

**Methylierung
als molekularbiologischer
Marker zur
Lungenkarzinom-Diagnostik**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität zu Köln

vorgelegt von Viola Schmiemann

Köln 2005

1. Berichtstatter:

Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen,
Institut für Genetik, Universität zu Köln

2. Berichtstatter:

Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora,
Institut für Humangenetik,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am
Institut für Cytopathologie,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit Betreuung durch
Prof. Dr. A. Böcking und Dr. med. H. J. Grote durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2005

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abstract.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1 DNA-Methylierung als epigenetische Veränderung.....	6
1.2 Funktion der DNA-Methylierung	7
1.3 Veränderung der Methylierungsmuster bei klinischen Syndromen	9
1.4 Veränderung der DNA Methylierungsmuster in Tumoren.....	10
1.5 Das Lungenkarzinom.....	11
1.5.1 Lungenkarzinom-Diagnostik.....	12
1.5.2 Molekularbiologische Veränderungen des Lungenkarzinoms.....	13
1.5.3 Promotor-Methylierung an histologischem Material der Lunge.....	14
1.5.4 Promotor-Methylierung an zytologischem Material der Lunge.....	16
1.6 Biomarker zur Diagnose von Lungenkarzinomen	17
1.6.1 Besonderheiten der molekularen Zytopathologie.....	18
1.6.2 Mutationen als Biomarker	18
1.6.3 Chromosomenaberrationen als Biomarker	19
1.6.4 Aberrante Promotor-Methylierung als Biomarker	19
1.7 Ziel der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Humane Zelllinien und ihre Kultivierung.....	21
2.2 Bronchialsekrete, Sputen und Formalin-fixiertes Gewebe	22
2.2.1 Verarbeitung und Quantifizierung von Tumorzellen in Bronchialsekreten	22
2.2.2 Sputen.....	22
2.2.3 Gewebe	22
2.3 Verwendeten Kollektive	23
2.3.1 Fall-Kontroll-Studien Kollektiv	23
2.3.2 Kohorten-Studien Kollektiv	24
2.3.3 Sputen Kollektiv.....	26
2.3.4 Formalin-fixiertes Gewebe Kollektiv.....	26
2.4 Vektoren.....	26

2.5 Bakterien.....	26
2.5.1 Bakterienstämme und ihre Anzucht	26
2.5.2 Transformation kompetenter One Shot INV α F' Zellen	26
2.6 Chemikalien.....	27
2.7 Enzyme	27
2.8 Antikörper.....	28
2.9 Molekularbiologische Kits.....	28
2.10 Medien, Puffer und Lösungen	28
2.10.1 Medien zur Anzucht von Zellkulturzelllinien	28
2.10.2 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.10.3 Lösungen für DNA Extraktion.....	29
2.10.4 Lösungen für Elektrophoresen	29
2.10.5 Lösungen für Immunzytochemie und -histochemie.....	29
2.10.6 Lösungen für Feulgen-Färbung.....	30
2.11 Geräte, Apparaturen, sonstiges Material.....	30
2.12 Software	31
2.13 Sequenzen	31
2.13.1 Oligonukleotide für DNA-Extraktions Studie.....	31
2.13.2 Oligonukleotide für Promotor Methylierungs-Nachweis mittels QMSP...	32
2.13.3 Oligonukleotide für die Klonierung von Promotorfragmenten.....	33
2.13.4 Oligonukleotide für die Sequenzierung.....	33
2.14 Mikrodissektion an histologischem Material.....	33
2.15 Isolierung von Nukleinsäuren.....	34
2.16 Ethanolfällung von DNA.....	35
2.17 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung.....	35
2.18 Enzymatische Reaktionen.....	35
2.18.1 Methylierung der DNA mit <i>SssI</i> -Methylase.....	35
2.18.2 Klonierung von PCR-Produkten	36
2.18.3 Analyse der Klonierungsprodukte mittels <i>EcoRI</i> -Verdau.....	36
2.19 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	36
2.20 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36

2.21 Polymerase-Kettenreaktion.....	37
2.21.1 β -Globin PCR.....	37
2.21.2 QMSP.....	37
2.21.3 PCR zur Klonierung von Promotorfragmenten.....	39
2.22 DNA-Analyse mittels Bisulfit.....	39
2.23 Sequenzierung.....	40
2.24 Nachweis von DNA-Hypomethylierung	
mittels 5-Methylcytosin-Antikörper AB-1.....	40
2.24.1 Vorbehandlung des Zellmaterials.....	40
2.24.2 Immunologische Reaktion.....	41
2.24.3 Auswertung der immunologischen Reaktion.....	41
2.25 Bild-Zytometrie.....	42
2.25.1 Feulgen Färbung.....	42
2.25.2 DNA-Bild-Zytometrie.....	42
2.26 Statistische Auswertung.....	43
3. Ergebnisse.....	44
3.1 DNA Extraktion.....	44
3.1.1 DNA Extraktion aus Saccomanno fixierten Bronchialsekreten.....	44
3.1.2 DNA Extraktion aus Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Geweben.....	46
3.2 Fall-Kontroll-Studien: aberrante Promotormethylierung als Tumormarker.....	46
3.2.1 Etablierung der Bisulfitkonversion und einer internen Kontrolle.....	46
3.2.2 Etablierung der Methylierungsmarker.....	47
3.2.3 Sensitivität und Spezifität der Marker	
bei Tumorzell positiven Bronchialsekreten.....	48
3.2.4 Methylierung in Bronchialsekreten verschiedener diagnostischer Gruppen.....	49
3.2.5 Sensitivität der Marker in Bezug auf histologische Subtypen und in	
Kombination miteinander.....	50
3.2.6 Klinisch-pathologische Korrelation.....	53
3.3 Retrospektive Kohorten-Studie: aberrante Promotormethylierung	
als Tumormarker.....	53
3.4 Methylierungsmuster in zytologischem und histologischem	
Untersuchungsmaterial.....	57
3.4.1 Vergleich der Methylierungsmuster in zytologischen und histologischen	
Untersuchungsmaterial mittels QMSP.....	57

3.4.2 Analyse der Methylierungsmuster einzelner Promotoren	58
3.5 Globale DNA Hypomethylierung	62
3.5.1 Globale DNA Hypomethylierung als Tumormarker	62
3.5.2 DNA Hypomethylierung in histologischen Präparaten von Lungenkarzinomen	63
3.6 Aberrante Promotormethylierung in Sputen	66
4. Diskussion	67
4.1 Extraktions-Studie	67
4.1.1 DNA Extraktion aus Saccomanno fixierten Bronchialsekreten	67
4.1.2 DNA Extraktion aus Formalin fixiertem, Paraffin eingebetteten Gewebe ..	69
4.2 Aberrante Promotormethylierung als molekularbiologischer Tumormarker für die Lungenkarzinom Diagnostik	69
4.2.1 Etablierung der Bisulfitkonversion und QMSP	70
4.2.2 Aberrante Methylierung des <i>APC</i> Promotors 1A	72
4.2.3 Aberrante Methylierung des <i>p16^{INK4a}</i> Promotors	74
4.2.4 Aberrante Methylierung des <i>RARB2</i> Promotors	75
4.2.5 Aberrante Methylierung des <i>RASSF1A</i> Promotors	76
4.2.6 Aberrante Methylierung des <i>SEMA3B</i> Promotors	77
4.2.7 Kombination verschiedener Methylierungsmarker als diagnostischen Test	77
4.2.8 Retrospektive Kohorten-Studie – Methylierung zur Erweiterung der bisherigen Lungenkarzinom-Diagnostik	78
4.3 Methylierungsmarker: Tumor- oder Risikomarker?	81
4.4 Globale DNA-Hypomethylierung	82
4.4.1 Hypomethylierung als Tumormarker	82
4.4.2 DNA Hypomethylierung in histologischen Präparaten von Lungenkarzinomen	83
5. Zusammenfassung	85
6. Literatur	86
7. Abkürzungen	102
8. Anhang	103
Eidesstattliche Erklärung	107
Teilpublikationen dieser Arbeit	108

Abstract

In this study, a diagnostic test for lung cancer was developed using aberrant promoter methylation as a tumormarker. For the detection of promoter methylation, DNA was isolated from bronchial secretions, treated with sodium-bisulfite and analyzed with a quantitative methylation specific real-time PCR (QMSP). For the QMSP, primer/TaqMan[®]-probe sets for different promoter-regions were designed and tested in case-control-studies comprising 297 bronchial secretions (112 lung cancers, 85 non-tumor-cases). Applying QMSP as well as sequencing of promoter regions to DNA from bronchial secretions and corresponding formalin fixed tumor-tissue showed that the markers *APC* and *RARB2* detect an epigenetic damage of the bronchial epithelium and may therefore be classified as risk markers. In contrast, *RASSF1A* and *p16^{INK4a}* proved to be tumor-specific. Finally, three useful markers for diagnostic purposes were combined to a panel (*APC*, *p16^{INK4a}*, *RASSF1A*). In a retrospective cohort-study comprising 235 bronchial aspirates (111 lung cancers, 103 non-tumor-cases, 21 other tumors) the results of the case-control-studies were verified. Using QMSP lung cancer was detected with a sensitivity of 52% and a specificity of >99%. Combining the molecular test with conventional cytology and histology, lung cancer was diagnosed in 88% at the first bronchoscopy. The methylation assay represents the first diagnostic test for lung cancer which fits for every day use and is independent of cell morphology. Thereby 40% of lung cancer cases with bronchial secretions lacking morphologically visible tumor cells could be identified. Furthermore, in 80% of cases with highly suspicious cytology the tumor was confirmed. The test can be accomplished using residual material of regular cytology. Therefore, it can be integrated in diagnostic routine without changes of the standard procedures. As a result, the newly developed test has a great diagnostic potential.

For the first time it was possible to quantify DNA hypomethylation in histological sections of squamous-cell carcinomas using a monoclonal antibody raised against the base 5-methyl-cytosine and analysing the staining results with image-cytometry. The squamous-cell carcinomas showed global hypomethylation in 80% of the studied cases. In average the 5-methyl-cytosine content of tumor cells was 29.4% lower than in respective reference cells.

1. Einleitung

1.1 DNA-Methylierung als epigenetische Veränderung

Die Weitergabe von Informationen erfolgt bei der Epigenetik auf der Ebene der Expression und bei der Genetik auf der Ebene der DNA-Sequenz. Epigenetische Effekte sind in vielen Eukaryoten bekannt: genomisches Imprinting in Pflanzen, *Mating type* und *Telomer silencing* in Hefe, *position effect variegation* in *Drosophila* sowie X-Chromosom Inaktivierung und genomisches Imprinting in Säugetieren.

Die häufigste epigenetische Modifikation ist die Methylierung von Cytosin. Dabei wird bevorzugt die palindromische Basenfolge von Cytosin und Guanin (CpG-Dinukleotid) methyliert. In höheren Pflanzen findet sich Methylierung zudem in der Sequenz CpNpG (Gruenbaum *et al.* 1981). Die chemische Reaktion wird in der Zelle von DNA Methyltransferasen (DNMT) postreplikativ katalysiert. Dabei wird eine Methylgruppe auf das Kohlenstoffatom 5 des Cytosins von dem Donor S-Adenosyl-Methionin übertragen (Szyf 1996).

Im Laufe der Evolution hat sich der CpG-Anteil der Wirbeltier-DNA verringert. Die Häufigkeit der Nukleotidfolge CpG entspricht nur einem fünftel dessen, was man nach der Basenzusammensetzung erwarten würde. Grund dafür ist die häufige Desaminierung von Cytosinresten und ihre unzureichende Reparatur.

Das Methylierungsmuster der DNA ist Zelltyp-spezifisch und wird während der Embryonalentwicklung durch drei unabhängige Methyltransferasen etabliert (Bestor 2000). Die am besten charakterisierte und am häufigsten in somatischen Zellen zu findende Methyltransferase ist DNMT1. Während der S-Phase ist dieses 193 kDa Protein an den Replikationsorten im Kern lokalisiert und interagiert mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), einem für die DNA-Reparatur und DNA-Replikation essentiellen Protein (Leonhardt *et al.* 1993). DNMT1 hat eine im Vergleich zu unmethylierten Sequenzen 10-40fach erhöhte Spezifität für hemimethylierte DNA-Stränge, weshalb man sie auch als Erhaltungsmethylase (*maintenance*) bezeichnet (Pradhan *et al.* 1999). Sie ist essentiell für die Embryonalentwicklung (Li *et al.* 1992), das Imprinting (Li *et al.* 1993, Howell *et al.* 2001) und die X-Chromosom-Inaktivierung in weiblichen Zellen (Beard *et al.* 1995).

Das DNMT2-Protein wurde 1998 charakterisiert (Yoder und Bestor 1998). Es ist in den frühen Stadien der Säugetierentwicklung aktiv, eine Methylaseaktivität konnte jedoch

bislang weder in biochemischen noch in genetischen Tests gezeigt werden. Vermutlich kommt DNMT2 eine Funktion bei der Centromerausbildung zu (Bestor 2000).

In *Drosophila melanogaster* findet sich bislang keine CpG-Methylierung, sondern nur eine sehr schwache CpT-Methylierung in embryonalen Stadien (Lyko *et al.* 2000). Allerdings besitzt *Drosophila* nicht nur ein DNMT1-ähnliches Protein, sondern auch ein DNMT2 Homolog (Hung *et al.* 1999), was möglicherweise eher spezifisch für eine CpT-Methylierung ist (Lyko *et al.* 2000). Zu bemerken ist jedoch, daß die Homologien in der *Drosophila*-Sequenz bezüglich DNMT1 und DNMT2 von Bestor kritisch bewertet werden (Bestor 2000).

Die dritte Gruppe von DNA-Methyltransferasen, DNMT3a und DNMT3b, konnte ebenfalls 1998 charakterisiert werden. Sie zeigen eine gleich starke Aktivität gegenüber hemi- und nicht methylierter DNA (Okano *et al.* 1998). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, daß Mäuse mit einer gezielt eingeführten homozygoten Inaktivierung des *DNMT3a*-Gens (Knockout-Mäuse) zwar lebend geboren werden, jedoch zwergwüchsig sind und im Alter von vier Wochen versterben. *DNMT3b*-Knockout-Mäuse sind nicht lebensfähig. Mutierte Embryos zeigen eine große Anzahl an Störungen in der Entwicklung und eine Wachstumsbeeinträchtigung beginnend am Tag 9. Wenn sich die Mutationen auf die C-terminale Domäne des Gens beschränken, tritt in den Mäusezellen eine Demethylierung der centromerischen DNA-Sequenz auf, wie sie auch vergleichbar beim ICF-Syndrom im Menschen zu beobachten ist (Okano *et al.* 1999). Basierend auf den Erkenntnissen aus den Mausmodellen und der Spezifität der Enzyme sowohl für hemi- als auch nicht methylierte DNA, werden die beiden DNMT3-Proteine als *de-novo*-Methylasen bezeichnet (Okano *et al.* 1998).

1.2 Funktion der DNA-Methylierung

Im Säugetiergenom gibt es einige hundert Basenpaar große Sequenzabschnitte, in denen CpG-Dinukleotide zehnmal häufiger auftreten als sonst. Diese als CpG-Inseln bezeichneten Genomabschnitte befinden sich in der 5'-Region (Promotorregion, untranslatierte Region und Exon 1) von schätzungsweise der Hälfte aller humanen Gene (Bird *et al.* 1986).

Außerdem befinden sich ca. 80% der CpG-Dinukleotide in repetitiven DNA-Sequenzen – Satelliten des Heterochromatins –, in Introns, in untranslatierten und in kodierenden Regionen von inaktiven gewebe- und entwicklungsspezifischen Genen. Hier liegen die CpG-Dinukleotide vorrangig in methylierter Form vor (Esteller und Herman 2002).

Für viele Gene ergibt sich eine umgekehrte Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression (Doerfler 1983). Die DNA-Methylierung ist meist assoziiert mit einer Inaktivierung der betroffenen DNA-Sequenz und einer Transkriptionshemmung.

Derzeit werden zwei Mechanismen diskutiert, die die Transkriptionshemmung durch DNA-Methylierung erklären könnten (Zahava und Cedar 1997). Durch Methylierung an CpG-Dinukleotiden in Promotorregionen kann eine Bindung von bestimmten Transkriptionsfaktoren an die DNA gehemmt werden. Solche Transkriptionsfaktoren enthalten ein CpG-Dinukleotid in ihrer Erkennungssequenz. Zu ihnen zählen z.B. die Faktoren AP-2, CREB, c-Myc/Myn, E2F1, NF κ B, ERS-2, HIF1 α und PEA-3 (Bergman und Mostoslavsky 1998). Allerdings gibt es auch eine Reihe von Faktoren, die methylierungsunabhängig DNA binden oder erst gar keine CpG-Erkennungssequenz besitzen. Hierzu zählen u. a. SP1, CTF und YY1 (Mostoslavsky und Bergman 1997) Der zweite Mechanismus zur Hemmung der Transkription erfolgt durch die Bindung von Repressorproteinkomplexen, die methylierte CpG-Dinukleotide erkennen, dazu gehören MeCP1 und MeCP2. Die Proteine MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 und MeCP2 bilden eine Familie, die mit hoher Affinität über eine gemeinsame Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) Methylcytosin binden kann. Die MBD's können mit verschiedensten Proteinen assoziiert sein, u.a. mit Histondeacetylasen. Diese können Histonkomplexe deacetylieren, was zu einer dichteren Verpackung der DNA und schließlich zu einer Transkriptionshemmung führt. Beide beschriebenen Mechanismen schließen einander nicht aus, man vermutet sogar, daß sie synergetisch wirken.

In Prokaryoten dient die DNA Methylierung außerdem der Unterscheidung von Eigen- und Fremd-DNA im Rahmen des Modifikations-Restriktions-Systems und schützt die DNA vor dem Abbau durch Restriktionsenzyme. Zudem markiert die DNA-Adenosin-Methylase den parentalen DNA-Strang, was für das postreplikative Mismatch-Reparatursystem von großer Bedeutung ist, da hier nur Basen am unmethylierten Strang einer hemimethylierten DNA ausgetauscht werden. Das Protein MBD4 könnte dabei eine verwandte Funktion zum *dam*-Gen in Eukaryoten haben (Bellacosa 2001).

In Eukaryoten wirkt sich die Methylierung nicht nur auf die Transkription, sondern auch auf die Organisation und differentielle Genexpression aus. Ähnlich dem Prokaryoten-System kann bei Eukaryoten die DNA-Methylierung auch als „Immunantwort“ gegenüber Fremd-DNA auf zellulärer Ebene angesehen werden (Doerfler 1991, Yoder *et al.* 1997). So wurde gezeigt, daß in transgenen Pflanzen die Transkription fremder DNA durch DNA-Methylierung des Selektionsmarkers verhindert wird. Auch endogene

retrotransposable Elemente wie z.B. Retroviren, LINE1- und Alu-Elemente werden durch *de novo* Methylierung inaktiviert und ihre Transkription so verhindert. Mehr als ein Drittel des menschlichen Genoms besteht aus transponierbaren Elementen (Li *et al.* 2001).

DNA-Methylierung bestimmt auch das genomische Imprinting („elterliche Prägung“). Dabei werden einige Gene durch parentspezifische Methylierungsmuster kontrolliert und entsprechend exprimiert. Ein bekanntes Beispiel für das Imprinting sind die benachbarten Gene *H19* und *Igf2* auf Chromosom 11p15. Die Gene unterliegen einer entgegengesetzten Prägung. Dabei wird das väterliche Allel von *H19* methyliert, während das mütterliche unmethyliert bleibt und transkribiert wird (Tremblay *et al.* 1995, Stoger *et al.* 1993). Umgekehrt ist dieses bei *Igf2* zu finden. Die geprägten Methylierungsmuster bleiben während der Gametogenese erhalten, während ungeprägte Genomregionen während der Zellteilung komplett demethyliert werden und im Blastocysten-Stadium einer *de novo* Methylierung unterliegen (Jaenisch 1997, Reik und Walter 2001).

Mit dem Imprinting vergleichbar ist die DNA-Methylierung bei der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in der weiblichen Zelle zur Gen-Dosis Regulierung. Ausgehend vom *X-chromosome-inactivation center* (Xic) wird das *Xist* Gen auf dem zu inaktivierenden Chromosom exprimiert. Das entstehende Xist-RNA Transkript akkumuliert im Zellkern. Durch einen bisher noch nicht völlig verstandenen Mechanismus kommt es zur Chromatinkondensation und zur DNA-Methylierung. Diese entgültige Inaktivierung des X-Chromosoms wird im späten Blastozystenstadium eingeleitet (Heard *et al.* 1997, Avner und Heard 2001).

1.3 Veränderung der Methylierungsmuster bei klinischen Syndromen

Verschiedene klinische Syndrome des Menschen sind mit Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA assoziiert und führen zu einer mentalen Retardierung der Patienten. Patienten mit dem „Immunodeficiency, Centromere Instability and Facial Anomalies“ (ICF) – Syndrom zeigen verschiedenste Mutationen in der katalytischen Domäne des *DNMT3B*-Gens und damit eine verminderte Proteinaktivität (Hansen *et al.* 1999, Xu *et al.* 1999). Als Folge werden repetitive Sequenzen hypomethyliert und centromer-nahe Regionen destabilisiert, was letztendlich die Chromosomen-Aberration nach sich zieht (Franceschini *et al.* 1995).

Das Fragiles-X-Syndrom ist gekennzeichnet durch die *de novo* Methylierung der Promotorregion des *FMRI*-Gens. Dieses Gen hat einen hochpolymorphen CCG-Repeat, der bei betroffenen Patienten Wiederholungssequenzen von 29 bis über 200 aufweisen kann (Kremer *et al.* 1991, Oberle *et al.* 1991).

Das Rett-Syndrom weist Mutationen im *MeCP2*-Gen auf, wobei die Mehrzahl der Veränderungen Transitionen von C zu T in der Methyl-Bindungsdomäne (MBD) sind (Nan *et al.* 1997, Ballestar *et al.* 2000).

1.4 Veränderung der DNA Methylierungsmuster in Tumoren

Cytosin und Methylcytosin können am Kohlenstoffatom C4 entweder chemisch induziert oder spontan zu Uracil bzw. Thymin desaminiert werden. Das Reparaturenzym Uracil-DNA-Glycosylase erkennt die Base Uracil in der DNA-Sequenz und tauscht sie gegen Cytosin aus. Schwieriger zu reparieren sind die zu Thymin desaminierten Methylcytosine, da die Thymin-DNA-Glycosylase Thymin-Reste als normalen Bestandteil der DNA wertet und diese nicht effizient austauschen kann (Laird und Jaenisch 1994). Als Folge entstehen Punktmutationen. 24% aller Mutationen im Gen *p53* in menschlichen Tumoren sind zurückzuführen auf Transitionen von CpG nach TpG oder CpA (Magewu und Jones 1994, Hollstein *et al.* 1998).

In der Entstehung von Tumoren spielen sowohl eine globale Verminderung der DNA Methylierung (Hypomethylierung) als auch eine meist auf Promotorregionen bezogene Erhöhung der Methylierung (Hypermethylierung) eine entscheidende Rolle. Dabei können beide Prozesse voneinander unabhängig oder auch in Kombination ablaufen. Die Hypomethylierung tritt sowohl genomweit als auch spezifisch in Proto-Onkogenen auf. So findet man beispielsweise eine verminderte Methylierung von *K-RAS* in Lungen- und Colonkarzinomen (Feinbert und Vogelstein 1983). Gleichzeitig kann man in Tumoren aber auch eine Hypermethylierung der Promotoren von Tumorsuppressor- und anderen Genen finden, z.B. bei *APC*, *CDKN2A* und *RASSF1A* (Gonzalzo *et al.* 1997, Hiltunen *et al.* 1997, Honorio *et al.* 2003). Bei den drei genannten Beispielen ist die Hypermethylierung als Mechanismus zur Inaktivierung der Gene in menschlichen Tumoren sicher belegt und durchaus vergleichbar mit der Inaktivierung von Genen durch Mutationen wie Deletionen und Punktmutationen (Baylin *et al.* 2001).

1.5 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom ist weltweit die Tumorerkrankung mit der höchsten Mortalität (Parkin *et al.* 2001). Es manifestiert sich in der Regel in der 6. Lebensdekade. Derzeit sind in Deutschland Männer häufiger als Frauen betroffen, doch die Zahl von Lungenkarzinompatientinnen steigt jährlich an. Die Prognose ist mit einer langfristigen Überlebensrate von weniger als 11% seit vielen Jahren unverändert schlecht, da die Tumoren meist erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert werden. Der Krankheitsverlauf auch von Patienten, die zunächst mit kurativer Zielsetzung operiert wurden, wird entscheidend von dem Auftreten und Ort der Metastasierung geprägt. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind bereits ca. 70% der Kleinzelligen- und 35% der Nicht-Kleinzelligen-Karzinome in andere Organe metastasiert (Wiethage *et al.* 2000). Patienten mit einer Diagnose des Lungenkarzinoms im Stadium I mit einer Tumorgroße ≤ 1 cm haben therapiert eine deutlich bessere Überlebensrate von mehr als 50% (Harpole *et al.* 1995). Lungentumoren entwickeln sich aus prämaligen Läsionen, die an verschiedenen Stellen innerhalb des bronchoalveolären Epithels entstehen können. Dieser Feldkanzerisierungs-Prozeß ist auf eine wiederholte Exposition der Lunge gegenüber Karzinogenen zurückzuführen. Der wesentlichste Kausalfaktor für die Entstehung bösartiger Lungentumoren ist mit rund 90% der Abusus von Tabakprodukten. 85-90% der Lungentumorpatienten sind Raucher und ca. 20% aller Raucher erkranken an bösartigen Lungentumoren (Kreuzer *et al.* 1998, Kreuzer *et al.* 1999, Mannino *et al.* 1998). Neben chronischen Tabakabusus sind noch weitere inhalative Noxen bekannt, welche die Entstehung von Lungentumoren begünstigen. Dazu gehören radioaktive Stäube, Asbest, Silikate, Arsen, Chromdämpfe, Kokereirohgase und Nickeldämpfe (Butz 1999, Haugen 2000). Die stadienhafte Ausdehnung eines Lungenkarzinoms ist in der TNM-Klassifikation festgelegt (Sobin und Wittekind 1997). Dabei steht „T“ für Tumorausdehnung, „N“ für Lymphknoten-Beteiligung und „M“ für Fernmetastasierung. Die histologische Klassifikation der Lungentumoren wurde zuletzt 2004 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) revidiert (Travis *et al.* 2004). Diese WHO-Klassifikation unterscheidet bei den bösartigen epithelialen Neubildungen neben Kleinzelligen Karzinomen u. a. folgende Hauptgruppen Nicht-Kleinzelliger Karzinome: Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, großzellige Karzinome und adenosquamöse Karzinome. Das Plattenepithelkarzinom (SCC) entwickelt sich aus dem Bronchialepithel hauptsächlich der Haupt-, Lappen- und Segmentbronchien, wobei relative Veränderungen des Bronchialepithels in Form einer Reservezellhyperplasie und Plattenepithelmetaplasie Vorläuferläsionen dar-

stellen. Das Adenokarzinom (AC) findet man vornehmlich in der Lungenperipherie. Es entwickelt sich aus dem schleimbildenden Epithel der Bronchien (zentrales AC) oder aus Clara-Zellen und/oder Alveozyten vom Typ II (peripheres AC). Die Häufigkeit des AC steigt derzeit weltweit an, ca. 35% aller Lungenkarzinome sind AC und ca. 32% SCC. In bis zu 50% aller Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC) findet man eine Vermischung von unterschiedlichen histologischen Typen. Das Kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) entsteht ähnlich dem SCC bevorzugt in zentralen Bronchien. Man vermutet, daß es sich aus pluripotenten bronchialen Vorläuferzellen ableitet. SCLC machen 15-20% aller Lungenkarzinome aus.

1.5.1 Lungenkarzinom-Diagnostik

Es gibt bildgebende, zytologische und histologische Diagnoseverfahren zum Nachweis von Lungenkarzinomen. In einem konventionellen Thorax-Röntgenbild lassen sich Knoten in der Lunge ab einer Größe von ca. 1,5 cm nachweisen. Zumeist befindet sich der Tumor dann in einem fortgeschrittenen Stadium und ist nicht mehr kurabel. 1992 wurde die ebenfalls auf Röntgenstrahlung basierende Spiral Computer Tomographie (Spiral CT) eingeführt, mit der sich Knoten ab 3-5 mm Größe nachweisen lassen. In großen Studien wie dem Early Lung Cancer Action Project (ELCAP) wurde die Nutzung des Spiral CT's als Screening Methode für Hochrisikopatienten überprüft (Henschke *et al.* 1999). Bei 2,7% (27/1000) der Studienteilnehmer konnte ein Tumor diagnostiziert werden, 24 davon befanden sich im Stadium I und 23 von 24 Patienten waren operabel. Nachteilig beim Spiral CT-Screening ist, daß bei einer hohen Zahl von Hochrisikopatienten (ca. 20-30%) verdächtige Knoten in der Lunge nachgewiesen werden, die sich im Follow-up als nicht maligne herausstellen (Henschke *et al.* 1999). Das Spiral CT ist eine bildgebende Technik, die für ein Massenscreening prinzipiell geeignet ist. Die Sensitivität und Spezifität der Methode, sowie die Frage nach einer Reduktion der Mortalität, müssen in weiteren Studien überprüft werden.

Die Fluoreszenz-Bronchoskopie (*laserlight induced fluorescence endoscopy*, LIFE) nutzt die Autofluoreszenz des Lungenepithels zur Detektion von Tumoren und Vorläuferläsionen. Dysplastisches und malignes Gewebe weisen im Vergleich zu Normalgewebe eine schwächere Fluoreszenz bei 442 nm auf (Hung *et al.* 1991). Die LIFE eignet sich nur bedingt zum Screening von Hochrisikopatienten, da es sich um eine invasive Maßnahme handelt, die nur zentral liegende Tumore nachweisen kann und eine schlechte Spezifität besitzt.

Während einer Bronchoskopie ist es möglich, zur histologischen Sicherung Biopsien und zur zytologischen Sicherung Bronchialsekrete und –bürstungen zu entnehmen. Bei der Bronchoskopie können dabei histologisch nur mit dem Bronchoskop erreichbare Tumoren biopsiert werden. In ca. 40% aller Fälle ist ein Tumor erst nach wiederholten invasiven Maßnahmen histologisch diagnostizierbar. Bronchialbürsten ermöglichen ebenfalls nur die Beurteilung lokal abgegebürsteter Zellen. Das Bronchialsekret beinhaltet dagegen abgeschilferte Zellen aus verschiedensten Bereichen der Lunge. Damit ist auch eine Sicherung peripher liegender Tumoren prinzipiell möglich. Das Sputum weist ebenfalls ein vergleichbar großes Spektrum an Zellen aus der Lunge auf und kann nicht invasiv gewonnen werden. Es wurde bereits mehrfach versucht, an Sputum eine zytologische Vorsorge für Hochrisikopatienten zu etablieren. Aus verschiedenen Gründen, z.B. wegen des Desinteresses der betroffenen Gruppen an diesem Test oder der unzureichenden Aufklärung über die technische Abgabe eines diagnostisch nutzbaren Sputums, bleibt bislang eine größere Akzeptanz dieser Vorsorgemaßnahme aus.

1.5.2 Molekularbiologische Veränderungen des Lungenkarzinoms

Lungenkarzinome sind sowohl histomorphologisch als auch hinsichtlich ihrer molekularbiologischen Veränderungen sehr heterogen. Trotzdem lassen sich für einige histologische Subtypen charakteristische genetische Defektmuster bestimmen. Die Entstehung der Lungenkarzinome vollzieht sich in mehreren Stufen. Genetische Prädispositionen, speziell Polymorphismen von Karzinogenaktivierungs- und -desaktivierungsenzyme erklären, weshalb manche Individuen trotz entsprechender Exposition kein Karzinom entwickeln (Remmele 1997).

Bei der Genese und Progression von bösartigen Lungentumoren spielen molekulare Mechanismen wie z.B. veränderte Genexpression, Punktmutationen, Amplifikationen oder Deletionen kleiner Genomabschnitte eine zentrale Rolle. Besonders häufig sind Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53*, die in 70% der SCLC und in 47% aller NSCLC zu finden sind (Greenblatt *et al.* 1994). In dem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, daß Methylierung des *p53*-Gens die Bindung von Benzo-a-pyren – einem Karzinogen aus dem Tabakrauch – an Guanin Reste fördert. Dies führt zu einer erhöhten G nach T Transitionsrate (Pfeifer *et al.* 1984, Pfeifer *et al.* 2000). Punktmutationen in Onkogenen finden sich beim Lungenkarzinomen in der *RAS*-Familie. *K-RAS* Mutationen sind bei AC in bis zu 44% und bei SCLC in 0% nachgewiesen worden (Clayton *et al.* 2000).

Weiterhin sind eine Überexpression der Onkogene *EGFR*, *HER2*, *c-MYC*, *n-MYC*, *L-MYC*, *RAF1*, *FOS*, *JUN*, *BCL-2*, *MYB*, *MDM2*, *KIT* und Deletionen in den Tumorsuppressorgenen *RB*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *FHIT*, *VHL* beschrieben worden (Wiethage *et al.* 2000).

Die komparative genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridization*, CGH) konnte beim SCLC bevorzugt Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p), dem langen Arm von Chromosom 10 (10q) und den Chromosomenarmen 4q, 5q, 13q und 17p nachweisen. Amplifikationen wurden auf 3q und auf 5p beschrieben (Balsara und Testa 2002). AC besitzen gehäuft Verluste auf Chromosom 9 und 19, Zugewinne finden sich auf Chromosom 1. SCC zeigen häufige Verluste auf Chromosom 2 und Zugewinne auf Chromosom 3 (Balsara und Testa 2002). Die CGH-Muster erlauben allerdings im Einzelfall keinen Rückschluß auf den führenden histologischen Tumortyp. Für die Entstehung und Progression von Lungentumoren stellen chromosomale Veränderungen offenbar eine wesentliche Ursache dar. Wie es zu dieser Chromosomeninstabilität kommt, ist bisher noch unklar.

Neben der bereits unter 1.5.3 erwähnten DNA-Hypermethylierung spielt offenbar die globale Hypomethylierung bei der Tumorentstehung eine Rolle. Studien weisen darauf hin, daß Hypomethylierung genetische Instabilität, eine Reaktivierung von transponierbaren Elementen und eine erhöhte Mutationsrate fördert (Feinberg 2004). Bislang gibt es nur wenige Arbeiten, die die Hypomethylierung von Lungentumoren - hauptsächlich an NSCLC-Karzinomen - untersucht haben. Generell wurde eine verminderte Methylierung der DNA in Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe nachgewiesen (Piyathilake *et al.* 2003, Feinberg und Vogelstein 1983). Die Mechanismen der globalen Hypomethylierung sind noch nicht gut erforscht. Neben einer passiven Demethylierung (Jost und Bruhat 1997) wurden auch biochemische Wege diskutiert (Razin *et al.* 1986, Vairapandi und Duker 1993, Jost & Jost 1995).

1.5.3 Promotor-Methylierung an histologischem Material der Lunge

In Lungenkarzinomen ist der Methylierungsstatus der Promotoren von weit über 40 Genen bekannt. Für die Untersuchungen wurden Biopsien, Resektate oder Zelllinien von Lungenkarzinomen verwendet. Die Tabelle 1.1 soll einen Überblick über Promotoren mit hoher Methylierungsfrequenz geben. Die Heterogenität der Proben und die verschiedenen Untersuchungsmethoden lassen nur bedingt einen Vergleich der Ergebnisse zu. So wird z.B. bei einem methylierungssensitiven Restriktionsenzymverdau nur eine

minimale Anzahl von CpG-Dinukleotiden untersucht, wohingegen eine genomische Sequenzierung nach Bisulfitkonversion eine größere Anzahl von CpG-Dinukleotiden erfaßt. Weiterhin wurden in den einzelnen Studien unterschiedliche Regionen innerhalb eines Promotors untersucht, was ebenfalls das Ergebnis beeinflusst, da das Methylierungsmuster der CpG-Inseln nicht uniform sein muß (Zheng *et al.* 2000). In vielen Fällen wurde die aberrante Promotormethylierung von Zelllinien untersucht. Der Vorteil bei der Arbeit mit Zelllinien gegenüber histologischem Material liegt darin, daß die Menge von DNA unlimitiert ist und Versuche - z.B. zur Expression von Genen - problemlos möglich sind. Während Analysen zum globalen Methylierungsstatus der DNA zeigten, daß Zelllinien stärker methyliert sind als die Primärtumoren, bleibt die Herkunft dieses Unterschieds unklar (Flatau *et al.* 1983, Smiraglia *et al.* 2001). Für viele der in Tabelle 1.1 aufgeführten Promotoren liegt die in Zelllinien gefundene Methylierungsfrequenz innerhalb der Spannweite der Methylierungsfrequenz des Tumorgewebes (z.B. *APC*, *CDH1*, *CDH13*, *CDKN2A* und *RASSF1A*). Dieses Ergebnis legt nahe, Zelllinien zum Screening auf aberrante Promotormethylierungen zu verwenden.

Tabelle 1.1: Literaturübersicht - Aberrante Promotormethylierung in Lungenkarzinomgewebe. NSCLC = Nicht-Kleinzellige Tumoren, SCLC = Kleinzellige Tumoren, MSP = methylierungsspezifische PCR, QMSP = quantitative methylierungsspezifische PCR, BGS = *bisulfite genomic sequencing*.

Gen	Methylierung		Methode	Literatur
	NSCLC	SCLC		
<i>APC</i>	72-96%	58%	MSP, QMSP	Brabender <i>et al.</i> 2001; Harden <i>et al.</i> 2003; Usadel <i>et al.</i> 2002; Virmani <i>et al.</i> 2002
<i>CDKN2A</i>	9-68%	5-9%	MSP	Ahrendt <i>et al.</i> 1999; Chan <i>et al.</i> 2002; Chen <i>et al.</i> 2002; Harden <i>et al.</i> 2003; Toyooka <i>et al.</i> 2001a; Toyooka <i>et al.</i> 2003
<i>CDH1</i>	18-28%	21%	MSP	Virmani <i>et al.</i> 2002; Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2001a
<i>CDH13</i>	43-50%	20-71%	MSP	Esteller <i>et al.</i> 1999a; Toyooka <i>et al.</i> 2001b
<i>DAPK</i>	19-44%	-	MSP	Tang <i>et al.</i> 2000; Kim <i>et al.</i> 2001a
<i>FHIT</i>	37-64%	64%	MSP	Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2001b; Virmani <i>et al.</i> 2002
<i>GSTP1</i>	7-40%	59%	MSP	Esteller <i>et al.</i> 1999a; Virmani <i>et al.</i> 2002
<i>MGMT</i>	19-47%	0-19%	MSP	Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2001a; Esteller <i>et al.</i> 1999b; Toyooka <i>et al.</i> 2001a
<i>RARB2</i>	35-43%	45-62%	MSP	Toyooka <i>et al.</i> 2001a; Virmani <i>et al.</i> 2000
<i>RASSF1A</i>	30-88%	72-100%	BGS, MSP	Dammann <i>et al.</i> 2000; Agathangelou <i>et al.</i> 2001; Burbee <i>et al.</i> 2001; Sato <i>et al.</i> 2002

1.5.4 Promotor-Methylierung an zytologischem Material der Lunge

Nur wenige Arbeiten zur Promotor-Methylierung wurden an zytologischen Material der Lunge – Bronchialsekreten (BRS), Bronchialbrüsten (BRB) und Sputen – durchgeführt. Eine Literaturübersicht zu den bisherigen Studien findet sich in Tabelle 1.2 für BRS und 1.3 für Sputen. Generell stellt man fest, daß die Methylierungsfrequenz der Promotoren in zytologischem Material niedriger als im Tumorgewebe ist.

Tabelle 1.2: Literaturübersicht - Aberrante Promotormethylierung in Bronchialsekreten.
NSCLC = Nicht-Kleinzellige Tumoren, SCLC = Kleinzellige Tumoren, NT = Nicht-Tumor-Patienten,
QMSP = quantitative methylierungsspezifische PCR, MSP = methylierungsspezifische PCR

Gen	Methylierung			Methode	Literatur
	NSCLC	SCLC	NT		
<i>APC</i>	16%	-	-	QMSP	Topaloglu <i>et al.</i> 2004
<i>CDKN2A</i>	3-25%	-	0%	1-Schritt MSP, QMSP	Topaloglu <i>et al.</i> 2004; Ahrendt <i>et al.</i> 1999; Kurakawa <i>et al.</i> 2001; Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2003
<i>CDH1</i>	42%	-	-	QMSP	Topaloglu <i>et al.</i> 2004
<i>CDH13</i>	-	-	5%	1-Schritt MSP	Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2003
<i>DAPK</i>	21%	-	-	1-Schritt MSP	Chan <i>et al.</i> 2002
<i>GSTP1</i>	3%	-	-	QMSP	Topaloglu <i>et al.</i> 2004
<i>MGMT</i>	9-23%	-	-	1-Schritt MSP, QMSP	Chan <i>et al.</i> 2002; Topaloglu <i>et al.</i> 2004
<i>RARB2</i>	0-71%	-	9%	1-Schritt MSP, QMSP	Topaloglu <i>et al.</i> 2004; Chan <i>et al.</i> 2002; Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2003
<i>RASSF1A</i>	13%	-	5%	1-Schritt MSP, QMSP	Topaloglu <i>et al.</i> 2004; Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2003

Die meisten Arbeiten zur aberranten Promotormethylierung an zytologischem Material sind mit einer konventionellen PCR (MSP) im Anschluß an eine Bisulfitkonversion durchgeführt worden. Bei den Sputen wurde die Sensitivität des Methylierungsnachweises durch eine 2- oder 3-Schritt-PCR zusätzlich erhöht. Die QMSP besitzt durch die Verwendung der sog. TaqMan[®]-Sonde und eines Fluoreszenzfarbstoffs zum Nachweis der PCR-Reaktion eine ähnlich hohe Sensitivität. So kann ein methyliertes Allel unter

5.000 bis 10.000 unmethylierten Allelen detektiert werden. Die Spezifität der QMSP ist höher als die der MSP, da die QMSP quantifizierbar ist und somit ein Schwellenwert (Cut-off) in der Auswertung verwendet werden kann.

Die Ergebnisse zur aberranten Methylierung in Bronchialsekreten und Sputen wurden nahezu ausschließlich an NSCLC-Patienten gewonnen. Kritische Kontrollen, z.B. von Patienten mit Nikotinabusus jedoch ohne Tumorleiden, wurden selten untersucht. Daher läßt sich oft keine Aussage bezüglich der Spezifität von Methylierungsmarkern machen.

Tabelle 1.3: Literaturübersicht - Aberrante Promotormethylierung in Sputen.

NSCLC = Nicht-Kleinzellige Tumoren, SCLC = Kleinzellige Tumoren, NT = Nicht-Tumor-Patienten, QMSP = quantitative methylierungsspezifische PCR, MSP = methylierungsspezifische PCR, RE-Verdau = Restriktionsenzymverdau.

Gen	Methylierung			Methode	Literatur
	NSCLC	SCLC	NT		
<i>CDKN2A</i>	58-90%	40%	12-35%	2- und 3-Schritt MSP	Palminsano <i>et al.</i> 2000; Kersting <i>et al.</i> 2000; Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2003; Belinsky <i>et al.</i> 2002
<i>CDH13</i>	-	-	7-10%	1-Schritt MSP	Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2003
<i>DAPK</i>	21%	-	-	1-Schritt MSP	Belinsky <i>et al.</i> 2002
<i>hMLH1</i>	38%	-	-	RE-Verdau	Wang <i>et al.</i> 2003
<i>MGMT</i>	52%	-	14-30%	2-Schritt MSP	Palminsano <i>et al.</i> 2000; Belinsky <i>et al.</i> 2002; Gilliland <i>et al.</i> 2002
<i>RARB2</i>	-	-	23-27%	1-Schritt MSP	Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> 2003
<i>RASSF1A</i>	21%	50%	3-31%	1-Schritt MSP	Belinsky <i>et al.</i> 2002; Honorio <i>et al.</i> 2003

1.6 Biomarker zur Diagnose von Lungenkarzinomen

Die inzwischen immer umfangreicheren Kenntnisse der molekularen Genetik bösartiger Lungentumoren bilden die Grundlage für die Entwicklung molekularer Biomarker. Die Suche nach einem geeigneten Biomarker umfaßt dabei ein breites Spektrum sowohl der methodischen Ansätze als auch der genetischen Alterationen selbst.

Im Idealfall sollte ein Biomarker an nicht- bzw. minimal-invasiv gewonnenem Untersuchungsmaterial anwendbar sein und möglichst keine die übliche Routineabläufe störenden Anforderungen stellen. Für das Lungenkarzinom eignen sich daher insbesondere

Sputen, Bronchialsekrete und Bronchialbürsten als Untersuchungsmaterial. Die Bearbeitung und Auswertung der molekularbiologischen Analysen sollte kostengünstig und schnell erfolgen können. Gerade im diagnostischen Alltag, in dem die Ärzte auf die Diagnosen angewiesen sind und die Patienten in Unsicherheit auf ein Ergebnis warten, sollte ein molekularbiologischer Test möglichst wenig Zeit in Anspruch nehmen. Um eine hohe Sensitivität und Spezifität zu gewährleisten, sollten die als Biomarker verwendeten genetischen Alterationen bei Tumorpatienten eine hohe Prävalenz aufweisen, bereits im Frühstadium der Tumorerkrankung nachweisbar sein und bei Patienten ohne Tumorerkrankung nicht auftreten.

1.6.1 Besonderheiten der molekularen Zytopathologie

Der Einsatz molekularbiologischer Verfahren an Präparaten der pulmonalen Exfoliativzytologie weist gegenüber entsprechender Untersuchungen an Tumorgewebe Besonderheiten auf. Die Fixierung der zytologischen Materialien in Saccomanno Fixativ (50% Ethanol, 2% Polyethyleneglycol 5.000) erhält die DNA in hochmolekularem und chemisch unmodifizierten Zustand (Grote *et al.* 2003a). Dagegen wird die DNA aus Gewebeproben der Histopathologie durch die verwendete Formalinfixierung fragmentiert und chemisch modifiziert (Srinivasan *et al.* 2002). Ein wesentlich limitierender Faktor für die Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen an zytologischem Material ist die geringe Anzahl von Tumorzellen in einem Überschuß von Nichttumorzellen. Dies setzt eine hohe Sensitivität des zu verwendenden Tests voraus.

1.6.2 Mutationen als Biomarker

In der zweiten Hälfte der 90er Jahre wurde mit der Entwicklung molekularer Biomarker an Mutationen begonnen, deren Nachweis man zum Tumorzell-Screening verwenden wollte. Die Verfahren benutzten in der Regel mehrere hintereinander geschaltete PCR-Schritte und waren dadurch hochsensitiv, allerdings auch methodisch aufwendig. Typische Beispiele stellen die *Single Strand Polymorphism* (SSCP) -Untersuchungen und sog. Systeme der amplifizierungsresistenten Mutation (ARMS) dar. Das zentrale Problem der Verfahren ist, daß sie ursprünglich zum Nachweis bekannter Mutationen entwickelt wurden und darum ein Gen nur punktuell untersuchen können. Da nur 23% der p53-Mutationen in sechs sog. „hot-spot“-Regionen liegen, ist die Mutations-Prävalenz bei alleiniger Untersuchung dieser hot-spots bei etwa 15% anzusetzen (Greenblatt *et al.* 1994). Dieser theoretische Wert der Mutationsfrequenz wird von zwei Studien, die an

zytologischem Exfoliativmaterial aus der Lunge durchgeführt wurden, deutlich überschritten, so daß sich die Frage nach der Spezifität der betreffenden Untersuchungen stellt (Behn *et al.* 1998a, Behn und Schuermann 1998b).

Das Gen *K-RAS* ist grundsätzlich für ein punktuelles Screening geeigneter, da 80% der Punktmutationen in Codon 12 auftreten, allerdings besitzt es für den Einsatz als Biomarker eine zu niedrige Prävalenz und Spezifität (Wiethage *et al.* 2000).

1.6.3 Chromosomenaberrationen als Biomarker

Zum Nachweis von Deletionen, Amplifikationen und Aneuploidie eignet sich die Mehrfachfarben Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Mit diesem Verfahren können sowohl gefärbte als auch ungefärbte fixierte Ausstrichpräparate untersucht und die Ergebnisse mit der konventionellen Zytomorphologie korreliert werden. Damit eignet sich die FISH insbesondere als adjuvante diagnostische Methode bei unklaren morphologischen Befunden. Die hohen Kosten für die benötigten DNA-Sonden und die zeitaufwendige Auswertung behindern allerdings eine breite diagnostische Anwendung im Rahmen des Tumorzell-Screenings (Sokolova *et al.* 2002).

1.6.4 Aberrante Promotor-Methylierung als Biomarker

Seit Anfang 2000 wird aberrante Promotormethylierung in Sputen untersucht. Besonders hervorzuheben ist die Arbeit von Palmisano und seinen Mitarbeitern, die *CDKN2A* und/oder *MGMT* Promotormethylierung in 100% der Sputen von Patienten mit Plattenepithelkarzinom teils bis zu drei Jahren vor der klinischen Diagnosestellung nachwiesen (Palmisano *et al.* 2000). In der Studie wurden auch Sputen von 123 Hochrisikopatienten, die Zigarettenrauch und/oder Radon-Strahlung ausgesetzt waren, untersucht. Bei dieser Gruppe wurde eine Promotormethylierung von *CDKN2A* und *MGMT* in 15% bzw. 25% nachgewiesen. Die Ergebnisse zur Methylierung in Sputen allgemein zeigen, daß die zu erlangende Spezifität an dem Material sehr begrenzt ist. Deshalb schlug Belinsky in einem Review 2004 folgendes Modell vor: an Stelle einzelner definitiver Tumormarker will er aberrante Methylierung verschiedener Gene in einem Panel kombinieren und dieses zu einer Risikoabschätzung nutzen. Dieses Modell prognostiziert eine Steigerung des Lungenkarzinomrisikos für Raucher und Exraucher proportional zur Anzahl der Gene, die in Sputen eine Promotormethylierung aufweisen. Ab einem gewissen Risikolevel sollen dann zusätzliche diagnostische Maßnahmen wie z.B. das Spiral CT oder eine Bronchoskopie zur Früherkennung hinzugezogen werden.

1.7 Ziel der Arbeit

Nicht selten sind bis zur endgültigen Diagnose eines Lungenkarzinoms mehrere invasive Untersuchungen erforderlich, die für den Patienten belastend sind (Schreiber und McCrory 2003). Die Entwicklung eines molekularbiologischen Tests an zytologischem Restmaterial würde eine ideale Ergänzung zur Diagnostik darstellen und könnte sowohl die Zahl der Wiederholungsbronchoskopien als auch die Notwendigkeit weiterer invasiver Untersuchungen senken.

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit der Extraktion und dem Erhaltungszustand der DNA aus Saccomanno fixierten Bronchialsekreten und Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Gewebeproben. In bisherigen Publikationen gibt es zur Extraktion von DNA aus zytologischem Material kaum verwertbare Informationen. Deshalb sollten vier verschiedene Extraktionsprotokolle überprüft werden, um letztendlich die geeignetste Methode für die geplanten Experimente festzulegen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein molekularbiologischer Test entwickelt werden, der die zytologische Diagnostik von Lungenkarzinomen erhärtet und ergänzt. Als Marker sollten aberrante Methylierungsmuster von Promotorregionen dienen. Eine sensitive Methode zum Nachweis methylierter, aus Bronchialsekreten bzw. Formalin-fixiertem Gewebe isolierter DNA sollte etabliert werden. Die Sensitivität und Spezifität der Methylierung verschiedener Promotorregionen zum Nachweis von Tumorzellen sollte zunächst im Fall-Kontroll-Studien Design überprüft werden. Durch eine Kombination geeigneter Marker sollte letztendlich ein möglichst sensitiver und spezifischer Test entwickelt werden. Im Rahmen einer retrospektiven Kohorten-Studie sollte abschließend die Tauglichkeit des diagnostischen Tests am alltäglichen Einsendegut überprüft werden. In weiteren Untersuchungen sollten die an Bronchialsekreten gewonnenen Ergebnisse mit dem entsprechenden histologischen Material abgeglichen werden.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Phänomen der globalen Hypomethylierung in Karzinomen. Hier sollte die Frage geklärt werden, ob Hypomethylierung als Tumormarker einsetzbar ist und ob ein Zusammenhang zwischen Gen-spezifischer Hyper- und globaler Hypomethylierung zu finden ist.

2. Material und Methoden

2.1 Humane Zelllinien und ihre Kultivierung

Alle Zelllinien wurden von der American Type Cell Culture (ATCC) bezogen. Der Zellstamm Wi-38 wurde von Dr. G. G. Maul, Wistar Institut, Philadelphia, USA, zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien HT-29, NCI-H522, T24 und der Zellstamm Wi-38 (s. Tab. 2.1) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit stabilisiertem Glutamin, 15% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wuchsen adhärent in 175 cm² Kulturflaschen mit je 15 ml Medium. Sie wurden alle 2-5 Tage 1:3 bis 1:5 passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin / EDTA (0,02% / 0,05%) für 2 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden vom Flaschenboden abgelöst und das Trypsin durch Zugabe von 12 ml frischem Medium inaktiviert. Je 3 ml Zellsuspension wurden in neue Kulturflaschen überführt und mit Medium auf 15 ml aufgefüllt.

Zum Anlegen von Gefrierkulturen wurden die Zellen nach der Behandlung mit Trypsin in 1 ml eiskalten FCS / 10% DMSO suspendiert und in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren und für die Versuche gelagert. Die Stocklösungen wurden nach 24 Stunden bei -80°C in Stickstoff überführt. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde diese möglichst kurz aufgetaut und direkt in 10 ml Medium aufgenommen.

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Angegeben sind die offiziellen Namen und Nummern der Zelllinien bei der American Type Culture Collection (ATCC), das Ursprungsgewebe, die Morphologie und eventuelle Besonderheiten.

Name	ATCC-Nr.	Gewebe; Morphologie	Besonderheit
NCI-H522	CRL-5810	Lunge, Adenokarzinom	Mutation in p53 Codon 191
HT-29	HTB-38	Colon, Adenokarzinom	Mutation in p53 Codon 273
T24	HTB-4	Harnblase, Urothelkarzinom	G3-4
Wi -38	CCL-75	Lunge, Fibroblasten	-

2.2 Bronchialsekrete, Sputen und Formalin-fixiertes Gewebe

2.2.1 Verarbeitung und Quantifizierung von Tumorzellen in Bronchialsekreten

Bronchialsekrete wurden während einer Bronchoskopie von Patienten mit Verdacht auf ein Lungenkarzinom gewonnen. Direkt nach Entnahme wurden sie im Verhältnis 1:5 mit Saccomanno-Fixativ (50% Ethanol / 2% Polyethylenglycol 1500 / 60 mg/l Rifampicin) versetzt und zum Institut für Cytopathologie, Heinrich-Heine-Universität (HHU), Düsseldorf, geschickt. Die Proben wurden hier zunächst bei 670 x g für 5 min zentrifugiert. Ein Teil des Zellsediments wurde zur Herstellung von zytologischen Ausstrichpräparaten verwendet, die nach Papanicolaou-Färbung in der diagnostischen Routine befundet wurden. Die restlichen Zellen wurden in Saccomanno-Fixativ resuspendiert und im Kühlschrank bei 4°C für spätere molekularbiologische Untersuchungen verwahrt. Die klinischen Befunde der Patienten wurden durch Aktendurchsicht bei den behandelnden Ärzten erhoben. Die Tumorzellzahl in Bronchialsekreten wurde semiquantitativ an den 4 Routineobjektträgern bestimmt. Die zytologisch Tumorzell-positiven Fälle wurden dabei in zwei Gruppen unterteilt: a) Präparate mit wenigen Tumorzellen, d. h. einzelne Tumorzellen oder kleine Tumorzellgruppen in bis zu drei Regionen (Tu +) und b) multiple Tumorzellen, d. h. einzelne Tumorzellen oder kleine Tumorzellgruppen in mindestens vier Regionen oder größere Tumorzellkomplexe (Tu ++). Die zytologischen diagnostischen Gruppen dringender Verdacht, zweifelhaft und falsch-negativ wurden im Artikel „Standardization of cytopathologic diagnosis“ definiert (Böcking 1998).

2.2.2 Sputen

In Saccomanno fixierte Sputen wurden mit 2% (w/v) DTT-Lösung im Verhältnis 1:10 behandelt um den Schleim zu auflösen. Für die Routine wurden vier Ausstriche auf Objektträger angefertigt. Die restlichen Zellen wurden in Saccomanno-Fixativ resuspendiert und im Kühlschrank bei 4°C für spätere molekularbiologische Untersuchungen verwahrt.

2.2.3 Gewebe

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gerharz, Institut für Pathologie, Bethesda Krankenhaus Duisburg, konnte auf archiviertes, Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe zurückgegriffen werden.

2.3 Verwendeten Kollektive

2.3.1 Fall-Kontroll-Studien Kollektiv

Im Fall-Kontroll-Studien Design wurden insgesamt 314 Bronchialsekrete von 297 Patienten, bei denen primär ein Verdacht auf ein Lungenkarzinom bestand, untersucht. Alle Patienten wurden in einem Zeitraum von Juli 2001 bis Juni 2003 bronchoskopiert. Von 16 Patienten wurden zwei und von einem Patienten drei Bronchialsekrete in die Fall-Kontroll-Studien einbezogen. Diese Bronchialsekrete wurden entweder zeitgleich oder bei einer nachfolgenden Bronchoskopie entnommen.

Tabelle 2.2: Angaben zum Fall-Kontroll-Studien Kollektiv. Die Tabelle ist unterteilt in Daten für die Nicht-Tumorgruppe (NT) und Tumor Gruppe (Tu). Angegeben ist der Median des Alters mit der Altersspanne der Patienten, das Geschlecht, der Nikotinabusus, das Tumorstadium und die Histologie. Bei „Stadium – entfällt“ sind die extrapulmonalen Primärtumoren mit Metastasierung in die Lunge zusammengefaßt.

	NT-Pat. n = 85	Tu-Pat. n = 212
Alter	65 (21-82)	65 (37-89)
Geschlecht		
weiblich	33	67
männlich	52	145
Raucher Status		
Raucher	22	88
Ex-Raucher	24	51
keine Angaben	39	73
Stadium		
I		6
II		2
III		20
IV		45
limited disease		29
extensive disease		10
unvollständige Daten		94
entfällt		6
Histologie		
AC		68
SCC		65
NSCLC _{andere}		26
SCLC		47
cSCLC		6

Die Nicht-Tumorgruppe umfaßte 89 Bronchialsekrete von 85 Patienten. Bei diesen Fällen wurden folgenden gutartigen Lungenerkrankungen diagnostiziert: 6x Asthma bronchiale, 39x chronische obstruktive Bronchitis, 5x Lungenembolie, 2x Lungenfibrose, 2x obstruktive Schlafapnoe Syndrom, 23x Pneumonie, 1x Sarkoidose und 7x Tuberkulose. Die Gruppe der malignen Erkrankungen umfaßte 225 Bronchialsekrete von 212 Patienten mit folgender Tumordiagnosen 68 AC, 64 SCC, 26 NSCLC_{andere}, 47 SCLC und 6 kombinierte SCLC (cSCLC). Die Tumortypisierung wurde nach den Richtlinien der „WHO Histological typing of Lung and Pleural Tumours“ (3. Auflage 1999) unter Verwendung der zytologischen und histologischen Gutachten durchgeführt. Angaben zu Alter, Geschlecht, Raucher-Status und Tumorstadien sowohl der Tumor- als auch der Nicht-Tumorgruppe wurden in Tabelle 2.2 zusammengefaßt.

2.3.2 Kohorten-Studien Kollektiv

Im Zeitraum vom 07.07.2002 bis zum 31.10.2002 wurden insgesamt 400 Bronchialsekrete aus der Abteilung für Pneumologie des Florence-Nightingale-Krankenhauses, Düsseldorf, kontinuierlich gesammelt. Aus diesem Kollektiv wurde jeweils die erste Einsendung des Patienten für eine retrospektive Kohorten-Studie verwendet. Bei zeitgleicher Einsendung mit mehrerer Bronchialsekrete wurde grundsätzlich das mit positiver zytologischer Diagnose molekularbiologisch untersucht. Bei negativer zytologischer Diagnose wurde ein Bronchialsekret für die Studie zufällig ausgewählt. Im Kohortenstudien-Design wurden Bronchialsekrete von insgesamt 235 Patienten (103 Nicht-Tumor-, 111 Lungentumor- und 21 sonstigen Patienten) untersucht. 108 Bronchialsekrete dieses Kollektivs wurde bereits in der oben beschriebenen Fall-Kontroll-Studie verwendet. Angaben zum Alter, Geschlecht und den Nikotinabusus der einzelnen Gruppen befinden sich in Tabelle 2.3. Die Kategorie Nicht-Tumorpatienten umfaßte Bronchialsekrete von Patienten mit Verdacht auf ein Lungenkarzinom, das im Rahmen der durchgeführten diagnostischen Maßnahmen ausgeschlossen werden konnte. Bei diesem Kollektiv handelt es sich um Risikopatienten, bei denen folgende gutartige Lungenerkrankungen diagnostiziert wurden: Asthma bronchiale, chronische obstruktives Bronchitis, Lungenembolie, Lungenfibrose, obstruktive Schlafapnoe Syndrom, Pneumonie, Sarkoidose und Tuberkulose. In der Gruppe der Tumorpatienten befanden sich 86 NSCLC und 25 SCLC. Die Gruppe schloß auch 33 Nachsorge-Patienten, ein Bronchialsekret aus der dem Tumor gegenüberliegenden Lunge und ein Bronchialsekret von einem Patienten 5 Monate vor Tumorerstdiagnose mit ein. Eine genaue Aufschlüsselung

nach Tumortyp und Staging ist in Tabelle 2.3 angegeben. Die Gruppe der 21 sonstigen Fälle umfaßte 4 Bronchialsekrete von Patienten mit Metastasen, ein Bronchialsekret von einem Morbus Hodgkin Fall mit mittlerer Dysplasie der Bronchialschleimhaut und 16 Bronchialsekrete von Patienten mit sonstigen Malignomen. Bei den sonstigen Malignomen konnten drei nicht nach dem Referenzstandard (zytologische oder histologische Sicherung) bewertet werden. Die verbliebenen 13 Fälle sind Patienten mit CUP-Syndrom (1), epithelalem Mesotheliom (3), Pleuramesotheliom (3), Larynx-Karzinom (1), Mesenchymom (1), Morbus Hodgkin (1), Non-Hodgkin-Lymphom der Lunge (1), Pharynx-Karzinom (1) und pulmonalem Blastom (1).

Tabelle 2.3: Angaben zum retrospektiven Kohortenstudien-Kollektiv.

Die Tabelle ist unterteilt in Daten für die Nicht-Tumorgruppe (NT), die Tumor Gruppe (Tu) und sonstige Patienten. Angegeben sind der Median des Alters mit der Altersspanne der Patienten, das Geschlecht, der Nikotinabusus, das Tumorstadium und die Histologie.

	NT-Pat. n = 103	Tu-Pat. n = 111	Sonstige n = 21
Alter	63 (21-82)	64 (43-83)	66 (34-83)
Geschlecht			
weiblich	39	45	10
männlich	64	66	11
Raucher Status			
Niemalsraucher	4	1	4
Raucher	40	61	7
Ex-Raucher	40	29	4
keine Angaben	18	20	7
Stadium			
I		26	
II		5	
III		27	
IV		20	
limited disease		11	
extensive disease		7	
unvollständige Daten		1	
entfällt		14	
Histologie			
AC		33	
SCC		28	
NSCLC _{andere}		25	
SCLC		23	
cSCLC		2	

2.3.3 Sputen Kollektiv

Insgesamt untersucht wurden Sputen von 10 Patienten. Darunter waren 6 Sputen mit zytologisch dringendem Tumorverdacht und 4 Tumorzell-positive.

2.3.4 Formalin-fixiertes Gewebe Kollektiv

Das Kollektiv Formalin-fixierter Gewebe umfaßte Biopsien von 11 SCC- und 14 SCLC-Patienten. Es setzte sich aus 9 weiblichen und 16 männlichen Patienten im Alter von 50 bis 84 (Median 62).

2.4 Vektoren

pCR[®] 2.1, Invitrogen, Karlsruhe

2.5 Bakterien

2.5.1 Bakterienstämme und ihre Anzucht

Der *E. coli*-Stamm INV α F' wurde von der Firma Invitrogen, Karlsruhe, bezogen.

F' *endA1 recA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1* $\phi 80lacZ\Delta M15$
 $\Delta(lacZYA-argF)U169 \lambda^-$

Die *E. coli*-Bakterien wurden bei 37°C in LB-Medium unter Schütteln (250 rpm) für mind. 14 h kultiviert. Zur Selektion von Plasmid-Transformanten wurde dem Medium Ampicillin in einer Konzentration von 50 μ g/ml zugesetzt.

Zum Anlegen von Gefrierkulturen wurde 1 ml einer frischen Übernachtskultur mit 15% (v/v) Glycerin in einem Kryoröhrchen gemischt und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Transformation kompetenter One Shot INV α F' Zellen

Kompetente Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut, mit 2 μ l T/A-Ligationsansatz (vgl. 2.18.2) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 sek bei 42°C im Wasserbad und einer Abkühlung auf Eis wurde zu den Bakterien 250 μ l vorgewärmtes LB-Medium gegeben und diese für 1 h bei 37°C inkubiert. 50-200 μ l der Suspension wurden auf mit Antibiotika versetzte und mit je 40 μ l (100 mM) IPTG und (40 mg/ml) X-Gal bestrichene LB-Platten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Positive Klone erscheinen weiß bis blaßblau, da das LacZ-Gen des Vektors aufgrund der Insertion eines DNA-Fragmentes unterbrochen wird.

Alle Experimente mit veränderten Organismen wurden unter Beachtung der Vorschriften des Gentechnikgesetzes vom 16.12.1993 (BGB1.1, S. 2066) sowie der Gentechnik-Sicherheitsverordnung vom 14.03.1995 (BGB1.1, S. 297) durchgeführt.

2.6 Chemikalien

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

Agarose SeaKem LE	Biorad, München
Biotinylierte Anti Mouse IgG	Vector/Alexis, Grünberg
Bromphenolblau (BPB)	Pharmacia Biotec, Schweden
Desoxynukleotidtriphosphat (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Seromed Biochrom, Deisenhofen
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
IPTG	Roche, Mannheim
Normalserum Pferd	Vector/Alexis, Grünberg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
<i>Sonicated Salmon Sperm DNA</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg
Trypsin	Biochrom, Berlin
X-Gal	Roche, Mannheim
Xylencyanol (XC)	USB, Ohio, USA
Zellkulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Enzyme

<i>EcoRI</i>	NE BioLabs, Frankfurt a.M.
Expand High Fidelity Polymerase	Roche, Mannheim
LightCycler-FastStart DNA Master	
Hybridization Probes	Roche, Mannheim
HotMaster Taq DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg
PLATINUM Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
<i>SssI</i> Methylase	NE BioLabs, Frankfurt a.M.

2.8 Antikörper

5-Methylcytosine (Ab-1) Oncogene/Biosciences, Darmstadt

2.9 Molekularbiologische Kits

Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (01) für den ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, CA, USA
E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
Intergen CpGenome DNA Modification Kit	Intergen Company, NY, USA
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel, Düren
NucleoTraP [®] CR	Macherey-Nagel, Düren
Puregene DNA Isolation Kit	Gentra Systems, MN, USA
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Extraction Kit	Qiagen, Hilden
TA Cloning [®] Kit, Version T	Invitrogen, Karlsruhe
Vectastain ABC Elite Standard	Vector/Alexis, Grünberg
Wizard DNA Clean-Up	Promega, WI, USA

2.10 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden nach Vorschrift aus *Molecular Cloning* mit ddH₂O hergestellt, sterilfiltriert oder autoklaviert (Sambrook und Russell 2001).

2.10.1 Medien zur Anzucht von Zellkulturzelllinien

Dulbecco's Modified Eagle Medium mit stabilisiertem Glutamin wurde mit 15% hitzeinaktiviertem FCS und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin versetzt.

2.10.2 Medien zur Anzucht von *E. coli*-Zellen

LB-Medium (1000ml)

10 g Typton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

ad H₂O und auf pH 7,5 einstellen

LB-Agar

LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar

autoklavieren und entsprechendes Antibiotikum nach dem Abkühlen zusetzen

2.10.3 Lösungen für DNA ExtraktionProteinase K Puffer

0,01 M Tris-HCl pH 7,8

0,005 M EDTA pH 8,0

0,5% SDS

2.10.4 Lösungen für ElektrophoresenLaufpuffer für Agarose-Gele (TBE-Puffer)

8,9 mM Tris

8,9 mM Borat

2 mM EDTA

5 x DNA Ladepuffer

2,5 mM Tris-HCl pH 8,0

50 mM EDTA pH 8,0

90% Glycerin

0,01% Bromphenolblau

0,01% Xylencyanol

2.10.5 Lösungen für Immunzytochemie und -histochemie10xTBS

245 mM Tris

1 M NaCl

ad 1l mit aqua dest. und auf pH 7,6 einstellen

10 mM Citratpuffer pH 6,0

Stammlösung A:

0,1 M Citronensäure

Stammlösung B:

0,1 M Natriumcitrat

beide Lösungen bei 8°C im Kühlschrank lagern, kurz vor Gebrauch 1,8 ml Stammlösung A mit 8,2 ml Stammlösung B mischen und auf pH 6,0 einstellen.

2.10.6 Lösungen für Feulgen-Färbung10% gepuffertes Formalin

100 ml Formalin

900 ml ddH₂O4 g NaH₂PO₄6,5 g NaHPO₄5 N HCl

414 ml 37% rauchende HCl

586 ml ddH₂OSO₂-Wasser

Stammlösung:

100 g Kaliumdisulfid K₂S₂O₅900 ml ddH₂O

Lösung in dunkler Flasche aufbewahren

Gebrauchslösung:

50 ml Stammlösung

50 ml 1 N HCl

900 ml ddH₂O**2.11 Geräte, Apparaturen, sonstiges Material**

ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, CA, USA
BioDocAnalyse	Whatman Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Consort E833 Power Supply	Consort, Belgien
EPS 301 Power Supply	Amersham Pharmacia, Freiburg
Gelelektrophoresekammern:	
Hoefer HE 33 Mini Submarine	Hoefer Pharmacia Biotech, USA
Perfect Blue Mini M	PEQLAB GmbH, Erlangen
Labor-pH-Meter 765	Knick, Berlin
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Capillaries	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microdissector PPMD	Eppendorf, Hamburg
Micro Feather Skapell Nr. 715	Feather, USA
Rotationsmikrotom HM 340 E	Microm, Walldorf

Shandon Färbeautomat	Thermo-Electron, Dreieich-Buchsschlag
T-gradient PCR-Cycler	Whatman Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 4515D	Eppendorf, Hamburg
UV-Leuchttisch TFX	Vilber Lourmat, Frankreich
Uvette	Eppendorf, Hamburg

2.12 Software

Access, Microsoft

AutoCyte QUIC-DNA-System, Autocyte, Burlington, USA

Human Genome Server – The Sanger Centre [<http://www.ensembl.org>]

PubMed, Nucleotide, Protein, OMIM [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]

2.13 Sequenzen

Alle Oligonukleotide und TaqMan[®]-Sonden wurden bei der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, bestellt. Die Stocklösungen wurden auf 100 pmol/μl eingestellt und bei –20°C gelagert. Die Gebrauchslösungen der unmodifizierten Oligonukleotide wiesen eine Konzentration von 10 pmol/μl oder 20 pmol/μl auf. Die TaqMan[®]-Sonden wurde auf eine Konzentration von 4 pmol/μl verdünnt.

2.13.1 Oligonukleotide für DNA-Extraktions Studie

Tabelle 2.4: Oligonukleotide für die Untersuchungen zur Amplifizierbarkeit von aus Saccomanno Fixativ extrahierter DNA. Angegeben sind Genname, *Primer*-Sequenz (F = *forward*, R = *reverse*), Hybridisierungstemperatur und Größe des zu erwartenden PCR-Fragments.

Gen	<i>Primer</i> -Sequenz	Hybrid. Temp.	Größe [bp]
<i>β-Globin</i>	F: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3' R: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'	55°C	268
<i>β-Globin</i>	F: 5'-GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G-3' R: 5'-GCT CAC TCA GTG TGG CAA AG-3'	55°C	536
<i>β-Globin</i>	F: 5'-ATT TTC CCA CCC TTA GGC TG-3' R: 5'-TGG TAG CTG GAT TGT AGC TG-3'	55°C	989

2.13.2 Oligonukleotide für Promotor Methylierungs-Nachweis mittels QMSP

Tabelle 2.5: Für den Nachweis von Methylierung in Promotorenregionen verschiedener Gene wurden methylierungsspezifische Oligonukleotide und TaqMan[®]-Sonden konstruiert. Angeben sind die Namen der zugehörigen Gene, die Oligonukleotidsequenz (F = *forward*, R = *reverse*, unterstrichen sind durch die Bisulfidkonversion modifizierte Basen), die Hybridisierungstemperatur, die Anzahl der durch die drei Oligonukleotide abgedeckten CpG-Dinukleotide und die Fragmentgröße des zu erzeugenden PCR-Produktes. Accession no. der NCBI-Datenbank und die Position des PCR-Fragmentes: *APC*: Accession no. U02509, Position 716-834; *p16^{INK4a}*: Accession no. U12818, Position 129-199; *RARB2*: Accession no. X56849, Position 951-1095; *RASSF1A*: Accession no. AC002481, Position 17883-18052; *MYOD1*: Accession no. AF027148, Position 4860-5021.

Gen-Promotor	Primer-Sequenz	Hybrid Temp.	Anzahl CpG	Größe [bp]
<i>APC</i>	F: 5'-GAA CCA <u>AAA</u> CGC TCC CCA T-3' R: 5'- <u>TTA</u> <u>TAT</u> GTC GGT <u>TAC</u> GTG CGT <u>TTA</u> <u>TAT</u> -3' TaqMan [®] : 5'-6FAM-CCC GTC <u>GAA</u> <u>AAC</u> CCG CCG ATT <u>A</u> -TAMRA-3'	58°C	8	74
<i>p16^{INK4a}</i>	F: 5'-TGG AGT <u>TTT</u> CGG <u>TTG</u> <u>ATT</u> GGT T-3' R: 5'- <u>AAC</u> <u>AAC</u> GCC CGC ACC TCC T-3' TaqMan [®] : 5'-6FAM-ACC CGA CCC <u>CGA</u> <u>ACC</u> GCG-TAMRA-3'	58°C	7	70
<i>RARB2</i>	F: 5'-CGA GAA CGC GAG CGA <u>TTC</u> -3' R: 5'- <u>GAC</u> CAA TCC <u>AAC</u> <u>CGA</u> <u>AAC</u> GA-3' TaqMan [®] : 5'-6FAM-CCT TCC GAA TAC GTT CCG <u>AAT</u> CCT AC-TAMRA-3'	60°C	11	146
<i>RASSF1A</i>	F: 5'-GGT <u>TTT</u> GCG AGA GCG <u>CGT</u> -3' R: 5'-GCT <u>AAC</u> <u>AAA</u> CGC <u>GAA</u> CCG <u>AAC</u> -3' TaqMan [®] : 5'-6FAM-GGA GGC <u>GTT</u> GAA GTC GGG <u>GTT</u> C-TAMRA -3'	61°C	10	169
<i>SEMA3B</i>	F: 5'-GGT TGT <u>TTG</u> <u>TTC</u> GGT <u>TAT</u> <u>TCG</u> <u>ATT</u> -3' R: 5'-CCC ACC <u>AAA</u> CCA <u>ACC</u> ACC G-3' TaqMan [®] : 5'-6FAM-CAC GCA CCG CCC GCC <u>GTA</u> CC-TAMRA-3'	58°C	10	83
<i>MYOD1</i>	F: 5'-CCA <u>ACT</u> CCA <u>AAT</u> CCC CTC TCT <u>TTA</u> T-3' R: 5'-TGA <u>TTA</u> <u>ATT</u> <u>TAG</u> <u>ATT</u> GGG <u>TTT</u> AGA GAA GGA-3' TaqMan [®] : 5'-6FAM-TCC CTT CCT <u>ATT</u> CCT <u>AAA</u> TCC AAC CTA <u>AAT</u> <u>ACC</u> TCC-TAMRA-3'	58°C	0	161

2.13.3 Oligonukleotide für die Klonierung von Promotorfragmenten

Tabelle 2.6: Oligonukleotide für die Klonierung von Promotorfragmenten.

Angegeben sind die Namen der zugehörigen Gene, die *Primer*-Sequenz (durch die Bisulfidkonversion modifizierte Basen sind unterstrichen), die Hybridisierungstemperatur und die Fragmentlänge des zu erzeugenden PCR-Produktes. F = *forward*, R = *reverse*. Bei der PCR für *RASSF1A* wurden 5% Formalin zugesetzt.

Gen	<i>Primer</i> -Sequenz	Hybrid. Temp.	Größe [bp]
<i>APC</i>	F: 5' - <u>GTT</u> AGG <u>GTT</u> AGG <u>TAG</u> <u>GTT</u> GTG -3' R: 5' - <u>ACA</u> <u>ACA</u> CCT CCA TTC <u>TAT</u> CTC C -3'	60,6°C	220
<i>RARB2</i>	F: 5' - <u>AGT</u> TGT TTG AGG <u>ATT</u> GGG ATG -3' R: 5' - <u>AAT</u> CAT TTA CCA TTT TCC <u>AAA</u> CTT <u>AC</u> -3'	57,5°C	195
<i>RASSF1A</i>	F: 5' - GAG GGA AGG AAG <u>GGT</u> AAG G -3' R: 5' - <u>CAA</u> CTC AAT <u>AAA</u> CTC <u>AAA</u> CTC CC-3'	60°C	259

2.13.4 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Tabelle 2.7: Die Oligonukleotide M13 F und M 13 R wurden für die Sequenzierung der klonierten Promotorfragmente der Gene *APC*, *RARB2* und *RASSF1A* verwendet. Die Oligonukleotide *APC*-F und *APC*-R wurden zum direkten Sequenzieren der DNA aus Bronchialsekreten genutzt. F = *forward*, R = *reverse*.

Name	<i>Primer</i> -Sequenz
M13 F	5' - GTA AAA CGA CGG CCA G -3'
M13 R	5' - GTC CTT TGT CGA TAC TG -3'
<i>APC</i> -F	5' - CCT ATA CCC CAC TAC GAA ATA C -3'
<i>APC</i> -R	5' - GAA GTT TGG GTT ATG GTG GTT TTA GTA TT -3'

2.14 Mikrodissektion an histologischem Material

Von Formalin fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden mit einem Rotationsmikrotom 10 µ Schnitte angefertigt und diese in einem 37°C warmen Wasserbad auf Objektträger aufgezogen. Die Präparate wurden zunächst in Xylol entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (99,5 %, 96 %, 70 % EtOH für je 5 min) geführt. Die Schnitte wurden für 5 sek in Hämatoxylin gefärbt und anschließend bis zur Mikrodissektion gewässert.

Präparate mit nur wenigen Nicht-Tumorzellen wurden manuell mit Micro-Feather-Skapellen unter Sicht im Inversionsmikroskop mikrodiseziert. Für aufwendigere Präparationen wurde der Eppendorf Mikrodisektor PPMD genutzt. Um die Morphologie der Zellen klar zu erkennen und sie präparieren zu können, wurden die Objektträger zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen und dann mit Xylol überschichtet. Interessante Zellkomplexe wurden mit einer Femto-Glaskapillare oder einem Mikrochisel vorsichtig vom Objektträger gelöst und mit einer Pipettenspitze abgesaugt. Die mikrodisezierten Zellkomplexe wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur DNA-Extraktion bei 4°C gelagert.

2.15 Isolierung von Nukleinsäuren

DNA aus Kulturzellen, Bronchialsekreten, Sputen und mikrodiseziertem Gewebe wurde über Proteinpräzipitation mit Hilfe des Puregene DNA Isolation Kits nach Herstellerangaben extrahiert. Die Lyse des jeweiligen Materials ist unter 2.15.1.1 / 2 / 3 beschrieben. Außerdem wurde DNA aus Bronchialsekreten für die DNA Extraktionsstudie mit Phenol-Chloroform – wie bei Sambrook und Russell beschrieben – und zwei auf Silikamembran basierenden Kits – NucleoSpin Tissue und QIAquick Extraction Kit – nach Herstellerangaben isoliert (Sambrook und Russell 2001).

2.15.1.1 Kulturzellen

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 175 cm²- Kulturflasche wurden nach Absaugen des Mediums zunächst trypsiniert und unter Zugabe von 2 ml frischem Medium/FCS mit 1.500 x g für 10 min bei 4°C pelletiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 2 ml Zell-Lysispuffer mit 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) für 30 min bei 65°C inkubiert.

2.15.1.2 Bronchialsekrete und Sputen

Die Bronchialsekrete und Sputen wurden bei 750 x g zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Ca. 50 µl Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen, mit 250 µl Lysepuffer und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 65°C inkubiert.

2.15.1.3 mikrodisszeziertes Gewebe

Das mikrodisszezierte Gewebe wurde in 250 µl Lysepuffer aufgenommen und mit 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Die Schnitte wurden bei 65°C und 450 rpm schüttelnd über Nacht inkubiert. Bei Bedarf wurde erneut Proteinase K dazugegeben und die Inkubationszeit verlängert bis die Schnitte vollständig aufgelöst waren.

2.16 Ethanolfällung von DNA

Für eine Ethanolfällung wurde die DNA-Lösung mit einem Zehntel ihres Volumens an 3 M NaAc (pH 5,2) und dem 2,5fachen ihres Volumens an EtOH^{absolut} versetzt und gut geschüttelt (vortex). Die Proben wurden für mindestens 2 Stunden bei -20°C inkubiert und anschließend für 30 min bei 16.000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Sediment mit 70%igen EtOH versetzt. Die Proben wurden für 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, die DNA getrocknet und in ddH₂O resuspendiert.

2.17 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung

Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde photometrisch bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dabei entspricht die Extinktion von 1,0 einer OD einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Nukleinsäure liegt bei einem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1,8-2,0 proteinfrei vor.

Durch Auftragen von 500 ng bis 1 µg unverdauter DNA auf ein 0,3%iges Agarosegel wurde die Intaktheit der DNA überprüft. Durch Bestimmung der R_f – Werte (*retarding front*) mit der BioDocAnalyse Software konnte das Laufverhalten der aufgetragenen Proben exakt bestimmt werden.

2.18 Enzymatische Reaktionen

2.18.1 Methylierung der DNA mit SssI-Methylase

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

1 µg DNA

5 µl 10x Reaktionspuffer

0,25 µl 200xSAM (S-Adenosylmethionin)

0,5 µl SssI Methylase

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

2.18.2 Klonierung von PCR-Produkten

Bei der PCR-Reaktion mit einer Taq-Polymerase wird an das 3'-Ende eines neu synthetisierten DNA-Stranges ein zusätzliches Adenosin-Nukleotid angehängt. Diese Eigenschaft kann man sich beim Klonieren zu nutzen machen, wenn man einen T/A-Klonierungsvektor mit komplementären Thymidin-Überhängen verwendet.

Nach Aufreinigung der zu klonierenden PCR-Fragmente (2.21.3) wurden 1-3 µl mit 10 ng Vektor, 1x Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase auf ein Volumen von 10 µl gebracht und bei 14°C für 16 Stunden inkubiert. Für die Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes verwendet (vgl. 2.5.2), der Rest wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

2.18.3 Analyse der Klonierungsprodukte mittels *EcoRI*-Verdau

Der Erfolg der Klonierung wurde mit einem *EcoRI* Restriktionsenzymverdau überprüft. Dazu wurden 5 µl isolierte Plasmid-DNA, 2 µl 10x Puffer H, 12 µl ddH₂O und 1 µl *EcoRI* je Ansatz verwendet und für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Bei einer erfolgreichen Klonierung waren zwei Banden zu erwarten, eine bei 2.789 bp und eine bei 16 bp plus die bp-Anzahl des klonierten Fragments.

2.19 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben und ein geeigneter Längenstandard wurden mit 1/5 Volumen Lade-puffer versetzt und auf einem Agarosegel in 1x TBE-Puffer bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde in Abhängigkeit von der Fragmentgröße ein Gel von 0,3% bis 1,5% verwendet. Durch Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in das Gel wurden die Nukleinsäuren angefärbt und konnten auf einem Transilluminator bei 302 nm betrachtet werden.

2.20 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *QIAquick Extraction Kit* nach Herstellerangaben. Dazu wurde die zu isolierende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück mit 3 Volumen Puffer QC bei 50°C aufgelöst. Die DNA wurde über Silicagel-Säulchen aufgereinigt und mit 30 µl dH₂O von der Membran eluiert.

2.21 Polymerase-Kettenreaktion

2.21.1 β -Globin PCR

Von dem β -Globin-Gen wurden drei unterschiedlich große Fragmente (268 bp, 536 bp, 989 bp) amplifiziert. In den Reaktionsansatz von 100 μ l wurden je 100 ng isolierte DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM je Oligonukleotidpaar, 0,2 mM dNTP und 2,5 U PlatinumTaq eingesetzt. Genaue Angabe zu Oligonukleotiden und Hybridisierungstemperatur sind in Tabelle 2.4 zu finden. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Zyklenzahl	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
1	95°C / 5 min		
35	95°C / 1min	55°C / 1min	72°C / 2min

Je 10 μ l PCR-Produkt wurde mit 2 μ l DNA Ladepuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch Vergleich mit Marker-DNA wurde die Größe des PCR-Produktes überprüft.

2.21.2 QMSP

Die Methylierung fünf verschiedener Gen-Promotoren (*APC*, *p16^{INK4a}*, *RAR β 2*, *RASSF1A*, *SEMA3B*) wurde nach Bisulfitkonversion der DNA mit der quantitativen methylierungs-spezifischen PCR (QMSP) untersucht. Jede PCR wurde mit Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne DNA verwendet. DNA der Zelllinie NCI-H522 (Promotor bei *APC* und *RASSF1A* methyliert), T24 (Promotor bei *p16^{INK4a}* und *SEMA3B* methyliert) und mit *SssI*-Methylase behandelte DNA der Zelllinie Wi-38 (alle Promotoren methyliert) dienten als Positivkontrolle. Als interne Referenz wurde für jede Probe eine CpG-freie Sequenz aus der Promotorregion des *MYOD1* Gens amplifiziert. Mit dieser internen Kontrolle konnten Rückschlüsse auf den Erfolg der Bisulfitkonversion und den Erhaltungszustand der DNA gezogen werden. Außerdem ermöglichte die interne Referenz eine Quantifizierung des PCR-Produktes (s. u.).

In einem 20 µl QMSP-Ansatz wurden 50 ng umgewandelte DNA, 600 nM je *Primer*, 200 nM TaqMan[®]-Sonde, 3,5 mM MgCl₂ und 2 µl LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes eingesetzt. Die QMSP-Reaktion wurde in LightCycler Kapillaren in einem LightCycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Zyklenzahl	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
1	95°C / 10 min		
60	95°C / 10 sek	58-61°C / 8 sek	72°C / 10 sek
1			40°C / 30 sek

Genaue Angaben zu den Oligonukleotiden, TaqMan[®]-Sonden, PCR-Fragmentlängen und Hybridisierungstemperaturen finden sich in Tabelle 2.5.

Die Auswertung der QMSP erfolgte sowohl qualitativ als auch quantitativ. Je 10 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl DNA Ladepuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch Vergleich mit einer DNA-Leiter wurde die Größe des PCR-Produktes überprüft. Die QMSP Ergebnisse für die Untersuchungen am *APC* Promotor 1A und am *RARB2* Promotor wurden mittels Endpunkt-Analyse und Schwellenwert (Cut off) bestimmt. Dabei wurde das Methylierungslevel als Verhältnis zweier absoluter Meßwerte definiert:

$$\text{Methylierungslevel [\%]} = \frac{\text{zu untersuchender Promotor}}{\text{interne Referenz MYOD1}} \times 100\%.$$

Der Cut off für *APC* wurde auf 35 und für *RARB2* auf 30 festgelegt. Alle Werte \geq dem Cut off wurden als positiv gewertet. Die QMSP Ergebnisse für die Promotoren von *p16^{INK4a}*, *RASSF1A* und *SEMA3B* wurden mittels Kreuzungspunkt-Analyse bestimmt. Hierbei wurden alle Werte ≥ 0 als positiv gewertet.

Zur Bestimmung der Sensitivität der der Primer/Sonden Paare wurde für jeden Gen-Promotor eine Verdünnungsreihe mit Gemischen aus Zelllinien-DNA mit entsprechender Promotormethylierung und Lachsspermien- oder Wi-38 DNA hergestellt. Die Verdünnungsreihe wurde mit Bisulfit behandelt und mit der entsprechenden QMSP untersucht.

2.21.3 PCR zur Klonierung von Promotorfragmenten

In den 20 µl PCR-Ansatz wurden 3 µl Bisulfit konvertierte DNA, 0,2 mM dNTP, 0,3 µM je Oligonukleotid, 1,25 U Eppendorf Hot Start *Taq* und 1 x PCR Puffer mit MgCl₂ gegeben. Die PCR Bedingungen waren wie folgt:

Zyklenzahl	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
1	94°C / 3 min		
34	94°C / 1 min	57,5°C; 60°C bzw. 60,6°C / 45 sek	65°C / 1 min
1			65°C / 8 min

Das komplette PCR-Produkt wurde mit 4 µl DNA Ladepuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch Vergleich mit Marker-DNA wurde die Größe des PCR-Produktes überprüft. Die Produktbande wurde mit einem Skapell ausgeschnitten und die DNA mit dem *QIAquick Extraction Kit* nach Herstellerangaben isoliert.

2.22 DNA-Analyse mittels Bisulfit

Die Bisulfitkonversion von DNA ermöglicht es Cytosin von methyliertem 5-Methyl-Cytosin zu unterscheiden. Dabei wird während der Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit Cytosin zu Uracil deaminiert, wohingegen 5-Methyl-Cytosin chemisch unmodifiziert bleibt. Mit methylierungsspezifischen Oligonukleotiden ist es möglich, den Methylierungsstatus einzelner Sequenzabschnitte nach Bisulfitkonversion mittels PCR zu untersuchen.

Zu Beginn der Arbeit wurde die aus Bronchialsekreten isolierte DNA mit dem CpGenome DNA Modification Kit nach Herstellerangaben konvertiert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde das Kit durch ein von Herman und Mitarbeitern 1996 publiziertes Protokoll ersetzt (Herman *et al.* 1996), das zunächst für die Anwendungen in der vorliegenden Arbeit optimiert werden mußte. Die Konversion wurde wie nachstehend beschrieben durchgeführt. Für jede Bisulfitkonversion wurde 1 µg DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit 0,3 M NaOH-Lösung für 15 min bei 37°C denaturiert. Dem 50 µl Reaktionsansatz wurden 30 µl 10 mM Hydrochinon- und 520 µl 3 M Natriumbisulfitlösung zugesetzt und anschließend für 16-20h bei 50°C inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem Wizard DNA Purification Kit nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 50 µl H₂O eluiert und mit einer Endkonzentration von 0,3 M NaOH für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in 20 µl H₂O resuspendiert (s. 2.16).

2.23 Sequenzierung

Die nicht radioaktive Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurde mit Hilfe des BigDye Sequenzierungskits und dem ABI PRISM™ 377 DNA Sequenzierungsgeräts der Firma ABI durchgeführt. In den Reaktionsansatz mit 10 µl Volumen wurden 100-150 ng DNA oder 500 ng Plasmid-DNA, 2,5 pmol *Primer* und 2 µl BigDye eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Zyklen	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
1	96°C / 5 min		
25	96°C / 30 sek	50°C / 15 sek	60°C / 4 min

Die DNA wurde mit EtOH gefällt (s. 2.16) und anschließend in 15 µl HPLC-H₂O resuspendiert. Die Proben wurden im Sequenzer mit POP6-Polymer aufgetrennt und die Sequenzen anschließend durch Vergleich mit der NCBI-Datenbank abgeglichen.

2.24 Nachweis von DNA-Hypomethylierung mittels 5-Methylcytosin-Antikörper AB-1

2.24.1 Vorbehandlung des Zellmaterials

2.24.1.1 Zellen aus Bronchialsekreten

Für die Immunfärbung wurden Zytocentrifugate mit einem Durchmesser von 5 mm angefertigt. Dazu wurden Saccomanno fixierte Bronchialsekrete bei 670 xg für 5 min zentrifugiert, dekantiert und das Pellet im restlichen Saccomanno resuspendiert. Ein Teil des Pellets wurde in Zytotunnel gegeben und die Zellen mittels Zytocentrifuge bei 700 xg für 10 min auf Objektträger (OT) zentrifugiert. Die OT wurden nach Papanicolaou gefärbt und erneut befundet. Die Deckgläser wurden in Xylol von den OT abgelöst. Die OT wurden für je 5 min in 100% und 96% Ethanol inkubiert. Nach einer Nachfixation der Zellen mit eiskaltem Methanol/Eisessig (3:1) für 15 min wurden die Präparate schnell getrocknet, für einen Tag bei RT und für 48h bei 50°C gealtert. Die OT wurden mit der Zell-beschichteten Seite nach oben in Petrischalen gelegt und mit 1x PBS überdeckt. Die Schalen wurden mit 40 cm Abstand unter einer 60 W starken UV-Lampe (254nm) platziert und die Präparate für 10h bestrahlt. Nach 30 min Inkubation in MeOH / 3% H₂O₂ wurden die OT zweimal in 1x PBS für je 5 min gewaschen. Danach erfolgte die immunologische Reaktion wie unten beschrieben (siehe 2.24.2).

2.24.1.2 Histologische Schnitte

Bei histologischem Material wurden 4 µm Schnitte mit einem Rotationsmikrotom angefertigt und im 37°C warmen Wasserbad auf OT aufgezogen. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und für je 5 min in 100% und 96% Ethanol gestellt. Anschließend wurden die OT für 30 min in MeOH / 3% H₂O₂ inkubiert. Die OT wurden für je 5 min in 70% Ethanol und Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die OT zweimal für je 5 min in kochendem Citratpuffer bei 600 W in der Mikrowelle behandelt. Nach zweimaligen Waschen der OT in 1x PBS für je 5 min wurde die immunologische Reaktion wie unten beschrieben durchgeführt (siehe 2.24.2)

2.24.2 Immunologische Reaktion

Für den Serumblock wurde eine Lösung aus 1,5 ml Normalserum vom Pferd in 98,5 ml 1x TBS-Puffer auf die OT getropft und für 20 min einwirken gelassen. Nach Abschütten der Flüssigkeit vom OT wurden die Präparate mit dem 5-Methylcytosin (AB-1) Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 über Nacht bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 1x PBS wurden die Zellen 30 min mit einem Link (225 µl Normalserum vom Pferd/75 µl biotinyliertes Anti Mouse IgG/14,7 ml 1x TBS) behandelt. Nach 2 Waschschritten mit 1x PBS wurden die OT mit ABC Elite Standard bedeckt und für 40 min inkubiert. Nach Waschen in 1x PBS wurden die OT je nach Bedarf für 1 bis 10 min in einer DAB-Lösung (120 mg DAB und 50 µl 30% H₂O₂ in 200 ml 1x PBS) entwickelt. Die Färbereaktion wurde durch 5 min Wässern gestoppt. Die Zellen wurden für 5-10 sek mit Hämatoxilin gegengefärbt. Die OT wurden anschließend nochmals gewässert und mit Aquatex eingedeckt.

2.24.3 Auswertung der immunologischen Reaktion

2.24.3.1 Zytologisches Material

Die zytologischen Präparate galten nur dann als auswertbar, wenn mindestens 90% der Granulozyten eine starke Immunfärbung aufwiesen. Die Granulozyten wurden als Referenzzellen verwendet. Die Intensität der Immunreaktion von Tumor- und Referenzzellen wurde visuell miteinander verglichen. Erschien der überwiegende Teil der Tumorzellen blasser gefärbt als die Referenzzellen so wurde der Fall als hypomethyliert gewertet.

2.24.3.2 Histologisches Material

Die Auswertung der 5-Methylcytosin Antikörperfärbung an histologischen Präparaten wurde mittels Bild-Densitometrie analog zur DNA-zytometrischen Auswertung der Feulgen Färbung (vgl. 2.25.2) durchgeführt. Statt des Interferenzfilters bei 570 nm wurde ein Blaufilter verwendet. Für die Messung wurden Bereiche ausgewählt, die kräftig gefärbte Lymphozyten, Granulozyten oder Mitosen als interne Referenz aufwiesen. Dementsprechend wurden die Analysezellen nur in Arealen gemessen, die zwischen kräftig gefärbten Referenzzellen lagen. Insgesamt wurden mindestens 30 Lymphozyten als Referenzzellen und 100 Tumorzellen als Analyse-Zellen gemessen.

Die integrierte optische Dichte (IOD) der 5-Methylcytosin Antikörperfärbung der Analysezellen wurde um die am selben Präparat mittels Bild-Zytometrie bestimmte mittlere DNA-Ploidie korrigiert. Die verwendete Formel lautet wie folgt:

$$\text{Methylierung [\%]} = \frac{\text{IOD Analyse} \times 2[\text{c}]}{\text{IOD Referenz} \times \text{DNA - Ploidie}} \times 100$$

2.25 Bild-Zytometrie

2.25.1 Feulgen Färbung

Die Feulgen Färbung wurde in einem Shandon Färbeautomaten nach folgendem Protokoll durchgeführt: 15 min Xylol, 5 min 100% EtOH, 5 min 96% EtOH, 50 min 10% gepuffertes Formalin, 10 min ddH₂O, 5 min ddH₂O, 60 min 5 N HCl 27°C, 3x 2 min ddH₂O, 60 min Schiff's Reagenz, 3x 5 min SO₂-Wasser, 2x 1 min ddH₂O, 3 min 70% EtOH, 3 min 96% EtOH, 3 min 100% EtOH, 10 min Xylol. Anschließend wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt und im Dunklen bis zur Durchführung der DNA-Bild-Zytometrie aufbewahrt.

2.25.2 DNA-Bild-Zytometrie

Die Messung des DNA-Gehalts einzelner Kerne erfolgte über die photometrische Bestimmung der integrierten optischen Dichte der feulgen-gefärbten Zellkerne. Verwendet wurde dazu das AutoCyte QUIC-DNA-System in Kombination mit einem konventionellen Lichtmikroskop (Zeiss Axioplan 2). Die an einen Computer angeschlossene CCD-schwarz-weiß-Kamera mit einer Auflösung von 572 Linien ermöglichte eine Projektion der Zellen auf einen Monitor. Dort erfolgte die Auswahl der einzelnen zu messenden Kerne. Diese wurden fokussiert und über die *Select*-Funktion automatisch erfaßt. Die Bildverarbeitungssoftware ist im Stande Kerngrenzen zu detektieren, Kernflä-

chen zu errechnen und die integrierte Dichte innerhalb der Meßmaske zu bestimmen. Durch gleichzeitige visuelle Kontrolle wurde die Messung von Artefakten verhindert und eine nicht zutreffende Auswahl von Kernen durch eine manuelle Korrektur geändert. Die Messungen erfolgten im grünen Licht bei 570 nm (Interferenzfilter 570 ± 10 nm) im Bereich des Absorptionsmaximums der mit fuchsin-schwefelhaltiger Säure konjugierten DNA. Die Kerne absorbieren das Licht entsprechend der gebundenen Farbstoffmenge. Die unterschiedliche Absorption des Lichts ist im schwarz-weiß Kamera-bild durch unterschiedliche Graustufen bis hin zur vollständigen Schwärzung der Zellkerne visualisiert. Zu Beginn jeder Messung wurde ein Lichtabgleich durchgeführt, da jedes Präparat einen eigenen Wert für die Lampenspannung am Mikroskop aufweist. Dieser Wert wurde so eingestellt, daß eine vollständige Ausnutzung des gesamten Umfangs aller 100 Graustufen durch das Bildanalysesystem gewährleistet wurde.

Die IOD der Zellkerne wurde ausschließlich in Arealen gemessen, in denen auch die Antikörperfärbung ausgewertet wurde (s. oben). Insgesamt wurden mindestens 30 Lymphozyten als interne Referenzzellen gemessen. Die mittlere IOD dieser Zellen wurde als diploider Chromosomensatz ($2c$) gewertet. Der Variations-Koeffizient der Referenzzellen und die Korrelation Kernflächen/IOD lagen zumeist unter 5% bzw. $r < 0,4$. Es wurden mindestens 300 Analyse-Zellen gemessen und die Abweichung vom diploiden Chromosomensatz als mittlere DNA-Ploidie [DNA-Ploidie = $2 \times$ DNA-Index] angegeben. Die Messungen entsprechen damit den Konsensus-Erklärungen der European Society of Analytical Cellular Pathology (Haroske *et al.* 2001).

2.26 Statistische Auswertung

Für die klinisch-pathologische Korellation wurde der zweiseitige chi-quadrat Test verwendet. Das Signifikanzlevel wurde auf $P < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 DNA Extraktion

3.1.1 DNA Extraktion aus Saccomanno fixierten Bronchialsekreten

In der Extraktions-Studie wurde mit verschiedenen Verfahren DNA aus 45 Saccomanno fixierten Bronchialsekreten isoliert. Anschließend wurden die Ergebnisse der Verfahren bezüglich DNA-Ausbeute, -Reinheit, -Erhaltungszustand und -Amplifizierbarkeit miteinander verglichen. Als Referenzmethode wurde die DNA-Extraktion mit Phenol-Chloroform gewählt. Bei den anderen drei auf Kits (Puregene, NucleoSpin Tissue, QIAamp DNA Mini) basierenden Extraktionsprotokollen wurde die DNA entweder über das Aussalzen von Proteinen mit Ammoniumacetat oder über die Bindung der DNA an Silikamembranen isoliert. Die Ergebnisse der Studie sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Tabelle 3.1: Vergleich verschiedener DNA Extraktionsprotokolle.

Angegeben ist der Median der DNA-Ausbeute mit Minimum und Maximum, der Mittelwert der Reinheitsquotienten mit dazugehöriger Standardabweichung, der Median der Fragmentgrößen mit Minimum und Maximum sowie die Erfolgsquote der PCR.

DNA Extraktionsmethode	DNA Ausbeute [μg]	DNA Reinheit [A_{260}/A_{280}]	Fragmentgröße [kb]	PCR
NucleoSpin Tissue	1.44 (0.18; 29.28)	1.70 ± 0.18	26 (13; > 40)	100%
Phenol-Chloroform	2.76 (0.78; 55.60)	1.69 ± 0.16	> 40 (> 40; > 40)	100%
Puregene	1.53 (0.24; 30.90)	1.77 ± 0.16	> 40 (17; > 40)	100%
QIAamp DNA Mini	1.14 (0.24; 18.90)	1.83 ± 0.12	23 (13; > 40)	100%

Die Ausbeute war abhängig von der Extraktionsmethode. Die Aufreinigung mit Phenol-Chloroform war am erfolgreichsten (2,76 μg), gefolgt von Puregene (1,53 μg), NucleoSpin Tissue (1,44 μg) und QIAamp DNA Mini (1,14 μg). Die DNA Reinheit lag zwischen 1,69 und 1,83. Der höchste Reinheitsquotient wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit erreicht (1.83 ± 0.12). Das Auftrennen der extrahierten DNA auf 0,3%igen Agarosegelen zeigte, daß die DNA im Saccomanno Fixativ in einem hochmolekularen Zustand erhalten bleibt (siehe Abb. 3.1). Mit der in dieser Studie verwendeten konventionellen Gelelektrophorese wurde keine Fragmentierung der DNA aufgrund des Fixativs

festgestellt, wohl aber eine Fragmentierung in Abhängigkeit des gewählten Extraktionsverfahrens nachgewiesen (Abb.3.1). Die DNA Fragmente der mit Phenol-Chloroform extrahierten Proben wurden im 0,3%igen Agarosegel so gut wie nicht aufgetrennt. Die mit Puregene gereinigten Proben waren im Median über 40 kb (17 kb; >40 kb) groß. Die mit dem NucleoSpin Tissue und QIAamp DNA Mini Kit extrahierte DNA wurde stärker geschert; die Fragmentgrößen lagen hier bei 26 kb (13 kb; >40 kb) und 23 kb (13 kb; >40 kb).

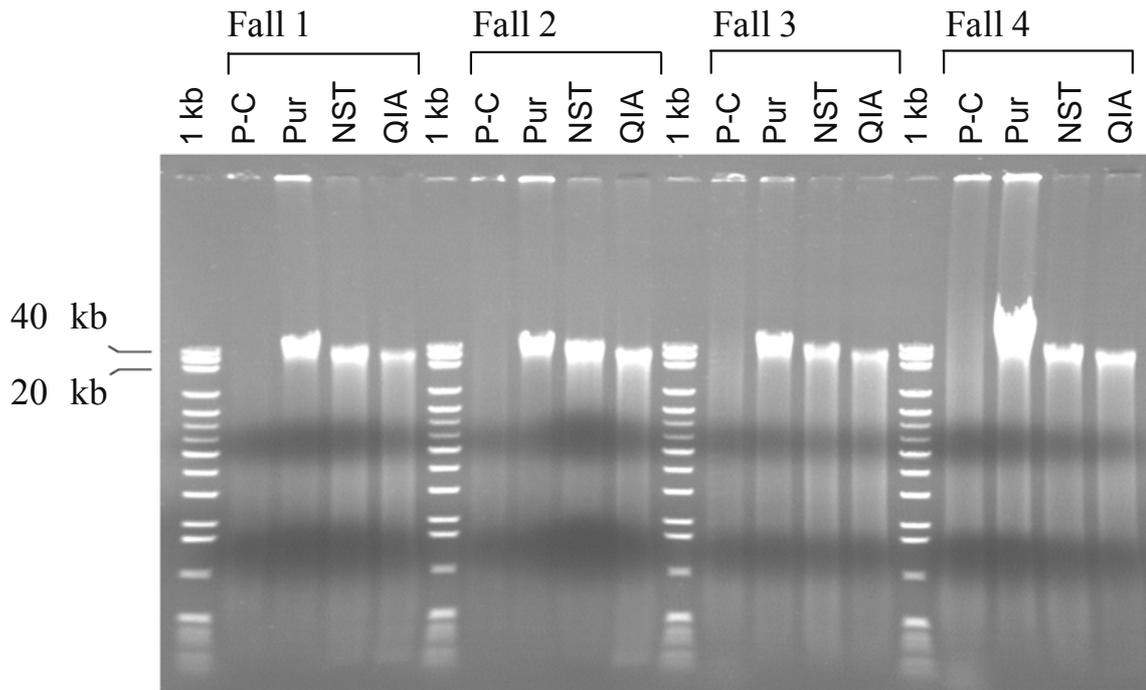
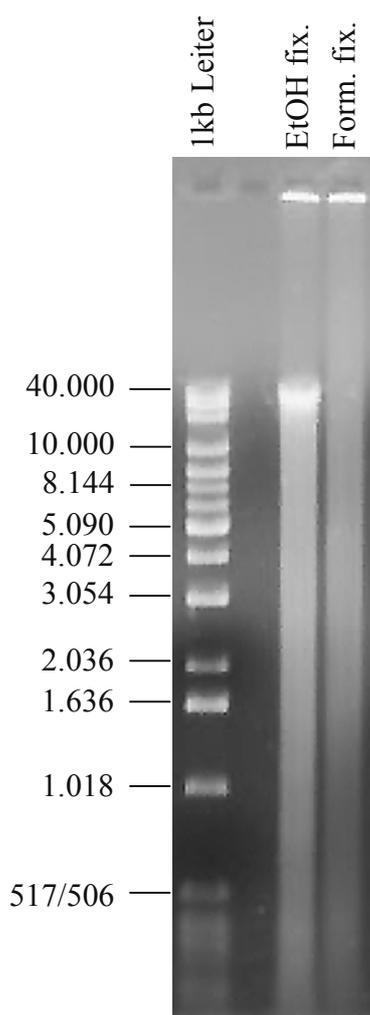


Abbildung 3.1: Vergleich verschiedener DNA Extraktionsprotokolle. Die Zellen jedes Bronchialsekrets wurden auf vier Extraktionsansätze aufgeteilt und die DNA mit folgenden Methoden extrahiert: Phenol-Chloroform (PC), mit Puregene (Pur), mit NucleoSpin Tissue (NST) und QIAamp DNA Mini Kit (QIA). Auf dem 0,3%igen Agarosegel sind 500 ng der je vier Extraktionsansätze von vier Bronchialsekreten (Fall 1 bis 4) elektrophoretisch aufgetrennt worden. Zum späteren Größenvergleich wurde zu jedem Fall eine 1kb DNA Extension Leiter mit aufgetragen.

Die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA wurde an 15 Bronchialsekreten für alle vier Methoden überprüft. Mittels PCR wurden in allen Fällen erfolgreich drei verschieden große β -Globin-Fragmente (268, 536 und 989 bp) amplifiziert. Da keinerlei Unterschied zwischen den vier DNA Extraktionsprotokollen bezüglich der DNA Amplifizierbarkeit festzustellen war, wurden keine weiteren Fälle mehr untersucht.

3.1.2 DNA Extraktion aus Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Geweben



DNA aus Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben wurde ausschließlich durch Aussalzen von Proteinen isoliert. Die DNA wies eine starke, durch das Formalin hervorgerufene Fragmentierung auf, was sich gut an der aufgetragenen Probe in Abbildung 3.2 veranschaulichen läßt. Die DNA schmierte hierbei über die gesamte Spurlänge. Die im Vergleich dazu aufgetragene Probe von in Saccomanno fixierter DNA wurde in einem hochmolekularen Zustand erhalten. Sie wies eine hauptsächlich durch die Extraktionsmethode bedingte Fragmentierung auf. Der Erhaltungszustand der DNA nach Fixation in ungepufferten Formalin war im Vergleich zu DNA nach Fixation in gepufferten Formalin noch wesentlich schlechter. So konnte die DNA von Proben mit ungepufferten Formalin in nur ca. 20% der Fälle erfolgreich amplifiziert werden. DNA aus gepuffertem Formalin erbrachte in ca. 90% ein brauchbares PCR-Ergebnis. Für die hier durchgeführten Studien wurde nur mit gepuffertem Formalin fixiertes Gewebe verwendet.

Abbildung 3.2: Einfluß des Fixativums auf den DNA-Erhalt. Gezeigt ist ein 0,3%iges Agarosegel auf dem eine 1 kb-DNA Extensions Leiter, 500 ng Saccomanno fixierte DNA und 500 ng in gepuffertem Formalin fixierte DNA aufgetragen sind.

3.2 Fall-Kontroll-Studien: aberrante Promotormethylierung als Tumormarker

3.2.1 Etablierung der Bisulfitkonversion und einer internen Kontrolle

Die Bisulfitkonversion wurde zunächst für DNA aus Saccomanno fixierten Bronchialsekreten in Anlehnung an das von Herman und Mitarbeitern publizierte Protokoll optimiert (Herman *et al.* 1996). Die anschließenden QMSP-Läufe waren nach erfolgreicher Konversion problemlos durchzuführen.

Bei der Etablierung der QMSP an Formalin fixierten Proben stellte sich heraus, daß in ungepuffertem Formalin fixiertes Gewebe ungeeignet für die geplanten Experimente

war. Nur durch Einsatz großer DNA Mengen und vieler PCR-Zyklen gelang es in 20% der untersuchten Proben ein schwaches PCR-Produkt zu erzeugen. Der Prozeß der Bisulfitkonversion führt zu einer zusätzlichen Fragmentierung der DNA, was unter Umständen auch Einfluß auf die PCR-Reaktionen selber hat. Vermehrte Strangbrüche bei der Bisulfitkonversion treten insbesondere bei folgenden zwei Reaktionsschritten auf: 1. der Denaturierung der DNA mit 10 M Natriumhydroxidlösung und 2. der Desaminierung der DNA mit Natriumbisulfit. Durch eine schonendere DNA-Denaturierung mit 3 M Natriumhydroxidlösung, sowie eine Senkung der Reaktionszeit auf 4-8 Stunden und der Reaktionstemperatur auf 50°C bei der Bisulfitbehandlung sollte die zusätzlich auftretende DNA-Fragmentierung verringert werden. Die Erfolgsrate der QMSP an in ungepuffertem Formalin fixierter DNA stieg trotzdem nicht an. Die Methode ließ sich somit nicht zufriedenstellend etablieren.

Ausschließlich in gepuffertem Formalin fixiertes Gewebe eignete sich dagegen mit ca. 90% erfolgreichen PCR-Läufen für die QMSP-Versuche und die Klonierung der Promotorfragmente. Die Umstellung der Fixierung von ungepuffertem auf gepuffertes Formalin erfolgte im Institut für Pathologie von Professor Gerharz Ende 2002. Somit konnten in dieser Arbeit nur Gewebe, das zu einem späteren Zeitpunkt eingesendet wurde, verwendet werden.

Durch die Klonierung und Sequenzierung von Promotorregionen konnte nachgewiesen werden, daß die Bisulfitkonversion eine nahezu 100%ige Effizienz besaß (vgl. Sequenzierungsergebnisse 3.4.2).

Für die Qualitätskontrolle der Bisulfitkonversion wurde eine QMSP an einer CpG freien, stark Cytosin-haltigen Sequenz des *MYOD1*-Gens etabliert. Die modifizierte DNA wurde nur dann für die weiteren Untersuchungen verwendet, wenn die *MYOD1* PCR und somit auch die Desaminierung der unmethylierten Cytosine zu Uracil erfolgreich war. Weiterhin dienen die QMSP-Ergebnisse für *MYOD1* der Berechnung des eingeführten Schwellenwertes bei der Auswertung (s. 2.21.2).

3.2.2 Etablierung der Methylierungsmarker

Für die zu untersuchenden Genpromotoren (*APC*, *p16^{INK4a}*, *RAR β 2*, *RASSF1A*, *SEMA3B*) lagen in der Literatur bereits Daten zur Hypermethylierung an Lungenkarzinomen bzw. -Zelllinien vor. Durch den Vergleich von publizierten Promotorsequenzen und den zugehörigen Prävalenzen aberranter Methylierung wurde die Region festgelegt, die von den *Primer/TaqMan*[®]-Sonden Paaren abgedeckt werden sollte. Zum Zeitpunkt

der Oligonukleotid-Etablierung für die QMSP war nur das *Primer*/TaqMan[®]-Sonden Paar für den Promotor von *APC* publiziert.

Die Oligonukleotide für die einzelnen Gene wurden zunächst an mit *SssI*-Methylase methylierter DNA etabliert. Ihre Sensitivität wurde anschließend durch Verdünnungsexperimente mit Gemischen aus komplett methylierter DNA und Lachsspermien-DNA bzw. unmethylierter Wi-38 DNA überprüft. Bei allen etablierten Oligonukleotiden konnte unter Verwendung eines LightCyclers mit der QMSP noch ein methyliertes Allel unter 5.000 unmethylierten Allelen nachgewiesen werden. Die Abbildung 3.3 zeigt eine QMSP am Beispiel der Verdünnungsreihe für den Promotor von *p16^{INK4a}*.

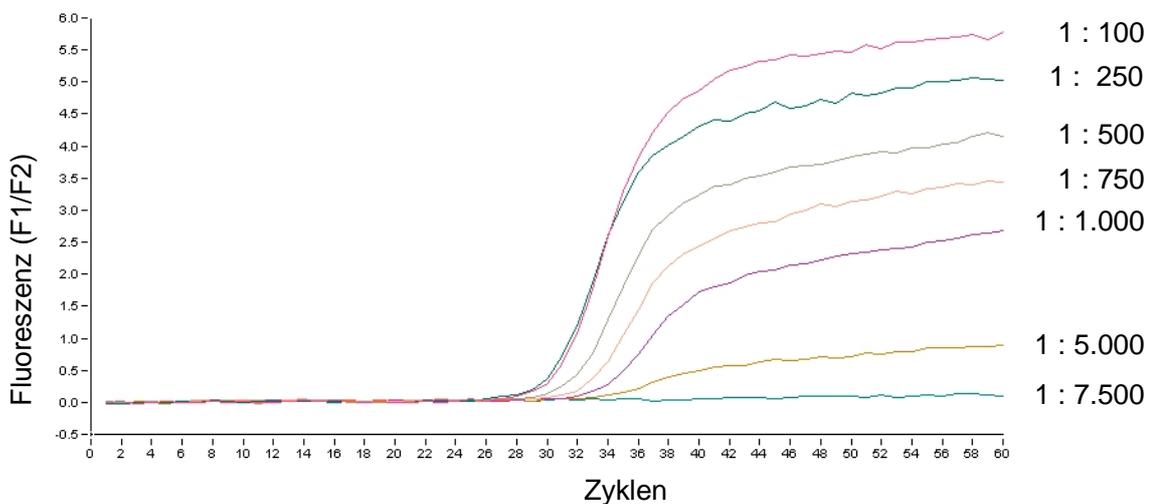


Abbildung 3.3: Verdünnungsreihen zur Messung der Sensitivität von *Primer*/Sonden-Paaren mittels QMSP im LightCycler. Aufgetragen ist die Zyklenzahl gegen die Fluoreszenz der Sonde. Die Proben sind mit 1:x beschriftet, wobei 1 das methylierte Allel und x die Anzahl der unmethylierten Allele beschreibt.

3.2.3 Sensitivität und Spezifität der Marker bei Tumorzell positiven

Bronchialsekreten

Im Anschluß an die Etablierung der *Primer*/Sonden-Paare wurde ihre Sensitivität und Spezifität in Fall-Kontroll-Studien an Bronchialsekreten von Lungenkarzinompatienten mit multiplen Tumorzellen (Tu++) und Bronchialsekreten von Risikopatienten ohne Lungenkarzinom (NT) evaluiert. Die Promotoren von *APC* und *RARB2* wiesen Methylierung mit einer Sensitivität von 70,9% (61/86) bzw. 77,8% (35/45) bei einer Spezifität von 53,9% bzw. 56,2% nach. Durch die Einführung der Endpunktauswertung und das Verwenden eines Schwellenwertes (Cut-off) bei ≥ 35 für *APC* und ≥ 30 für *RARB2* gelang es, die Spezifität des Nachweises auf 99% bzw. 84% zu steigern. Aberrante Methylierung konnte nun mit einer Sensitivität von 30% (26/86) für *APC* und von 47% (21/45) für *RARB2* nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Promotor-Hypermethylierung von

$p16^{INK4a}$ und *RASSF1A* konnte in 27% (12/45) bzw. 55% (47/86) der Fälle mit einer Spezifität von 100% detektiert werden (Abb. 3.4). Der Marker *SEMA3B* erwies sich in Bronchialsekreten als unspezifisch und wurde nicht weiter untersucht (Abb. 3.4).

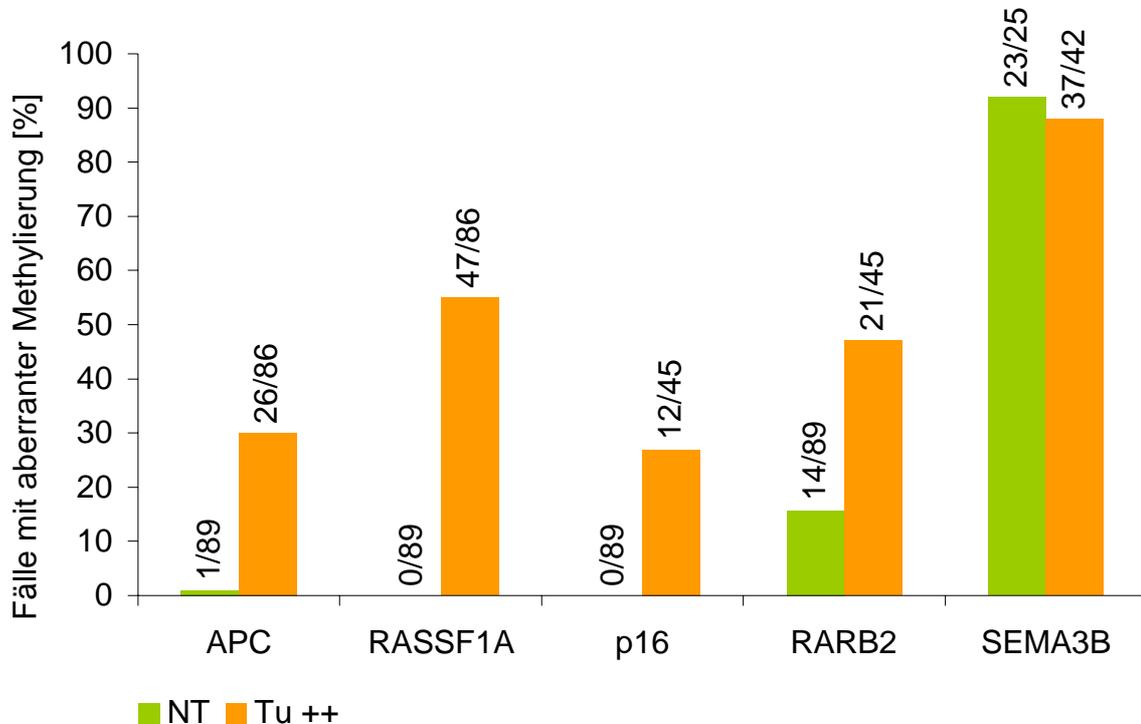


Abbildung 3.4: Fall-Kontroll Studie mit QMSP der Marker Gene *APC*, *RARB2*, *RASSF1A*, $p16^{INK4a}$ und *SEMA3B*. Dargestellt ist die Häufigkeit der aberranten Promotormethylierung in Bronchialsekreten mit multiplen Tumorzellen (Tu ++) und Bronchialsekreten von Risikopatienten ohne Lungenkarzinom (NT).

3.2.4 Methylierung in Bronchialsekreten verschiedener diagnostischer Gruppen

Nach der Etablierung und Evaluierung der Promotormethylierungen an Bronchialsekreten mit reichlich Tumorzellen (Tu ++), wurde das Fall-Kontroll-Studienkollektiv um folgende zytologische Diagnose-Gruppen erweitert: positiver Befund mit wenigen Tumorzellen (Tu +) im Bronchialsekret, dringender Verdacht (d. V.) und zweifelhaft (zw.). Außerdem wurden Fälle mit falsch-negativer (f.-neg.) Zytologie einbezogen. In den nachfolgenden Auswertungen wurden drei (*APC*, $p16^{INK4a}$, *RASSF1A*) und vier (*APC*, $p16^{INK4a}$, *RASSF1A*, *RARB2*) Marker miteinander kombiniert. Die Unterscheidung in ein drei bzw. Vier-Marker-Panel ist begründet durch die sinkende Spezifität bei Hinzunahme des vierten Markers *RARB2*. Die Spezifität mit drei Markern lag bei 99% und mit vier Markern bei 83%.

Für die zytologischen Diagnose-Gruppen Tu + und d. V. konnten mit drei Markern 65% (35/54) bzw. 69% (18/26) der Tumorfälle mittels QMSP detektiert werden. Mit vier

Markern fand sich für die entsprechenden Gruppen bei 87% (47/54) bzw. 92% (24/26) der Fälle ein positiver QMSP-Befund. Bei zytologisch zweifelhafter oder falsch-negativer Diagnose konnte ein Lungenkarzinom in 44% (11/25) bzw. 76% (19/25) und 37% (10/27) bzw. 59% (16/27) molekularbiologisch diagnostiziert werden.

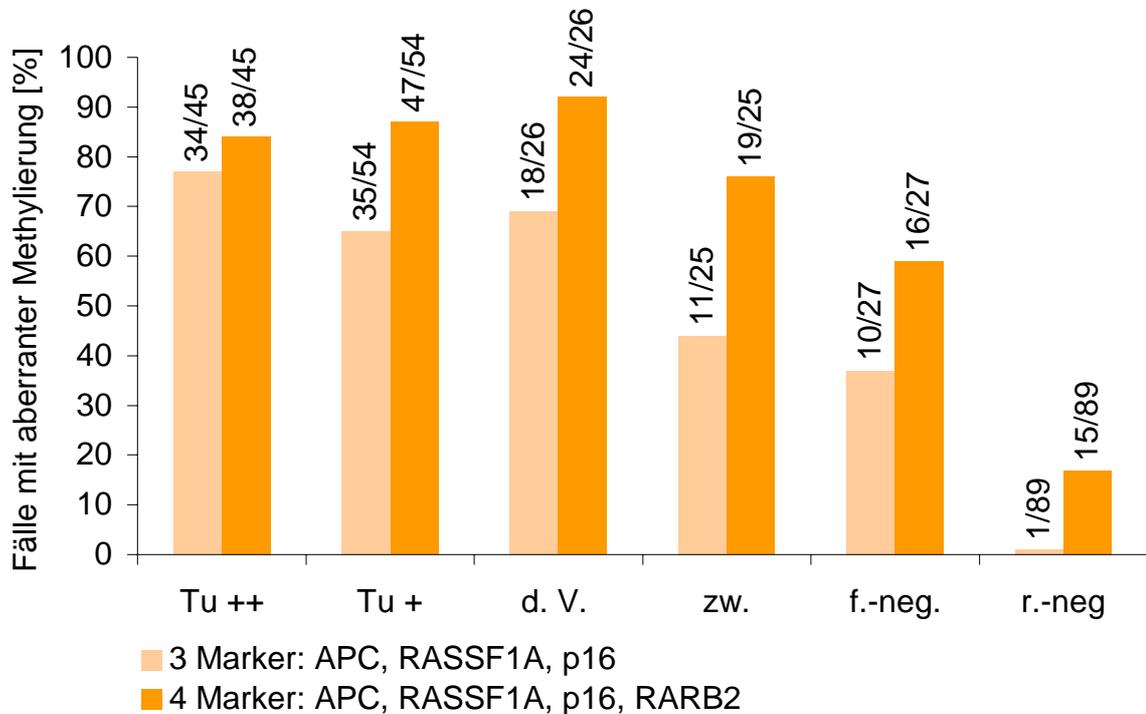


Abbildung 3.5: Fall-Kontroll Studie mit QMSP der Marker Gene *APC*, *RASSF1A*, *p16^{INK4a}* und *RARB2*. Dargestellt ist die Häufigkeit der aberranten Promotormethylierung in Bronchialsekreten mit unterschiedlichen zytologischen Diagnosegruppen. Tu ++ = BRS mit multiplen Tumorzellen, Tu + = BRS mit wenigen Tumorzellen, d. V. = dringender Verdacht, zw. = zweifelhaft, f.-neg. = falsch-negativ, r.-neg. = richtig negativ.

3.2.5 Sensitivität der Marker in Bezug auf histologische Subtypen und in Kombination miteinander

In Abbildung 3.6 wurden die Patienten der oben beschriebenen Fall-Kontroll-Studien nach dem histologischen Subtyp ihres Karzinoms gruppiert und der Methylierungsstatus der vier getesteten Promotorregionen synoptisch dargestellt (weißes Kästchen = unmethyliert, graues Kästchen = methyliert). Die Methylierungsfrequenz der verschiedenen Markergene korrelierte bis zu einem gewissen Grad mit dem histologischen Subtyp. Besonders ausgeprägt war diese Korrelation für den Marker *RASSF1A*, der 89% (36/40) der SCLC detektierte (Abb. 3.6).

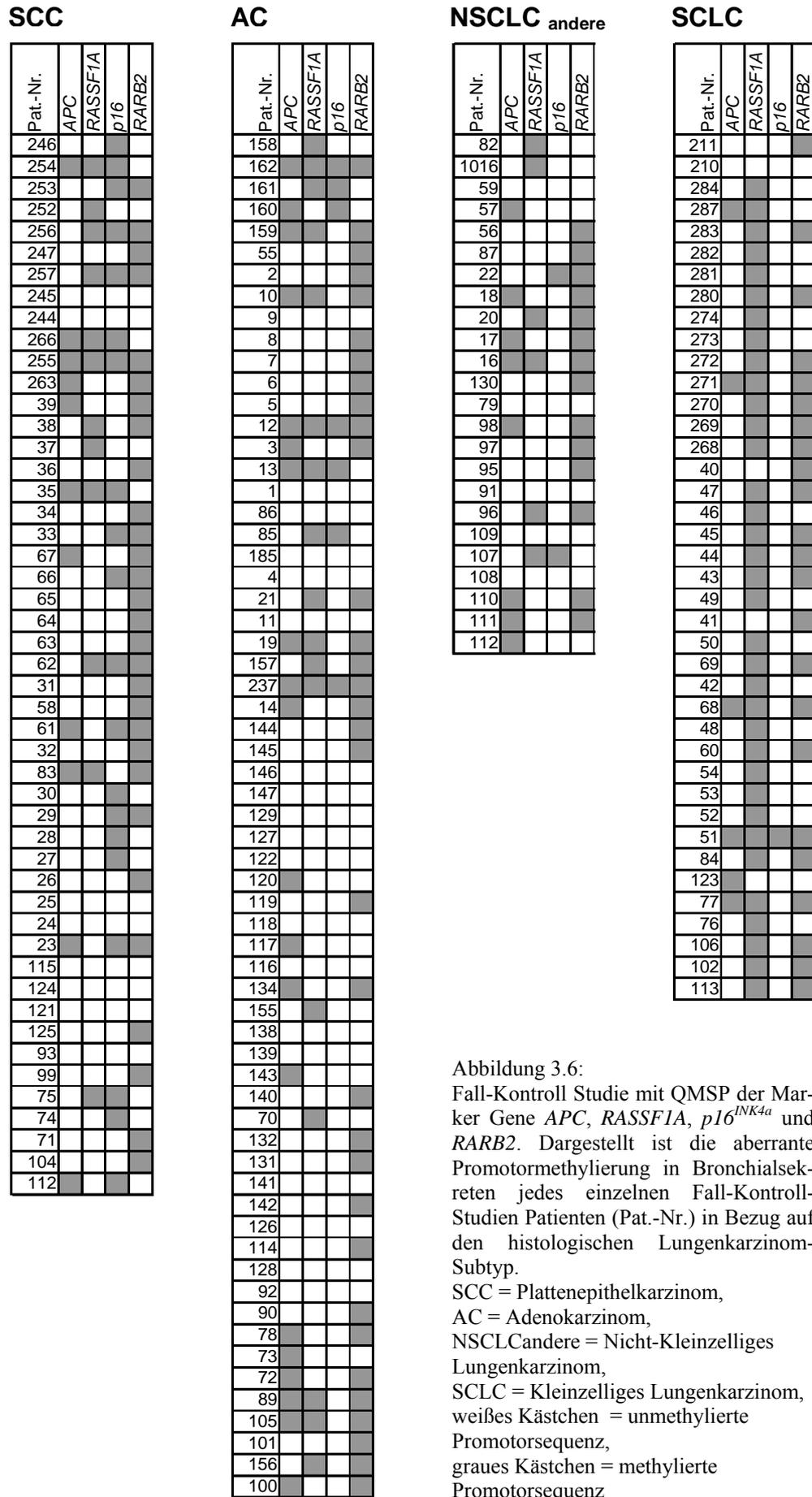


Abbildung 3.6:
 Fall-Kontroll Studie mit QMSP der Marker Gene *APC*, *RASSF1A*, *p16^{INK4a}* und *RARB2*. Dargestellt ist die aberrante Promotormethylierung in Bronchialsekreteten jedes einzelnen Fall-Kontroll-Studien Patienten (Pat.-Nr.) in Bezug auf den histologischen Lungenkarzinom-Subtyp.
 SCC = Plattenepithelkarzinom,
 AC = Adenokarzinom,
 NSCLC andere = Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom,
 SCLC = Kleinzelliges Lungenkarzinom,
 weißes Kästchen = unmethylierte Promotorsequenz,
 graues Kästchen = methylierte Promotorsequenz

Die Abbildung 3.7 beschreibt den Zugewinn der Sensitivität bei einer Verwendung des Drei- bzw. Vier-Marker-Panels. Die zusätzliche Untersuchung von *APC* und *p16^{INK4a}* steigerte die Sensitivität bei SCLC nur minimal auf 90% bei einer Spezifität von 99%. Die zusätzliche Überprüfung der Methylierung von *RARB2* erhöhte die Sensitivität zwar auf 98%, allerdings auf Kosten der Spezifität von nunmehr 83% (s. Abb. 3.7).

Anders als bei SCLC wiesen die einzelnen Marker bei NSCLC geringere Methylierungsprävalenzen auf. Der Marker *p16^{INK4a}* detektierte 41% (20/49) der Plattenepithelkarzinome (Abb. 3.7). Die zusätzliche Untersuchung von *APC* und *RASSF1A* erhöhte die Sensitivität auf 55% (27/49). Mit dem Vier-Marker-Panel konnten 84% (41/49) der Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.7).

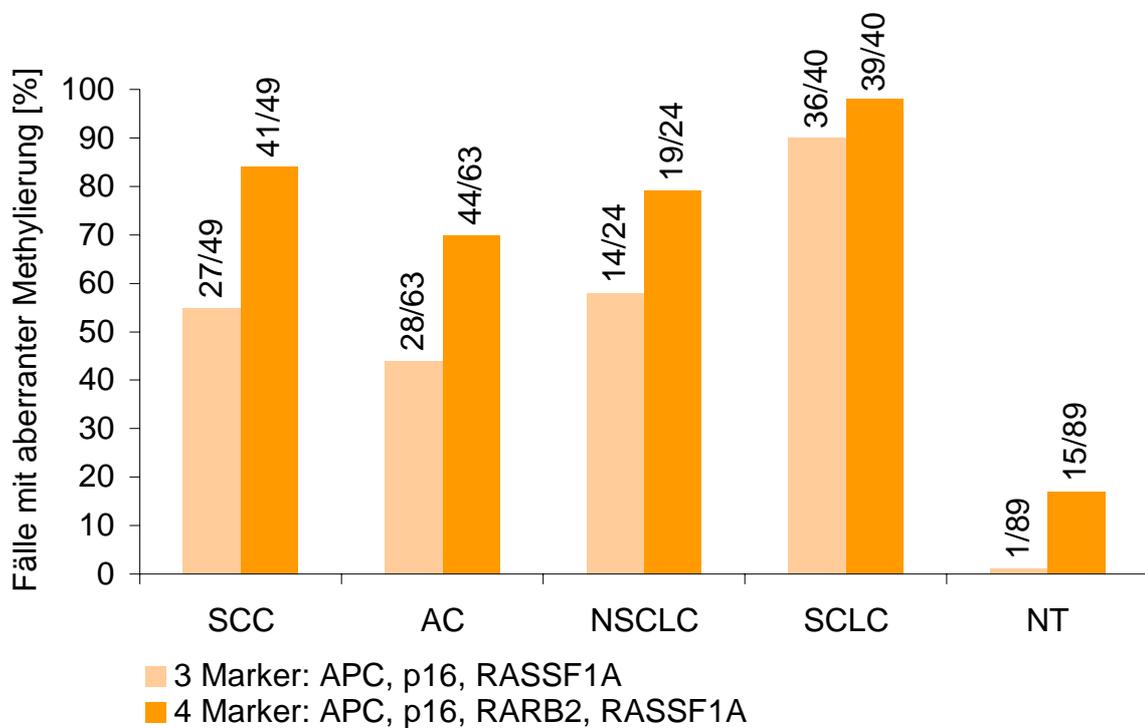


Abbildung 3.7: Fall-Kontroll Studie mit QMSP der Marker Gene *APC*, *RASSF1A*, *p16^{INK4a}* und *RARB2*. Dargestellt ist die aberrante Promotormethylierung in Bronchialsekreten verschiedener histologischer Lungenkarzinom-Subtypen (SCC = Plattenepithelkarzinom, AC = Adenokarzinom, NSCLC_{andere} = Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom, SCLC = Kleinzelliges Lungenkarzinom) und Nicht-Tumorfälle (NT) mit drei Markern (*APC*, *RASSF1A*, *p16^{INK4a}*) und vier Markern (*APC*, *RASSF1A*, *p16^{INK4a}*, *RARB2*).

Bei Adenokarzinomen und NSCLC_{andere} zeigte *APC* eine Sensitivität von ca. 33%. Die zusätzliche Untersuchung von *p16^{INK4a}* und *RASSF1A* detektierte 44% (28/63) der AC und 58% (14/24) der NSCLC_{andere}. Mit vier Markern konnte die Sensitivität für beide histologischen Subtypen auf 70% (44/63) bzw. 79% (19/24) erhöht werden.

Für einen diagnostischen Test ist die Kombination von verschiedenen Markern zur Erhöhung der Sensitivität unbedingt erforderlich. Das Drei-Marker-Panel erfüllte die

Bedingung der notwendigen hohen Spezifität. Die Kombination der Methylierungsergebnisse der Gruppen Tu ++, Tu +, d. V., zw. und f.-neg. aus den Fall-Kontroll-Studien ergab mit dem Drei-Marker-Panel eine Sensitivität von 59,7% (105/176) bei einer Spezifität von 99% (1/89). Für das Vier-Marker-Panel wurde eine Sensitivität von 81% (143/176) bei einer Spezifität von 83% (15/89) berechnet. Dabei war der Promotor von *RARB2* in Bronchialsekreten von Tumorpatienten doppelt so häufig methyliert wie bei Nicht-Tumorpatienten (48% versus 20,8%).

3.2.6 Klinisch-pathologische Korrelation

In die Berechnungen für die klinisch-pathologische Korrelation wurden die Fall-Kontroll Patienten der Tu + und Tu ++ Gruppe einbezogen. Ausschließlich das Methylierungslevel des Markers *APC* korrelierte positiv mit dem Alter sowohl der Tumor- als auch der Nicht-Tumorgruppe ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$). Für *APC*, *RASSF1A*, *p16^{INK4a}*, *RARB2* und *SEMA3B* konnte keine Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Geschlecht, Rauchgewohnheiten oder Tumorstadium festgestellt werden. Der Marker *RASSF1A* zeigte jedoch einen Trend, daß Hypermethylierung mit der Anzahl von Paket-Jahren assoziiert ist ($\chi^2 = 1,98$; $P > 0,25$). Ein Paketjahr entspricht dabei einem täglichen Konsum von 20 Zigaretten für die Dauer eines Jahres.

3.3 Retrospektive Kohorten-Studie: aberrante Promotormethylierung als Tumormarker

Die retrospektive Kohorten-Studie umfaßte 400 kontinuierlich gesammelte Bronchialsekrete von Patienten, die mit einem Verdacht auf ein Lungenkarzinom im Zeitraum vom 07.07.2002 bis zum 31.10.2002 in der Abteilung für Pneumologie des Florence-Nightingale-Krankenhauses, Düsseldorf, bronchoskopiert worden sind. Als Referenzstandard wurden die zeitgleiche oder im weiteren Verlauf erstellten histologischen und zytologischen Befunde verwendet. Von den 400 Bronchialsekreten erfüllten 259 die im Material- und Methodenteil (s. 2.3.2) beschriebenen Einschlußkriterien. Davon wurden 24 Sekrete aus der retrospektiven Kohortenstudie ausgeschlossen, da sich weniger als 800 ng DNA extrahieren ließ und somit eine Bisulfitkonversion mit anschließenden QMSP-Läufen nicht durchführbar war. Drei weitere Fälle wurden wegen mangelnden Referenzstandards ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. Die verbliebenen Bronchialsekrete setzten sich aus folgenden Gruppen zusammen: 103 Nicht-Tumorfälle, 111

Lungenkarzinomfälle und 21 sonstige Malignome. Eine genaue Aufschlüsselung der Gruppen erfolgte im Material- und Methodenteil (s. 2.3.2).

Mit dem Vier-Marker-Panel (*APC*, *p16^{INK4a}*, *RARB2* und *RASSF1A*) wiesen 100/235 Bronchialsekreten eine aberrante Promotormethylierung auf. Dabei konnten Lungenkarzinome und Rezidive mit einer Sensitivität von 78,5% bei einer Spezifität von 79% nachgewiesen werden. Aberrante Promotormethylierung mit dem Vier-Marker-Panel wurde außerdem noch in Bronchialsekreten von 21/103 Nicht-Tumorpatienten, 11/33 Nachsorge-Patienten ohne Rezidiv, 3/4 Patienten mit Lungenmetastasen (1x Zervix-, 1x Colon- und 1x Rektums-Karzinom) und 6/16 Patienten mit sonstigen Malignomen (1x epitheliales Mesotheliom, 2x Pleuramesotheliom, 1x CUP-Syndrom, 1x SCC des Larynx, 1x Dysplasie Grad 2 des Trachealepithels) detektiert. Keinerlei Hypermethylierung mit dem Vier-Marker-Panel zeigten 25/82 Lungenkarzinom-Fälle, 2 Patienten mit Rezidivtumor, 82/103 Nicht-Tumorfälle, 13/33 Nachsorge-Patienten ohne Rezidiv, 1 Bronchialsekret aus einem tumorfreien Lungenlappen bei bestehendem Lungenkarzinom, 1/4 Patient mit Lungenmetastase (1x Mamma-Karzinom) und 7/13 Patienten mit sonstigen Malignomen (2x epitheliales Mesotheliom, 1x Pleuramesotheliom, 1x Mesenchymom, 1x Morbus Hodgkin, 1x Non-Hodgkin-Lymphom der Lunge, 1x Pharynx-Karzinom und 1x pulmonalem Blastom).

Die Ergebnisse der retrospektiven Kohorten-Studie für das Drei-Marker-Panel (*APC*, *p16^{INK4a}* und *RASSF1A*) sind in Abb. 3.8 zusammengestellt. 56/235 Bronchialsekreten zeigten eine aberrante Promotormethylierung. Lungenkarzinome und deren Rezidive konnten mit einer Sensitivität von 52% bei einer Spezifität von 99% nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten ein Patient ohne Tumor und ein Patient mit einer pulmonalen Metastase eines Rektumkarzinoms eine aberrante Methylierung des *APC* Promotors. Zwei Patienten mit sonstigen Malignomen waren im Bronchialsekret für *APC* (Pharynx-Karzinom) bzw. *p16^{INK4a}* (epitheliales Mesotheliom) methylierungs-positiv. Ein Patient mit einem Morbus Hodgkin wies eine mittlere Dysplasie der Trachealschleimhaut auf und zeigte eine aberrante Methylierung des *RASSF1A* Promotors. Bei 7/27 Nachsorge-Patienten ohne Rezidiv wurde eine aberrante Methylierung des *APC* (3) bzw. des *RASSF1A* (4) Promotors bis zu 13 Monate nach der Erstdiagnose gefunden. Der sich anschließende Beobachtungszeitraum betrug 0 bis 16 Monate. In diesem Zeitraum zeigten sowohl ein *APC*- (14 Monate) als auch ein *RASSF1A*- (16 Monate) positiver Fall eine erneute Tumorprogression. Die DNA von 179 Bronchialsekreten wies keinerlei Methylierung auf. Darunter waren 37/76 Lungentumor- und 2/6 Rezidivfälle.

Ebenfalls keine Hypermethylierung zeigten die Promotoren von 102/103 Nicht-Tumorpatienten, 20/27 Nachsorge-Patienten ohne Rezidiv, 1 Bronchialsekret aus einem tumorfreien Lungenlappen bei bestehendem Lungenkarzinom, 3/4 Metastasen und 11/13 Fälle sonstiger Malignome.

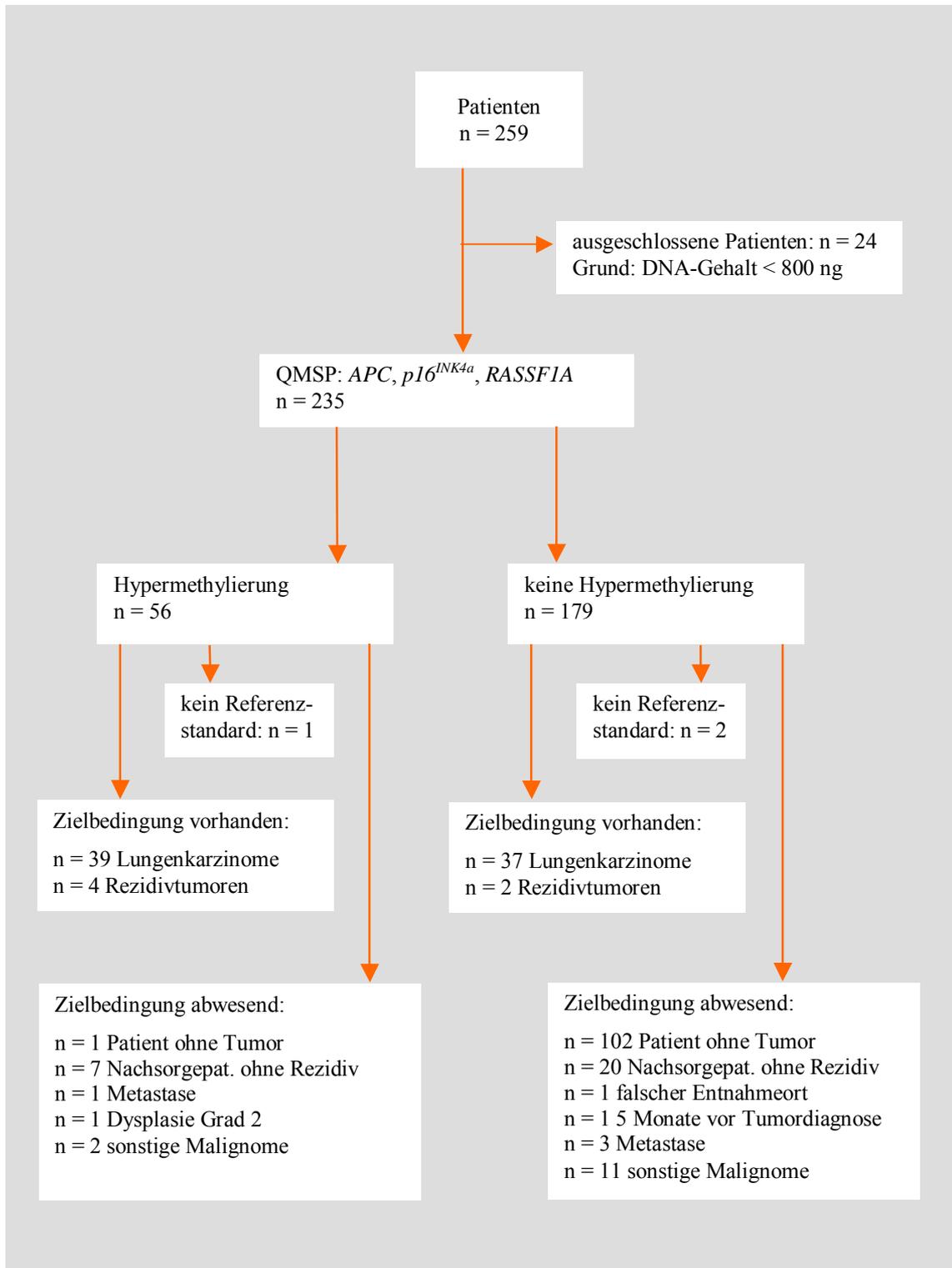


Abbildung 3.8: Retrospektive Kohorten-Studie. Flußdiagramm der QMSP Ergebnisse für das Drei-Marker-Panel (*APC*, *RASSF1A*, *p16^{INK4a}*). Als Referenzstandard wurden die zeitgleiche und im *Follow-up* erhobenen Diagnosen der Histologie und Zytologie verwendet.

Die Präparate von Patienten mit einem Lungenkarzinom, bei denen das Bronchialsekret in der diagnostischen Routine mit einem negativen zytologischen Befund bewertet wurde, wurden von einem Arzt für Pathologie auf Screening-Fehler überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß nachträglich in 3 von 45 Fällen Tumorzellen (1 SCLC) bzw. morphologisch auffällige Zellen (2x dringender Verdacht auf ein AC bzw. SCC) im Bronchialsekret gefunden werden konnten. Mit dem Drei-Marker-Panel waren 40% (18/45) der zytologisch falsch-negativen Befunde methylierungs-positiv. Dies bedeutet, daß Zellen bereits epigenetisch nachweisbare tumorspezifische Veränderungen aufweisen können, bevor sie morphologisch auffällig werden. Für die Zytologie erbrachte die QMSP mit dem Drei-Marker-Panel somit folgende diagnostische Zugewinne: 1. Identifizierung von Lungenkarzinomen in 40% (18/45) der zytologisch falsch-negativen Befunde; 2. Bestätigung eines zytomorphologisch bestehenden dringenden Verdachts in 80% (8/10) und eines zweifelhaften Befunds in 25% (1/4).

Die Methylierungsfrequenzen des Drei-Marker-Panels variierten zwischen der Fall-Kontroll-Studie und der retrospektiven Kohorten-Studie wie folgt: 90% vs. 80% für SCLC, 37% vs. 58% für NSCLC_{andere}, 44% vs. 50% für AC, 55% vs. 42% für SCC.

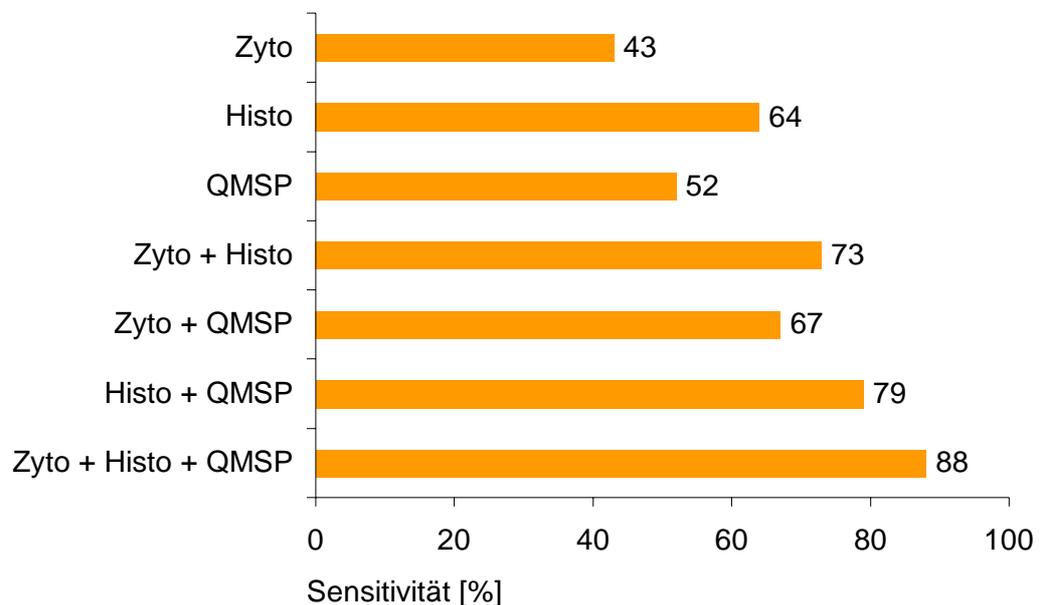


Abbildung 3.9: Retrospektive Kohorten-Studie. Sensitivität von Histologie, Zytologie und 3 Marker Panel für den Nachweis eines Lungenkarzinoms. Dargestellt ist die Sensitivität der einzelnen Methoden und ihrer Kombination.

Die Abbildung 3.9 gibt die Sensitivität des Nachweises von Lungenkarzinomen bei der ersten Bronchoskopie an. Dargestellt sind die Werte für die Zytologie, Histologie und das Drei-Marker-Panel alleine und für verschiedene methodische Kombinationen.

Mit der Zytologie bzw. Histologie lassen sich 43% bzw. 64% der Tumoren nachweisen. Beide diagnostischen Methoden zusammen detektierten 73% der Lungenkarzinome. Durch die Kombination der QMSP mit der Histologie und Zytologie konnte die Sensitivität der Lungenkarzinomdiagnostik mit einer einzigen Bronchoskopie auf 88% gesteigert werden.

3.4 Methylierungsmuster in zytologischem und histologischem Untersuchungsmaterial

3.4.1 Vergleich der Methylierungsmuster in zytologischen und histologischen Untersuchungsmaterial mittels QMSP

Die Korrelation der Methylierungsmuster in zytologischem (Bronchialsekret) und histologischem (Gewebebiopsie) Untersuchungsmaterial sollte klären, inwieweit sich Rückschlüsse vom Methylierungsbefund des zytologischen Materials auf den Methylierungsstatus des Tumors ziehen lassen. Dazu wurde der Methylierungsstatus der Promotoren von *APC*, *p16^{INK4a}*, *RARB2* und *RASSF1A* an Gewebeproben von insgesamt 25 Tumoren und dem zugehörigen Bronchialsekreten untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt. Die aberrante Methylierung des *APC* Promotors konnte in 3/25 Fällen sowohl im Tumor als auch im dazugehörigen Bronchialsekret nachgewiesen werden. Dabei wurde der oben eingeführte Schwellenwert von ≥ 35 nicht berücksichtigt, da unklar ist, ob sich der für Bronchialsekrete verwendete Wert sich auf Tumorgewebe übertragen läßt. Zusätzlich zeigte sich in weiteren 9 Bronchialsekreten eine aberrante Methylierung. Die Hypermethylierung des *APC* Promotors 1A mißt präferenziell eine Schädigung des Lungenepithels und weist nicht zwingend die Methylierung im Tumor nach. Die Methylierung des *RARB2* Promotors trat in 5 Fällen nur im Tumor, in 9 Fällen nur im Bronchialsekret und in weiteren 10 Fällen sowohl im Tumor als auch im Bronchialsekret auf. Bei der Auswertung wurde – wie bereits schon bei *APC* – der oben eingeführte Schwellenwert von ≥ 30 nicht berücksichtigt. *RARB2* ist nicht tumorspezifisch und somit als Risikomarker einzustufen. Die aberrante Methylierung des Promotors von *p16^{INK4a}* wurde fünfmal ausschließlich in Tumoren und einmal sowohl im Tumor als auch im Bronchialsekret nachgewiesen. Bei einem der *p16^{INK4a}* positiven Tumorgewebe war das dazugehörige Bronchialsekret zytologisch negativ und enthielt somit keine Tumorzellen. Da der Marker tumorspezifisch ist, konnte er offensichtlich in dem tumorfreien Bronchialsekret keine Methylierung nachweisen. Der Promotor von

RASSF1A war bis auf in einem Fall im Tumorgewebe und dazugehörigem Bronchialsekret gleichzeitig hypermethyliert. Bei dem diskrepanten Fall handelt es sich um das bereits bei *p16^{INK4a}* beschriebene negative Bronchialsekret. Zusammenfassend läßt sich aus dem Vergleich von Bronchialsekret zu Tumorgewebe ableiten, daß in Bronchialsekreten von den Markern *p16^{INK4a}* und *RASSF1A* ausschließlich Tumorzellen detektiert wurden. Die Methylierung von *APC* und *RARB2* hat dagegen bis zu einem gewissen Grad eine Vorschädigung des Lungenepithels angezeigt.

Tabelle 3.2: Vergleich der QMSP-Ergebnisse in Tumorgewebe und dazugehörigem Bronchialsekret (BRS). meth. = methyliert, unmeth. = unmethyliert.

Promotor	Tumor meth.	BRS meth.	Tumor unmeth.	BRS unmeth.	Tumor / BRS meth.	Tumor / BRS unmeth.
<i>APC</i>	3	12	22	13	3	13
<i>p16^{INK4a}</i>	6	1	19	24	1	19
<i>RARB2</i>	15	19	10	6	10	1
<i>RASSF1A</i>	16	15	9	10	15	9

3.4.2 Analyse der Methylierungsmuster einzelner Promotoren

Die Klonierung und anschließende Sequenzierung von Promotorregionen verschiedener Tumoren sollte Aufschluß über das Ausmaß der Methylierung einzelner Promotoren und gegebenenfalls das Vorliegen einer Gewebe-Heterogenität hinsichtlich von Methylierungsdefekten geben. Zusätzlich konnte auf diese Weise die Effizienz der Bisulfidkonversion und die Spezifität der *Primer*/Sonden-Paare bestimmt werden. Die Klonierungs-*Primer* wurden dabei so gewählt, daß sie die mittels QMSP untersuchten Promotorregionen umschlossen. Für den *p16^{INK4a}* Promotor gelang es nicht ein klonierbares PCR-Fragment zu erzeugen. Die Ergebnisse für die Untersuchung der Promotoren *APC*, *RARB2* und *RASSF1A* sind in Abbildung 3.10 zusammengefaßt.

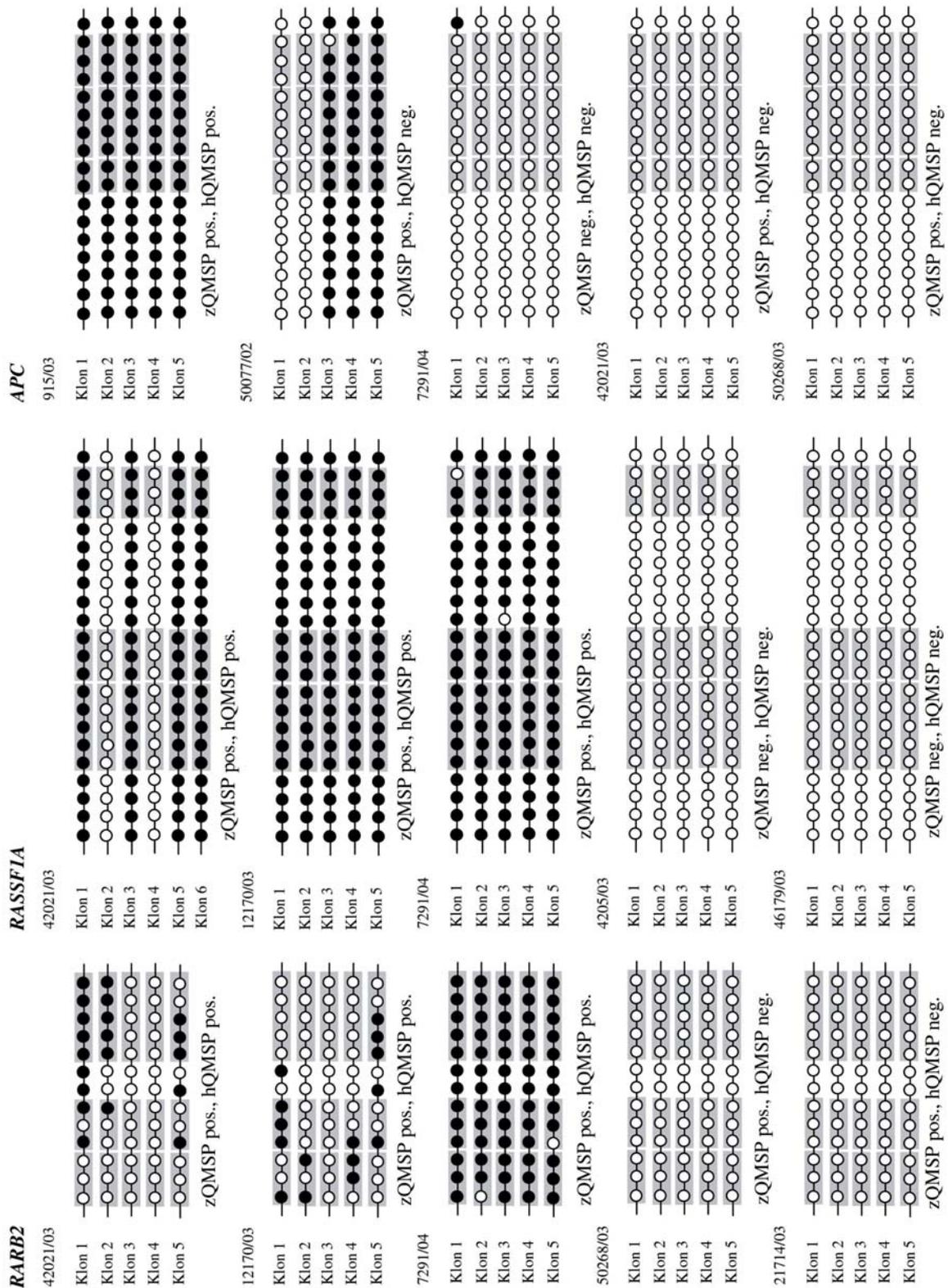


Abbildung 3.10: Untersuchung von Promotorregionen auf die Methylierung einzelner CpG-Dinucleotide. Dargestellt sind die Ergebnisse der Klonierung von Promotorfragmenten von *APC*, *RARB2* und *RASSF1A*. Je Fall wurden 5-6 Klone sequenziert. Methylierte CpG-Dinucleotide sind als schwarz hinterlegte und unmethylierte CpG-Dinucleotide als farblose Kreise dargestellt. Die von den *Primer/TaqMan*[®]-Paaren erfaßten CpG-Dinucleotide sind grau hinterlegt. Zusätzlich zur Fallnummer ist unter den einzelnen Klonen das Ergebnis der QMSP an den korrespondierenden histologischen Präparaten (hQMSP) und zytologischen Präparaten (zQMSP) angegeben (pos = methyliert, neg = unmethyliert).

Für den *APC* Promotor 1A wurde DNA von drei QMSP negativen und 2 QMSP positiven Tumoren in *E. coli* transformiert. Jeweils 5-6 Klone wurden sequenziert (s. Abb. 3.10). Das klonierte Fragment umfaßte insgesamt 17 CpG-Dinukleotide, wovon 9 von dem *APC-Primer*/Sonden-Paar abgedeckt wurden. Die *APC* negativen Tumoren waren mit Ausnahme eines Klons homogen unmethyliert. Klon 1 des Patienten 7291/04 wies ein methyliertes CpG-Dinukleotid auf. Zwei von den drei im Tumor *APC* negativen Fällen waren im Bronchialsekret hypermethyliert. Das QMSP positive Tumorgewebe von Patient 915/03 zeigte eine homogene Methylierung des *APC* Promotors. Der ebenfalls *APC* positive Fall 50077/02 wies eine homogene Promotormethylierung bei drei Klonen und keinerlei Hypermethylierung bei 2 Klonen auf.

Für den *APC* Promotor 1A wurde außerdem DNA aus 14 Bronchialsekreten direkt, d. h. ohne Zwischenschritt über die Klonierung, sequenziert. Die Sequenzen waren entsprechend überlagert, ließen sich jedoch klar auswerten. So zeigten 7 Bronchialsekrete mit negativer QMSP keinerlei Methylierung der CpG-Dinukleotide (2 Fälle gutartiger Lungenerkrankung, 1 SCC, 2 NSCLC_{andere}, 2 SCLC). Bei weiteren 7 Fällen wurde eine Methylierung von 1-8 CpG-Dinukleotiden (3 Fälle gutartiger Lungenerkrankung, 2 AC, 1 NSCLC_{andere}, 1 SCLC) festgestellt. Der *APC* Promotor war bei diesen Fällen unterschiedlich stark methyliert.

Für die Untersuchung des *RARB2* Promotors wurde DNA von drei QMSP positiven und zwei QMSP negativen Geweben transformiert. Das klonierte PCR-Fragment umfaßte 13 CpG-Dinukleotide, wovon 11 vom *Primer*/Sonden-Paar abgedeckt wurden. Der Promotor von *RARB2* wies in 2 von 3 QMSP positiven Geweben ein heterogenes Methylierungsmuster auf (s. Abb. 3.10). Drei der insgesamt 10 untersuchten Klone zeigten keinerlei Methylierung. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurde hier DNA von im Gewebe verbliebenen Nicht-Tumorzellen kloniert. Der ebenfalls QMSP positive Fall 7291/04 wies eine nahezu homogene Hypermethylierung der Dinukleotide auf. Die beiden QMSP negativen Gewebe zeigten keinerlei Methylierung der untersuchten *RARB2* Promotorregion.

Für die Untersuchung des *RASSF1A* Promotors wurde DNA von drei QMSP positiven und zwei QMSP negativen Geweben in *E. coli* transformiert. Die dazu nötigen PCR-Fragmente umfaßten insgesamt 22 CpG-Dinukleotide, wovon 11 vom *Primer*/Sonden-Paar abgedeckt wurden. Alle drei QMSP positiven Gewebe wiesen eine nahezu komplette Methylierung des untersuchten *RASSF1A* Promotors auf (s. Abb. 3.10). Beim Fall 42021/03 wurden außerdem noch 2 homogen unmethylierte Klone detektiert, was ver-

mutlich – wie bereits bei *RARB2* beschrieben – auf zwischen Tumorzellen liegenden Nicht-Tumorzellen zurückzuführen ist. Die zwei im Tumor QMSP negativen Fälle wiesen keinerlei Methylierung der untersuchten CpG-Dinukleotide auf.

Bei der Auswertung der einzelnen Sequenzen zeigte sich, daß die Bisulfitkonversion eine Effizienz von nahezu 100% besaß. In Abbildung 3.11 sind Ausschnitte einer methylierten und unmethylierten DNA-Sequenz des *RASSF1A* Promotors dargestellt. Bei der Bisulfitkonversion werden unmethylierte Cytosine zu Uracil deaminiert. In der Sequenz sind sie dann als Thymin abzulesen. Die Sequenzierung des Gegenstranges zeigt entsprechend eine Konvertierung von Guanin (G) zu Adenosin (A). Die unten abgebildete unmethylierte Sequenz wies eine Desaminierung aller Cytosinbasen zu Uracil auf. Bei der methylierten Sequenz blieben nur die 5-Methylcytosinbasen als Cytosin erhalten, wohingegen die unmethylierten Cytosine zu Uracil desaminiert wurden. Das Elektrophärogramm der Sequenzen zeigte bei den Klonierungen eine saubere Sequenz.

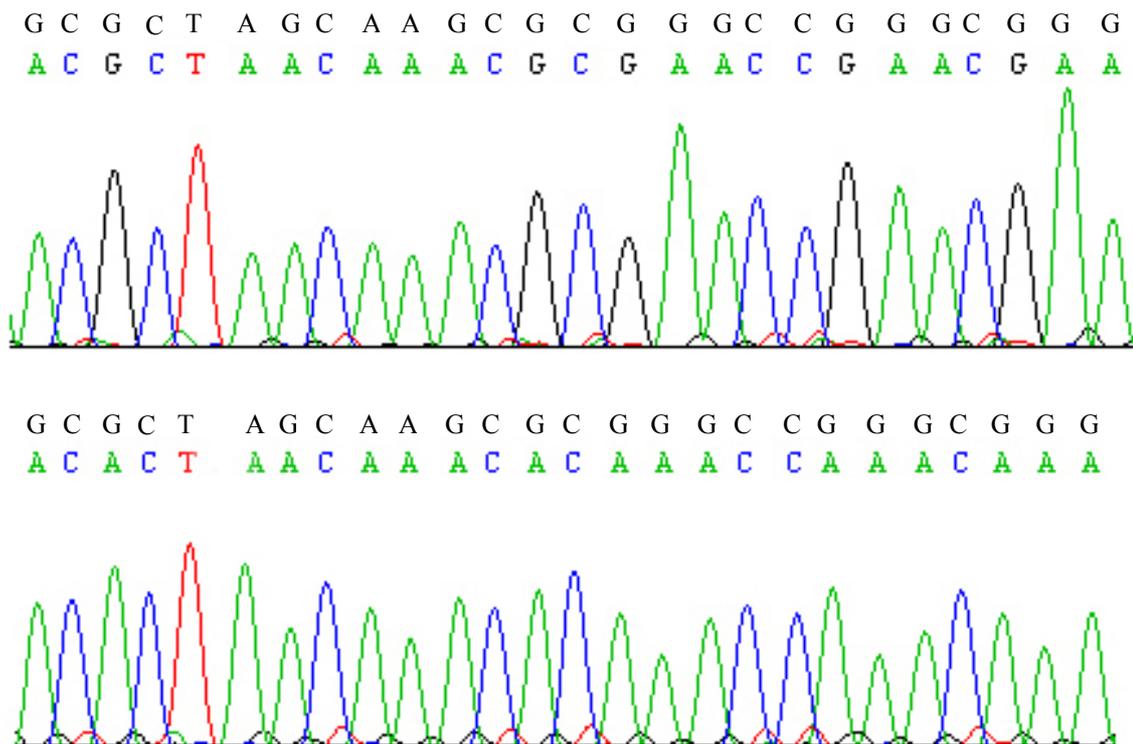


Abbildung 3.11: Dargestellt ist ein Ausschnitt zweier Sequenzen vom *RASSF1A* Promotor. Die obere Sequenz weist methylierte CpG-Dinukleotide auf, die untere Sequenz ist komplett unmethyliert. Unmethylierte Cytosine werden Uracil desaminiert, bei der Sequenzierung erhält man daher Thymin statt Cytosin bzw. auf dem Gegenstrang Adenosin statt Guanin. Mit schwarzen Buchstaben ist die Originalsequenz über die sequenzierte Sequenz geschrieben. Außerdem ist das Elektrophärogramm der Sequenzierung dargestellt, um die Reinheit der Sequenzen zu demonstrieren.

3.5 Globale DNA Hypomethylierung

3.5.1 Globale DNA Hypomethylierung als Tumormarker

Nach bisherigen Erkenntnissen nimmt die globale Methylierung der DNA im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe ab. Seit kurzer Zeit ist ein Antikörper gegen 5-Methylcytosin erhältlich, der sich als potentieller Tumormarker an Bronchialsekret-Ausstrichen eignen könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Antikörper an Zytozentrifugat-Präparaten von Bronchialsekreten mit reichlich Plattenepithelkarzinomzellen etabliert. Insgesamt wurden Zytozentrifugate von 56 Patienten mit dem 5-Methylcytosin Antikörper inkubiert. Da eine mangelnde Anfärbung einen positiven Tumorbefund liefert, wurden nur Immunreaktionen evaluiert, die eine Anfärbung von mindestens 90% der Referenzzellen aufwiesen. Letztendlich konnten daher nur 27 von 56 Präparaten ausgewertet werden. Eine starke globale DNA Hypomethylierung der Tumorzellen im Vergleich zu den Referenzzellen konnte bei 16/27 (56%) Präparaten visuell wahrgenommen werden.

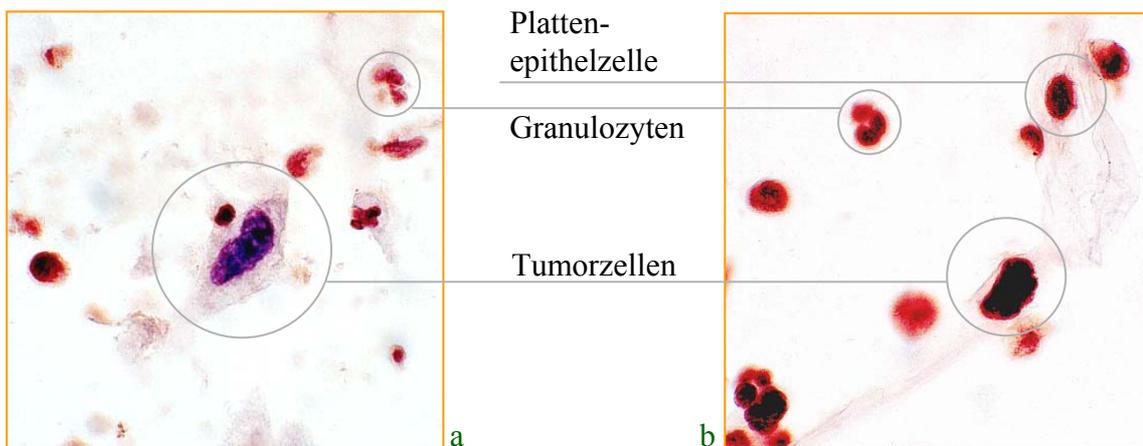


Abbildung 3.12a, b: 5-Methylcytosin-Antikörper. Immunzytochemische Anfärbung von Plattenepithelkarzinomzellen und Granulozyten aus Bronchialsekreten von zwei Patienten. Bild a zeigt einen vom Hämatoxilin bläulich gefärbten Kern einer Tumorzelle mit folglich niedrigem 5-Methylcytosin-Gehalt und mehrere durch den Antikörper stark bräunlich angefarbte Granulozyten mit einem hohen 5-Methylcytosin-Gehalt. Bild b zeigt eine starke Anfärbung sowohl der Tumorzelle als auch der Granulozyten und des oralen Plattenepithels mit dem Antikörper.

Die Abbildung 3.12 a zeigt eine Tumorzelle mit einem geringen 5-Methylcytosin Gehalt (Kern bläulich gefärbt) im Verbund mit stark vom Antikörper angefarbten – folglich hypermethylierten – Referenzzellen (Kern bräunlich gefärbt). In Abbildung 3.12b wiesen sowohl die Tumor- als auch die Referenzzellen eine starke Hypermethylierung auf. Eine Etablierung der Immunreaktion an bereits aus der Routine vorhandenen Ausstrichpräparaten war nicht möglich, es konnten nur frisch angefertigte Zytozentrifugate verwendet werden.

3.5.2 DNA Hypomethylierung in histologischen Präparaten von Lungenkarzinomen

Insgesamt wurden 18 Tumoren von Patienten mit Lungenkarzinomen (11 SCC, 7 SCLC) auf DNA Hypomethylierung untersucht. Von jeder Tumorbiopsie wurden zwei 4 µm Schnitte angefertigt. Der erste Schnitt wurde mit einer Feulgenfärbung und der zweite mit dem 5-Methylcytosin-Antikörper angefärbt. Als Referenzzellen wurden Lymphozyten und als Analysezellen Tumorzellen definiert. Morphologisch unauffälliges Bronchialepithel eignete sich nicht als Referenz, da bei Rauchern dieses Epithel eine Reservezell-Hyperplasie aufweist, die Kerne sich in den histologischen Schnitten stark überlagern und sich oft in der S-Phase befinden (s. Abb. 3.13b, c). Mittels Bild-Zytometrie wurde zunächst der durchschnittliche DNA-Gehalt der Referenz- und Tumorzellen und anschließend die Intensität der Antikörper Färbung bei den einzelnen Schnittpräparaten bestimmt. Für die Auswertung wurde der Wert der Färbeintensität des Antikörpers bei den Analysezellen um den durchschnittlichen DNA-Gehalt der Tumorzellen korrigiert. Nur Präparate von Plattenepithelkarzinomen konnten ausgewertet werden, da sich bei den SCLC die einzelnen Tumorzellen – wie in Abbildung 3.14 gezeigt – nicht voneinander abgrenzen ließen und somit eine zytometrische Messung unmöglich durchzuführen war. Einer der elf SCC-Präparate konnte auf Grund zu weniger Lymphozyten im Präparat nicht gemessen werden. Bei den 10 gemessenenen Präparaten wiesen die SCC-Tumorzellen eine mittlere DNA-Ploidie von 2,5 bis 5,7c¹ (Median von 1,797) auf. DNA Hypomethylierung wurde in 8/10 Lungenkarzinomen nachgewiesen. In diesen 8 Fällen lag der 5-Methylcytosin-Gehalt der Tumorzellen im Median bei 70,6% der Referenzzellen (Spannweite: 35,8% bis 89,9%). In Abbildung 3.13 ist exemplarisch die Immunfärbung an Schnittpräparaten von drei hypomethylierten SCC-Biopsien gezeigt. Allgemein variiert die Anfärbung einzelner Zelltypen in einem gewissen Maße je nach Anschnittebene der Zellen. Optisch dunkler erscheinende Zellen müssen nicht zwingend einen höheren DNA- bzw. Methylgruppen-Gehalt als hell gefärbte Zellen aufweisen, da auch die Zellfläche berücksichtigt werden muß. Bei der Bestimmung des DNA-Gehalts und der Färbeintensität des Antikörpers wurde aus diesem Grund die integrierte – also auf die Fläche bezogene – optische Dichte ermittelt. In Abbildung 3.13a sind durchweg schwach gefärbte Tumorzellen und drei stark gefärbte Mitosen zu sehen. Die Mitose unten rechts im Bild liegt in einer anderen Schnittebene.

¹ 1c entspricht einem haploiden Chromosomensatz.

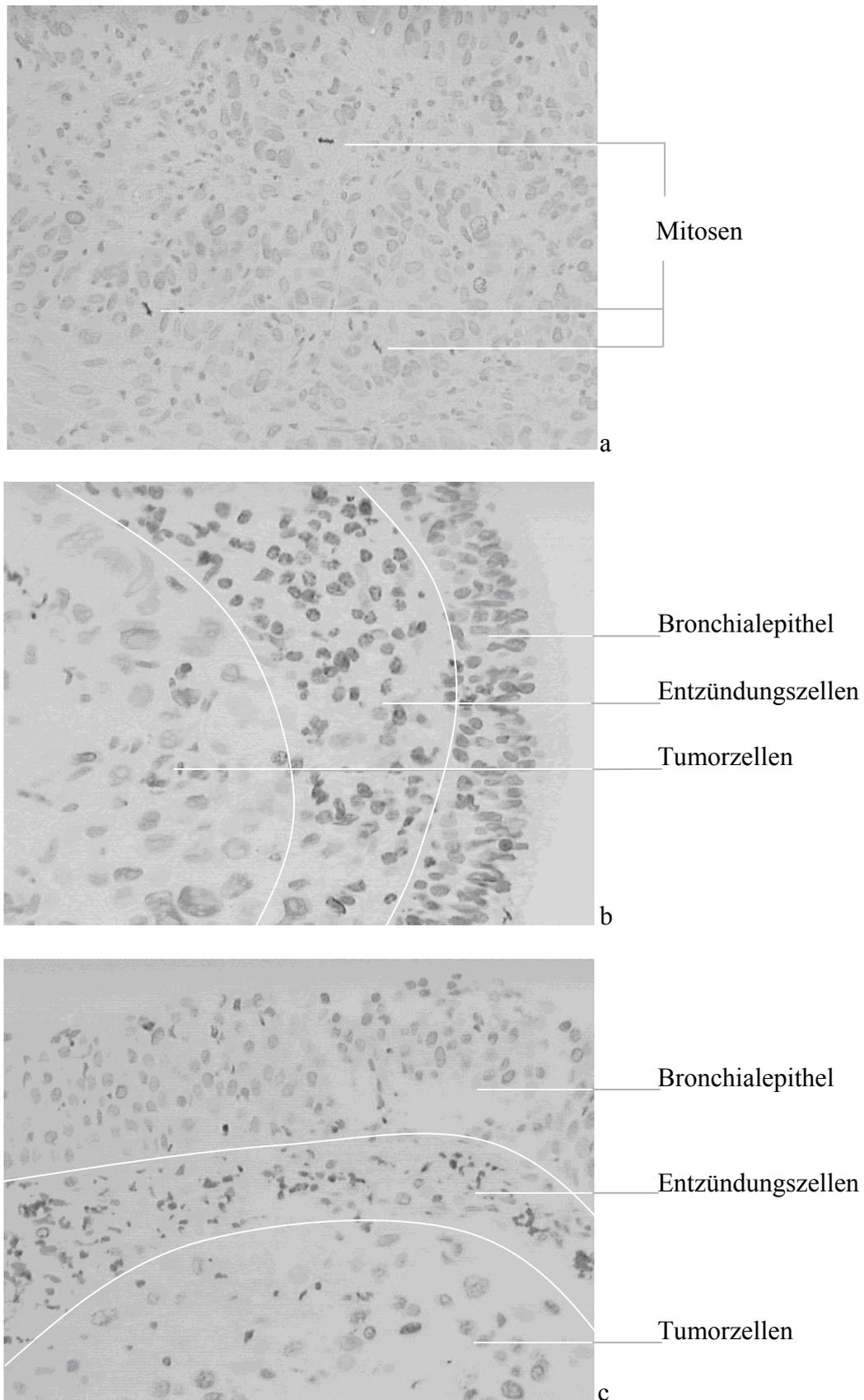


Abbildung 3.13a, b, c: 5-Methylcytosin Antikörper. Immunhistochemische Anfärbung von histologischen Schnitten von Plattenepithelkarzinom-Biopsien dreier unterschiedlicher Patienten. Bild a zeigt eine Reihe blaß gefärbter Tumorzellen und drei stark angefärbte Mitosen. Bild b und c zeigen eine starke Anfärbung sowohl des Bronchialepithels als auch der Entzündungszellen. Die Tumorzellen weisen eine schwächere Anfärbung auf.

Aus diesem Grund ist die Färbung nicht so prägnant. Der 5-Methylcytosingehalt dieses Tumors war um 30% verringert. Rechts im Bild von Abbildung 3.13b ist ein gut angefarbtes Bronchialepithel mit Reservezellhyperplasie zu sehen. Die Zellen überlagern sich teils stark. Links im Bild befinden sich schwächer gefärbte Tumorzellen. Der Tumor wies einen um 29% verminderten 5-Methylcytosingehalt auf. Zwischen Tumorzellen und Bronchialepithel liegen bandförmig stark angefarbte Entzündungszellen, dabei handelt es sich vornehmlich um Lymphozyten. Das Zellband oben in Abbildung 3.13c zeigt ein Bronchialepithel mit Reservezellhyperplasie. Darunter liegt bandförmig eine Schicht von stark angefarbten Entzündungszellen. Dabei handelt es sich sowohl um Lymphozyten als auch um Granulozyten. Der untere Teil der Abbildung zeigt blasser gefärbte Tumorzellen. Der Fall hatte einen um 32% verminderten 5-Methylcytosingehalt.



Bronchialepithel

Kleinzelliges Karzinom

Abbildung 3.14: Immunhistochemische Anfärbung eines histologischen Schnitts von einer Kleinzelligen-Lungenkarzinom-Biopsie. Links von der weiß eingezogenen Linie sind basale Anteile des Bronchialepithels mit Reservehyperplasie zu sehen. Nach rechts folgen Tumorzellen eines Kleinzelligen-Karzinoms mit ausgeprägten Zellüberlagerungen und Quetschungsartefakten. Die Karzinomzellen weisen den für Kleinzeller charakteristischen „Schmier“ auf, d. h. die Tumorzellen sind nicht mehr voneinander abgrenzbar und somit nicht zytometrisch meßbar.

Es ist bekannt, daß in Tumoren eine globale Hypomethylierung der DNA mit einer lokalen Hypermethylierung von Promotorregionen einhergehen kann. Durch einen Vergleich der Ergebnisse zur Hypomethylierung mit denen zur Promotor Hypermethylierung sollte festgestellt werden, ob ein Zusammenhang bei den hier untersuchten Fällen zu finden ist. Aus dem Biopsiematerial der beschriebenen histologischen Präparate wurde DNA isoliert und der Methylierungsstatus der Promotorregionen der Gene *APC*, *p16^{INK4a}*, *RARB2* und *RASSF1A* bestimmt. Eine Hypermethylierung konnte 3x in 0/4, 3x in 1/4 und 4x in 2/4 Promotorregionen nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen aberranter Promotormethylierung und globaler Hypomethylierung konnte nicht gefunden werden.

3.6 Aberrante Promotormethylierung in Sputen

Im Fall-Kontroll-Studien Design wurde die Hypermethylierung in Sputen von insgesamt 10 Patienten untersucht. Mit den Markern *APC*, *p16^{INK4a}* und *RASSF1A* konnte einer von sechs Fällen mit dringendem zytologischen Tumorverdacht erhärtet werden. Von den vier Sputen mit Tumorzellen wurden zwei mit drei Markern detektiert. Die Hinzunahme von *RARB2* als Marker brachte nur bei einem Fall mit dringendem Tumorverdacht einen weiteren Zugewinn.

4. Diskussion

4.1 Extraktions-Studie

4.1.1 DNA Extraktion aus Saccomanno fixierten Bronchialsekreten

Die meisten bisherigen Studien, die den Einfluß verschiedener Fixative und DNA Extraktionsmethoden auf die Qualität der DNA untersuchten, verwendeten dazu Routinematerial aus der Histologie. An zytologischen Material wurden keine systematischen Studien an Saccomanno Fixativ, das ein Standard Fixativum der extragenitalen Zytologie ist, durchgeführt (Garcia Closas *et al.* 2001, Kerstens *et al.* 2000, Tobal *et al.* 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde aus 45 Bronchialsekreten mit je vier verschiedenen Extraktionsprotokollen DNA isoliert. Diese wurde hinsichtlich ihrer Ausbeute, Reinheit, Fragmentlänge und Amplifizierbarkeit überprüft. Alle Bronchialsekrete wurden direkt nach der Bronchoskopie mit auf Alkohol basierendem Saccomanno Fixativ fixiert, da es die Zellmorphologie gut erhält und dem Bakterienwachstum bis zur Verarbeitung des Materials entgegenwirkt. Es konnte gezeigt werden, daß das Fixativ die DNA in einem hochmolekularen, unfragmentierten Zustand bewahrt. Auf Agarosegelen konnten Fragmentlängen von > 40 kb ermittelt werden. Die Ergebnisse werden auch von Untersuchungen, die Tobal und Mitarbeiter durchführten, unterstützt (Tobal *et al.* 1989). Sie verwendeten 14,3%igen Alkohol zum Fixieren ihrer Proben und überprüften die Länge ihrer DNA-Fragmente mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese. Der Großteil der Fragmente hatte eine Größe von 35-63 kb (Range>15-97 kb).

Alle vier getesteten Extraktionsprotokolle isolierten DNA, die intakt genug war, um größere PCR-Fragmente von bis zu 989 bp zu amplifizieren. Kerstens und Mitarbeiter verwendeten ebenfalls das Saccomanno Fixativ für Zervixabstriche und führten erfolgreich ein HPV Screening mit LiPA-PCR durch (Kerstens *et al.* 2000). Auch an histologischem Material konnte gezeigt werden, daß 95%iger Alkohol von verschiedenen untersuchten Fixativen zu dem erfolgreichsten in Bezug auf die Amplifikation mittels PCR zählte (Greer *et al.* 1991, Greer *et al.* 1994).

Unabhängig von dem verwendeten Extraktionsprotokoll variierte die DNA-Ausbeute zwischen den einzelnen Bronchialsekreten stark. Diese Schwankungen waren nicht abhängig vom Entzündungsgrad, sondern zurückzuführen auf zu wenig Restmaterial.

Bei der Planung von Studien mit Bronchialsekreten ist daher zu bedenken, daß ein Teil der Sekrete wegen ungenügender DNA-Menge aus den zu untersuchenden Kollektiven heraus fällt.

Diese Studie zeigte, daß DNA-Ausbeute, -Reinheit und -Fragmentgröße signifikant abhängig von dem verwendeten Extraktionsprotokoll waren. Die Aufreinigung mit Phenol-Chloroform erreichte die höchste DNA-Ausbeute und größten DNA-Fragmente. Die DNA-Reinheit war geringfügig schlechter als bei den anderen Extraktionsmethoden. Ein Vorteil der Phenol-Chloroform Aufreinigung gegenüber den auf Silikamembran basierenden Methoden liegt in der besseren Anpaßbarkeit der nötigen Chemikalienmenge auf die wechselnden Ausgangsmengen von Zellen in Bronchialsekreten. Jedoch war die Extraktion zeitaufwendiger und forderte die Verwendung toxischer Chemikalien. Ob in der extrahierten DNA-Lösung Phenol verblieben war, mußte bei einer Wellenlänge von 230 nm zusätzlich überprüft werden und ggf. die Extraktion wiederholt werden.

Das Puregene DNA Extraktionskit reinigt die DNA mittels Proteinpräzipitation mit Ammonium Acetat. Diese Methode erzielte die zweitbesten Ergebnisse in Bezug auf DNA-Ausbeute, -Reinheit und -Fragmentlänge. In 50% aller Fälle lag die Fragmentlänge hier bei >40 kb. Das Protokoll ließ sich gut auf variierende Ausgangszellmengen einstellen und verwendete keine toxischen Chemikalien.

Das NucleoSpin Tissue Kit und QIAamp DNA Mini Kit funktionieren nach dem selben Prinzip. Die DNA wird an einer Silikamembran gebunden, gereinigt und eluiert. Die Protokolle waren schnell und einfach durchzuführen, jedoch erzielten beide eine geringere DNA-Ausbeute. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß die DNA sich nicht vollständig bei der Elution von der Silikamembran lösen läßt. Außerdem wurde die DNA wesentlich stärker fragmentiert als bei der Extraktion mit Phenol-Chloroform oder Puregene. Diese Beobachtungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Garcia-Closas *et al.* 2001, Tobal *et al.* 1986). Beide Kits scherten die DNA stark, der Median der Fragmentlängen für die Extraktion mit NucleoSpin Tissue lag bei 26 kb und für QIAamp bei 23 kb. Die mit QIAamp isolierten Proben wiesen die höchste DNA-Reinheit auf. Bei genügend Material eignen sich die auf Silikamembran-basierenden Kits gut für eine schnelle und einfache DNA-Extraktion.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß das Saccomanno Fixativ die DNA in Bronchialsekreten in einem für PCR-basierte Untersuchungen geeigneten Zustand erhält. Eine chemische Veränderung der DNA wurde bisher noch nicht beobachtet. Grundsätzlich eignen sich alle vier für die Studie verwendeten Extraktionsprotokolle zum Isolieren

ren der DNA aus Saccomanno fixierten Bronchialsekreten. Für die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurde die DNA mit dem Puregene DNA Isolation Kit extrahiert. Zu dieser Entscheidung führten folgende Eigenschaften dieses Extraktionsverfahrens: a) zweithöchste Ausbeute, b) zweithöchste Reinheit, c) Fragmentgröße > 40 kb, d) keine giftigen Chemikalien, e) gut anpaßbar auf wechselnde Ausgangsmengen, f) einfache und schnelle Handhabung.

4.1.2 DNA Extraktion aus Formalin fixiertem, Paraffin eingebetteten Gewebe

Die DNA Extraktion aus Gewebe wurde mit dem Puregene DNA Extraktionskit durchgeführt. Die Qualität der isolierten DNA variierte in Abhängigkeit von der dem verwendeten Formalin. DNA aus Proben, die mit gepuffertem Formalin fixiert wurden, waren weniger fragmentiert als Proben aus ungepufferten Formalin. Die stärkere Fragmentierung der DNA bei ungepufferten Proben läßt sich auf die Bildung von Ameisensäure unter Lichteinfluß erklären. Dadurch sinkt der pH-Wert im Fixativ ab, das Gewebe und die DNA werden stärker angegriffen. Mit Phosphatpuffer versetztes Formalin bleibt auch unter Lichteinfluß im neutralen pH-Wert-Bereich, das Gewebe wird in einem intakteren Zustand bewahrt. Da Formalin ein stark chemisch reaktives Reagenz ist, bewirkt seine Aldehydgruppe nicht nur eine Fragmentierung der DNA, sondern erzeugt auch artifizielle Mutationen (Srinivasan *et al.* 2002). Eine Veränderung des Methylierungsmusters der DNA in Formalin fixierten Proben wurde bisher allerdings nicht beschrieben und auch in den Untersuchungen dieser Studie nicht festgestellt.

4.2 Aberrante Promotormethylierung als molekularbiologischer Tumormarker für die Lungenkarzinom Diagnostik

Bislang ist noch nahezu unbekannt, welcher Mechanismus der DNA-Hypermethylierung von Genen in Tumoren zugrunde liegt. Häufig wird eine Überexpression der DNA-Methyltransferase impliziert (Belinsky *et al.* 1996, Baylin und Herman *et al.* 2000), jedoch wird diese nicht in allen Tumoren beobachtet, in denen Hypermethylierung auftritt (Robertson und Jones 2000). Seit längerer Zeit wird die Hypothese vertreten, daß Karzinogene Hypermethylierung auslösen. Beispiele dafür sind Stoffe wie Nickel und Arsen, die Hypermethylierung hervorrufen und damit Veränderungen der Chromatinstruktur induzieren könnten (Mass und Wang *et al.* 1997). Smith hat in diesem Zusammenhang postuliert, daß es ausgehend von der Basenspezifität der DNA-Methyltransferase zur Aktivierung des Enzyms kommen kann, wenn die

Replikation durch Karzinogen-Addukte an DNA-Basen angehalten wird (*Activation by Stalling*, Smith 1998). Das Lungenkarzinom ist ein bekanntermaßen durch Exposition der Lunge gegenüber Karzinogenen hervorgerufener Tumor, daher sollte diese Möglichkeit nicht vernachlässigt werden.

Nach der Two-Hit-Hypothese von Knudson erfolgt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch mindestens zwei gravierende Veränderungen, die beide Allele funktionell ausschalten (Knudson 1971). So kann die Funktion eines Allels z.B. durch Missense-Mutationen oder Deletionen zerstört oder eingeschränkt werden. Darüberhinaus muß allerdings eine zweite Veränderung im zweiten Allel auftreten. Die Inaktivierung des zweiten Allels kann durch epigenetische Veränderungen erfolgen, beispielsweise durch die Methylierung einer CpG-reichen Promotorregion. Welcher Mechanismus bei der Inaktivierung zu finden ist, variiert in Abhängigkeit von den betroffenen Genen und hängt außerdem stark von Tumortyp und -klasse ab (Bishop und Schiestl 2000). Diese Feststellungen mögen die Unterschiede in der Methylierungsfrequenz unterschiedlicher Tumorsuppressorgene innerhalb eines Tumors erklären.

4.2.1 Etablierung der Bisulfitkonversion und QMSP

Die Bisulfitkonversion von DNA aus Saccomanno fixierten Bronchialsekreten ließ sich in Anlehnung an das von Herman und Mitarbeitern publizierte Protokoll etablieren (Herman *et al.* 1996). Bei den Formalin fixierten Geweben zeigte sich allerdings, daß die Art der Fixation einen großen Einfluß auf den Erfolg der im Anschluß an die Bisulfitkonversion durchgeführten PCR hatte. DNA aus mit ungepuffertem Formalin fixierten Gewebe ließ sich nur mühevoll und qualitativ unbefriedigend in ca. 20% der Fälle mit einer QMSP amplifizieren. Die Ergebnisse waren bei in gepuffertem Formalin fixierten Gewebe mit ca. 90% entschieden besser. Bei den nachfolgenden Untersuchungen wurde nur noch Gewebe, das in gepuffertem Formalin fixiert wurde, verwendet. Die Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit im Vorfeld zu den QMSP-Läufen führte zu einer zusätzlichen Fragmentierung der isolierten DNA. In einer umfangreichen Studie überprüften Grunau und Mitarbeiter den Einfluß verschiedener Parameter auf die Effizienz der Bisulfitkonversion und den Erhaltungszustand der DNA. Sie fanden heraus, daß die Bisulfitbehandlung bei 55°C für 4-18 Stunden eine Effizienz von 99% besaß, gleichzeitig wurden 84-96% der DNA degradiert (Grunau *et al.* 2001). Durch die Sequenzierung einiger Bisulfit-behandelter Promotorregionen konnte die von Grunau und Mitarbeitern beschriebene Effizienz der Bisulfitkonversion in dieser Arbeit bestä-

tigt werden. Von diesem Standpunkt aus entwickelte sich die Arbeitshypothese, daß eine schonendere Bisulfitkonversion die PCR-Erfolgsquote bei in ungepuffertem Formalin fixierten Proben erhöhen könnte. Sowohl der DNA Denaturierungsschritt als auch die Desaminierungsreaktion wurden durch Senkung der Reagenzienkonzentration, der Reaktionszeit und -temperatur abgemildert. Trotzdem ließ sich keine Steigerung der PCR-Erfolgsquote erzielen.

In Fall-Kontroll-Studien sollten Methylierungen verschiedener Promotoren auf ihre potentielle Eignung als diagnostischer Marker in Bronchialsekreten überprüft werden. Insgesamt wurden *Primer*/TaqMan[®]-Paare für sechs verschiedene Gen-Promotoren (*APC*, *MYOD1*, *p16^{INK4a}*, *RARB2*, *RASSF1A*, *SEMA3B*) etabliert. Die Spezifität der *Primer*/Sonden-Paare wurde zum einen an 89 Bronchialsekreten von Patienten mit benigner Lungenerkrankung ermittelt und zum anderen über die Klonierung und anschließende Sequenzierung von entsprechenden Promotorregionen überprüft. Bislang gibt es in der Literatur nur wenig Daten zur Sequenzierung einzelner Promotorregionen. Das Erzeugen eines transformierbaren PCR Produkts stellte sich bei den Versuchen als kritisch dar. So sind die CpG-freien Regionen, die groß genug sind um Sequenzierungs-*Primer* an diese Stelle zu legen, in CpG-Inseln selten. Eine weitere Schwierigkeit beim *Primer*-Design - sowohl für die methylierungsspezifischen *Primer*/TaqMan[®]-Paare als auch für die Sequenzierungs-*Primer* - stellt die DNA-Sequenz an sich dar, die auf Grund der chemischen Modifikation der DNA mittels Natriumbisulfit lange poly-A- bzw. poly-T-Sequenzen beinhaltet. Eine längere Sequenzfolge einer Base im *Primer* senkt die Spezifität des Oligonukleotids. Außerdem „stolpert“ die Polymerase bei poly-A- bzw. poly-T-Sequenzen bei der Synthese eines PCR-Produkts häufiger, was zu Abbrüchen der Amplifikation oder zu Fehlern in der Amplikonsequenz führen kann. Die genannten Aspekte bieten eine Erklärung dafür, warum für den Promotor von *p16^{INK4a}* kein transformierbares PCR-Produkt erzeugt werden konnte. PCR-Produkte von jeweils fünf Fällen der Promotoren von *APC*, *RARB2* und *RASSF1A* wurden in *E.coli* transformiert. Die Sequenzierungen einzelner Klone ergab für die Promotorregionen der Gene *APC*, *RARB2* und *RASSF1A*, daß QMSP negative Fälle keine oder ein methyliertes CpG aufwiesen. QMSP positive Fälle hingegen besaßen einen hohen Anteil methylierter CpG-Dinukleotide. Die untersuchten Promotor-Regionen von *APC* und *RASSF1A* wiesen bei positiver QMSP ein homogenes Methylierungsmuster auf. Dieses Ergebnis erlangten auch Esteller und Dammann, die DNA aus Lungentumoren klonierten (Esteller *et al.* 2000, Dammann *et al.* 2000). Die Sequenzierung der Klone von *RARB2* wies in 2

von 3 QMSP positiven Fällen ein sehr heterogenes Methylierungsmuster auf. Obwohl bei der Konstruktion der *Primer*/TaqMan[®]-Paare zunächst von komplett methylierten CpG-Inseln ausgegangen wurde, scheinen auch heterogen methylierte CpG-Regionen – wie sie mittels Sequenzierung bei zwei *RARB2*-Fällen gefunden wurden – von den Oligonukleotiden erfaßt zu werden. Die durch die Klonierung und Sequenzierung der Promotorregion erlangten Ergebnisse bestätigen die hohe Spezifität der methylierungsspezifischen *Primer*/TaqMan[®]-Sonden Paare. Ein Rückschluß auf die Methylierungsmuster in den Tumoren ist allerdings nur bedingt möglich, da die untersuchten Biopsien nur einen kleinen Teil des Tumors widerspiegeln.

Die Sensitivität der Oligonukleotide für die QMSP wurde in Verdünnungsreihen getestet und lag bei allen etablierten *Primer*/Sonden-Paaren bei 1:5.000. Dieser Wert entspricht durchaus der in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Sensitivität (Eads *et al.* 2000).

4.2.2 Aberrante Methylierung des *APC* Promotors 1A

Der *APC* Promotor 1A wies eine Hypermethylierung² in 71% der untersuchten Bronchialsekrete von Tumorpatienten auf und zeigte eine präferenzielle Methylierung bei NSCLC Patienten. Damit liegt die Methylierungsfrequenz in Bronchialsekreten unter den Beobachtungen vergleichbarer Studien, die unter Verwendung einer QMSP Tumorsektate und Zelllinien von NSCLC untersuchten. Sie fanden eine Hypermethylierung des *APC* Promotors in 72-96% (Median 84%) der NSCLC und 58% der SCLC (Brabender *et al.* 2001, Virmani *et al.* 2002, Usadel *et al.* 2002, Harden *et al.* 2003). Andere Arbeiten, in denen eine traditionelle MSP verwendet wurde, detektierten *APC* Hypermethylierung in 0 bis 53% (Median 45%) der NSCLC und 26% der SCLC (Virmani *et al.* 2001, Toyooka *et al.* 2003, Esteller *et al.* 2001, Yanagawa *et al.* 2003). Topaloglu und Mitarbeiter untersuchten die Methylierung des *APC* Promotors an 31 Bronchialsekreten von NSCLC Patienten mittels QMSP. Sie fanden eine Methylierungsfrequenz von 16% (Topaloglu *et al.* 2004). Die deutliche Abweichung der Ergebnisse dieser Arbeit von Topaloglus Daten mag durch die Verwendung anderer *Primer*/Sonden-Paare und durch das Untersuchen eines kleineren Kollektivs erklärt werden.

² Ein Promotor wurde als aberrant methyliert oder hypermethyliert bezeichnet, wenn mit dem *Primer*/Sonden-Paar ein PCR-Produkt erzeugt werden konnte. Um die aberrante Methylierung von *APC* und *RARB2* als diagnostischen Marker zu verwenden, wurde die QMSP quantitativ ausgewertet und ein Schwellenwert von ≥ 35 bzw. ≥ 30 eingeführt.

Bislang sind Informationen über eine mögliche physiologische, altersabhängige Methylierung des *APC* Promotors im Lungenepithel begrenzt. Brabender und Mitarbeiter fanden eine *APC* Hypermethylierung in 2 von 10 Fällen mit histologisch normalen Lungengewebe. Allerdings waren die untersuchten Personen signifikant jünger als die hier beschriebene Kontrollgruppe, die eine *APC* Hypermethylierung in 46% der Fälle aufwies (Brabender *et al.* 2001). Waki und Mitarbeiter überprüften den Methylierungsstatus des nicht-neoplastischen Lungengewebes von 30 Autopsiefällen mit einer konventionellen MSP. Sie detektierten eine *APC* Promotormethylierung in 33% der untersuchten Fälle, die ein Alter zwischen 22 und 87 Jahren besaßen (Waki *et al.* 2003). Allgemein wird eine altersabhängige Methylierung des *APC* Promotors im Lungengewebe vermutet, so wie sie in nicht tumoröser Darmmukosa beschrieben ist (Waki *et al.* 2003, Ahuja und Issa 2000, Brabender *et al.* 2001). Dazu paßt auch der in dieser Studie gefundene Zusammenhang zwischen Alter und quantitativen *APC* Methylierungslevel sowohl in der Kontroll- als auch in der Tumorgruppe ($p < 0.01$ bzw. $p < 0,001$). Das Lungengewebe mag durch Umwelteinflüsse während der Lebenszeit beschädigt werden. Ob Zigarettenrauch in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt, bleibt noch zu erkunden (Brabender *et al.* 2001).

Die hohe Methylierungsfrequenz des *APC* Promotors 1A in der Kontrollgruppe dieser Arbeit ist möglicherweise ein Hinweis darauf, daß die aberrante Methylierung von *APC* ein früher Schritt in der Karzinogenese ist. Man muß daran denken, daß die hier untersuchte Kontrollgruppe zunächst unter Tumorverdacht bronchoskopiert wurde und die meisten Patienten Raucher oder Exraucher waren. Frühere Studien an Vorläuferläsionen eines Karzinoms des Verdauungsapparat - wie z.B. Barrett-Ösophagus und Dickdarm-Adenom - untermauern, daß Veränderungen der Methylierung und damit verbunden der Expression des *APC* Gens früh in der Tumorgenese entstehen können (Kawakami *et al.* 2000, Esteller *et al.* 2000).

Um den Marker *APC* für einen diagnostischen Test verwenden zu können, wurden die PCR-Läufe quantitativ ausgewertet. Signifikante quantitative Unterschiede des Methylierungslevels von *APC* zwischen der Kontroll- und der Tumorgruppe ermöglichten die Setzung eines Schwellenwertes (*Cut-off*) bei ≥ 35 . Damit gelang es, die Spezifität von 54% auf 99% zu steigern. Nur ein Fall in der Kontrollgruppe wies nach Einführung des Schwellenwertes eine aberrante Promotormethylierung von *APC* auf. Möglicherweise besteht bei diesem Patient ein erhöhtes Karzinom-Risiko. In der Literatur konnten

aberrante Methylierungen bis zu 3 Jahre vor der Tumormanifestation nachgewiesen werden (Honorio *et al.* 2003, Palmisano *et al.* 2000). Leider konnte der APC positive Kontrollpatient nur bis November 2002 weiter verfolgt werden, zu diesem Zeitpunkt wurde noch kein Tumor diagnostiziert.

4.2.3 Aberrante Methylierung des $p16^{INK4a}$ Promotors

Eine aberrante Methylierung des $p16^{INK4a}$ Promotors wurde in dieser Arbeit besonders häufig in Bronchialsekreten von Patienten mit SCC (41%) detektiert. Dagegen zeigten sowohl AC als auch SCLC mit 18% bzw. 0% eine deutlich niedrigere Methylierungsfrequenz. Die Ergebnisse lassen sich mit denen bisheriger Studien an reseziertem Lungenkarzinomgewebe korrelieren. So wurde die Methylierung des $p16^{INK4a}$ Promotors in 21-68% (Median 44%) der SCC, in 9-55% (Median 24%) der AC und in 5-9% der SCLC beschrieben (Chan *et al.* 2002, Toyooka *et al.* 2001a, Toyooka *et al.* 2003, Ahrendt *et al.* 1999, Chen *et al.* 2002, Harden *et al.* 2003, Kim *et al.* 2001b, Yanagawa *et al.* 2003, Topaloglu *et al.* 2004).

Die Methylierungsrate von $p16^{INK4a}$ liegt interessanterweise im Sputum von NSCLC mit 35-90% (Median 69%) deutlich höher als im Tumorgewebe (Palminsano *et al.* 2000; Chen *et al.* 2002; Kersting *et al.* 2000). Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse der Studien, die Bronchialsekrete von NSCLC untersuchten, deutlich niedrigere Methylierungsfrequenzen im Median von 23% (Ahrendt *et al.* 1999, Topaloglu *et al.* 2004, Kurakawa *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte keine aberrante Promotormethylierung von $p16^{INK4a}$ in der Kontrollgruppe festgestellt werden, obwohl die Patienten zu einer Risikogruppe zählten und mit dem Verdacht auf ein Lungenkarzinom bronchoskopiert wurden. Dieses Ergebnis unterstreicht die hohe Spezifität, die mit der QMSP erlangt werden kann. Andere Autoren beschrieben ebenfalls eine niedrige Methylierungsrate des $p16^{INK4a}$ Promotors von 0-3% bei Patienten ohne Lungenkarzinom (Waki *et al.* 2003, Zöchbauer-Müller *et al.* 2003). Jedoch gibt es auch Publikationen, die eine aberrante Methylierung in bis zu 35% (Median 14%) der Patienten mit gutartigen Lungenerkrankungen nachgewiesen haben (Palminsano *et al.* 2000, Kersting *et al.* 2000, Belinsky *et al.* 2002, Gilliland *et al.* 2002, Soria *et al.* 2002). Der Grund für die stark unterschiedlichen Ergebnisse bleibt unklar. Es gibt keine offensichtlichen Unterschiede in den verwendeten Methoden. Bis zu einem gewissen Grad mögen die Wahl der untersuchten CpG-Dinukleotide und die Kollektivzusammenstellung eine Rolle spielen.

4.2.4 Aberrante Methylierung des *RARB2* Promotors

Bei der Etablierung der QMSP wurde eine aberrante Methylierung des *RARB2* Promotors in 78% der Bronchialsekrete von Patienten mit einem Lungenkarzinom und in 40% der Bronchialsekrete der Kontrollgruppe gefunden. Im Gegensatz dazu wurde in bisherigen Studien an reseziertem Lungenkarzinomgewebe eine Methylierungsfrequenz von 35-55% beschrieben (Toyooka *et al.* 2001a, Toyooka *et al.* 2003, Virmani *et al.* 2000, Zöchbauer *et al.* 2001a). Eine aberrante Promotormethylierung von *RARB2* wurde außerdem bei bis zu 14% der Patienten mit einem Lungenkarzinom auch in nicht-malignem Lungengewebe und in Sputen von Kontrollpatienten nachgewiesen (Toyooka *et al.* 2003, Virmani *et al.* 2000, Zöchbauer *et al.* 2001a, Zöchbauer *et al.* 2003). Chan und Mitarbeiter ermittelten eine zu den Daten dieser Arbeit vergleichbare Methylierungsfrequenz von *RARB2* in Lungentumoren und Bronchialsekreten von chinesischen Patienten (Chan *et al.* 2002). Sie führten ethnische Unterschiede als Grund für eine höhere Methylierungsfrequenz im Vergleich zur Literatur an. Jedoch widerspricht dies den Ergebnissen der Arbeit von Toyooka und Mitarbeitern, die die Methylierungsfrequenz verschiedener Gene in vier unterschiedlichen Ländern (USA, Australien, Japan, Taiwan) untersucht haben. Sie konnten keinerlei geographisch bedingte Unterschiede in Bezug auf die Methylierung von *RARB2* nachweisen (Toyooka *et al.* 2003). Daher ist anzunehmen, daß unterschiedliche Methylierungsfrequenzen für den *RARB2*-Promotor aufgrund verschiedener Kollektive und Methoden zustande kommen. Die meisten Arbeiten verwendeten bislang die konventionelle MSP. Eine sensitivere Methode wie die QMSP bietet eine Erklärung für die erhöhte Methylierungsfrequenz des *RARB2* Promotors. Interessanterweise fanden Zöchbauer und Mitarbeiter eine erhöhte *RARB2* Methylierungsrate in Sputen von Rauchern mit dysplastischen Veränderung des Bronchialepithels (Zöchbauer *et al.* 2003). Ob die Patienten aus der in dieser Arbeit untersuchten Kontrollgruppe ein durch die *RARB2* Methylierung erhöhtes Risiko haben, ein Lungenkarzinom zu entwickeln, bleibt noch unklar und muß durch eine weiteres *follow-up* der Patienten geklärt werden. Eine weitere mögliche Erklärung für die variierenden Angaben zur *RARB2* Methylierung mag die Wahl der untersuchten CpG Inseln sein. So fanden Topaloglu und Mitarbeiter trotz Verwendung einer QMSP keine aberrante *RARB2* Promotormethylierung in Bronchialsekreten von Patienten mit NSCLC (Topaloglu *et al.* 2004).

Um die Promotormethylierung von *RARB2* als Tumormarker zu verwenden, wurden – wie bereits bei *APC* – die PCR-Läufe quantitativ ausgewertet und ein *Cut-off* bei ≥ 30

festlegt. Dadurch konnte die Spezifität von 56% auf 84% gesteigert werden. Wie bereits für den *APC* Promotor diskutiert, könnte auch die nachgewiesene Methylierung von *RARB2* in Bronchialsekreten von Risikopatienten der Diagnose eines Lungenkarzinoms einige Zeit vorausgehen. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Nicht-Tumorpatienten mit *RARB2* Methylierung wurde bislang noch kein Lungentumor nachträglich diagnostiziert. Die Nachverfolgungszeit der Patienten mag aber mit maximal 3 Jahren noch nicht lang genug sein.

4.2.5 Aberrante Methylierung des *RASSF1A* Promotors

Eine aberrante Methylierung des *RASSF1A* Promotors wurde in dieser Arbeit besonders häufig in Bronchialsekreten von Patienten mit einem SCLC (88%) aber auch mit NSCLC (26%) nachgewiesen. Patienten mit gutartigen Lungenerkrankungen zeigten keine Hypermethylierung. In bisherigen Arbeiten an reseziertem Tumorgewebe und an Zelllinien wurde für den *RASSF1A* Promotor eine Hypermethylierung in 72-100% bei SCLC detektiert (Dammann *et al.* 2000, Agathangelou *et al.* 2001, Burbee *et al.* 2001, Dammann *et al.* 2001, Sato *et al.* 2002). In NSCLC Tumorgewebe wurde eine Hypermethylierung in 30-38% der Fälle und in NSCLC-Zelllinien in 36-88% beschrieben (Dammann *et al.* 2000, Agathangelou *et al.* 2001, Burbee *et al.* 2001, Sato *et al.* 2002, Kim *et al.* 2003, Toyooka *et al.* 2003, Tomizawa *et al.* 2002). Damit sind die in dieser Arbeit an Bronchialsekreten ermittelten Daten mit den in der Literatur berichteten Methylierungsfrequenzen von Tumoren und Zelllinien vergleichbar. Weiterhin fanden auch andere Autoren nur selten eine Hypermethylierung von *RASSF1A* in nicht kanzerösem Gewebe. Waki und Mitarbeiter fanden eine *RASSF1A*-Promotormethylierung nur in 3% (1/29) der untersuchten Autopsiefälle (Waki *et al.* 2003). Einige andere Studien untersuchten nicht kanzeröses Lungengewebe von Lungenkarzinompatienten und wiesen ebenfalls eine *RASSF1A* Methylierung bei durchschnittlich 3% der Fälle nach (Dammann *et al.* 2000, Agathangelou *et al.* 2001, Burbee *et al.* 2001, Dammann *et al.* 2001, Toyooka *et al.* 2003).

Die Methylierung des *RASSF1A* Promotors wurde bereits an Sputen und Bronchialsekreten von Tumor- und Nicht-Tumorpatienten untersucht. In Sputen wurde eine Hypermethylierung in 50% (4/8) der SCLC und in 21% (5/24) der NSCLC nachgewiesen (Honorio *et al.* 2003). Topaloglu und Mitarbeiter fanden Methylierung von *RASSF1A* in 13% der untersuchten Bronchialsekrete von NSCLC (Topaloglu *et al.* 2004). Sie verwendeten dazu eine QMSP. Die Unterschiede in der Methylierungsfrequenz zwischen

der hier vorliegenden Arbeit und der Publikation von Topaloglu und Mitarbeitern haben ihre Ursache möglicherweise – wie bereits zuvor schon diskutiert – in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kollektive und der Untersuchung verschiedener Promotorregionen von *RASSF1A*. Einige Studien an Sputen von Patienten ohne Tumor wiesen ebenfalls eine Methylierung des *RASSF1A* Promotors auf. Diese Arbeiten verwendeten die konventionelle MSP bzw. die sensitivere zwei-Schritt MSP. Damit konnte eine aberrante Methylierung von *RASSF1A* in bis zu 3% der untersuchten Sputen und Bronchialsekrete von Nicht-Tumorpatienten detektiert werden (Zöchbauer *et al.* 2003, Honorio *et al.* 2003, Belinsky *et al.* 2002). Bei einem Teil dieser scheinbar falsch-positiven Patienten wurde bis zu drei Jahre später ein Lungenkarzinom diagnostiziert (Honorio *et al.* 2003). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Spezifität von 100% zeigt, daß die Methylierung des *RASSF1A* Promotors ein guter Tumormarker für Lungenkarzinome ist.

4.2.6 Aberrante Methylierung des *SEMA3B* Promotors

Für das Gen *SEMA3B*, einem Mitglied der Semaphorin Familie, wurde gezeigt, daß es in der Tumorgenese von Lungenkarzinomen eine Rolle spielt und durch Methylierung der Promotorregion insbesondere in SCLC häufig inaktiviert wird (Kuroki *et al.* 2003, Tomizawa *et al.* 2001, Sekido *et al.* 1996). Bislang gibt es wenig Daten bezüglich der Methylierung von *SEMA3B* in nicht neoplastischen Lungengewebe. Kuroki und Mitarbeiter untersuchten NSCLC und dazugehöriges nicht kanzeröses Gewebe und wiesen eine Methylierung in 41% bzw. 11% der Fälle nach (Kuroki *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde bei Nicht-Tumorpatienten in Bronchialsekreten eine wesentlich höhere Methylierungsrate von 92% detektiert. Offensichtlich befinden sich in Bronchialsekreten nicht neoplastische Zellen mit aberranter *SEMA3B* Methylierung. Diese bislang nicht näher charakterisierten Zellen überlagern eine mögliche Methylierung von Tumorzellen in Bronchialsekreten. Folglich eignet sich der Methylierungsstatus von *SEMA3B* nicht als diagnostischer Marker.

4.2.7 Kombination verschiedener Methylierungsmarker als diagnostischen Test

Die einzeln etablierten und evaluierten Methylierungsmarker wurden in einem drei bzw. Vier-Marker-Panel kombiniert. Für die Routinediagnostik eignete sich ausschließlich das Drei-Marker-Panel bestehend aus *APC*, *p16^{INK4a}* und *RASSF1A*, da diese Kombination eine Spezifität von 99% besitzt. Die Hinzunahme von *RARB2* zum Markerset führte

zu einer enormen Einbuße der für einen effizienten Test notwendigen hohen Spezifität. Damit eignete sich *RARB2* nicht als Marker für eine definitive Tumordiagnose. Unter Verwendung des Drei-Marker-Panels konnten Lungenkarzinome aus den Fall-Kontroll-Studien mit einer Sensitivität von 59,7% bei einer Spezifität von 99% diagnostiziert werden. Bislang wurden zwar Promotormethylierungen verschiedener Gene an Tumoren, Zelllinien und auch zytologischem Material getestet, jedoch wurde noch nicht eine geeignete Kombination von Markern an verschiedenen diagnostischen Gruppen systematisch überprüft. Die Ergebnisse stellen folglich den ersten molekularen für die Lungenkarzinom-Diagnostik praktisch nutzbaren Test dar, der aberrante Promotormethylierung als Biomarker einsetzt. Die Besonderheit des in der vorliegenden Arbeit entwickelten diagnostischen Tests liegt in seiner Spezifität. Es gelang hierbei zum ersten mal Methylierung als definitiver Diagnosemarker und nicht nur als Risikomarker zu nutzen. Um die Ergebnisse zu validieren und den Test auf seine „Alltagstauglichkeit“ zu überprüfen, wurde eine retrospektive Kohorten-Studie durchgeführt.

4.2.8 Retrospektive Kohorten-Studie – Methylierung zur Erweiterung der bisherigen Lungenkarzinom-Diagnostik

In der retrospektiven Kohortenstudie wurden 235 kontinuierlich gesammelte und nicht vorselektierte Bronchialsekrete ohne Kenntnis der finalen Diagnose mittels QMSP untersucht. Mit dem Vier-Marker-Panel konnten Lungenkarzinome und deren Rezidive mit einer Sensitivität von 78,5% bei einer Spezifität von 79% nachgewiesen werden. Der Verzicht auf den Marker *RARB2* erhöhte die Spezifität auf 99% bei einer Sensitivität von 52%. Wie bereits weiter oben diskutiert ist für die Anwendung der Marker in der Lungenkarzinom-Diagnostik eine hohe Spezifität notwendig. Damit bestätigte sich, daß die Promotormethylierung des Gens *RARB2* nicht nutzbarer als Tumormarker ist. Dennoch erscheint die aberrante Methylierung von *RARB2* durchaus informativ für die Abschätzung eines Risikos zu sein. So wiesen Tumorpatienten doppelt so häufig eine *RARB2* Hypermethylierung auf wie Nicht-Tumorpatienten. In diesem Zusammenhang ist der Beitrag von Belinsky 2004 interessant, der ein Modell zur Risikoabschätzung bei Patienten mit Lungenkarzinom-Risiko vorgeschlägt (Belinsky 2004). Dieses Modell beruht ebenfalls auf der Untersuchung von Promotorhypermethylierungen, allerdings an Sputen. Belinsky geht davon aus, daß die steigende Häufigkeit von Methylierungen von verschiedenen Gen-Loci mit einem steigenden Risiko, ein Lungenkarzinom zu entwickeln, einhergeht. Die Ergebnisse zur Hypermethylierung des *APC* Promotors 1A und

des *RARB2* Promotors in dieser Arbeit unterstützen Belinsky's Gedanken durchaus, da sie den Grad einer Schädigung des Epithels und nicht unbedingt die Methylierung im Tumor messen. Eine kleine Serie von 10 Sputen zeigte, daß die an Bronchialsekreten etablierten Marker prinzipiell als Risikomarker für die Sputum-Diagnostik einsetzbar sind.

In der Kohorten-Studie wies ein Patient unter 103 Nicht-Tumorpatienten mit dem Drei-Marker-Panel eine aberrante Methylierung des *APC* Promotors 1A auf. Dieser Fall wurde bereits im Fall-Kontroll-Kollektiv untersucht und unter 4.2.2 entsprechend diskutiert. Unter den Patienten mit sonstigen Malignomen wiesen zwei eine aberrante Methylierung mit dem Drei-Marker-Panel auf. Der erste Fall hatte ein Pharynx-Karzinom. Aus dem zytologischen Routinealltag weiß man, daß Pharynx-Karzinomzellen durchaus in die Lunge aspiriert werden können. Vermutlich wurde hier die aberrante Methylierung von Pharynx-Karzinomzellen nachgewiesen. Jedoch bleibt diese Aussage spekulativ, da in der Literatur bislang noch nicht die Methylierung des *APC* Promotors für dieses Organ untersucht wurde. Der zweite Patient hatte ein epitheliales Mesotheliom und war *p16^{INK4a}* positiv. Auch hier ist davon auszugehen, daß die aberrante Methylierung von Mesotheliomzellen nachgewiesen wurde. Mesotheliome sind maligne Erkrankungen der die Lunge umgebenden serösen Häute. Somit ist nicht auszuschließen, daß in diesem Fall Mesotheliomzellen in die Alveolen der Lunge abgeschilfert sind und mittels QMSP meßbar wurden. In der Literatur ist die aberrante Methylierung von *p16^{INK4a}* für Mesotheliome mit 8,8% beschrieben (Hirao *et al.* 2002). Ein Patient mit Morbus Hodgkin und einer zufällig nachgewiesenen mittlerern Dysplasie des Trachealepithels wies eine aberrante Methylierung des *RASSF1A* Promotors auf. Nicht invasive Krebsvorstufen des Bronchialepithels lassen sich im Rahmen einer konventionellen Bronchoskopie nicht gezielt biopsieren. Insofern ist nicht auszuschließen, daß bei den Patienten auch stärker gradige dysplastische Veränderungen des Bronchialepithels vorliegen, die eine *RASSF1A* Hypermethylierung erklären könnten. Mit dem Drei-Marker-Panel wurde außerdem eine aberrante Promotormethylierung in 7/27 Nachsorgefällen nachgewiesen. Zwei dieser Nachsorgepatienten zeigten 14 bzw. 16 Monate nach dem positiven QMSP Befund einen erneuten Tumorprogress. Die restlichen 5 QMSP positiven Nachsorgepatienten wurden bislang 0-11 Monate nachverfolgt. Die 5 Jahres-Überlebensrate von Lungenkarzinompatienten ist niedriger als 11% (Parkin *et al.* 2001), daher ist es durchaus wahrscheinlich, daß die verbliebenen 5 QMSP positiven Nachsorgepatienten in

absehbarer Zeit erneut einen Tumor entwickeln werden. Um genauere Aussagen über die Nutzbarkeit der Marker *APC* und *RASSF1A* als Prognosemarker treffen zu können, ist eine weitere Nachbeobachtung der Patienten notwendig.

Die Sensitivität des Drei-Marker-Panels lag in der Fall-Kontroll Studie etwas höher als in der retrospektiven Kohorten-Studie (52% versus 59,7%). Die Schwankungen kommen durch Unterschiede in der zahlenmäßigen Zusammensetzung von Patienten einzelner Diagnosegruppen und Tumortypen zustande. In den Fall-Kontroll Studien wurden für das Kollektiv optimale Fälle ausgewählt, die retrospektive Kohortenstudie dagegen setzte sich aus einem kontinuierlich gesammelten Kollektiv von Routine-Einsendegut innerhalb eines festgelegten Zeitfensters zusammen. Damit sind die Ergebnisse der Kohorten-Studie den zu erwartenden Ergebnissen in der alltäglichen Anwendung des Drei-Marker-Panels gleichzusetzen.

Bislang gibt es als adjuvanten Methoden für die Unterstützung der Lungenkarzinom-Diagnostik die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs (FISH)-Analyse und die Immunzyto- bzw. Immunhistochemie. Ein PCR-gestützter molekularbiologischen existiert bislang noch nicht. Die FISH ist teuer und muß zeitaufwendig ausgewertet werden. Sowohl für die FISH als auch für die Immunfärbungen müssen morphologisch auffällige Zellen vorhanden sein. Beide Methoden werden nur zum Ausschluß bzw. zur Bestätigung von einem zytomorphologischen Tumorverdacht verwendet. Die zusätzliche Anwendung des methylierungsspezifischen Drei-Marker-Panels zur bisherigen zytologischen und histologischen Diagnostik könnte den Nachweis von Lungenkarzinomen bei der ersten Bronchoskopie auf 88% steigern. Insbesondere bei der in den letzten Jahren starken Zunahme von Adenokarzinomen der Lunge, die auf Grund ihrer peripheren Lage für die Histologie schwerer zu diagnostizieren sind als zentral gelegene Tumoren, ist ein die Zytologie ergänzender diagnostischer Test an Spülflüssigkeit der Lunge wünschenswert und wird vermutlich in näherer Zukunft noch an Bedeutung gewinnen.

Die retrospektive Kohorten-Studie zeigte außerdem, daß sich die DNA-Extraktion aus den Bronchialsekreten, die Bisulfitkonversion und die anschließenden diagnostischen QMSP-Läufe zeitnah durchführen lassen. Bei einem optimalen Zeitmanagement und entsprechender Laborausrüstung kann man für eine Probe das Ergebnis innerhalb von drei Tagen erhalten. Dies bedeutet einen entscheidenden Vorteil gegenüber früheren Bemühungen bis in die 90er Jahre z.B. Mutationen als molekulare Marker einzusetzen (Grote *et al.* 2003b).

4.3 Methylierungsmarker: Tumor- oder Risikomarker?

Bislang gibt es in der Literatur nur wenig Angaben über den Vergleich von Methylierungsfrequenzen in Tumorgewebe und dazugehörigem Bronchialsekret. Dieser Vergleich sollte in der vorliegenden Arbeit für die Promotoren *APC*, *p16^{INK4a}*, *RARB2* und *RASSF1A* zeigen, ob die an zytologischen Material gewonnenen Ergebnisse mit dem Tumor selber zu korrelieren sind. Die am Gewebe gefundenen Methylierungsfrequenzen der einzelnen Promotoren passen zu den oben diskutierten Angaben aus der Literatur. Die aberrante Methylierung des *APC* Promotors wurde in der vorliegenden Arbeit in Bronchialsekreten häufiger als in Tumoren gefunden (8% versus 44%). Daraus läßt sich schließen, daß die Methylierung von *APC* vornehmlich eine Vorschädigung des Lungenepithels widerspiegelt und nicht unbedingt die epigenetische Veränderung im Tumor mißt. Dieses Ergebnis wurde von den Sequenzierungen nach Klonierung von *APC* verifiziert. Folglich sollte der Marker *APC* als Risiko- und nicht als Tumormarker eingestuft werden. Trotzdem gelang es über die Setzung eines Schwellenwertes den Risikomarker *APC* vergleichbar einem Tumormarker mit einer Spezifität von 99% zu nutzen. Auch bei *RARB2* handelt es sich um einen Risikomarker. Der Methylierungsstatus von *RARB2* im Tumorgewebe korrelierte nicht zwingend mit dem Status des zugehörigen Bronchialsekrets. Topaloglu und Mitarbeiter überprüften die Methylierungsfrequenz der Promotoren *APC* und *RARB2* an Bronchialsekreten von Patienten mit *APC* bzw. *RARB2* positiven Tumorgewebe. Sie machten ähnliche Beobachtungen und fanden eine korrelierende Methylierung nur in 29% (4/14) für *APC* und 0% (0/3) für *RARB2* (Topaloglu *et al.* 2004). Eine aberrante Methylierung von *p16^{INK4a}* und *RASSF1A* im Bronchialsekret wurde stets auch im Tumor gefunden. Bei den beiden Markern handelt es sich um Tumor spezifische Marker. Die Methylierung von *p16^{INK4a}* im Tumor wurde nicht immer in Bronchialsekreten detektiert. Da Tumorzellen in den untersuchten Bronchialsekreten vorhanden waren, wäre es durchaus denkbar, daß die äußeren Zellen, die leichter abschilfern und sich somit häufiger als tiefer im Tumor liegende Zellen im Bronchialsekret wiederfinden, eine schwächere oder gar fehlende Methylierung aufweisen. Tumoren könnten also hinsichtlich ihres Methylierungsmusters heterogen sein. Topaloglu und Mitarbeiter fanden ebenfalls nur eine geringe Methylierung des *p16^{INK4a}* Promotors in Bronchialsekreten von methylierten Tumorgewebe (in 14% bei 1/7 BRS; Topaloglu *et al.* 2004) Bei dem Marker *RASSF1A* korrelierte die Methylierung im zytologischen und histologischen Material in allen Fällen. Dieses Ergebnis wird auch von Ahrendt und Mitarbeitern bestätigt (Ahrendt *et al.* 1999).

4.4 Globale DNA-Hypomethylierung

In den letzten Jahren kristallisierte sich heraus, daß die globale DNA Hypomethylierung eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Karzinomen spielt. Sie führt zu genetischer Instabilität, reaktiviert transponierbare Elemente und erhöht die Mutationsrate in der DNA (Feinberg 2004). Bislang gibt es nur wenige Publikationen zum globalen Methylierungsstatus von Lungenkarzinomen, der ausschließlich an histologischem Material untersucht wurde. Unter Verwendung verschiedener Methoden (Southern Blot Analyse, *high performance* Kapillarelektrophorese, visueller Beurteilung) wurde eine globale DNA Hypomethylierung bei 70-100% der Lungenkarzinom-Zellen im Vergleich zu dazugehörigem Nicht-Tumorgewebe beschrieben (Benfield *et al.* 1988, Paz *et al.* 2002, Piyathilake *et al.* 2001, Piyathilake *et al.* 2003). Die Untersuchung der globalen Hypomethylierung mit einem Antikörper ermöglichte in dieser Arbeit die Korrelation des Methylierungsstatus mit der Morphologie einzelner Zellen.

4.4.1 Hypomethylierung als Tumormarker

In dieser Arbeit wurde an zytologischen Präparaten aus Bronchialsekreten mit reichlich Plattenepithelkarzinom-Zellen die globale DNA Hypomethylierung der Tumorzellen im Vergleich zu den Granulozyten als Referenz-Zellen untersucht. Dabei sollte die Tauglichkeit eines Antikörpers gegen die Base 5-Methylcytosin als Tumormarker evaluiert werden. DNA Hypomethylierung konnte in 59% der zytologischen Plattenepithelkarzinom-Präparate nachgewiesen werden. Aus folgenden Gründen eignete sich jedoch der 5-Methylcytosin Antikörper nicht als Tumormarker für die Routine. 1. Bei der Verwendung von Tumormarkern, die einen positiven Befund mit einem negativen Signal – also einer mangelnden Anfärbung der Tumorzellen – anzeigen, ist die Gefahr falsch positive Befunde zu erzeugen sehr hoch. Um dieses Problem einzuschränken wurden die Präparate nur ausgewertet, wenn die Anfärbung der Referenzzellen mindestens 90% betrug. Dieses Kriterium erfüllten nur knapp 60% der gefärbten Präparate. Daher war der Anteil nicht auswertbarer Fälle mit 41% zu hoch. 2. Aufgrund des negativen Signals eignete sich der Antikörper nicht für ein Massenscreening und könnte allenfalls bei der Bewertung von Fällen mit unklarer Zellmorphologie dienlich sein. Der Antikörper ließ sich jedoch nicht an Routinepräparaten etablieren. Bei unklarer Morphologie müßte folglich ein neues Zytozentrifugat für die Immunfärbung angefertigt werden. Jedoch lassen sich in neuen Präparaten die morphologisch unklaren Zellen meist nur schwer wieder identifizieren und bewerten. 3. Die Vorbehandlung der Zellen aus den Bronchialsekreten und

die Immunfärbung dauerten eine Woche. Für eine Anwendung des Antikörpers im Routine-Alltag ist die Bearbeitung methodisch zu aufwendig und zeitlich zu langwierig. Abschließend läßt sich festhalten, daß der 5-Methylcytosin Antikörper als Tumormarker für den Einsatz in der Routine nicht geeignet ist, wohl aber für die Forschung von Interesse sein könnte.

4.4.2 DNA Hypomethylierung in histologischen Präparaten von Lungenkarzinomen

Die Untersuchungen mit dem 5-Methylcytosin Antikörper wurden vom zytologischen auf histologisches Material ausgeweitet. Die Verwendung von Lungenkarzinomgewebe als Untersuchungsmaterial ermöglichte es, zwei Methoden an einem Material durchzuführen und die Ergebnisse miteinander zu korrelieren. So wurde der DNA-Gehalt von Zellen bzw. die integrierte optische Dichte der Antikörperfärbung an zwei aufeinanderfolgenden 4 µm Gewebeschnitten mit Hilfe der Bild-Zytometrie gemessen. Tumorzellen weisen in der Regel einen im Vergleich zu Normalgewebe erhöhten DNA-Gehalt auf. Damit besitzt eine Tumorzelle auch mehr Substrat, das vom 5-Methylcytosin Antikörper gebunden werden kann. Folglich führt die Einführung der DNA-Ploidie als Korrekturfaktor zu einer genaueren Quantifizierung des 5-Methylcytosin-Gehalts. Dieser Aspekt wurde in bisherigen Arbeiten nicht berücksichtigt. Als Referenz-Zellen wurden Lymphozyten verwendet, da das morphologisch unauffällige Bronchialepithel der Lungenkarzinompatienten eine Reservezell-Hyperplasie aufwies. Weiterhin überlagerten sich die einzelnen Zellen oft stark und ein hoher Prozentsatz der Kerne befand sich in der S-Phase. Die Verwendung von Lymphozyten als Referenz-Zellen erscheint durchaus legitim, da es sich um diploide, nicht proliferierende Zellen handelt, die einen durchschnittlichen 5-Methylcytosin-Gehalt aufweisen (Bariol *et al.* 2003). In den bisherigen immunhistochemischen Arbeiten zum 5-Methylcytosin Antikörper wurde die Färbeintensität der Tumor- und Referenz-Zellen entweder durch ein Scoresystem visuell bewertet oder durch die Messung der optischen Dichte in Bezug auf die Zellgröße bestimmt (Piyathilake *et al.* 2001, Piyathilake *et al.* 2003, de Capo *et al.* 2003, Hernandez-Blazquez *et al.* 2000). Keiner der Autoren hatte bislang zusätzlich den DNA-Gehalt der gemessenen Zellen berücksichtigt, um den verminderten 5-Methylcytosin Gehalt quantifizieren zu können. In der Literatur findet sich nur eine Arbeit, die den 5-Methylcytosin Gehalt in Lungenkarzinomzellen quantifizierte. Unter Verwendung einer *high performance* Kapillarelektrophorese konnten Paz und Mitarbeiter eine

Verringerung des Methylcytosingehaltes um 22% gegenüber dazugehörigem Normalgewebe nachweisen (Paz *et al.* 2002). Außerdem fanden sie globale Hypomethylierung nur in 70% aller untersuchten Adenokarzinome. Diese Angaben werden durchaus von den Ergebnissen dieser Studie – globale Hypomethylierung der DNA von SCC in 80% der Fälle um im Median 29,4% - untermauert.

Die Färbungen der SCLC konnten nicht ausgewertet werden, da die Tumorzellen nicht klar voneinander abgrenzbar waren. Das „Schmierer“ der Tumorzellen im histologischen Schnitt ist charakteristisch für SCLC-Tumoren und läßt sich auch nicht beheben. Damit eignet sich die oben diskutierte Methode nicht für SCLC.

Ein Zusammenhang zwischen globaler Hypomethylierung und Promotor-spezifischer Hypermethylierung konnte in dieser Arbeit nicht entdeckt werden. Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch Kaneda und Mitarbeiter beim Magenkarzinom (Kaneda *et al.* 2004). Inwieweit und ob ein solcher Zusammenhang zwischen globaler Hypomethylierung und Promotor-spezifischer Hypermethylierung in Tumoren Bedeutung hat, bleibt zur Zeit noch unklar.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein diagnostischer Test für Lungenkarzinome entwickelt, der aberrante Promotormethylierungen als Tumormarker nutzt. Der Nachweis der Promotormethylierungen erfolgte an DNA aus Bronchialsekreten nach Bisulfitkonversion mittels quantitativer methylierungsspezifischer real-time PCR (QMSP). Hierfür wurden *Primer/TaqMan*[®]-Sonden-Paare für verschiedene Promotorregionen konstruiert und in Fall-Kontroll-Studien an insgesamt 297 Bronchialsekreten (112 Lungenkarzinome, 85 Nicht-Tumor-Fälle) untersucht. Durch den Vergleich von DNA aus Bronchialsekreten und Formalin fixierten Tumorgeweben mittels QMSP sowie Sequenzierung der Promotorregionen konnte gezeigt werden, daß die Marker *APC* und *RARB2* eine Schädigung des Bronchialepithels nachweisen und als Risikomarker einzustufen sind. *RASSF1A* und *p16^{INK4a}* erwiesen sich hingegen als spezifische Tumormarker. Letztendlich wurden drei für diagnostische Zwecke geeignete Marker zu einem Panel zusammengestellt (*APC*, *p16^{INK4a}* und *RASSF1A*). In einer retrospektiven Kohortenstudie an 235 Bronchialsekreten (111 Lungenkarzinome, 103 Nicht-Tumor-Fälle, 21 sonstige Tumoren) konnten die Ergebnisse der Fall-Kontroll-Studien verifiziert werden. Lungenkarzinome wurden mit einer Sensitivität von 52% bei einer Spezifität von >99% detektiert. Durch die Kombination des molekularbiologischen Tests mit der herkömmlichen zytologischen und histologischen Diagnostik gelang es, 88% der Lungenkarzinome bei der ersten Bronchoskopie zu diagnostizieren. Die QMSP mit einem drei Marker Panel stellt den ersten praxistauglichen von der Morphologie unabhängigen molekularbiologischen Lungenkarzinom-Test dar. So konnten 40% der Lungenkarzinomfälle mit Bronchialsekreten ohne morphologisch sichtbare Tumorzellen identifiziert werden. Weiterhin wurde bei 80% der zytologisch als dringend verdächtig eingestuften Befunde ein Karzinom nachgewiesen. Da der Test an Restmaterial der regulären Zytologie durchgeführt wird, ist er ohne Umstellung der Routineabläufe optimal in die Diagnostik integrierbar. Damit besitzt der Test ein sehr großes Potential bei diagnostischen Problemfällen.

Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen die Base 5-Methylcytosin gelang es mittels Bild-Zytometrie erstmals, Hypomethylierung an histologischen Schnittpräparaten von Plattenepithelkarzinomen bei Erhalt der Zellmorphologie zu quantifizieren. Die Plattenepithelkarzinome wiesen in 80% der untersuchten Fälle eine globale Hypomethylierung auf, wobei der 5-Methylcytosingehalt durchschnittlich 29,4% geringer als bei den Referenzzellen war.

6. Literatur

Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, Fullwood P, Chauhan A, Walker R, Shaw JA, Hosoe S, Lerman MI, Minna JD, Maher ER, Latif F: Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene* 2001; 20:1509-1518

Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, Herman JG, Wu L, Decker PA, Jen J, Sidransky D: Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluids from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 332-339

Ahuja N and Issa JP: Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol* 2000; 15: 835-842

Avner P and Heard E: X-chromosom inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 59-67

Ballestar E, Yusufzai TM, Wolffe AP: Effects of Rett syndrome mutations of the methyl-CpG binding domain of the transcriptional repressor MeCP2 on selectivity for association with methylated DNA. *Biochemistry* 2000; 39: 7100-7106

Balsara BR and Testa JR: Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* 2002; 21: 6877-6883

Bariol C, Suter C, Cheong K, Ku S-L, Meagher A, Hawkins N, Ward R: The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 2003; 162: 1361-1371

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG: Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10:687-692

Baylin SB and Herman JG: DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-174

Beard C, Li E, Jaenisch R: Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* 1995; 9: 2325-2334

Behn M, Qun S, Pankow W, Havemann K, Schuermann M: Frequent detection of K-ras and p53 mutations in brush cytology samples from lung cancer patients by a restriction fragment length polymorphism based „enriched PCR“ technique. *Clin Cancer Res* 1998a; 4: 361-371

Behn M and Schuermann M: Sensitive detection of p53 gene mutations by a „mutant enriched“ PCR-SSCP technique. *Nucleic Acids Res* 1998b; 25: 1356-1358

Belinsky SA: Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 707-717

Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, Crooks LA, Divine KK, Winters SA, Grimes MJ, Harms HJ, Tellez CS, Smith TM, Moots PP, Lechner JF, Stidley CA, Crowell RE: Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res* 2002; 62: 2370-2377

Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa JP: Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4045-4050

Bellacosa A: Role of MED1 (MBD4) gene inn DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol* 2001; 187: 137-144

Benfield JR, Wain JC, Derrick M, Smith SS, Ohnuki Y, Bates SE, Shively J, Teplitz RL, Hammond WG: Biochemical and cytogenetic studies of human lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988; 96:840-848

Bergman Y and Mostoslavsky R: DNA demethylation: turning genes on. *Biol Chem* 1998; 379: 401-407

Bestor TH: The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2395-2402

Bird AP: CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986 May 15-21; 321: 209-213

Bishop AJ and Schiestl RH: Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2427-2434

Böcking A: Standardization of cytopathologic diagnosis. *Pathologe* 1998; 19: 236-241

Brabender J, Usadel H, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Wickramasinghe K, Lum CE, Park J, Salonga D, Singer J, Sidransky D, Holscher AH, Meltzer SJ, Danenberg PV: Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. *Oncogene* 2001; 20: 3528-3532

Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M, Minna JD: Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 691-699

Butz M: Beruflich verursachte Krebserkrankungen – Eine Darstellung der im Zeitraum 1978 bis 1997 anerkannten Fälle. Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, Sankt Augustin, 1999

Chan EC, Lam SY, Tsang KW, Lam B, Ho JC, Fu KH, Lam WK, Kwong YL: Aberrant promoter methylation in Chinese patients with non-small cell lung cancer: patterns in primary tumors and potential diagnostic application in bronchoalveolar lavage. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3741-3746

Chen JT, Chen YC, Wang YC, Tseng RC, Chen CY, Wang YC: Alterations of the p16^{INK4a} gene in resected nonsmall cell lung tumors and exfoliated cells within sputum. *Int J Cancer* 2002; 98: 724-731

Clayton SJ, Scott FM, Walker J, Callaghan K, Haque K, Liloglou T, Xinarianos G, Shawcross S, Ceuppens P, Field JK, Fox JC: K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. *Clin Chem* 2000; 46: 1929-1938

de Capoa A, Musolino A, Della Rosa S, Caiafa P, Mariani L, Del Nonno F, Vocaturo A, Donnorso RP, Niveleau A, Grappelli C: DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncol Rep* 2003; 10: 545-549.

Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP: Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-319

Dammann R, Takahashi T, Pfeifer GP: The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* 2001; 20: 3563-3567

Doerfler W: Patterns of DNA methylation - evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism. A proposal. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1991; 372: 557-564

Doerfler W: DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 93-124

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucl Acids Res* 2000; 28: E32

Esteller M & Herman JG: Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002; 196: 1-7

Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG: Analysis of *Adenomatous Polyposis Coli* promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4366-4371

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG: Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999a; 59: 67-70

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA repair gene O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999b; 59: 793-797

Feinberg AP: The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 427-432
Feinberg AP & Vogelstein B: Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-92

Flatau E, Bogenmann E, Jones PA: Variable 5-methylcytosine levels in human tumor cell lines and fresh pediatric tumor explants. *Cancer Res* 1983; 43: 4901-4905

Franceschini P, Martino S, Ciocchini M, Ciuti E, Vardeu MP, Guala A, Signorile F, Camerano P, Franceschini D, Tovo PA: Variability of clinical and immunological phenotype in immunodeficiency-centromeric instability-facil anomalies syndrome. *EUR J Pediatr* 1995; 154: 840-846

Garcia-Closas M, Egan KM, Abruzzo J, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Franklin T, Bender PK, Beck JC, Le Marchand L, Lum A, Alavanja M, Hayes RB, Rutter J, Buetow K, Brinton LA and Rothman N: Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10: 687-696

Gilliland FD, Harms HJ, Crowell RE, Li YF, Willink R, Belinsky SA: Glutathione S-transferase P1 and NADPH quinone oxidoreductase polymorphisms are associated with aberrant promoter methylation of P16 (INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in sputum. *Cancer Res* 2002; 62: 2248-2252

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878

Greer CE, Wheeler CM, Manos MM: Sample preparation and PCR amplification from Paraffin-embedded tissues. *PCR Methods Appl.* 1994; 3: S113-122

Greer CE, Lund JK, Manos MM: PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl.* 1991; 1: 46-50

Gonzalzo ML, Bender CM, You EH, Glendening JM, Flores JF, Walker GH, Hayward NK, Jones PA, Fountain JW: Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 5336-5347

Grote HJ, Schmiemann V, Sarbia M, Böcking A: DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: Which method to take? *Anal Cell Pathol* 2003a, 25: 83-88

Grote HJ, Schmiemann V, Böcking A: Molekulare Zytopathologie bösartiger Lungentumoren - Prävalenz der genetischen Alterationen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2003b, 87: 142-149

Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, Razin A: Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett* 1981; 124: 67-71

Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A: Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: E65-5

Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM: The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14412-14417

Harden SV, Tokumaru Y, Westra WH, Goodman S, Ahrendt SV, Yang SC, Sidransky D: Gene promoter hypermethylation in tumor and lymph nodes of stage I lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1370-1375

Haroske G, Baak JP, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Böcking A: Fourth update ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 2001; 23: 89-95

Harpole DH, Herndon JE, Wolfe WG, Iglehart JS, Marks JR: A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology and oncogene expression. *Cancer Res* 1995; 55: 51-56

Haugen A: Etiology of lung cancer. in Hansen H (ed) *The IASLC textbook of lung cancer*. Martin Dunitz, London, Seite 1 bis 12

Heard E, Clerc P, Avner P: X-chromosom inactivation in mammals. *Annu Rev Genet* 1997; 31: 571-610

Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, Libby DM, Pasmantier MW, Koizumi J, Altorki NK, Smith JP: Early lung cancer action project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet* 1999; 354: 99-105

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826

Hernandez-Blazquez FJ, Habib M, Dumollard JM, Barthelemy C, Benchaib M, de Capoa A, Niveleau A: Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissue by immunohistochemistry and image analysis. *Gut* 2000; 47: 689-693

Hiltunen MO, Alhonen L, Koistinaho J, Myohanen S, Paakkonen M, Marin S, Kosma VM, Janne J: Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 70: 644-648

Hirao T, Bueno R, Chen CJ, Gordon GJ, Heilig E, Kelsey KT: Alterations of the p16^{INK4} locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis* 2002; 7: 1127-1130

Hollstein M, Moeckel G, Hergenbahn M, Spiegelhalder B, Keil M, Werle-Schneider G, Bartsch H, Brickmann J: On the origins of tumor mutations in cancer genes: insights from the p53 gene. *Mutat Res* 1998; 405: 145-154

Honorio S, Agathangelou A, Schuermann M, Pankow W, Viacava P, Maher ER, Latif F: Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast patients. *Oncogene* 2003; 22:147-150

Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR: Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 2001; 104: 829-838

Hung M-S, Karthikeyan N, Huang B, Koo H-C, Kiger J, Shen C-KJ: Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosin) methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11940-11945

Hung J, Lam S, LeRiche JC, Palcic B: Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Laser Surg Med* 1991; 11: 99-105

Jaenisch R: DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet* 1997; 13: 323-329

Jost JP and Jost YC: Mechanism of active DNA demethylation during embryonic development and cellular differentiation in vertebrates. *Gene* 1995; 157: 265-266

Jost JP and Bruhat A: The formation of DNA methylation patterns and the silencing of genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1997; 57: 217-248

Kaneda A, Tsukamoto T, Takamura-Enya T, Watanabe N, Kaminishi M, Sugimura T, Tatematsu M, Ushijima T: Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci* 2004; 95: 58-64

Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, Yin J, Fleisher AS, Abraham JM, Beer DG, Sidransky D, Huss HT, Demeester TR, Eads C, Laird PW, Ilson DH, Kelsen DP, Harpole D, Moore MB, Danenberg KD, Danenberg PV, Meltzer SJ: Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 2000; 92: 1805-1811

Kerstens HM, Robben JC, Poddighe PJ, Melchers WJ, Boonstra H, de Wilde PC, Macville MV and Hanselaar AG: AgarCyto: a novel cell-processing method for multiple molecular diagnostic analyses of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 709-718

Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M: Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3221-3229

Kim DH, Kim JS, Ji YI, Shim YM, Kim H, Han J, Park J: Hypermethylation of RASSF1A promoter is associated with the age at starting smoking and a poor prognosis in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3743-3746

Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT: Promoter methylation of DAP-kinase: association with advanced stage in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2001a; 20: 1765-1770

Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT: p16INK4a and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001b; 61: 3419-3424

Knudson AG Jr: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823

Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI: Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* 1991; 252: 1711-1714

Kreuzer M, Kreienbrock L, Gerken M, Heinrich J, Bröske-Hohlfeld I, Müller KM, Wichmann HE: Risk factors for lung cancer in young adults. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 1028-1037

Kreuzer M, Müller KM, Gerken M, Wichmann HE: Lung cancer histologic types and age of onset. *Cancer* 1999; 85: 1958-1965

Kurakawa E, Shimamoto T, Utsumi K, Hirano T, Kato H, Ohyashiki K: Hypermethylation of p16(INK4a) and p15(INK4b) genes in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2001; 19: 277-281

Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM: Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of Semaphorin 3 B in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; 65: 3352-3355

Laird PW and Jaenisch R: DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1487-1495

Leonhardt H and Bestor TH: Structure, function and regulation of mamlian DNA methyltransferase. *EXS* 1993; 64: 109-119

Li E, Bestor TH, Jaenisch R: Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69: 915-926

Li E, Beard C, Jaenisch R: Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366: 362-365

Li WH, Gu Z, Wang H, Nekruteko A: Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 2001; 409: 847-849

Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R: DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 2000; 408: 538-540

Magewu AN & Jones PA: Ubiquitous and tenacious methylation of CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4225-4232

Mannino DM, Ford E, Giobanni GA, Thun M: Lung cancer deaths in the United States from 1979 to 1992: an analysis using multiple-cause mortality data. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 159-166

Mass MJ, Wang L: Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 386: 263-277

Mostoslavsky R & Bergman Y: DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333: 29-50

Nan X, Campoy FJ, Bird A: MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding site in genomic chromatin. *Cell* 1997; 88: 471-481

Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL: Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-1102

Okano M, Xie S, Li E: Cloning and characterisation of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; 19: 219-220

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li W: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-257

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA: Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000; 60: 5954-5958

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS: Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37: 4-66

Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Herman JG, Esteller M: Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissue and human primary tumors. *Cancer Res* 2002; 62: 4519-4524

Pfeifer GP, Grunberger D, Drahovsky D : Impaired enzymatic methylation of BFDE-modified DNA. *Carcinogenesis* 1984; 5: 931-935

Pfeifer GP, Steigerwald SD, Mueller PR, Wold B, Riggs AD: Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science*. 1989; 246: 810-813

Pfeifer GP: p53 mutational spectra and the role of methylated CpG sequences. *Mutat Res* 2000; 450: 155-166

Piyathilake CJ, Frost AR, Bell WC, Oelschlager D, Weiss H, Johanning GL, Niveleau A, Heimburger DC, Grizzle WE: Altered global methylation of DNA: an epigenetic difference in susceptibility for lung cancer is associated with its progression. *Hum Pathol* 2001; 32: 856-862

Piyathilake CJ, Henao O, Frost AR, Macaluso M, Bell WC, Johanning GL, Heimburger DC, Niveleau A, Grizzle WE: Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung (United States). *Cancer Causes Control* 2003; 14: 37-42

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ: Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase I. Expression, purification, and comparison of *de novo* and maintenance methylation. J Biol Chem 1999; 274: 33002-33010

Razin A, Szyf M, Kafri T, Roll M, Giloh H, Scarpa S, Carotti D, Cantoni GL: Replacement of 5-methylcytosine by cytosine: a possible mechanism for transient DNA demethylation during differentiation. Proc Natl Acad Sci 1986; 83: 2827-2831

Reik W & Walter J: Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nat Rev Genet 2001; 2: 21-32

Remmele W: Pathologie, Springer Verlag 1997

Robertson KD and Jones PA: DNA methylation: past, present and future directions. Carcinogenesis 2000; 21: 461-467

Sambrook J and Russel DW. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2001

Sato M, Horio Y, Sekido Y, Minna JD, Shimokata K, Hasegawa Y: The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. Oncogene 2002; 21: 4822-4829

Schreiber G and McCrory DC: Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. Chest 2003; 123 Suppl 1: 115S-128S

Sekido Y, Bader S, Latif F, Chen JY, Duh FM, Wei MH, Albanesi JP, Lee CC, Lerman MI, Minna JD: Human semaphorins A(V) und IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 4120-4155

Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JC, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Caligiuri MA, Plass C: Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. Hum Mol Genet 2001; 10: 1413-1419

Smith SS: Stalling of DNA methyltransferase in chromosome stability and chromosome remodelling. *Int J Mol Med* 1998; 1: 147-156

Sobin L and Wittekind C, eds. *TNM classification of malignant tumours*, 5th ed. New York; John Wiley, 1997

Sokolova IA, Bubendorf L, O'Hare A, Legator MS, Jacobson KKB, Grilli B, Dalquen P, Halling KC, Tamm M, Seelig SA, Morrison LE: A fluorescence in situ hybridization-based assay for improved detection of lung cancer cells in bronchial washing specimens. *Cancer* 2002; 96: 306-315

Soria JC, Rodriguez M, Liu DD, Lee JJ, Hong WK, Mao L: Aberrant promoter methylation of multiple genes in bronchial brush samples from former cigarette smokers. *Cancer Res* 2002; 62: 351-355

Stoger R, Kubicka P, Liu CG, Kafri T, Razin A, Cedar H, Barlow DP: Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting. *Signal Cell* 1993; 73: 61-71

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002; 161: 1961-1971

Szyf M: The DNA methylation machinery as a target for anticancer therapy. *Pharmacol Ther* 1996; 70: 1-37

Tang X, Khuri FR, Lee JJ, Kemp BL, Liu D, Hong WK, Mao L: Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. *J Nat Cancer Inst* 2000; 92: 1511-1516

Tremblay KD, Saam JR, Ingram RS, Tilghman SM, Barolomei MS: A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse *H19* gene. *Nat Genet* 1995; 9: 407-413

Tobal K, Layton DM, Mufti GJ: Non-invasive isolation of constitutional DNA for genetic analysis. *Lancet*. 1989; 2: 1281-1282

Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF, Minna JD. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13954-13959

Tomizawa Y, Kohno T, Kondo H, Otsuka A, Nishioka M, Niki T, Yamada T, Maeshima A, Yoshimura K, Saito R, Minna JD, Yokota J: Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of *RASSF1A* at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2362-2368

Topaloglu O, Obaidul H, Tokumaru Y, Lee J, Ratovitski E, Sidransky D, Mool C-S: Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2284-2288

Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, McLarren D, Feng Z, Fukuyama Y, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Tsukuda K, Sugio K, Shimizu M, Shimizu K. Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 103: 153-60

Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, Virmani AK, Girard L, Miyajima K, Harada K, Ariyoshi Y, Takahashi T, Sugio K, Brambilla E, Gilcrease M, Minna JD, Gazdar AF: DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther* 2001a; 1: 61-67

Toyooka KO, Toyooka S, Virmani AK, Sathyanarayana UG, Euhus DM, Gilcrease M, Minna JD, Gazdar AF: Loss of expression and aberrant methylation of the *CDH13* (H-cadherin) gene in breast and lung carcinoma. *Cancer Res* 2001b; 61: 4556-4560

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC Eds. WHO-Classification of Tumours. Pathology of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC-Press, Lyon 2004

Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jerónimo C, Harden S, Engles J, Danenberg PV, Yang S, Sidransky D. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 371-375

Vairapandi M & Duker NJ: Enzymic removal of 5-methylcytosine from DNA by a human DNA-glycosylase. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5323-5327

Virmani AK, Tsou JA, Siegmund KD, Shen LYC, Long TI, Laird PW, Gazdar AF, Laird-Offringa IA. Hierarchical clustering of lung cancer cell lines using DNA methylation markers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention* 2002; 11: 291-297

Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, Padar A, Huang CX, Cunningham T, Farinas AJ, Milchgrub S, Euhus DM, Gilcrease M, Herman J, Minna JD, et al. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1 A in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1998-2004

Virmani AK, Rathi A, Zöchbauer-Müller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D, Maitra A, Heda S, Fong KM, Thunnissen F, Minna JG, Gazdar AF: Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor- β gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1303-1307

Waki T, Tamura G, Sato M, Motoyama T: Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene* 2003; 22: 4128-4133

Wiethage T, Junker K, Johnen G, Krismann M, Müller K-M: Pathologie und Molekularbiologie bösartiger pulmonaler Tumoren. *Pathologe* 2000; 21: 404-423

Xu GL, Bestor TH, Bourchis D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequinot E: Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase. *Nature* 1999; 402: 187-191

Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, Motoyama T: Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 589-592

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH: Cytosin methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; 13: 335-340

Yoder JA and Bestor TH: A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 279-84

Zahava S and Cedar H: DNA methylation: A molecular lock. *Current Biology* 1997; 7: 305-307

Zheng S, Chen A, McMillan A, Lafuente A, Lafuente MJ, Ballesta A, Trias M, Wiencke JK: Correlations of partial and extensive methylation at the p14(ARF) locus with reduced mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2057-2064

Zöchbauer-Müller S, Lam S, Toyooka S, Virmani AK, Toyooka KO, Seidl S, Minna JD, Gazdar AF: Aberrant methylation of multiple genes in the upper aerodigestive tract epithelium of heavy smokers. *Int J Cancer* 2003; 107: 612-616

Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD: Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001a; 61: 249-255

Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD: 5' CpG island methylation of the *FHIT* gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast. *Cancer Res* 2001b; 61: 3581-3585

7. Abkürzungen

AC	Adenokarzinom
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälberserum
h	Stunden
IPTG	Isoproyl-beta-D1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
LB	Luria Broth
min	Minuten
NSCLC	Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom
NT	Nicht-Tumorpatient
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
rpm	<i>rotation per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SCC	Plattenepithelkarzinom
sek	Sekunden
SCLC	Kleinzelliges-Lungenkarzinom
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
Tu	Tumor
U	Units
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -galactosid

8. Anhang

Methylation of RAS association domain family protein 1A as a molecular marker for lung cancer

Hans J. Grote¹, Viola Schmiemann¹, Helene Geddert², Alfred Böcking¹, Rainer Kappes³, Helmut E. Gabbert² and Mario Sarbia^{2,4}

¹Institute of Cytopathology, H.-Heine-University, D-40225 Duesseldorf, Germany;

²Institute of Pathology, Heinrich-Heine-University, D-40225 Duesseldorf, Germany;

³Department of Pulmonology, Florence-Nightingale-Hospital, D-40489 Duesseldorf, Germany; ⁴Institute of Pathology, Technical University, D-81675 Munich, Germany

Abstract

Rationale: Aberrant methylation of CpG islands in gene promoter regions is an important mechanism for silencing tumor suppressor genes in cancer and offers a promising tool for the development of molecular biomarkers. **Objectives:** To determine the prevalence of aberrant promoter methylation of the RAS association domain family protein 1A gene in bronchial aspirates of patients who underwent bronchoscopy for suspected lung cancer, and to test whether such a methylation assay is suitable as a diagnostic adjunct to conventional cytology. **Methods:** We analyzed 221 bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer using a sensitive quantitative methylation specific PCR. **Measurements and Main Results:** Aberrant methylation was found in 88% (35/40) of small cell lung cancer, 28% (31/109) of non-small cell lung cancer and 100% (6/6) of combined small cell lung cancer independent from clinical tumor stage. No aberrant methylation was detected in patients finally diagnosed for non-neoplastic lung disease (0/66). Depending on histological subtype, up to 88% of cases presenting with a negative histology showed a positive methylation assay, thus confirming cytological diagnosis of lung cancer with a 100% specificity. **Conclusion:** The analysis of aberrant methylation of RAS association domain family protein 1A using a quantitative methylation specific PCR enabled a sensitive and highly specific distinction between lung cancer and non-neoplastic lung disease. These results suggest that our methylation assay is a promising molecular tool for diagnosis of primary lung cancer.

Aberrant promoter methylation of *p16^{INK4a}*, *RARB2* and *SEMA3B* in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer

Hans J. Grote¹, Viola Schmiemann¹, Helene Geddert², Ulrich P. Rohr³, Rainer Kappes⁴, Helmut E. Gabbert² and Alfred Böcking¹

¹Institute of Cytopathology, H.-Heine-University, D-40225 Duesseldorf, Germany

²Institute of Pathology, Heinrich-Heine-University, D-40225 Duesseldorf, Germany

³Department of Hematology, Oncology, and Clinical Immunology, Heinrich-Heine-University, D-40225 Duesseldorf, Germany

⁴Department of Pulmonology, Florence-Nightingale-Hospital, D-40489 Duesseldorf, Germany

Abstract

Aberrant promoter methylation of normally unmethylated CpG-islands offers a promising tool for the development of molecular biomarkers. We investigated bronchial aspirates of patients admitted for suspected lung cancer with regard to the prevalence of aberrant methylation of potential marker genes. Applying quantitative methylation specific PCR (QMSP) we analyzed bronchial aspirates from 75 patients with primary lung cancer and 64 bronchial aspirates of patients diagnosed with benign lung disease for promoter methylation of three candidate marker genes (*p16^{INK4a}*, *RARB2*, *SEMA3B*). Hypermethylation of *p16^{INK4a}* detected 18/75 (24%) cases with primary lung cancer and was present predominantly in squamous cell carcinomas (14/25, 56%). *RARB2* QMSP at an assay threshold greater than 30 was found in 42/75 (56%) patients with lung cancer without relation to histological subtype. Patients with benign lung disease showed methylation of *p16^{INK4a}* and a *RARB2* QMSP at an assay threshold greater than 30 in 0/64 (0%) and 8/64 (13%) cases, respectively. Combining the two methylation markers, *p16^{INK4a}* and *RARB2*, yielded a sensitivity of 69% and a specificity of 87% for the diagnosis of pulmonary malignancy. In contrast, *SEMA3B* displayed frequent promoter methylation (around 90%) both in bronchial aspirates of tumor and non-tumor cases and thus was not suited as a biomarker. The results of this study indicate that QMSP analysis of *p16^{INK4a}* and *RARB2* may aid the diagnosis of primary lung cancer in bronchial aspirates. In particular, detection of *p16^{INK4a}* methylation by QMSP may serve as a highly specific marker of pulmonary squamous cell carcinoma.

Aberrant methylation of the Adenomatous Polyposis Coli promoter 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer

Hans J. Grote¹, Viola Schmiemann¹, Sibylle Kiel², Alfred Böcking³, Rainer Kappes³, Helmut E. Gabbert² and Mario Sarbia²

¹Institute of Cytopathology, Heinrich-Heine-University, Duesseldorf, Germany

²Institute of Pathology, Heinrich-Heine-University, Duesseldorf, Germany

³Department of Pulmonology, Florence-Nightingale-Hospital, Duesseldorf, Germany

Abstract

Promoter hypermethylation is a major mechanism for gene silencing and offers a promising starting point for developing molecular biomarkers. The purpose of our study was to determine aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene promoter 1A with respect to its prevalence and quantitative level in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. Applying quantitative methylation specific PCR (QMSP), 155 bronchial aspirates from patients with non-small cell cancer (NSCLC) and small cell cancer (SCLC) of the lung as well as 67 bronchial aspirates from patients diagnosed for non-neoplastic lung disease were examined in a retrospective case-control-study. Aberrant *APC* promoter 1A methylation was seen in 71% of NSCLC, 38% of SCLC, and 42% of patients with non-neoplastic lung disease being, therefore, not specific for the presence of primary lung cancer. In contrast, quantitative analysis showed a significantly higher methylation level of bronchial aspirates from NSCLC as compared to patients without neoplastic lung disease. Introducing a cut-off point which defined high level of *APC* hypermethylation NSCLC could be discriminated from cases without neoplastic disease with a specificity of 98.5% and a sensitivity of 39%. The data suggests that quantitative analysis of *APC* hypermethylation may serve as a biomarker of primary lung cancer.

DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: Which method to take?

Hans Jürgen Grote^a, Viola Schmiemann^a, Mario Sarbia^b and Alfred Böcking^a

^aInstitute of Cytopathology, Heinrich-Heine-University, Moorenstrasse 5, D-40225 Düsseldorf, Germany

^bInstitute of Pathology, Heinrich-Heine-University, Moorenstrasse 5, D-40225 Düsseldorf, Germany

Abstract

Objective: To evaluate the ability of 50% ethanol / 2% carbowax (Sacomanno fixative) to preserve bronchial secretions with high quality genomic DNA as well as to compare different DNA extraction methods.

Methods: DNA was extracted from 45 bronchial aspirates by four different extraction protocols. Beside DNA yield, DNA quality with regard to purity, integrity, and PCR success rate were investigated.

Results: No fragmentation of sample DNA due to the fixative was detected. It was preserved as high molecular weight DNA. DNA yield, purity, and integrity were dependent on the DNA extraction method to some extent. Irrespective of the DNA extraction method the PCR success rate for amplification of β -globin gene fragments (268, 536, and 989 bp) was 100%.

Conclusions: A fixative containing 50% ethanol / 2% carbowax preserves high quality DNA which is well suited for PCR-based assays regardless of the extraction protocol used. The selection of the DNA extraction protocol has to be adjusted to the circumstances of application.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen (s. S. 108) – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen betreut worden.

Köln, Februar 2005

Viola Schmiemann

Teilpublikationen dieser Arbeit

Grote HJ, **Schmiemann V**, Geddert H, Böcking A, Kappes R, Gabbert HE, Sarbia M: Methylation of RAS association domain family protein 1A as a molecular marker for lung cancer. 2004 (submitted)

Grote HJ, **Schmiemann V**, Geddert H, Kappes R, Rohr U, Gabbert HE, Böcking A: Aberrant promoter methylation of *p16^{INK4a}*, *RARB2* and *SEMA3B* in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. Int J Cancer 2004, (accepted)

Grote HJ, **Schmiemann V**, Kiel S, Böcking A, Kappes R, Gabbert HE, Sarbia M: Aberrant methylation of the *APC* gene promoter 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. Int J Cancer 2004, 110: 751-755

Grote HJ, **Schmiemann V**, Sarbia M, Böcking A: DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: Which method to take? Anal Cell Pathol 2003, 25: 83-88