplifikation	42
3.3.6 Qualitäts- und Quantitätskontrolle der biotinylierten cRNA	44
3.3.7 Fragmentierung	45
3.3.8 Hybridisierung, Waschen, Färben und <i>Scannen</i> der <i>GeneChips</i> <sup>®</sup>	45
3.3.9 Datenanalyse	48

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>51</b>
4.1 Erhaltene Nukleinsäuremengen	51
4.1.1 Erhaltene Gesamt-RNA Mengen aus den Gewebeproben	51
4.1.2 Ausbeute der Amplifikation	52
4.2 Die bioinformatische Analyse mittels <i>Expressionist</i> <sup>®</sup>	52
4.2.1 <i>Principal Component Analysis</i> (PCA) und Identifizierung der Ausreißer-Proben	53
4.2.2 Bildung von Gruppen für die Analyse	54
4.2.3 Statistische Analyse	55
4.2.3.1 Varianzkoeffizient	55
4.2.3.2 Auf die varianten Sequenzen angewendete statistische Testverfahren	55
4.2.3.2.1 T-Test	55
4.2.3.2.2 <i>N-Fold Regulation</i> Test	55
4.2.3.2.3 <i>Inter Group Gap</i>	56
4.2.3.3 Fusion der auf die varianten Sequenzen angewendeten statistischen Testverfahren	56
4.3 Vergleich der erhobenen Daten mit in der Literatur beschriebenen Genen	57
4.4 Differenziell exprimierte Gene NSCLC versus Lunge normal	58
<b>5 Diskussion</b>	<b>66</b>
5.1 Die RNA-Isolation aus kleinen Gewebemengen	66
5.2 Der Vergleich der Genexpressionsanalyse mit Markergenen in der Literatur	67
5.3 Genexpressionsanalysen erlauben eine Differenzierung zwischen Lungenmetastase und Primärtumor	68
5.4 Ausreißer-Proben	69
5.5 Unterschiede der Genexpression von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge	70
im Vergleich zum Normalgewebe	70
5.5.1 Beispiele für in pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen herunterregulierte Gene	70
5.5.1.1 Surfactantproteine	70
5.5.1.1.1 <i>Surfactant Protein D</i> (SFTPD)	71
5.5.1.1.2 <i>Surfactant Protein B</i> (SFTPB)	72
5.5.1.2 G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPR 105)	73
5.5.1.3 Prostaglandin D Synthase (PDS)	74
5.5.2 Beispiele für in pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen hochregulierte Gene	76
5.5.2.1 <i>Small proline-rich proteins</i>	76
5.5.2.1.1 <i>Small proline-rich protein 1B</i> (Cornifin, SPRR1B)	77
5.5.2.1.2 <i>Small proline-rich protein 3</i> (SPRR3)	77
5.5.2.2 S100A2 -Ca <sup>2+</sup> -binding protein	78
5.5.2.3 <i>Matrix metalloprotease 1</i> (MMP1)	79
5.5.2.4 Serinprotease-Inhibitoren (SERPINE)	80
5.5.2.4.1 SERPIN5B / MASPIN	81
5.5.2.4.2 <i>Squamous cell carcinoma antigens</i>	82
5.5.2.5 Proteinregulator der Zytokinese 1 (PRC1)	83
5.5.2.6 Proteine der Zell-Zell-Interaktion	84
5.5.2.6.1 Desmoglein 3 (DSG3) und Desmocollin 3 (DSC3)	84
5.5.2.6.2 <i>Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5</i> (CEACAM5)	85
5.5.2.7 <i>Death receptor 6</i> (TNFRSF21, DR6)	87
5.5.2.8 Peptidylprolyl Isomerase F (PPIF /CYP3)	89
<b>6 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>90</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>105</b>
<b>Anhang</b>	<b>107</b>

## Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

---

Tabelle 1: Stadieneinteilung	10
Tabelle 2: Klinische TNM-Klassifikation	11
Tabelle 3: Patientendaten	35
Tabelle 4: Daten kommerzieller Proben	37
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien	38
Tabelle 6: Geräte und Software	40
Tabelle 7: Waschen und Färben der hybridisierten <i>GeneChips</i> <sup>®</sup>	46
Tabelle 8: Erhaltene RNA-Mengen und -Qualitäten	51
Tabelle 9: cRNA Mengen	52
Tabelle 10: Ausreißer-Proben	53
Tabelle 11: Analysegruppen	54
Tabelle 12: Ausgewählte differentiell exprimierte Gene	58
Abbildung 1: Histologische Einteilung des Lungenkarzinoms	9
Abbildung 2: Die Therapie verschiedener Tumorstadien	13
Abbildung 3: Modell der stufenweisen Entwicklung des Lungenkarzinoms	15
Abbildung 4: <i>Feature</i> eines Arrays	26
Abbildung 5: <i>Probe set</i>	27
Abbildung 6: Amplifikation und Biotinylierung der mRNA	45
Abbildung 7: Färben der hybridisierten cRNA	47
Abbildung 8: Hybridisierung, Waschen und Färben der <i>GeneChips</i> <sup>®</sup>	48
Abbildung 9: Datenanalyse-von Pixels zu Daten ( <i>Refining</i> )	49
Abbildung 10: Datenanalyse-Kondensation und Normalisation	49
Abbildung 11: PCA-Analyse	53
Abbildung 12: Statistische Analyse	56
Abbildung 13: Osteopontin ist in den Tumorproben überexprimiert	57
Abbildung 14: Keratin 19 ist in den Tumorproben überexprimiert	58
Abbildung 15: <i>Surfactant protein D</i> ist in den Tumorproben signifikant unterexprimiert	60
Abbildung 16: <i>Surfactant protein B</i> ist in den Tumorproben signifikant unterexprimiert	60
Abbildung 17: G-Protein gekoppelter Rezeptor ist in den Tumorproben signifikant unterexprimiert	60
Abbildung 18: Prostaglandin D Synthase ist in den Tumorproben signifikant unterexprimiert	61
Abbildung 19: SPRR3 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	61
Abbildung 20: SPRR1B ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	61
Abbildung 21: S100A2 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	62
Abbildung 22: MMP1 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	62
Abbildung 23: MASPIN ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	62
Abbildung 24: SCCA2 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	63
Abbildung 25: SCCA1 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	63
Abbildung 26: PRC1 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	63
Abbildung 27: CEACAM5 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	64
Abbildung 28: DSG3 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	64
Abbildung 29: DSC3 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	64
Abbildung 30: DR6 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	65
Abbildung 31: PPIF ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert	65
Abbildung 32: Die Entstehung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure	75

Im Rahmen dieser Arbeit entstand folgender Reviewartikel:

Muller-Hagen, G., Beinert, T. and Sommer, A. (2004) *Aspects of lung cancer gene expression profiling*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 7, 290-303.

## **1 Einleitung**

Das Lungenkarzinom gehört zu den häufigsten bösartigen Erkrankungen weltweit. Die Einführung und Weiterentwicklung multimodaler Therapiekonzepte, die Chemotherapie, Radiatio und Operation beinhalten, haben bislang kaum zu Prognoseverbesserungen geführt. Die Therapie richtet sich nach der 1986 eingeführten und 1997 modifizierten prognostisch orientierten Stadieneinteilung auf der Basis von Tumorlage und Tumorgroße, Anzahl und Lage befallener Lymphknoten sowie Vorhandensein von Fernmetastasen (Mountain, 1997; Mountain, 1986). Da sich Lungenkarzinome im selben Stadium bezüglich Therapieansprechen und Prognose jedoch stark unterscheiden, wächst seit mehreren Jahren die Erkenntnis, dass eine zusätzliche biologische Charakterisierung wichtig ist.

Die Mikroarray Technologie erlaubt die parallele Messung der Genexpression tausender Gene in einer Gewebeprobe und somit die effiziente Identifikation neuer Biomarker, die Tumor von Normalgewebe unterscheiden. Biomarker werden als Moleküle verstanden, die entweder nur oder in hohen Spiegeln in Tumorzellen im Vergleich zu normalem Gewebe vorkommen, und die in Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin oder Sputum sezerniert werden können. Biomarker könnten in Zukunft der Früherkennung von Lungenkarzinomen dienen, eine gerichtete Therapie erlauben oder Tumoreigenschaften wie Ansprechen auf Chemotherapie und Auftreten von Metastasen charakterisieren und so eine bessere Aussage über die Prognose treffen.

### **1.1 Epidemiologie von Lungenkarzinomen**

Im Jahr 2004 stellte der Lungenkrebs in Europa mit 13.3 % aller Krebsneuerkrankungen den größten Anteil. Auch bei den durch Krebs bedingten Todesfällen führte diese Erkrankung in Europa im Jahr 2004 mit 341.800 Todesfällen (Boyle and Ferlay, 2005).

Da es in Deutschland nach wie vor kein übergreifendes nationales Krebsregister gibt, beruhen die zuletzt für das Jahr 2002 veröffentlichten Zahlen auf Schätzungen. Demnach lag der Lungenkrebs bei Männern im Jahre 2002 mit 32.500 Neuerkrankungen nach dem Prostatakarzinom und dem Kolonkarzinom an dritthäufigster Stelle aller bösartigen Neoplasien und entsprach damit knapp 15 % aller Krebsneuerkrankungen bei Männern. Bei Frauen wurden 12.450 Neuerkrankungen geschätzt. Damit steht das Lungenkarzinom mit 6.1 % aller Krebsneuerkrankungen nach Mamma- und Kolonkarzinom ebenfalls an dritthäufigster Stelle

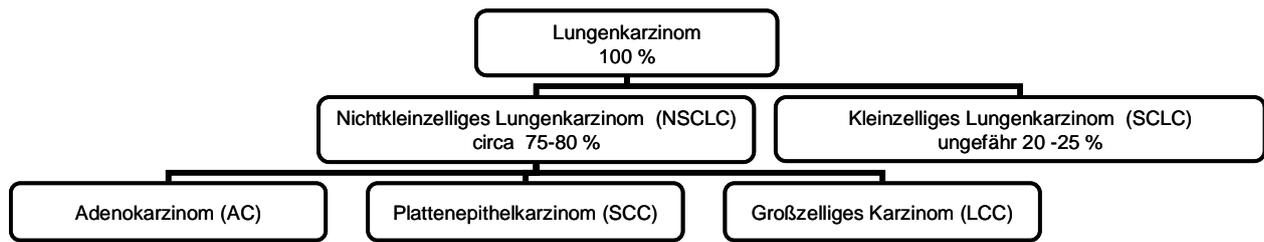
(GEKID, 2006). Bezüglich der Mortalität nahm der Lungenkrebs im Jahre 2002 in Deutschland bei Männern mit 26.3 % aller Krebstodesfälle eine Spitzenposition ein, bei den Frauen lag dieser Anteil mit 10.4 % an dritter Stelle (GEKID, 2006). Die Zunahme der Anzahl rauchender Frauen bei gleichzeitig bestehender abnehmender Anzahl männlicher Raucher korreliert mit dem Trend der Inzidenz dieser Erkrankung. Während bei den Männern die höchste Inzidenz in Deutschland Mitte der 70er bis Ende der 80er Jahre erreicht wurde, steigt die Inzidenz bei Frauen weiterhin kontinuierlich an. Die Fünfjahresüberlebensrate ist für beide Geschlechter ähnlich mit etwa 12 % bei Männern und 14 % bei Frauen (GEKID, 2006). Das aktive Rauchen wird für die Mehrzahl der Lungenkarzinome verantwortlich gemacht (Sascoa et al., 2004).

## 1.2 Histologische Subtypen und Stadien des Lungenkarzinoms

### 1.2.1 Histologische Einteilung

Die aktuellste Klassifikation von Lungenkarzinomen der Internationalen Krebsforschungsagentur der Weltgesundheitsorganisation beschreibt acht maligne Lungentumorarten: Plattenepithelkarzinome, kleinzellige Karzinome, Adenokarzinome, großzellige Karzinome, adenosquamöse Karzinome, sarkomatoide Karzinome, Karzinoidtumoren und Speicheldrüsentumoren. Diese werden darüberhinaus jeweils in verschiedenen Untervarianten eingeteilt (Travis et al., 2004).

Nach klinischen Gesichtspunkten (siehe unten) werden Lungenkarzinome in zwei große histologische Gruppen gegliedert: etwa 20-25 % kleinzellige (*small cell lung cancer*, SCLC), und 75-80 % nichtkleinzellige Lungenkarzinome (*non small cell lung cancer*, NSCLC). Während das kleinzellige Lungenkarzinom eine eigene Entität darstellt, umfaßt das nichtkleinzellige Lungenkarzinom üblicherweise Adenokarzinom (*adenocarcinoma*, AC), Plattenepithelkarzinom (*squamous cell carcinoma*, SCC) und großzelliges Karzinom (*large cell carcinoma*, LCC) (siehe Abbildung 1). Im weitesten Sinne können jedoch alle epithelialen Tumoren ohne die für das SCLC typischen histologischen Merkmalen unter dem Begriff NSCLC subsumiert werden (Travis et al., 2004). Häufig sind dabei mehrere histologische Typen und verschiedene Differenzierungs- und Wachstumsformen in einem Tumor nebeneinander nachweisbar.



**Abbildung 1: Histologische Einteilung des Lungenkarzinoms nach klinischen Kriterien**

Das kleinzellige Lungenkarzinom stellt eine eigene Entität dar, während das nichtkleinzellige Lungenkarzinom in weitere Subtypen unterteilt wird.

Im Folgenden wird die Histologie der für die vorliegende Arbeit wichtigen Karzinomtypen (ACC und SCC) näher beschrieben.

Das AC ist mit circa 30 % aller Lungenkarzinome die häufigste Form. Einerseits ist das AC das Lungenkarzinom mit der geringsten Assoziation zur chronischen Exposition mit dem Zigarettenrauch, andererseits wird die prozentuale Zunahme dieses histologischen Typs neuartigen Verfahren der Zigarettenproduktion zugeschrieben, die eine immer tiefere Inhalation des Tabakrauches erlauben und der Zigarette neue toxische Komponenten hinzufügen (Hecht, 2003).

ACs sind üblicherweise in der Peripherie des Bronchialbaumes zu finden, können jedoch auch zentral sitzen. Sie entstehen aus den schleimbildenden Epithelien der Bronchien, aus den Clara-Zellen oder aus den Pneumozyten vom Typ II (Myers and Tazelaar, 2003; Riede et al., 2004).

Das bronchioloalveoläre Karzinom (BAC) als Subtyp des Adenokarzinoms wächst entlang der Alveolarwände. Andere Subtypen sind das papilläre, muzinöse, nicht-muzinöse oder gemischt muzinöse AC (Myers and Tazelaar, 2003; Riede et al., 2004).

Das SCC ist meist zentral lokalisiert. Es entsteht metaplastisch aus dem normalen Lungenepithel und wächst endobronchial bzw. infiltriert zwischen die kartilaginösen Ringe und zerstört im Laufe der Zeit das umgebende Gewebe. Aufgrund der zentralen Obstruktion und der damit verbundenen Symptome wie z.B. poststenotische Pneumonie oder Bronchiektasen manifestiert sich das Plattenepithelkarzinom oft früher als andere Lungenkarzinome mit einer damit verbundenen besseren Prognose. Der solide, grau-weiße Tumor zeigt mitunter eine Einschmelzung. Die histologische Diagnose beruht auf der Keratinproduktion der Tumorzellen und/oder interzellularen Desmosomen. Wenn mehr als 10 % des Tumors Drüsenanteile zeigen, wird ein adenosquamöses Karzinom diagnostiziert (Myers and Tazelaar, 2003; Riede et al., 2004).

### 1.2.2 TNM Klassifikation und Stadieneinteilung

Wie alle anderen bösartigen Tumoren werden auch die Lungenkarzinome in eine TNM-Klassifikation eingeordnet. Dieses *Staging* dient der Einschätzung der Prognose, der Therapieplanung und nicht zuletzt der Qualitätssicherung. Die „*Union Internationale Contre le Cancer* (UICC)“ führte diese Stadieneinteilung 1986 ein, eine prognostisch orientierte Modifikation folgte 1997 (Mountain, 1997) (siehe Tabelle 1). Die Stadieneinteilung beruht jedoch nur auf Tumorgröße und Tumorinvasion (T), auf Anzahl und Lokalisation der Lymphknotenmetastasen (N) und der Existenz von Fernmetastasen (M) (Tabelle 2). Histopathologie oder Veränderungen auf molekularer Ebene werden bislang nicht berücksichtigt. Wird das Stadium anhand bildmorphologischer Kriterien und klinischer Kriterien festgelegt, steht vor ihm ein kleines c, wird es anhand des Operationspräparates durch den Pathologen erhoben, macht man dies durch ein kleines p deutlich.

**Tabelle 1: Stadieneinteilung** (nach Mountain, 1997)

STADIUM	T	N	M
Okkultes Karzinom	Tx	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T1	N1	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T3	T1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
Stadium IIIB	Jedes T	N3	M0
	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 2: Klinische TNM-Klassifikation** (nach Mountain, 1997)

## **Primärtumor**

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden, oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)
T2	Tumor mit einem der folgenden Kennzeichen hinsichtlich Größe oder Ausbreitung: Tumor mehr als 3 cm in Ausdehnung, Tumor mit Befall des Hauptbronchus, 2 cm oder weiter distal der Carina, Tumor infiltriert viszerale Pleura, assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
T3	Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: Brustwand (einschließlich Tumoren des Sulcus superior), Zwerchfell, mediastinale Pleura, parietales Perikard, oder Tumor im Hauptbronchus weniger als 2 cm distal der Carina, aber Carina selbst nicht befallen, oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina; oder Tumor mit malignem Pleura- oder Perikarderguß, oder Satellitentumoren im gleichen Lungenlappen wie der Primärtumor

## **Regionale Lymphknoten**

Nx	Regionäre Lymphknoten (LK) können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen LK und/oder in ipsilateralen Hilus-LK (einschließlich einer direkten Ausbreitung des Primärtumors)
N2	Metastasen in ipsilateralen, mediastinalen und/oder subcarinalen LK
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten

## **Metastasen**

Mx	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

## **1.3 Diagnostik und Therapie des Lungenkarzinoms**

### **1.3.1 Diagnostik des Lungenkarzinoms**

Die histologische Sicherung des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms erfolgt in den meisten Fällen mittels bronchoskopisch gewonnener Biopsien. Bei peripher gelegenen Herden kann transthorakal, thorakoskopisch oder computertomographisch gesteuert Material entnommen werden. In seltenen Fällen ist eine offene Biopsie notwendig.

Da das Lungenkarzinom oft über Fernmetastasen klinisch manifest wird, sind Biopsien aus Metastasen (zum Beispiel aus Leber, Gehirn oder Knochen) häufig ein erster Hinweis auf den Primarius.

Zu den routinemäßig durchgeführten *Staging* Untersuchungen gehören eine Computertomographie (CT) des Thorax, Knochenszintigraphie und Abdomensonographie (Silvestri et al., 2003b). Bei Verdacht auf zerebrale Metastasen wird eine MRT des Kopfes veranlaßt, zur genauen Klärung des nodalen Befalles können die Positronenemissionstomographie (PET), der endoskopische Ultraschall mit Feinnadelaspiration sowie die Mediastinoskopie eingesetzt werden (Silvestri et al., 2003a).

### **1.3.2 Therapie des Lungenkarzinoms**

Das Lungenkarzinom zeichnet sich meist durch eine schlechte Prognose aus. Als Therapieoptionen stehen die Operation sowie Strahlen- und Chemotherapie zur Verfügung, die bei lokal fortgeschrittenen Tumoren in einer multimodalen Therapie miteinander kombiniert werden. Dabei orientiert sich die Therapie am Tumortyp (SCLC oder NSCLC) und am Erkrankungsstadium (siehe Tabelle 1 und Abbildung 2). SCLCs sind aufgrund ihrer hohen Zellteilungsrate in der Regel inoperabel, jedoch besonders empfindlich für Chemo- und Strahlentherapie; NSCLCs sind in den Anfangsstadien operabel, aber weniger empfindlich für Chemo- und Strahlentherapie als SCLCs.

Im Folgenden wird die Therapie des NSCLC beschrieben:

Tumoren im Stadium I und II sind primär chirurgisch resektabel, ab dem Stadium IB sollte jedoch nach individueller Abwägung eine neoadjuvante oder auch adjuvante Chemotherapie zum Einsatz kommen. Derzeit gibt es nur für die adjuvante Therapie gute Daten. Auch bei R1- oder R2-Resektion, also bei Operationspräparaten, die an den Schnittträgern nicht tumorfrei sind, sollte anschließend bestrahlt und/oder chemotherapiert werden. Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen Lungenkarzinomerkrankungen (Stadium IIIA bzw. Stadium IIIB ohne malignen Pleuraerguß nach UICC) wird eine präoperative, neoadjuvante Chemotherapie oder eine kombinierte Radiochemotherapie mit nachfolgender Operation angestrebt. Besteht funktionelle Inoperabilität, kann in kurativer Absicht strahlentherapiert werden. Metastasierte Tumoren (Stadium IIIB mit malignem Pleuraerguß oder Stadium IV) sind prognostisch inoperabel. Es finden primär palliative Chemotherapieschemata Anwendung, die nach dem Allgemeinzustand des Patienten und dem Nebenwirkungsprofil der Substanzen ausgewählt

werden. Verwendung finden 2-fach-Kombinationen bestehend aus Zytostatika der neueren Generation wie Gemcitabin, Docetaxel, Paclitaxel oder Vinorelbin kombiniert mit Carbo- oder Cisplatin. Neuere Therapieansätze kombinieren die Chemotherapie simultan oder sequentiell mit der sogenannten *targeted therapy* (Huang et al., 2006 und Lynch and Kim, 2005). Diese "gezielte Krebstherapie" entstand durch die Suche nach effektiveren und verträglicheren Medikamenten zur Behandlung von bösartigen Tumoren. Ausschlaggebend war die Erkenntnis, dass bei vielen bösartigen Tumoren bestimmte Rezeptoren auf den Tumorzellen in Überzahl vorhanden oder fehlreguliert sind. So werden für die Therapie bestimmte Eigenschaften von Lungenkarzinomzellen genutzt, die gesunde Zellen kaum oder gar nicht aufweisen. Damit ist die gezielte Krebstherapie gleichsam schonend und wirksam. Beispiele einer *targeted therapy* beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom sind die EGFR Kinaseinhibitoren Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®; beide im klinischen Einsatz) oder Bevacizumab, ein rekombinanter monoklonaler anti-VEGF Antikörper, der die Neubildung von Blutgefäßen im Tumor hemmt (Phase III Studie abgeschlossen).

Bei *in toto* entfernten isolierten Metastasen zum Beispiel des Gehirns oder der Nebenniere kann bei funktioneller Operabilität des Primärtumors eine Resektion in Erwägung gezogen werden (Huber and Schalhorn, 2003).

	•N0	•N1	•N2	•N3	•M1
•T1	•IA	•IIA	•IIIA	•IIIB	IV
•T2	•IB	•IIB	•IIIA	•IIIB	•IV
•T3	•IIB	•IIIA	•IIIA	•IIIB	•IV
•T4	•IIIB	•IIIB	•IIIB	•IIIB	•IV
•M1	•IV	•IV	•IV	•IV	

**Abbildung 2: Die Therapie verschiedener Tumorstadien**

Bei den Stadien I-III A ist eine Operation möglich, ab dem Stadium IB jedoch in Kombination mit einer adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie. Bei den Stadien IIIB und IV kommt eine palliative Chemotherapie und/oder Radiatio in Betracht.

Die klinische Erfahrung hat jedoch gezeigt, dass Tumoren gleichen histologischen Typs und Stadiums verschieden auf bestimmte Chemotherapeutika ansprechen bzw. sich verschieden

schnell lokal ausbreiten oder metastasieren. Genexpressionsanalysen haben dies bestätigt, in dem in Histologie und Stadium gleichwertigen, sich jedoch verschieden verhaltenden Tumoren verschiedene Genmuster gefunden werden konnten (Beer et al., 2002; Creighton et al., 2003; Gordon et al., 2002; Moran et al., 2002; Wigle et al., 2002). Die Umsetzung dieser Erkenntnisse in die Praxis könnte Patienten mit Tumoren von geringem Ausbreitungspotential toxische Therapien ersparen, bei hoher Wahrscheinlichkeit zur Metastasierung könnten hingegen prophylaktische Maßnahmen eingesetzt werden oder nach einer Operation adjuvante Therapiekonzepte verstärkt zum Einsatz kommen. Zudem könnten maßgeschneiderte Chemotherapien verabreicht und neue Therapiestrategien, wie zum Beispiel *targeted* Therapien in einer neuen Dimension, verfolgt werden.

### **1.4 Genetische Veränderungen bei der Genese des Lungenkarzinoms**

Eine genetische Prädisposition scheint nur in wenigen Fällen zur Entwicklung des Lungenkarzinoms beizutragen (Schwartz et al., 1996; Sellers et al., 1990).

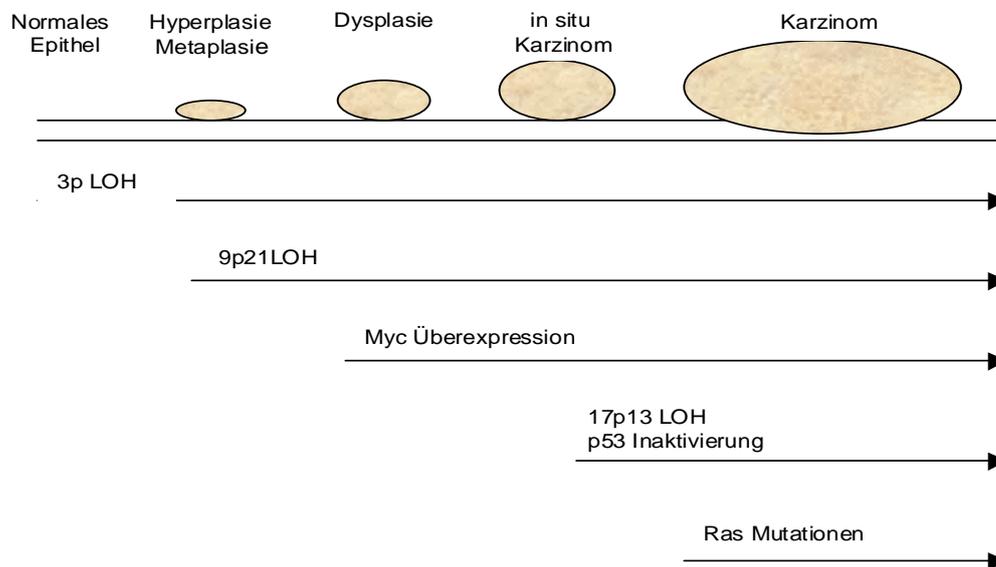
Demgegenüber ist es erwiesen, dass inhalative Noxen, allen voran der Zigarettenrauch, zu bleibenden genetischen Veränderungen des pulmonalen Epithels führen.

Die meisten Zellen befinden sich in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus, teilen sich also nicht. Bei der sich dahingegen ungehindert teilenden Krebszelle existieren Möglichkeiten, die Zellen aus der G<sub>0</sub>-Phase heraus zu bringen. Der kritische Punkt bei der Zellteilung ist das Durchlaufen des G<sub>1</sub>/S-Punktes, dessen Überschreitung irreversibel ist. Die Zellzyklusregulation basiert auf Genprodukten, die auf den Zellzyklus eine fördernde oder bremsende Wirkung entfalten. Mutationen in diesen Genen können zur Auslösung oder Verstärkung einer aktivierenden bzw. zur Aufhebung einer hemmenden Wirkung führen. Proto-Onkogene werden durch Mutationen zu Onkogenen aktiviert, Tumorsuppressorgene hingegen inaktiviert, dabei haben die Mutationen bei Onkogenen meist einen dominanten, bei Tumorsuppressorgenen meist einen rezessiven Charakter. Bei Onkogenen reicht daher eine Mutation für eine Aktivierung, bei Tumorsuppressorgenen muß für eine Inaktivierung neben der Mutation des einen Allels das zweite Allel bereits verloren gegangen sein. Dies geschieht meist durch eine *Deletion*. Durch diese Mutationen kann die Kanzerogenese, also die Transformation von normalen Zellen zu Krebszellen, direkt (zum Beispiel wenn das Onkogen einen Transkriptionsfaktor darstellt) oder indirekt (über eine Aktivierung von Signalwegen) stimuliert werden. Mit einer Unterscheidung

in eine direkte und indirekte Stimulation ist der Komplexität der Krebsentstehung allerdings noch nicht Genüge getan. Häufig kommt es erst durch eine ganze Abfolge von Vorgängen zu einer indirekten oder direkten Stimulation der Zelltransformation. Beispielsweise kann die Wirkung eines Transkriptionsfaktors die Transkription weiterer Faktoren auslösen, die dann wiederum erst indirekt die Bildung solcher Gene fördern, die schlussendlich die transformierende Wirkung entfalten

Neben dem Entgleisen dieser Wachstumskontrollmechanismen sind die Tumorzellen in der Lage, dem programmierten Zelltod (Apoptose) zu entgehen. Weitere Veränderungen resultieren in der Störung von DNA-Reparatursystemen und der Aktivierung invasiver, prometastatischer und angiogenetischer Faktoren. Man nimmt an, dass die Entwicklung des Lungenkarzinoms stufenweise erfolgt (siehe Abbildung 3).

Im Folgenden wird hier kurz auf wichtige Veränderungen bei der Entstehung des Lungenkarzinoms auf der Genebene (= DNA Ebene) hingewiesen, da sich Änderungen auf der DNA Ebene in der in dieser Arbeit untersuchten Genexpressionsebene (= mRNA Ebene) direkt oder indirekt widerspiegeln. Für eine ausführlichere Darstellung wird auf Übersichtsarbeiten zu diesem Thema verwiesen (Sanchez-Cespedes, 2003; Sekido et al., 2003).



**Abbildung 3: Modell der stufenweisen Entwicklung des Lungenkarzinoms (Sekido et al., 1998)**

### **1.4.1 Aktivierung von Proto-Onkogenen und Wachstumsfaktoren**

Onkogene können durch Punktmutationen, Deletionen, chromosomale Translokationen oder Gen-Amplifikationen aktiviert werden. Ein Großteil der bekannten von Onkogenen kodierten Proteine läßt sich ihrer Funktion nach in vier Klassen einteilen:

- Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren in der Zellmembran
- Proteinkinasen im Zytoplasma
- GTP-bindende Proteine in der Zellmembran (zum Beispiel Ras)
- DNA-bindende Proteine (Transkriptionsfaktoren) im Zellkern (zum Beispiel Myc)

#### **1.4.1.1 Die Ras Genfamilie**

Proto-Onkogene der Ras-Genfamilie binden an Guanosintriphosphat (GTP) und wandeln dieses durch eine intrinsische GTPase in die inaktive Form (Guanosindiphosphat, GDP) um. Eine Mutation von Ras (zum Beispiel eine Punktmutation an Position 12 und 13 des Ras-Proteins) verlangsamt die GTP-Hydrolyse und resultiert in der Akkumulation der aktiven, GTP-gebundenen Form und der Aktivierung des RAF1/MAPK Wegs und damit der Aktivierung von Proliferation.

Die meisten Mutationen beim Lungenkarzinom betreffen das K-Ras-Gen (Slebos et al., 1990), fast ausschließlich betroffen dabei ist das Adenokarzinom (Tsuchiya et al., 1995). Unter anderem als Konsequenz der Exposition zu Zigarettenrauch entstehen dabei DNA-Addukte, die in spezifischen Kodons des K-Ras- und des p53-Gens akkumulieren.

#### **1.4.1.2 Myc Onkogene**

Zur Myc Familie der Proto-Onkogene gehören c-Myc, N-Myc und L-Myc. Sie kodieren für Transkriptionsfaktoren (Grandori et al., 2000). Für eine Aktivierung zu Onkogenen ist dabei eine Amplifikation, also eine Vervielfältigung des Gens auf der Ebene der DNA (zum Beispiel durch Translokation, Bildung von Isochromosomen, Mutation) mit nachfolgender Überexpression auf RNA Ebene notwendig.

Myc reguliert einen Cyclin-abhängige Proteinkinase (CDK) Inhibitor (Coller et al., 2000), induziert die Expression von Cyclin D1/D2 und führt zur Akkumulation von Cyclin D-CDK4 Komplex. Aus diesem gehen weitere Produkte hervor, die zur Zellzyklusprogression beitragen

(Coller et al., 2000; Guo et al., 2000). Eine abnormale Myc Expression kommt häufig im SCLC und weniger häufig in NSCLCs vor (Zochbauer-Muller et al., 2002).

### 1.4.1.3 Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren

Eines der am besten charakterisierten autokrinen Systeme beim Lungenkarzinom ist das des Gastrin-freisetzenden Peptids (*gastrin-releasing peptide*, GRP) und anderer Bombesin-ähnlicher Peptide (*bombesin-like peptides*, BN) sowie ihrer Rezeptoren *gastrin-releasing*-Peptid-Rezeptor (GRPR), Neuromedin B receptor (NMBR) und Bombesin Rezeptor Subtyp 3 (BRS-3) (Zochbauer-Muller et al., 2002). Die Peptide sind bedeutende Regulatoren der Lungenentwicklung (Spindel, 1996). Die Überexpression der drei GRP/BN Rezeptoren ist beim SCLC wie beim NSCLC weit verbreitet (Spindel, 1996). Der Ligand NMB wird in 100% der SCLCs und NSCLCs exprimiert (Cardona et al., 1991) und GRP wird in etwa 20-60% der SCLC und weniger häufig in NSCLC exprimiert (Richardson and Johnson, 1993). Die Aktivierung von GRP Rezeptoren in den Luftwegen wurde mit langer Zigarettenrauchexposition assoziiert (Zochbauer-Muller et al., 2002).

Neureguline sind Peptidwachstumsfaktoren, die mit der ERBB Familie der transmembranären Rezeptortyrosinkinasen (ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4) interagieren. Der aktivierte ERBB Rezeptor induziert eine intrinsische Kinase, welche intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden wie zum Beispiel den MAP-Kinase-Signalweg aktiviert (Sekido et al., 1998). Die Überexpression von ERBB1 ist häufiger in NSCLC als in SCLC und ist möglicherweise von Tumorstadium und dem Grad der Differenzierung abhängig (Damstrup et al., 1992; Tateishi et al., 1990). ERBB2 ist in über einem Drittel der NSCLCs stark exprimiert, besonders aber in Adenokarzinomen (Schneider et al., 1989; Shi et al., 1992; Weiner et al., 1990).

Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factors*, IGF I und II) und der Typ I IGF-Rezeptor (IGF-R) sind häufig hochreguliert in SCLC und NSCLC (Quinn et al., 1996).

Der Hepatozytenwachstumsfaktor (*hepatocyte growth factor*, HGF) und sein Rezeptor c-Met stimulieren die Proliferation und sind bei Differenzierungsprogrammen wie Morphogenese und Angiogenese involviert. Met wird in Lungenkarzinomen wie auch in normalem pulmonalen Gewebe exprimiert, wohingegen HGF in vielen NSCLCs nicht jedoch in SCLCs exprimiert wird (Harvey et al., 1996; Olivero et al., 1996; Rygaard et al., 1993). Erhöhtes HGF wurde mit einem schlechteren Überleben in resezierten NSCLCs assoziiert (Siegfried et al., 1997).

Ein weiterer autokriner Signalweg beim Lungenkarzinom ist der des Plättchenwachstumsfaktors (*platelet-derived growth factor*, PDGF) und dessen Rezeptors (PDGFR) (Antoniades et al., 1992).

Durch autokrine Signalwege ist eine von der Umgebung unabhängige Entwicklung und damit ein ungehemmtes Wachstum des Tumors möglich.

### **1.4.2 Verlust der Funktion von Tumorsuppressorgenen und der Wachstumskontrolle**

Bei dem Prozeß der Lungenkarzinogenese spielt die Inaktivierung vieler Tumorsuppressorgene eine Rolle. Mutationen von Tumorsuppressorgenen haben häufig einen rezessiven Charakter. Einem Funktionsverlust liegt also die Inaktivierung beider Allele zugrunde. Ein großer Abschnitt eines Allels ist dabei deletiert oder durch nicht-reziproke Translokation oder mitotische Rekombination (*loss of heterozygosity*, LOH) verloren gegangen, während das andere Allel durch Mutation, Methylierung, epigenetische oder andere Veränderungen inaktiviert wird. Studien, die zur LOH durchgeführt wurden, haben zu Hinweisen über die Lokalisation von Tumorsuppressorgenen geführt, die bei der Entstehung des Lungenkarzinoms eine Rolle spielen. Die Gene, die beim Lungenkarzinom am häufigsten durch LOH verändert werden, liegen auf den Chromosomenarmen 1p, 3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10p, 10q, 13q, 15q, 17p, 18q, 19p, Xp and Xq. Deletionen von 3p, 9p21 (p16INK4A/p15INK4B), 13q14 (Retinoblastomgen) und 17p13 (p53) stehen dabei am Anfang dieses Prozesses (Osada and Takahashi, 2002; Zochbauer-Muller et al., 2002).

#### **1.4.2.1 Tumorsuppressorgene in der 3p Region**

Ein Allelverlust in der 3p Region ist eine der häufigsten genetischen Alterationen, die sowohl beim SCLC (> 90%) als auch beim NSCLC (~ 70%) nachgewiesen wurden. Dabei wurden verschiedene, separate Abschnitte des Allelverlust identifiziert, darunter 3p25-26, 3p21.3-22, 3p14 and 3p12 (Hibi et al., 1992; Latif et al., 1992).

Ein Allelverlust auf 3p scheint eine der frühesten Veränderungen in der Pathogenese des Lungenkarzinoms zu sein, da sie sogar in histologisch normalem Epithel von Lungenkarzinompatienten und gesunden Rauchern nachgewiesen wurde (Wistuba et al., 1997). Die Häufigkeit und das Ausmaß des Allelverlusts nehmen dabei mit zunehmenden histopathologischen Veränderungen zu. Daraus läßt sich schließen, dass multiple Tumorsuppressorgene in dieser Region liegen.

Einige mutmaßliche Tumorsuppressorgene wurden aufgrund von homozygot deletierten Regionen in Zelllinien des Lungenkarzinoms identifiziert. Ein Beispiel ist das ROBO1/DUTT1 Gen, welches aus einer homozygot deletierten Region in 3p 12-13 isoliert wurde. Es ist homolog zu dem *Drosophila axon guidance receptor/Roundabout* Gen, welches als Rezeptor der Slit Familie fungieren könnte (Sundaresan et al., 1998).

Das FHIT (*fragile histidine triad*) Gen, welches für die Diadenosin-Triphosphat-Hydrolase kodiert, wurde in 3p14.2 identifiziert (Croce et al., 1999; Sozzi et al., 1996). FHIT inhibiert das Tumorstadium durch die Induktion von Apoptose und das Anhalten des Zellzyklus. Der Verlust der FHIT Expression kann in fast allen SCLCs nachgewiesen werden, beim NSCLC ist er häufiger im Plattenepithelkarzinom als im Adenokarzinom (Geradts et al., 2000; Wistuba et al., 2000).

### **1.4.2.2 Der p16INK4-Cyclin D1-CDK4-RB Signalweg**

p16 bindet die Cyclin abhängige Proteinkinase 4 (*cyclin-dependent protein kinase 4*, CDK4) und hemmt so die Interaktion von CDK4 mit Cyclin D1. Der Komplex Cyclin D1-CDK4 phosphoryliert das Produkt des Retinoblastomgens (pRB) und befreit die Zellen auf diese Weise von der Wachstumshemmung (Sherr, 1996). p16, lokalisiert auf dem Chromosom 9p21, wird häufig durch Veränderung der Methylierung seiner Promotorregion inaktiviert oder unterliegt Allelverlust und Mutationen (Zochbauer-Muller et al., 2002). In NSCLCs sind p16 Veränderungen häufig, in SCLCs dahingegen selten (Sekido et al., 1998).

### **1.4.2.3 Der p53-MDM2-p14ARF Signalweg**

Das p53 Gen, lokalisiert auf 17p13, ist eines der bedeutendsten Tumorsuppressorgene und wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Bei Einwirkung von  $\gamma$ -Strahlung, UV-Strahlung oder Karzinogenen auf das Genom aktiviert p53 die Expression einer Reihe von Genen wie p21/WAF1/CIP1, MDM2, GADD 45, IGF-BP und Cyclin G, welche einen Zellzyklusarrest, die Einschaltung von DNA Reparatursystemen und Apoptose bewirken (Levine, 1997). Nicht reparable DNA Schäden induzieren p53 vermittelte Apoptose durch Expression von Genen z.B. der Bcl-2 Familie (BAX, NOXA, PUMA), APAF1, PIG3 oder p53AIP (Osada and Takahashi, 2002).

Eine Kopie des p53 Gens ist häufig deletiert in SCLCs wie NSCLCs und die Inaktivierung durch eine Mutation des verbleibenden Allels tritt in 75-100 % der SCLCs und in circa 50 % der

NSCLCs auf. Eine bestimmte Mutationsform scheint dabei direkt mit dem Zigarettenkonsum zu korrelieren (Hainaut and Vahakangas, 1997). Zusätzliche abnormale p53 Expression wurde in 40-70 % SCLCs und 40-60 % NSCLCs beobachtet (Nishio et al., 1996). Eine große Metaanalyse, die durchgeführt wurde um zu sehen ob p53 Änderungen das Überleben von NSCLC Patienten beeinflussen, zeigte, dass der negativ prognostische Effekt von p53 Alterationen in Adenokarzinomen, nicht jedoch in Plattenepithelkarzinomen hoch signifikant ist (Mitsudomi et al., 2000).

### **1.4.2.4 Der TGF- $\beta$ Signalweg, Smad 2 und Smad 4**

TGF- $\beta$  hemmt die Proliferation von Epithelzellen durch die Induktion von CDK Inhibitoren (p15INK4B, p21CIP1, p27KIP1) und teilweise durch die Herunterregulation von Myc (Osada and Takahashi, 2002). Eine Expressionsanalyse zeigte, dass die Expression von TGF- $\beta$  Rezeptor II (TGF $\beta$ RII) ein charakteristisches Merkmal von normalem Lungengewebe ist (Bhattacharjee et al., 2001). Es wurde berichtet, dass die Expression dieses Rezeptors beim Lungenkarzinom häufig verloren geht (Osada et al., 2001). Mutationen der intrazellulären Mediatoren von TGF- $\beta$ , Smad2 und Smad4 sind weniger häufig (Nagatake et al., 1996; Uchida et al., 1996).

### **1.4.2.5 Der APC Gen/Wnt Signalweg**

Das adenomatöse Polyposis Coli Gen (APC) spielt eine Rolle im Wnt-Signalweg. Mit dem Verlust der APC Expression, häufig beobachtet beim Lungenkarzinom, wird der Wnt-Signalweg angeschaltet und über  $\beta$ -Catenin werden Gene wie das c-Myc Onkogen und Cyclin D1 hochreguliert, die beide die Zellzyklusprogression regulieren (Fearnhead et al., 2001).

### **1.4.3 Gestörte DNA Reparatur und Zellzykluskontrolle**

Während der Mitose gibt es Kontrollstellen im Zellzyklus („*checkpoints*“), welche DNA Schäden detektieren und eine Reparatur veranlassen. Durch Brüche in der doppelsträngigen DNA werden die ATM- und die ATR-Kinase aktiviert, welche Schlüsselmoleküle wie CHK1, CHK2, p53, BRCA1 and NBS1 phosphorylieren und zum Zellzyklusarrest an den Stellen G1, S und G2 führen (Osada and Takahashi, 2002). Die DNA-*damage*-aktivierten Kinasen CHK1 und CHK2 phosphorylieren die Tyrosinphosphatase Cdc25C und schaffen damit eine Bindungs-

Stelle für 14-3-3 Proteine. Die Interaktion dieser Proteine mit Cdc25c führt zum Arrest des Zellzyklus. Durch Änderungen in der Expression von 14-3-3 Genen kann jedoch auch eine Zellzyklusderegulation verursacht werden (Hermeking und Benzinger, 2006).

In den meisten Lungenkarzinomen, in NSCLC ebenso wie SCLC, schwächen genetische Veränderungen von p53 den G1 Kontrollpunkt, wohingegen der G2 Kontrollpunkt speziell im SCLC in der Funktion geändert ist (Konishi et al., 2002). CHK2 kann in Lungenkarzinomen durch Mutation verändert sein (Haruki et al., 2000). Über den Verlust von 14-3-3 $\sigma$  durch Hypermethylierung wurde ebenfalls berichtet (Osada and Takahashi, 2002). Das 14-3-3 $\sigma$  Gen wird durch p53 induziert und sein Proteinprodukt inhibiert den Zellzyklus (Hermeking und Benzinger, 2006).

Essentielle Komponenten des Mitosespindel Kontrollpunkts, die BUB und MAD Gene, können beim Lungenkrebs ebenfalls Mutationen aufweisen (Nomoto et al., 1999; Sato et al., 2000; Yamaguchi et al., 1999).

### **1.4.4 Änderung des Methylierungsmusters**

Neben Deletion und Mutation kann auch eine Methylierung zum Verlust der Funktion von Tumorsuppressorgenen führen. Werden CpG-Inseln im Promotorbereich von Tumorsuppressorgenen methyliert, können diese Gene nicht mehr abgelesen werden (Esteller et al., 2001).

### **1.4.5 Defekter Apoptosemechanismus und Entkommen vor der Immunkontrolle**

Das Proto-Onkogen Bcl-2 schützt Zellen vor Apoptose und wird durch p53 negativ reguliert. Das Bcl-2 Protein wird häufig in SCLCs (Kaiser et al., 1996) und NSCLCs (Pezzella et al., 1993) exprimiert. Es ist wahrscheinlich, dass Tumorzellen Bcl-2 überexprimieren um Apoptosesignale durch Ras und Myc Expression zu überwinden (Zochbauer-Muller et al., 2002). BAX ist ein Bcl-2 verwandtes Protein und wahrscheinlich ein „*downstream*“ Transkriptionsziel von p53. Es formt mit Bcl-2 Homo- oder Heterodimere und es wird angenommen, dass das Bcl-2 : BAX Verhältnis die Anfälligkeit der Zelle für Apoptose bestimmt (Sekido et al., 1998). Neben dem Vermeiden der Apoptose entwickeln Tumorzellen auch Strategien, um dem Erkennen durch das Immunsystem zu entkommen (auch als „*escape*“ bezeichnet). Es konnte gezeigt werden, dass die Klasse I MHC Antigenexpression beim Lungenkrebs herunterreguliert

ist (Korkolopoulou et al., 1996; Redondo et al., 1991). Das Klasse I Molekül des „*major histocompatibility complex*“ (MHC) vermittelt die Präsentation von endogenen Peptidantigenen zu zytotoxischen Lymphozyten. Mutationen des  $\beta$ 2-Mikroglobulins, dessen Produkt eine Komponente des MHC I ist, sowie die Herunterregulation eines Transporters, welcher für die Antigenpräsentation verantwortlich ist, wurden ebenfalls beschrieben (Chen et al., 1996; Singal et al., 1996).

### 1.5 Angiogenese und Lungenkarzinom

Die Bedeutung der Angiogenese bei der Entwicklung und dem Verhalten von Tumoren wurde erstmals von Folkman (Folkman, 1971) hervorgehoben. Eine ganze Zahl angiogener Faktoren konnte identifiziert werden (Folkman, 1997). Angiogenetische Faktoren werden von Tumor- und ihren Vorläuferzellen unter bestimmten Bedingungen wie Hypoxie oder Änderungen von Onkogenen sezerniert. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) ist einer der bedeutendsten Vertreter (Veikkola and Alitalo, 1999). Er wird im Lungenkarzinom häufig überexprimiert (O'Byrne et al., 2000).

### 1.6 Genexpressionsanalyse

Für die Subklassifikation von Tumorentitäten auf molekularer Ebene, die Identifikation von diagnostischen und prognostischen Markern, die Aufklärung von Signaltransduktionswegen und die Entdeckung neuer therapeutischer Zielmoleküle (*targets*) werden Hochdurchsatzverfahren genutzt, die es möglich machen, Genexpressionsanalysen von tausenden Genen gleichzeitig durchzuführen.

Dabei werden „geschlossene“ und „offene“ Systeme unterschieden. Bei den geschlossenen Systemen der Genexpressionstechnologien nutzt man einen individuell vorgegebenen, für bestimmte Bedingungen definierten Satz an Genen, wohingegen bei offenen Systemen vorab keine Informationen über Gensequenzen benötigt werden.

Beide Systeme sind komplementär: offene Systeme sind in der Lage neue, mit der untersuchten Krankheit in Zusammenhang stehende Gene zu detektieren, während geschlossene Systeme Daten zur Genexpression all jener Gene einer Gewebeprobe liefern, die mit der genutzten

Technologie vorgegeben werden. Mit der Sequenzierung des gesamten humanen Genoms und mit der Verfügbarkeit stets sensibler werdender *Array*-basierter Methoden ist vorhersehbar, dass immer weniger offene Technologien zum Einsatz kommen. Im Folgenden werden kurz diejenigen Technologien beschrieben, die derzeit am meisten genutzt werden: „*serial analysis of gene expression*“ (SAGE), „*suppression subtractive hybridization*“ (SSH), cDNA- und Oligonukleotid-Mikroarrays.

### 1.6.1 *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE)

Die Methode des SAGE wurde von Velculescu et al. entwickelt um die Bestimmung von Absolutmengen aller in einer Zellpopulation vorhandenen Transkripte zu ermöglichen (Velculescu et al., 1995). Eine Nukleotidsequenz von nur 10-11 Basenpaaren ist ausreichend, um ein Transkript eindeutig zu identifizieren. Dazu wird die von den Zellen isolierte mRNA in Doppelstrang-DNA umgeschrieben und mit verschiedenen Enzymen verdaut, so dass 9-15 Basenpaare lange Abschnitte bestimmter Stellen der DNA entstehen. Diese werden „*tags*“ genannt. Für die Analyse einer Gewebeprobe werden ungefähr 10.000-100.000 solcher *tags* analysiert. Die Gesamtanzahl eines jeden *tag* repräsentiert dabei die Menge des korrespondierenden Transkripts. In einem nächsten Schritt wird das Gen identifiziert, das einem *tag* zugrunde liegt. Dabei wird die Nukleotidsequenz der *tags* benutzt um *expressed sequence tags* (ESTs)- oder cDNA Datenbanken des jeweiligen Organismus abzufragen (Altschul et al., 1990). Die Ergebnisse von *tag*-Anzahl und -Identifizierung werden in einem Genexpressionsprofil zusammengefaßt. So können Genexpressionsprofile verschiedener Gewebe miteinander verglichen werden. Die Gruppen um Nacht (Nacht et al., 2001) sowie um Hibi (Hibi et al., 1998) verglichen mit dieser Methode die Genexpression von SCC und AC.

SAGE stellt eine „offene“ Genexpressionsanalyse dar, es können theoretisch alle Transkripte einer Probe isoliert und benannt werden. Ein anderer Vorteil von SAGE sind die gegenüber Mikroarray-Experimenten wesentlich geringeren Kosten. Jedoch dauert diese Methode mit 10-14 Tagen für die Analyse von zwei Proben von der Isolation bis zum Vergleich der Genexpressionen sehr lang. Somit ist SAGE nicht für einen hohen Durchsatz von Proben geeignet (Matsumura et al., 2005).

Die SAGE Methode wurde von verschiedenen Forschern modifiziert um bestimmte Zwecke zu erfüllen. So ist es mit der Methode des LongSAGE möglich, durch die Generierung von 21 Basenpaaren langen *tags* Gene und Exons schneller zu identifizieren (Saha et al., 2002). Mit der

Methode des SuperSAGE dahingegen werden 26 Basenpaare lange *tags* erhalten, so dass die simultane Messung verschiedener Proben möglich ist (Matsumura et al., 2005).

### **1.6.2 *Suppression Subtractive Hybridization (SSH)***

Dieses Verfahren, von Diatchenko et al. beschrieben, basiert auf einer Methode, die *Suppression PCR* genannt wird (Diatchenko et al., 1996). Dabei wird die gesamte zelluläre RNA, die unabhängig aus zwei Proben gewonnen wurde, in cDNA umgeschrieben. Die in den Proben verschieden exprimierten RNAs werden dann voneinander subtrahiert.

Ein Schritt, der Normalisation genannt wird, gleicht dabei die Vielfalt der cDNA innerhalb der sogenannten *Target-Population* an, der Schritt der Subtraktion schließt gemeinsame Sequenzen der sogenannten *Target-* und *Driver-Population* aus. Diese Technik kann während einem einzigen Hybridisierungsdurchlauf seltene Sequenzen auf das mehr als das Tausendfache anreichern (Diatchenko et al., 1996). Dieses Verfahren ist jedoch sehr zeitaufwendig, da alle cDNA Fragmente sequenziert werden müssen. Außerdem ist es sehr schwierig, viele Proben miteinander zu vergleichen, es sei denn angereicherte, verschieden exprimierte cDNA Fragmente werden in einem Folgeschritt in cDNA *Arrays* verwendet.

Diese Methode wurde von Difilippantonio et al. und Petersen et al. zur Genexpressionsanalyse des Lungenkarzinoms angewandt (Difilippantonio et al., 2003; Petersen et al., 2000; Petersen and Petersen, 2003).

### **1.6.3 Mikroarrays**

Die Mikroarray-Technologie wurde erfolgreich genutzt, um zahlreiche Erkrankungen näher zu beschreiben, wie zum Beispiel Leukämie (Golub et al., 1999), malignes Lymphom (Alizadeh et al., 2000), malignes Melanom (Bittner et al., 2000), Dickdarmkrebs (Alon et al., 1999), hepatozelluläres Karzinom, Ovarial- (Welsh et al., 2001), Mamma- (Hedenfalk et al., 2001; Perou et al., 1999) und Prostatakarzinom (Elek et al., 2000). In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Arbeiten zu Genexpressionsanalysen beim Lungenkarzinom. Einige Forschungsgruppen untersuchten alle histologischen Entitäten (Beer et al., 2002; Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001; Virtanen et al., 2002; Yamagata et al., 2003). Andere konzentrierten sich auf eine oder wenige Lungenkarzinomformen (Giordano et al., 2001; Goodwin et al., 2001). Viele versuchten eine Subklassifikation der einzelnen histologischen

Entitäten, besonders des Adenkarzinoms, zu erstellen (Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001). Andere korrelierten Parameter wie Rauchen (Miura et al., 2002; Powell et al., 2003; Singhal et al., 2003), Metastasierungspotential (Chen et al., 2001) oder Überleben (Beer et al., 2002; Yamagata et al., 2003) mit der Genexpression, verglichen Tumorgewebe mit angrenzendem noch normalem Lungengewebe (McDoniels-Silvers et al., 2002) oder prüften die Sensibilität gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika (Kikuchi et al., 2003).

Auf diese und weitere zahlreiche beim Lungenkarzinom durchgeführte und veröffentlichte Genexpressionsanalysen wird in dieser Arbeit im Diskussionsteil eingegangen und hier auf den im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Übersichtsartikel verwiesen (Muller-Hagen et al., 2004).

Es gibt zwei Typen von Mikroarrays: cDNA- und Oligonukleotid-Mikroarrays.

### 1.6.3.1 cDNA-Mikroarrays

Mit dieser „geschlossenen“ Methode kann die Genexpression tausender Gene in einem einzigen Hybridisierungsschritt parallel gescannt werden. Im Gegensatz zu Oligonukleotid-Mikroarrays werden bei der Herstellung von cDNA-Mikroarrays PCR-Produkte mit einem *Spotting-Roboter* auf eine Glasoberfläche oder eine Nylonmembran gebracht und können so direkt in molekularbiologischen Labors hergestellt und an sich ändernde Bedürfnisse angepaßt werden.

*Spotted* Mikroarrays bestehen aus längeren Oligonukleotiden (50-80 Nukleotide) oder cDNA Fragmenten (100-500 Nukleotide), die durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) generiert und auf Nylonmembranen oder gläsernen Objektträgern aufgebracht werden. Bei sogenannten *low-density* cDNA-Mikroarrays werden radioaktiv markierte Proben, in *high-density* cDNA-Mikroarrays fluoreszenzmarkierte Proben an die DNA der *spotted* Mikroarrays hybridisiert (Schena et al., 1996). Die Produkte, die als Sonden auf den Träger aufgebracht werden, sind meistens Klone bzw. PCR-Produkte aus cDNA Banken oder auch Oligomere (50-60 bp). Als Farbstoffe für die Markierung der cDNAs sind Fluorescein-12, Cy3 (rot) oder Cy5 (grün) gebräuchlich.

Eine häufig verwendete Form ist die konkurrierende Hybridisierung von zwei verschieden markierten cDNA-Proben auf einem *Array*. Untersucht man beispielsweise Tumorzellen und normale Gewebezellen eines Patienten, so markiert man bei der cDNA-Synthese die Zellen des einen Typs mit Cy3 (rot) und die des anderen mit Cy5 (grün). Dann hybridisiert man ein Gemisch der beiden markierten cDNAs auf ein *Array*. Mißt man bei unterschiedlichen Wellenlängen die Intensitäten der beiden Farbstoffe (rot und grün) auf einem *Spot*, so sollte sich in dem Signalverhältnis das Konzentrationsverhältnis der markierten Transkripte widerspiegeln.

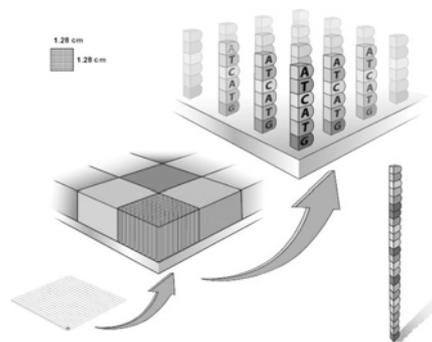
Die Überlagerung des Signals von Rot- und Grünkanal korreliert also mit der relativen Messung der RNA Menge.

Mit der Anwendung dieser Methode entstanden eine ganze Reihe von Arbeiten über Genexpressionsanalysen des Lungenkarzinoms (Bangur et al., 2002; Garber et al., 2001; Heighway et al., 2002; Hellmann et al., 2001; Kikuchi et al., 2003; McDoniels-Silvers et al., 2002; Nakamura et al., 2003; Wang et al., 2000; Wigle et al., 2002; Wikman et al., 2002; Yamagata et al., 2003).

### 1.6.3.2 Oligonukleotid-Mikroarrays

Dies sind  $24 \mu\text{m}^2$  große, von einer Plastikkapsel umhüllte Siliconträger. Die Firma Affymetrix nennt diese Mikroarrays auch *GeneChips*<sup>®</sup>. Die neueste Generation der *GeneChips*<sup>®</sup> bietet inzwischen Detektoren für fast das gesamte humane Genom auf einem *Chip* an. Darauf repräsentieren circa 47.000 Transkripte ungefähr 38.500 Gene.

Die Synthese der Oligonukleotide auf der Glasoberfläche erfolgt unter Reinraumbedingungen, wie sie für die Herstellung von Computer-Chips verwendet werden. Mittels der photolithographischen Technologie werden die Oligonukleotide direkt auf die *Arrays* synthetisiert (Affymetrix, Santa Clara, CA) (Lockhart et al., 1996). Dabei erfolgt die Synthese Base für Base. In jeder Schicht werden lichtempfindliche 5'-Schutzgruppen selektiv von den wachsenden Oligomeren entfernt. Jeder gerade gekoppelte Baustein blockiert seinerseits durch Schutzgruppen das Weiterwachsen der Kette. Das genaue Positionieren der Lichtstrahlen erreicht man mit Hilfe photolithographischer Masken. Die Länge der synthetisierten Oligomere beträgt 25 Nukleotide. Den Bereich auf dem *Array*, auf dem eine Spezies von Oligonukleotiden synthetisiert wurde, nennt man *feature* (siehe Abbildung 4).



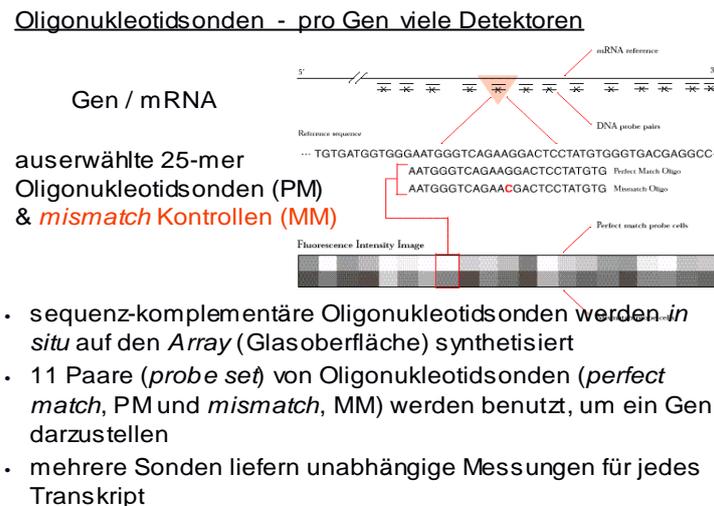
**Abbildung 4:**

**Feature eines Arrays**

([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))

- Fläche, wo je eine Oligonukleotidsonde aufgebracht wird, wird als *feature* bezeichnet ( $11 \mu\text{m} \times 11 \mu\text{m}$ )
- $10^7 - 10^8$  Moleküle pro *feature*

Für jedes *perfect match* Oligonukleotid (PM), welches 100% homolog ist zu der mRNA-Sequenz, ist auf dem Chip eine spezifische Negativkontrolle, das *mismatch* Oligonukleotid (MM) synthetisiert, bei dem die 13. Base durch ihr Komplement ausgetauscht ist. Die Standardsonde für die Untersuchung einer Zielsequenz besteht bei Affymetrix-*GeneChips*<sup>®</sup> aus 11 spezifischen Oligonukleotiden sowie den 11 entsprechenden MM-Oligonukleotiden, in der Gesamtheit als *probe set* bezeichnet (siehe Abbildung 5). Die Oligonukleotidsequenzen entsprechen den letzten 600-1000 Basenpaaren des 3' Endes der jeweiligen mRNA.



**Abbildung 5: Probe set (www.affymetrix.com)**

Dabei liegen die zu einem *probe set* gehörenden Oligonukleotide nicht nebeneinander, sondern verteilt auf dem *GeneChip*<sup>®</sup>. Das hat den Vorteil, dass bei lokalen Störungen auf dem Array (zum Beispiel durch Luftblasen oder Herstellungsdefekte) eine genügende Anzahl von Detektoren für die Sequenz vorhanden ist.

Zusätzlich zu den Detektor-Oligonukleotiden werden noch markierte artifizielle Nukleotide auf den *GeneChip*<sup>®</sup> aufgebracht. Diese fungieren als Kontrolle. Wiederum andere markierte Oligonukleotide ermöglichen es der Bildanalyse-Software, ein Gitternetz über den *GeneChip*<sup>®</sup> zu legen und damit die *feature* Grenzen exakt zu lokalisieren und während des *Scannens* zu fokussieren. Sie dienen gleichzeitig der Qualitätskontrolle der Oligonukleotidsynthese. Außerdem sind auf den Arrays *probe sets* für die bakteriellen Gene bioB, bioC, bio D und cre zur Hybridisierungskontrolle vorhanden.

Im Gegensatz zu den cDNA-Mikroarrays wird bei den Oligonukleotid-Mikroarrays keine Kontrollprobe verwendet, es werden daher absolute Expressionswerte der RNA (Signalintensitäten) gemessen.

Forschungsgruppen, die mit dieser Methode die Genexpression von Lungenkarzinomproben untersuchten, sind zum Beispiel Bhattacharjee et al., Beer et al., Moran et al., Sugita et al., Singhal et al., und Giordano et al. (Beer et al., 2002; Bhattacharjee et al., 2001; Giordano et al., 2001; Moran et al., 2002; Singhal et al., 2003; Sugita et al., 2002).

### 1.6.3.3 SURF Array

In dieser Arbeit wurden sogenannte Kunden *GeneChips*<sup>®</sup> verwendet, das sind von Affymetrix speziell auf Kundenwunsch, in dem Falle für die Schering AG, angefertigte Oligonukleotid-Mikroarrays. Die den *probe sets* zugrunde liegenden Sequenzen werden dabei vom Anwender vorgegeben. Design und Herstellung der *Arrays* unterliegen der Firma Affymetrix. Der in dieser Arbeit verwendete Kundenchip „SURF“-Array beinhaltet die Mehrheit aller humanen Gensequenzen für Zelloberflächenproteine sowie für transmembranäre, membranassoziierte oder sezernierte Proteine. Er enthält 19.892 *probe sets*, die 18.080 Sequenzen korrespondierend zu 11.745 Genen repräsentieren.

### 1.6.4 Verarbeitung der Mikroarray-Genexpressionsdaten

#### 1.6.4.1 Normalisation, *Refining* und Kondensation

Bevor alle Mikroarray Experimente einer Datenanalyse unterzogen werden können, müssen die Signale normalisiert oder modifiziert werden, um sie vergleichbar zu machen (Butte, 2002). Wurden alle Experimente zu gleicher Zeit gemacht, mit homogenen Gewebeproben und mit nur einer Mikroarray Technologie kann dieser Schritt recht einfach sein, indem man die Helligkeit der *Scanbilder* anpaßt. Andere Normalisationsmethoden sind das Benutzen der Genexpressionsdaten von „*housekeeping*“ Genen, theoretische Annahmen, dass sich die meisten Gene zwischen einzelnen Experimenten nicht ändern, oder andere nicht-lineare Techniken.

Meist sind Mikroarray Experimente jedoch komplizierter und *intra-* sowie *inter-microarray* Variationen („*noise*“) können die Interpretation von Expressiondaten verfälschen. Dabei kann man unter anderem biologischen *noise* (wie zum Beispiel das unterschiedliche Expressionsverhalten von Genen, die für Hormone mit tageszeitlichen Schwankungen der Konzentration kodieren) und technischen *noise* unterscheiden. Den letzteren kann man durch die Methode des „*Refining*“ vermindern.

Die 22 Expressionswerte pro Gen eines *probe sets* (11 spezifische Oligonukleotide sowie 11 entsprechende *mismatch* Oligonukleotide) werden für die Analyse zu einem Wert zusammengerechnet. Dies nennt man Kondensation.

### 1.6.4.2 Genexpressionsanalysen

Nach der Transformation der Rohdaten in eine Genexpressionsmatrix durch *Refining*, Kondensation und Normalisation werden die erhaltenen Daten analysiert.

Es wurden umfangreiche bioinformatische Programme entwickelt und es existieren Algorithmen der Datenauswertung. Welche Form der Datenauswertung gewählt wird, hängt sowohl vom Untersucher als auch vom Experiment ab. Die Kunst der bioinformatischen Analyse besteht im richtigen Übersetzen von Arbeitshypothesen in adäquate Analysemethoden.

Ziel von Expressionsdatenanalysen ist es, Beziehungen und Muster einzelner Daten zu erkennen und neue Einsichten in die zugrunde liegende Biologie der untersuchten Gewebeproben zu erlangen. Gene und deren Produkte, die bei einer bestimmten Krankheit im Vergleich zum normalen Gewebe verändert exprimiert werden, können einen bestimmten Phänotyp erklären helfen.

Es folgt ein kurzer Überblick über allgemein verwendete Methoden wie *supervised* und *unsupervised methods* (Butte, 2002). In den Abschnitten Methoden und Diskussion wird erläutert, welche Formen der Datenauswertung bei dieser Arbeit verwendet wurden.

#### *Supervised methods:*

Bei dieser Analysemethode ist vorher bekannt, welche Proben in welche Gruppe fallen (zum Beispiel krank/gesund). Man teilt die Proben in diese Gruppen ein und verwendet dann Methoden um Gene zu finden, die sich in den Gruppen unterscheiden.

Dieses Verfahren wendet man an, um Unterschiede in der Genexpression verschiedener Gruppen von Gewebe zu finden oder um für eine Erkrankung charakteristische Gene zu extrahieren.

Um herauszufinden, ob ein Gen zwischen Gruppen verschiedener Proben differentiell exprimiert ist, muß man verschiedene Dinge beachten: das absolute Expressionsniveau bzw. ob ein Gen hoch- oder runterreguliert ist, die Differenz der Expressionsniveaus aller Proben, den sogenannten *fold change* (FC) oder das Verhältnis der Expressionsniveaus aller Proben (kalkulierbar durch Division) sowie die Reproduzierbarkeit von Expressionsänderungen (statistische Relevanz).

Bei größeren Probenmengen kann ein Einzelvergleich einer jeden Probe Trends in der Genexpression verschleiern, so dass man *supervised* Methoden nutzt, die individuelle Gene mittels *nearest-neighbour approach* und/oder multiple Gene mittels *decision trees*, *neural networks* und *support vector machines* findet (Butte, 2002; Causton et al., 2003).

### *Unsupervised methods:*

Diese setzt man ein, wenn man am Analysieren interner Strukturen oder an Beziehungen im Datenset interessiert ist. Dabei weiß man im Gegensatz zu den „supervised“ Methoden nichts über die Gruppeneinteilung der Proben (zum Beispiel bei unbekanntem Histologien verschiedener Proben) und versucht mit Hilfe der „*unsupervised*“ Methoden die Proben automatisch in entsprechende Gruppen einteilen zu lassen.

Dabei gibt es drei Arten von Methoden:

- *feature determination*, wobei man nach Genen mit interessanten Eigenschaften forscht, ohne ein vorbestimmtes Muster zu suchen, ein Beispiel dafür ist die *Principal Component Analysis*;
- *cluster determination*, wobei man Gruppen von Genen mit ähnlichen Mustern der Genexpression sucht, Beispiele sind *nearest-neighbour clustering*, *self-organizing maps*, *k-means clustering* und *one-and two-dimensional hierarchical clustering*; und die bisher selten angewandte
- *network determination*, wobei man Graphen bestimmt, die Gen-Gen oder Gen-Phänotyp Interaktionen bestimmen; verwendet werden *Boolean networks*, *Bayesian networks* und *relevance networks* (Butte, 2002; Causton et al., 2003).

Im Folgenden werden Analysemethoden näher beschrieben, die in der Auswertung dieser Arbeit eine Rolle spielten.

- *Hierarchical clustering*: Diese *unsupervised* Methode bildet *cluster*, also Kohorten von Proben mit ähnlichen Genexpressionsmustern. Dabei werden solche Proben zusammen gruppiert, deren Expressionsmessungen stark miteinander korrelieren. Durch fortwährendes Weitergruppieren entstehen sogenannte Dendrogramme. In Dendrogrammen stellen in Gruppen zusammengefaßte Gene („*Cluster*“) Äste eines sich verzweigenden Baumes dar. Um so kürzer die Äste dabei sind, desto ähnlicher sind die zugehörigen Genexpressionsmuster (Causton et al., 2003).

*Principal Component Analysis (PCA)*: Dabei werden Proben als Punkte in einem dreidimensionalen Raum dargestellt. Ein Punkt faßt dabei alle Genexpressionen einer Probe in Form eines Vektors zusammen. Die Vektoren, die „*principal components*“, halten die Variationen zwischen den einzelnen Genexpressionen einer Probe fest und konzentrieren sie

abnehmend. Dabei hält der erste Vektor mehr Variationen fest als der zweite usw. (Causton et al., 2003).

### **1.6.4.3 Standardisierung der Datenverarbeitung**

Für die Datenaufbereitung der Mikroarrays existiert noch keine ausgereifte, standardisierte Vorgehensweise. Da es für jeden Analyseschritt verschiedene Strategien gibt, ist es schwierig, die Qualität der Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse zu beurteilen und Resultate verschiedener Forschungsgruppen miteinander zu vergleichen. Um dieses Problem anzugehen, wurde die Arbeitsgruppe „*Microarray Gene Expression Data Society*“ (mged) gegründet. Diese Arbeitsgruppe hat den Leitfaden „*minimum information about a microarray experiment*“ (MIAME) herausgegeben, der bei Veröffentlichungen eine Beurteilung der Qualität ermöglichen soll (Brazma and Vilo, 2001).

## 2 Zielstellung

Es ist bekannt, dass Lungenkarzinome im gleichen Stadium verschieden rasch progredient verlaufen, Metastasen entwickeln oder unterschiedlich auf Therapien ansprechen. Dem individuellen Verhalten eines Tumors liegt ein bestimmtes molekularbiologisches Muster zugrunde. Die Aufklärung dieses Musters durch den Vergleich mit normalem Lungengewebe ist die Voraussetzung zu einer neuen, auf molekularbiologischen Erkenntnissen beruhenden Einteilung von Lungentumoren. Zudem birgt die Entdeckung neuer Biomarker das große Potential der Früherkennung von Lungentumoren und der Entwicklung neuer Therapieansätze.

Bei der vorliegenden Arbeit sollte

- die RNA-Isolation aus Tumorzellen von Gewebebiopsien optimiert werden.
- ein Vergleich einiger der gefundenen Genexpressionsdaten mit der Literatur durchgeführt werden.
- die Genexpression von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen mit der von normalem Lungengewebe mit Hilfe von affymetrix *GeneChips*<sup>®</sup> verglichen werden.
- die Identifikation und Beschreibung vielversprechender Gene erfolgen, die zur Aufklärung der Pathogenese des Lungenkarzinoms beitragen sowie diagnostische und therapeutische Ansätze liefern könnten.
- die Möglichkeit der Charakterisierung von Metastasen bezüglich des Primärtumors gezeigt werden.

## **3 Patienten, Material und Methoden**

### **3.1 Vorgehensweise**

Diese Arbeit erfolgte im Rahmen einer Kooperation der Schering AG Berlin, Abteilung *Enabling Technologies, Genomics & Bioinformatics*, mit der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Lehrkrankenhaus der Humboldt-Universität Berlin, Klinik für Infektiologie. Weiterer Vertragspartner war das Gemeinschaftskrankenhauses Havelhöhe, Abteilung Pneumologie. Es wurden bei Bronchoskopien gewonnene Gewebeproben sowie bei Operationen aus Tumorresektaten gewonnene Tumorproben und angrenzendes makroskopisch normal aussehendes Gewebe (so genannte „*matched samples*“) für Genexpressionsanalysen bereitgestellt. Nach der RNA-Isolation und der Amplifikation folgte die Hybridisierung mit dem kundengefertigten Affymetrix *SURF-Array*. Anschließend erfolgte eine umfassende Datenanalyse.

### **3.2 Patienten und Tumorproben**

#### **3.2.1 Tumorproben**

Diese Arbeit erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission (Prof.Uebelhack, Charité-Universitätsmedizin Berlin). Alle Patienten wurden über die Art der Probenentnahme und deren Risiken aufgeklärt. Es erfolgte eine umfassende Patienteninformation über die Intention der Arbeit (siehe Anhang).

Bei 15 Patienten wurde Gewebe im Rahmen einer Bronchoskopie gewonnen. Die Bronchoskopie wurde von Oberärzten der Klinik für Infektiologie der Charité bzw. des Gemeinschaftskrankenhauses Havelhöhe durchgeführt. Diese Untersuchung war zur Diagnosestellung bei Verdacht auf ein Lungenkarzinom, zur Verlaufskontrolle eines bekannten Lungenkarzinoms bzw. aufgrund von Komplikationen dieser Erkrankung medizinisch indiziert. Dabei wurden Biopsien für die Feststellung der Histologie des Lungenkarzinoms entnommen und durch Pathologen im pathologischen Institut der Charité bzw. für das Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe im Pathologischen Instituts des Waldkrankenhauses Spandau untersucht. Darüberhinaus erfolgte nach Aufklärung und Zustimmung des Patienten die Entnahme weiterer Biopsien aus dem makroskopisch

sichtbaren Tumor für die vorliegende Arbeit. Die etwa 0.5-1 mm<sup>3</sup> großen Biopsien übergaben die Oberärzte direkt an die Doktorandin, die diese mit Hilfe einer Pinzette in ein Kryoröhrchen überführte und sofort in flüssigen Stickstoff (-196°C) gab.

Weiterhin wurden 9 Gewebeproben aus Tumorsektaten (R) gewonnen. Diese Patienten konnten aufgrund des Tumorstadiums einer Operation zugeführt werden. Aus dem makroskopisch pathologischen Anteil der Tumorsektate sowie dem direkt angrenzenden, makroskopisch noch normal erscheinenden Gewebe („*normal adjacent tissue*“, NAT) wurden - nach Einweisung durch einen Pathologen - durch die Doktorandin mittels Skalpell etwa 3-5 mm<sup>3</sup> große Proben gewonnen und nach Einbringen in Kryoröhrchen ebenfalls sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Gewebeproben bei -80°C asserviert.

Verfügbare Patientendaten wie Geschlecht, Alter, Raucher/Nichtraucher sowie pulmonale Koerkrankungen wurden ebenso dokumentiert wie Histologie, Tumorstadium und erfolgte Therapien vor der Probenentnahme (siehe Tabelle 3). Die für die Doktorarbeit verwendeten Gewebeproben wurden nicht histologisch untersucht. Die Gewebeentnahme erfolgte wie oben beschrieben jedoch zeitgleich mit den Gewebeproben, die im Rahmen der klinischen Versorgung des Patienten histologisch untersucht wurden. Dabei lautete die histologische Diagnose bei drei der 15 durch Biopsien entnommenen „Tumorproben“ normales Lungengewebe. In diesen Fällen wurde die Art des Lungenkarzinoms entweder durch eine spätere erneute Bronchoskopie festgestellt oder war aufgrund früherer Untersuchungen bereits bekannt.

Zusammenfassend handelt es sich bei den 24 klinischen Proben also um 8 NATs, 9 Adenokarzinome und 7 Plattenepithelkarzinome

Weitere Gewebeproben wurden von kommerziellen Firmen bestellt, um das Probenkollektiv auf frühe Tumorstadien zu erweitern und zusätzliche normale Gewebeproben zu erhalten (siehe Tabelle 4).

### 3.2.2 Probanden

Probenname	Herkunft	Histologie	Geschlecht	Alter	Proben- gewinnung	TNM	UICC	Raucher	Therapie vor Proben- entnahme	Therapie- ansprechen	Pulmonale Koerkg./ Asbestkontakt
NAT 1	V	gesundes angrenzendes Gewebe zu mäßig differenziertem AC	m	70	R	pT2pNX (0/3) cM0	IB	Ja	Nein	-	nicht bekannt
NAT 2	V	gesundes angrenzendes Gewebe zu wenig differenziertem AC	m	65	R	T4N0M0	IIIB	Nein	neoadjuvante Chemotherapie	leichte Regredienz	nicht bekannt
NAT 3	V	gesundes angrenzendes Gewebe zu wenig differenziertem AC	w	62	R	T2N2M0	IIIA	Ja	neoadjuvante Radiochemo- therapie	nicht bekannt	nicht bekannt
NAT 4	V	gesundes angrenzendes Gewebe zu LCC	m	53	B	T4N2M0	IIIB	Ja	Chemotherapie	partiell	nicht bekannt
NAT 5	V	gesundes angrenzendes Gewebe zu mittelgradig differenziertem AC	m	63	B	T2N3M1	IV	Ja	Nein	-	COPD
NAT 6	H	gesundes angrenzendes Gewebe zu mäßig differenziertem SCC	m	76	R	pT1pN1M0	IIA	Ja	Nein	-	nicht bekannt
NAT 7	H	gesundes angrenzendes Gewebe zu wenig differenziertem AC	m	58	B	pT4cN3M0	IIIB	Ja	nicht bekannt	nicht bekannt	Asbestkontakt
NAT 8	V	gesundes angrenzendes Gewebe zu wenig differenziertem AC	m	73	R	pT2pN0 (0/3) M0	IB	Ja	Nein	-	nicht bekannt
AC 1	V	wenig differenziertes AC	m	65	R	T4N0M0	IIIB	Nein	neoadjuvante Chemotherapie	leichte Regredienz	nicht bekannt
AC 2	V	wenig differenziertes AC	w	48	B	T4N3M0	IIIB	Ja	Nein	-	nicht bekannt

AC 3	V	wenig differenziertes AC	w	57	B	T2N3M1	IV	Ja	Nein	-	COPD
AC 4	V	wenig bis mittelgradig differenziertes AC	m	51	B	T2N2M1	IV	Ja	Nein	-	offene Tbc
AC 5	H	wenig differenziertes Adenokarzinom	m	58	B	pT4cN3M0	IIIB	Ja	nicht bekannt	nicht bekannt	Asbestkontakt
AC 6	V	wenig differenziertes AC	m	73	R	pT2pN0 (0/3) M0	IB	Ja	Nein	-	nicht bekannt
AC 7	V	wenig differenziertes AC	m	45	B	TxNxM1	IV	Ja	Nein	-	nicht bekannt
AC 8	V	wenig differenziertes AC	m	55	R	pT2pN1M1	IV	Ja	wahrscheinlich neoadjuvante Radiochemotherapie	nicht bekannt	nicht bekannt
AC 9	V	wenig differenziertes AC	m	50	B	TxNxM1	IV		nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
SCC 1	V	SCC	m	74	B	T4NxM1	IV	Nein	Ja	nicht bekannt	nicht bekannt
SCC 2	V	mittelgradig differenziertes SCC	m	69	B	T3N3M0	IIIB	Ja	Nein	-	nicht bekannt
SCC 3	V	SCC	m	58	B	T4N3M1	IV	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
SCC 4	H	SCC	m	68	B	T4N2M1	IV	Ja	Nein	-	COPD
SCC 5	H	SCC	w	46	B	T4NxM1	IV	nicht bekannt	Chemotherapie	nicht bekannt	Asthma
SCC 6	V	wenig differenziertes SCC	m	36	B	T2N3M1	IV	Ja	Nein	-	Emphysem
SCC 7	V	mittelgradig differenziertes SCC (fragliche Metastase bei anamn. bekanntem Mamma-Ca und Cervix-Ca)	w	71	R	pT4pN0 (0/27)	IIIB	Nein	Nein	-	nicht bekannt

R=Resektion, B=Zangenbiopsie bei Bronchoskopie, V=Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, H=Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe, AC=Adenokarzinom,; SCC=Plattenepithelkarzinom; LCC=großzelliges Karzinom; m=männlich, w=weiblich; c=Tumorstadium klinisch festgelegt, p=Tumorstadium von Pathologen festgelegt; COPD=*chronic obstructive pulmonary disease*; Tbc=Tuberkulose

Tabelle 4: Daten kommerzieller Proben

Probenname	Herkunft	Histologie	Geschlecht	Alter
k.NAT 1	A	gesundes angrenzendes Gewebe zu AC	w	73
k.AC 1	C	mäßig bis wenig differenziertes AC	w	59
k.AC 2	A	AC	w	73
k.SCC 1	C	SCC	m	58
k.Normal 1	S	normal	m	19/30 ( <i>gepoolt</i> )
k.Normal 2	S	normal	w	39/49/50/62/65 ( <i>gepoolt</i> )
k.Normal 3	Cl	normal	m	56
k.Normal 4	Cl	normal	m	72
k.Normal 5	Cl	normal	m	61
k.Normal 6	Cl	normal	w	68
k.Normal 7	Cl	normal	w	59
k.Normal 8	C	normal	m	35
k.Normal 9	Cl	normal	w	54
k.Normal 10	Cl	normal	m	44
k.Normal 11	Cl	normal	m	51
k.Normal 12	A	normal	w	61
k.Normal 13	S	normal	w	39/49/50/62/65/66 ( <i>gepoolt</i> )
k.Normal 14	S	normal	m	40/51/56/68 ( <i>gepoolt</i> )
k.fetal 1	S	fetale Lunge	w	-
k.fetal 2	S	fetale Lunge	m	-

k.=kommerzielle Probe , Normal=Normales Lungengewebe, fetal=fetales Lungengewebe, m=männlich, w=weiblich

### 3.3 Material und Methoden der Genexpressionsanalyse mittels *GeneChip*<sup>®</sup>

#### 3.3.1 Verwendete Materialien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

REAGENZ	BEZUGSQUELLE
Kryoröhrchen	Firma Nunc
RNeasy MINI Kit	Firma Qiagen
RNeasy MICRO Kit	Firma Qiagen
Distilled Water DNase, RNase free 500ml	Firma Gibco Life Technologies
RNA 6000 Nano Lab Chip Kit	Firma Agilent Technologies, Waldbronn
Eppendorf PCR-Tubes, 0,5ml, thin-walled	Firma Eppendorf
T7-(dT)24 primer	Firma Genset Corp., Paris, France
SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit	Firma Invitrogen
0,5M EDTA (pH 8,0 100ml)	Firma Ambion
GeneChip Sample Cleanup Module	Firma Affymetrix
BioArray™ High Yield™ RNA Transcript Labeling Kit	Kit Firma Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY, USA
für Hybridisierung: -MES Monohydrate "2(N-Morpholino)ethanesulfonic acid" -MES Sodium Salt -5M NaCl (100ml) -0,5M EDTA (pH8 100ml) -Tween 20 "Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate" (100ml) -Oligo B2 5' -bio GTC GTC AAG ATG CTA CCG TTC AGG A-3' -Herring sperm DNA 10mg/ml -Acetyliertes BSA (10ml) 20mg/ml -20x SSPE (3M NaCl, 0,2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,02M EDTA) -Antifoam A (30% 100ml) -Streptavidin-Phycoerythrin (1mg/ml 1ml) -Biotinylated Anti-Streptavidin (0,5mg) -Goat IgG-Reagent Grade (50mg) -100x Kontroll-RNA	Firma SIGMA Firma SIGMA Firma Ambion Firma Ambion Firma SIGMA Firma GenSet Corp., Paris, France  Firma Promega GmbH Firma SIGMA Firma BioWhittaker Europe Firma SIGMA Firma Mobitec Molecular Probes Firma Vector Laboratories Firma SIGMA

## **Lösungen**

### 12 x MES (für 1000 ml):

-70.4 g MES säurefreies Monohydrat

-193.3 g MES Natriumsalz

-800 ml dH<sub>2</sub>O

→Mischen, pH zwischen 6.5 und 6.7 einstellen

→mit dH<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen

→durch einen 0.2 µm Filter filtrieren

→bei 4°C aufbewahren und vor Licht schützen

### 2 x Hybridisierungspuffer (für 50 ml):

-8.3 ml 12 x MES

-17.7 ml 5M NaCl

-4 ml 0.5M EDTA

-0.1 ml 10% Tween-20

-19.9 ml dH<sub>2</sub>O

### 1 x Hybridisierungspuffer:

verdünnt aus 2 x Hybridisierungspuffer mit dH<sub>2</sub>O

### Waschpuffer A (für 1000ml):

-300 ml 20 x SSPE

-1 ml 10% Tween-20

-699 ml dH<sub>2</sub>O

→durch einen 0.2 µm Filter filtrieren

### Waschpuffer B (für 1000ml):

-83.3 ml 12 x MES

-5.2 ml 5 M NaCl

-1ml 10% Tween-20

-910.5 ml dH<sub>2</sub>O

→durch einen 0.2 µm Filter filtrieren

### 2 x Färbepuffer (für 250 ml):

-41.7 ml 12 x MES

-92.5 ml 5M NaCl

-2.5 ml 10% Tween-20

-113.3 ml dH<sub>2</sub>O

→durch einen 0.2 µm Filter filtrieren

SAPE Färbelösung: (2 x 600 µl Aliquote pro GeneChip):

Pro GeneChip:

-600 µl 2 x Färbepuffer

-48 µl 50 mg/ml acet.BSA

-12 µl SAPE

- 540 µl dH<sub>2</sub>OAntikörperlösung (1 x 600 µl Aliquote pro GeneChip):

-300 µl 2 x Färbepuffer

-24 µl 50 mg/ml acet.BSA

-6 µl 10 mg/ml Goat IgG

-3.6 µl 0.5 mg/ml biotinyliertes Antistreptavidin

-266.4 µl dH<sub>2</sub>O**Tabelle 6: Geräte und Software**

GERÄT	HERSTELLER
Ultra-Turax T8	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Sterilisator	Firma Memmert, Schwabach
Biophotometer	Firma Eppendorf
Bioanalyzer Agilent 2100	Firma Agilent Technologies, Waldbronn
Eppendorfzentrifuge 5415C	Firma Eppendorf
SpeedVac	Firma Christ
Fluidics	Firma Affymetrix
GeneChip Scanner 2500	Firma Affymetrix

SOFTWARE	
Expressionist® Version 5.0	GeneData AG, Basel

**3.3.2 Überblick**

In Vorbereitung auf die Genexpressionsanalyse mußte zunächst die gesamte RNA aus dem Gewebe isoliert werden. Daraufhin folgte die Vervielfältigung, die Amplifikation, der in der gesamten RNA enthaltenen mRNA. Dieser Schritt wurde gleichzeitig dazu genutzt, biotinmarkierte Nukleotide in die cRNA einzubauen, um ein Signal generieren zu können. Nach der Amplifikation folgte die Fragmentierung der cRNA in Nukleotide mit einer Länge von 35-300 Basenpaaren.

Nach der Hybridisierung der fragmentierten und biotin-markierten cRNA auf die *GeneChips*<sup>®</sup> erfolgte der Waschvorgang und weitere Färbungen mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat um die gebundenen cRNAs sichtbar zu machen.

#### **3.3.3 Isolation der gesamten RNA mittels RNeasy Mini-/Micro Kit**

Mit Hilfe eines sterilen Skalpells wurde aus der auf Eis gelagerten Resektatprobe ein kleines Stück entnommen, die restliche Probe wurde wieder bei -80°C asserviert.

Bei Biopsieproben wurde das Material aufgrund der geringen Menge vollständig verwendet, die 2-5 circa 1 mm<sup>3</sup> großen Biopsien eines Patienten wurden dabei zusammen verarbeitet.

Nach dem Wiegen der Proben wurden sie in RLT-Puffer überführt und mit Hilfe des Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co.KG) zerteilt und homogenisiert. Der Ultra-Turrax ist ein Stab mit einem sehr schnell rotierendem Messer (bis 24000 Umdrehungen pro Minute). Durch die hohe Umdrehungszahl des Messers treten gelingt es besonders gut, Partikel in einer Suspension sehr klein zu zerhacken.

Bei Proben ab circa 15 mg Gewicht (aus Tumorsektaten) verfuhr man nach dem Protokoll des RNeasy Mini Kit, bei Proben mit geringerem Gewicht nach dem Protokoll des RNeasy Micro Kit (beide Qiagen, Hilden). Die Aufarbeitung verlief gemäß dem Protokoll des Herstellers. Bei dem eingesetzten Verfahren nutzt man die selektive Bindung der RNA an Kieselgelmembranen. Abgesehen von Eppendorfbechern sind alle verwendeten Materialien Bestandteil der den Protokollen zugehörigen und kommerziell erhältlichen Sets von Qiagen.

Das in Puffer befindliche Probenlysat wurde zum Abtrennen von Zellresten zunächst zentrifugiert. Um ein Verstopfen der feinen Filter der Säulchen zu vermeiden, wurde daraufhin nur der Probenüberstand weiterverarbeitet, das Zellpellet wurde verworfen. Der Überstand wurde mit Ethanol versetzt und anschließend auf die Säulchen aufgebracht. Nach Zentrifugation wurde der Säulendurchlauf verworfen. Daraufhin wurden die Säulchen zweimal nacheinander unter Zugabe zweier verschiedener Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert und der Durchlauf jedes Mal verworfen. Letztlich folgte zum Trocknen der Säulchen eine Zentrifugation ohne Hinzugabe von Puffer.

Zum Eluieren der Gesamt RNA wurden schließlich 30 µl (Mini-Protokoll) beziehungsweise 14 µl (Micro-Protokoll) RNase-freies Wasser auf die Säulchen gegeben und zentrifugiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das so erhaltene Eluat erneut auf die Säulchen gebracht und zentrifugiert.

Bei der Aufarbeitung mittels RNeasy Micro Kit wurde zusätzlich ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu wurde nach dem Schritt der Zentrifugation das Probenlysat-Ethanol-Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit einer DNase Mischung inkubiert. Danach wurde weiter verfahren wie oben beschrieben.

Am Arbeitsplatz wurde strikt auf Vermeidung einer Kontamination mit RNAsen geachtet. Dazu wurde regelmäßig mit einem RNase deaktivierenden Reagenz gereinigt. Mehrfach verwendbare Materialien, wie Pinzetten und Ultra-Turrax-Aufsätze wurden nach jeder Probenaufarbeitung desinfiziert und sterilisiert.

### 3.3.4 Qualitätskontrolle

Die Qualität und die Quantität der so gewonnenen Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des *Bioanalyzer Agilent 2100*, RNA 6000 Nano Assay (Firma Agilent Technologies), kontrolliert. Gemäß Protokoll des Herstellers wird dabei das Prinzip der Kapillarelektrophorese in einer automatisierten Form in der Art genutzt, dass die Qualität von DNA, mRNA oder Gesamt-RNA bei 12 Proben zugleich bestimmt werden kann (Linhardt and Toida, 2002). Dazu wurden bis zu 12 Proben gleichzeitig auf den *LabChip*<sup>®</sup> aufgetragen, je 1 µl des Eluats bei Proben aus Resektaten sowie nur 0.5 µl Eluat bei RNA aus Biopsien, um wertvolles Material zu sparen.

Gesamt-RNA mit guter bis sehr guter Qualität (28S/18S rRNA Verhältnis von 0.5-2.5) wurde zur Amplifikation weiterverwendet.

Neben der Feststellung der Qualität wurden durch den *Agilent Analyzer* auch die Konzentrationen der Gesamt-RNA bestimmt. Eine Konzentration von 400-1000 ng/µl stellte die Voraussetzung zur Weiterverwendung dar. Waren Qualität oder Konzentration der isolierten Gesamt-RNA einer Probe nicht zufriedenstellend, wurde aus noch vorhandenem Gewebe erneut isoliert.

### 3.3.5 Amplifikation

Für eine Übersicht zu Amplifikation und Biotinylierung wird an dieser Stelle auch auf die Abbildung 6 verwiesen.

Bei der Amplifikation wurde die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben, um dann wiederum in cRNA transkribiert zu werden. Ziel der Amplifikation ist das Anreichern von mRNA Kopien sowie der Einbau biotin-markierter Nukleotide. Die reverse Transkription erfolgte

mittels T7-oligo-(dT)-*Primer*, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet. So gelang das Umschreiben in die cDNA mit anschließender Zweitstrangsynthese. Die resultierende ds-cDNA enthielt einen T7-Promotor als Erkennungssequenz für die T7-RNA-Polymerase. Dies ermöglichte die *in vitro* Transkription und den Einbau von biotinylierten Nukleosidtriphosphaten (NTPs) in die cRNA.

Bei der Amplifikation wurden Mengen von circa 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt, um eine optimale cRNA Menge von circa 20 µg zu erhalten. War die Konzentration des Eluats zu niedrig, wurde mit Hilfe des *SpeedVac*, einem Gerät, das sich das Prinzip der Kombination von Vakuum und hoher Temperatur zum Erreichen einer Verdunstung zunutze macht, eine Konzentrierung erreicht. War die Konzentration des Eluats zu hoch, wurde mit RNase freiem Wasser verdünnt. Danach wurde mit dem kommerziell erhältlichen *SuperScript<sup>TM</sup> Double-Stranded cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen<sup>TM</sup>) der erste Strang synthetisiert: zur RNA wurden 2 µl T7-(dT)<sub>24</sub> Primer (50 pmol/µl) hinzugefügt und mit Wasser auf 11 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Dann wurde eine Mischung aus 4 µl 5 x *first strand* Puffer, 2 µl 0.1 M DDT und 1 µl 10 mM dNTP Mix hinzugefügt und für 2 Minuten bei 50°C inkubiert und schließlich die Synthese durch Zugabe einer reversen Transkriptase (1 µl 200 U/µl Superscript II RT) gestartet. Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei 50°C im PCR-Gerät inkubiert.

Bei der Synthese des zweiten Stranges setzte man das gesamte Volumen aus dem Ansatz der Synthese des ersten Stranges (20 µl) ein, fügte eine Mischung aus RNase freiem H<sub>2</sub>O (91 µl), Puffer (30 µl 5 x *Second Strand* Puffer), 10 mM dNTP Mix (3 µl), sowie drei Enzymen (1 µl E.coli DNA Ligase 10U/µl, 4 µl E.coli DNA Polymerase I 10U/µl und 1 µl E.coli RNase H 2U/µl) hinzu (Endvolumen 150 µl) und inkubierte für 2 Stunden bei 16°C. Anschließend wurden 2 µl einer T4 DNA Polymerase hinzugegeben, deren Reaktion man nach 5 min bei 16 °C durch Zugabe von 10 µl 0.5M EDTA stoppte.

Die somit erhaltene doppelsträngige cDNA mußte nun gereinigt, das heißt von allen für die bisherigen Reaktionen notwendigen Zusätze befreit werden. Dazu wurde das säulenbasierte *GeneChip<sup>®</sup> sample cleanup module* der Firma Affymetrix verwendet. Zu dem Reaktionsansatz von inzwischen 162 µl wurde 600 µl cDNA Bindepuffer hinzugegeben, davon 500 µl auf ein Säulchen aufgetragen, für 1 Minute zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde mit dem restlichen Volumen von 262 µl genauso verfahren. Dann wurden 750 µl cDNA Waschpuffer auf das Säulchen gegeben, für 1 Minute zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde das Säulchen durch

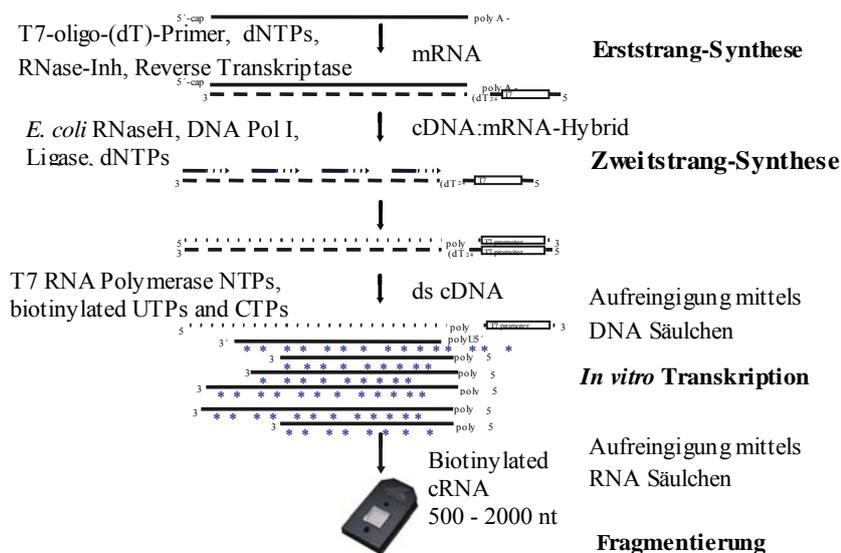
Zentrifugation mit offenen Deckeln für 5 Minuten getrocknet. Das Aufbringen von 14 µl cDNA Elutionspuffer erbrachte 12 µl Eluat.

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit Hilfe des ENZO *BioArray<sup>TM</sup>HighYield<sup>TM</sup>* Kit (Affymetrix), wobei dem Volumen von 12 µl cDNA eine Mischung aus 11 µl H<sub>2</sub>O, 4 µl 10 x HY *Reaction Buffer*, 4 µl 10 x biotin-markierter Nukleotide, 4 µl 10 x DTT, 4 µl 10 x RNase Inhibitor Mischung und 2 µl 20 x T7 RNA Polymerase zugefügt und bei 37°C mindestens 12 h inkubiert wurde.

Die so erhaltene cRNA wurde wiederum gereinigt. Zum Reaktionsansatz von nun 40 µl wurde 60 µl RNase freies H<sub>2</sub>O, 350 µl cRNA Bindepuffer und 250 µl 100% Ethanol gegeben, auf ein Säulchen aufgetragen, zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nacheinander wurden 500 µl cRNA Waschpuffer und 500 µl 80% Ethanol dazugegeben, jedes Mal zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurden die Säulchen durch Zentrifugation mit offenen Deckeln getrocknet und dann in ein neues Eppendorfgesäß überführt und zweimal mit je 11 und 10 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O eluiert, so dass das die amplifizierte RNA enthaltende Elutionsvolumen circa 20 µl betrug.

#### **3.3.6 Qualitäts- und Quantitätskontrolle der biotinylierten cRNA**

Die Qualität der biotinylierten cRNA wurde erneut mittels *Bioanalyzer Agilent 2100*, RNA 6000 Nano Assay kontrolliert. Dabei wurde die aus der Amplifikation gewonnene cRNA mit 1:4 bis 1:10 verdünnt und je ein 1 µl analysiert um so die Größenverteilung der generierten cRNA sowie deren Menge zu bestimmen. Nach einer Amplifikationsrunde wurde eine Größenverteilung von 500-2000 nt mit einem Maximum bei circa 1500 nt erwartet. Waren die Größen oder Mengen zu gering, wurde die cRNA verworfen. Da nicht verwendete isolierte RNA sowie nicht für die Isolation von RNA verwendetes Gewebe gekühlt aufbewahrt worden war, konnte in diesen Fällen erneut isoliert und/oder amplifiziert werden.



**Abbildung 6: Amplifikation und Biotinylierung der mRNA (www.affymetrix.com)**

### 3.3.7 Fragmentierung

Um ein adäquates Binden an die 25 Basenpaare langen Oligonukleotide auf den *GeneChips*<sup>®</sup> zu gewährleisten, mußte die biotin-markierte cRNA im folgenden Schritt in 35-300 Basenpaare lange Stücke fragmentiert werden. Der Ansatz wurde dabei auf 500-1000 ng/µl cRNA eingestellt.

Dazu wurde dem Elutionsvolumen von 20 µl ein Fragmentationspuffer zugefügt, der unter hohen Temperaturen eine Ionen-induzierte Hydrolyse der cRNA induziert. Zusammen mit RNase-freiem Wasser wurde für 35 Minuten bei 94°C inkubiert und danach wieder sofort auf Eis gelagert, um eine Reassoziierung der Fragmente zu verhindern.

Mit Hilfe eines Photometers wurde die Konzentration der Proben in einer Verdünnung von 1:80 bei den Wellenlängen 260 und 280 nm bestimmt. Die ermittelte Konzentration bildete die Grundlage für die Berechnung der einzusetzenden Menge an cRNA für die Hybridisierung.

### 3.3.8 Hybridisierung, Waschen, Färben und Scannen der *GeneChips*<sup>®</sup>

#### Hybridisierung

Zunächst mußten die *GeneChips*<sup>®</sup> 10 Minuten lang bei 45°C im Hybridisierungssofen rotierend prähybridisiert werden, um sie den Reaktionsbedingungen wie Temperatur und

Ionenkonzentration anzupassen. Dazu wurden die *GeneChips*<sup>®</sup> mit 200 µl 1x Hybridisierungspuffer (siehe Abschnitt Lösungen) befüllt. Parallel dazu wurde die Hybridisierungsmischung (bestehend aus 12 µg der fragmentierten cRNA, RNase freiem H<sub>2</sub>O, 3 µl 5 nM Kontrolloligo B2, 3 µl 100 x Kontroll cRNA (BioB/C/D, cre), 3 µl Heringssperma-DNA 10 mg/ml, 7.5 µl acetylierter BSA 20 mg/ml und 150 µl 2 x MES Hybridisierungspuffer) für je 5 Minuten bei 99°C und 45°C inkubiert. Nach Entfernen der Prähybridisierungslösung wurden die *GeneChips*<sup>®</sup> mit 200 µl dieser Mischung beladen und für mindestens 16 Stunden bei 45°C und 60 rpm im Hybridisierungsöfen hybridisiert. Die restliche Hybridisierungsmischung wurde bei -80°C aufbewahrt.

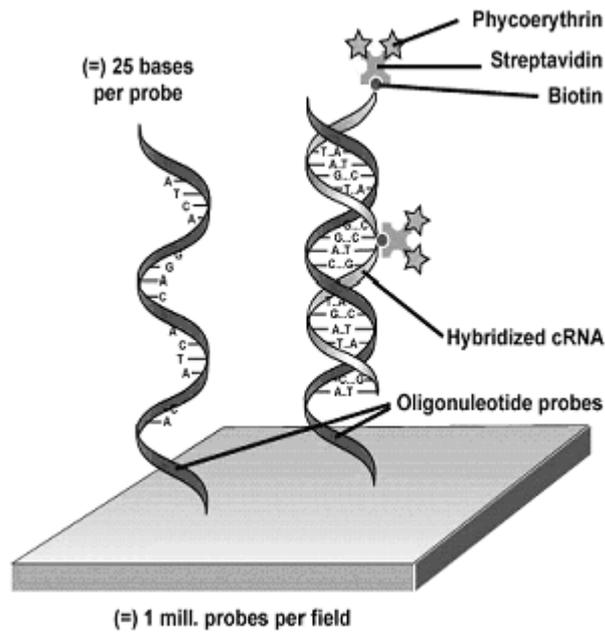
#### Waschen und Färben

Das Waschen und Färben wurde gemäß dem Protokoll EuKGE-WS2 (siehe Tabelle 7) in der Fluidics Station (Affymetrix) durchgeführt.

**Tabelle 7: Waschen und Färben der hybridisierten *GeneChips*<sup>®</sup>**

1. Waschvorgang nach Hybridisierung	10 Zyklen von 2 Mischungen pro Zyklus mit Waschpuffer A bei 25 °C
2. Waschvorgang nach Hybridisierung	4 Zyklen von 15 Mischungen pro Zyklus mit Waschpuffer B bei 50°C
1. Färbung	Färben des <i>Array</i> für 10 Minuten in SAPE Lösung bei 25°C
Waschen nach der Färbung	10 Zyklen von 4 Mischungen pro Zyklus mit Waschpuffer A bei 25°C
2. Färbung	Färben des <i>Array</i> für 10 Minuten in Antikörper Lösung bei 25°C
3. Färbung	Färben des <i>Array</i> für 10 Minuten in SAPE Lösung bei 25°C
letzter Waschvorgang	15 Zyklen von 4 Mischungen pro Zyklus mit Waschpuffer A bei 30°C. Anschließend Warteposition des <i>Array</i> vor dem Scannen bei 25°C .

Die auf dem *Array* befindlichen biotinylierten cRNAs werden durch die Bindung eines Streptavidin-Phycoerythin-Konjugats für den Laser sichtbar gemacht (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Färben der hybridisierten cRNA** (aus Rieneck et al., 2000)

### Scannen

Das *Scannen* der *GeneChips*<sup>®</sup> erfolgte unmittelbar nach der Färbung mit dem *GeneChip Scanner 2500* (Affymetrix) (siehe Abbildung 8). Dabei regte der Laser das Phycoerythrin an und die entstehenden Signale wurden mit einer Kamera detektiert. Dabei wurden drei Dateien generiert.

Die DAT Datei beinhaltet die Rohdaten, die Intensitäten aller Pixel. Die Auflösung des *Scanners* beträgt  $7 \times 7$  Pixel pro *feature*. Nachdem, wie im Abschnitt Einleitung beschrieben, die Gitternetzlinien und damit die Grenzen für die *features* festgesetzt wurden, wurde die CEL Datei generiert, welches aus Signalen pro *feature*, also 22 Signalen pro Gen, den sogenannten *feature* Intensitäten, besteht. Mit zusätzlichen Informationen über das der Genexpression zugrundeliegende Gewebe wurde dann die Exp Datei erstellt.

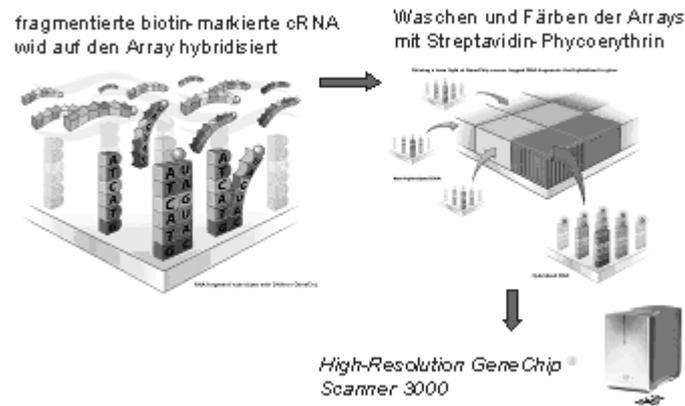


Abbildung 8: Hybridisierung, Waschen und Färben der *GeneChips*<sup>®</sup> ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))

### 3.3.9 Datenanalyse

Für einen allgemeinen Überblick über die Datenanalyse wird hier auf den entsprechenden Abschnitt der Einleitung verwiesen.

#### *Workstation*

Zuerst erfolgt das Festlegen der Gitternetzlinien, der Grenzen für die *features*, um die CEL Datei zu generieren.

#### *Refining*

Das *Refining* stellt eine Korrekturmethode der Rohdaten der CEL Datei dar, also eine Korrektur auf der Ebene der *feature* Intensitäten.

Bei dieser Arbeit wurde mittels *Expressionist<sup>TM</sup> Refiner* (Softwarekomponente von *GeneData*) die Qualität der Affymetrix Chips kontrolliert und Defekte ausgeglichen. Schlechte RNA und Fehlstellen (Flecken, durch die Manufaktur bedingte Lücken, Artefakte durch Hybridisierung, Färben und Waschen) auf dem Array wurden detektiert, räumliche Gradienten ausgeglichen. Dadurch erfolgte eine globale Normierung der *Arrays*. Gradienten und Fehlstellen, die durch den *Refiner* nicht korrigiert werden konnten, wurden durch ihn maskiert und bei der weiteren Analyse ignoriert (siehe Abbildung 9).

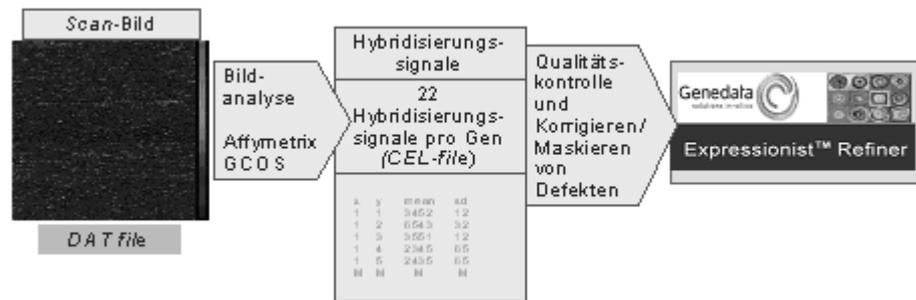


Abbildung 9: Datenanalyse-von Pixels zu Daten (*Refining*) ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))

Kondensation und Normalisation

Da auf dem *GeneChip*® wie in der Einleitung beschrieben ein Gen durch 11 spezifische Oligonukleotide sowie 11 entsprechende *mismatch* Oligonukleotide repräsentiert wird, muß man für die Analyse die erhaltenen 22 Expressionswerte pro Gen und Hybridisierung zu einem Wert zusammenrechnen. Dies nennt man Kondensation. Die Kondensation und Normalisation bei dieser Arbeit erfolgte durch einen proprietären Algorithmus (Dr. Henrik Seidel, Schering AG).

Mit zusätzlichen Angaben zum Experiment und zur Gewebeprobe entstand so aus der CEL Datei die sogenannte Exp Datei (siehe Abbildung 10).

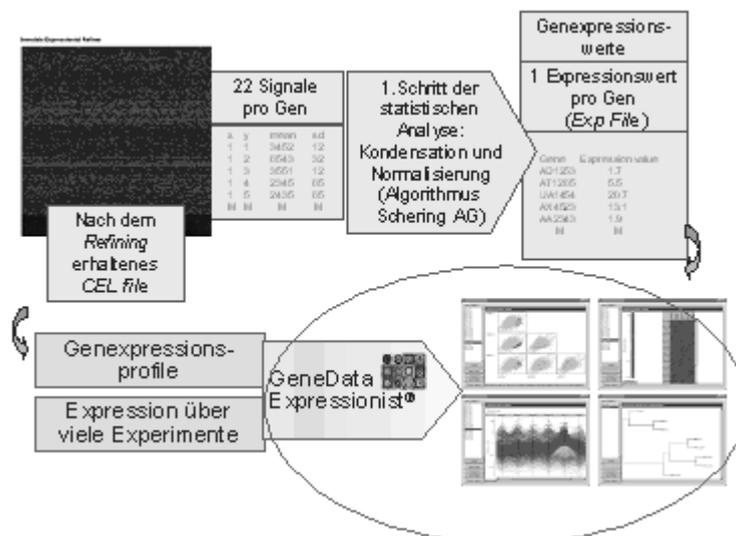


Abbildung 10: Datenanalyse-Kondensation und Normalisation ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))

Die statistische Analyse der Expressionswerte und die Visualisierung der Daten wurde mit Hilfe der *Expressionist<sup>®</sup>-Analyst Software (GeneData)* durchgeführt und wird im Abschnitt Ergebnisse beschrieben. Für eine weitere Visualisierung wurde der hauseigene „*Array Northern*“ (Version September 2003) genutzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Erhaltene Nukleinsäuremengen

#### 4.1.1 Erhaltene Gesamt-RNA Mengen aus den Gewebeproben

Das Gewicht der aus Bronchoskopien und Tumorresektaten gewonnenen Tumorproben lag zwischen 2.5 mg und 61 mg. Daraus wurde totale RNA mit einer Menge zwischen 2.16 und 36.53 µg isoliert. Dabei zeigte sich größtenteils eine sehr gut bis gut erhaltene Qualität des Erbmaterials (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Erhaltene RNA-Mengen und -Qualitäten**

Probenname	Methode der RNA-Isolierung	Proben-gewicht [mg]	totale RNA [µg/µl]	Elutions-volumen [µl]	Summe toRNA [µg]	rRNA Verhältnis (28S/18S)	Qualität	Bezeichnung in Säulen-diagrammen (Abb.14-32)
NAT 1	Mini	23	0,12	30	3,66	1,95	sehr gut	18
NAT 2	Mini	18	0,12	30	3,57	2,11	gut	19
AC 1	Mini	16,5	0,21	30	6,21	1,84	sehr gut	r
NAT 3	Mini	20	0,10	30	2,85	2,40	gut	22
NAT 4	Micro	3	1,39	12	16,67	1,17	degradiert	24
SCC 1	Micro	10	0,18	12	2,16	1,82	sehr gut	k
AC 2	Micro	5	1,70	12	20,38	1,34	sehr gut	a
AC 3	Micro	5	0,52	12	6,24	1,82	sehr gut	c
SCC 2	Micro	15	0,77	12	9,20	1,31	sehr gut	j
NAT 5	Micro	10	0,52	12	6,20	1,40	sehr gut	23
SCC 3	Micro	5	3,04	12	36,53	1,29	sehr gut	m
AC 4	Micro	7	1,27	12	15,29	1,23	sehr gut	d
NAT 6	Mini	61	0,33	30	9,90	1,27	sehr gut	20
NAT 7	Micro	2,5	0,27	12	3,24	*	gut	25
AC 5	Micro	5	0,91	12	10,90	1,40	sehr gut	e
SCC 4	Mini	12,5	0,35	30	10,50	1,19	gut	l
SCC 5	Mini	15,5	0,41	30	12,36	*	gut	s
NAT 8	Mini	15	0,64	30	19,32	*	gut	21
AC 6	Mini	18,25	0,68	30	20,52	1,19	sehr gut	b
SCC 6	Mini	12	0,60	30	17,88	1,53	sehr gut	n
SCC 7	Mini	11,5	0,75	30	22,50	1,41	sehr gut	o
AC 7	Mini	6	0,17	30	4,98	2,06	gut	f
AC 8	Mini	14	0,42	30	12,66	0,89	gut	g
AC 9	Mini	8	0,56	12	6,66	*	gut	h

\* Bei diesen Proben wurde das rRNA Verhältnis nicht von Agilent berechnet, das Electropherogramm zeigte jedoch saubere peaks an den erwarteten Stellen.

### 4.1.2 Ausbeute der Amplifikation

Durch die Vervielfältigung (Amplifikation) der mRNA konnten schließlich Ausbeuten von bis zu 88.4 µg biotinylierter cRNA erreicht werden.

**Tabelle 9: cRNA Mengen**

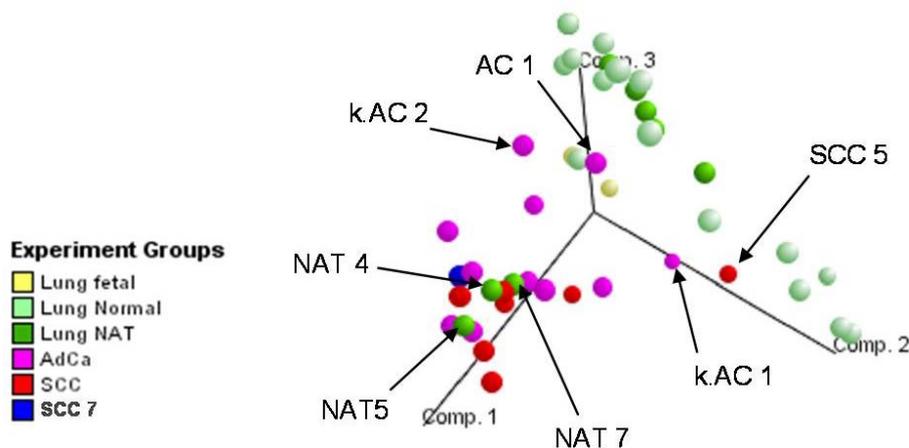
Probenname	cRNA [µg/µl]	Elutionsvolumen [µl]	Summe cRNA [µg]
NAT 1	1,22	20	24,3
NAT 2	1,49	20	29,7
AC 1	1,85	20	36,9
NAT 3	0,98	20	18,4
NAT 4	0,33	20	6,5
SCC 1	2,20	20	44
AC 2	3,89	20	77,8
AC 3	1,21	20	24,2
SCC 2	2,95	20	59
NAT 5	3,61	20	72,2
SCC 3	3,42	20	68,4
AC 4	2,57	20	51,4
NAT 6	1,66	20	33,1
NAT 7	0,70	20	14
AC 5	2,45	20	49
SCC 4	1,34	20	26,7
SCC 5	0,38	20	7,6
NAT 8	0,37	20	7,3
AC 6	2,45	20	48,9
SCC 6	3,29	20	65,7
SCC 7	1,10	20	22
AC 7	1,18	20	23,5
AC 8	1,08	20	21,6
AC 9	4,42	20	88,4

### 4.2 Die bioinformatische Analyse mittels *Expressionist*<sup>®</sup>

Nach dem Hybridisieren und *Scannen* der *GeneChips*<sup>®</sup> wurde eine bioinformatische Analyse durchgeführt. Dazu wurde die *Expressionist*<sup>®</sup>-*Analyst* Software (*GeneData*, Schweiz) verwendet.

#### 4.2.1 Principal Component Analysis (PCA) und Identifizierung von Ausreißer-Proben

Um eventuelle Fehlklassifizierungen von Proben zu identifizieren, wurde eine PCA durchgeführt. Diese stellt alle Gewebeprobe als Punkte in einem dreidimensionalen Raum dar. Ein Punkt faßt dabei alle Genexpressionen einer Probe in Form eines Vektors zusammen. Die Vektoren, die „*principal components*“, halten die Variationen zwischen den einzelnen Genexpressionen fest. Die Tumorproben formierten dabei ein distinktes *Cluster*, welches klar vom *Cluster* der nichtpathologischen Lungenproben getrennt war (siehe Abbildung 11). Mit dieser Methode konnten Ausreißer-Proben (sogenannte „*outlier*“) identifiziert werden, welche von den folgenden statistischen Analysen ausgeschlossen wurden (siehe Tabelle 10).



**Abbildung 11: PCA-Analyse**

Die Tumorproben (rot und lila) trennen sich klar von den normalen (hell- und dunkelgrün) Gewebeprobe. Beschriftet sind die Ausreißer-Proben. Bei Probe SCC 7 war histologisch nicht klar, ob sie ein primäres Lungenkarzinom oder eine Metastase darstellt (siehe Diskussion).

**Tabelle 10: Ausreißer-Proben**

Tumorproben wie Normalproben	Normalproben wie Tumorproben
AC 1	NAT 7
k.AC 2	NAT 4
SCC 5	NAT 5
k.AC 1	

#### 4.2.2 Bildung von Gruppen für die Analyse

Es wurden zwei Analysegruppen gebildet (siehe Tabelle 11).

Eine Gruppe enthielt die normalen Proben, das heißt die von kommerziellen Firmen verwendeten normalen Lungengewebeproben sowie jene Proben, die bei Tumorsektaten das makroskopisch noch normal erscheinende, an den Tumor angrenzende Gewebe umfaßten (NAT, *normal adjacent tissue*). Jene normalen Proben, die sich in der Expression wie Tumoren darstellten (Ausreißer-Proben), wurden aus der Gruppe ausgeschlossen.

Die zweite Gruppe umfaßte die Tumorproben, die sich aus 8 ACs und 7 SCCs zusammensetzten. Diejenigen Tumorproben, die sich in der Expression wie normales Lungengewebe verhielten (Ausreißer-Proben) wurden aus der Gruppe ausgeschlossen.

**Tabelle 11: Analysegruppen**

Gruppe „normal“	Gruppe „Tumor“
k.Normal 1	AC 2
k.Normal 2	AC 3
k.Normal 3	AC 4
k.Normal 4	AC 5
k.Normal 5	AC 6
k.Normal 6	AC 7
k.Normal 7	AC 8
k.Normal 8	AC 9
k.Normal 9	k.SCC 1
k.Normal 10	SCC 1
k.Normal 11	SCC 2
k.Normal 12	SCC 3
k.Normal 13	SCC 4
k.Normal 14	SCC 6
k.NAT 1	SCC 7
NAT 1	
NAT 2	
NAT 3	
NAT 6	
NAT 8	
k.fetal 1	
k.fetal 2	

### 4.2.3 Statistische Analyse

#### 4.2.3.1 Varianzkoeffizient

Für die subsequente Analyse der Daten wurden diese zunächst gefiltert. Dazu wurde der Varianzkoeffizient angewendet. Er basiert auf dem Ausmaß der Variabilität der Genexpressionswerte innerhalb ausgewählter Gruppen. Die Schwelle des Varianzkoeffizienten (VC) wurde auf  $vc \geq 0.001$  festgesetzt.

Das Ergebnis war eine Gruppe varianter Sequenzen: 13084 Sequenzen.

#### 4.2.3.2 Auf die varianten Sequenzen angewendete statistische Testverfahren

##### 4.2.3.2.1 T-Test

Es folgte eine Signifikanzanalyse der varianten Sequenzen mit den zwei beschriebenen Analysegruppen. Der T-Test liefert dabei die Gene, die sich signifikant zwischen beiden Analysegruppen unterscheiden. Dabei wurde die Annahme einer Normalverteilung gemacht. Aufgrund der relativ kleinen Anzahl von Datenpunkten innerhalb der verglichenen Gruppen kann eine Normalverteilung hier nicht überprüft werden. Bei größeren Expressionsstudien in der Literatur hat sich jedoch gezeigt, dass die Expressionswerte tatsächlich näherungsweise normalverteilt sind (Speed, 2005). Als Sortierkriterium liefert der T-Test zudem viel feinere Werte als ein nicht-parametrischer Test und ist Standard in der Expressionsanalyse-Literatur (Allison et al., 2006). Der p-Wert wird dabei nicht im Sinne einer Wahrscheinlichkeit interpretiert, sondern als Sortierkriterium, um die Gene mit den stärksten Änderungen zwischen den Gruppen relativ zur Variabilität innerhalb der Gruppen zu finden. Der Wert wurde dabei auf  $p \leq 10^{-6}$  gesetzt. Dies resultierte in 503 Sequenzen.

##### 4.2.3.2.2 *N-Fold Regulation Test*

Ein anderer Test, der auf die Gruppe der varianten Sequenzen angewandt wurde, ist der *N-Fold Regulation Test*, wobei der Parameter als Verhältnis der Mittelwerte festgesetzt wurde. Dabei wird innerhalb einer jeden Gruppe der Mittelwert aller Expressionswerte (dieses Gens in dieser Gruppe) gebildet, anschließend werden die beiden Mittelwerte der beiden Gruppen dividiert. Dieser Test sortiert die Sequenzen nach ihrer Fähigkeit basierend auf Verhältnissen

zwischen Gruppen zu diskriminieren. Der Wert wurde auf einen *Fold Change*  $FC \geq 4$  festgelegt. Dies resultierte in 338 Sequenzen.

#### 4.2.3.2.3 *Inter Group Gap*

Der dritte Test, der auf die varianten Sequenzen angewandt wurde, war ein *N-Fold Regulation Test*, wobei der Parameter auf die *Inter Group Gap* festgelegt wurde. Dieser Test identifiziert Gene, die in der einen Gruppe grundsätzlich höhere Expressionswerte haben als in der anderen Gruppe (oder umgekehrt).

Der Wert des *Inter Group Gap* (IGG) wurde dabei auf  $IGG \geq 1.001$  gesetzt. Dies resultierte in 19 Sequenzen.

#### 4.2.3.3 Fusion der auf die varianten Sequenzen angewendeten statistischen Testverfahren

Die Ergebnisse des T-Test, *N-Fold Regulation Test* und *Inter Group Gap* wurden fusioniert. Dies resultierte in 614 Sequenzen (siehe Abbildung 12).

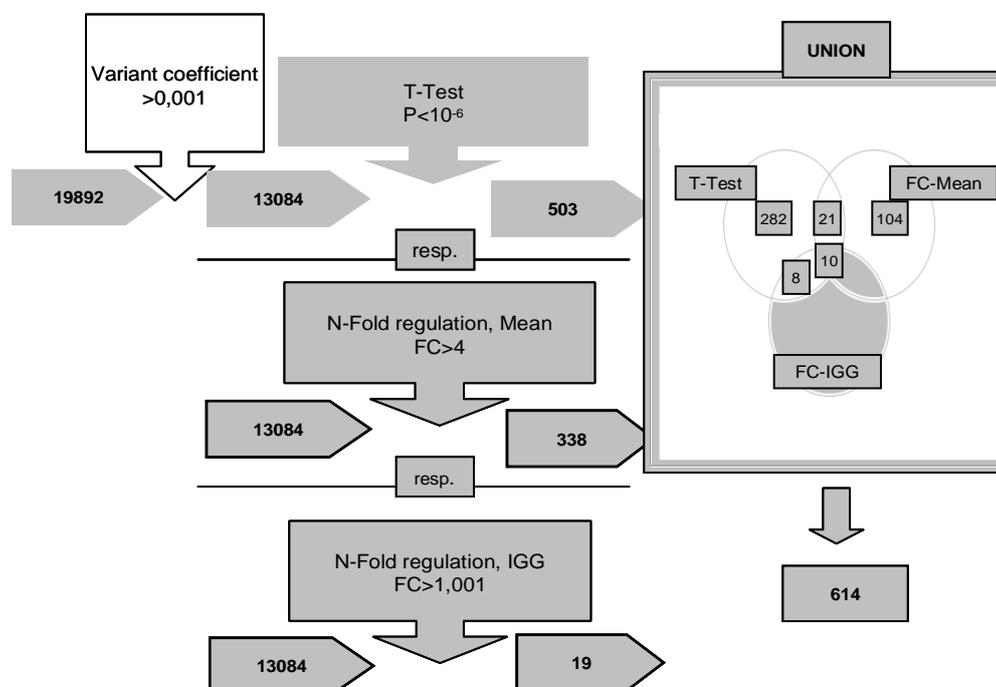


Abbildung 12: Statistische Analyse

### 4.3 Vergleich der erhobenen Daten mit in der Literatur beschriebenen Genen

Um die Datensammlung zu überprüfen und um zu zeigen, dass der in dieser Arbeit verwendete Kunden-*GeneChip*<sup>®</sup> Expressionswerte realitätsnah abbildet, wurden in der Literatur markante Gene gesucht, die für den biologischen Zustand des Lungenkarzinoms typisch und auf dem Kunden-*Array* vorhanden sind.

In den in dieser Arbeit untersuchten Tumorproben fand sich zum Beispiel die mRNA von Osteopontin hochreguliert (siehe Abbildung 13).

Heighway et al. untersuchten 39 resezierte nichtkleinzellige Lungenkarzinome im Vergleich zu normalem Lungengewebe mit cDNA-Mikroarrays, die 47 650 Transkripte enthielten. Bei 27 der Patienten war RNA von Tumor und *matched* Normalgewebe verfügbar (Heighway et al., 2002).

Korrelierend zu unserer Arbeit fand die Arbeitsgruppe um Heighway die mRNA von Osteopontin im Tumorgewebe als stark überexprimiert. Schneider et al. untersuchten die mRNA Expression von Osteopontin in NSCLC-Normalgewebepaaren von 82 Patienten mit der Methode der *quantitative real-time reverse transcription-PCR*. Dabei fand sich die mRNA im Tumorgewebe 20fach erhöht (Schneider et al., 2004).

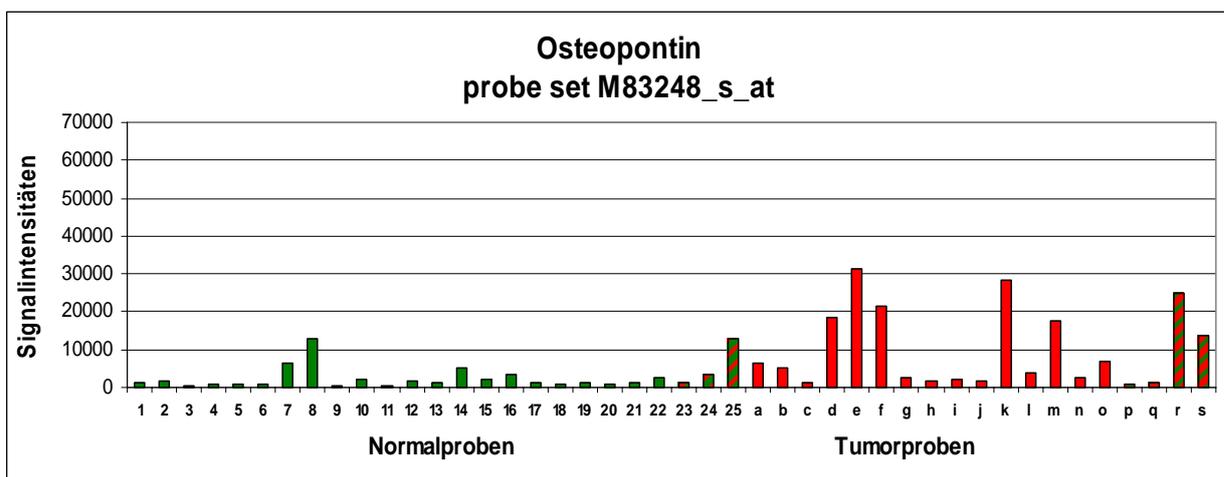


Abbildung 13: Osteopontin ist in den Tumorproben überexprimiert.

Ein weiteres in der vorliegenden Arbeit als im Tumor hochreguliert gefundenes und in der Literatur beschriebenes „Markergen“, welches die Qualität unserer Untersuchung unterstreicht, ist Keratin 19 (siehe Abbildung 14). Dieses wurde von Heighway et al. als im

Lungenkarzinom hochreguliert beschrieben und auch die Gruppe um Wikman, die 14 pulmonale Adenokarzinome mit cDNA Mikroarrays mit normalem Lungengewebe verglichen, fanden dieses Gen überexprimiert (Wikman et al., 2002).

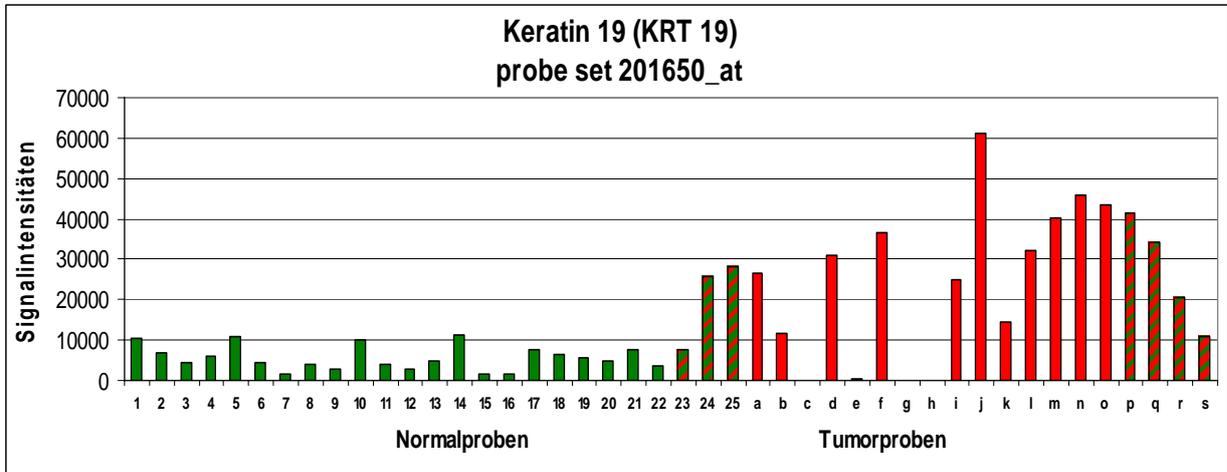


Abbildung 14: Keratin 19 ist in den Tumorproben überexprimiert.

#### 4.4 Differenziell exprimierte Gene NSCLC versus Lunge normal

Mit Hilfe der oben beschriebenen Datenanalyse fanden sich 614 differenziell exprimierte Gene. Die von der Schering AG zur Veröffentlichung freigegebenen Gene sind in der Tabelle 12 zu finden und in der Diskussion näher beschrieben.

Tabelle 12: ausgewählte differenziell exprimierte Gene

im Tumor hochregulierte Gene	im Tumor herunterregulierte Gene
<i>small-proline rich protein 3</i> (SPRR3)	<i>surfactant protein D</i> (SFTPD)
<i>small-proline rich protein 1</i> (SPRR1B)	<i>surfactant protein B</i> (SFTPB)
S100A2	G-protein gekoppelter Rezeptor (GPR105)
Matrix metalloprotease 1 (MMP1)	Prostaglandin D Synthase (PDS)
SERPIN5B / MASPIN	
<i>squamous cell carcinoma antigen 2</i> (SCCA2 / SERPINB4)	
<i>squamous cell carcinoma antigen 1</i> (SCCA1 / SERPINB4)	
Proteinregulator der Zytokinese 1 (PRC1)	
<i>Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5</i> (CEACAM5)	
Desmoglein (DSG3)	
Desmocollin (DSC3)	
<i>death receptor 6</i> (DR6 / TNFRSF21)	
Peptidylprolyl Isomerase F ( PPIF /CYP3)	

Die Abbildungen 15-31 stellen die Expressionsdaten je eines Gens über den Gewebeproben dar und machen die differentielle Expression dieser Gene in Lungenkarzinomen im Vergleich zum normalen Lungengewebe deutlich.

### Legende der Abbildungen 15-31

#### Normalproben (Markierung in grün):

von links nach rechts:

- 1 k.fetal 1
- 2 k.fetal 2
- 3 k.Normal 1
- 4 k.Normal 2
- 5 k.Normal 3
- 6 k.Normal 4
- 7 k.Normal 5
- 8 k.Normal 6
- 9 k.Normal 7
- 10 k.Normal 8
- 11 k.Normal 9
- 12 k.Normal 10
- 13 k.Normal 11
- 14 k.Normal 12
- 15 k.Normal 13
- 16 k.Normal 14
- 17 k.NAT 1
- 18 NAT 1
- 19 NAT 2
- 20 NAT 6
- 21 NAT 8
- 22 NAT 3

#### Tumorproben (Markierung in rot):

von links nach rechts:

- a AC 2
- b AC 6
- c AC 3
- d AC 4
- e AC 5
- f AC 7
- g AC 8
- h AC 9
- i k.SCC 1
- j SCC 2
- k SCC 1
- l SCC 4
- m SCC 3
- n SCC 6
- o SCC 7

#### Ausreißer-Proben (grün-rosa gestreift):

- 23 NAT 5
- 24 NAT 4
- 25 NAT 7

#### Ausreißer-Proben (rot-grün gestreift):

- p k.AC 1
- q k.AC 2
- r AC 1
- s SCC 5

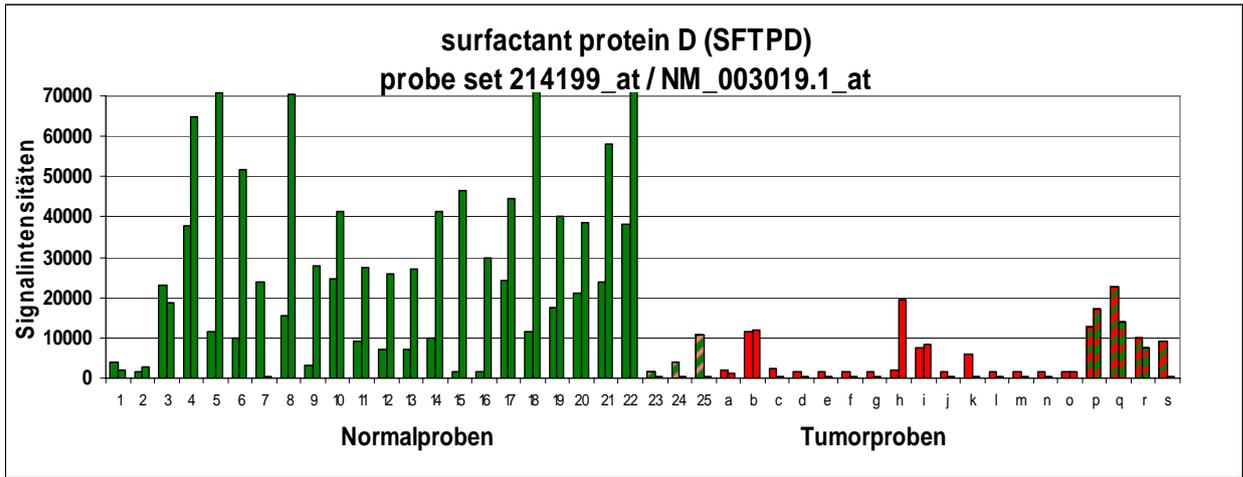


Abbildung15: *Surfactant protein D* ist in den Tumorproben signifikant unterexprimiert.

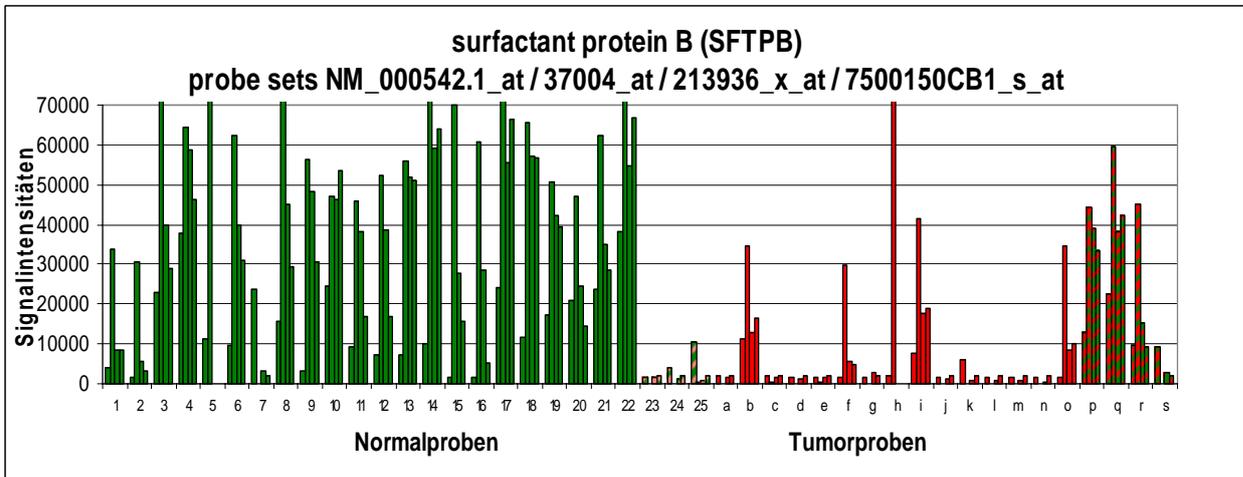


Abbildung 16: *Surfactant protein B* ist in den Tumorproben signifikant unterexprimiert.

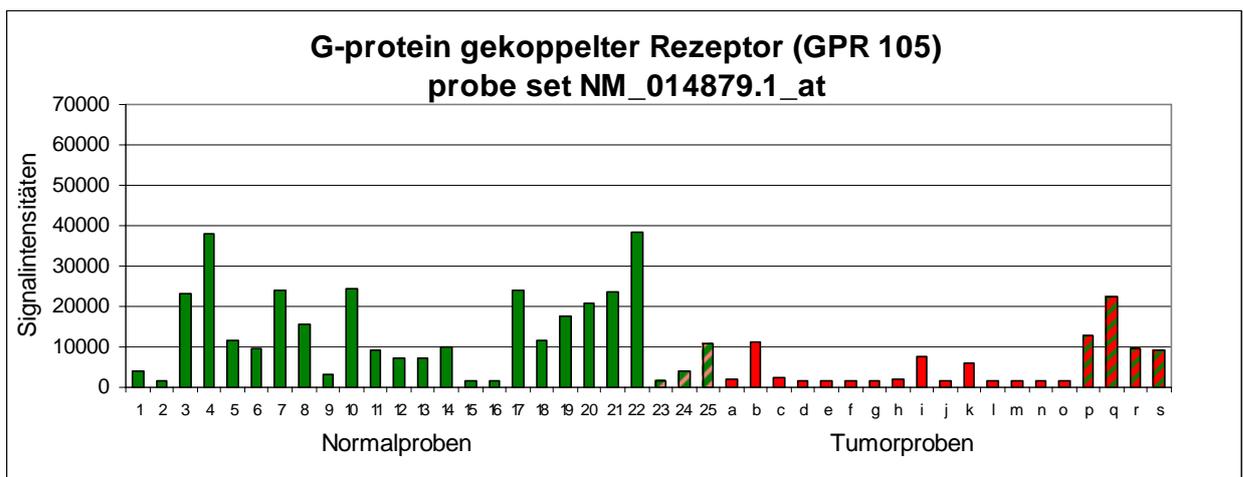


Abbildung 17: G-Protein gekoppelter Rezeptor ist in den Tumorproben signifikant unterexprimiert.

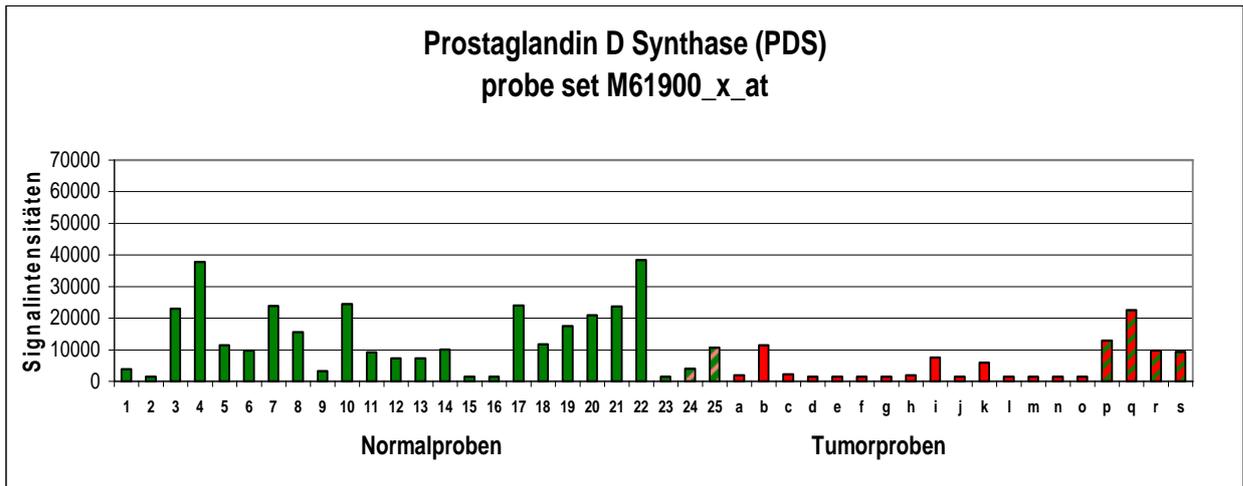


Abbildung 18: Prostaglandin D Synthase ist in den Tumorproben signifikant unterexprimiert.

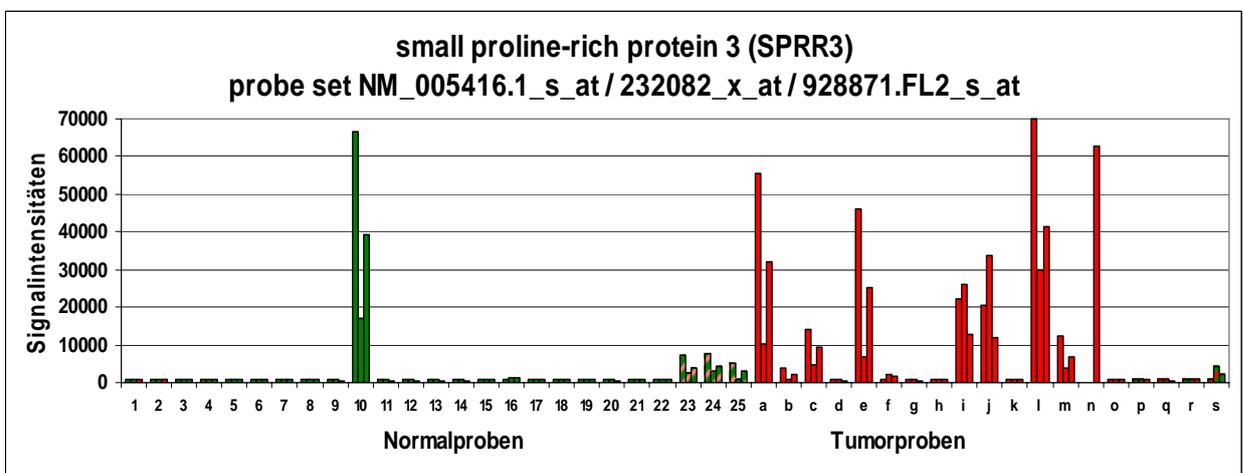


Abbildung 19: SPRR3 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

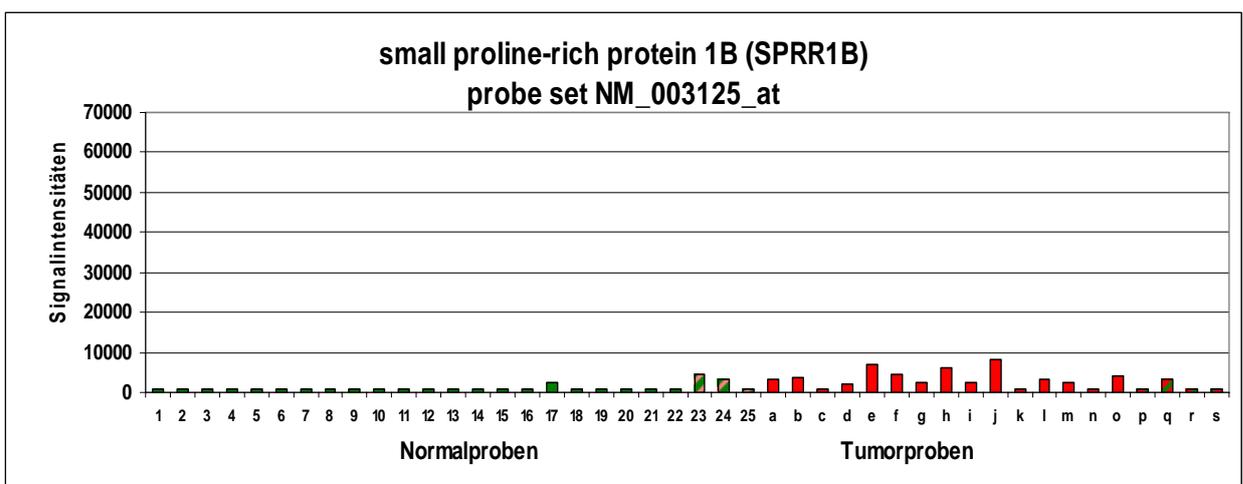


Abbildung 20: SPRR1B ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

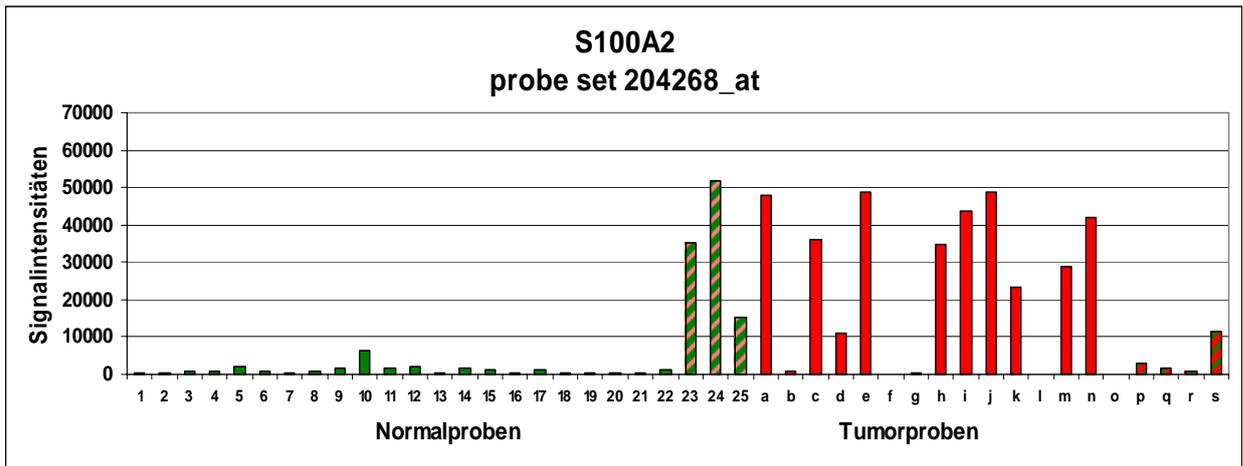


Abbildung 21: S100A2 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

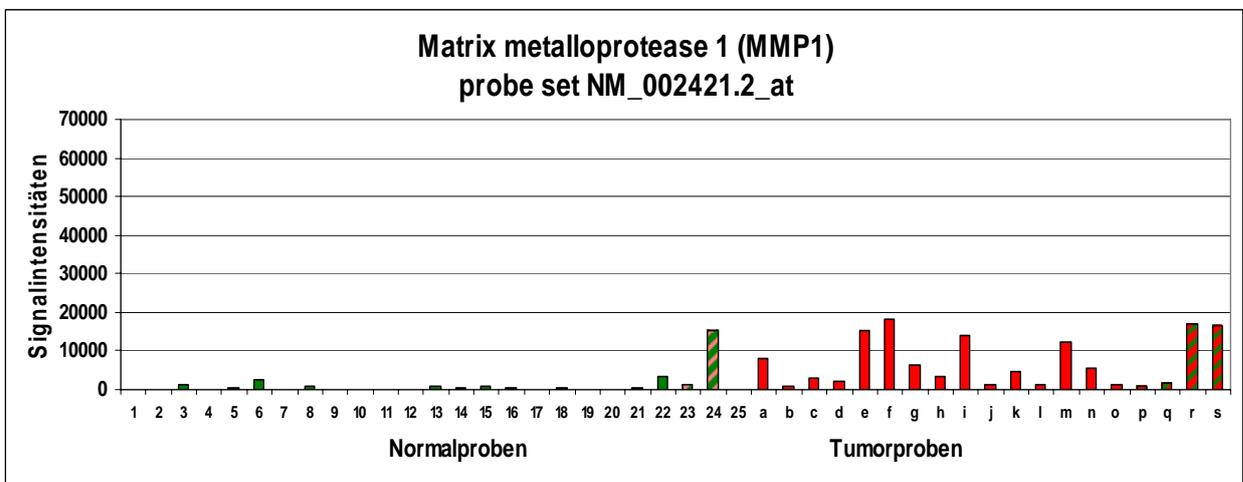


Abbildung 22: MMP1 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

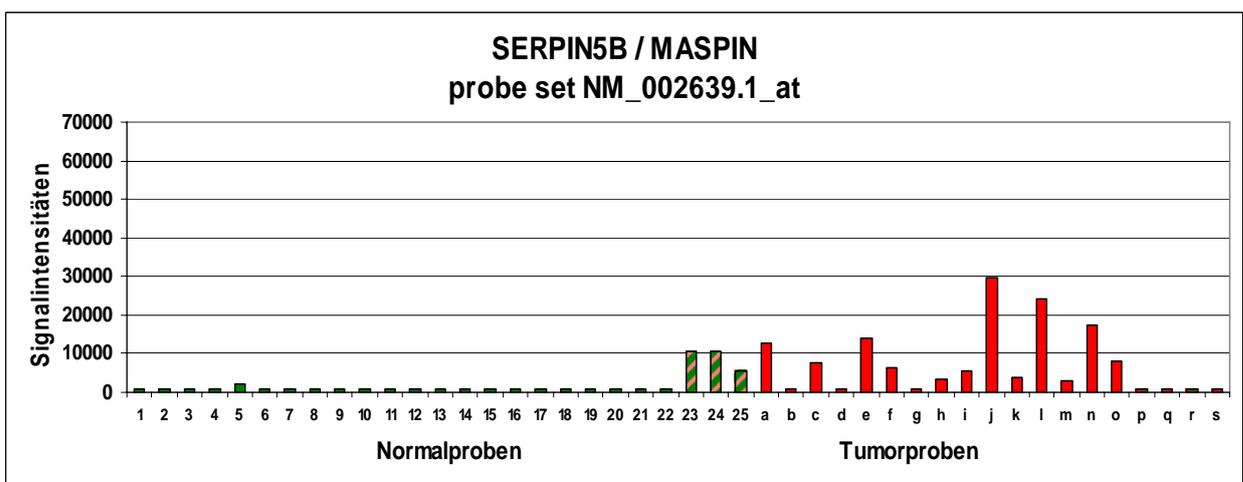


Abbildung 23: MASPIN ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

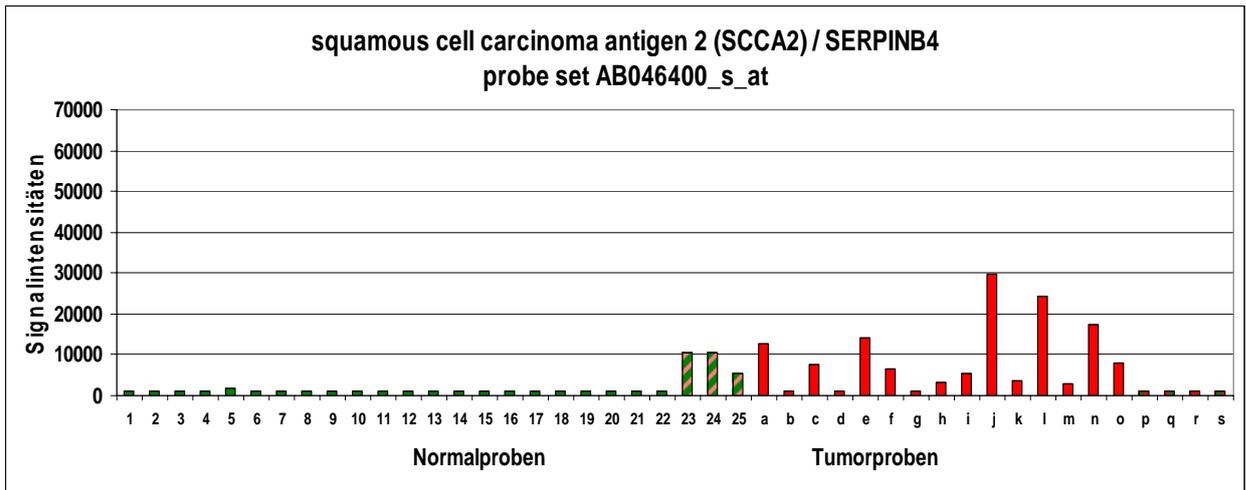


Abbildung 24: SCCA2 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

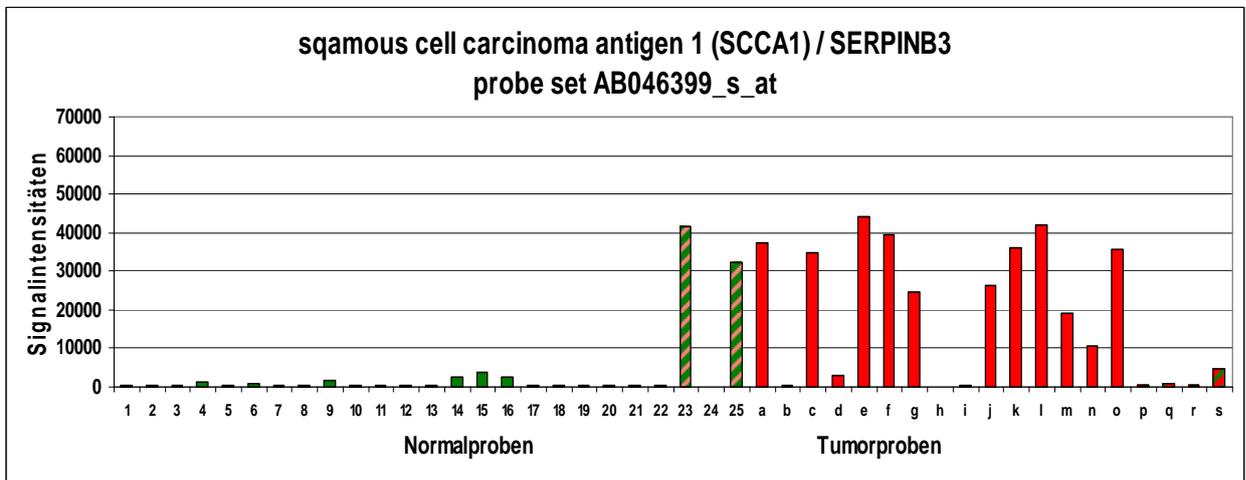


Abbildung 25: SCCA1 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

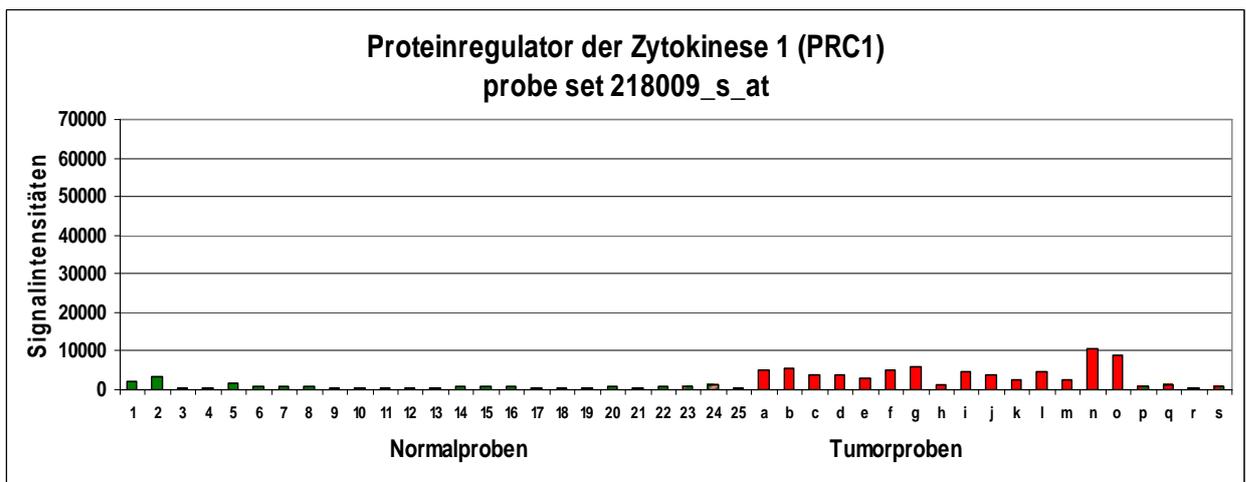


Abbildung 26: PRC1 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

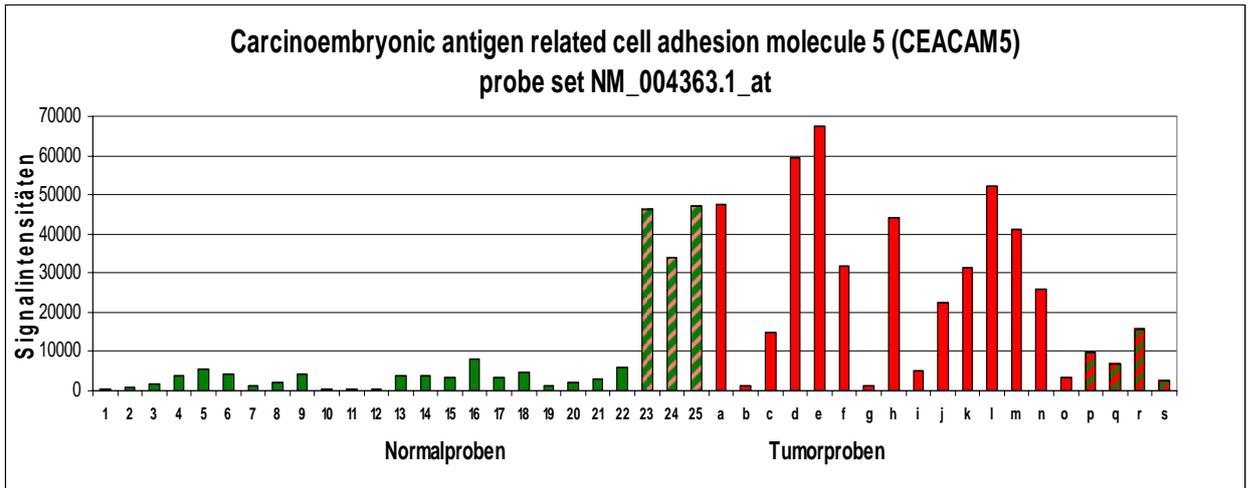


Abbildung 27: CEACAM 5 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

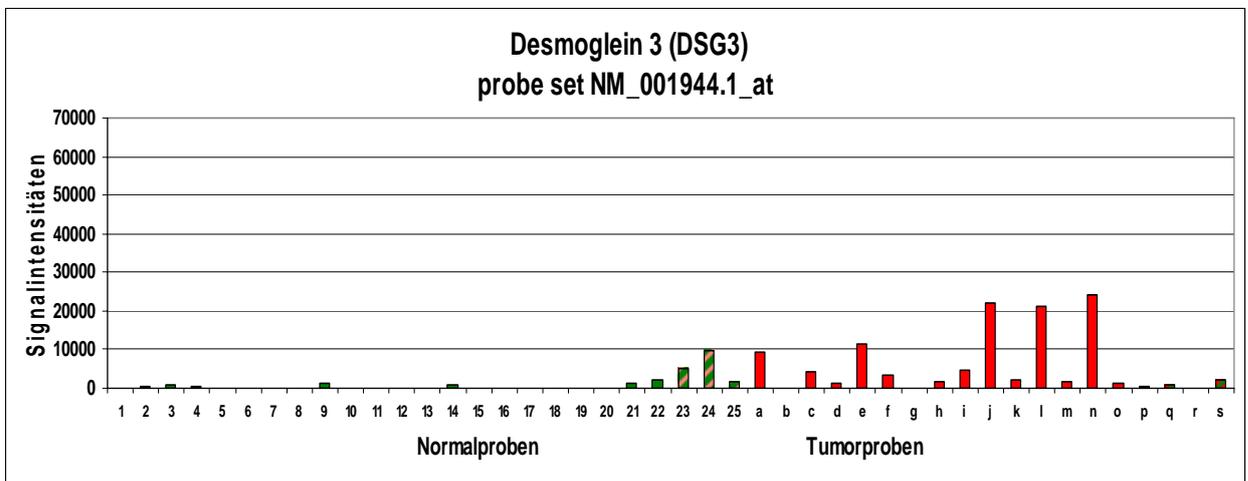


Abbildung 28: DSG 3 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

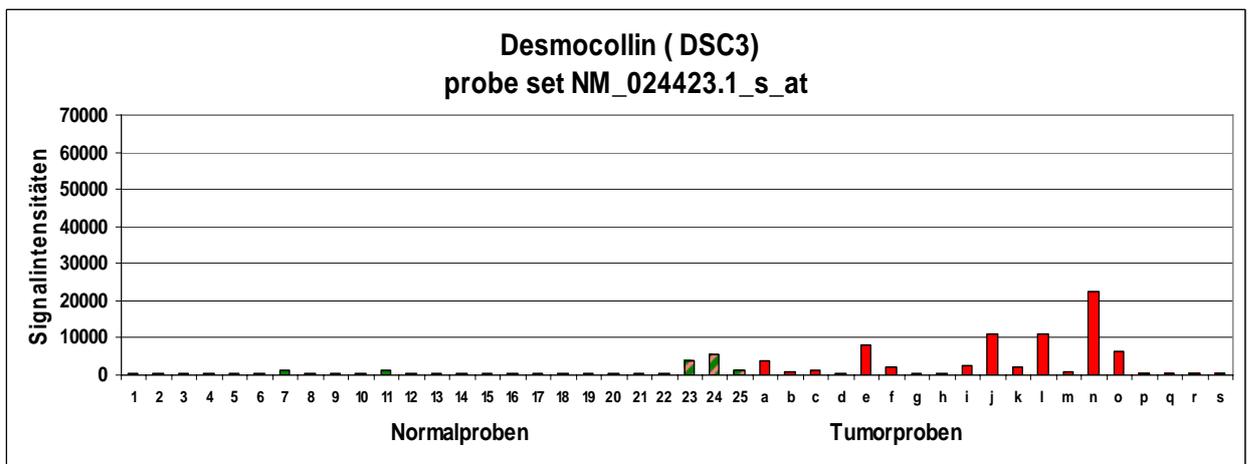


Abbildung 29: DSC3 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

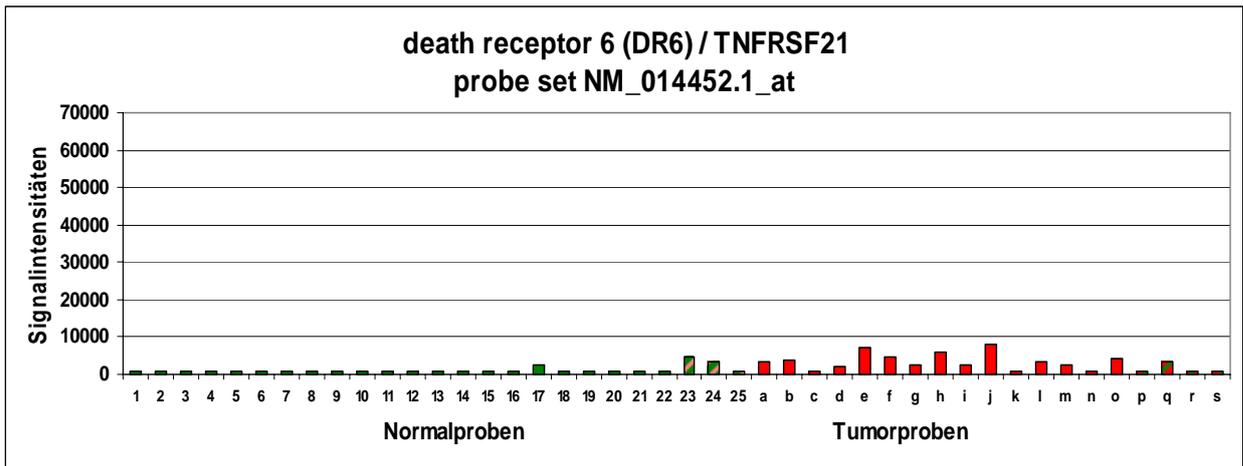


Abbildung 30: DR 6 ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

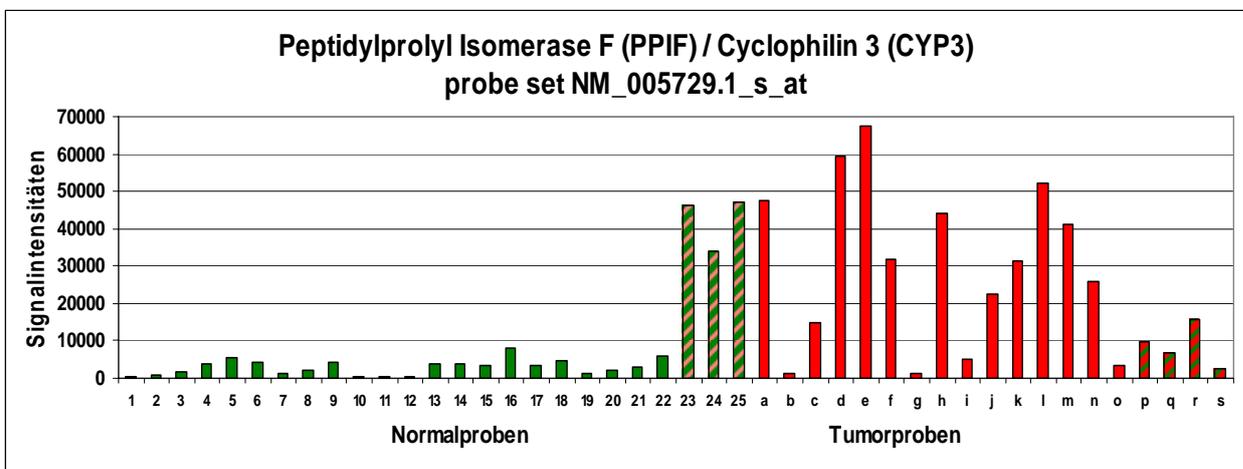


Abbildung 31: PPIF ist in den Tumorproben signifikant überexprimiert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die RNA-Isolation aus kleinen Gewebemengen

Für die Durchführung von Genexpressionsanalysen anhand von Biopsien ist es wichtig, Verfahren zu optimieren, welche die Isolation von RNA aus kleinsten Gewebemengen möglich machen. Die histologische Diagnose des Lungenkarzinoms wird meist durch in Bronchoskopien gewonnene Gewebeproben gestellt. Diese wiegen oft nicht mehr als 5 mg. Viele Arbeitsgruppen, die Genexpressionsanalysen beim Lungenkarzinom durchführten, nutzten Gewebe aus Tumorbanks oder Gewebe aus bei Operationen gewonnenen Tumorresektaten für die Genexpressionsanalyse (Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001). Diese haben jedoch ein wesentlich höheres Ausgangsgewicht als Biopsien. Tumorresektate stellen beim Lungenkarzinom zudem meist frühe Stadien der Erkrankung dar und sind Resultat eines therapeutischen Eingriffes. Um auch Genexpressionsprofile von Lungenkarzinomen der weitaus häufigeren späten Tumorstadien erstellen zu können und Aussagen vor Beginn einer Therapie treffen zu können, ist es nötig, das geringe Ausgangsmaterial der durch Biopsien gewonnenen Proben bestmöglich nutzen.

In dieser Arbeit ist die Isolation von mRNA aus Proben von nur bis zu 2.5 mg Gewicht gelungen. Dabei konnten gute Qualitäten und Quantitäten der Nukleinsäuren erhalten werden (Tabelle 8). Das Zusammenführen mehrerer Biopsien eines Patienten bei zu geringem Gewicht einer einzelnen Probe sowie der Einsatz des *Ultra-Turrax* Dispergiergeräts zur Gewebemehomogenisierung waren dabei ausschlaggebend.

Aufgrund der ubiquitär vorhandenen RNAsen ist für den Einsatz des Verfahrens in der Klinik weiterhin eine gute Logistik von der Asservierung der Probe bis hin zur Aufarbeitung des Gewebes von großer Bedeutung. „RNAsen“ sind RNA spaltende Enzyme, die ubiquitär im Gewebe vorhanden sind und nur schwer inaktiviert werden können. Sie verlieren ihre Wirkung nur bei sehr tiefen Temperaturen. Neben dem sterilen Umgang mit den Gewebeproben ist es deshalb nötig, sie sofort nach Gewinnung in ein kaltes Medium, zum Beispiel flüssigen Stickstoff, zu überführen. Deshalb wurde bei der vorliegenden Arbeit besonders auf eine gute Logistik der Probenentnahme geachtet, dass heißt, es stand immer flüssiger Stickstoff zur Verfügung, in den die Probe so schnell wie möglich überführt wurde. Im Labor wurde auf Einhaltung der entsprechenden Lagertemperaturen und auf Reinigung mit RNAsen inaktivierenden Mitteln geachtet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe einer guten Logistik und des hier eingesetzten Verfahrens der Isolation von Erbmaterial eine Genexpressionsanalyse mit sehr geringem Gewebematerial möglich ist. Die gute Qualität der Genexpressionsanalyse der in Bronchoskopien gewonnenen Biopsien läßt die Etablierung eines solchen Verfahrens in der Klinik realistischer erscheinen.

Ebenso wurde hier gezeigt, dass die von vielen Arbeitsgruppen bevorzugte, aber sehr aufwendige und kostenintensive Technik der Mikrodissektion für eine gute Genexpressionsanalyse nicht notwendig ist. Die Mikrodissektion ist ein lasergesteuerter Gewebeschnitt unter dem Mikroskop mit dem Ziel, möglichst homogene Proben und wenig histologisch normales Gewebe zwischen Tumorgewebe zu erhalten. In dieser Arbeit konnte mit der *Principal Component Analysis* (PCA) auch ohne dieses Verfahren Tumorgewebe deutlich von Normalgewebe unterschieden werden. Auch Bhattacharjee et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass Adenokarzinomproben, welche mikroskopisch inhomogen waren und verschieden hohe Anteile von normalen Zellen enthielten, vergleichbare Genexpressionssignaturen aufwiesen wie homogene Tumorproben (Bhattacharjee et al., 2001).

### **5.2 Vergleich der Genexpressionsanalyse mit Markergenen aus der Literatur**

In dieser Arbeit wurde die Genexpression von 19 nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen mit der Genexpression von 25 Gewebeproben aus normalem Lungengewebe verglichen. Nach der Hybridisierung der fragmentierten und biotin-markierten cRNA auf die *GeneChips*<sup>®</sup>, Wasch- und Färbevorgängen folgte die Datenanalyse. Dabei zeigte sich in der PCA eine klare Gruppenbildung basierend auf den intrinsischen Genexpressionsdaten von Tumor- und Normalproben. Es konnten sogar vier Tumor- sowie drei Normalgewebeproben als Ausreißer-Proben identifiziert werden.

Die erhaltenen Daten wurden mit Genexpressionsanalysen aus der Literatur verglichen. Da die Gruppe um Heighway Genexpressionsanalysen am Lungenkarzinom mit cDNA Mikroarrays, und somit einer anderen Methode als der hier verwendeten nutzte, um Genexpressionsanalysen zu erstellen, war diese Arbeit für einen Vergleich der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Daten besonders geeignet.

Heighway et al. untersuchten die Genexpression von 39 nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und verglichen sie mit Normalgewebe der Lunge. Von 27 Patienten ließen sich Tumor-Normalgewebe Probenpaare gewinnen. Die Genexpression von besonders repräsentativen Genen wurde mittels RT-PCR validiert (Heighway et al., 2002).

Heighway et al. fanden Osteopontin im Lungenkarzinom hochreguliert. Mit der Methode der *quantitative real-time reverse transcription-PCR*, die die Gruppe um Schneider nutzte, konnte Osteopontin in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen um das 20fache erhöht gegenüber dem Normalgewebe nachgewiesen werden (Schneider et al., 2004). Die in der vorliegenden Arbeit genutzte Methode der Genexpressionsanalyse bestätigte die bei Heighway et al. und Schneider et al. gefundene Hochregulation dieses Gens im Tumor (siehe Abbildung 13). Osteopontin ist ein multifunktionelles Protein, das sich sowohl intra- als auch extrazellulär befinden kann und in vielen prä- und posttranslationalen Isoformen vorliegt. Strukturell ähnelt es einem Matrixprotein, hat jedoch Eigenschaften, die eher den Zytokinen eigen sind, wie die Regulation zellulärer Migration und zellvermittelter Immunität. Deswegen wurde es als sowohl als Matrixprotein als auch als Zytokin klassifiziert. Es wurde gezeigt, dass dieses Protein als regulatorisches Protein in vielen Lungenerkrankungen, auch dem Lungenkarzinom, überexprimiert wird (O'Regan, 2003).

Die Expressionsdaten eines weiteren Gens bestätigen ebenfalls die in der vorliegenden Arbeit genutzte Methode der Genexpressionsanalyse. Dabei handelt es sich um Keratin 19 (siehe Abbildung 14). Heighway et al. fanden Keratin 19 in den Tumorproben hochreguliert. Wikman et al. untersuchten die Genexpression dieses Gens mit *semi-quantitativer real-time RT-PCR* und fanden es ebenfalls im Tumor überexprimiert (Wikman et al., 2002). Fragmente von Keratin 19, die im Blut als CYFRA 21.1 detektiert werden können, werden als Tumormarker im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom genutzt (Dohmoto et al., 2000).

### 5.3 Ausreißer-Proben

Bei der vorliegenden Arbeit wurden vier Tumor- sowie drei Normalgewebeproben als Ausreißer-Proben identifiziert (Tabelle 10). Ausreißer-Proben, also Proben, die nicht in die vorhergesehene Gruppe fallen, können durch viele Gründe entstehen, z.B. durch Ungenauigkeiten bei der Biopsie, durch eine falsche histologische Diagnose oder durch eine falsche Klassifizierung der Proben.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden nicht die für die Mikroarray verwendeten Gewebeproben histologisch untersucht, sondern die zeitgleich aus dem mutmaßlich gleichen Tumor für klinisch-diagnostische Zwecke entnommenen Proben. Der wahrscheinlichste Grund für das Vorliegen der Ausreißer-Proben ist, dass der Untersucher in diesen Fällen durch eine makroskopische Fehleinschätzung anstelle von Tumor fälschlicherweise Normalgewebe (Proben AC 1 und SCC 5) bzw. anstelle von NAT Tumor (NAT 7, NAT 4 und NAT 5) entnahm.

Da das diagnostische Verfahren bei den kommerziellen Proben 09 und C14 nicht bekannt ist, kann auch hier nur spekuliert werden; möglich für das Ausreißer-Verhalten dieser Proben sind jedoch prinzipiell dieselben Gründe wie die oben beschriebenen.

### **5.4 Genexpressionsanalysen erlauben eine Differenzierung zwischen Lungenmetastase und Primärtumor**

Die Probe SCC 7 stammt aus einem Tumorsektat einer Patientin, bei welcher anamnestisch ein Zervix- und ein Mammakarzinom bekannt waren. Bei einer neuen Raumforderung in der Lunge erfolgte die Resektion. Es war zum Zeitpunkt der Operation nicht klar, ob die Raumforderung einen pulmonalen Primarius oder eine Metastase eine der beiden anderen Tumorerkrankungen darstellte. In der PCA-Analyse der vorliegenden Arbeit clusterte diese Probe mit den Adenokarzinomproben (siehe Abbildung 11).

Genexpressionsanalysen könnten in Zukunft von großer Bedeutung für die Diagnostik bei sogenannten CUP-Tumoren sein und die histologische und immunhistochemische Untersuchung wesentlich ergänzen. CUP steht für *Cancer of Unknown Primary* und ist als metastatische Erkrankung bekannt, dessen Primarius zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht identifiziert werden kann und oft, selbst bei Autopsie unerkant bleibt (Pavlidis et al., 2003). CUP-Tumoren der Lunge präsentieren sich oft mit pulmonalen Parenchymmetastasen oder einem isolierten malignen Pleuraerguß. Adenokarzinome sind immunhistomorphologisch mäßig gut und Plattenepithelkarzinome schlecht einem Primarius zuzuordnen. Genexpressionsanalysen könnten zusätzlich zur Immunhistochemie einen Hinweis für den Primarius der Erkrankung liefern. In drei vorliegenden Studien konnten mittels der Genexpressionsanalyse Lungenmetastasen deren Primärtumoren zugeordnet werden (Bhattacharjee et al., 2001; Giordano et al., 2001; Yamagata et al., 2003). Giordano et al. identifizierten 12 Proben, die Adenokarzinommetastasen von Kolonkarzinomen

darstellten (Giordano et al., 2001). In der Untersuchung von Bhattacharjee et al. wurden nur 7 von 10 Proben vorher korrekt als Kolonkarzinometastasen klinisch diagnostiziert (Bhattacharjee et al., 2001). Yamata et al. konnten ein klinisch als Lungenkarzinom deklariertes Gewebe als Lungenmetastase eines anderen Primarius identifizieren und ein als pulmonale Kolonmetastase deklariertes Gewebe *clusterte* als primärer Lungentumor (Yamagata et al., 2003).

## **5.5 Unterschiede der Genexpression von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge im Vergleich zum Normalgewebe**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von normalem Lungengewebe mit der von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen verglichen. Dabei fanden sich 614 differentiell exprimierte Gene. Einige davon versprechen neue Rückschlüsse auf Karzinogenese, Prognose und Therapieansprechen des Lungenkarzinoms. Davon werden zwölf Gene im Folgenden genauer diskutiert.

### **5.5.1 Beispiele für in pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen herunterregulierte Gene**

#### **5.5.1.1 Surfactantproteine**

Das Surfactant (*surface active agent*) ist eine Emulsion aus verschiedenen Phospholipiden, Proteinen und Kohlenhydraten, die einen Teil des Schutz- und Selbstreinigungsmechanismus des Bronchialsystems darstellt und durch eine Reduzierung der Oberflächenspannung den Kollaps der Alveolen und terminalen Bronchiolen während der Ausatmung verhindert. Desweiteren dient es dem Schutz der Alveolen vor Austrocknung, beeinflusst die Aktivität der Alveolarmakrophagen und erleichtert die Phagozytose von Bakterien und Schmutzpartikeln (Riede et al., 2004).

Eine Änderung des Proteingehaltes und der Proteinzusammensetzung des Surfactant spielen eine Rolle bei vielen Lungenerkrankungen (Griese, 1999), unter anderem dem *acute respiratory distress syndrome* (ARDS). Inzwischen gibt es zunehmend Hinweise auf einen Einfluß der Genexpression dieser Proteine auf die Lungenkarzinogenese.

Bisher wurden vier Surfactant spezifische Proteine identifiziert und nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit A, B, C und D bezeichnet. Es können zwei Familien von Surfactantproteinen unterschieden werden: die hydrophoben Proteine B und C, die ein niedriges Molekulargewicht aufweisen, sowie die hydrophilen Proteine A und D mit einem hohen Molekulargewicht (Hermans and Bernard, 1999).

### **5.5.1.1.1 Die herunterregulierte Genexpression für *Surfactant Protein D* (SFTPD) in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzellen als Ausdruck für ein angeborenes oder erworbenes geschwächtes lokales Immunsystem**

In den untersuchten ACs und SCCs fand sich die RNA für das pulmonale Surfactant Protein D im Vergleich zum gesunden Lungengewebe herunterreguliert (siehe Abbildung 15). Die Ausreißer-Proben bestätigten dieses Verhalten. Dabei waren neun aller von uns untersuchten nichtkleinzelligen Lungenkarzinome metastasiert.

Das Surfactant Protein D gehört wie auch das Surfactant Protein A zur *Collectin* Familie der *host defense* Proteine. Diese gehören zum angeborenen, also zum von Antikörpern unabhängigen, Immunsystem. SFTPD ist in der Lage, Oligosaccharide auf bakteriellen und viralen Oberflächen zu binden, und eingeleitet durch diesen Vorgang direkt bakterizid zu wirken (Wu et al., 2003) oder die Phagozytose durch Makrophagen zu fördern. In Rauchern fand man reduzierte Spiegel von SFTPA und SFTPD in der bronchoalveolären Lavage (Honda et al., 1996). Diese Reduktion könnte mit einer Schwächung des angeborenen Immunsystems assoziiert sein (Wright, 1997). SFTPD defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen und Entzündungen (Lawson and Reid, 2000).

Proteine, die von Alveolarzellen gebildet werden, sind nicht nur auf der Oberfläche des Respirationstraktes, sondern in kleinen Mengen auch im Blut nachweisbar (Hermans and Bernard, 1999). Qi et al., 2002, untersuchte mittels PCR die Expression der mRNA sowie die klinische Bedeutung des in das Blut sezernierten SFTPD von Lungenkarzinompatienten. 26 der Patienten hatten ein metastasiertes Lungenkarzinom, bei 37 Lungenkarzinompatienten waren keine Metastasen nachweisbar, 15 Patienten waren an einer Pneumonie erkrankt und 15 andere völlig gesund. In den Blutproben der Gesunden und an Pneumonie Erkrankten fand sich keine SFTPD Expression, während sich in 24 von 26 Metastasierten und in 9 von 37 Nichtmetastasierten dieses Protein fand (Qi et al., 2002).

Zhang et al. untersuchten mittels ELISA die Serumspiegel von SFTPD in Mäusen ohne und mit einem Lungentumor. Die gefundenen erhöhten Serumspiegel bei Mäusen mit einem

Lungentumor wurden durch Immunoblotting verifiziert. Ein erhöhter Spiegel war auch in Mäusen mit einer Lungenentzündung zu messen (Zhang et al., 2004).

Das gefundene niedrige Expressionsverhalten von SFTPD bei der hier vorliegenden Arbeit ist diskordant zu den Untersuchungen von Qi et al. und Zhang et al. Möglicherweise setzten diese Arbeitsgruppen unspezifische Antikörper ein, die nicht nur SFTPD, sondern auch andere Proteine im Blut detektierten. Zudem muß die Höhe der Expression auf Transkriptionsebene, die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde, nicht mit der Höhe der Expression auf Proteinebene, die in den Arbeiten von Qi et al. und Zhang et al. untersucht wurde, übereinstimmen.

Demgegenüber ist die Entdeckung von Lawson et al., die herausfanden, dass SFTPD defiziente Mäuse anfälliger gegenüber Infektionen und Entzündungen sind, gut vereinbar mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, da häufige Infektionen und Entzündungen mit einer gesteigerten Zellteilungsrate und somit einer höheren Wahrscheinlichkeit zur malignen Zelltransformation verbunden sind. Man kann also vermuten, dass die hier gefundene erniedrigte Expression von SFTPD in Lungenkarzinomproben nicht Folge von Lungenerkrankungen, sondern eine genetisch bedingte Prädisposition für Infektionen und Tumorerkrankungen der Lunge darstellt. Sollte sich dies in weiteren Untersuchungen bestätigen, könnte die Messung von SFTPD in der BAL in Vorsorgeuntersuchungen zum Einsatz kommen.

Für eine erworbene Herunterregulierung hingegen sprechen Untersuchungen des SFTPD Gehaltes in der bronchioalveolären Lavage (BAL) von Rauchern und Nichtrauchern (Betsuyaku et al., 2004; Honda et al., 1996). Dabei fanden sich deutlich niedrigere Werte bei Rauchern. Angesichts des höheren Risikos für Raucher, an einem Lungenkarzinom zu erkranken, spricht die in dieser Arbeit gefundene Herunterregulierung des SFTPD auch für eine erworbene Eigenschaft der Tumorzellen.

### **5.5.1.1.2 Die herunterregulierte Genexpression für *Surfactant Protein B* (SFTPB) prädisponiert möglicherweise zum nichtkleinzelligen Lungenkarzinom durch falsch zusammengesetztes Surfactant**

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA Transkriptionsvariante 1 des Surfactant Protein B untersucht. Dabei fand sich eine signifikante Herunterregulation (siehe Abbildung 16) in ACs und SCCs im Vergleich zu normalem Lungengewebe.

Die Expression dieses Proteins wird u.a. durch eine Retinolsäurerezeptor alpha vermittelte Verstärkung der TTF1 Bindung an die *Enhancer* Region von SFTPb stimuliert. (Jacot and Bousquet, 2003). Ein besseres Verstehen dieser Vorgänge könnte zu neuen therapeutischen Möglichkeiten führen. Im Zusammenhang mit anderen Tumormarkern wie TTF-1, CK 7 und CK 20 ist SFTPb nach einer Untersuchung von Zou et al. nutzbar in der Unterscheidung von pulmonalen Adenokarzinomen und Lungenmetastasen von Adenokarzinomen mit anderem Primarius (Zou et al., 2003). Diese Erkenntnis wurde in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft, ist jedoch in Hinblick auf die Probleme bei der Diagnosestellung eines CUP-Tumors von außerordentlichem Interesse.

Es ist anzunehmen, dass durch eine Fehlregulation dieses Proteins ein falsch zusammengesetztes Surfactant entsteht. Dadurch wird die Lunge anfälliger für Atelektase und Verletzungen (Whitsett and Weaver, 2002). In der Literatur wurden keine Daten zur Expression von SFTPb in Lungenkarzinomen gefunden. Seifart et al. untersuchten Genvarianten von SFTPb in gesunden Lungen und Lungenkarzinomen und fanden eine deutlich erhöhte Variation des Intron 4 des SFTPb Gens in den Lungen- und besonders Plattenepithelkarzinomen. Sie diskutierten, dass diese Genvariabilität mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine Entwicklung von Lungenkarzinomen einhergeht (Seifart et al., 2002).

Die Angaben in der Literatur lassen vermuten, dass auch die in der vorliegenden Arbeit gefundene Herunterregulation von SFTPb durch ein falsch zusammengesetztes Surfactant zu Lungenkarzinomen prädisponiert. Es sind jedoch weitere Arbeiten notwendig, um diese These zu bestätigen.

### **5.5.1.2 Der herunterregulierte G-Protein gekoppelte Rezeptor (GPR 105) als Ausdruck einer fehlregulierten Immunantwort in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen**

GPR 105 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der spezifisch auf UDP-Glucose und verwandte Zucker-Nukleotide reagiert. In den hier untersuchten Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge war GPR 105 im Vergleich zum normalen Gewebe herunterreguliert (siehe Abbildung 17).

Der Rezeptor wurde aufgrund von Homologievergleichen der Aminosäuresequenz der Familie der Nucleotidrezeptoren/P2Y Rezeptoren als P2Y14 zugeordnet. Für eine Übersicht des bisherigen Wissensstands über diesen Rezeptors wird an dieser Stelle auf Abbraccio et al. verwiesen (Abbraccio et al., 2003). Bei Expressionsuntersuchungen war der Rezeptor beim Menschen in Plazenta, Fettgewebe, Magen und Darm am häufigsten vertreten, gefolgt

von Gehirn, Milz, Lunge und Herz (Chambers et al., 2000). Untersuchungen an der Ratte lassen vermuten, dass die pathophysiologische Funktion dieses Rezeptors in einer Regulation bei immunologischer Herausforderung besteht. Charlton et al. setzten Ratten Stimulatoren der Makrophagenphagozytose sowie der Lipopolysacchariden aus, die zu einer Höherexpression von GPR 105 führte (Charlton et al., 1997). Die Signalwege sind noch unklar und bedürfen weiterer Forschung.

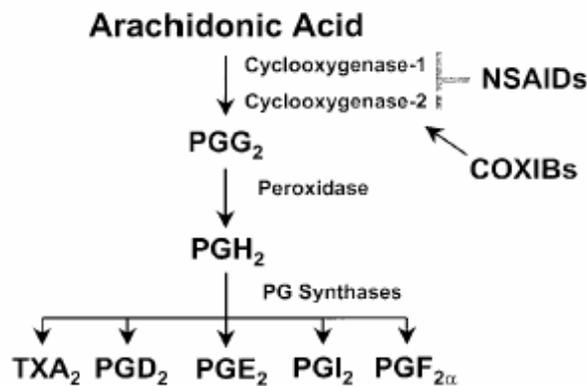
In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen der Genexpression von GPR 105 und dem Lungenkarzinom bisher nicht beschrieben. Die gefundene Herunterregulierung dieses Rezeptors lassen zusammen mit den Untersuchungen von Chambers et al. und Charlton et al. vermuten, dass immunologische Reize in Lungenkarzinomzellen nicht adäquat mit einer Hochregulation von GPR 105 beantwortet werden und somit die Immunantwort fehlreguliert ist. Ob dies so ist und ob die erniedrigte Expression von GPR 105 Folge oder Ursache der Erkrankung ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

### **5.5.1.3 Die herunterregulierte Prostaglandin D Synthase (PDS) als Ausdruck einer geänderten Prostaglandinproduktion in Tumoren**

Die Genexpression für PDS in Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge fand sich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zum Normalgewebe als signifikant herunterreguliert (siehe Abbildung 18).

Prostaglandine sind lipophile Hormone mit membranständigen Rezeptoren. Sie entstehen durch die Einwirkung von Enzymen, die Cyclooxygenasen genannt und mit COX abgekürzt werden, aus Arachidonsäure. Dabei entsteht durch das bifunktionale COX Enzym im ersten Schritt Prostaglandin G<sub>2</sub> und im zweiten Schritt, durch eine Peroxidase-Aktivität der COX, Prostaglandin H<sub>2</sub>, aus dem durch die jeweiligen Prostaglandinsynthasen alle anderen Prostaglandine entstehen (siehe Abbildung 32). COX-1 wird in den meisten normalen Geweben exprimiert und stößt die Synthese vieler Prostaglandine an, die für normale physiologische Funktionen notwendig sind, wohingegen die Expression von COX-2 unter biologischem Stress als Folge zahlreicher endogener und exogener Faktoren wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Onkogenen und Karzinogenen induziert wird (Anderson et al., 2003). In den letzten 10 Jahren wurden viele Arbeiten über den enzymatischen Signalweg der Produktion von Prostaglandinen und anderen bioaktiven Lipidmediatoren veröffentlicht. Neben Prostaglandinen entstehen aus Arachidonsäure Thromboxane und Leukotriene. Viele

Arachidonsäure-Abkömmlinge wirken als lokale Signalstoffe parakrin. Sie modulieren die Wirkungen anderer Hormone und beeinflussen viele Zellreaktionen (Lodish et al., 2001).



**Abbildung 32: Die Entstehung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure.** (DuBois, 2003)

PG=Prostaglandin, TX=Thromboxan, COXIB=Cyclooxygenase-2-Inhibitoren, NSAID=non-steroidal anti-inflammatory drugs

Die Kenntnis des enzymatischen Signalwegs der Prostaglandinproduktion hat zur Entwicklung neuer Medikamente wie der selektiven COX-2 Inhibitoren (COXIBs, zum Beispiel Celecoxib, Rofecoxib, und Valdecoxib) geführt. Der Signalweg des Prostaglandinrezeptors wurde ebenfalls aufgeklärt, woraufhin weitere Medikamente, die die Prostaglandinsynthese hemmen, entwickelt werden. Interessant ist, dass dieser Signalweg auch in der Karzinogenese eine Rolle zu spielen scheint. Berichte über COX Inhibitoren und/oder eine genetische Manipulation dieser Kaskade zeigten dramatische Effekte auf die Karzinogenese und die Progression einer metastasierten Erkrankung (DuBois, 2003).

Eine Herunterregulation von Prostaglandin D Synthase in Tumoren ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Einen Hinweis auf eine Herunterregulation dieses Enzyms findet man bei Ando et al., 2003, die den protektiven Effekt von Prostaglandin D in mit Bleomycin behandelten Mäuselungen zeigen konnten, indem sie retroviral Prostaglandin-D2-Synthase transfizierte Fibroblasten verabreichten (Ando et al., 2003).

Da eine Überexpression von COX-2 in Tumoren bekannt ist, könnte die hier gefundene Herunterregulation von PDS entweder Ausdruck eines negativen Feedbacks durch die erhöhte COX-2 sein oder eine gering exprimierte PDS ist Teil der durch die COX-2 angestoßenen Kaskade, die durch viele Mechanismen zur Karzinogenese beiträgt.

Ermert et al., 2003 berichten über immunhistochemische Expressionsmuster von COX-1, COX-2, Prostaglandin-E2-Synthase, Prostaglandin-D<sub>2</sub>-Synthase, Prostaglandin-I-Synthase, und Thromboxan-A<sub>2</sub>-Synthase in einer Anzahl von Lungentumoren (Ermert et al., 2003). Darin war die immunhistochemische Expression von Prostaglandin-D<sub>2</sub>-Synthase in Endothelzellen von NSCLC-assoziierten Blutgefäßen gesteigert. Die Autoren diskutierten eine Beteiligung von Prostaglandin D<sub>2</sub> an der tumor-vermittelten Angiogenese und somit eine tumorfördernde Funktion dieses Prostaglandins. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Herunterregulation auf mRNA-Ebene muß dieser Entdeckung nicht entgegenstehen, durch Einflüsse anderer Enzyme auf Translationsebene könnten trotz eines niedrigen Spiegels an mRNA hohe Proteinkonzentrationen von Prostaglandin-D-Synthase entstehen.

Über die Zusammenhänge der bekannten COX-2 Überexpression in Lungentumoren und der Expression von Prostaglandin-D-Synthase besteht noch viel Forschungsbedarf. Erfolgreiche Ansätze zur Hemmung der Tumorstadiums durch Einsatz von COXIBs bei nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (Gridelli et al., 2002) versprechen jedoch einen positiven Ausblick.

### **5.5.2 Beispiele für in pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen hochregulierte Gene**

#### **5.5.2.1 *Small proline-rich proteins***

Die sogenannten SPRR Gene kodieren eine Klasse von Polypeptiden, die *small proline rich proteins* genannt werden, weil sie proteinreiche Regionen enthalten. Die Bildung dieser Proteine wird während der Differenzierung von humanen epithelialen Keratinozyten stark induziert (Gibbs et al., 1993).

SPRR Proteine werden von eng verwandten Mitgliedern einer Genfamilie kodiert, welche auf dem Chromosom 1 innerhalb des epidermalen Differenzierungskomplexes liegt und aus 11 Genen besteht: SPRR1A, SPRR1B, sieben SPRR2 Gene, SPRR3 sowie SPRR4 (Tesfaijzi et al., 2003).

In dieser Arbeit war die mRNA von SPRR3 wie auch SPRR1B in ACs und SCCs im Vergleich zum normalen Lungengewebe überexprimiert (siehe Abbildungen 19 und 20).

#### **5.5.2.1.1 Das im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom hochregulierte *small proline-rich protein 1B* (Cornifin, SPRR1B) hat möglicherweise Einfluß auf den Ablauf der Mitose**

In der vorliegenden Arbeit fand sich die mRNA für SPRR1B in ACs und SCCs der Lunge hochreguliert.

Die Überexprimierung von SPRR1B fördert den Übergang der Zellen in die G0 Phase des Zellzyklus. Viele Untersuchungen zeigten die Rolle von SPRR1B bei der Differenzierung der squamösen Zellen der Haut sowie der respiratorischen Epithelzellen (An et al., 1992; Kartasova et al., 1988; Smith et al., 1978; Tesfaigzi et al., 1996; Yaar et al., 1995). SPRR1B beeinflusst die Stärke und Flexibilität von Plattenepithelien (Candi et al., 1999; Tarcsa et al., 1998).

Tesfaigzi et al. zeigten, dass SPRR1 in Plattenepithelkarzinomen der Lunge überexprimiert ist (Tesfaigzi et al., 1993). Das Protein kommt jedoch auch in anderen als Plattenepithelgeweben vor. So wies man es in myoepithelialen Zellen und glatten Muskelzellen nach (Kartasova and van de Putte, 1988; Koizumi et al., 1996). Die Expression dieses Proteins in Zelllinien, die von Adenokarzinomen abstammten, fand sich hingegen herunterreguliert (Tesfaigzi et al., 2003).

Induzierte man die Expression dieses Proteins für kurze Zeitabschnitte, wurde die Wachstumsrate nicht beeinflusst, statt dessen jedoch der Übergang in die G0/G1 Phase im Vergleich zu Kontrollen beschleunigt. Tesfaigzi et al. diskutieren, dass SPRR1B an Signale gebunden ist, die verantwortlich sind für das Verlassen der proliferativen Phase von Zellen und dass seine Überexprimierung die normale Mitose unterbrechen kann.

Die hier gefundene Hochregulation von SPRR1B in Plattenepithelkarzinomen korreliert mit der Arbeit von Tesfaigzi et al. Das diskordante Ergebnis der vorliegenden Arbeit beim Adenokarzinom könnte darin begründet sein, dass Tesfaigzi et al. die Proteinexpression in Zelllinien, die vorliegende Arbeit jedoch die mRNA Expression in Tumorgewebe untersuchte.

#### **5.5.2.1.2 Das *small proline-rich protein 3* (SPRR3) ist im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom ebenfalls hochreguliert**

Diese Arbeit fand die mRNA von SPRR3 in NSCLCs im Vergleich zu normalem Lungengewebe hochreguliert.

In der Literatur sind kaum Arbeiten zu finden, die die Genexpression von SPRR3 in Lungenkarzinomen untersuchen. Nacht et al. fanden dieses Gen mit der Methode der SAGE in Plattenepithelkarzinomen der Lunge hochreguliert, in Adenokarzinomen jedoch herunterreguliert. Chen et al. untersuchten die Expression von SPRR3 im Ösophaguskarzinom im Vergleich zu normaler Ösophagasmucosa mittels Northern blot und RT-PCR. Diese Arbeitsgruppe fand eine Herunterregulation dieses Gens im Tumorgewebe (Chen et al., 2000). Weitere Untersuchungen, die sich der Expression von SPRR3 in Lungentumoren sowie der Funktion des von SPRR3 kodierten Proteins widmen sind erforderlich um festzustellen, ob SPRR3 eine ähnliche Funktion wie SPRR1B besitzt und gleichsinnig reguliert wird oder ob es eine andere Funktion innehat.

### **5.5.2.2 Die überexprimierte *S100A2-Ca<sup>2+</sup>-binding protein* mRNA als Zeichen einer Apoptoseresistenz**

Wir fanden S100A2 in der überwiegenden Mehrheit der untersuchten Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert (siehe Abbildung 21).

Das S100A2 Gen, auch als S100L oder CaN19 bezeichnet, kodiert ein Protein, das zu den kalziumbindenden Proteinen der *EF-hand* Familie gehört (Franz et al., 1998). Es befindet sich auf Chromosom 1q21 in einer Region, welche in vielen Tumoren häufig verändert ist (Feng et al., 2001). Viele S100 Proteine befinden sich im Zytoplasma, S100A2 jedoch im Zellkern (Mueller et al., 1999). In normalen Zellen steigt die Expression von S100A2, wenn die Zellen in die S Phase des Zellzyklus eintreten. Die Expression wird durch Wachstumsfaktoren in der frühen G1 Phase induziert (Feng et al., 2001). Die Rolle von S100A2 beim Zellzyklus ist jedoch unklar.

Eine der vielen Funktionen des Tumorsuppressors p53 ist die Aktivierung der Apoptose. Eines der Zielgene des Apoptose-Signalwegs von p53 ist S100A2 [Sun et al., 2000]. Da S100A2 dabei herunterreguliert wird, könnte die hier vorliegende Hochregulation von S100A2 in Tumorzellen im Umkehrschluß für eine erniedrigte p53 Expression und eine wachsende Resistenz gegenüber Apoptose sprechen.

Unser Ergebnis korreliert mit der Arbeit von Heighway et al., die S100A2 in der Mehrzahl von 39 NSCLCs im Vergleich zu normalem Lungengewebe hochreguliert fanden (Heighway et al., 2002). Heighway et al. validierten dieses Ergebnis mit den Methoden der RT-PCR, Western blot und Immunhistochemie, die die Überexpression bestätigten. Die in dieser Arbeit und bei Heighway et al. gefundene Hochregulation korreliert jedoch nicht mit dem

Ergebnis von Feng et al., die S100A2 als herunterreguliert beschrieben. Allerdings wurde dabei nicht Tumorgewebe, sondern eine Zelllinie aus Tumorzellen, die nach Exposition mit Zigarettenrauch *in vivo* aus normalen menschlichen Bronchialzellen entstanden sowie 11 NSCLC Zelllinien analysiert. Als Ursache der Herunterregulation konnten sie eine CpG Methylierung der Promoter Region des S100A2 Gens ausmachen. Die bei Feng et al. gefundene Herunterregulierung von S100A2 könnte auf einem veränderten epigenetischen Muster in Zelllinien im Vergleich zu dem hier untersuchten Tumorgewebe beruhen.

### **5.5.2.3 Die hochregulierte *Matrix metalloprotease 1* (MMP1) stellt eventuell einen lungenkarzinomspezifischen Vertreter der Matrixmetalloproteinasen dar**

In der vorliegenden Arbeit war die Expression dieses Gens, das auch als *collagenase I*, *interstitial collagenase*, *fibroblast collagenase* oder *tissue collagenase* bezeichnet wird, gegenüber den Expressionswerten der normalen Gewebeproben in SCCs wie auch ACs erhöht (siehe Abbildung 22). Dieses Ergebnis korreliert mit dem von Heighway et al., die dieses Gen ebenfalls in NSCLCs hochreguliert fanden (Heighway et al., 2002).

MMPs sind Zink-enthaltende sezernierte proteolytische Enzyme, die aufgrund eines *remodeling* der extrazellulären Matrix zur Gewebeinvasion, Metastasierung und Angiogenese eines Tumors beitragen (Bonomi, 2002). Dies erreichen diese Enzyme durch das Spalten von Substraten, die zum Beispiel strukturelle Komponenten der Extrazellulärmatrix sind oder auch Wachstumsfaktor-bindende Proteine, Vorläufer von Wachstumsfaktoren, Rezeptortyrosinkinasen und Zelladhäsionsmoleküle darstellen (Egeblad and Werb, 2002). Es gibt mehr als 21 menschliche MMPs, deren Höherexpression in Tumoren vor allem auf Änderungen während der Transkription beruht und nicht auf Genamplifikationen oder aktivierenden Mutationen, wie es bei vielen Onkogenen der Fall ist (Egeblad and Werb, 2002). Die Transkription von MMP1 z.B. wird durch den Tumorsuppressor p53 gehemmt (Sun et al., 2000).

In der eingesehenen Literatur ist die genaue Funktion von MMP1 nicht beschrieben.

Therapeutische Möglichkeiten der Hemmung von Tumorwachstum und Tumordinvasion durch den Einsatz von MMP-Inhibitoren (MMPIs) wurden und werden intensiv untersucht. Verschiedene MMPIs befinden sich in klinischen Studien (Vihinen et al., 2005), unter anderem bei Patienten mit Lungenkarzinomen (Shepherd and Sridhar, 2003). Obwohl die Ergebnisse erster klinischer Studien größtenteils enttäuschend waren, zeigten sich auch positive Ergebnisse. Daher sollten MMPs identifiziert werden, die einen guten

therapeutischen Ansatzpunkt erlauben (Vihinen et al., 2005). Egeblad und Werb erklären die bisher enttäuschten Hoffnungen der klinischen Studien damit, dass bisher größtenteils Tumoren in späten Stadien mit MMPs behandelt wurden, da man davon ausging, dass MMPs durch die Beeinflussung der Extrazellulärmatrix vor allem bei der Invasion und Metastasierung eine Rolle spielen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass MMPs auch Wachstumsfaktoren freisetzen und ihre Substrate unter anderem Rezeptortyrosinkinasen und Zelladhäsionsmoleküle darstellen, die in frühen Tumorstadien eine Rolle spielen. Die Autoren empfehlen daher den Einsatz von MMPs in der Behandlung früher Stadien oder als Adjuvant vor oder nach einer Operation um die Bildung neuer Mikrometastasen zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem späte Tumorstadien untersucht (siehe Tabelle 3). Es fehlt der Vergleich zur Expression in frühen Tumorstadien. Weitere Genexpressionsanalysen beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom sind erforderlich, um die erhöhte Expression von MMP1 im Vergleich zum normalen Lungengewebe zu bestätigen. Man sollte prüfen, ob die Hochregulation auch in frühen Tumorstadien nachweisbar ist und welche Funktion MMP1 bei der Entstehung des Lungenkarzinoms innehat.

Während einige MMPs, wie MMP7, von Krebszellen exprimiert werden, werden andere MMPs, z.B. MMP2 und MMP9, von Tumorstromazellen, wie Fibroblasten, Myofibroblasten, Entzündungs- und Endothelzellen synthetisiert (Egeblad and Werb, 2002). Daher könnten verschiedene Gewebe je nach vorherrschendem Zelltyp verschiedene MMPs exprimieren. Falls sich MMP1 in Studien, die die Gewebeverteilung von MMPs beforschen, als lungenkarzinomspezifische Matrixmetalloproteinase herausstellt, könnte es Substrat für eine gerichtete Therapie, eine so genannte *targeted therapy*, sein. Bisher lassen sich in der Literatur jedoch noch keine solchen MMP-Gewebeverteilungsstudien finden.

### 5.5.2.4 Serinprotease-Inhibitoren (SERPINE)

Serinprotease-Inhibitoren, auch als Serpine bezeichnet, sind hoch homolog auf der Nukleotidebene und kodieren für zu 92% identische Proteine (Kuwano et al., 1995).

In der Literatur findet man Hinweise auf immunsuppressive und wachstumshemmende Eigenschaften von Serpinen. So gibt es Beweise dafür, dass ein Vertreter der Serpine, das *ovine uterine serpin*, im Uterus die immunsuppressiven Effekte von Progesteron vermittelt und vor einer immunologischen Abstoßung des Fetus schützt (Peltier and Hansen, 2001).

In einer Untersuchung von Tekin et al. inhibierte *ovine uterine serpin* das Wachstum zweier Tumorzelllinien (D17, eine Osteosarkom-Zelllinie des Hundes und PC-3, eine Prostatakarzinom-Zelllinie), wohingegen das Wachstum zweier Nicht-Tumorzelllinien nicht gehemmt wurde. Der Mechanismus der Hemmung ist jedoch nicht bekannt (Tekin et al., 2005).

Neben wachstumsinhibierenden Funktionen von Serpinen findet man jedoch auch Hinweise auf die Förderung von Tumorwachstum, zum Beispiel durch eine Hemmung der Apoptose in Tumorzellen (Suminami et al., 2000). Die Rolle der Serpine in Tumoren ist also sehr komplex.

### **5.5.2.4.1 Das hochregulierte SERPIN5B / MASPIN fungiert als Tumorsuppressorgen**

Maspin, auch als SERPINB5 bezeichnet, war in 100 % der hier untersuchten Plattenepithelkarzinome und zu einem kleineren Teil (62.5 %) in Adenokarzinomen hochreguliert (siehe Abbildung 23).

Heighway et al, die cDNA Analysen durchführten, fanden Maspin in der Mehrheit der untersuchten NSCLCs überrepräsentiert (Heighway et al., 2002). Eine Folgeuntersuchung dieser Arbeitsgruppe (Smith et al., 2003) validierte an einem neuen Set von NSCLCs mit Hilfe von PCR, Immunhistochemie und unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers die Hochregulation dieses Gens bzw. des Proteins im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom und insbesondere im Plattenepithelkarzinom. Der Gruppe war es möglich zu zeigen, dass sich das Proteinprodukt von Maspin vor allem in atypischen Zellen präneoplastischer Läsionen nachweisen läßt, in nichtneoplastischem Lungengewebe fand sich das Gen nicht. Eine Ausnahme bildeten nur die multipotenten Basalepithelzellen, in welchen man eine starke Anreicherung des Proteinproduktes fand.

Maspin wird als Tumorsuppressorgen angesehen, wenn auch die genaue Funktion bisher nicht bekannt ist. Es wird angenommen, dass die Maspinexpression direkt von p53 induziert werden kann (Zou et al., 2000). Die Überexpression von Maspin in Tumoren wurde mit einer verringerten Zellwanderungsfähigkeit und somit einer geringeren Invasions- und Metastasierungstendenz in Verbindung gebracht (Bass et al., 2002).

Sager et al. fanden Maspin im Mammakarzinom herunterreguliert (Sager et al., 1997).

Einige Studien zeigten jedoch eine Korrelation einer Hochregulation von Maspin in malignem Brustdrüsengewebe und im Ovarkarzinom mit einer schlechteren Prognose (Sood et al., 2002; Umekita et al., 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Überexpression von Maspin in NSCLCs korreliert mit der Arbeit von Heighway et al. Die durch Bass et al. beschriebene verringerte Invasions- und Metastasierungstendenz von Maspin überexprimierenden Tumorzellen scheinen ebenso wie die diskutierte Funktion als Tumorsuppressoren widersprüchlich zu dem hier gefundenen Ergebnis. Die Arbeiten von Sood und Umekita dahingegen, die in Mamma- und Ovarkarzinom eine Assoziation von Maspin Überexpression und schlechterer Prognose fanden, lassen dahingegen eine Überexpression auch im Lungenkarzinom vermuten.

### **5.5.2.4.2 Die hochregulierten *squamous cell carcinoma antigens* sind Zeichen einer verminderten Apoptose sowie einer geschwächten Immunantwort**

Das *squamous cell carcinoma antigen 1* (SCCA1 / SERPINB3) sowie das *squamous cell carcinoma antigen 2* (SCCA2 / SERPINB4) gehören ebenfalls zur Gruppe der Serpine. In dieser Arbeit waren SCCA1 und SCCA2 im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom deutlich überexprimiert (siehe Abbildungen 24 und 25). Auch die Forschungsgruppen um Heighway et al., 2002 und Smith, et al., 2003 fanden SCCA1 und SCCA2 im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom deutlich überexprimiert (Heighway et al., 2002; Smith et al., 2003).

SCCA1 inhibiert Papain-ähnliche Cysteinproteasen, SCCA2 Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen (Silverman et al., 1998). SCCA wurde primär aus dem Gewebe der *Cervix uteri* isoliert (Kato and Torigoe, 1977). In weiteren Untersuchungen vor allem am Plattenepithel der *Cervix uteri* fand man, dass sie eine Rolle bei der Zelldifferenzierung in normalen wie maligne veränderten Plattenepithelzellen spielen (Hoshina et al., 1986; Michioka et al., 1994). Serumspiegel von SCCAs werden klinisch für die Diagnose und das Management des Zervixkarzinoms und Tumoren anderer Organe verwendet (Brioschi et al., 1991; Kato et al., 1983; Kato et al., 1982; Maruo et al., 1985). Mino et al. beschrieben SCC als Marker von Plattenepithelkarzinom der Lunge (Mino et al., 1988).

Die Verhinderung der Apoptose in Krebszellen trägt deutlich zur Tumorprogression bei. Dabei spielen viele physiologische Inhibitoren der Apoptose, zum Beispiel bcl-2, eine Rolle. Auch SCCA1 spielt eine Rolle bei der Hemmung der Apoptose in Tumorzellen (Suminami et al., 2000).

Suminami et al. impften Mäuse mit einem *antisense*-SCCA-mRNA exprimierenden Retrovirus. Die Mäuse zeigten ein supprimiertes Tumorwachstum durch vermehrte Apoptose. Wenn sich diese Ergebnisse und die in der vorliegenden Arbeit gefundene Hochregulation von SCCAs in NSCLCs durch weitere Untersuchungen bestätigen, könnte

die Behandlung mit antisense-SCCA in Zukunft eine neue NSCLC Therapie darstellen. Suminami et al. fanden außerdem in einer *in vitro* Untersuchung, dass SCCA1 die Migration von natürlichen Killerzellen verhindert (Suminami et al., 2001). Demnach könnte ein hoher Serumspiegel von SCCA für eine geschwächte Immunfunktion sprechen, welche zum „escape“ des Tumors beiträgt. Ein erhöhter Serumspiegel in frühen Tumorstadien könnte so unabhängig von Tumorgröße und Lymphknotenmetastasierung einen Marker für eine schlechte Prognose darstellen. Dies ist für frühe Stadien des Zervixkarzinoms erwiesen (Duk et al., 1996), für das Lungenkarzinom existieren noch keine Studien.

### **5.5.2.5 Der hochregulierte Proteinregulator der Zytokinese 1 (PRC1) verursacht eine vermehrte Zellteilung im Lungenkarzinom**

Die Transkriptionsvariante 1 dieses Gens, die sich in ACs als auch SCCs überexprimiert fand, kodiert für ein Protein, welches eine Rolle bei der Zytokinese spielt (siehe Abbildung 26).

Während der S und G2/M Phase der Mitose finden sich hohe Spiegel dieses Proteins, welche nach Übergang in die G1 Phase fallen.

PRC1 ist im Zellkern lokalisiert, assoziiert während der Mitose mit den mitotischen Spindeln und ist für die Bewegung in Richtung Zellmitte während der Zytokinese verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass dieses Protein ein Substrat einiger zyklin-abhängiger Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) ist.

Die Aktivität von PRC1 wird von p53 beeinflusst. Li et al. zeigten in cDNA Mikroarray-Analysen, dass die Menge an mRNA von PRC1 signifikant sank, wenn die p53 Aktivität gesteigert wurde. Sie konnten demonstrieren, dass p53 direkt die Transkription von PRC1 unterdrückt. Darüber hinaus zeigten sie, dass eine niedrigere PRC1-Expression mit einer Hemmung der Zellteilung einhergeht. Über die Kontrolle der Transkription von PRC1 hat der Tumorsuppressor p53 eine bedeutende Rolle in der Regulierung der Zytokinese (Li et al., 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Überexpression von PRC1 läßt sich gut mit diesen Forschungsergebnissen vereinbaren, da p53 in Lungenkarzinomen bekanntermaßen herunterreguliert ist (Nishio et al., 1996).

In Literaturdatenbanken ist bisher keine Arbeit zu finden, die die Genexpression von PRC1 in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen untersuchte, daher scheint die vorliegende Arbeit der erste Hinweis auf eine Hochregulation von PRC1 in NSCLCs zu sein.

### **5.5.2.6 Proteine der Zell-Zell-Interaktion**

Proteine der Zell-Zell-Interaktion sind bei vielen biologischen Prozessen beteiligt. Bei der Karzinogenese und Metastasierung haben sie einen besonders hohen Stellenwert. Um eine Metastase zu bilden, müssen Tumorzellen eine Reihe komplex regulierter Prozesse durchlaufen. Hierzu zählen lokale Invasion, Intravasation, Zirkulation, Adhäsion und Extravasation im Zielorgan, Überleben, Proliferation und Angiogenese (Charalabopoulos et al., 2004). Dabei sind die Tumorzelladhäsion und Migration, vermittelt durch Proteine der Zell-Zell-Interaktion ausschlaggebend für die organspezifische Metastasierung. Die neben den Selectinen und der Ig-Superfamilie vielleicht interessantesten Adhäsionsmoleküle sind die der Familie der Cadherine. Cadherine sind kalziumabhängige Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, die mit intrazellulären Proteinen, den Cateninen, interagieren (Charalabopoulos et al., 2004). Bei der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression zweier Mitglieder von Subfamilien der Cadherine gemessen: Desmoglein 3 und Desmocollin 3. Beide fanden sich im Vergleich zum Normalgewebe im Tumor hochreguliert (siehe Abbildung 28 und 29).

#### **5.5.2.6.1 Hochreguliertes Desmoglein 3 (DSG3) und Desmocollin 3 (DSC3) als Zeichen einer gesteigerten Metastasierungsfähigkeit**

Desmosomen sind Zell-Zell Bindungselemente zwischen epithelialen, myokardialen und bestimmten anderen Zelltypen. Desmoglein 3 ist eine kalzium-bindende transmembranäre Glykoproteinkomponente der Desmosomen in epithelialen Zellen von Wirbeltieren. Bis heute wurden drei Mitglieder der Desmoglein Subfamilie identifiziert. Alle gehören der Superfamilie der Cadherin-Zelladhäsionsmoleküle an.

Desmoglein ähnelt hinsichtlich seiner Sequenz und Struktur besonders dem E-Cadherin, das als Transmembranprotein in Gürteldesmosomen vorkommt. Man entdeckte es erstmals bei Patienten mit einer seltenen Autoimmunkrankheit, dem *Pemphigus vulgaris*. Es wird deshalb auch als *Pemphigus vulgaris Antigen*, PVA, bezeichnet (Lodish et al., 2001). Bisher lassen sich in der Literatur keine Arbeiten finden, die die Expression von Desmoglein im Lungenkarzinom oder anderen Tumoren untersuchten. Die in den hier untersuchten Tumorproben gefundene Hochregulation der mRNA Expression könnte jedoch für eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit an andere Organe und damit einer höheren

Metastasierungsfähigkeit der in fortgeschritteneren Stadien befindlichen nichtkleinzelligen Lungenkarzinome sprechen.

Desmocollin ist ein calciumabhängiges Glykoprotein und ein Mitglied der Desmocollin Subfamilie der Cadherin Superfamilie.

Zusammen mit den Desmogleinen werden sie vor allem in Epithelzellen gefunden, wo sie als adhäsive Proteine die desmosomale Zell-Zell-Bindung ausmachen und für Zelladhäsion und Formation der Desmosomen fungieren. Die faserartigen Transmembranproteine Desmocollin und Desmoglein ragen in den Raum zwischen den Zellen und bilden dort mit den Fasern der anderen Zellen ein die beiden Zellen verbindendes, verschlungenes Netzwerk. Die Datenlage zur Expression von Desmocollin in Tumorgeweben ist genauso wenig zufriedenstellend wie die von Desmoglein. Man kann vermuten, dass die Expression der eng zusammenarbeitenden Proteine parallel gesteuert ist und dass eine erhöhte Expression mit einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit und somit einer schlechteren Prognose einhergeht.

Hier wurden vor allem späten Tumorstadien untersucht. Sollte auch in frühen Tumorstadien eine Überexpression dieser Gene mit einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit einhergehen, könnte die Genexpressionsanalyse von Tumorresektaten den Entscheid für oder gegen eine adjuvante Therapie erleichtern.

### **5.5.2.6.2 Hochreguliertes *Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5* (CEACAM5) als potentieller Prognosemarker**

CEACAM5 ist ebenfalls ein Protein, welches bei der Zell-Zell-Adhäsion eine Rolle spielt.

Wir fanden die Expression dieses Gens gegenüber dem Mittel der Expressionwerte der normalen Gewebeprobe in SCCs wie auch ACs überexprimiert (siehe Abbildung 27).

In der Literatur sind keine Untersuchungen zur Genexpression von CEACAM5 in Lungenkarzinomen zu finden. Vielmehr finden sich Untersuchungen im Kolonkarzinom. Dabei implantierten Baczynska D et al. verschiedene Kolonkarzinomzellen subcutan in Nacktmäuse. Einer Reihe von Mäusen wurden Zellen mit einer hohen Expression von CEACAM5 implantiert, einer anderen wurden Kolonkarzinomzellen implantiert, die wenig CEACAM5 exprimierten. Da sich in letzterer Versuchsreihe eine viel geringere Wachstumsrate fand, argumentierten die Autoren, dass eine Höherexpression von CEACAM5 das Wachstum von Tumoren beschleunigt (Baczynska et al., 2003).

Sienel et al. untersuchten ein anderes Mitglied dieser Familie, CEACAM1, im Lungenkarzinom. Um herauszufinden, ob das Vorhandensein von CEACAM1 mit dem

Langzeitüberleben korreliert, maß diese Arbeitsgruppe die Expression von CEACAM1 in 145 nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen mittels Immunhistochemie (Sienel et al., 2003). Das normale in den Resektaten vorhandene Epithel zeigte keine Anfärbung mit anti-CEACAM-1 Antikörper, während die Tumorzellen eine Anfärbung zeigten. Dabei war die CEACAM-1 Expression in ACs höher als in SCCs. Die *multivariate Cox regression* Analyse zeigte, dass eine Expression von CEACAM-1 mit einem schlechten Überleben einhergeht ( $p = 0.018$ ).

Veronesi et al. untersuchten CEA, also das carcinoembryonic antigen selbst, in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (Veronesi et al., 2005). Das carcinoembryonale Antigen (CEA) ist ein Membranglykoprotein, das in hohen Spiegeln im Serum von Feten und im Serum von Patienten mit Tumorerkrankungen gemessen werden kann. Es ist bekannt, dass ein hoher Serumspiegel von CEA einen negativen prognostischen Faktor beim NSCLC darstellt (Sadoff, 1998). Da jedoch nur wenige Patienten mit frühen Tumorstadien einen hohen Serumspiegel an CEA haben, maßen Veronesi et al. nicht nur den präoperativen Serumspiegel von CEA, sondern mit Hilfe von Immunassays auch den CEA-Gehalt im resezierten Tumorgewebe von Patienten mit NSCLC (69 ACs, 55 SCCs, 22 andere NSCLCs ohne neoadjuvante Therapie) im Stadium 1 und 2. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit CEA-positiven Plattenepithelkarzinomen ein um 30% besseres 3-Jahresüberleben zeigten, wohingegen sich im Adenokarzinom keine Korrelation von CEA-Positivität und Überleben fand. Die auf den ersten Blick paradoxe Beobachtung, dass der gleiche Tumormarker mit einer schlechten Prognose verbunden ist, wenn hohe Serumspiegel gemessen werden, jedoch mit einer guten Prognose assoziiert ist, wenn er sich im Tumorgewebe selbst in hoher Konzentration befindet, läßt sich anhand der Funktion dieses Proteins erklären: die Überexpression dieses Adhäsionsmoleküls im Gewebe und damit die verstärkte Kohäsion von Zellen könnte vor Metastasierung und Progression schützen. Hohe Serumspiegel dahingegen könnten auftreten, wenn CEA-Protein im Rahmen von einem Verlust seiner interzellulären Kohäsionskapazität freigesetzt wird und damit das Risiko von Metastasenbildung erhöht ist. Die Autoren diskutierten, dass es daher nützlich sein könnte, alle Tumorresektate auf CEA-Positivität zu untersuchen um diejenigen Patienten benennen zu können, die eventuell von einer adjuvanten Therapie profitieren (Veronesi et al., 2005).

Faßt man die Ergebnisse von Baczynska et al., Sienel et al. und Veronesi et al. zusammen, läßt sich erkennen, dass eine im Tumorgewebe gemessene Hochregulation von CEA-Protein selbst, nicht jedoch seiner verwandten Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und CEACAM5 mit einer besseren Prognose einhergeht.

Man kann mutmaßen, dass CEACAM5 eine ähnliche Funktion wie CEACAM1 einnimmt, so dass die hier im Vergleich zum Normalgewebe erhöht gemessene mRNA Expression in Lungenkarzinomen mit einer schlechteren Prognose einhergehen könnte. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

### **5.5.2.7 Der hochregulierte *death receptor 6* (TNFRSF21, DR6) trägt zu einer gestörten Apoptose bei**

In der vorliegenden Arbeit fand sich DR6 im Vergleich zum Normalgewebe in den NSCLC Tumorproben hochreguliert.

Innerhalb der Tumornekrosefaktor Rezeptoren 1 (TNFR1) Superfamilie wurde eine Untergruppe beschrieben, welche eine zytoplasmatische *death* Domäne enthalten, und welche als *death receptors* klassifiziert werden. Dazu gehören neben DR6 die Rezeptoren DR4, DR5 und FAS. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren durch spezifische Liganden wie zum Beispiel TRAIL oder FASL führt zu einer Einschaltung verschiedener Komponenten des *cell death pathways*, einschließlich des Adaptormoleküls TRADD und nachfolgend des FADD-caspase-8 (CASP8) Signalwegs. In der Folge wird der apoptose-induzierende, nukleare Faktor kappa-B (NFKB) Signalweg aktiviert.

In einer Studie, in der menschliche nichtkleinzellige Lungenkarzinom-Zelllinien mit Celecoxib behandelt wurden, fand man eine Induktion der *death receptors*, vor allem von DR5, durch Celecoxib und ein vermindertes Zellüberleben durch aktivierte Apoptose (Liu et al., 2004).

Die Funktion von *death receptors* als Induktoren der Apoptose ist weithin akzeptiert. Darüber hinaus gibt es zunehmende Hinweise darauf, dass diese Rezeptoren auch zahlreiche Funktionen ausüben, die nicht mit der Apoptose zu tun haben (Wajant, 2003). Die Gruppe um Shivapurkar untersuchte die Expression von Komponenten des death Signalwegs (death-inducing signaling complex, DISC) in SCLC und NSCLC Zelllinien im Zusammenhang mit der Myc-Expression (Shivapurkar et al., 2002a).

Teitz et al. fanden in Neuroblastomen, in denen eine Amplifikation von N-Myc vorliegt, eine Inaktivierung von CASP8 durch Promotormethylierung (Teitz et al., 2000) und Shivapurkar et al. beschrieben in einer früheren Arbeit die Inaktivierung von CASP8 in Lungenkarzinomen (Shivapurkar et al., 2002b). Wie in dieser Arbeit schon in der Einleitung beschrieben, findet sich eine abnormale Myc Expression häufig in SCLCs und weniger häufig in NSCLCs (Zochbauer-Muller et al., 2002).

Von den 34 von Shivapurkar et al. untersuchten SCLC Zelllinien waren 12 Myc positive. Die CASP8 Genexpression war in 79% aller SCLCs verloren, nicht jedoch in den untersuchten 22 NSCLC Zelllinien. Myc Amplifikation war in 45 % aller CASP8 negativen SCLC Zelllinien präsent, nicht jedoch in den CASP8 positiven Zelllinien. Die Verlustfrequenz von CASP8 war in Myc-positiven SCLC verglichen mit Myc-negativen SCLC oder NSCLC signifikant höher. Analysen anderer DISC Komponenten zeigten einen höheren Verlust von CASP10, DR5, FAS und FASL in SCLC verglichen mit NSCLC. Der Verlust von proapoptotischen DISC Komponenten (wie CASP8, CASP10, DR5 und Fas) war in Myc-positiven SCLC Zelllinien signifikant höher und diese Zelllinien waren resistent gegenüber dem *cell death pathway* induzierenden Liganden TRAIL (Shivapurkar et al., 2002a). Die Autoren schlußfolgerten, dass der *death receptor pathway* im Lungenkarzinom an verschiedenen Punkten inaktiviert wird und dass Myc Amplifikation in SCLC mit der Inaktivierung vieler Komponenten des DISC Komplexes assoziiert ist.

In dieser Arbeit wurden nur NSCLC untersucht. Wir fanden DR6 in 7 von 8 untersuchten Adenokarzinomen und in 5 von 7 Plattenepithelkarzinomen hochreguliert (siehe Abbildung 30). Bislang wurde TNFRSF21 in der Literatur noch nicht mit Lungenkarzinomen assoziiert. Wenn man davon ausgeht, dass DR6 eine ähnliche Funktion wie DR5 besitzt und in NSCLCs ähnliche Veränderungen im *death receptor pathway* wie im SCLC vorliegen, kann man spekulieren, dass die gefundene Hochregulation von DR6 einer negativen Feedback Regulation bei Verlust von anderen DISC Komponenten darstellt. Außerdem ist es möglich, dass Tumorzellen DR6 überexprimieren um andere Apoptosesignale zu überwinden oder dass eine Überexpression auf mRNA Ebene-zum Beispiel durch einen Fehler in der Translation-mit einer Herunterregulation auf Proteinebene einhergeht. Unterschiedliche Genexpressionsmuster in NSCLCs und SCLCs wie die von Shivapurkar gefundene wären für die klinische Anwendung von großer Bedeutung. Weitergehende Untersuchungen über die Veränderungen des *death receptor pathways* und dessen Liganden in Lungenkarzinomen sind wünschenswert. Gerade in Signalwegen, die zur Apoptose führen, sollten neue therapeutische Ansätze gesucht werden. So ist zum Beispiel TRAIL, ein Ligand der *death* Rezeptoren, ein seltenes Beispiel für ein Molekül, welches viele Krebszellen spezifisch abtötet (Ashkenazi and Dixit, 1998) und daher als neues Therapeutikum vorgeschlagen wurde. Shivapurkar et al. konnten eine Inaktivierung von Komponenten des DISC Komplexes mit einer Resistenz von Lungenkarzinom Zelllinien gegenüber einer Behandlung mit TRAIL assoziieren (Shivapurkar et al., 2002a).

### **5.5.2.8 Hochregulierte Peptidylprolyl Isomerase F (PPIF /CYP3) ist Teil einer gesteigerten Immuntätigkeit**

Wir fanden PPIF in den untersuchten Tumorproben im Vergleich zum normalen Lungengewebe als überexprimiert (siehe Abbildung 31).

Peptidyl-Prolyl-Isomerasen oder Cyclophiline sind *Chaperone* (Ammenproteine), welche die Faltung von Proteinen erleichtern. Sie stellen eine Enzymfamilie dar, die die Rotation von Peptidyl-Prolyl Bindungen in entfalteten Abschnitten eines Polypeptids beschleunigen und so die cis-trans Isomerisierung bestimmter Prolin-Imidin-Peptidbindungen in Oligopeptiden katalysieren. Solche Isomerisierungen sind oft der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Faltung von Proteindomänen. Die meisten Peptidyl-Prolyl-Isomerasen katalysieren die Rotation jeder exponierten Peptidyl-Prolyl-Bindung, während andere spezifische Substrate besitzen. Cyclophiline sind während der Evolution hoch konservierte Proteine und konnten in bisher in jedem lebenden Organismus nachgewiesen werden (Andreeva et al., 1999). Dies spricht für eine große Bedeutung dieser Proteine.

Peptidylprolyl Isomerasen spielen eine Rolle bei der Regulation der Transkription (Shaw, 2002). Cyclophiline sind auch bei der Immunantwort gegenüber Tumoren beteiligt. So untersuchten Gohara et al. in einer klinischen Phase I Studie, ob in Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom eine Impfung mit Cyclophilin B eine Stimulation der zellulären Immunantwort hervorruft (Gohara et al., 2002). Auch wenn dies in dieser Studie nicht gezeigt werden konnte, ist dieser Ansatz vielversprechend und interessant.

Cyclophiline sind ebenfalls als Prognosemarker diskutiert worden. So untersuchten Howard BA et al. 234 nichtkleinzellige Lungenkarzinome mittels Immunhistochemie auf Cyclophilin A und korrelierten die Ergebnisse mit dem Langzeitüberleben (Howard et al., 2004). Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Überexpression dieses Proteins mit dem Überleben hergestellt werden. Ebenfalls ist bekannt, dass Cyclophiline in Stresssituationen überexprimiert werden (Andreeva et al., 1999).

Zur spezifischen Funktion von PPIF ließ sich in der durchgesehenen Literatur kein Anhalt finden. Ein Zusammenhang der PPIF Expression mit dem Lungenkarzinom ist bisher nicht beschrieben. Nimmt man jedoch an, dass PPIF eine ähnliche Funktion innehat wie andere Mitglieder der Cyclophilin Familie, kann man vermuten, dass eine Hochregulation von PPIF in Lungenkarzinomen eine Stresssituation des Körpers widerspiegelt und Zeichen einer Stimulation des Immunsystems ist.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Genexpressionen beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom im Vergleich zu gesundem Lungengewebe mittels Oligonukleotid-Mikroarrays untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass selbst kleine Gewebeproben von bis zu nur 2.5 mg für die Gewinnung von qualitativ guter RNA in ausreichender Quantität genutzt werden können. Somit wird auch bei kleinen Tumorproben der Einsatz von *GeneChips*<sup>®</sup> zur molekularbiologischen Diagnostik ermöglicht.

Vor dem Einsatz eines solchen Verfahrens in der Klinik müssen jedoch Markergene gefunden werden, deren Expressionsmessungen Konsequenzen für Diagnostik und Therapie des Lungenkarzinoms haben. Bis dato gibt es beim Lungenkarzinom nur Hinweise für solche Markergene, und die vorliegende Untersuchung hat versucht, bekannte Markergene zu bestätigen und neue aufzuzeigen.

Durch den Einsatz von Oligonukleotid-Mikroarrays konnten 614 differentiell exprimierte Gene bei pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zum gesunden Gewebe gemessen werden.

Um die erhaltenen Daten zu vergleichen, wurde auf Genexpressionsanalysen aus der Literatur zurückgegriffen. Da Heighway et al. mit cDNA Mikroarrays, und somit einer anderen Methode als der in der vorliegenden Arbeit verwendeten arbeiteten, war diese Arbeitsgruppe für einen Vergleich mit den hier gefundenen Genexpressionen besonders geeignet. Am Beispiel von Osteopontin und Keratin 19 wurde aufgezeigt, dass sich die Expressionsveränderungen auch mit der von Heighway et al. verwendeten Methode fanden (Heighway et al., 2002).

Von den in der vorliegenden Arbeit in pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen als differentiell exprimiert gefundenen Genen sind folgende besonders vielversprechend: Gene, die Anhaltspunkte zur Erklärung der fehlregulierten Immunantwort bei Vorliegen eines Lungenkarzinoms liefern (SFTPD, SFTPB, GPR 105, SCCA1, SCCA2, PPIF), Gene, die auf eine geänderte Prostaglandinproduktion in Tumoren hinweisen (PDS), Gene, die einen Einfluß auf die Zytokinese in Tumorzellen zu haben scheinen (SPRR1B, PRC1) und Gene, die Ausdruck der verminderten Apoptose in Lungenkarzinomen sind (S100A2, SCCA1, SCCA2, DR6). Desweiteren wurden Prognosemarker (CEACAM5), Gene, die eine gesteigerte Metastasierungsfähigkeit widerspiegeln (DSG3, DSC3) sowie ein

Tumorsuppressorgen (MASPIN) identifiziert und möglicherweise ein lungenkarzinomspezifischer Vertreter der Matrixmetalloproteinasen (MMP1) gefunden. SPRR1B, S100A2, MMP1, SCCA1, SCCA2, PRC1 und DR6 erscheinen als mögliche Ziele einer sogenannten *targeted therapy*.

Um vielversprechende „Kandidatengene“ weiterzuentwickeln, ist zunächst die Verifizierung der hier gefundenen Daten auf RNA-Ebene mit unabhängigen Methoden wie zum Beispiel der rt-PCR notwendig. Hohe Expressionen auf mRNA-Ebene lassen nicht automatisch auf hohe Proteinkonzentrationen schließen. Daher sind auch Untersuchungen auf Protein-Ebene, zum Beispiel mittels Immunhistochemie, unabdingbar.

Neben der Gewinnung neuer Kandidaten für eine *targeted therapy* machen die hier erzeugten Genexpressionsdaten zusammen mit den klinischen Daten viele zusätzliche Analysen möglich, zum Beispiel Klassifizierungsalgorithmen für die Unterscheidung von NSCLC Untertypen. Unter Einbeziehung weiterer Tumorproben, vor allem früher Tumorstadien, könnten Gensignaturen erstellt werden, die Prognose und Therapieansprechen eines bestimmten Lungenkarzinomtyps vorhersagen.

Im Zeitalter der zunehmenden molekularbiologischen Charakterisierung maligner Tumore versteht sich die vorliegende Arbeit als weiterer Mosaikstein auf dem Weg zu einer spezifischeren Therapie und als kleiner Beitrag zur großen Hoffnung auf eine Heilung der Erkrankung Krebs.

- Abbracchio, M.P., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M.T., King, B.F., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A. and Burnstock, G. (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci*, **24**, 52-55.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O. and Staudt, L.M. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, **403**, 503-511.
- Allison, D.B., Cui, X., Page, G.P. and Sabripour, M. (2006) Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Gen*, **7**, 55-65.
- Alon, U., Barkai, N., Notterman, D.A., Gish, K., Ybarra, S., Mack, D. and Levine, A.J. (1999) Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *PNAS*, **96**, 6745-6750.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- An, G., Huang, T.H., Tesfaigzi, J., Garcia-Heras, J., Ledbetter, D.H., Carlson, D.M. and Wu, R. (1992) An unusual expression of a squamous cell marker, small proline-rich protein gene, in tracheobronchial epithelium: differential regulation and gene mapping. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **7**, 104-111.
- Anderson, W.F., Umar, A. and Hawk, E.T. (2003) Cyclooxygenase inhibition in cancer prevention and treatment. *Expert Opin Pharmacother*, **4**, 2193-2204.
- Ando, M., Murakami, Y., Kojima, F., Endo, H., Kitasato, H., Hashimoto, A., Kobayashi, H., Majima, M., Inoue, M., Kondo, H., Kawai, S. and Hayashi, I. (2003) Retrovirally Introduced Prostaglandin D<sub>2</sub> Synthase Suppresses Lung Injury Induced by Bleomycin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **28**, 582-591.
- Andreeva, L., Heads, R. and Green, C.J. (1999) Cyclophilins and their possible role in the stress response. *Int J Exp Pathol*, **80**, 305-315.
- Antoniades, H., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J. and O'Hara, C. (1992) Malignant Epithelial Cells in Primary Human Lung Carcinomas Coexpress in vivo Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) and PDGF Receptor mRNAs and Their Protein Products. *PNAS*, **89**, 3942-3946.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- Baczynska, D., Wietrzyk, J., Madej, J., Krop-Watorek, A., Dabrowska, A., Widerak, K., Opolski, A. and Ugorski, M. (2003) The tumorigenic potential of human CX-1 colon adenocarcinoma cells depends on carcinoembryonic antigen (CEACAM5) expression. *Cell Mol Biol Lett*, **8**, 471-486.
- Bangur, C.S., Switzer, A., Fan, L., Marton, M.J., Meyer, M.R. and Wang, T. (2002) Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene*, **21**, 3814-3825.
- Bass, R., Fernandez, A.-M.M. and Ellis, V. (2002) Maspin Inhibits Cell Migration in the Absence of Protease Inhibitory Activity. *J. Biol. Chem.*, **277**, 46845-46848.
- Beer, D.G., Kardia, S.L., Huang, C.C., Giordano, T.J., Levin, A.M., Misek, D.E., Lin, L., Chen, G., Gharib, T.G., Thomas, D.G., Lizyness, M.L., Kuick, R., Hayasaka, S., Taylor, J.M., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B. and Hanash, S. (2002) Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*, **8**, 816-824.

- Betsuyaku, T., Kuroki, Y., Nagai, K., Nasuhara, Y. and Nishimura, M. (2004) Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J*, **24**, 964-970.
- Bhattacharjee, A., Richards, W.G., Staunton, J., Li, C., Monti, S., Vasa, P., Ladd, C., Beheshti, J., Bueno, R., Gillette, M., Loda, M., Weber, G., Mark, E.J., Lander, E.S., Wong, W., Johnson, B.E., Golub, T.R., Sugarbaker, D.J. and Meyerson, M. (2001) Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13790-13795.
- Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., Hendrix, M., Radmacher, M., Simon, R., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Sampas, N., Dougherty, E., Wang, E., Marincola, F., Gooden, C., Lueders, J., Glatfelter, A., Pollock, P., Carpten, J., Gillanders, E., Leja, D., Dietrich, K., Beaudry, C., Berens, M., Alberts, D. and Sondak, V. (2000) Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, **406**, 536-540.
- Bonomi, P. (2002) Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in lung cancer. *Semin Oncol*, **29**, 78-86.
- Boyle, P. and Ferlay, J. (2005) Cancer incidence and mortality in Europe 2004. *Ann Oncol*, **16** (3), 481-488.
- Brazma, A. and Vilo, J. (2001) Gene expression data analysis. *Microbes Infect*, **3**, 823-829.
- Brioschi, P.A., Bischof, P., Delafosse, C. and Krauer, F. (1991) Squamous-cell carcinoma antigen (SCC-A) values related to clinical outcome of pre-invasive and invasive cervical carcinoma. *Int J Cancer*, **47**, 376-379.
- Butte, A. (2002) The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 951-960.
- Candi, E., Tarcsa, E., Idler, W.W., Kartasova, T., Marekov, L.N. and Steinert, P.M. (1999) Transglutaminase Cross-linking Properties of the Small Proline-rich 1 Family of Cornified Cell Envelope Proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 7226-7237.
- Cardona, C., Rabbitts, P.H., Spindel, E.R., Ghatei, M.A., Bleehen, N.M., Bloom, S.R. and Reeve, J.G. (1991) Production of neuromedin B and neuromedin B gene expression in human lung tumor cell lines. *Cancer Res*, **51**, 5205-5211.
- Causton, H., Quackenbusch, J. and Brazma, A. (2003) In *A Beginner's Guide. Microarray Gene Expression Data Analysis*. Blackwell Publishing.
- Chambers, J.K., Macdonald, L.E., Sarau, H.M., Ames, R.S., Freeman, K., Foley, J.J., Zhu, Y., McLaughlin, M.M., Murdock, P., McMillan, L., Trill, J., Swift, A., Aiyar, N., Taylor, P., Vawter, L., Naheed, S., Szekeres, P., Hervieu, G., Scott, C., Watson, J.M., Murphy, A.J., Duzic, E., Klein, C., Bergsma, D.J., Wilson, S. and Livi, G.P. (2000) A G Protein-coupled Receptor for UDP-glucose. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10767-10771.
- Charalabopoulos, K., Gogali, A., Kostoula, O.K. and Constantopoulos, S.H. (2004) Cadherin superfamily of adhesion molecules in primary lung cancer. *Exp Oncol*, **26**, 256-260.
- Charlton, M.E., Williams, A.S., Fogliano, M., Sweetnam, P.M. and Duman, R.S. (1997) The isolation and characterization of a novel G protein-coupled receptor regulated by immunologic challenge. *Brain Res*, **764**, 141-148.
- Chen, B.-S., Wang, M.-R., Cai, Y., Xu, X., Xu, Z.-X., Han, Y.-L. and Wu, M. (2000) Decreased expression of SPRR3 in Chinese human oesophageal cancer. *Carcinogenesis*, **21**, 2147-2150.
- Chen, H.L., Gabrilovich, D., Virmani, A., Ratnani, I., Girgis, K.R., Nadaf-Rahrov, S., Fernandez-Vina, M. and Carbone, D.P. (1996) Structural and functional analysis of beta2 microglobulin abnormalities in human lung and breast cancer. *Int J Cancer*, **67**, 756-763.

- Chen, J.J.W., Peck, K., Hong, T.-M., Yang, S.-C., Sher, Y.-P., Shih, J.-Y., Wu, R., Cheng, J.-L., Roffler, S.R., Wu, C.-W. and Yang, P.-C. (2001) Global Analysis of Gene Expression in Invasion by a Lung Cancer Model. *Cancer Res*, **61**, 5223-5230.
- Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N. and Golub, T.R. (2000) Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *PNAS*, **97**, 3260-3265.
- Creighton, C., Hanash, S. and Beer, D. (2003) Gene expression patterns define pathways correlated with loss of differentiation in lung adenocarcinomas. *FEBS Lett*, **540**, 167-170.
- Croce, C.M., Sozzi, G. and Huebner, K. (1999) Role of FHIT in Human Cancer. *J Clin Oncol*, **17**, 1618-.
- Damstrup, L., Rygaard, K., Spang-Thomsen, M. and Poulsen, H.S. (1992) Expression of the epidermal growth factor receptor in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res*, **52**, 3089-3093.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6025-6030.
- Difilippantonio, S., Chen, Y., Pietas, A., Schluns, K., Pacyna-Gengelbach, M., Deutschmann, N., Padilla-Nash, H.M., Ried, T. and Petersen, I. (2003) Gene expression profiles in human non-small and small-cell lung cancers. *Eur J Cancer*, **39**, 1936-1947.
- Dohmoto, K., Hojo, S., Fujita, J., Ueda, Y., Bandoh, S., Yamaji, Y., Ohtsuki, Y., Dobashi, N. and Takahara, J. (2000) Mechanisms of the release of CYFRA21-1 in human lung cancer cell lines. *Lung Cancer*, **30**, 55-63.
- DuBois, R.N. (2003) Evaluation of the Whole Prostaglandin Biosynthetic Pathway in Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, **9**, 1577-1578.
- Duk, J., Groenier, K., de Bruijn, H., Hollema, H., ten Hoor, K., van der Zee, A. and Aalders, J. (1996) Pretreatment serum squamous cell carcinoma antigen: a newly identified prognostic factor in early-stage cervical carcinoma. *J Clin Oncol*, **14**, 111-118.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 161-174.
- Elek, J., Park, K.H. and Narayanan, R. (2000) Microarray-based expression profiling in prostate tumors. *In Vivo*, **14**, 173-182.
- Ermert, L., Dierkes, C. and Ermert, M. (2003) Immunohistochemical Expression of Cyclooxygenase Isoenzymes and Downstream Enzymes in Human Lung Tumors. *Clin Cancer Res*, **9**, 1604-1610.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, **61**, 3225-3229.
- Fearnhead, N.S., Britton, M.P. and Bodmer, W.F. (2001) The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 721-733.
- Feng, G., Xu, X.-c., Youssef, E.M. and Lotan, R. (2001) Diminished Expression of S100A2, a Putative Tumor Suppressor, at Early Stage of Human Lung Carcinogenesis. *Cancer Res*, **61**, 7999-8004.
- Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, **285**, 1182-1186.
- Folkman, J. (1997) Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *Exs*, **79**, 1-8.
- Franz, C., Durussel, I., Cox, J.A., Schafer, B.W. and Heizmann, C.W. (1998) Binding of Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> to Human Nuclear S100A2 and Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18826-18834.

- Garber, M.E., Troyanskaya, O.G., Schluens, K., Petersen, S., Thaesler, Z., Pacyna-Gengelbach, M., van de Rijn, M., Rosen, G.D., Perou, C.M., Whyte, R.I., Altman, R.B., Brown, P.O., Botstein, D. and Petersen, I. (2001) Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *PNAS*, **98**, 13784-13789.
- Geradts, J., Fong, K.M., Zimmerman, P.V. and Minna, J.D. (2000) Loss of Fhit expression in non-small-cell lung cancer: correlation with molecular genetic abnormalities and clinicopathological features. *Br J Cancer*, **82**, 1191-1197.
- Gibbs, S., Fijneman, R., Wiegant, J., van Kessel, A.G., van De Putte, P. and Backendorf, C. (1993) Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins. *Genomics*, **16**, 630-637.
- Giordano, T.J., Shedden, K.A., Schwartz, D.R., Kuick, R., Taylor, J.M.G., Lee, N., Misek, D.E., Greenon, J.K., Kardia, S.L.R., Beer, D.G., Rennert, G., Cho, K.R., Gruber, S.B., Fearon, E.R. and Hanash, S. (2001) Organ-Specific Molecular Classification of Primary Lung, Colon, and Ovarian Adenocarcinomas Using Gene Expression Profiles. *Am J Pathol*, **159**, 1231-1238.
- Gohara, R., Imai, N., Rikimaru, T., Yamada, A., Hida, N., Ichiki, M., Kawamoto, M., Matsunaga, K., Ashihara, J., Yano, S., Tamura, M., Ohkouchi, S., Yamana, H., Oizumi, K. and Itoh, K. (2002) Phase 1 clinical study of cyclophilin B peptide vaccine for patients with lung cancer. *J Immunother*, **25**, 439-444.
- Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D. and Lander, E.S. (1999) Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *Science*, **286**, 531-537.
- Goodwin, L.O., Mason, J.M. and Hajdu, S.I. (2001) Gene expression patterns of paired bronchioloalveolar carcinoma and benign lung tissue. *Ann Clin Lab Sci*, **31**, 369-375.
- Gordon, G.J., Jensen, R.V., Hsiao, L.-L., Gullans, S.R., Blumenstock, J.E., Ramaswamy, S., Richards, W.G., Sugarbaker, D.J. and Bueno, R. (2002) Translation of Microarray Data into Clinically Relevant Cancer Diagnostic Tests Using Gene Expression Ratios in Lung Cancer and Mesothelioma. *Cancer Res*, **62**, 4963-4967.
- Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P. and Eisenman, R.N. (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 653-699.
- Gridelli, C., Maione, P., Airoma, G. and Rossi, A. (2002) Selective cyclooxygenase-2 inhibitors and non-small cell lung cancer. *Curr Med Chem*, **9**, 1851-1858.
- Griese, M. (1999) Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*, **13**, 1455-1476.
- Guo, Q.M., Malek, R.L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N.H., Dang, C.V. and Liu, E.T. (2000) Identification of c-Myc Responsive Genes Using Rat cDNA Microarray. *Cancer Res*, **60**, 5922-5928.
- Hainaut, P. and Vahakangas, K. (1997) p53 as a sensor of carcinogenic exposures: mechanisms of p53 protein induction and lessons from p53 gene mutations. *Pathol Biol (Paris)*, **45**, 833-844.
- Haruki, N., Saito, H., Tatematsu, Y., Konishi, H., Harano, T., Masuda, A., Osada, H., Fujii, Y. and Takahashi, T. (2000) Histological Type-selective, Tumor-predominant Expression of a Novel CHK1 Isoform and Infrequent in Vivo Somatic CHK2 Mutation in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*, **60**, 4689-4692.
- Harvey, P., Warn, A., Newman, P., Perry, L.J., Ball, R.Y. and Warn, R.M. (1996) Immunoreactivity for hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, met, in human lung carcinomas and malignant mesotheliomas. *J Pathol*, **180**, 389-394.
- Hecht, S.S. (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 733-744.

- Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Raffeld, M., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Dougherty, E., Kononen, J., Bubendorf, L., Fehrl, W., Pittaluga, S., Gruvberger, S., Loman, N., Johannsson, O., Olsson, H., Wilfond, B., Sauter, G., Kallioniemi, O.-P., Borg, A. and Trent, J. (2001) Gene-Expression Profiles in Hereditary Breast Cancer. *N Engl J Med*, **344**, 539-548.
- Heighway, J., Knapp, T., Boyce, L., Brennand, S., Field, J.K., Betticher, D.C., Ratschiller, D., Gugger, M., Donovan, M., Lasek, A. and Rickert, P. (2002) Expression profiling of primary non-small cell lung cancer for target identification. *Oncogene*, **21**, 7749-7763.
- Hellmann, G.M., Fields, W.R. and Doolittle, D.J. (2001) Gene Expression Profiling of Cultured Human Bronchial Epithelial and Lung Carcinoma Cells. *Toxicol. Sci.*, **61**, 154-163.
- Hermans, C. and Bernard, A. (1999) Lung Epithelium-specific Proteins . Characteristics and Potential Applications as Markers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **159**, 646-678.
- Hermeking, H. and Benzinger, A. (2006) 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol*, **16 (3)**: 183-92.
- Hibi, K., Liu, Q., Beaudry, G.A., Madden, S.L., Westra, W.H., Wehage, S.L., Yang, S.C., Heitmiller, R.F., Bertelsen, A.H., Sidransky, D. and Jen, J. (1998) Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **58**, 5690-5694.
- Hibi, K., Takahashi, T., Yamakawa, K., Ueda, R., Sekido, Y., Ariyoshi, Y., Suyama, M., Takagi, H. and Nakamura, Y. (1992) Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene*, **7**, 445-449.
- Honda, Y., Takahashi, H., Kuroki, Y., Akino, T. and Abe, S. (1996) Decreased contents of surfactant proteins A and D in BAL fluids of healthy smokers. *Chest*, **109**, 1006-1009.
- Hoshina, M., Kimura, A., Shibata, K., Maruo, T. and Mochizuki, M. (1986) Immunocytological distribution of the tumor antigen TA-4: expression during carcinogenesis and maturation of squamous epithelium of human uterine cervix. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol*, **12**, 119-126.
- Howard, B.A., Zheng, Z., Campa, M.J., Wang, M.Z., Sharma, A., Haura, E., Herndon, J.E., 2nd, Fitzgerald, M.C., Bepler, G. and Patz, E.F., Jr. (2004) Translating biomarkers into clinical practice: prognostic implications of cyclophilin A and macrophage migratory inhibitory factor identified from protein expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, **46**, 313-323.
- Huang, C.L., Yokomise, H., Fukushima, M., Kinoshita, M. (2006) Tailor-made chemotherapy for non-small cell lung cancer patients. *Future Oncol. Apr*; **2 (2)**, 289-99.
- Huber, R. and Schalhorn, A. (2003) Multimodale Therapie des Lungenkarzinoms. In *Tumoren der Lunge und des Mediastinums. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Tumorzentrum München und W.Zuckschwerdt Verlag GmbH, pp. 118-123.
- Jacot, W. and Bousquet, J. (2003) Understanding the regulation of surfactant gene expression. *Eur Respir J*, **22**, 6-7.
- Kaiser, U., Schilli, M., Haag, U., Neumann, K., Kreipe, H., Kogan, E. and Havemann, K. (1996) Expression of bcl-2--protein in small cell lung cancer. *Lung Cancer*, **15**, 31-40.
- Kartasova, T. and van de Putte, P. (1988) Isolation, characterization, and UV-stimulated expression of two families of genes encoding polypeptides of related structure in human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol*, **8**, 2195-2203.
- Kartasova, T., van Muijen, G.N., van Pelt-Heerschap, H. and van de Putte, P. (1988) Novel protein in human epidermal keratinocytes: regulation of expression during differentiation. *Mol Cell Biol*, **8**, 2204-2210.
- Kato, H., Morioka, H., Aramaki, S., Tamai, K. and Torigoe, T. (1983) Prognostic significance of the tumor antigen TA-4 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol*, **145**, 350-354.

- Kato, H., Morioka, H., Tsutsui, H., Aramaki, S. and Torigoe, T. (1982) Value of tumor-antigen (TA-4) of squamous cell carcinoma in predicting the extent of cervical cancer. *Cancer*, **50**, 1294-1296.
- Kato, H. and Torigoe, T. (1977) Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer*, **40**, 1621-1628.
- Kikuchi, T., Daigo, Y., Katagiri, T., Tsunoda, T., Okada, K., Kakiuchi, S., Zembutsu, H., Furukawa, Y., Kawamura, M., Kobayashi, K., Imai, K. and Nakamura, Y. (2003) Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene*, **22**, 2192-2205.
- Koizumi, H., Kartasova, T., Tanaka, H., Ohkawara, A. and Kuroki, T. (1996) Differentiation-associated localization of small proline-rich protein in normal and diseased human skin. *Br J Dermatol*, **134**, 686-692.
- Konishi, H., Nakagawa, T., Harano, T., Mizuno, K., Saito, H., Masuda, A., Matsuda, H., Osada, H. and Takahashi, T. (2002) Identification of Frequent G2 Checkpoint Impairment and a Homozygous Deletion of 14-3-3 {epsilon} at 17p13.3 in Small Cell Lung Cancers. *Cancer Res*, **62**, 271-276.
- Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A.L. and Gatter, K.C. (1996) Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer*, **73**, 148-153.
- Kuwano, A., Kondo, I., Kishi, F., Suminami, Y. and Kato, H. (1995) Assignment of the squamous cell carcinoma antigen locus (SCC) to 18q21 by in situ hybridization. *Genomics*, **30**, 626.
- Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.
- Latif, F., Tory, K., Modi, W.S., Graziano, S.L., Gamble, G., Douglas, J., Heppell-Parton, A.C., Rabbitts, P.H., Zbar, B. and Lerman, M.I. (1992) Molecular characterization of a large homozygous deletion in the small cell lung cancer cell line U2020: a strategy for cloning the putative tumor suppressor gene. *Genes Chromosomes Cancer*, **5**, 119-127.
- Lawson, P.R. and Reid, K.B. (2000) The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol Rev*, **173**, 66-78.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
- Li, C., Lin, M. and Liu, J. (2004) Identification of PRC1 as the p53 target gene uncovers a novel function of p53 in the regulation of cytokinesis. *Oncogene*, **23**, 9336-9347.
- Linhardt, R.J. and Toida, T. (2002) Capillary Electrophoresis: Ultra-High Resolution Separation Comes of Age. *Science*, **298**, 1441-1442.
- Liu, X., Yue, P., Zhou, Z., Khuri, F.R. and Sun, S.-Y. (2004) Death Receptor Regulation and Celecoxib-Induced Apoptosis in Human Lung Cancer Cells. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 1769-1780.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. and Brown, E.L. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, **14**, 1675-1680.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2001) *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer.
- Lynch, T.Jr. and Kim, E. (2005) Optimizing chemotherapy and targeted agent combinations in NSCLC. *Lung Cancer*. 2005 Dec; **50** Suppl 2:S25-32.
- Maruo, T., Shibata, K., Kimura, A., Hoshina, M. and Mochizuki, M. (1985) Tumor-associated antigen, TA-4, in the monitoring of the effects of therapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Serial determinations and tissue localization. *Cancer*, **56**, 302-308.

- Matsumura, H., Ito, A., Saitoh, H., Winter, P., Kahl, G., Reuter, M., Kruger, D.H. and Terauchi, R. (2005) SuperSAGE. *Cellular Microbiology*, **7**, 11-18.
- McDoniels-Silvers, A.L., Nimri, C.F., Stoner, G.D., Lubet, R.A. and You, M. (2002) Differential Gene Expression in Human Lung Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res*, **8**, 1127-1138.
- Michioka, T., Takeshima, N., Tsunaga, N., Suminami, Y., Nawata, S. and Kato, H. (1994) Expression of squamous cell carcinoma antigen, a serine protease inhibitor, in the integument of vertebrates. *Acta Histochem Cytochem*, **27**, 435-440.
- Mino, N., Iio, A. and Hamamoto, K. (1988) Availability of tumor-antigen 4 as a marker of squamous cell carcinoma of the lung and other organs. *Cancer*, **62**, 730-734.
- Mitsudomi, T., Hamajima, N., Ogawa, M. and Takahashi, T. (2000) Prognostic Significance of p53 Alterations in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Clin Cancer Res*, **6**, 4055-4063.
- Miura, K., Bowman, E.D., Simon, R., Peng, A.C., Robles, A.I., Jones, R.T., Katagiri, T., He, P., Mizukami, H., Charboneau, L., Kikuchi, T., Liotta, L.A., Nakamura, Y. and Harris, C.C. (2002) Laser Capture Microdissection and Microarray Expression Analysis of Lung Adenocarcinoma Reveals Tobacco Smoking- and Prognosis-related Molecular Profiles. *Cancer Res*, **62**, 3244-3250.
- Moran, C.J., Arenberg, D.A., Huang, C.-C., Giordano, T.J., Thomas, D.G., Misek, D.E., Chen, G., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S. and Beer, D.G. (2002) RANTES Expression Is a Predictor of Survival in Stage I Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, **8**, 3803-3812.
- Mountain, C. (1997) Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*, **111**, 1710-1717.
- Mountain, C.F. (1986) A new international staging system for lung cancer. *Chest*, **89**, 225S-233S.
- Mueller, A., Bachi, T., Hochli, M., Schafer, B.W. and Heizmann, C.W. (1999) Subcellular distribution of S100 proteins in tumor cells and their relocation in response to calcium activation. *Histochem Cell Biol*, **111**, 453-459.
- Muller-Hagen, G., Beinert, T. and Sommer, A. (2004) Aspects of lung cancer gene expression profiling. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **7**, 290-303.
- Myers, J. and Tazelaar, H. (2003) Pathology of lung malignancies. [www.uptodateonline.com/application/topic.asp?file=lung\\_ca](http://www.uptodateonline.com/application/topic.asp?file=lung_ca).
- Nacht, M., Dracheva, T., Gao, Y., Fujii, T., Chen, Y., Player, A., Akmaev, V., Cook, B., Dufault, M., Zhang, M., Zhang, W., Guo, M., Curran, J., Han, S., Sidransky, D., Buetow, K., Madden, S.L. and Jen, J. (2001) Molecular characteristics of non-small cell lung cancer. *PNAS*, **98**, 15203-15208.
- Nagatake, M., Osada, H., Kondo, M., Uchida, K., Nishio, M., Shimokata, K. and Takahashi, T. (1996) Aberrant hypermethylation at the bcl-2 locus at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res*, **56**, 1886-1891.
- Nakamura, H., Saji, H., Ogata, A., Hosaka, M., Hagiwara, M., Saijo, T., Kawasaki, N. and Kato, H. (2003) cDNA microarray analysis of gene expression in pathologic Stage IA nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer*, **97**, 2798-2805.
- Nishio, M., Koshikawa, T., Kuroishi, T., Suyama, M., Uchida, K., Takagi, Y., Washimi, O., Sugiura, T., Ariyoshi, Y., Takahashi, T. and Ueda, R. (1996) Prognostic significance of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol*, **14**, 497-502.
- Nomoto, S., Haruki, N., Takahashi, T., Masuda, A., Koshikawa, T., Fujii, Y. and Osada, H. (1999) Search for in vivo somatic mutations in the mitotic checkpoint gene, hMAD1, in human lung cancers. *Oncogene*, **18**, 7180-7183.

- O'Byrne, K.J., Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Cox, G., Turley, H., Steward, W.P., Gatter, K. and Harris, A.L. (2000) Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, **82**, 1427-1432.
- Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C., Pennacchietti, S., Nicotra, M.R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P.G., Comoglio, P.M. and Di Renzo, M.F. (1996) Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer*, **74**, 1862-1868.
- O'Regan, A. (2003) The role of osteopontin in lung disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, **14**, 479-488.
- Osada, H. and Takahashi, T. (2002) Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene*, **21**, 7421-7434.
- Osada, H., Tatematsu, Y., Masuda, A., Saito, T., Sugiyama, M., Yanagisawa, K. and Takahashi, T. (2001) Heterogeneous transforming growth factor (TGF)-beta unresponsiveness and loss of TGF-beta receptor type II expression caused by histone deacetylation in lung cancer cell lines. *Cancer Res*, **61**, 8331-8339.
- Pavlidis, N., Briasoulis, E., Hainsworth, J. and Greco, F.A. (2003) Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *Eur J Cancer*, **39**, 1990-2005.
- Peltier, M.R. and Hansen, P.J. (2001) Immunoregulatory activity, biochemistry, and phylogeny of ovine uterine serpin. *Am J Reprod Immunol*, **45**, 266-272.
- Perou, C.M., Jeffrey, S.S., van de Rijn, M., Rees, C.A., Eisen, M.B., Ross, D.T., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Zhu, S.X., Lee, J.C.F., Lashkari, D., Shalon, D., Brown, P.O. and Botstein, D. (1999) Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *PNAS*, **96**, 9212-9217.
- Petersen, S., Heckert, C., Rudolf, J., Schluns, K., Tchernitsa, O.I., Schafer, R., Dietel, M. and Petersen, I. (2000) Gene expression profiling of advanced lung cancer. *Int J Cancer*, **86**, 512-517.
- Petersen, S. and Petersen, I. (2003) Expression profiling of lung cancer based on suppression subtraction hybridization (SSH). *Methods Mol Med*, **75**, 189-207.
- Pezzella, F., Turley, H., Kuzu, I., Tungekar, M.F., Dunning, M.S., Pierce, C.B., Harris, A., Gatter, K.C. and Mason, D.Y. (1993) bcl-2 Protein in Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *N Engl J Med*, **329**, 690-694.
- Powell, C.A., Spira, A., Derti, A., DeLisi, C., Liu, G., Boreczuk, A., Busch, S., Sahasrabudhe, S., Chen, Y., Sugarbaker, D., Bueno, R., Richards, W.G. and Brody, J.S. (2003) Gene Expression in Lung Adenocarcinomas of Smokers and Nonsmokers. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **29**, 157-162.
- Qi, Z.L., Xiao, L., Gao, Y.T., Du, J.M. and Jing, L. (2002) [Expression and clinical significance of surfactant protein D mRNA in peripheral blood of lung cancer patients]. *Ai Zheng*, **21**, 772-775.
- Quinn, K.A., Treston, A.M., Unsworth, E.J., Miller, M.J., Vos, M., Grimley, C., Battey, J., Mulshine, J.L. and Cuttitta, F. (1996) Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines. *J Biol Chem*, **271**, 11477-11483.
- Redondo, M., Concha, A., Oldiviela, R., Cueto, A., Gonzalez, A., Garrido, F. and Ruiz-Cabello, F. (1991) Expression of HLA class I and II antigens in bronchogenic carcinomas: its relationship to cellular DNA content and clinical-pathological parameters. *Cancer Res*, **51**, 4948-4954.
- Richardson, G.E. and Johnson, B.E. (1993) The biology of lung cancer. *Semin Oncol*, **20**, 105-127.
- Riede, U., Werner, M. and Schäfer, H. (2004) In *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag.

- Rieneck, K., Bovin, L.F., Josefsen, K., Buschard, K., Svenson, M. and Bendtzen, K. (2000) Massive parallel gene expression profiling of RINm5F pancreatic islet beta-cells stimulated with interleukin-1beta. *Apmis*, **108**, 855-872.
- Rygaard, K., Nakamura, T. and Spang-Thomsen, M. (1993) Expression of the proto-oncogenes c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor, in SCLC cell lines and xenografts. *Br J Cancer*, **67**, 37-46.
- Sadoff, L. (1998) The usefulness of carcinoembryonic antigen testing in the overall management of patients with non-small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol*, **21**, 284-286.
- Sager, R., Sheng, S., Pemberton, P. and Hendrix, M.J. (1997) Maspin. A tumor suppressing serpin. *Adv Exp Med Biol*, **425**, 77-88.
- Saha, S., Sparks, A.B., Rago, C., Akmaev, V., Wang, C.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. and Velculescu, V.E. (2002) Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat Biotechnol*, **20**, 508-512.
- Sanchez-Cespedes, M. (2003) Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer*, **40**, 111-121.
- Sasco, A.J., Secretana, M.B., and Straif, K. (2004) Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, **45**, Suppl 2, S3-S9.
- Sato, M., Sekido, Y., Horio, Y., Takahashi, M., Saito, H., Minna, J.D., Shimokata, K. and Hasegawa, Y. (2000) Infrequent mutation of the hBUB1 and hBUBR1 genes in human lung cancer. *Jpn J Cancer Res*, **91**, 504-509.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O. and Davis, R.W. (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10614-10619.
- Schneider, P.M., Hung, M.C., Chiocca, S.M., Manning, J., Zhao, X.Y., Fang, K. and Roth, J.A. (1989) Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **49**, 4968-4971.
- Schneider, S., Yochim, J., Brabender, J., Uchida, K., Danenberg, K.D., Metzger, R., Schneider, P.M., Salonga, D., Holscher, A.H. and Danenberg, P.V. (2004) Osteopontin But Not Osteonectin Messenger RNA Expression Is a Prognostic Marker in Curatively Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 1588-1596.
- Schwartz, A.G., Yang, P. and Swanson, G.M. (1996) Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives. *Am J Epidemiol*, **144**, 554-562.
- Seifart, C., Seifart, U., Plagens, A., Wolf, M. and von Wichert, P. (2002) Surfactant protein B gene variations enhance susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in German patients. *Br J Cancer*, **87**, 212-217.
- Sekido, Y., Fong, K.M. and Minna, J.D. (1998) Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1378**, F21-59.
- Sekido, Y., Fong, K.M. and Minna, J.D. (2003) Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med*, **54**, 73-87.
- Sellers, T.A., Bailey-Wilson, J.E., Elston, R.C., Wilson, A.F., Elston, G.Z., Ooi, W.L. and Rothschild, H. (1990) Evidence for mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, **82**, 1272-1279.
- Shaw, P.E. (2002) Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO Rep*, **3**, 521-526.

- Shepherd, F.A. and Sridhar, S.S. (2003) Angiogenesis inhibitors under study for the treatment of lung cancer. *Lung Cancer*, **41 Suppl 1**, S63-72.
- Sherr, C.J. (1996) Cancer Cell Cycles. *Science*, **274**, 1672-1677.
- Shi, D., He, G., Cao, S., Pan, W., Zhang, H.Z., Yu, D. and Hung, M.C. (1992) Overexpression of the c-erbB-2/neu-encoded p185 protein in primary lung cancer. *Mol Carcinog*, **5**, 213-218.
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Matta, H., Sathyanarayana, U.G., Huang, C.X., Toyooka, S., Minna, J.D., Chaudhary, P.M. and Gazdar, A.F. (2002a) Loss of expression of death-inducing signaling complex (DISC) components in lung cancer cell lines and the influence of MYC amplification. *Oncogene*, **21**, 8510-8514.
- Shivapurkar, N., Toyooka, S., Eby, M.T., Huang, C.X., Sathyanarayana, U.G., Cunningham, H.T., Reddy, J.L., Brambilla, E., Takahashi, T., Minna, J.D., Chaudhary, P.M. and Gazdar, A.F. (2002b) Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. *Cancer Biol Ther*, **1**, 65-69.
- Siegfried, J.M., Weissfeld, L.A., Singh-Kaw, P., Weyant, R.J., Testa, J.R. and Landreneau, R.J. (1997) Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **57**, 433-439.
- Sienel, W., Dango, S., Woelfle, U., Morresi-Hauf, A., Wagener, C., Brummer, J., Mutschler, W., Passlick, B. and Pantel, K. (2003) Elevated Expression of Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 Promotes Progression of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, **9**, 2260-2266.
- Silverman, G.A., Bartuski, A.J., Cataltepe, S., Gornstein, E.R., Kamachi, Y., Schick, C. and Uemura, Y. (1998) SCCA1 and SCCA2 are proteinase inhibitors that map to the serpin cluster at 18q21.3. *Tumour Biol*, **19**, 480-487.
- Silvestri, G.A., Hoffman, B. and Reed, C.E. (2003a) One From Column A: Choosing Between CT, Positron Emission Tomography, Endoscopic Ultrasound With Fine-Needle Aspiration, Transbronchial Needle Aspiration, Thoracoscopy, Mediastinoscopy, and Mediastinotomy for Staging Lung Cancer. *Chest*, **123**, 333-335.
- Silvestri, G.A., Tanoue, L.T., Margolis, M.L., Barker, J. and Detterbeck, F. (2003b) The Noninvasive Staging of Non-small Cell Lung Cancer: The Guidelines. *Chest*, **123**, 147S-156.
- Singal, D.P., Ye, M. and Qiu, X. (1996) Molecular basis for lack of expression of HLA class I antigens in human small-cell lung carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, **68**, 629-636.
- Singhal, S., Amin, K.M., Krukltis, R., DeLong, P., Friscia, M.E., Litzky, L.A., Putt, M.E., Kaiser, L.R. and Albelda, S.M. (2003) Alterations in cell cycle genes in early stage lung adenocarcinoma identified by expression profiling. *Cancer Biol Ther*, **2**, 291-298.
- Slebos, R.J., Kibbelaar, R.E., Dalesio, O., Kooistra, A., Stam, J., Meijer, C.J., Wagenaar, S.S., Vanderschueren, R.G., van Zandwijk, N., Mooi, W.J. and et al. (1990) K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*, **323**, 561-565.
- Smith, G., Wilton, L.V. and Binns, R. (1978) Sequential changes in the structure of the rat respiratory system during and after exposure to cigarette smoke. *Toxicol Appl Pharmacol*, **46**, 579-591.
- Smith, S.L., Watson, S.G., Ratschiller, D., Gugger, M., Betticher, D.C. and Heighway, J. (2003) Maspin - the most commonly-expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer - is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions. *Oncogene*, **22**, 8677-8687.
- Sood, A.K., Fletcher, M.S., Gruman, L.M., Coffin, J.E., Jabbari, S., Khalkhali-Ellis, Z., Arbour, N., Seftor, E.A. and Hendrix, M.J. (2002) The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, **8**, 2924-2932.

- Sozzi, G., Veronese, M.L., Negrini, M., Baffa, R., Cotticelli, M.G., Inoue, H., Tornielli, S., Pilotti, S., De Gregorio, L., Pastorino, U., Pierotti, M.A., Ohta, M., Huebner, K. and Croce, C.M. (1996) The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, **85**, 17-26.
- Speed, T. (2005) [www.berkeley.edu/users/terry/group/home.html](http://www.berkeley.edu/users/terry/group/home.html).
- Spindel, E.R. (1996) Roles of bombesin-like peptides in lung development and lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **14**, 407-408.
- Sugita, M., Geraci, M., Gao, B., Powell, R.L., Hirsch, F.R., Johnson, G., Lapadat, R., Gabrielson, E., Bremnes, R., Bunn, P.A. and Franklin, W.A. (2002) Combined Use of Oligonucleotide and Tissue Microarrays Identifies Cancer/Testis Antigens as Biomarkers in Lung Carcinoma. *Cancer Res*, **62**, 3971-3979.
- Suminami, Y., Nagashima, S., Murakami, A., Nawata, S., Gondo, T., Hirakawa, H., Numa, F., Silverman, G.A. and Kato, H. (2001) Suppression of a Squamous Cell Carcinoma (SCC)-related Serpin, SCC Antigen, Inhibits Tumor Growth with Increased Intratumor Infiltration of Natural Killer Cells. *Cancer Res*, **61**, 1776-1780.
- Suminami, Y., Nagashima, S., Vujanovic, N.L., Hirabayashi, K., Kato, H. and Whiteside, T.L. (2000) Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br J Cancer*, **82**, 981-989.
- Sun, Y., Cheung, J.M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Wenger, L., Altman, R.D., Howell, D.S. and Cheung, H.S. (2000) Wild Type and Mutant p53 Differentially Regulate the Gene Expression of Human Collagenase-3 (hMMP-13). *J. Biol. Chem.*, **275**, 11327-11332.
- Sun, Y. (2000) Identification and characterization of genes responsive to apoptosis: application of DNA chip technology and mRNA differential display. *Histol Histopathol.*, **15** (4):1271-84.
- Sundaresan, V., Roberts, I., Bateman, A., Bankier, A., Sheppard, M., Hobbs, C., Xiong, J., Minna, J., Latif, F., Lerman, M. and Rabbitts, P. (1998) The DUTT1 gene, a novel NCAM family member is expressed in developing murine neural tissues and has an unusually broad pattern of expression. *Mol Cell Neurosci*, **11**, 29-35.
- Tarcsa, E., Candi, E., Kartasova, T., Idler, W.W., Marekov, L.N. and Steinert, P.M. (1998) Structural and Transglutaminase Substrate Properties of the Small Proline-rich 2 Family of Cornified Cell Envelope Proteins. *J. Biol. Chem.*, **273**, 23297-23303.
- Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Kaneko, S. and Sugimachi, K. (1990) Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res*, **50**, 7077-7080.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M. and Kidd, V.J. (2000) Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med*, **6**, 529-535.
- Tekin, S., Padua, M.B., Brad, A.M. and Hansen, P.J. (2005) Antiproliferative actions of ovine uterine serpin. *Am J Reprod Immunol*, **53**, 136-143.
- Tesfaigzi, J., Th'ng, J., Hotchkiss, J.A., Harkema, J.R. and Wright, P.S. (1996) A small proline-rich protein, SPRR1, is upregulated early during tobacco smoke-induced squamous metaplasia in rat nasal epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **14**, 478-486.
- Tesfaigzi, J., Wright, P.S., Oreffo, V., An, G., Wu, R. and Carlson, D.M. (1993) A small proline-rich protein regulated by vitamin A in tracheal epithelial cells is induced in lung tumors. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **9**, 434-440.
- Tesfaigzi, Y., Wright, P.S. and Belinsky, S.A. (2003) SPRR1B overexpression enhances entry of cells into the G0 phase of the cell cycle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **285**, L889-898.

- Travis, W.D., Brambilla, E., Müller-Hermelink, H.K. and Harris, C.C. (2004) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, Lyon.
- Tsuchiya, E., Furuta, R., Wada, N., Nakagawa, K., Ishikawa, Y., Kawabuchi, B., Nakamura, Y. and Sugano, H. (1995) High K-ras mutation rates in goblet-cell-type adenocarcinomas of the lungs. *J Cancer Res Clin Oncol*, **121**, 577-581.
- Uchida, K., Nagatake, M., Osada, H., Yatabe, Y., Kondo, M., Mitsudomi, T., Masuda, A. and Takahashi, T. (1996) Somatic in vivo alterations of the JV18-1 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res*, **56**, 5583-5585.
- Umekita, Y., Ohi, Y., Sagara, Y. and Yoshida, H. (2002) Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer*, **100**, 452-455.
- Veikkola, T. and Alitalo, K. (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, **9**, 211-220.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*, **270**, 484-487.
- Veronesi, G., Pelosi, G., Sonzogni, A., Leon, M.E., D'Aiuto, M., Gasparri, R., De Braud, F., De Pas, T., Sandri, M. and Spaggiari, L. (2005) Tumour CEA as predictor of better outcome in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer*, **48**, 233-240.
- Vihinen, P., Ala-aho, R. and Kahari, V.M. (2005) Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, **5**, 203-220.
- Virtanen, C., Ishikawa, Y., Honjoh, D., Kimura, M., Shimane, M., Miyoshi, T., Nomura, H. and Jones, M.H. (2002) Integrated classification of lung tumors and cell lines by expression profiling. *PNAS*, **99**, 12357-12362.
- Wajant, H. (2003) Death receptors. *Essays Biochem*, **39**, 53-71.
- Wang, T., Hopkins, D., Schmidt, C., Silva, S., Houghton, R., Takita, H., Repasky, E. and Reed, S.G. (2000) Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis. *Oncogene*, **19**, 1519-1528.
- Weiner, D.B., Nordberg, J., Robinson, R., Nowell, P.C., Gazdar, A., Greene, M.I., Williams, W.V., Cohen, J.A. and Kern, J.A. (1990) Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res*, **50**, 421-425.
- Welsh, J.B., Zarrinkar, P.P., Sapinoso, L.M., Kern, S.G., Behling, C.A., Monk, B.J., Lockhart, D.J., Burger, R.A. and Hampton, G.M. (2001) Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *PNAS*, **98**, 1176-1181.
- Whitsett, J.A. and Weaver, T.E. (2002) Hydrophobic Surfactant Proteins in Lung Function and Disease. *N Engl J Med*, **347**, 2141-2148.
- Wigle, D.A., Jurisica, I., Radulovich, N., Pintilie, M., Rossant, J., Liu, N., Lu, C., Woodgett, J., Seiden, I., Johnston, M., Keshavjee, S., Darling, G., Winton, T., Breikreutz, B.-J., Jorgenson, P., Tyers, M., Shepherd, F.A. and Tsao, M.S. (2002) Molecular Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer and Correlation with Disease-free Survival. *Cancer Res*, **62**, 3005-3008.
- Wikman, H., Kettunen, E., Seppanen, J.K., Karjalainen, A., Hollmen, J., Anttila, S. and Knuutila, S. (2002) Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene*, **21**, 5804-5813.

- Wistuba, II, Behrens, C., Virmani, A.K., Mele, G., Milchgrub, S., Girard, L., Fondon, J.W., 3rd, Garner, H.R., McKay, B., Latif, F., Lerman, M.I., Lam, S., Gazdar, A.F. and Minna, J.D. (2000) 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*, **60**, 1949-1960.
- Wistuba, II, Lam, S., Behrens, C., Virmani, A.K., Fong, K.M., LeRiche, J., Samet, J.M., Srivastava, S., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. (1997) Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 1366-1373.
- Wright, J.R. (1997) Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol. Rev.*, **77**, 931-962.
- Wu, H., Kuzmenko, A., Wan, S., Schaffer, L., Weiss, A., Fisher, J.H., Kim, K.S. and McCormack, F.X. (2003) Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J. Clin. Invest.*, **111**, 1589-1602.
- Yaar, M., Eller, M.S., Bhawan, J., Harkness, D.D., DiBenedetto, P.J. and Gilchrist, B.A. (1995) In vivo and in vitro SPRR1 gene expression in normal and malignant keratinocytes. *Exp Cell Res*, **217**, 217-226.
- Yamagata, N., Shyr, Y., Yanagisawa, K., Edgerton, M., Dang, T.P., Gonzalez, A., Nadaf, S., Larsen, P., Roberts, J.R., Nesbitt, J.C., Jensen, R., Levy, S., Moore, J.H., Minna, J.D. and Carbone, D.P. (2003) A Training-Testing Approach to the Molecular Classification of Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, **9**, 4695-4704.
- Yamaguchi, K., Okami, K., Hibi, K., Wehage, S.L., Jen, J. and Sidransky, D. (1999) Mutation analysis of hBUB1 in aneuploid HNSCC and lung cancer cell lines. *Cancer Lett*, **139**, 183-187.
- Zhang, F., Pao, W., Umphress, S., Jakowlew, S., Meyer, A.M., Dwyer-Nield, L.D., Takeda, K., Gelfand, E.W., Fisher, J., Malkinson, A.M. and Mason, R.J. (2004) Serum Levels of Surfactant Protein D Are Increased in Mice With Lung Tumors. *Chest*, **125**, 109S-.
- Zochbauer-Muller, S., Gazdar, A.F. and Minna, J.D. (2002) Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol*, **64**, 681-708.
- Zou, S.M., Lin, D.M., Lu, N., Liu, X.Y., Wen, P. and Liu, F.S. (2003) [Use of thyroid transcription factor-1, surfactant protein-B, cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in discrimination between primary and metastatic adenocarcinoma of lung]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **83**, 1350-1352.
- Zou, Z., Gao, C., Nagaich, A.K., Connell, T., Saito, S.i., Moul, J.W., Seth, P., Appella, E. and Srivastava, S. (2000) p53 Regulates the Expression of the Tumor Suppressor Gene Maspin. *J. Biol. Chem.*, **275**, 6051-6054.

## Abkürzungen

---

AC	<i>adenocarcinoma</i> (Adenokarzinom)
BAC	bronchioloalveoläres Karzinom
BAL	bronchioalveoläre Lavage
Bp	Basenpaare
CDK	cyclin-abhängige Proteinkinase
CDC25C	cell division cycle 25C
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule</i>
CHK	checkpoint kinase
CK	Kreatinkinase
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
CUP	<i>Cancer of Unknown Primary</i>
CYP3	Cyclophilin 3
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DR	<i>death receptor</i>
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
EGF-R	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FC	<i>Fold Change</i>
GPR	G-Protein gekoppelte Rezeptor
IGG	<i>Inter Group Gap</i>
K	kommerziell
LCC	<i>large cell carcinoma</i> (großzelliges Karzinom)
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
MAPK	Kinase der Mikrotubulus assoziierten Proteine
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMPI	Matrixmetalloproteinasen-Inhibitoren
NAT	<i>normal adjacent tissue</i>
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
NSCLC	nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDS	Prostaglandin D Synthase
PG	Prostaglandin
PKC	Proteinkinase C
PET	Positronenemissionstomographie
PPIF	Peptidylprolyl Isomerase F

## Abkürzungen

---

PRC	Proteinregulator der Zytokinese
Ras	kleine GTPase
RAF1	zur Ras-Familie gehörende kleine GTPase
rpm	Rotationen pro Minute
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> (Plattenepithelkarzinom)
SCCA	<i>squamous cell carcinoma antigen</i>
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom
SFTP	Surfactantprotein
SSH	<i>suppression subtractive hybridization</i>
TNFR	Tumornekrosefaktor Rezeptor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TTF-1	Thyroid Transkriptionsfaktor 1
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
VC	Varianzkoeffizient
VEGF	Wachstumsfaktor des Gefäßendothels

## Einwilligungserklärung zur Probenentnahme:

### **„Genexpressionsanalysen beim Bronchialkarzinom“**

Bei mir wurde ein bösartiger Lungentumor diagnostiziert. Ich bin bereit, einer zusätzlichen Gewebeentnahme aus dem Lungentumor zuzustimmen.

Meine betreuenden Ärzte haben mit mir ein Aufklärungsgespräch geführt, das den Zweck der Probenentnahme erklärte. Außerdem wurde mit ein Aufklärungsblatt ausgehändigt. Das Aufklärungsblatt, das den Untersuchungshergang genau schildert, war für mich gut verständlich.

Mir wurde dargelegt, dass zur Sicherung der Diagnose und Planung der Therapie die Gewinnung einer Gewebeprobe aus dem Tumor grundsätzlich (also unabhängig von dieser Probenentnahme für die Genexpressionsanalyse) notwendig ist. Hierfür werden durch einen dünnen, flexiblen Schlauch (Bronchoskop) mit einer sehr kleinen Zange unter Sicht mehrere Gewebstücke (Biopsien) aus dem Tumorgewebe entnommen. Ich bin damit einverstanden, dass hierbei auch Biopsien für Studienzwecke entnommen werden. Eine Einverständniserklärung zur Bronchoskopie mit Biopsie wird mir vor der Untersuchung zusätzlich vorgelegt. Mir ist bekannt, dass die Untersuchungsergebnisse möglicherweise keinen unmittelbaren Nutzen für mich haben, sondern dass es sich hierbei um die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten meiner Erkrankung handelt. Mir ist insbesondere bekannt, dass ich jederzeit ohne Angabe von Gründen und zu jedem beliebigen Zeitpunkt meine Einwilligung zurückziehen kann, ohne dass mir hieraus Nachteile entstehen würden.

Alle Fragen wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Name, Vorname:

geb.:

Datum:

Unterschrift:

Aufklärender Arzt:

## **Danksagung**

Großer Dank gilt Herrn PD Dr. Beinert, der den Anstoß zur vorliegenden Arbeit brachte, die Voraussetzungen zur Zusammenarbeit mit der AG Schering schuf sowie mir medizinisch-wissenschaftlich zur Seite stand.

Ich danke Frau Dr. Leder, der Betreuerin der Arbeit seitens der AG Schering. Nur durch ihre experimentelle Anleitung, wissenschaftliche Betreuung und außerordentliche Geduld war diese Arbeit möglich. Frau Dr. Sommer vermittelte mir wichtige biochemische Grundlagen und lieferte als Ko-Autorin des im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Review Artikels wertvolle Beiträge. Herrn Dr. Seidel sei für die Erklärung der bioinformatischen Prozesse gedankt. Herrn Dr. Pohlenz, dem Leiter der Abteilung „*Enabling Technologies, Genomics & Bioinformatics*“ der Schering AG Berlin, danke ich für die Nutzung des Labors und das zustande kommen des Vertrages, allen anderen Mitarbeitern dieser Abteilung für die äußerst freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ich danke der leitenden Oberärztin Fr. Dr. Temmesfeld der Klinik für Infektiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin für die Mitbetreuung der Arbeit und die Bereitstellung der Tumorproben. Dank gilt auch Herrn Dr. Grah des Gemeinschaftskrankenhauses Havelhöhe, der durch die Bereitstellung weiterer Tumorproben einen nicht kleinen Anteil zur Arbeit lieferte.

Weiterhin gilt besonderer Dank meinem Freund Daniel Korr, der mit stets aufmunternden Worten eine große Unterstützung ist.

Zuletzt der allergrößte Dank meinen Eltern Jeanette und Gerd Müller-Hagen, die meinen Weg stets mit ungeheurer Liebe und Aufopferung begleiten und die in dieser Arbeit hoffentlich eine Frucht ihres Einsatzes sehen.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Gerit Müller-Hagen, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genexpressionsanalysen beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom im Vergleich zu gesundem Lungengewebe mittels der Oligonukleotid-Mikroarray Technologie“ 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 19.06.2007