

Beschreibung einer Familie
mit häufigem Lungenkarzinom
Gewinnung und Asservierung
von DNA und B-Zellen
für molekulargenetische Analysen

Aus dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München,
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

Beschreibung einer Familie
mit häufigem Lungenkarzinom
Gewinnung und Asservierung
von DNA und B-Zellen
für molekulargenetische Analysen

Klaus Rehe

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler
2. Univ.-Prof. Dr. M. Werner

Die Dissertation wurde am 02.01.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.05.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung

- 1.1 Epidemiologie*
- 1.2 Klassifikation*
- 1.3 Klinik und Prognose*
- 1.4 Ätiologie und Risikofaktoren*
 - 1.4.1 Rauchen*
 - 1.4.2 Berufliche Faktoren*
 - 1.4.3 Allgemeine Umweltfaktoren*
 - 1.4.4 Familiarität*
- 1.5 Genetik*
 - 1.5.1 Allgemeine Grundlagen der Tumorentstehung*
 - 1.5.2 Onkogene*
 - 1.5.3 Tumorsuppressorgene (TSG)*
 - 1.5.4 Stand der Erkenntnisse beim Lungenkarzinom*
 - 1.5.5 Mutationen des kurzen Arms des Chromosoms 3 (3p)*
 - 1.5.6 Mutationen anderer Chromosomen und Gene*

2. Zielsetzung

3. Material und Methoden

- 3.1 Ethikvotum*
- 3.2 Patientenaufklärung und Einverständniserklärung*
- 3.3 Interview*
- 3.4 Studienteilnehmer und Proben*
 - 3.4.1 Patienten und Personen*
 - 3.4.2 Karzinomzelllinien*
- 3.5 Entnahme von Vollblut*
- 3.6 Etablierung von B-Zell-Kulturen*
 - 3.6.1 Gewinnung von EBV-Virus für die Transformation*
 - 3.6.2 EBV-Transformation der Lymphozyten*
 - 3.6.3 Kultivierung der B-Lymphozyten*
 - 3.6.4 Einfrieren der Zellen*

Inhaltsverzeichnis

- 3.7 *Isolierung der DNA*
 - 3.7.1 *Lyse der Zellen aus Vollblut*
 - 3.7.2 *Lyse der Zellen aus Zellkulturen*
 - 3.7.3 *Reinigung und Fällung*
- 3.8 *Qualitätsprüfung und Quantifizierung der DNA*
 - 3.8.1 *Darstellung im Agarose-Minigel*
 - 3.8.2 *Optische DNA-Mengenbestimmung im Spektrometer*
- 3.9 *Mikrosatellitenanalyse*
 - 3.9.1 *Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)*
 - 3.9.2 *Überprüfung der PCR-Produkte im Minigel*
 - 3.9.3 *Vorbereitung des Polyacrylamidgels*
 - 3.9.4 *Laden des Gels und Durchführung der Elektrophorese*
 - 3.9.5 *Transfer der Mikrosatellitenallele auf die HybondTM-N-+-Membran*
 - 3.9.6 *Radioaktivmarkierung der Oligonukleotide*
 - 3.9.7 *Hybridisierung und Autoradiographie*
- 3.10 *Weiterführende molekularbiologische Analysen*
 - 3.10.1 *Single-Strand Conformation Polymorphismus Analyse (SSCP)*

4. Ergebnisse

- 4.1 *Stammbaum*
- 4.2 *Erfassung des Krankheitsstatus und klinische Erhebung*
- 4.3 *Nicht-verwandter Patient mit Adenokarzinom der Lunge (2010)*
- 4.4 *Gewebe*
- 4.5 *B-Lymphozyten-Zelllinien*
- 4.6 *DNA-Isolierung*
- 4.7 *Mikrosatellitenanalyse*
- 4.8 *Molekulargenetische Analysen in den 3p21-Genen RON und a2ä2*

5. Diskussion

Inhaltsverzeichnis

6. Zusammenfassung

7. Anhang

7.1 *Literaturverzeichnis*

7.2 *Rezepte und Arbeitsstoffe*

7.3 *Firmenverzeichnis*

7.4 *Personencodierung*

7.5 *Darstellung der Studie für das Ethikvotum*

7.6 *Informationsschreiben und Einwilligungserklärung*

7.7 *Fragebogen*

8. Danksagung

9. Lebenslauf

1. Einführung

1.1 Epidemiologie

Das Lungenkarzinom stellt in Deutschland unter den Krebstodesfällen die häufigste Ursache beim Mann und die dritthäufigste Ursache bei der Frau dar. Bei Männern entfielen 1995 in den alten Bundesländern 26,6% und in den neuen Bundesländern 29,5% aller Krebstodesfälle auf das Lungenkarzinom, bei Frauen waren es etwa 9,2% in den alten und 7,2% in den neuen Bundesländern (Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland, 1998). Basierend auf der Grundlage der Inzidenzdaten aus dem Jahr 1997 treten nach Schätzungen des Robert Koch Instituts in Deutschland jährlich bei Männern 28.200 (entsprechend 17% aller bösartigen Neubildungen) und bei Frauen 8.900 (entsprechend 5% aller bösartigen Neubildungen) neue Fälle von Lungenkarzinomen auf (<http://www.rki.de/GBE/KREBS/BROSCHUERE2/BROSCHUERE2.HTM>). Während die Inzidenz bei Männern sinkt, steigt sie bei Frauen (Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland, 1998). International betrachtet führte die beobachtete starke Zunahme der Bronchialkarzinome beim weiblichen Geschlecht dazu, daß dieses bereits seit 1980 in den USA die Spitzenposition der durch Malignome verursachten Todesursachen bei beiden Geschlechtern einnimmt (Müller und Theile, 1994).

1.2 Klassifikation

Allgemein geht man davon aus, daß alle histologischen Typen aus einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle entstehen (Carbone, 1997). Histopathologisch werden die Lungenkarzinome in kleinzellige und nicht-kleinzellige Karzinome eingeteilt (Müller und Theile, 1994).

Es wird unterschieden in:

- SCLC (*Small Cell Lung Cancer*; kleinzelliges Lungenkarzinom; *oat cell tumor*)
- NSCLC (*Non Small Cell Lung Cancer*; nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
 - Plattenepithelkarzinom
 - Adenokarzinom
 - großzelliges Karzinom

Dem SCLC, das meist starke Raucher betrifft, wird ein Anteil von 20% an den Lungenkarzinomen zugeschrieben (Zöchbauer et al., 1994). Zu 90% entsteht es in zentralen Lungenabschnitten. Man subtypisiert in den Haferzelltyp (*oat cell tumor*) mit rundlichen oder länglich-spindeligen Kernen und wenig Zytoplasma und den Intermediärtyp, mit größeren, polygonalen Zellen mit etwas mehr Zytoplasma. Die Zellen sind in 70%-80% aneuploid und zeichnen sich viel häufiger als die NSCLC durch neuroendokrine Merkmale aus (Lorenz, 1994; Häußinger und Huber, 1996). SCLC besitzen L-Dopa-Decarboxylase-Aktivität, haben neuroendokrine Granula, exprimieren Chromogranin A und neurale Kreatinkinase (CK-BB), sowie neuronspezifische Enolase (NSE, in 60%-100%) und Synaptophysin (ca. 80%). Paraneoplastische Phänomene werden teilweise durch die Peptidhormone adrenocorticotropes Hormon (ACTH), β -Endorphin, Kalzitinin, Oxytocin, Gastrin-Releasing-Peptide (GRP, ein Bombesinanalagon), Neurotensin, Vasopressin, atriales natriuretisches Peptid (ANP) oder hypophysäre Neurophysine verursacht und die Zellen tragen oft entsprechende Rezeptoren für diese Hormone, die bei NSCLC in der Regel nicht nachzuweisen sind (Lorenz, 1994, Zöchbauer et al., 1994; Carbone, 1997). Ca. 20% der SCLCs sind Mischtumoren, die zusätzlich entweder Merkmale eines großzelligen Bronchialkarzinoms zeigen oder mit Plattenepithel- oder Adenokarzinomen kombiniert sind. Dies stützt die Theorie einer einheitlichen Ausgangszelle für Lungenkarzinome unterschiedlicher histologischer Differenzierung (Müller und Theile, 1994; Zöchbauer et al., 1994).

Das Plattenepithelkarzinom ist mit einem Anteil von 30% bis 40% die häufigste Form des Bronchialkarzinoms und ist am engsten mit dem Rauchen assoziiert. Im Gegensatz zum Adenokarzinom nimmt seine Inzidenz ab, es liegt in 90% zentral, stellt aber auch einen Anteil von 50% der *Pancoast*-Tumoren. Für die Diagnosestellung ist das Vorhandensein von Hornperlen und Interzellularbrücken unerlässlich und ihre Bildung nimmt mit dem Grad der Differenzierung zu, der Gehalt an spezifischen Zytokeratinen ist unterschiedlich und Aneuploidie findet sich in 40%-90% (Tumorzentrum München, 1997; Häußinger und Huber, 1996). An der Zelloberfläche werden EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptoren stark exprimiert (Zöchbauer et al., 1994). Frühe, asymptotische Plattenepithelkarzinome fallen, wenn überhaupt, häufig durch Erythroplakie auf (Crissman et al., 1993).

Der Anteil der Adenokarzinome liegt zwischen 25% und 30%. Sie zeigen eine geringere Assoziation mit dem Zigarettenrauchen und sind das am häufigsten beobachtete Lungenkarzinom bei Nichtrauchern. Außerdem entstehen sie gehäuft in Narben. In 75% der Fälle liegen sie in peripheren Lungenabschnitten (Zöchbauer et al., 1994; Capewell et al., 1991). Besonders Frauen sind von der allgemein steigenden Inzidenz der Adenokarzinome betroffen. Eine histologische Subtypisierung teilt in azinäre, papilläre, solide Karzinome mit Schleimbildung und in bronchoalveoläre Karzinome (Alveolarzellkarzinome) ein, von denen letztere die günstigste Prognose haben. Verschiedene Subtypen können allerdings in einem Tumor nebeneinander vorkommen. Adenokarzinome bilden in ca. 80% Muzin (Zöchbauer et al., 1994), die Zellen sind zu 40%-90% aneuploid und exprimieren in ca. 66% carcino-embryonales Antigen (CEA), Surfactant-Apoprotein und außerdem Keratine, nicht jedoch plattenepitheliale Keratine (Häußinger und Huber, 1996). Papilläre Adenokarzinome und bronchoalveoläre Karzinome können Psammkörperchen aufweisen. Durch frühzeitige Gefäßinfiltration und daraus resultierender hämatogener Streuung haben die Adenokarzinome im Stadium 1 und 2 eine schlechtere Prognose als die Plattenepithelkarzinome. Seltene Varianten sind das adenosquamöse Karzinom und das Pulmoblastom (Tumorzentrum München, 1997). In über 50% finden sich Herde plattenepithelialer Differenzierung, oft auch Riesenzellen und entdifferenzierte polymorphe Strukturen (Müller und Theile, 1994).

Sind Bronchialkarzinome nicht kleinzellig oder weisen keine differenzierten Merkmale auf, dann werden sie als großzelliges Karzinom bezeichnet. Sie bilden einen Anteil von 10%-15% an den Bronchialkarzinomen (Zöchbauer et al., 1994). Wahrscheinlich bestehen sie aus gering differenzierten Adeno- oder Plattenepithelkarzinomen und exprimieren daher z. T. sowohl plattenepitheliale Marker, wie auch CEA und Surfactant-Apoprotein. Die Tumorzellen sind in 70%-80% der Fälle aneuploid. Besitzen die Tumoren einen hohen Anteil an Riesenzellen und auch neutrophile Granulozyten, weist dies meist auf ein Spätstadium und eine schlechte Prognose hin. In etwa 10% der Fälle wird eine neuroendokrine Differenzierung mit Expression von NSE, γ -Enolase, Serotonin, Bombesin oder anderen Neuropeptiden festgestellt (Tumorzentrum München, 1997).

Allgemein haben NSCLC viel seltener neuroendokrine Eigenschaften und es fehlen ihnen in aller Regel die entsprechenden Rezeptoren. Sie exprimieren jedoch häufig Re-

zeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und *erbB-2*, *her-2* und *neu* (Lorenz, 1994).

1.3 Klinik und Prognose

Einen ersten und wichtigen Anteil zur Diagnose Lungenkrebs liefert die Anamnese, in der unter anderem neben der allgemeinen Krebsanamnese spezielle Symptome (Hämoptysis, Husten, Dyspnoe, Schmerzen, Dysphagie, Heiserkeit, systemischer Gewichtsverlust u.a.), Risikofaktoren (Rauchen, berufliche Exposition u.a.) und eine mögliche familiäre Belastung erfaßt werden sollen (Tumorzentrum München, 1997; Zöchbauer et al., 1994). In den Stadien I und II finden sich allerdings nur bei weniger als der Hälfte der Patienten Symptome, 10%-15% der Bronchialkarzinome werden bei klinisch unauffälligen Personen durch Routineröntgen oder Sputumzytologie entdeckt (Zöchbauer et al., 1994). Die klinische Untersuchung konzentriert sich insbesondere auf die Thoraxorgane aber auch auf paraneoplastische Syndrome, die bereits vor der Diagnose des Bronchialkarzinoms auffallen können (Tumorzentrum München, 1997; Feddersen und Wichert, 1994).

Die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit beim NSCLC ist die Operation, möglich ist sie jedoch nur in ca. 30% der Fälle (Johnston, 1988). Eine Studie gibt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit nach operativem Eingriff im Stadium I mit 73% und im Stadium II mit 36% an (Branscheid et al., 1994). Global liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach einer Operation im Bereich von 25%-30% (Häußinger und Huber, 1996). Bei fortgeschrittenen Karzinomen wird die Chemotherapie oder Strahlentherapie angewandt, Patienten mit nicht mehr resezierbaren NSCLC scheinen von einer kombinierten Radiochemotherapie zu profitieren (Dillman et al., 1990; Marino et al., 1995).

SCLC befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose meist schon im fortgeschrittenem Tumorstadium und werden in der Regel nicht operiert. Für diese Karzinome kommt in erster Linie eine kombinierte Chemo-Radio-Therapie zur Anwendung. Ist eine Therapie mit kurativer Zielsetzung nicht mehr möglich, dann ist die Palliation, ebenso wie supportive Maßnahmen, ein wichtiges Standbein in der Behandlung des Bronchialkarzinoms (Tumorzentrum München, 1997). Der funktionelle Gewinn und das Plus an Lebensqualität gemessen am Karnovsky-Index sind bei der Indikationsstellung gegen die Nebenwirkungen der Therapie abzuwägen (Steppling, 1994).

Die Prognose des Bronchialkarzinoms hat sich seit den frühen 70er Jahren kaum gebessert und ist mit einer 5-Jahres-Mortalitätsrate von 87% sehr schlecht (Khuri et al., 1997). Eine frühe Diagnose der lokalisierten Stadien ist wegen der nur unspezifischen Symptome eher selten und so werden meist erst fortgeschrittene Tumorstadien entdeckt, die einer kurativen chirurgischen oder einer effektiven systemischen Therapie nicht mehr zugänglich sind.

Ungeachtet der Histologie und dem Stadium des Bronchialkarzinoms findet sich bei inoperablen, nicht behandelten Patienten nach dem Auftreten der ersten Symptome eine mediane Überlebenszeit von ca. 8 Monaten (Rosenthal und Doermer, 1989). SCLC im Stadium *limited disease* bei Frauen haben eine günstigere Prognose, wenn die Laktatdehydrogenase (LDH) und NSE normalwertig sind, die Patientin sich in gutem Allgemeinzustand befindet und unter 70 Jahren alt ist. Ebenso haben SCLC im Stadium *extensive disease* bei normaler LDH und im Alter unter 70 Jahren eine günstigere Prognose (Tumorzentrum München, 1997; Wolf und Havemann, 1994). Bei letzteren ist die Lokalisation, das Ausmaß der Metastasen und die Art der Therapie entscheidend.

Beim NSCLC zeigen die Adenokarzinome aufgrund häufigerer Rezidive eine niedrigere Überlebensrate als Plattenepithelkarzinome. Der Grad der Differenzierung geht ebenso in die Bewertung der Prognose ein, wie das Ausmaß der Neovaskularisation und die Tumorinvasion in Blut- oder Lymphgefäße. Die Zytokeratinexpression in Zellen regionärer Lymphknoten oder in Knochenmarkszellen korreliert mit einer höheren Rezidivrate. Studien bezüglich des Einflusses des Ploidiestatus und des Anteils sich in der Synthesephase des Zellzyklus befindlichen Tumorzellen auf die Prognose lieferten kontroverse Ergebnisse. Mit Differenzierungsverlust und damit negativer Auswirkung auf die Prognose ist auch ein Verlust der ABH-Antigen-Expression bzw. das Neuaufreten einer H/Le^y/Le^b-Antigenexpression assoziiert.

Eine schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate haben Patienten, die vermehrt EGF oder *erbB-2* exprimieren und deren Tumorzellen einen stärkeren Aneuploidiestatus oder eine höhere proliferative Aktivität zeigen. Patienten mit Adenokarzinomen haben eine schlechte 5-Jahres-Überlebensrate, wenn sie eine Punktmutation im *ras*-Protoonkogen besitzen, was bei ca. einem Drittel der Patienten zutrifft (Lorenz, 1994; Rodenhuis und Slebos, 1992; Volm, 1989; Zöchbauer et al., 1994; Diez et al., 1997).

1.4 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Lunge steht mit nahezu 100 m² Gesamtoberfläche und einem Atemluftdurchsatz von 10 000 bis 20 000 Litern pro Tag am stärksten von allen Körperorganen mit der Umwelt in Verbindung (Baur und Konietzko, 1996). Es ist daher einsichtig, daß äußere Einflüsse auf Erkrankungen dieses Organs mitbestimmend sein können. An erster Stelle steht hierbei das inhalative Zigarettenrauchen, das mit 85% als wichtigste Ursache des Lungenkarzinoms angesehen wird. In 8% werden eine berufliche Karzinogenexposition, in 5% die Luftverschmutzung und in 2% andere Ursachen verantwortlich gemacht (Häußinger und Huber, 1996). Aber auch die Kanzerogenese durch exogene Karzinogene steht wahrscheinlich in einem direkten Kausalzusammenhang mit der individuellen genetischen Konstitution, da an der Absorption, dem Transport, der Aktivierung, der Detoxifizierung und der Exkretion von Umweltstoffen und ihrer im Körper gebildeten Metabolite verschiedenste Gene beteiligt sind. Ein und dieselbe Dosis eines Karzinogens könnte interindividuell einen unterschiedlichen Effekt haben (Colditz et al., 1996).

1.4.1 Rauchen

Das Rauchen wurde bereits 1939 als Hauptrisikofaktor für das Bronchialkarzinom erkannt (Müller, 1939). Im Vergleich zu Nichtrauern sind rauchende Männer 22 mal und rauchende Frauen 12 mal häufiger von einem Bronchialkarzinom betroffen. Die Verdopplung der „Pack-years“ (Produkt aus täglich gerauchten Schachteln von Zigaretten und Raucherjahren) führt zu einer zwei- bis vierfach erhöhten Sterblichkeit. Ein früher Beginn der Rauchgewohnheit steigert das Risiko bis zu 30 mal und nach Aufgabe des Rauchens vermindert sich das Risiko mit Zunahme des rauchfreien Intervalls (Häußinger und Huber, 1996). In Teilen Großbritanniens ist das Rauchen bei Männern nach einer Schätzung sogar für über 99% und bei Frauen für über 90% der Lungenkarzinome verantwortlich (Capewell et al., 1991). Frauen erkranken bei gleichem Zigarettenkonsum früher und häufiger als Männer (Eckersberger, 1994), sie stellen aber auch einen Anteil von ca. 75% an den Bronchialkarzinomen von Nichtrauern dar (Capewell et al., 1991). Unter den mehr als 5000 Haupt- und Nebenprodukten des Zigarettenrauches kann man Kanzerogene wie N-Nitrosoamine, Benzpyrene, Benzanthrazene und Kokanzerogene (Promotoren) wie Phenole und Terpene nachweisen (Zöchbauer et al., 1994;

Horch, 1993). Zigarettenrauch gilt dabei als komplettes Karzinogen, das sowohl als Initiator als auch als Promotor wirken kann (Leanderson, 1993). Außerdem enthält der Zigarettenrauch hohe Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffmetaboliten wie Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikale, die eine Hydroxylierung und Strangbrüche der DNA hervorrufen können (Leanderson, 1993). Auch Passivrauchen erhöht das Lungenkarzinomrisiko, da der Nebenstromrauch unter anderem polyzyklische Aromate, Nitrosamine und aromatische Amine enthält. Ungefähr 20% der Bronchialkarzinome von Nichtrauchern sollen auf einer passiven Exposition beruhen (Correa et al., 1983; Zöchbauer et al., 1994). Insgesamt wird das Rauchen für 30% aller Krebstodesfälle verantwortlich gemacht und man geht davon aus, daß globaler Rauchverzicht die Krebserkrankungen um eben diesen Prozentsatz, speziell Bronchialkarzinome sogar um 80% senken würde (Eckersberger, 1994; Harvard report on cancer prevention, 1996).

1.4.2 Berufliche Faktoren

Das Bronchialkarzinom ist außerdem die häufigste Art der berufsbedingten Karzinome (Baur et al., 1994). Industriezweige wie die Papierindustrie, die chemische Industrie, die petroleumverarbeitende Industrie und die transportmittelproduzierende Industrie sowie der Schiffsbau können wahrscheinlich mit einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko in Verbindung gebracht werden (Blot und Fraumeni, 1976). Welche Rolle dabei den ca. 40-50 000 chemischen Verbindungen für die jeweilige Lungentoxizität und Kanzerogenität zukommt, ist unklar. Unter den Arbeitsmaterialien stehen Glasfasern, Kaliumtitanatverbindungen, Keramikfasern, Siliziumkarbidfasern und Steinwolle als Lungenkrebsgefahrstoffe im Verdacht (Baur et al., 1994). Asbest, stellt neben dem Zigarettenrauchen den zweitwichtigsten Risikofaktor für Lungenkarzinome dar (Zöchbauer et al., 1994). Dabei scheint die Asbestexposition bei Rauchern eine multiplikative Wirkung hinsichtlich des Krebsrisikos zu haben. Die durchschnittliche Latenzzeit zwischen der ersten Exposition und der Diagnose eines Lungenkarzinoms beträgt mehr als 40 Jahre und es entwickeln sich überwiegend Plattenepithelkarzinome (Hillerdal, 1993). Aufgrund dieser langen Latenzperiode wird der Häufigkeitsgipfel asbestbedingter Malignome erst um das Jahr 2010 erwartet (Baur und Konietzko, 1996).

1.4.3 Allgemeine Umweltfaktoren

Ein erhöhtes Lungenkarzinomrisiko haben aufgrund einer höheren Schadstoffexposition, besonders gegenüber Dieselruß, Benzol und polyaromatischen Kohlenwasserstoffen Stadtpopulationen, bei denen im Vergleich zur Landbevölkerung eine gering erhöhte Inzidenz von Lungenkarzinomen beobachtet wird (Blot und Fraumeni, 1976; Zöchbauer et al., 1994; Kappos, 1994).

1.4.4 Familiarität

Eine familiäre Häufung, d. h. eine mögliche genetische Prädisposition von Lungenkarzinomen wurde erstmals auf der Grundlage statistischer Analysen postuliert. Die Gesamtmortalität an Karzinomen war bei Familienangehörigen von Patienten mit einem Lungenkarzinom signifikant höher und der Anteil der Malignome des Respirationstraktes unter Berücksichtigung des Raucherstatus war ungefähr dreimal so hoch (Tokuhata, 1964). Andere Studien bestätigten die genetische Suszeptibilität für Malignome bei Verwandten eines an Lungenkarzinom Erkrankten und spezifizierten das erhöhte Krebsrisiko insbesondere für die Trachea, die Bronchien, die Lunge, die Nasenhöhle, den Larynx, den Uterus, die Zervix, die Ovarien und andere weibliche Geschlechtsorgane (Lynch et al., 1986; Sellers, 1987). Am größten ist dieses Risiko beim SCLC (Sellers et al., 1992 a).

Veröffentlichungen, die von mehreren Bronchialkarzinomen unter Geschwistern oder Bronchialkarzinomen über mehrere Generationen einer Familie berichten, sind in der Literatur selten. Goffman et al. beschreiben zwei Familien mit einer erhöhten Anzahl von Bronchialkarzinomen und anderen Malignomen. In der ersten der beiden Familien hatten von 12 Geschwistern fünf ein Lungenkarzinom, ein Bruder ein Larynxkarzinom und eine Schwester eine akute myeloische Leukämie (AML). Der Großvater der Geschwister verstarb an einem Lebermalignom, die Mutter an einem Mammakarzinom und je eine ihrer Schwestern an Malignomen der Leber bzw. des Ovars. Weitere Familienmitglieder hatten ein Ovarialkarzinom, ein Uterusleiomyom, ein Basaliom und ein malignes Melanom sowie einen Glomustumor.

Tabelle 1: Übersicht über die Anzahl der vom Lungenkarzinom betroffenen Personen und dem Vorkommen weiterer Tumoren bei bereits publizierten Familien.

Autor	Fallzahl	Zelltyp	Weitere Tumoren	Tumoren in anderen Generationen
Goffman et al., 1982	5/12	Unspezifiziert Großzellig Unspezifiziert Kleinzellig Adenokarzinom	Larynxkarzinom Akute myeloische Leukämie	Leberkarzinom Mammakarzinom Ovarialkarzinom Leberkarzinom Ovarialkarzinom Uterusleiomyom Basaliom/Melanom Glomustumor
	4/12	Undifferenziert Epidermoidkarzinom Anaplastisch Adenokarzinom	Larynxkarzinom Maligner Knochentumor	Karzinom des Kiefers Großzelliges Lungenkarzinom Lungen-Plattenepithelkarzinom/Mammakarzinom Lungen-Adenokarzinom Mammakarzinom Schilddrüsenkarzinom
Paul et al., 1987	3/7	Alveolarzellig in allen drei Fällen	-	-
Brisman et al., 1967	4/8	Plattenepithelial in allen vier Fällen, ein kleinzelliges Zweitkarzinom	-	-
Biran et al., 1991	4/10	Großzellig Schlecht differenziert, ev. kleinzellig Adenokarzinom Plattenepithelial	Hirntumor	-
Joishy et al., 1977	2/2	Alveolarzellig bei beiden eineiigen Zwillingen	-	Zervixkarzinom
Nagy et al., 1968	3/10	Plattenepithelial in allen drei Fällen	Mammakarzinom Genitalkarzinom	-

In der zweiten Familie waren unter elf Geschwistern vier Lungenkarzinome und ein Larynxkarzinom aufgetreten. Die Mutter der Geschwister verstarb an einem Malignom des Kiefers. Ein weibliches Familienmitglied hatte neben dem Lungenkarzinom zusätzlich ein duktales Mammakarzinom. Der Enkel einer Betroffenen erkrankte an einem papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinom (Goffman et al., 1982). Paul et al. berichteten über drei von sieben Geschwistern, die alle an einem Alveolarzellkarzinom erkrankten (Paul et al., 1987). Von Brisman et al. wurde eine schwarze Familie mit acht Geschwistern beschrieben, von denen vier ein Plattenepithelkarzinom der Lunge ent-

wickelten. Die einzige weibliche Betroffene entwickelte zusätzlich ein kleinzelliges Lungenkarzinom (Brisman et al., 1967). Eine 10-köpfige Geschwisterreihe mit vier Lungenkarzinomen ist von Biran et al. dokumentiert worden. Eine Schwester erlag einem nicht spezifizierten Hirntumor, ein Bruder verstarb an einer chronischen Lungenerkrankung (Biran et al., 1991). Joishy et al. beobachteten bei zwei eineiigen Zwillingen ein Bronchialkarzinom. Die Mutter hatte ein Zervixkarzinom (Joishy et al., 1977). Nagy berichtet von drei Lungenkarzinomen unter zehn Geschwistern in der dritten von vier dokumentierten Generationen einer Familie. Eine Schwester verstarb an Brustkrebs, eine andere an einem Genitalkarzinom (Nagy et al., 1968).

1.5 Genetik

1.5.1 Allgemeine Grundlagen der Tumorentstehung

Krebs entsteht, wenn im Körper Zellen maligne transformieren. Das ist der Fall, wenn die Ausgewogenheit der Regelkreise in Zellen in der Art gestört wird, daß Zellen unkontrolliert wachsen. Wenn diese Störungen im Genom stattfinden, können oftmals viele Jahre zwischen dem gesunden Zustand und der Bildung der ersten malignen Zelle und nochmals weitere Jahre bis zum klinischen Ausbruch der Krankheit liegen. Comings stellte 1973 die Hypothese auf, daß jede Zelle multiple, für Transformationsfaktoren codierende Strukturgene enthält. Während diese Strukturgene in bestimmten Stadien der Embryogenese und möglicherweise während mancher Zellzyklusphasen physiologisch aktiv sind, sind sie beim Erwachsenen durch diploide Regulatorgene supprimiert. Die Suppression dieser Transformationsfaktoren ist beim Erwachsenen normal. Der Wegfall eines Regulatorgens kann jedoch eine Zelle von der Wachstumsrestriktion entbinden und ihr somit die Fähigkeit zu unkontrolliertem Wachstum verleihen. Das Gleichgewicht zwischen Strukturgenen und Regulatorgenen kann entweder durch aktivierende Mutationen der Strukturgene oder inaktivierende genetische Läsionen der Regulatorgene gestört werden (Comings, 1973). Heute bezeichnet man die proliferationsfördernden Gene allgemein als Proto-Onkogene, ihre Gegenspieler, die proliferationshemmenden Regulatorgene, als Tumorsuppressorgene (Weinberg, 1991).

1.5.2 Onkogene

In der normalen, nicht transformierten Zelle nehmen die von Comings 1973 als Strukturgene (Proto-Onkogene) bezeichneten Gene an der Wachstumsregulation und der Differenzierung teil. Sie sind ontogenetisch stark konserviert und enthalten die genetische Information für Wachstumsfaktoren (Leal et al., 1985) oder deren Rezeptoren (Downward et al., 1984), für intrazelluläre Übermittler von Wachstumssignalen (Hunter und Sefton, 1980) oder für Transkriptionsfaktoren (Bohmann et al., 1987). Durch qualitative Veränderungen können sie in Onkogene gewandelt werden. Man spricht in diesem Fall von dominanten genetischen Schäden, da Mutationen in nur einem homologen Proto-Onkogen auf funktioneller Ebene zu einem Funktionsgewinn („*gain of function*“) führen. Trotz gleichzeitiger Expression des verbleibenden unveränderten Allels ist dadurch die Möglichkeit der Zelltransformation schon gegeben (Bishop, 1983 und 1991). Diese Veränderungen können aus einer einzigen Punktmutation, die das codierte Protein verändert (Bishop, 1983 und 1991), aus einer Genamplifikation, die zu verstärkter Genexpression führt (Bishop, 1991) oder aus einer chromosomalen Translokation, die das Proto-Onkogen in Nachbarschaft zu einem häufig abgelesenen Gen bringt (Dalla-Favera et al., 1982; Taub et al., 1982; Heisterkamp et al., 1983) resultieren.

1.5.3 Tumorsuppressorgene (TSG)

Die Regulatorgene werden heute in der Regel als Tumorsuppressorgene bezeichnet, da sie in der normalen, nicht entarteten Zelle ein unkontrolliertes Wachstum und somit die Tumorentstehung supprimieren. Zu ihrer Inaktivierung ist der Ausfall der biologischen Funktion der Gene beider homologer Chromosomen notwendig. Man spricht von einer rezessiven Mutation, da sich der Verlust von nur einem der beiden homologen Gene in der Zelle nicht bemerkbar macht, solange noch ausreichende Mengen des Wildtypgenproduktes, codiert durch das nicht geschädigte Allel, vorhanden sind (Knudson, 1971; Comings, 1973). Pathogenetische Bedeutung erlangen Tumorsuppressorgene deshalb erst durch vollständigen Funktionsverlust („*loss of function*“). Eine Mutation oder der Verlust eines Allels führt zur Krebsprädisposition, für die Entwicklung eines Tumors ist jedoch zusätzlich der Verlust des bis dahin verbliebenen normalen Allels notwendig. Eine Ausnahme bilden sogenannte dominant negative Mutationen, bei denen mutierte

Genprodukte die Wildtypgenprodukte inaktivieren und so suggerieren, es handle sich um dominante Onkogene (Herskowitz, 1987; Bishop, 1991). Die Inaktivierung von TSGen wird beispielsweise durch Deletion eines gesamten Chromosoms zum Beispiel durch Nondisjunction, oder durch chromosomale Translokationen hervorgerufen (Bishop, 1991). Funktionell gestützt wird die Hypothese der Tumorsuppression durch Experimente, bei denen die in Tumorzelllinien verlorengangene Funktion der Tumorsuppression wieder supplementiert werden konnte. So entstanden durch Fusion von malignen und nicht-malignen Zelllinien Zellhybride, die ein nicht-malignes Wachstum zeigten. Manche Folgegenerationen konnten aber durch erneute Chromosomenverluste die Malignität wieder zurückgewinnen (Harris et al., 1969; Stanbridge, 1976). In ähnlicher Weise wurde das tumorigene Potential von Zellkulturen auch durch Mikrozelltransfer einzelner Chromosomen unterdrückt (Stanbridge, 1989; Sanchez et al., 1994).

Sowohl zytogenetische Befunde als auch molekulargenetische Untersuchungen an Tumorzellen können auf die Existenz von Tumorsuppressorgenen hinweisen. So werden bei Tumoren häufige, oftmals nicht zufällige Chromosomendeletionen beobachtet, in deren Bereich wahrscheinlich Gene lokalisiert sind, die die Tumorentstehung unterdrücken (Heim und Mitelman, 1989). Ein molekularer Vergleich zwischen Tumor- und Normal-DNA kann den Verlust einer solchen chromosomalen Region als Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) dokumentieren. Ein noch stärkerer Hinweis auf die Rolle von Tumorsuppressorgenen ist der Nachweis homozygoter Deletionen (Cavenee et al., 1983; Wei et al., 1996).

Tumorsuppressorgene werden in einem Zwei-Schritt Mechanismus inaktiviert. Schon in der Keimbahn besteht die Möglichkeit, daß ein Allel bereits mutiert ist. Diese Mutation wurde dann von einem betroffenen Elternteil geerbt oder entstand während der Gametogenese. Die zweite homologe Mutation tritt im Laufe des Lebens als somatische Mutation hinzu. Tumoren, die infolge dieser Kombination von Mutationen entstehen, sind vererbbar. Die zweite Möglichkeit einer Zwei-Schritt Inaktivierung besteht im Erwerb zweier somatischer Mutationen nach der Geburt. (Burch, 1963; Knudson, 1971). In diesem Fall müssen zwei somatische Mutationen als stochastisches Ereignis ein und dieselbe Zelle oder deren Nachfahren treffen, um einen sporadischen Tumor zu verursachen (Abb. 1).

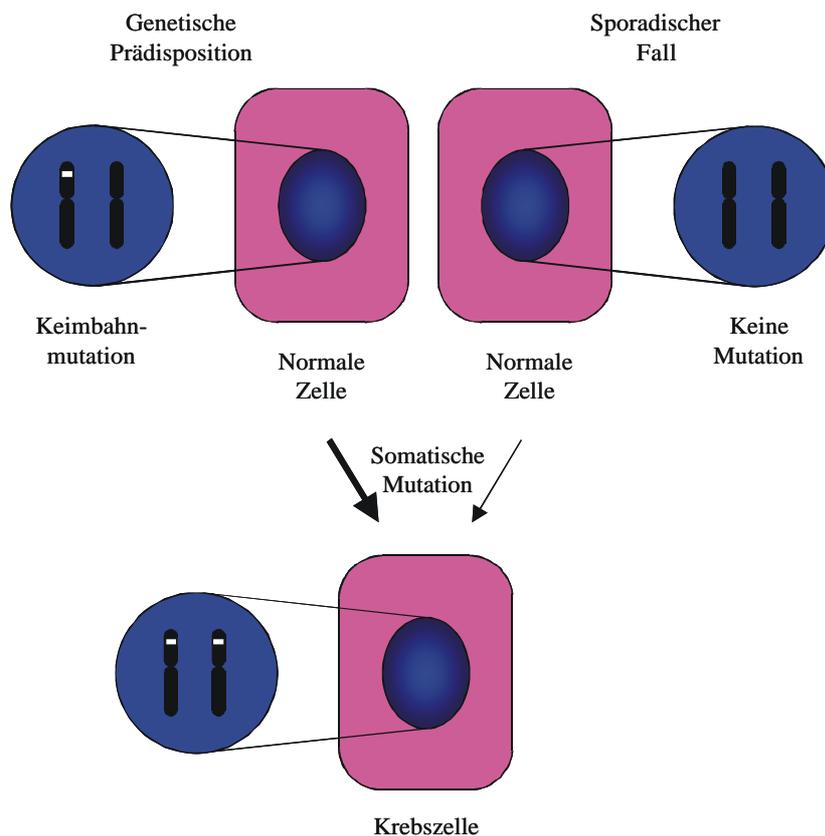


Abbildung 1: Zwei-Schritt-Theorie der Karzinogenese. Bei familiären Tumorerkrankungen wird von einem Elternteil ein inaktiviertes TSG-Allel vererbt. Eine Krebszelle entsteht dann, wenn das zweite Allel durch eine somatische Mutation außer Kraft gesetzt wird. Bei den sporadischen Fällen müssen beide TSG-Allele durch somatische Mutationen inaktiviert werden (Knudson, 1971 und 1989).

Beispiele für bekannte Tumorsuppressorgene sind das *RB*- (Friend et al., 1986; Fung et al., 1987; Lee et al., 1987), das *WT*- (Gessler et al., 1990), das *TP53*- (Malkin et al., 1990) und das *VHL*-Tumorsuppressorgen (Latif et al., 1993).

Übereinstimmend geht man davon aus, daß Krebs in vielen molekularen Schritten entsteht und beispielsweise die alleinige Aktivierung eines Onkogens in der Regel nicht ausreichend ist, einen Tumor hervorzurufen (Land et al., 1983). Vielmehr ist es das Zusammenwirken von zeitlich getrennt stattfindenden und voneinander unabhängigen Einzelmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgen, die zum phänotypischen Vollbild der Erkrankung führen. Entscheidend ist dabei die Anhäufung der Einzelläsionen und nicht eine bestimmte Reihenfolge ihres Auftretens, die die malignen Eigenschaften erzeugt. Solche kumulativen Ereignisse wurden anhand des kolorektalen Kar-

zinoms beschrieben (Fearon und Vogelstein, 1990; Hamilton, 1992). Sie können in der selben Zelle oder in von ihr abstammenden Zellen akkumulieren und gehen mit Initiati-on, Promotion und Progression des Tumorgeschehens einher (Abb. 2).

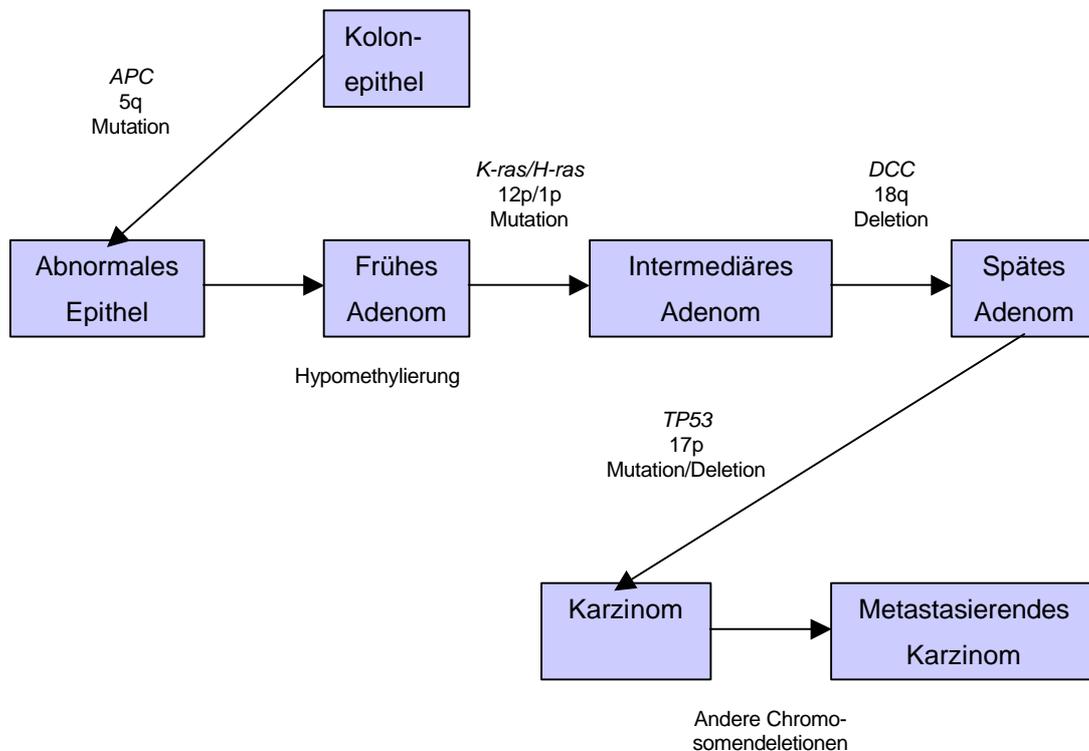


Abbildung 2: Mehrschritt-Theorie der Tumorgenese am Beispiel molekulargenetischer Alterationen in der Adenom-Karzinomsequenz (Fearon and Vogelstein, 1990; Hamilton 1992).

Bezogen auf spezifische Organe ist es jedoch immer der homologe Verlust des gleichen TSGs, der die Tumorkaskade einleitet. Zum Beispiel verursacht der Verlust des *RB*-Gens in retinalen Zellen das Retinoblastom (Friend et al., 1986) und der Verlust des *VHL*-Gens im Nierenepithel das klarzellige Nierenzellkarzinom (Latif et al., 1993, Gnarra et al., 1994, Brauch et al., 2000).

1.5.4 Stand der Erkenntnisse beim Lungenkarzinom

Für das Lungenkarzinom wird ähnlich wie für das kolorektale Karzinom ein Mehrstufenkonzept der Karzinogenese angenommen. Gestützt wird diese Vermutung durch die

Beobachtung von Schleimhautdysplasien einschließlich epithelialer Atypien, dem *Carcinoma in situ* und schließlich dem invasiven Karzinom (Müller und Theile, 1994; Satoh et al., 1997). Einige der molekulargenetischen Veränderungen, die als Voraussetzung für diesen stufenweisen Verlauf gelten, sollen im Folgenden beschrieben werden.

1.5.5 Mutationen des kurzen Arms des Chromosoms 3 (3p)

Chromosomale Deletionen in Tumorzellen gelten als gewichtige Hinweise für die Lokalisation eines für die Tumorgenese kritischen Tumorsuppressorgens (Cavenee et al., 1983; Weinberg, 1991; Kok et al., 1997). Bereits 1982 berichteten Whang-Peng et al. über zytogenetische Untersuchungen, die sie an Zellen von in Kultur genommenem Gewebe kleinzelliger Bronchialkarzinome vornahmen und in denen sie spezifische, von den Tumorzellen erworbene Aberrationen in Metaphasechromosomen feststellten.

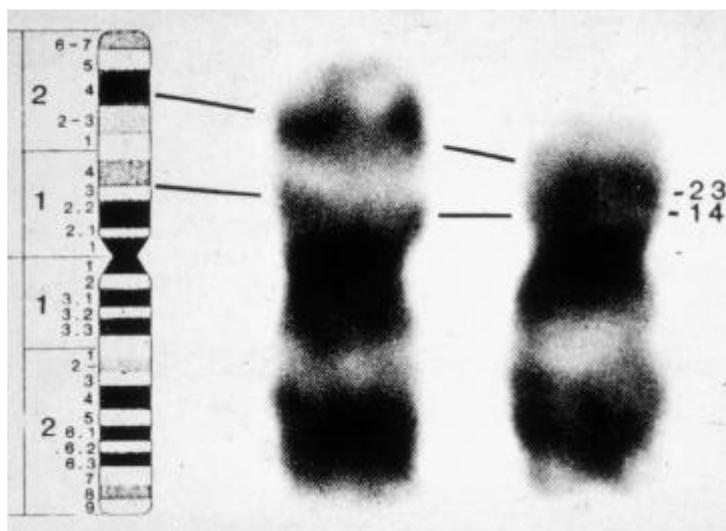


Abbildung 3: Darstellung des Chromosoms 3: Skizze (links) und Chromosomenpräparation (Mitte und rechts) einer SCLC Zelllinie. Der Vergleich der beiden 3p-Homologe zeigt ein normales Chromosom 3 (Mitte) und ein verändertes Chromosom 3 (rechts) mit einer Deletion der Region 3p14-3p23 (Die Abbildung wurde von J. Whang Peng zur Verfügung gestellt).

Obwohl fast alle SCLCs Chromosomenaberrationen zeigten, traten am häufigsten Aberrationen des kurzen Arms des Chromosoms 3 auf. In allen untersuchten Fällen wurden

3p-Deletionen identifiziert, deren kürzeste Überlappungsregion die Region 3p14-3p23 war. In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen hingegen konnten sie keine derartigen Veränderungen feststellen (Whang-Peng et al., 1982) (Abb. 3).

Später gelang auch der karyotypische Nachweis von 3p-Deletionen in NSCLC (Testa und Siegfried, 1992). Daß es sich bei den zytogenetisch ermittelten 3p-Aberrationen tatsächlich um Verluste von DNA-Sequenzen und nicht lediglich um balancierte chromosomale Translokationen handelte, mußte molekulargenetisch durch LOH-Analysen gezeigt werden. Der Vergleich von normalen Zellen und Tumorzellen bestätigte den 3p-Allelverlust bei SCLC und NSCLC (Brauch et al., 1987; Naylor et al., 1987; Rabbits et al., 1990). Kartierungsarbeiten engten die Deletion schließlich auf die Region 3p21-p22 ein und es konnte gezeigt werden, daß 100% der SCLC-Zelllinien, >90% der NSCLC-Zelllinien sowie über 90% der frisch mikrodisektierten primären Lungenkarzinome Allelverluste in diesem Bereich aufweisen (Brauch et al., 1987; Kok et al., 1987; Brauch et al., 1990; Sundaresan et al., 1992; Hibi et al., 1992; Thiberville et al., 1995; Buchhagen, 1996).

Untersuchungen an einer Mensch-Maus-Hybrid-Zelllinie stützten den Verdacht, daß die 3p21-Region ein kritisches Tumorsuppressorgen enthalten könnte. Der Transfer eines zwei Megabasen großen DNA-Fragments aus der 3p21-Region konnte die Tumorigenität der ursprünglichen Maus-Fibrosarkom-Zelllinie reduzieren (McNeill Killary et al., 1992). Ähnliche Ergebnisse wurden in Chromosomentransferexperimenten erzielt (Sato et al., 1993). Die in dieser Region bereits bekannten Gene und ihre mögliche Rolle für das Lungenkarzinom sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Neuere molekulargenetische Untersuchungen bekräftigten die mögliche Rolle von 3p-Loci beim Lungenkarzinom, nachdem schon in Hyperplasien und prämaligen Läsionen molekulargenetisch ein 3p-Verlust dargestellt wurde (Sundaresan et al., 1992; Gazdar et al., 1994; Hung et al., 1995; Sozzi et al., 1995). Weitere Fortschritte hin zur Identifizierung eines relevanten Lungenkarzinomgens wurden durch die Identifizierung homozygoter Deletionen in den Bereichen 3p21-22 und 3p14.2 erzielt (Rabbits, 1990; Yamakawa et al., 1993; Daly et al., 1993; Kok et al., 1994; Todd et al., 1997; Fong et al., 1997; Virmani et al., 1998). Die Untersuchung bekannter Gene in 3p21 auf eine mögliche Bedeutung für das Lungenkarzinom blieb bisher ohne Erfolg (Kok et al., 1997).

Tabelle 2: Bekannte, beim Lungenkarzinom häufig deletierte Gene auf Chromosom 3 in der Region 3p14-22.

Gen	Lage	Funktion und Bedeutung bei Tumoren	Bedeutung für das Lungenkarzinom
hMLH1-Gen	3p21-p23	„mismatch repair“ Gen, verantwortlich für Mikrosatelliteninstabilitäten; Mutationen dieses Gens finden sich v. a. bei sporadischen kolorektalen Tumoren und beim hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)	Mikrosatelliteninstabilitäten sind selten
TGF- β Typ II Rezeptor-Gen	3p22	Kodiert für den Typ II Serin-Threonin Kinase-Rezeptor; Mutationen häufig in Zellen mit defekten mismatch repair Genen	unbekannt
THRB-Gen	3p21	Kodiert für den Thyroid Hormon Rezeptor β	z.T. kein Verlust der Heterozygotie
RARB-Gen	3p21	Kodiert für den Retinoid Säure Rezeptor β	unterschiedliche Expression; keine signifikant häufige Inaktivierung durch homologe somatische Ereignisse bekannt
MST1	3p21	Kodiert für makrophagenstimulierendes Protein, das vor allem in der Leber exprimiert wird	kein relevantes TSG
APEH	3p21.3	Kodiert eine Acylpeptidhydrolase, die N-terminal acylierte Aminosäuren von acylierten Proteinen oder Peptiden spaltet	wird beim Großteil der SCLC normal exprimiert
ACY1	3p21.1	Kodiert für eine Aminosäureacylase, hydrolysiert von N-terminal acylierte Aminosäuren	normale Expression des Enzyms in NSCLC und ca. der Hälfte der SCLC
ARP	3p21	Kodiert für ein ubiquitär exprimiertes argininreiches Protein	keine funktionelle Rolle für die Tumorentstehung nachgewiesen
UBE1L	3p21	zu 45% identisch mit dem humanen ubiquitin-aktivierenden Enzym E1, das intrazelluläre Proteine mit Ubiquitin markiert, damit sie degradiert werden können	zeigt von allen Genen auf 3p21 die stärkste Expressionsminderung beim Lungenkarzinom, jedoch keine Mutationen im verbleibenden Allel bei 15 SCLC-Zelllinien in einer Studie
UNPH	3p21.3	kodiert für Ubiquitinprotease; homologes nukleäres Protein bei Nagern, das bei Überexpression zu onkogener Transformation durch verminderte Degradierung zellulärer Proteine führt	beim SCLC und beim Adenokarzinom überexprimiert
CTNNB1	3p21	humanes β -catenin-Gen; möglicherweise zentrale regulatorische Rolle bei der Zelladhäsion und Tumorprogression; verminderte Expression in über 50% der Ösophagus-, Magen- und kolorektalen Karzinome	Nachweis einer möglichen Rolle als TSG fehlt
α RLC	3p21	kodiert für die α -Untereinheit des Integrins; homozygote Deletionen sind berichtet	wird beim Lungenkarzinom vermehrt exprimiert

Tabelle 2: Bekannte, beim Lungenkarzinom häufig deletierte Gene auf Chromosom 3 in der Region 3p14-22 (Fortsetzung).

Gen	Lage	Funktion und Bedeutung bei Tumoren	Bedeutung für das Lungenkarzinom
GNAT1/ GNAI2	3p21.3	kodieren für zwei Guaninnukleotid-bindende Proteine; <i>retinal specific α-transducing polypeptide 1</i> (GNAT1) und <i>α-transducing polypeptide 2</i> (GNAI2)	homozygote Deletionen beim SCLC sind bekannt; die Region überlappt mit der TSG-Aktivität
3pK	3p21	kodiert für eine Proteinkinase; homozygote Deletionen bekannt	ist nicht in einem tumorsupprimierenden Fragment enthalten
SEMA-III/F und SEMA-A	3p21	Kodieren für zwei Semaphoringene; enthalten in homozygot deletierten Fragmenten; involviert in die Zell- zu Zell-Kommunikation	kausale Rolle für das Lungenkarzinom unwahrscheinlich
SKMc15	3p21.3	Homologien zu <i>immediate early response</i> Genen, PC4 und TIS7, von Nagern	in SCLC konnten keine inaktivierenden Mutationen gefunden werden
Putatives Telomerase-Repressor-Gen	3p14.2-p21.1	Unterdrückung der Telomeraseaktivität durch Transfer subchromosomaler Fragmente des Chromosoms 3 und damit Wiederherstellung des Alterungsprozesses in Zelllinien von Nierenkarzinomen	Nachweis der Zellalterung in einer Adenokarzinom-Zelllinie nach Chromosom 3-transfer trotz weiterhin nachweisbarer Telomeraseaktivität

(Leduc et al., 1989; Cook et al., 1993; Carritt et al., 1992; Kok et al., 1993; Papadopoulos et al., 1994; Latif et al., 1997; Kok et al., 1997; Cook et al., 1998; Tanaka et al., 1998).

Aus diesem Grund wurde damit begonnen, die kritischen Regionen der homozygoten Deletionen mit Hilfe molekulargenetischer Klonierungs- und Kartierungsverfahren (Contig-Mapping) systematisch auf neue Gene hin zu untersuchen. Wei et al. konstruierten ein 700 kb-Klon contig, bestehend aus 23 Cosmiden und einem P1-Phagen, das die homozygote Deletionen in der Region 3p21.3 umspannt. Diese homozygoten Deletionen wurden ursprünglich in den drei SCLC-Zelllinien NCI-H740, NCI-H1450 und GLC20 identifiziert (Daly et al., 1993; Kok et al., 1994). Ihre kleinste gemeinsame überlappende Region umfaßt 370 kb und ordnet das fragliche relevante Lungenkarzinomgen dieser Region zu. Aus der Region sind bereits die folgenden 17 Gene bekannt: *3pk*, *PL6*, *101F6*, *BLU2*, *123F2*, *fus1*, *LuCa-2*, *LuCa-1*, *fus2*, *SkMc15*, *Sema A(V)*, *GNAI-2*, *GNAT-1*, *Sema IV*, *7KASH2*, *Gene 15* und *Gene 16*. (Wei et al., 1996). Ihre mögliche Bedeutung für das Bronchialkarzinom wird gegenwärtig untersucht.

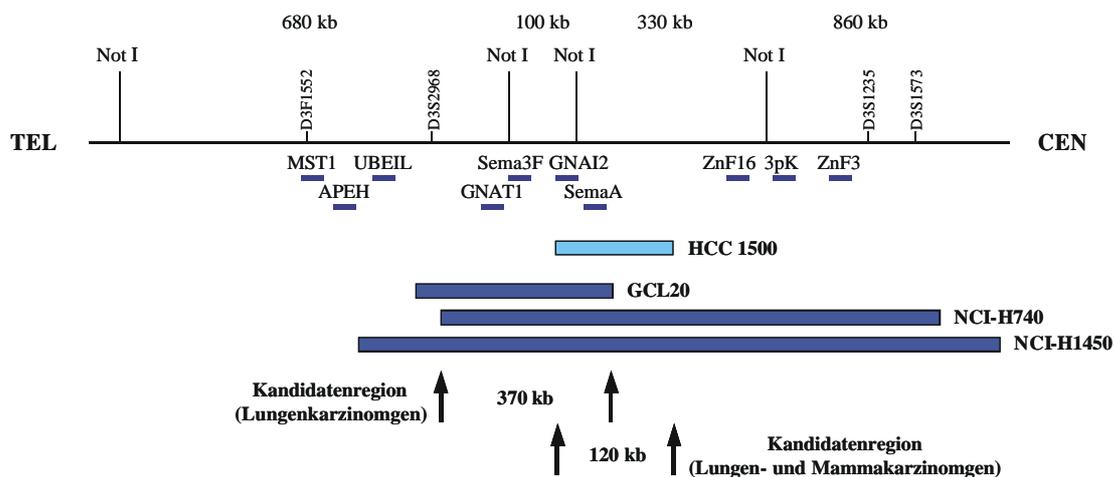


Abbildung 4: Schematische Darstellung homozygoter Deletionen in den SCLC-Zelllinien GCL20, NCI-H740 und NCI-H1450 (dunkelblaue Balken) sowie des Mammakarzinoms HCC1500 (hellblauer Balken) im Vergleich zu einer 3p21.3-Karte mit bekannten Genloci, NotI-Schnittstellen und 3p-Markern (Kok et al., 1994; Wei et al., 1996; Sekido et al., 1998). Die Orientierung ist vom Telomer (TEL, links) zum Centromer (CEN, rechts). Die kleinste überlappende Region beträgt 120 kb. Bekannte Gene in dieser Region sind *LUCA1*, *LUCA2*, *fus1*, *123F2*, *BLU2*, *101F6*, *PL6* (Wei et al., 1996) und *Gen 26* (Sekido et al., 1998).

Auch Sekido et al. beschrieben eine ca. 220 kb umfassende homozygote Deletion in einer Mammakarzinomzelllinie und dem primären Mammakarzinom (Sekido et al., 1998). Dieser Bereich überlappt mit dem der homozygoten Deletion der drei SCLC-Zelllinien. Ein Vergleich der Abmessungen der Deletionen engt die wahrscheinlich Tumorsuppressorgen-relevante Region jetzt auf 120 kb ein, in der nur noch acht der bisher identifizierten Gene liegen. Diese sind *LUCA1*, *LUCA2*, *fus1*, *123F2*, *BLU2*, *101F6*, *PL6* und *Gen 26* (Sekido et al., 1998) (Abb. 4).

1.5.6 Mutationen anderer Chromosomen und Gene

Lungenkarzinome zeigen außer den Chromosom 3-Aberrationen häufig zusätzliche Veränderungen. Chromosomale Regionen in denen sowohl beim SCLC als auch beim NSCLC häufig LOHs auftreten sind 1p, 3p, 4q, 4p, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 11p, 13q, 14q, 16p, 17p, 17q, 18q und 22q. Beim SCLC können außerdem 15q und beim NSCLC 1q, 2q, 11q, 12p, 19p, 19q, 21q und X betroffen sein (Virmani et al., 1998). Für Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome wurde gezeigt, daß in 30% der Fälle nur die vier

Chromosomenarme 3p, 8q, 9p und 17p betroffen waren. Insgesamt zeigten Plattenepithelkarzinome mehr LOHs als die Adenokarzinome. Weitere von LOHs betroffene Regionen beim Plattenepithelkarzinom waren 3q, 4q, 7p, 9q, 13q, 16q und 21q (Sato et al., 1994).

Mutationen im *TP53*-Gen in 17p werden beim SCLC in 75% und beim NSCLC in 45% der Fälle beobachtet (Chiba et al., 1990; Takahashi et al., 1991; Sundaresan et al., 1992). Dabei entfallen 50% auf G zu T Transversionen. Beim SCLC werden des weiteren A zu G Transversionen beobachtet (Chiba et al., 1990; Takahashi et al., 1991). Plattenepithelkarzinome zeigen schon im Stadium der leichten Dysplasie und des Carcinoma in situ eine vermehrte Expression des p53-Proteins während dies bei den anderen Tumortypen erst mit den fortgeschrittenen Stadien assoziiert ist (Sozzi et al., 1992; Sundaresan et al., 1992; Bennett et al., 1993; Rusch et al., 1995; Satoh et al., 1997).

Beim SCLC treten *TP53*-Mutationen und 17p-LOH schon frühzeitig im Stadium *limited disease* auf (Yokota et al., 1987; Takahashi et al., 1991). Nach *TP53*-Gentransfer in NSCLC kann es zur teilweisen Tumorregressionen kommen, was die Bedeutung des *TP53* für das Lungenkarzinom unterstreicht (Roth et al., 1996 b).

In ähnlicher Weise zeigen die meisten SCLC und einige NSCLC schon vor Metastasensetzung LOH der Rb-Region in 13q14 (Yokota et al., 1987). Mutationen in *Rb* und *TP53* wurden mit der Prognose des Lungenkarzinoms korreliert. Eine schlechtere Überlebensrate zeigen jene Patienten, die entweder eine Überexpression von mutiertem p53-Protein oder eine verminderte Expression von Rb-Protein aufweisen. Die schlechteste Prognose haben Patienten, die beide Veränderungen haben, jedoch finden sich hier widersprüchliche Ergebnisse (Xu et al., 1994; Carbone, 1997).

Andere möglicherweise relevante Chromosomenorte sind in 9p21-22 mit dem *p16^{INK4}*-Gen (Olopade et al., 1993; Merlo et al., 1994; Kishimoto et al., 1995; Virmani et al., 1998), in 5q21 mit dem *MCC*-Gen und dem *APC*-Gen (D'Amico et al., 1992), in 11p15.5 mit dem *p57KIP2*-Gen (O'Briant und Bepler, 1997), und in 18p11.3 mit dem *DAL-1*-Gen (Tran et al., 1999).

Zu den Onkogenen, deren Aktivierung in Bronchialkarzinomen nachgewiesen wurde, gehört die *c-erbB*-Familie, *c-myb*, Mitglieder aus der *myc*- und *ras*-Familie, *c-raf*, *v-src*, *v-abl* und *v-sis* (Lorenz, 1994; Carbone, 1997). Als eine häufige und frühe genetische Veränderung konnten *K-ras*-Mutationen sowohl beim SCLC als auch beim NSCLC

nachgewiesen werden (Koutselini et al., 1990; Dragani et al., 1995; Cooper et al., 1997). In der Regel treten diese Mutationen später als die 3p-Deletionen auf (Kishimoto et al., 1995; Hung et al., 1995) und spielen möglicherweise spät in der Tumorprogression eine Rolle (Little et al., 1983; Nau et al., 1985; Yokota et al., 1987). Wachstumsfaktoren wie EGF und EGF-Rezeptoren, die von *c-erb-B1* und *c-erb-B2* (auch *HER-2/neu*) kodiert werden spielen möglicherweise beim Plattenepithelkarzinom und *Gastrin releasing peptide* (GRP), *Insulin like growth factor* (IGF) und IGF-1-Rezeptoren sowie transferrinähnliche Wachstumsfaktoren beim SCLC eine Rolle (Zöchbauer et al., 1994; Carbone, 1997).

2. Zielsetzung

Das Bronchialkarzinom ist eines der häufigsten Malignome in den industrialisierten Ländern einschließlich Deutschland. Dies betrifft sowohl die Neuerkrankungsrate als auch die durch Malignome verursachten Todesfälle. Obwohl gerade in der Krebsursachenforschung im vergangenen Jahrzehnt bemerkenswerte Fortschritte erzielt wurden, gehört das Bronchialkarzinom nicht zu den Tumoren mit erkannten genetischen Ursachen. Eine Reihe genetischer Studien entdeckten zwar schon in den achtziger Jahren, daß das Chromosom 3 eine besondere Rolle spielen muß, und in jüngster Zeit wurden sogar homozygote 3p-Deletionen kartiert und kloniert mit dem Ziel, die darin enthaltenen Gene und ihre Bedeutung für das Bronchialkarzinom aufzuklären, bislang blieb jedoch ein Erfolg hinsichtlich der Identifizierung eines relevanten Gens aus. Vergleicht man die Situation und die Voraussetzungen mit den Erfolgen, die der Identifizierung der Gene für das Retinoblastom (*RB*), das Nierenzellkarzinom (*VHL*) und dem Darmkrebs (*APC*) zugrunde lagen, so wird klar, daß diese nur mit Hilfe von Tumorfamilien identifiziert werden konnten.

Familiäre Formen des Bronchialkarzinoms sind sehr selten und in der Literatur nur vereinzelt beschrieben. Ein Nutzen für die Identifizierung eines Bronchialkarzinomgens konnte daraus noch nicht gezogen werden. Die Identifizierung neuer belasteter Familien, die Kenntnis von Stammbauminformationen, Krankengeschichten und der Einfluß von möglichen Risikofaktoren sowie die Verfügbarmachung biologischen Materials möglicherweise belasteter Familien könnte dieser Forschungsrichtung einen neuen Schub verleihen.

In dieser Arbeit wird eine Familie mit einer auffälligen familiären Häufung des Bronchialkarzinoms beschrieben. Zielsetzung dieser Arbeit ist es, diese Familie hinsichtlich ihrer Familien- und Krankenamnesen, Rauchergewohnheiten und möglichen beruflichen Belastungen zu erfassen und zu dokumentieren. Darüber hinaus sollen durch die Gewinnung und Asservierung konstitutionellen biologischen Materials belasteter und gesunder Familienmitglieder zukünftige molekularbiologische Untersuchungen ermöglicht werden. Es sollen in Kooperation mit dem *National Cancer Institute* in Frederick/USA erste molekularbiologische Untersuchungen an dort neu identifizierten Genen in der für das Lungenkarzinom kritischen 3p21.3-Region durchgeführt werden.

Folgende Arbeitsschritte sollen durchgeführt werden:

- An der Technischen Universität München soll ein Ethikvotum zur Erfassung, Beschreibung und Gewinnung biologischen Materials und der Durchführung künftiger molekularer Analysen eingeholt werden.
- Es sollen die lebenden und an der Studie teilnehmenden Mitglieder der Familie besucht, über die Studie aufgeklärt und ihre Krankengeschichte sowie ihr Verwandtschaftsgrad zu einem am Bronchialkarzinom erkrankten Familienmitglied, ihr Rauchverhalten und ihre möglichen beruflichen Belastungen anhand eines Fragebogens erfaßt werden.
- Auf der Basis dieser Angaben sowie den zusätzlichen Informationen über die Verstorbenen oder anderweitig nicht zur Verfügung stehenden Personen, die von einem verantwortlichen Familienmitglied ergänzt werden, soll der Stammbaum erstellt und die Familienmitglieder in erkrankte und nichterkrankte Personen unterschieden werden.
- Für die Patienten sollen relevante Informationen hinsichtlich des histologischen Typs des Tumors sowie die jeweiligen Krankheitsverläufe anhand der Krankenakten erfaßt werden.
- Es soll die Grundlage zur Erfassung neuer Fälle in der noch nicht belasteten Generation der Kinder geschaffen werden.
- Es soll biologisches Material von den Familienmitgliedern in Form von DNA und B-Zellen (permanente DNA-Quelle) isoliert und asserviert werden.
- Es sollen erste Mutationsanalysen an neu charakterisierten Genen in der kritischen 3p21.3-Region durchgeführt werden. Als mögliche positive Kontrollen werden Zelllinien von Lungenkarzinomen und Zervixkarzinomen mitanalysiert.
- Die gewonnenen neuen Informationen sowie das biologische Material sollen in künftigen Analysen zur Identifizierung eines relevanten Bronchialkarzinomlokus genutzt werden können.

Folgende Fragen sollen geklärt werden:

- Wie viele gesicherte Fälle eines Bronchialkarzinoms liegen vor ?
- Liegt bei der untersuchten Familie eine familiäre Bronchialkarzinomerkrankung vor ?
- Wie viele und welche anderen Malignome kommen bei den Erstgradverwandten vor ?
- Spielen andere als familiäre Faktoren für die aufgetretenen Fälle von Bronchialkarzinomen eine Rolle ?
- Handelt es sich bei den Familienmitgliedern um verwandte Personen im Sinne einer Erstgradverwandtschaft ?
- Kann biologisches Material sowohl von Patienten als auch gesunden Personen sowohl in der betroffenen als auch der noch nicht betroffenen Generation (deren Kinder) gewonnen werden ?
- Lassen sich in der konstitutionellen DNA der Patienten Mutationen in neu charakterisierten 3p21.3-Genen nachweisen ?
- Weisen diese Gene Mutationen in der DNA von Lungen- oder Zervixkarzinomen auf ?

3. Material und Methoden

3.1 Ethikvotum

Zur Durchführung der Studie wurde im Februar 1996 ein Antrag an die Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer zur Genehmigung der Durchführung der Studie eingereicht.

Neben dem Formantrag wurden eine kurze Darstellung der Studie, ein Informationsschreiben und eine Einwilligungserklärung für die Studienteilnehmer vorgelegt. Diese Unterlagen sind im Anhang dieser Arbeit beigelegt. Dem Antrag wurde im gleichen Monat entsprochen.

3.2 Patientenaufklärung und Einverständniserklärung

Alle Patienten und Familienangehörige über 18 Jahre wurden von der Familienkontaktperson 11.0 zunächst angesprochen und über die Studie informiert. Nachdem die Familienangehörigen der Kontaktperson ihre Zustimmung zur Teilnahme erteilt hatten, wurden sie über die Abteilung Thoraxchirurgie (Klinikum rechts der Isar) direkt kontaktiert und das Informationsschreiben wurde ihnen übersandt. Es wurde über die Kontaktperson ein gemeinsamer Termin zur Unterzeichnung der Einverständniserklärung und zur Blutabnahme vereinbart.

Die einzige teilnehmende minderjährige Person wurde von den Eltern sowie durch ihre eigene Unterschrift vertreten.

3.3 Interview

Die Familienangehörigen wurden einzeln im persönlichen Gespräch anhand eines ausgearbeiteten Erhebungsbogens befragt. Der Erhebungsbogen wurde von Priv. Doz. Dr. Thomas Brüning, Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, ausgearbeitet und für diese Studie zur Verfügung gestellt. Der Erhebungsbogen ist ebenfalls im Anhang dieser Arbeit beigelegt.

Der Erhebungsbogen wurde als Instrument zur standardisierten Erfassung von Risikofaktoren beim Bronchialkarzinom, dem individuellen Lebensstil, Umweltfaktoren, Lebensraum und erblichen Faktoren benutzt. Mit Hinsicht auf die Risikofaktoren wurden

neben der Erfassung einer erblichen Belastung die Schwerpunkte insbesondere auf Berufszweige mit erhöhtem Risiko, Gefahrenstoffe und Rauchgewohnheiten gesetzt. Der Raucherstatus wird allgemein durch die Anzahl der „Pack-years“ beschrieben. Das ist die Anzahl der pro Tag gerauchten Zigaretenschachteln multipliziert mit der Anzahl der Jahre in denen diese Menge geraucht wurde.

Von der minderjährigen Person wurde die Familienanamnese durch die Eltern dokumentiert.

3.4 Studienteilnehmer und Proben

3.4.1 Patienten und Personen

Es wurden 25 Mitglieder einer Familie mit häufigem Lungenkarzinom rekrutiert und in die Studie eingeschlossen. Der Familienstammbaum konnte für vier Generationen (Abb. 5) konstruiert werden. Die rekrutierten Personen sind lebende Mitglieder der dritten und vierten Generation.

Ebenso wurde ein 33 Jahre alter, nicht verwandter Patient mit einem Adenokarzinom in die Studie eingeschlossen. Der Patient sollte im Rahmen der Studie in die molekularbiologischen Analysen mit eingehen, da sein frühes Erkrankungsalter auf eine mögliche genetische Prädisposition hinweisen könnte.

3.4.2 Karzinomzelllinien

Es wurden ebenso eine Reihe von Tumorzelllinien für die molekularbiologische Analyse vorbereitet. Sie wurden am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg etabliert und als DNA-Quellen für diese Studie zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien waren: LX-1 (Lungenkarzinom), A427 (Lungenkarzinom), A549 (Lungenkarzinom), LUTCML-54 (Lungenkarzinom), Calu-6 (Adenokarzinom der Lunge), LXF289 (Adenokarzinom der Lunge), RPMI2650 (Plattenepithelkarzinom der Lunge), SK-MES-1 (Plattenepithelkarzinom der Lunge), H-Messo-1 (Mesotheliom, Lunge). Alle Lungenkarzinomzelllinien wurden von der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg erhalten. Die Zervixkarzinomzelllinien waren: Hela, MRI-H186, MRI-H215, Caski, SW 756, Ca-1 und Sitta. Diese Zelllinien wurden von Herrn Prof. zur Hausen (DKFZ) zur Verfügung gestellt.

3.5 Entnahme von Vollblut

Bei der Blutabnahme wurden insgesamt 30 ml heparinisiertes Blut in drei 10 ml-NH₄-Heparin-Monovetten (Sarstedt) aus einer Armvene entnommen. Davon wurden 10 ml direkt für die Gewinnung genomischer DNA weiterverarbeitet und 20 ml wurden für die Etablierung von B-Zellkulturen eingesetzt.

3.6 Etablierung von B-Zell-Kulturen

Alle Arbeiten mit vitalen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.6.1 Gewinnung von EBV-Virus für die Transformation

Für die Immortalisierung der Zellen der an der Studie teilnehmenden Familienmitglieder wurde der Umstand ausgenutzt, daß das Epstein-Barr-Virus (EBV) selektiv menschliche und Primaten B-Lymphozyten zu sich kontinuierlich teilenden Zellen transformieren kann (Werner et al., 1972; Miller und Lipman, 1973; Rabin et al., 1978; Rickinson, 1984). Obwohl sich das Virusgenom in die DNA der Gastzelle einbauen kann persistiert es in den meisten Zellen mit 5-800 Kopien pro Zelle (Sudgen et al., 1979; Yates et al., 1984). Transformierendes Virus kann leicht im Zellkulturüberstand infizierter Zellen gewonnen werden. Klassischerweise wird für die Transformation humaner Lymphozyten eine lymphoblastoide Marmoset Zelllinie B95-8 verwendet, die ursprünglich durch Infektion der Marmoset-Lymphozyten mit EBV eines an infektiöser Mononukleose erkrankten Patienten hergestellt wurde.

Der EBV-enthaltende Zellkulturüberstand für die Transfektion und Immortalisierung von B-Lymphozyten der Blutspender wurde nach den Empfehlungen von Neitzel hergestellt (Neitzel, 1986). Die EBV-produzierende Zelllinie B95-8B (*Marmoset*) (Baer et al., 1984) wurde von Frau Dr. Sabine Klauck, DKFZ Heidelberg erhalten.

Die in Suspension wachsenden B95-8-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (T400; Nunc) über mehrere Wochen in RPMI 1640 (Gibco BRL) mit Zusätzen von 20% fötalem Kälberserum (Gibco BRL) und 4 mM L-Glutamin (Gibco BRL) expandiert. Dabei wurde das Medium nicht ausgetauscht sondern nach Verbrauch immer wieder durch Zusatz neuen Mediums mit neuen Nährstoffen angereichert und die Kultur so auf ein

größeres Volumen expandiert. Nachdem die Zellen in ca. 250 ml dicht gewachsen waren, wurde das Medium noch ca. eine Woche lang unverändert belassen. Die Zellen wurden dann zunächst in 50 ml Zentrifugengefäßen (Greiner) für 5 Minuten bei 1500 U/min (Beckmann) abzentrifugiert und der Überstand durch einen 0.45 µm Membranfilter (Nalgene) sterilfiltriert. Dieser Filtrationsschritt soll gewährleisten, daß in der EBV-Suspension keine Marmoset Zellen mehr vorhanden sind und so eine spätere Kontamination der humanen Zellen verhindert wird. Die EBV-enthaltende Suspension wurde in 2.0 ml Portionen in 2.0 ml Kryoröhrchen (Greiner) bei 4°C gelagert. Für die Transformation von 10^6 - 10^7 Lymphozyten wurden 2.0 ml dieses Überstandes eingesetzt.

3.6.2 EBV-Transformation der Lymphozyten

Zwei 10 ml-Blutproben wurden in parallelen Ansätzen verarbeitet. In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) wurden 12,5 ml Lymphozytentrennmedium (Gibco BRL) vorgelegt und mit 10 ml Blut überschichtet. Zur Gewinnung der B- und T-Lymphozyten wurde bei 3000 U/min in einer Zentrifuge GS6R (Beckman) für acht Minuten bei 18°C zentrifugiert. Während dieser Zentrifugation wurde das Serum von den zellulären Bestandteilen des Blutes getrennt. Während die Erythrozyten vom Trennmedium aufgenommen wurden setzten sich die Lymphozyten als feine helle Zwischenschicht auf dem Trennmedium ab. Mit Hilfe einer sterilen Pipette wurden sie abgesaugt und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt. Die Lymphozyten wurden zunächst in 2 ml Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung, die Kalzium und Magnesium enthielt (PBS; Gibco BRL), resuspendiert, dann mit dem selben Medium auf 50 ml aufgefüllt und schließlich für 15 Minuten bei 18°C und 1000 U/min (1.011g) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal mit 30 ml Hanks' gepufferter Salzlösung, die ebenfalls mit Kalzium und Magnesium versetzt ist (HBSS; Gibco BRL), wiederholt.

Die gewaschenen Lymphozyten wurden in 2 ml Kulturmedium RPMI (mit 15% FCS, 4 mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin; Gibco BRL) aufgenommen und mit 2 ml einer EBV-Suspension (3.5.1) versetzt. Dann wurden sie für 90 Minuten im mit 5% CO₂ begasten Zellkulturschrank bei 37°C inkubiert, wobei alle 20 Minuten die sedimentierten Zellen vorsichtig aufgeschüttelt wurden. In je zwei T25-Zellkulturflaschen

(Nunc) wurden 3 ml Kulturmedium vorgelegt und je die Hälfte (2 ml) der inkubierten Zellsuspension sowie 5 µl einer Cyclosporin A-Lösung (Sigma) zugegeben.

Die Zugabe von Cyclosporin, einem aus Pilzen gewonnenen Immunsuppressivum, ist zur Abtötung der in der Kultur vorhandenen T-Zellen erforderlich. Werden die T-Zellen nicht entfernt, so kommt es zwar zu Beginn der Transformation zur kontinuierlichen Vermehrung der B-Zellen, es tritt dann aber besonders bei den Zellen seropositiver Personen vermehrt Zelltod und Regression ein (Brack et al., 1984; Krönke et al., 1984).

3.6.3 Kultivierung der B-Lymphozyten

Für die Kultivierung der B-Zellen wurden die Zellkulturflaschen aufrecht in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gestellt. Der Gasaustausch erfolgte über luftdurchlässige Schraubdeckel. Nach sieben bis vierzehn Tagen begannen sich in den meisten Kulturen die B-Zellen zu vermehren, die unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 10-facher Vergrößerung als helleuchtende zusammenhängende Zellballen zu erkennen waren. Die Vitalität der Zellen und erfolgreiche Transformation ist an einer Vergrößerung der Lymphozyten zu erkennen. Die Zellen sind nicht komplett rund sondern zeigen eher eine kleine zapfenförmige Ausstülpung und sie neigen dazu, miteinander zu aggregieren.

Der pH-Abfall und somit der Verbrauch des Kulturmediums während des Zellwachstums wurde durch Indikatorumschlag von rot nach gelb angezeigt. In diesem Fall wurde frisches Medium zugegeben und bei Bedarf die Zellen in größere T150-Kulturflaschen (Nunc) überführt. In den größeren Flaschen, d. h. nach hinreichender Vermehrung der Zellen, erfolgte die Zugabe von neuem Medium, nachdem ca. die Hälfte des alten Mediums abgenommen und verworfen wurde. Somit war gewährleistet, daß den Zellen immer noch genügend der von ihnen selbst produzierten Wachstumsstoffe zur Verfügung standen. Für die DNA-Isolierung und Asservierung der Zellen wurde jede Zelllinie auf mindestens fünf T150-Kulturflaschen expandiert. Nach vier bis acht Wochen hatten sich die B-Zellen zu zusammenhängenden schwimmenden Zellklonen vermehrt, die den Kulturflaschenboden in einer nahezu lückenlosen Schicht bedeckten.

3.6.4 Einfrieren der Zellen

Für die Asservierung der B-Zellen wurden die Zellen von vier T150 Kulturflaschen (Nunc) in Einfriermedium gebracht und auf -80°C bzw. in flüssigen Stickstoff für die Langzeitlagerung überführt. Dazu wurden die gezüchteten Zellen zusammen mit dem Medium in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 800 U/min (0.809 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die sedimentierten Zellen gewaschen indem sie zunächst in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und dann wieder auf 50 ml aufgefüllt wurden. Dieser Zentrifugierschritt wurde wiederholt und die Zellen anschließend in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann zu gleichen Teilen (mindestens 1×10^7 Zellen pro Aliquot) auf zwei 2.0 ml Kryoröhrchen (Greiner) überführt, in die bereits jeweils 1.0 Einfriermedium vorgelegt waren. Die Gefäße wurden steril verschraubt und die Röhrchen mehrfach geschwenkt um eine gute Durchmischung von Zellen und Einfriermedium zu erreichen. Zunächst wurden die Zellen auf Eis vorgekühlt, dann für 10 Minuten bei -20°C vorgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

3.7 Isolierung von DNA

Genomische DNA wurde aus Vollblut und den *in vitro* B-Zell-Kulturen gewonnen.

3.7.1 Lyse der Zellen aus Vollblut

Die Lyse von Blutzellen wurde durch Vermischen von 10 ml heparinisierten Blutes und 40 ml Zellysepuffer, der auf 4°C vorgekühlt war, in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) durchgeführt. Die vollständige Lyse der Blutzellen konnte man an der Veränderung der Farbe und der Konsistenz des Blut-Zellysepuffergemisches erkennen. Aus der hellroten und nicht durchsichtigen Zellsuspension entstand eine dunkelrote, jetzt durchsichtige Lösung. Nach der Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 3000 U/min in der Beckmann Zentrifuge GS6R wurde der Überstand abgegossen und das Sediment noch einmal in 2 ml Zellysepuffer desaggregiert. Die Lyse wurde zur Vervollständigung und zum Waschen mit weiteren 50 ml Zellysepuffer wiederholt. Nach Zentrifugation und Dekantieren war am Boden des 50 ml Gefäßes ein opakes weißes „Plättchen“ zurückgeblieben, das hauptsächlich aus Zellkernen und einigen Thrombozyten bestand.

Diese Zellkerne wurden in 4,5 ml Zellkernfällungspuffer in Suspension gebracht, mit 0,5 ml 10%igem Natriumdodecylsulfat (SDS; Eurobio) und 0,4 ml Proteinase K (10mg/ml; Boehringer Mannheim) versetzt und für ca. 16 Stunden im Wasserbad bei 48°C zur Freisetzung der DNA aufgeschlossen. Die Lösung zeichnete sich danach durch erhöhte Viskosität und ein klares Aussehen aus.

3.7.2 Lyse der Zellen aus Zellkulturen

Die Zellen aus einer T150-Kulturflasche (Nunc) mit B-Lymphozyten wurden für die DNA-Isolierung zunächst zusammen mit dem Kulturmedium in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und durch eine 10-minütige Zentrifugation mit 1000 U/min bei 20°C sedimentiert. Dann wurden sie in einem Gesamtvolumen von 50 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Gibco BRL) gewaschen, 10 Minuten bei 20°C mit 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und erst dann erfolgte die Zugabe von Zellysepuffer und die Gewinnung von Zellkernen wie in 3.6.1.

Die Lungenkarzinom- und Zervixkarzinomzellen wurden am DKFZ auf je vier T400-Kulturflaschen (Nunc) expandiert. Im eigenen Labor wurde zunächst das Medium abgegossen und die adhärent wachsenden Zellen durch Behandlung mit 0.25%igem Trypsin (Sigma) geerntet, im Phasenkontrastmikroskop examiniert und die Trypsinbehandlung mit dem zuvor abgenommenen Medium gestoppt. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 20°C mit 1000 U/min abzentrifugiert und vorbereitend für die DNA-Isolierung zweimal in einem Gesamtvolumen von 50 ml PBS (Gibco BRL) gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von Zellysepuffer und die Gewinnung von Zellkernen wie in 3.6.1.

3.7.3 Reinigung und Fällung

Die DNA wurde durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln zur Entfernung von Proteinen und Lipiden aus der wässrigen Lösung gereinigt. Als organisches Lösungsmittel wurde ein Phenol-Mix (Roth) und Chloroform-IAA (Merck) eingesetzt. Alle Extraktionen fanden jeweils mit den gleichen Volumina bei Raumtemperatur in 50 ml Polypropylenreaktionsgefäßen (Greiner) unter einem chemischen Abzug statt. Zunächst

erfolgte die Extraktion mit dem Phenol-Mix durch Zugabe der organischen Phase und durch 10-minütiges sorgfältiges Schwenken bis die Suspension milchig weiß war. Hierbei wurde heftiges Schütteln vermieden, um ein Zerschneiden der hochmolekularen DNA durch Scherkräfte zu vermeiden. Die Phasen wurden bei Raumtemperatur und 15-minütiger Zentrifugation bei 3000 U/min getrennt. Die obere, DNA-enhaltende wäßrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und anschließend die Extraktion mit dem Phenol-Mix wiederholt. Nach erneutem Überführen der wäßrigen Phase in ein frisches Röhrchen wurde die Lösung diesmal mit dem gleichen Volumen (5 ml) Chloroform-IAA (Merck) unter Schwenken vermischt. Nach der im Anschluß stattfindenden Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues 50 ml Röhrchen (Greiner) abpipettiert.

Für die Fällung der DNA wurde die wäßrige Lösung durch Zugabe von 0,5 ml 3 M Natriumacetat auf eine Endsalzkonzentration von 0,3 M vorbereitet. Durch Zugabe eines 2,5-fachen Volumens (12,5 ml) auf -20°C gekühlten Äthanol (100%, Merck) wurde die DNA durch vorsichtiges hin und her Schwenken gefällt. Nachdem die DNA in Form eines weißen geknäuelten Fadens präzipitiert war, wurde dieser mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt (Eppendorf). Die DNA wurde zunächst zur Entfernung von restlichem Salz mit 70%igem Äthanol (Merck) gewaschen indem das Äthanol mit einer Pipette mehrmals aufgezogen und am DNA Faden vorbeipipettiert wurde. Durch diese Bewegung wurde der DNA-Faden von allen Seiten gespült. Die Entfernung des Wassers erfolgt in gleicher Weise mit 100%igem Äthanol. Die DNA wurde bei offenen Gefäßen über Nacht an der Luft an einem luftzuggeschützten Platz getrocknet.

Am folgenden Tag wurde die DNA in 1,5 ml TE-Puffer pH 7,4 aufgenommen, über mehrere Tage gelöst und dann als Stocklösungen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.8 Qualitätsprüfung und Quantifizierung der DNA

3.8.1 Darstellung im Agarose-Minigel

Die genomische DNA wurde in 1%igen Agarosegelen auf Menge und Qualität überprüft. Zu diesem Zweck wurden je 4 µl DNA-Stocklösung und 8 µl Gelladepuffer vermischt, 10 Minuten lang bei 68°C denaturiert und anschließend in die Taschen des Mi-

nigels geladen. Um die jeweilige DNA-Menge abschätzen zu können, wurden zum Vergleich Standardmengen von 125 ng, 250 ng und 500 ng einer λ -DNA (Gibco BRL) auf dem gleichen Gel mitgeführt. Die Elektrophorese wurde bei 80 V für 60 Minuten unter Verwendung von 1×TBE als Laufpuffer durchgeführt. Die DNA-Banden konnten durch Zugabe von Ethidiumbromid zum Gel (15 μ g/100 ml) nach der Elektrophorese im UV-Licht sichtbar gemacht und auf Polaroidfilm photographiert werden. Die isolierte hochmolekulare genomische DNA läuft als breite, gezackte Bande im Bereich der 23 kb λ -DNA. Eine eventuelle Degradierung der DNA, die durch unsanfte Handhabung bei der Extraktion entsteht, ist als diffuser Schmier über den gesamten Trennbereich zu erkennen und nach Möglichkeit zu verhindern. Eine grobe Abschätzung der DNA-Menge kann im Vergleich der λ -DNA-Mengen vorgenommen werden.

3.8.2 Optische DNA-Mengenbestimmung im Spektrophotometer

Um die Berechnung der DNA-Konzentration zu ermöglichen wurden 2 μ l DNA aus den Stocklösungen mit 98 μ l Aqua dest. verdünnt (1:50) und die Absorption im Spektrophotometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 μ g/ml. Die DNA-Menge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration} = \text{OD (Meßwert)} \times 50 \mu\text{g/ml} \times 50 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

3.9 Mikrosatellitenanalyse

Die isolierten DNA-Proben der Familienmitglieder wurden anhand ihres Mikrosatellitenstatus an 3p und 9q auf die Zugehörigkeit zur gleichen Familie überprüft.

Die Analyse umfaßte zunächst die Amplifikation der genomischen DNA an einem hoch-polymorphen DNA-Locus. Die Häufigkeit der Heterozygotie an den gewählten Loci ist größer als 90% und somit ist gewährleistet, daß sich die elterlichen Allele aufgrund von Längenunterschieden im Polyacrylamidgel unterscheiden lassen. Die Bestimmung von Mikrosatellitenallelen an mehreren Loci kann Auskunft über die Stammbaumverhältnisse geben und Fälle von Nicht-Verwandtschaft aufdecken. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrosatellitenanalyse dazu benutzt um sicher zu stellen,

daß es sich in der Generation der Erkrankten um echte Geschwister und bei der nachfolgenden Generation um die leiblichen Kinder handelt. Die Analyse der DNA der Zellkulturen sollte bestätigen, daß es während der Kultur nicht zu Kreuzkontaminationen zwischen den B-Zelllinien kam.

3.9.1 Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die PCR ist eine von Mullis et al. (Mullis et al., 1986) entwickelte Reaktion, mit der selektiv Nukleinsäuresequenzen definierter Länge und Sequenz angereichert werden können. In der Reaktion wird durch das Enzym DNA-Polymerase an einem einzelsträngigen DNA-Abschnitt, der als Matrize dient, ein komplementärer zweiter Strang polymerisiert und es entsteht eine doppelsträngige DNA. Für diesen Vorgang sind mehrere Schritte notwendig, die im Folgenden aufgeführt sind.

Zunächst wird die genuine doppelsträngige DNA mittels Erhitzen denaturiert, so daß jetzt die beiden komplementären Stränge als Einzelstränge vorliegen. In einem zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung (*annealing*) zweier kurzer, synthetisch hergestellter Oligonukleotide, *Primer 1* und *Primer 2*, die an den entgegengesetzten, flankierenden Bereichen der jeweiligen Einzelstränge über Wasserstoffbrücken binden. Die Lage von *Primer 1* und *Primer 2* an den jeweiligen Einzelsträngen bestimmt die Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Die Amplifikation, das heißt das Aufsynthetisieren der einzelnen Nukleotide und die Verlängerung des jeweiligen DNA-Stranges in einem dritten Schritt, der sogenannten Extension oder Kettenverlängerung, wird von der thermostabilen Polymerase ausgeführt. Dabei werden die vier Desoxynukleotidtriphosphate je nach Vorlage der DNA-Matrize in 5'→3'-Richtung an den neuentstehenden komplementären Strang synthetisiert. Werden diese drei Reaktionsschritte zyklisch wiederholt, dann entstehen exponentiell millionenfach Kopien einer exakt definierten DNA-Sequenz. Der Ablauf der Einzelschritte wird durch Temperaturänderungen geregelt und läuft in einem PCR-Thermo-Cycler automatisiert ab.

Die PCR wurde mit DNA aus den Blutproben und aus den Zellkulturen durchgeführt. Die dazu verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Oligonukleotid-(Primer)-sequenzen und PCR-Bedingungen

Locus	Sequenz	Länge [bp]	Chrom.	Temp. [°C]	MgCl ₂ [mM]
D3S1038 (1) D3S1038 (2)	5'-TCC AGT AAG AGG CTT CCT AG-3' 5'-AAA GGG GTT CAG GAA ACC TG-3'	100- 120	3p	60	15
D3S1350 (1) D3S1350 (2)	5'-AGC TAC AGG CTG AGG CAG-3' 5'-CAT CAT AAG ACC AGT CGC AC-3'	200- 250	3p	62	15
D9S1198 (1) D9S1198 (2)	5'-TGG GAG AGG GAA ATT GCT ATC-3'	120	9q	55	20

(1) Vorwärts-Primer, (2) Rückwärts-Primer, Chrom. Chromosomenlokalisierung, Temp. Annealing-Temperatur.

Ein PCR-Reaktionsansatz von 25 µl enthielt 100 ng DNA, je 20 pmol *Primer 1* und *Primer 2*, je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1×PCR-Puffer mit MgCl₂ und 1,25 Einheiten Taq DNA-Polymerase (Eurobio). Die Reaktion wurde in 35 Zyklen bei für die Oligonukleotide spezifischen Temperaturen in einem PTC 200 Thermal Cycler (MJ Research, INC; Biozym) durchgeführt. Die spezifischen Programme zur Durchführung der einzelnen PCR-Reaktionen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Spezifische PCR-Programme für die verschiedenen Primerpaare.

Primerpaar	Denaturierung	Zyklus-denaturierung	Annealing	Zyklus-extension	Extension
D3S1038 (1/2)	94°C 4 Min	94°C 1 Min	60°C 30 Sek	72°C 30 Sek	72°C 4 Min
D3S1350 (1/2)	95°C 4 Min	95°C 30 Sek	64°C 30 Sek	72°C 1 Min	72°C 4 Min
D9S1198 (1/2)	94°C 4 Min	94°C 1 Min	55°C 30 Sek	72°C 30 Sek	72°C 4 Min

3.9.2 Überprüfung der PCR-Produkte im Minigel

In einem 2%igen Agarosegel wurden die PCR-Reaktionsprodukte auf Spezifität und ausreichende Menge überprüft. Dazu wurden 4 µl PCR-Produkt mit 8 µl Gelladepuffer gemischt und im Vergleich zu 0,7 µg DNA des Molekulargewichtsmarkers BM V (Böh-

ringer Mannheim) in 1×TBE Puffer bei 100 V über 30 Minuten aufgetrennt. Die Größe des PCR-Produktes wurde durch Vergleich mit den Fragmenten definierter Länge des Standards bestimmt. Die Spezifität war gegeben, wenn nur eine PCR-Produktbande der erwarteten Länge im UV-Licht zu sehen war.

3.9.3 Vorbereitung des Polyacrylamidgels

Die Auftrennung der in der PCR amplifizierte Mikrosatellitenallele der Länge 100 bis 250 Basenpaare erfolgte in hochauflösenden 8%igen Polyacrylamidgelen. Das Gel hatte eine Abmessung von 40 × 40 cm und eine Stärke von 0,5 mm und wurde in einer Biorad Sequenziergelkammer (Biorad) hergestellt. Die Glasdeckplatte wurde mit Repel-Silane ES (Pharmacia Biotech) behandelt, damit sie sich nach Ende der Elektrophorese leicht abheben läßt. Die vorbereitete flüssige Polyacrylamidlösung wurde luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und der mit Repel-Silane (Pharmacia Biotech) behandelte *sharktooth*-Kamm (Biorad) mit der ungezähnten Seite zwischen die Glasplatten gesetzt, so daß im Gel eine große, glatt begrenzte Tasche entstand. Nach dem Auspolymerisieren über ca. 30 Minuten wurde die Glasvorrichtung mit dem Gel in die Elektrophoresekammer gestellt und der untere Puffertrog mit 600 ml 1×TBE gefüllt. Alle Luftblasen zwischen Gel und Puffer wurden mit Hilfe einer Spritze vorsichtig entfernt. Am oberen Ende des Gels wurde jetzt die große Tasche durch Spülen mit Puffer von Gelresten befreit und durch Einsetzen des Haifischzahnkamms die Probenauftragspositionen ausgebildet. Der obere Puffertrog wurde ebenfalls mit 600 ml 1×TBE gefüllt. Das Gel wurde durch einen Vorlauf bei 1800 V (PowerPac 3000; Bio Rad) für eine Stunde auf eine Temperatur von ca. 65°C äquilibriert, um den denaturierten Zustand der Proben zu unterstützen und aufrechtzuerhalten.

3.9.4 Laden des Gels und Durchführung der Elektrophorese

2 µl PCR-Produkt wurden mit 4 µl deionisiertem Formamid und 1 µl Formamid Dyes gemischt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Je 6 µl davon wurden in die vom Haifischzahnkamm begrenzten Kammern geladen. Die Elektrophorese wurde bei 1800 V für PCR Produkte der Loci D3S1038 und D9S1198 für 3,5 Stunden und für PCR-Produkte des Locus D3S1350 für 5,5 Stunden durchgeführt.

3.9.5 Transfer der Mikrosatellitenallele auf die Hybond™-N+-Membran

Die Glasdeckplatte wurde vorsichtig vom Gel abgehoben und dieses auf der Grundplatte belassen. Über das Gel wurde luftblasenfrei eine zurechtgeschnittene und in 10×TBE getauchte Hybond™-N+-Membran (Amersham) aufgelegt und darüber ebenfalls luftblasenfrei vier Lagen formatangepaßtes Whatman 2MM Papier (Schleicher und Schuell) gelegt, wobei die erste davon ebenfalls befeuchtet wurde. Um einen Kurzschluß des Flüssigkeitsstromes während des Transfers zu verhindern, wurden Parafilmstreifen (American National Can TM) bündig um die Hybond™-N+-Membran platziert. Zur Gewährleistung eines gleichmäßigen Anpreßdrucks wurde eine Glasplatte aufgelegt und diese mit einer mit Wasser gefüllten 250 ml Glasflasche beschwert. Der Transfer fand in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 3 Stunden statt. Die Membran wurde in 0,4 N NaOH gebadet und anschließend zweimal für 10 Minuten in 5×SSC neutralisiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit 2MM Whatmanpapier (Schleicher und Schuell) aufgesaugt, danach wurde die Membran noch feucht in einen Plastikbeutel für die Hybridisierung (Boehringer Mannheim) eingeschweißt.

3.9.6 Radioaktivmarkierung der Oligonukleotide

Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten Allele auf der Nylonmembran wurden die dort lokalisierten spezifischen DNA-Banden mit Hilfe spezifischer radioaktiv markierter Sonden detektiert. Als Sonde wurde jeweils einer der beiden PCR-Primer verwendet.

Für die Radioaktivmarkierung wurden je 0,5 µl Oligonukleotidlösung, 11,5 µl Aqua dest., 2 µl 10×Puffer, 5 µl γ -³³P-ATP (3000 Ci/mmol; Amersham) und T4-Polykinase (Böhringer Mannheim) vermischt und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde die Reaktion mit 2 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt. Der Einbau der Radioaktivität wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Dazu wurde je 1 µl der radioaktiven Reaktionslösung auf eine Polygram[®]CEL 300-Fertigfolie (Macherey-Nagel) aufgetragen und in eine mit 0,7 M KH₂PO₄ pH 3,5 gefüllte Chromatographiekammer gestellt, so daß sich die angetrockneten Probenauftragungspunkte ca 0,5 cm oberhalb des Flüssigkeitsspiegels befanden. Nachdem die Flüssigkeit infolge der Kapillarkräfte ca. 5 cm nach oben gewandert war, wurde die Chromatographiefolie getrocknet und ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP; Amersham) für 30 Sekunden exponiert.

Das leichtere, nicht inkorporierte γ -³³P-ATP trennte sich von der nur langsam aufwärtssteigenden markierten DNA gut ab. Die Sonde galt als markiert, wenn der DNA-Fleck nach 30 Sekunden eine schwache Färbung auf dem Röntgenfilm zeigte. Die gesamte markierte Probe wurde für die Hybridisierung eingesetzt, eine Quantifizierung war nicht erforderlich und fand nicht statt.

3.9.7 Hybridisierung und Autoradiographie

Bei der Hybridisierung bindet sich die einzelsträngige radioaktiv markierte Sonde komplementär an die auf die Nylonmembran geblottete denaturierte DNA. Dazu wurde die in den Hybridisierungsbeutel eingeschweißte Membran zunächst mit 20 ml Hybridisierungslösung versetzt und bei 42°C für 1 Stunde vorhybridisiert. Dieser Vorgang diente der Reduzierung von Hintergrund. Die radioaktiv markierte Oligonukleotidprobe wurde bei 95°C über 5 Minuten denaturiert und zur Membran in die Hybridisierungslösung zugegeben. Durch Bewegen und Kneten des Beutels wurde die Sonde gleichmäßig in der Flüssigkeit im Beutel verteilt und die Hybridisierung anschließend für 12 Stunden im Wasserbad bei 42°C unter leichter Bewegung durchgeführt. Danach wurde die Membran aus dem Beutel genommen und zweimal in 2×SSC, 0,1% SDS unter vorsichtigem Abreiben beider Seiten für 15 Minuten auf einem Kippschüttler gewaschen. Die Membran wurde zwischen zwei Lagen Whatmanpapier (Schleicher und Schüll) abgetrocknet und anschließend in Folie eingeschweißt. Danach wurde die Autoradiographie bei -70°C je nach Intensität der radioaktiv markierten Probe für 12-72 Stunden mit Hyperfilm MP (Amersham) durchgeführt.

3.10 Weiterführende molekularbiologische Analysen

Weiterführende molekularbiologische Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Debora Angeloni und Herrn Dr. Michael Lerman, Laboratory of Immunobiology, National Cancer Institute, Frederick Cancer Research Facility, NCI-FCRDC, Frederick, Maryland/USA, durchgeführt.

Zu Beginn der Arbeit war geplant, die DNA der Mitglieder der Lungenkarzinomfamilie auf mögliche konstitutionelle chromosomale Umlagerungen oder Deletionen mit Hilfe der *Southern-Blot* Technik zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen die-

ser Dr.-Arbeit *Southern-Blots* angefertigt, die den Forschern zur Hybridisierung mit den aus der 3p21.3 Region zu isolierenden DNA-Sonden zur Verfügung gestellt werden sollten.

Tabelle 5: Oligonukleotid-(Primer)-sequenzen für das *RON*-Gen.

Locus	Länge [bp]	Vorwärts-Primer/ Rückwärts-Primer
876F-971R	115	5'-TTA GCG CCA CTG AGC CAG AGT TGG-3' 5'-AGC ACA GGG TAG GGC TGT CC-3'
921F-1011R	112	5'-TCG ACT GCA GAT TTG CTC CA-3' 5'-GTG GCA AGT TGG GCA CCC ACT G-3'
Exon 14	159	5'-GCG GAA AGA GTC CAT CCA C-3' 5'-CTT GAG ACT CCA TCT CTG C-3'
Exon 15	113	5'-ATT ATG CAC CTC ACA CCA GGC CAC-3' 5'-CTG CCC CAC TTA CGA CTT AGT GAC-3'
Exon 16	206	5'-TCG CTC TGC AGG CAT CAC AGA GAT G-3' 5'-GAT GAA CAC TGA CCC GCT GAG GTG A-3'
Exon 17	162	5'-TTG CCC ACC AAC CCA CCT GTG-3' 5'-CAC CCC AGC TAC TCT GGA CTC-3'
Exon 18	223	5'-AGT CCT AAG TGT GAT CCT CTC CCT AC-3' 5'-GCC TCA CCA CAT CAG ACT TGG TGG T-3'
Exon 19	163	5'-CCA CAG TGG TCA TTT GGT GTG TGC TGC-3' 5'-CCA CCT CCA CAT ACT CAC AGA GAA TCA G-3'
Exon 20	108	5'-CAG GTA CCA AGT GAT GCA GCA ATG CTG-3' 5'-TCC CCAA AGC AGT GCA GAC ACT ATC TG-3'

Im Verlauf der Arbeit wurden Analysen des *RON*-Gens (GenBank Accession Number X70040) und des *a212 calcium channel subunit* Gens (GenBank Accession Number AF042792), die beide in der kritischen Region der homozygot deletierten 3p21.3-Region liegen, möglich. In ersten Versuchen zur Identifizierung einer hypothetischen Keimbahnmutation wurden diese Loci jetzt präferentiell mittels PCR-gestützter SSCP-Analysen untersucht. Die Experimente mit den dazu neu entwickelten Primerpaaren wurden von Frau Dr. D. Angeloni in Frederick, USA durchgeführt. Dazu wurden zu-

nächst die Genstruktur des *RON*-Gens mit Hinblick auf die Intron/Exon-Grenzen aufgeklärt (Angeloni et al., 2000). Analysiert wurden die Exons die für die Kinasedomäne (Exons 14-20) sowie ein Bereich des Exon 1, der die proteolytische Schnittstelle enthält. Die benutzten Primerpaare sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die benützten Primerpaare für das *a2ä2*-Gen waren LU9-2F: 5'-GTC TCC TCT TTG GAC AGA TTC TG und LU9-2R: 5'-TGG AGA TGA CTG TAA CAA GGG CAC und ergaben ein PCR-Produkt von 115 Basenpaaren Länge (D. Angeloni, persönliche Mitteilung).

3.10.1 Single-Strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP)

Die PCR für die SSCP wurden radioaktiv in einem Volumen von 12.5 ml durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt 100 ng genomische DNA, 12.5 pmol *Primer 1* und *Primer 2*, 200 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1.25 nCi ³²P-dATP, und 0.5 U AmliTaq DNA-Polymerase (Perkin Elmer). Die Bedingungen für die zyklischen Reaktionen waren für alle Primer eine Minute Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei 64° und 30 Sekunden Extension bei 72°C (Angloni et al., 2000).

Die radioaktiven PCR-Produkte wurden für acht Minuten bei 90°C in Formamidpuffer (Stop Solution, Amersham, Arlington Heights, IL) hitzedenaturiert. Die Elektrophorese wurde im 0.5×MDE Gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME) und 0.6×TBE bei konstanter Leistung von 8 W, Raumtemperatur und über Nacht durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf 3 MM Papier transferiert, getrocknet und ein X-OMAT AR Röntgenfilm (Kodack, Rochester, NY) wurde exponiert (Angloni et al., 2000).

4. Ergebnisse

Es wurde eine Familie mit häufigem Vorkommen von Lungenkarzinomen in der Region Niederbayern erfaßt. Bei der Herkunftsregion handelt es sich um eine ländliche Region ca. 100 km östlich von München gelegen mit ansässiger Chemieindustrie.



Abbildung 5: Deutschlandkarte mit Markierung der Herkunftsregion der Lungenkarzinom-Familie (graue Fläche). Die alten und die neuen Bundesländer sind durch eine durchgezogene Linie in der Karte getrennt.

Im Folgenden wird diese Familie anhand der Beschreibung des Stammbaums, der Erfassung der klinischen Daten der Patienten und der individuellen Auswertung eines Fragebogens zur Erfassung des Raucherstatus und beruflicher Belastungen wissenschaftlich dokumentiert. Von den erfaßten lebenden Mitgliedern wurde jeweils eine Blutprobe zur Etablierung einer DNA-Sammlung als Grundlage molekularbiologischer Analysen

gewonnen. Eine zweite Blutprobe diente der Etablierung von B-Zellkulturen als permanente Quelle konstitutionellen biologischen Materials. Alle Maßnahmen wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Grundlagen zur Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Entstehung des Lungenkarzinoms besonders hinsichtlich der Identifizierung eines Lungenkarzinomlokus zu schaffen.

4.1 Stammbaum

Es handelt sich um eine Familie von vier Generationen I, II, III und IV mit mehreren Fällen von Lungenkarzinomen, für die ein Stammbaum erhoben wurde. Der Stammbaum (Abb. 6) basiert auf den Angaben der einzelnen befragten Familienmitglieder, die mit einem Zahlencode verschlüsselt sind. Für jene Familienmitglieder, die nicht direkt befragt werden konnten, weil sie entweder schon verstorben waren oder aber eine Befragung ablehnten, wurden die Informationen durch Angaben der Person 11.0 ergänzt, die im Rahmen dieser Studie die Kontakte innerhalb der Familie pflegte und stellvertretend für alle Ansprechpartnerin war.

Zu Beginn der Studie war bekannt, daß sechs Verwandte ersten bzw. zweiten Grades an einem Malignom erkrankt und verstorben waren, davon fünf an einem Lungenkarzinom. Diese Personen waren zum einen der Großvater väterlicherseits und ein Bruder des Vaters. In der befragten Generation III waren es die drei Geschwister 6.0, 8.0 und 10.0, die an einem Lungenkarzinom verstorben waren, ein weiterer Bruder 4.0 erlag einem Melanom. Zwischen den Eltern der 13 Geschwister besteht keine Konsanguinität. Sie waren beide nicht an einem Lungenkarzinom erkrankt. Der Vater hatte ein Herzleiden und Asthma und verstarb im Alter von 78 Jahren. Die Mutter verstarb an einer Verletzung („hat sich gestoßen“ laut der Bezugsperson 11.0). Das Alter der Geschwister der befragten und belasteten Generation III war zum Zeitpunkt der Erhebung 49 bis 70 Jahre. Außer diesen 13 Geschwistern wurden in der Generation IV, in der noch keine Krankheitsfälle aufgetreten waren, 16 Personen erfaßt. Das Alter dieser Personen war 25 bis 45 Jahre.

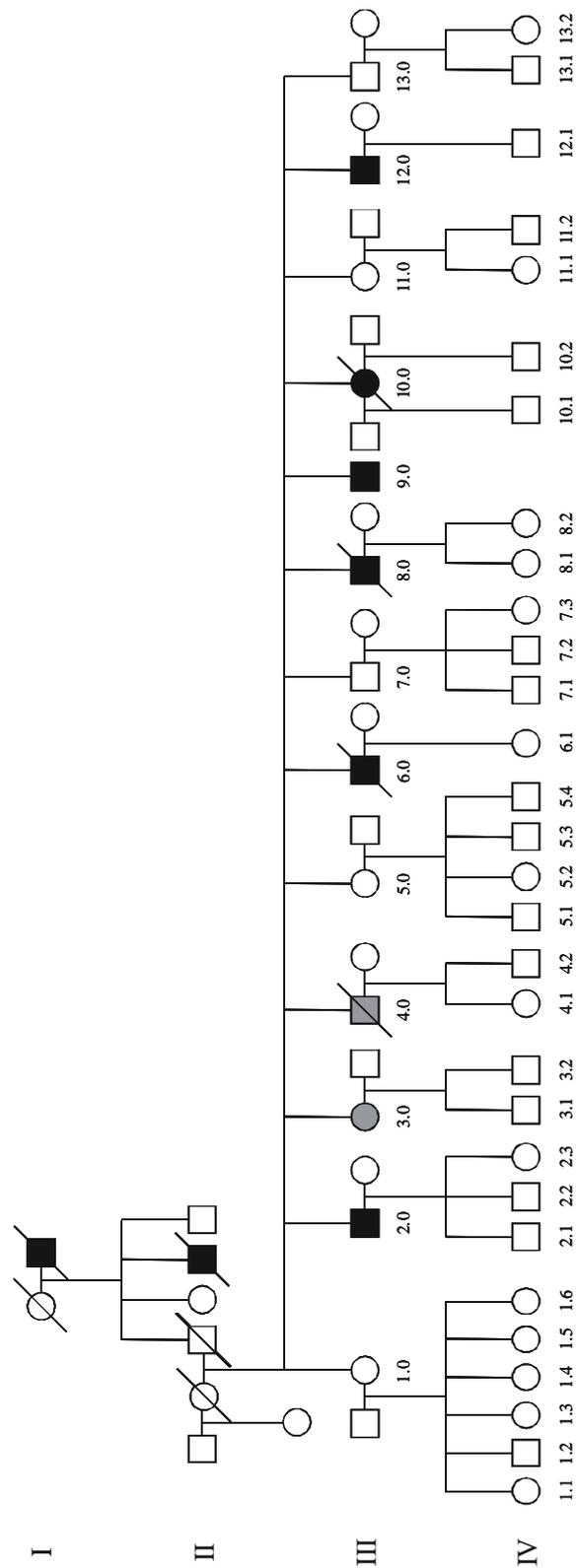


Abbildung 6: Stammbaum der Familie über vier Generationen (I-IV). Die Quadrate stellen männliche, die Kreise weibliche Familienmitglieder dar. Erkrankte Personen sind schwarz (Lungenkarzinom) oder grau (andere Malignome) ausgefüllt, verstorbene Personen sind schräg durchgestrichen. Die arabischen Zahlen dienen der Kennzeichnung der Personen.

4.2 Erfassung des Krankheitsstatus und klinische Erhebung

Angaben zu einer Malignomerkrankung wurden von acht Personen erhoben: 2.0 Lungenkarzinom, 3.0 Zervixkarzinom, 4.0 Melanom, 6.0 Lungenkarzinom, 8.0 Lungenkarzinom, 9.0 Lungenkarzinom, 10.0 Lungenkarzinom und 12.0 Verdacht auf Lungenkarzinom. Die vier Patienten 4.0, 6.0, 8.0 und 10.0 waren bereits verstorben.

Person 2.0

Es handelt sich um eine männliche Person (zweites Kind der Eltern) von 69 Jahren, bei dem im Verlauf der Studie (Mai 1997) ein Lungentumor diagnostiziert wurde. Laut Krankenakte (TU-München) handelt es sich bei dem Tumor um ein histologisch gesichertes, invasives, niedrig differenziertes, gering verhornendes Plattenepithelkarzinom im linken Lungenoberlappen, das im größten Durchmesser eine Ausdehnung von 8,5 cm hatte (Abb. 7). Der Tumor zeigte bereits Infiltration in die hintere knöcherne Brustwand, die hilären und mediastinalen Lymphknoten waren nicht metastatisch befallen. Eine Operation konnte kurativ durchgeführt werden. Tumormaterial wurde in Paraffin gebettet asserviert. Das pTNM-Stadium des Tumors war pT3, pN0, M0, G3, R0.

Bezüglich des Raucherstatus konnte ein Zigarettenkonsum von 50 „Pack-years“ anamnestiziert werden.

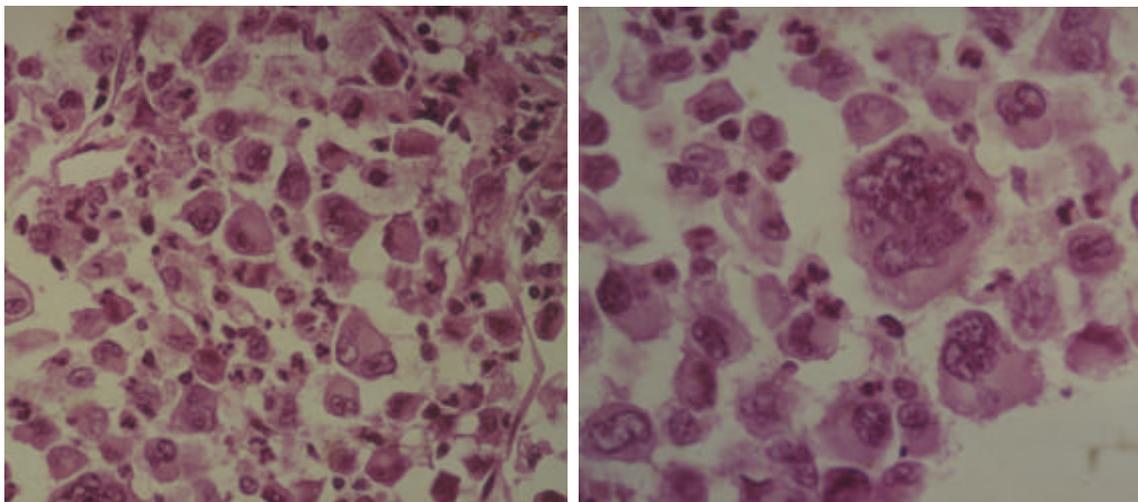


Abbildung 7: HE-Färbung des gering differenzierten, leicht verhornenden Plattenepithelkarzinoms (NSCLC) des Patienten 2.0 in 40-facher (links) und 63-facher (rechts) Vergrößerung.

Person 3.0

Es handelt sich um eine weibliche Person (drittes Kind der Eltern) von 68 Jahren. Im Alter von 61 Jahren wurde ein Zervixkarzinom diagnostiziert, das 1986 erfolgreich durch eine Operation behandelt werden konnte. Zehn Jahre später zeigt die Patientin keinen Anhalt für Metastasen oder ein Lokalrezidiv. Weitere Informationen konnten nicht erhoben werden. Es standen keine Krankenakten zur Einsicht zur Verfügung, da die Patienten eine Teilnahme an der Studie ablehnte.

Person 4.0

Es handelt sich um eine männliche Person (viertes Kind der Eltern), die im Alter von 31 Jahren (1962) an einem Melanom verstarb. Es existieren keine weiteren Angaben.

Person 6.0

Es handelt sich um eine männliche Person (sechstes Kind der Eltern), die im Alter von 52 Jahren (1985) an einem Lungenkarzinom verstarb. Anamnestische Daten ließen sich nur über die Schwester 11.0 erheben, da der Betroffene vor vielen Jahren nach Australien ausgewandert war. Er arbeitete dort als Kraftfahrzeuglackierer und rauchte seit seinem 20. Lebensjahr, d. h. über 32 Jahre lang Filterzigaretten. Angaben in „Pack-years“ können nicht gemacht werden.

Person 8.0

Es handelt sich um eine männliche Person (achtes Kind der Eltern), die im Alter von 56 Jahren (1993) an einem Lungenkarzinom verstarb. Laut Krankenakte lag ein histologisch gesichertes, gering differenziertes, invasives, gering verhornendes Plattenepithelkarzinom in der rechten Lunge vor (Abb. 8). Der Tumor infiltrierte ins Mediastinum in den Bifurkationsbereich und in den paratrachealen Raum. Da der Patient funktionell nicht operabel war, erfolgte eine primäre Bestrahlungstherapie. Das TNM-Stadium des Tumors war T3, Nx, M0, G3. Bezüglich des Raucherstatus lagen Angaben in der Krankenakte mit einer Schachtel Filterzigaretten täglich über 30 Jahre vor (30 „Pack-years“), nach Angaben des Sohnes rauchte der Patient jedoch 25 – 30 Zigaretten am Tag (bis 45 „Pack-years“).

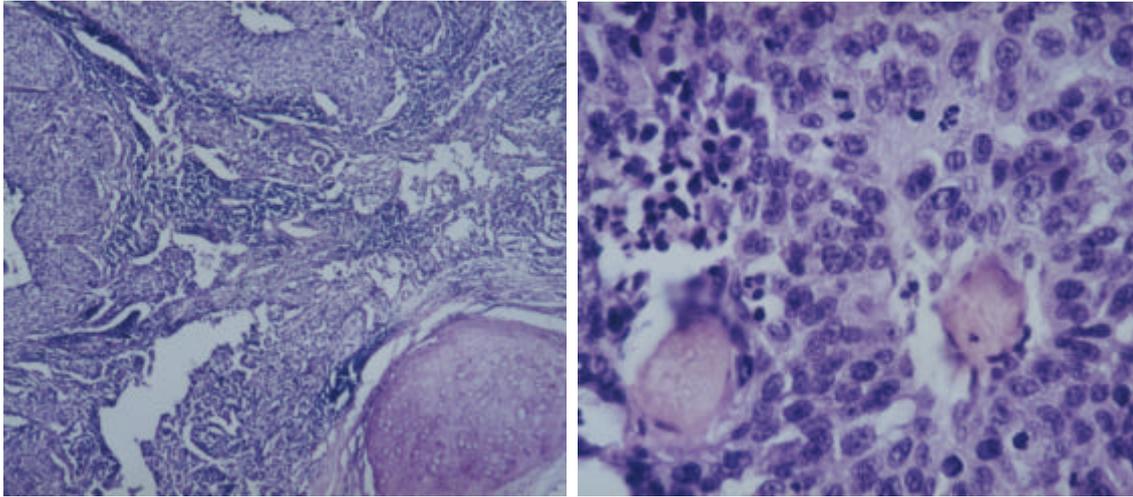


Abbildung 8: HE-Färbung eines gering differenzierten, leicht verhornenden Plattenepithelkarzinoms (NSCLC) des Patienten 8.0 in 10-facher (links) und 40-facher (rechts) Vergrößerung.

Person 9.0

Es handelt sich um eine männliche Person (neuntes Kind der Eltern), bei der im Alter von 54 Jahren (1993) ein Lungenkarzinom diagnostiziert wurde. Laut Krankenakte handelte es sich um großzelliges Karzinom vom Riesenzelltyp im rechten Lungenoberlappen. Der Tumor infiltrierte in die viscerale Pleura und verursachte eine *Lymphangiosis carcinomatosa* subpleural. Eine kurative Resektion fand im gleichen Jahr statt. Das pTNM-Stadium des Tumors war pT3, pN0, pM0, G3. Der Patient rauchte ca. 40 „Pack-years“.

Person 10.0

Es handelt sich um eine weibliche Person (zehntes Kind der Eltern), bei der im Alter von 52 Jahren (1995) ein kleinzelliges Bronchial-Karzinom (SCLC) diagnostiziert wurde. Das Karzinom war bereits im Stadium *extensive disease* mit multipler Metastasierung ins Cerebrum, Leber und Skelettsystem. Die Patientin verstarb noch im gleichen Jahr. Initial erhielt die Patientin eine Chemotherapie (ACO-Schema über 8 Zyklen), kurz vor ihrem Tod eine palliative Strahlentherapie. Nach Angaben des Sohnes rauchte sie seit der Jugend eine Schachtel Zigaretten am Tag (ca. 30-35 „Pack-years“).

Person 12.0

Es handelt sich um eine männliche Person (zwölftes Kind der Eltern), die im Alter von 52 Jahren 1997 im Verlauf dieser Studie mit Verdacht auf ein Lungenkarzinom stationär behandelt wurde. Laut Krankenakte wurde in der radiologischen Untersuchung auf der Seitenaufnahme des Thorax eine Verschattungszone im anterioren Lungenoberlappensegment festgestellt. Der linke Hilus war deutlich verbreitert. Im CT zeigte sich ein tumoröser Prozeß im linken anterioren Oberlappensegment mit Infiltration der Thoraxwand im Sinne eines *Pancoast*-Tumors. Weder in der transbronchialen Biopsie, noch in der transthorakalen Zytologie und der transthorakalen CT-gesteuerten Punktion konnten tumorverdächtige Zellen gefunden werden. Somit konnte der klinisch-radiologische Verdacht auf ein Lungenkarzinom, pathologisch-anatomisch (noch) nicht bestätigt werden. Der Patient rauchte ca. 38 „Pack-years“.

In Tabelle 6 sind die Informationen, die mittels des Erhebungsbogens erfaßt werden konnten, zusammengefaßt. Daten von Personen, die bereits vor Studienbeginn verstorben waren oder die persönlich keinen Erhebungsbogen ausgefüllt haben, wurden teilweise mit Hilfe der Bezugsperson 11 oder näherer Angehöriger dieser ergänzt.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Informationen aus dem Erhebungsbogen.

Person	Geb./Gest.	Genus	KG (kg)	Länge (cm)	Karzinom	Raucherstatus	Berufe/ Arbeitsplätze	Gefahrenstoffe/ Arbeitsstoffe
1.0	-	w	-	-	-	-	-	-
2.0	14.08.1927	m	77 (-7)	177	Lungen- karzinom	Seit `47; mit Filter seit `51 20/die; aufge- hört `97	`42-`47: Maurer `48-`62: Maler `63-`69: Lagerist `69-`90: Technischer Zeichner Seit `90: Rente	-
2.1	08.09.1952	m	95 (+3)	180	-	-	Seit `66: Drucker	Reinigungsbenzin, Spiritus, Aceton, Salpetersäure, Salzsäure, Blutlaugen- salz, S-Plus D-Industrieentkalker, Fix- iermatron, EP 26 Druckplattenentwick- ler (täglich, seit 66)
3.0	1929	w	-	-	Zervix- karzinom	-	-	-
4.0	06.12.1931- 04.06.1962	m	-	-	Melanom	Positiv (Menge: ?)	`45-`62: Maurer	-
4.1	16.06.1954	w	68 (+7)	165	-	Seit `71 15/die (Filter)	`68-`77: Verkäuferin `84-`97: Näherin	Polyacryl, Viskose, Polyamid, Poly- propylen
5.0	25.07.1932	w	70 (+6)	162	-	-	-	-
5.1	20.11.1957	w	53	163	-	Seit `75 10-15/die (Fil- ter)	`74-`80: Hotelfachfrau `80-`82: Büro Seit `86: Familienhilfe	-

Tabelle 6: Zusammenfassung der Informationen aus dem Erhebungsbogen (Fortsetzung).

Person	Geb./Gest.	Genus	KG (kg)	Länge (cm)	Karzinom	Raucherstatus	Berufe/Arbeitsplätze	Gefahrenstoffe/Arbeitsstoffe
5.2	08.05.1963	m	65 (+2)	172	-	Von `78 bis `94 25/die	Seit `78: Stahlbauer im Maschinenbau	Chrom, etwas Kontakt mit Lacken, Verdünnern, Klebstoffen, Dichtungsmitteln, Glas- & Steinwolle (`80-`85, 2x/Wo, Maschinenwärmeisolation), Schweißarbeiten (`80-`90, 10x/Wo, als Legierungszusatz: 8CrNiMo 1.4301 = VA, Ni, Fe, Mn, Mb, Vn), Schmierstoffe (`80-`90)
6.0	17.09.1933- 15.05.1985	m	-	-	Lungenkarzinom	Seit `53 (Menge: ?)	KFZ-Lackierer in Australien (ohne Maske/Absaugung)	-
7.0	19.09.1935	m	84	168	-	Von `57 bis `95 (Filter)	`65-`96: Metallfräser	-
7.1	25.07.1960	m	71	185	-	Seit `77 20/die	Seit `75: Werkzeugmacher	Quarzstaub (seit `94, max. 10 min./die, erodierte Teile abstrahlen), Kühlschmierstoffe (seit `75, tägl. Zum Fräsen, Drehen, Bohren, Schleifen)
7.1.1	19.06.1983	m	65 (+5)	180	-	Seit `97 10/die	Schüler	-
7.2	15.10.1961	m	75	180	-	Von `78 bis `83 20/die	Seit `77: Werkzeugmacher	Kühlschmierstoffe (seit `93, 2x/Wo, zum Schleifen)
7.3	08.01.1967	w	60	174	-	-	`85-`87: Schneiderin `87-`90: Kontrollarbeiten (Schrauben...) seit `97: Kassiererin	-

Tabelle 6: Zusammenfassung der Informationen aus dem Erhebungsbogen (Fortsetzung).

Person	Geb./Gest.	Genus	KG (kg)	Länge (cm)	Karzinom	Raucherstatus	Berufe/Arbeitsplätze	Gefahrenstoffe/Arbeitsstoffe
8.0	22.06.1937-1993	m	-	-	Lungenkarzinom	Seit der Jugend: 25-30/die	Bis `56: Landwirtschaftsgehilfe `56-`92: Maurer	Holzstaub
8.1	28.01.1967	w	56 (+2)	176	-	Seit `85 10/die (Filter)	`82-`87: Bürokauffrau seit `87: Buchhalterin	-
8.2	19.11.1971	w	56	175	Atyp. NZN	-	Seit `89: Krankenschwester	
9.0	05.02.1939	m	88 (+8)	164	Lungenkarzinom	Seit `54, mit Filter seit `65 bis `93 20/die	`61-`84: Installateur `84-`93: Gemeindearbeiter	Kupfer- und verzinkte Eisenrohre, Schweißarbeiten (`84-`93, 2x/a, E-Schweißen, Fe), Kühlschmierstoffe (`84-`93, 2x/a)
10.0	25.07.1942-1995	w	-	-	Lungenkarzinom	Seit der Jugend bis `94 20/die	Bis `78: Näherin `78-`95: Bäuerin	-
10.1	12.12.1965	m	76 (+5)	171	-	Seit `82 14/die	`83-`85: Schmid `85-`87: Fahrzeugbauer `87-`88: Bundeswehr seit `88: Schleifer/Schweißer	Quarzstaub (`85-`86, 2x/Wo, Sandstrahlarbeiten), Schutzgasschweißern (seit `82, 2-3x/Wo, Fe, verzinktes Blech), Kühlschmierstoffe (`85-`87, tägl., Eisenschneidearbeiten)
11.0	25.07.1943	w	65 (+5)	160	-	-	`57-`65: Pelznäherin `71-`83: Näherin	-
11.1	21.06.1968	m	67 (+2)	174	-	-	Seit `83: Fliesenleger	Staub (Baustelle, Flex, Fliesenkleber), Silikonfugenkitt, seltenst Glaswolle (Wärmeisolierung), seltenst Quarzstaub (Polierarbeiten)

Tabelle 6: Zusammenfassung der Informationen aus dem Erhebungsbogen (Fortsetzung).

Person	Geb./Gest.	Genus	KG (kg)	Länge (cm)	Karzinom	Raucherstatus	Berufe/Arbeitsplätze	Gefahrenstoffe/Arbeitsstoffe
12.0	11.10.1945	m	80 (+10)	182	Lungenkarzinom	Seit `61 (Filter) 20/die	`61-`81: Automechaniker `82-`97: Schreiner	Holzstaub (`82-`97, tägl. an der Kreissäge, Eiche, Buche, Spanplatten, Weichhölzer)
13.0	1948	m	-	-	-	-	-	-
13.1	30.01.1972	m	79 (+10)	190	-	Seit `88 (gelegentlich)	Seit `90: Bürokaufmann	-

Geb./Gest. Geboren/Gestorben, Genus Geschlecht w weiblich, m männlich, KG (kg) Körpergewicht in Kilogramm, in Klammern ist die Gewichtsdiffferenz zum Gewicht zehn Jahre vor der Erhebung angegeben, Länge (cm) Körperlänge in Zentimeter, Karzinom Vorkommen und Art des Karzinoms, atyp. NZN atypischer Nävuszellnävus, Gefahrenstoffe/Arbeitsstoffe Umgang mit Gefahrenstoffen und Arbeitsmaterialien.

4.3 Nicht-verwandter Patient mit Adenokarzinom der Lunge (2010)

Im Januar 1996 wurde in der thoraxchirurgischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar (Leiter Herr Prof. Präuer) der TU-München ein Patient mit Zustand nach Lungenlappenresektion und Metastasen in der kontralateralen Lunge stationär behandelt. Der Patient war zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (1994) eines Adenokarzinoms der Lunge 33 Jahre alt. Familienanamnestisch gab es eine Tante (Schwester des Vaters), die an einem Mammakarzinom erkrankt war. Beide Eltern waren im Alter von 68 Jahren und 67 Jahren gesund. Es gibt keine Geschwister.

4.4 Gewebe

Von den am Lungenkarzinom erkrankten Personen 2.0 und 8.0 steht Tumormaterial in Form von in Paraffin eingebettetem Gewebe zur Verfügung (Abbildungen 7 und 8). Da bei der Person 2.0 das Lungenkarzinom erst nach Beginn der Studie diagnostiziert und operiert wurde, wurde zudem frisches Tumormaterial in flüssigem Stickstoff asserviert.

4.5 B-Lymphozyten-Zelllinien

Es wurden B-Lymphozyten-Zelllinien von 25 Mitgliedern der Lungenkarzinomfamilie angelegt. Die EBV-Transformation und die Expansion der Zelllinien war in allen Fällen erfolgreich. Es wurden jeweils 6 - 8 Aliquota der Zellen bei -80°C eingefroren.

4.6 DNA-Isolierung

Es wurden DNA-Proben aus Blut von 25 Mitgliedern der Lungenkarzinomfamilie isoliert. Ebenso wurde DNA aus der Blutprobe eines nicht verwandten 33-jährigen Patienten mit einem Adenokarzinom isoliert. Pro Blutprobe konnten etwa 350 – 600 μg Hochmolekulargewichts-DNA gewonnen werden.

Es wurde ebenfalls DNA aus 20 B-Zellkulturen isoliert. Die Ausbeute war hier 250 – 600 μg .

4.7 Mikrosatellitenanalyse

Zur Überprüfung der anamnestisierten Stammbaumverhältnisse der Familie mit häufigem Lungenkarzinom wurden die DNA-Proben der Familienmitglieder Mikrosatellitenanalysen unterzogen. Für den Mikrosatellitenlokus D3S1350 konnten bei den Personen der beiden analysierten Generationen insgesamt zehn verschiedene Allele identifiziert werden (Abb. 9).

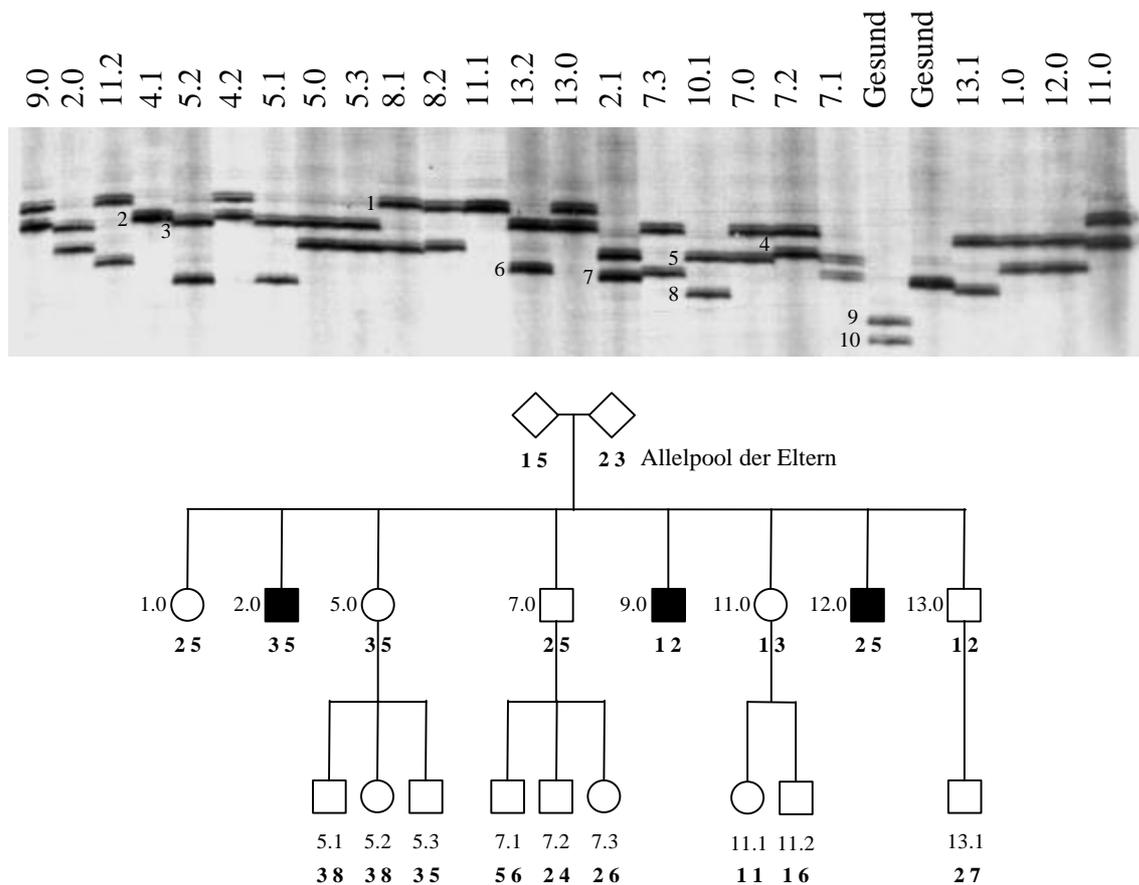


Abbildung 9: a) Autoradiographie der Mikrosatellitenanalyse am D3S1350 Lokus. Es wurden die aus Blut gewonnenen DNA-Proben einzelner Familienmitglieder analysiert, deren Position im Stammbaum der entsprechenden Numerierung der Abbildung 6 entspricht. Die Personen 1.0, 2.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0, 12.0 und 13.0 gehören der Geschwisterreihe (Generation III) an, in der 2.0 und 9.0 am Lungenkarzinom erkrankt sind und in der bei 12.0 der Verdacht auf ein Lungenkarzinom besteht. b) Skizze eines Ausschnitts des Familienstammbaums sowie Genotypen (fett gedruckte Zahlen) der Familienmitglieder gemäß der in a) dargestellten Autoradiographie. Die Genotypen der Geschwister in der Generation mit den erkrankten Personen ist mit einer Erstgradverwandschaft vereinbar. Dabei darf angenommen werden, daß die Eltern die Genotypen 15 und 23 trugen. Die Segregation des Allels 3 bzw. 5 in der Kernfamilie der Person 5.0, die Segregation des Allels 2 bzw. 5 in der Kernfamilie der Person 7.0, die Segregation des Allels 1 in der Kernfamilie der Person 11.0 und die Segregation des Allels 2 in der Kernfamilie der Person 13.0 sind mit einer Zugehörigkeit der Nachkommen zur Familie ebenfalls vereinbar.

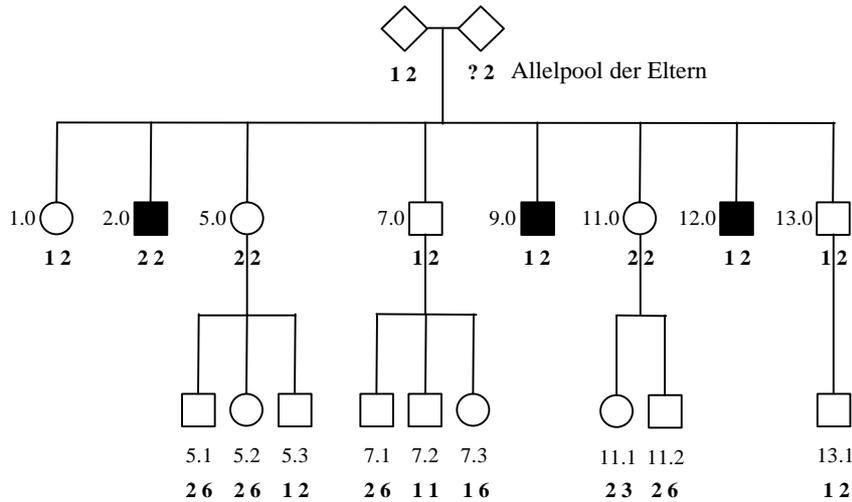
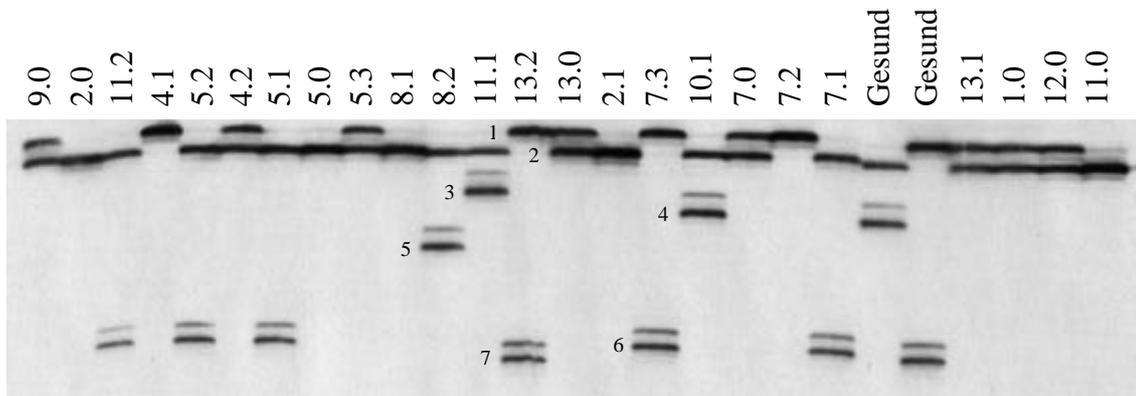


Abbildung 10: a) Autoradiographie der Mikrosatellitenanalyse am D3S1038 Lokus. Es wurden die aus Blut gewonnenen DNA-Proben einzelner Familienmitglieder analysiert, deren Position im Stammbaum der entsprechenden Numerierung in Abbildung 6 entspricht. Personen 1.0, 2.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0, 12.0 und 13.0 gehören der Geschwisterreihe (Generation III) an, in der 2.0 und 9.0 am Lungenkarzinom erkrankt sind und in der bei 12.0 der Verdacht auf ein Lungenkarzinom besteht. b) Skizze eines Ausschnitts des Familienstammbaum sowie Genotypen (fett gedruckte Zahlen) der Familienmitglieder gemäß der in a) dargestellten Autoradiographie. Die Genotypen der Geschwister in der Generation der Erkrankten ist mit einer Erstgradverwandschaft vereinbar. Dabei darf angenommen werden, daß im Allelpool der Eltern mindestens die Allele 1,2 und 2 waren. Die Segregation des Allels 2 in der Kernfamilie der Person 5.0, die Segregation des Allels 1 bzw. 2 in der Kernfamilie der Person 7.0 und die Segregation des Allels 2 in der Kernfamilie der Person 11.0 sind mit einer Zugehörigkeit der Nachkommen zur Familie ebenfalls vereinbar.

Für den Lokus D3S1038 waren es sieben (Abb. 10) und für den Lokus D9S1198 waren es sechs Allele (Abb. 11).

Da es bei jeder Person zwei elterliche Allele, eines von der Mutter und eines vom Vater gibt, dürfen in einer Generation maximal vier verschiedene Allele gefunden werden, wenn es sich um echte Geschwister der gleichen Eltern handelt. Dies traf bei Personen der Generation III für die getesteten Loci D3S1038, D3S1350 und D9S1198 zu.

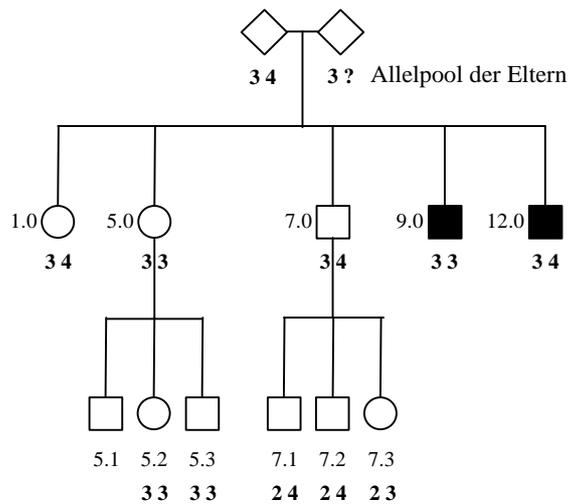
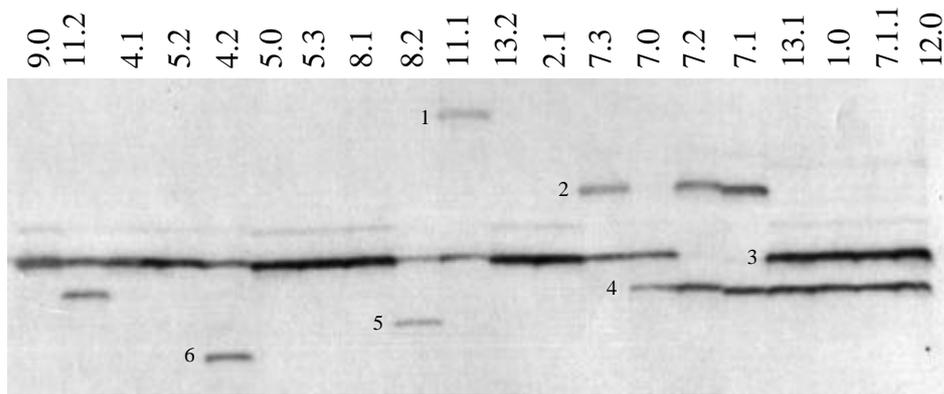


Abbildung 11: a) Autoradiographie der Mikrosatellitenanalyse am D9S1198 Locus. Es wurden die aus der Zellkultur gewonnenen DNA-Proben einzelner Familienmitglieder analysiert, deren Position im Stammbaum der entsprechenden Numerierung in Abbildung 6 entspricht. Personen 1.0, 5.0, 7.0, 9.0, und 12.0 gehören der Geschwisterreihe (Generation III) an, in der 2.0 und 9.0 am Lungenkarzinom erkrankt sind und in der bei 12.0 der Verdacht auf ein Lungenkarzinom besteht. **b)** Skizze eines Ausschnitts des Familienstammbaums sowie Genotypen (fett gedruckte Zahlen) der Familienmitglieder gemäß der in a) dargestellten Autoradiographie. Die Genotypen der Geschwister in der Generation der Erkrankten ist mit einer Erstgradverwandschaft vereinbar. Dabei darf angenommen werden, daß im Allelpool der Eltern mindestens die Allele 3, 4 und 3 waren. Die Segregation des Allels 3 in der Kernfamilie der Person 5.0 und die Segregation des Allels 3 bzw. 4 in der Kernfamilie der Person 7.0 sind mit einer Zugehörigkeit der Nachkommen zur Familie ebenfalls vereinbar.

In Generation IV durften unter echten Geschwistern wiederum nur vier unterschiedliche Allele auftreten, was in allen Fällen zutraf. Die Allelverteilung innerhalb der Geschwistergeneration III mit den erkrankten Personen und die Segregation dieser Allele in die nachfolgende Generation IV ist an ausgewählten Beispielen in den Abbildungen 9, 10 und 11 dargestellt.

Die Mikrosatellitenanalysen bestätigten, soweit möglich, die Segregation des Allels jenes Elternteils auf die Kinder, dessen Familienzugehörigkeit durch Erstgradverwandtschaft gegeben war. Es wurden weder in der Blut-DNA noch in der DNA der B-Zellkulturen Anhaltspunkte für Nichtzugehörigkeit zum Stammbaum gefunden.

Die Mikrosatellitenanalysen mit den DNA-Proben aus den B-Zellkulturen lieferten identische Ergebnisse wie die mit den aus nativem Blut gewonnenen DNA-Proben, was eine Kontamination zwischen den Proben während der B-Zell-Kultivierung ausschloß.

4.8 Molekulargenetische Analysen in den 3p21-Genen *RON* und *a2ä2*

In Zusammenarbeit mit Frau Dr. D Angeloni und Herrn Dr. M. Lerman am National Cancer Institute (NCI) in Frederick, USA, wurden das *RON*-Gen und das *a2ä2*-Gen in der 3p21.3-Region einer Reihe von PCR-gestützten SSCP-Analysen zur Identifizierung krankheitsassoziierter Mutationen unterzogen. Diese Experimente wurden am NCI durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Es wurden die Lungenkarzinom- und Zervixkarzinomzelllinien auf mögliche somatische Mutationen und die konstitutionelle DNA-Proben der Mitglieder der Lungenkarzinomfamilie und eines nicht-verwandten Patienten auf mögliche Keimbahnmutationen untersucht.

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen exemplarisch die Ergebnisse der SSCP-Analysen im *RON*-Gen. Im Exon 18 (Abb. 12) zeigten weder die Tumorzelllinien A 427, SKMES-1, LUTCML-54, RPMI 2650, H-Messo, LXF 289, Calu-6, A549, LX-1, Sitta, C4-1, SW 756, Caski, MRI-H215, Hela und MRI H-185 noch die konstitutionellen DNA-Proben der Personen 5.1 (2036), 4.2 (2035), 5.2 (2034), 4.1 (2033), 11.2 (2032), 11.0 (2003) sowie der Patienten 2.0 (2031), 9.0 (2030) und 2010 eine Abweichung zum Wildtyp.

Im Exon 20 (Abb. 13) zeigte keine der Zelllinien MRI-H186, Hela, MRI-H125, Caski, SW 756, C4-1, Sitta, LX-1, Calu-6 und LXF-289 sowie die konstitutionelle DNA 2003 Hinweise auf eine Mutation. Die Lungenkarzinomzelllinie A 549 dagegen zeigte eine leichte Verzögerung in der Wanderungsgeschwindigkeit. Die Ursache dafür konnte in der Sequenzierung als Basenaustausch A4031G nachgewiesen werden. Bei diesem Basenaustausch handelt es sich um einen Einzelnukleotidpolymorphismus (*single nucleo-*

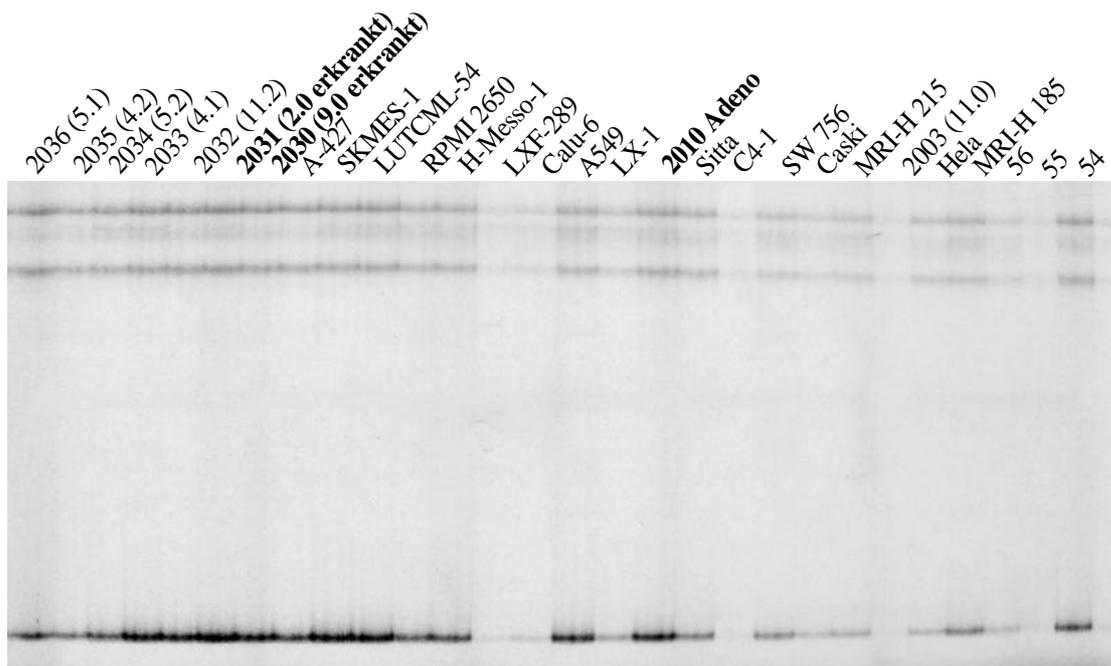


Abbildung 12: SSCP-Analyse des Exon 18 des *RON*-Gens in der Chromosomenregion 3p21.3 in der konstitutionellen DNA bei Mitgliedern der Lungenkarzinomfamilie und an DNA aus Zelllinien von Lungen- und Zervixkarzinomen. DNA 2036, 2035, 2034, 2033 und 2032 sind nicht erkrankte Familienmitglieder aus der 4. Generation (Kinder) und 2003 (11.0) ist eine nicht erkrankte Person der 3. (betroffenen) Generation der Lungenkarzinomfamilie, 2031 und 2030 sind DNA-Proben der erkrankten Familienmitglieder 2.0 und 9.0. A-247, SKMES-1, LUTCML-54, RPMI-2650 sind Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen, H-Messo-1 ist eine Mesotheliomzelllinie, LXF-289 und Calu-6 sind Zelllinien von Lungenadenokarzinomen, A549 und LX-1 sind Lungenkarzinomzelllinien, 2010 ist die konstitutionelle DNA eines Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge; Sitta, C4-1, SW 756, Caski, MRI-H215, Hela, und MRI-H 185 sind Zervixkarzinomzelllinien; 54-56 sind Kontrollproben. Das 223 bp lange radioaktiv markierte PCR-Fragment zeigt nach Denaturierung in die Einzelstränge, Polyacrylamidgelelektrophorese unter renaturierenden Bedingungen und Autoradiographie sowohl die beiden Banden der komplementären Einzelstränge (oben) als auch eine Bande der Heteroduplex (unten). Die DNA der Individuen 56, 55 und 54 zeigt ein Wildtypbandenmuster. Alle anderen DNA-Proben zeigen ebenfalls das Wildtypmuster (D. Angeloni, persönliche Mitteilung).

tide polymorphism, SNP), der bei gesunden Personen vorkommen kann (D. Angeloni, persönliche Mitteilung).

Die Abbildung 14 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der SSCP-Analysen im *a2ä2*-Gen. Hierbei zeigte die Lungenkarzinomzelllinie LUTCML-54 im Vergleich zur Adenokarzinomzelllinie LXF 298 ein abweichendes Bandenmuster, das sich auch in den amplifizierten DNA-Proben der Personen 4.1 (2033) und 4.2 (2035) fand, jedoch nicht in den amplifizierten DNA-Proben der Personen 8.1 (2039), 5.3 (2038), 5.1 (2037), 9.0 (2030), 2.0 (2031), 13.0 (2043), 5.2 (2034) und 5.1 (2036).

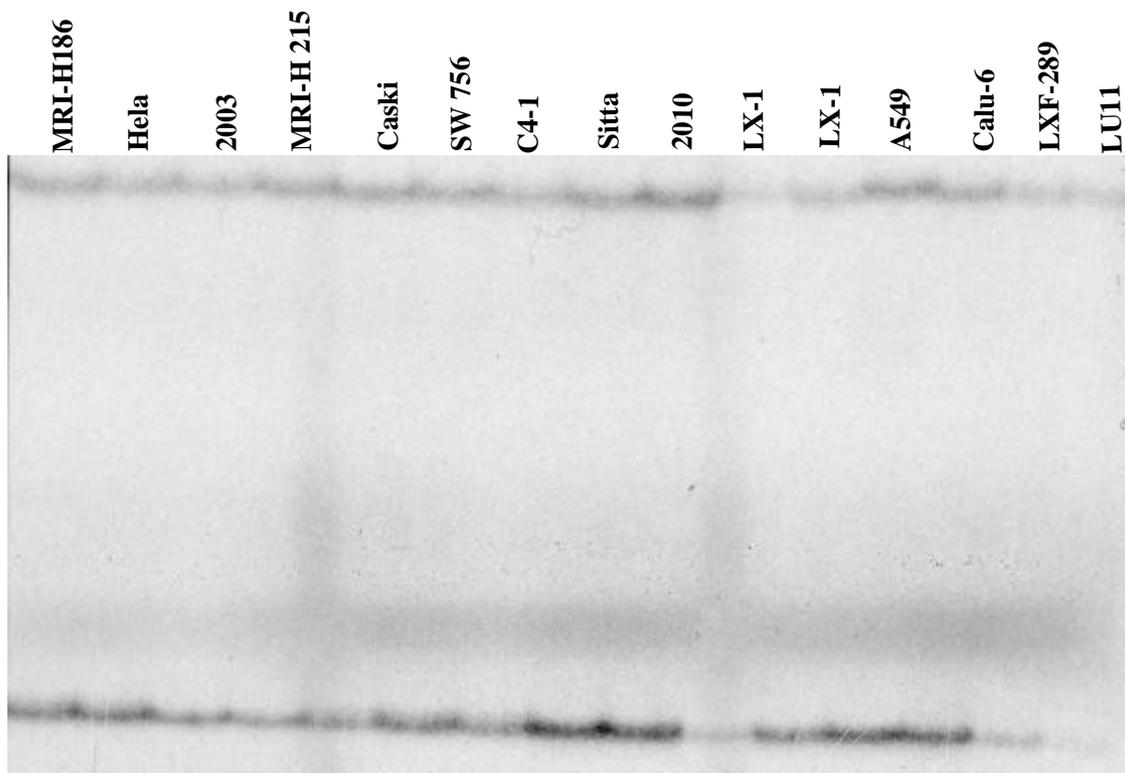


Abbildung 13: SSCP Analyse des Exon 20 des *RON*-Gens in der Chromosomenregion 3p21.3 in der DNA von Lungenkarzinom- und Zervixkarzinomzelllinien. Ebenso wurde die konstitutionelle DNA einer nicht erkrankten Person der 3. (betroffenen) Generation der Lungenkarzinomfamilie (2003) und eines Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge (2010) untersucht. Die Lungenkarzinomzelllinien waren (LX-1, A549, Calu-6 (Adenokarzinom) und LXF-289 (Adenokarzinom)). Die Zervixkarzinomzelllinien waren MRI-H 186, HeLa, MRI-H215, Caski, SW 756, C4-1 und Sitta. Das 180 bp lange, radioaktiv markierte PCR-Fragment zeigt nach Denaturierung in die Einzelstränge, Polyacrylamidgelelektrophorese unter renaturierenden Bedingungen und Autoradiographie sowohl ein Signal für die Einzelstrangbanden (oben) als auch die Heteroduplex (unten). Alle DNA Proben zeigten ein Wildtyp SSCP Muster wie in Lu11. Die DNA der Lungenkarzinomlinie A549 zeigte eine leicht verzögerte Wanderung der Einzelstrangbanden, was in der Sequenzierung als homozygoter Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) des Nukleotids A4031G bestätigt wurde (D. Angeloni, persönliche Mitteilung).

Auch in diesem Fall handelt es sich um einen Polymorphismus, der jedoch noch nicht genauer charakterisiert werden konnte (D. Angeloni, persönliche Mitteilung).

Insgesamt konnte weder in den für die Kinase Domäne kodierenden Genabschnitten von *RON* (876F-971R, 921F-1011R und Exon 14-20) noch im untersuchten Abschnitt des *a2ä2* – Gens Hinweise auf prädisponierende oder Tumor-assoziierte Mutation nachgewiesen werden (Abbildungen 12, 13 und 14).

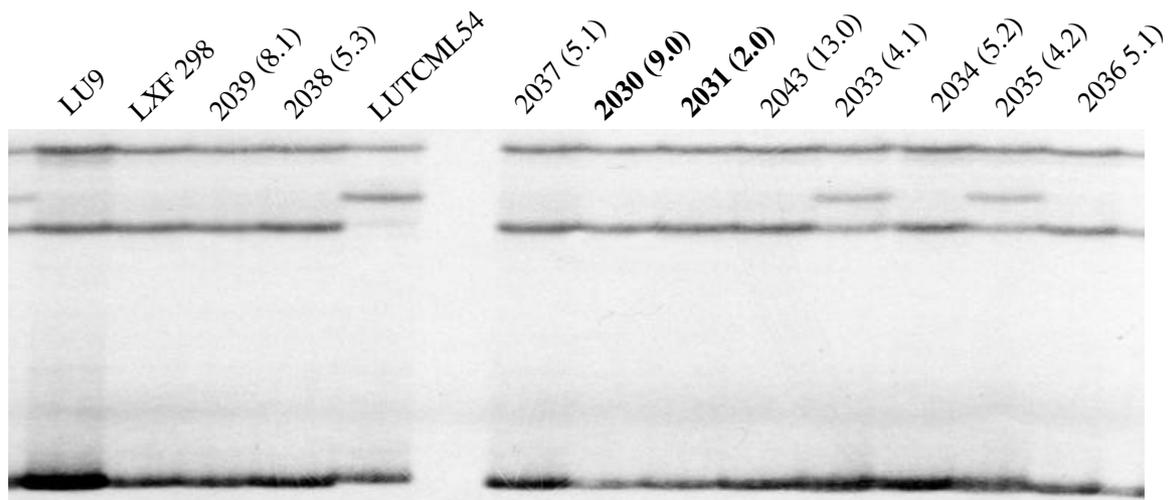


Abbildung 14: SSCP Analyse im *a2ä2*-Gen (3p21.3) in der konstitutionellen DNA von Mitgliedern der Lungenkarzinomfamilie und Lungenkarzinomzelllinien. Die Lungenkarzinomzelllinien waren LXF-289 (Adenokarzinom) und LUTCML-54. Die Familienproben beinhalteten die DNA Proben der beiden erkrankten Familienmitglieder 2.0 (2031) 9.0 (2030) sowie den nicht betroffenen Mitgliedern 8.1 (2039), 5.3 (2038), 5.1 (2037), 13.0 (2043), 4.1 (2033), 5.2 (2034), 4.2 (2035) und 5.1 (2036). LU9 ist eine Vergleichs-DNA einer anderen Zelllinie. Das 115 bp lange radioaktiv markierte PCR-Fragment (Primer: LU9 2F und LU9 2R) zeigt nach Denaturierung in die Einzelstränge, Polyacrylamidgelelektrophorese unter renaturierenden Bedingungen und Autoradiographie sowohl zwei Signale für Einzelstrangbanden (oben) als auch die Heteroduplex (unten). LU9 zeigt das Wildtypmuster. Die anderen Proben zeigen denselben Wildtyp, mit Ausnahme der Proben LUTCML54, 2033 und 2035, die einen noch nicht näher charakterisierten Polymorphismus im *a2ä2*-Gen aufweisen, der sich durch eine zusätzliche Bande zwischen den beiden normalen Einzelstrangbanden darstellt (D. Angeloni, persönliche Mitteilung).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird eine Familie beschrieben, die 1993 im Rahmen anamnestischer Erhebungen eines Lungenkarzinompatienten in der thoraxchirurgischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar durch das häufige Auftreten von Malignomen unter Geschwistern aufgefallen war. Für diese Familie wurde anhand der Angaben über das Geburtsalter und den Verwandtschaftsgrad sowie Angaben über die bis dahin aufgetretenen Karzinome der Familienstammbaum erhoben. Besonders eindrucksvoll erwies sich, daß bei Abschluß der hier vorgelegten Studie fünf von 13 Geschwistern an einem Lungenkarzinom erkrankt oder verstorben waren und daß bei einem weiteren Bruder die Verdachtsdiagnose aufgestellt wurde. Diese familiäre Häufung, zusammen mit dem durchschnittlich niedrigen Erkrankungsalter von 56 Jahren bei den gesicherten Fällen, weist auf eine mögliche genetische Prädisposition für das Lungenkarzinom hin. Laut Angaben der Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter beim Lungenkarzinom um das 67ste Lebensjahr (<http://www.rki.de/GBE/KREBS/BROSCHUERE2/BROSCHUERE2.HTM>).

Eine ähnliche Situation eines um etwa zehn Jahre vorgezogenen Erkrankungsalters bei einer familiär gehäuft auftretenden Karzinomerkrankung wurde 1979 von Cohen et al. beschrieben. Es handelte sich dabei um eine große italo-amerikanischen Familie, in der zehn Familienmitglieder ein klarzelliges Nierenzellkarzinom entwickelten und deshalb eine genetische Prädisposition vermutet wurde (Cohen et al., 1979). Im Rahmen der in der Folge erfolgreichen Identifizierung des Nierenzellkarzinomgens *VHL* (Latif et al., 1993) erwies sich diese Familie initial als ausschlaggebend für die Lokalisierung des relevanten Tumorsuppressorgens. Es war nämlich gelungen, die Erkrankung des familiären Nierenzellkarzinoms mit dem Auftreten und der Segregation einer konstitutionellen genetischen Aberration, einer Translokation zwischen den Chromosomen 3 und 8 [t(3; 8) (p14; q24) in Verbindung zu bringen (Cohen et al., 1979; Li et al., 1993). Später wurden andere Familien mit häufigem Nierenzellkarzinom und chromosomalen Translokationen beschrieben und immer war das Chromosom 3 involviert (Pathak et al., 1982, Kovacs et al., 1989). Aus diesem Grund wurde ein relevantes Nierenzellkarzinomgen zunächst am Chromosom 3p-Bruchpunkt vermutet, was sich später zwar nicht als korrekt erwies, schließlich aber doch zur Identifizierung des *VHL*-Gens in der Regi-

on 3p25-26 führte (Latif et al., 1993, Schmidt et al., 1995). Die Beobachtung und sorgfältige wissenschaftliche Erhebung und Evaluierung der Familien mit familiärer Häufung des Nierenzellkarzinoms gaben somit einer Entwicklung Aufschwung, die innerhalb der letzten 20 Jahre zu einer Revolution der Erkenntnisse und Entdeckung neuer biologischer Mechanismen der Tumorgenese beim Nierenzellkarzinom führte. Hervorzuheben ist hier nicht nur die Entdeckung eines neuen Tumorsuppressorgens, sondern vor allem die Entdeckung eines neuen biologischen Mechanismus der Tumorentstehung. Denn als Adaptermolekül zwischen der Ubiquitin-Ligase und der Proteindegradationsmaschinerie und den zu zerstörenden zellulären Faktoren übernimmt das VHL-Protein die Kontrolle über den physiologischen Abbau von Proteinen in der Zelle und löst bei Störung die Tumorgenese aus (Ohh und Kaelin, 1999).

Diese eindrucksvolle Entwicklung bei der Aufklärung der Ursachen des Nierenzellkarzinoms zeigt auf, welcher hohe Stellenwert seltenen Beobachtungen und Ereignissen wie dem familiär gehäuften Auftreten von Tumoren zukommt. Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Anhaltspunkte für ein familiär gehäuft auftretendes Lungenkarzinom bei einer Familie aus Niederbayern sind deshalb von großer Bedeutung, da das Lungenkarzinom mit an der Spitze sowohl der Krebsneuerkrankungen als auch der durch Krebs verursachten Sterbefälle steht und trotz aufwendiger Bemühungen seine genetischen Ursachen immer noch nicht aufgeklärt werden konnten. Die hier beschriebene Familie könnte somit sowohl anhand ihrer Familien- und Krankengeschichte als auch anhand des biologischen Materials der einzelnen Familienmitglieder nützlich und wertvoll für die Identifizierung eines Lungenkarzinomgens sein.

Eine familiäre Häufung des Lungenkarzinoms wurde bereits 1964 epidemiologisch untermauert (Tokuhata und Lilienfeld, 1963; Tokuhata, 1964). Damals wurde eine höhere, durch Malignome bedingte Mortalitätsrate bei Angehörigen von Lungenkarzinompatienten beobachtet und es wurde gezeigt, daß der Anteil von Malignomen des Respirationstraktes nach Korrektur für den Raucherstatus ungefähr dreimal so hoch war wie bei den Kontrollen. In einer anderen Arbeit wurde eine erhöhte Lungenkrebsmortalität bei Geschwistern von Lungenkarzinompatienten beschrieben (Fraumeni et al., 1975). Darüber hinaus wurde über eine Assoziation des Lungenkarzinoms mit anderen Karzino-

men bei Familien berichtet. Ein erhöhtes Karzinomrisiko wurde hier insbesondere für die Trachea, die Bronchien, die Lunge, die Nasenhöhle, den Larynx, den Uterus, die Zervix, die Ovarien und andere weibliche Geschlechtsorgane beschrieben (Lynch et al., 1986; Sellers et al., 1987). Auch wenn es hinsichtlich der unterschiedlichen histologischen Subtypen keine signifikanten Unterschiede gibt, scheint das Risiko für das gemeinsame Auftreten mit anderen Tumoren bei Angehörigen von SCLC-Patienten am größten zu sein (Sellers et al., 1992 a).

Dennoch sind Berichte über Familien mit mehreren Bronchialkarzinomen unter Geschwistern oder über mehrere Generationen in einer Familie selten. Die Häufung von Lungenkarzinomen und die Assoziation mit anderen Tumoren bei den wenigen bekannten Beispielen erscheint jedoch eindrucksvoll und nicht zufällig. So beschrieben zum Beispiel Goffman et al. zwei Familien, bei denen in der ersten Familie fünf von 12 Geschwistern ein Lungenkarzinom hatten (Goffman et al., 1982). Weitere Tumoren bei den Geschwistern waren ein Larynxkarzinom und eine akute myeloische Leukämie (AML). Die Mutter verstarb am Mammakarzinom und andere Tumoren bei Verwandten beinhalteten Malignome der Leber und des Ovars, ein Larynxkarzinom, ein Uterusleiomyom, ein Basaliom, ein malignes Melanom und einen Glomustumor. In der zweiten Familie waren unter elf Geschwistern vier Lungenkarzinome aufgetreten. Eine Patientin hatte darüber hinaus ein duktales Mammakarzinom und andere Familienmitglieder waren an einem Larynxkarzinom, einem Malignom des Kiefers und einem papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinom erkrankt.

In einer anderen Familie wurde in der dritten von vier dokumentierten Generationen von drei Lungenkarzinomen unter zehn Geschwistern berichtet. In dieser Familie verstarb eine weitere Schwester an Brustkrebs und eine andere an einem Genitalkarzinom. In den anderen Generationen waren keine Malignome zu anamnestizieren (Nagy et al., 1968). In einer weiteren 10-köpfigen Geschwisterreihe traten bei vier Geschwistern Lungenkarzinome auf und ein weiterer Bruder verstarb an einer chronischen Lungenerkrankung. Ein anderes Familienmitglied war an einem Hirntumor erkrankt (Biran et al., 1991). Ebenso wurde über drei von sieben Geschwistern berichtet, die an einem Alveolarzellkarzinom erkrankt waren (Paul et al., 1987).

Daß eine familiäre Häufung des Lungenkarzinoms nicht auf die ethnische Gruppe der Kaukasier beschränkt ist, wurde durch die Beobachtung von Brisman et al. belegt, die eine ähnliche Häufung von Lungenkarzinomen bei vier von acht Geschwistern einer schwarzen Familie beschrieben. Alle Betroffenen entwickelten ein Plattenepithelkarzinom der Lunge (Brisman et al., 1967). Die Möglichkeit einer vorliegenden genetischen Prädisposition wurde darüber hinaus besonders eindrucksvoll anhand der Beobachtung eines Bronchialkarzinoms bei zwei eineiigen Zwillingen belegt. Die Mutter der Zwillinge entwickelte ein Zervixkarzinom (Joishy et al., 1977).

Mit Ausnahme der Beobachtungen der beiden eineiigen Zwillinge wurde die Häufung des Lungenkarzinoms in großen Familien, d. h. mit sieben und mehr Geschwistern gemacht. Da in den industrialisierten Ländern die Anzahl von Kindern pro Familie nach dem zweiten Weltkrieg durch die allgemeine Verbesserung des Lebensstandards und die Verfügbarkeit der Antibabypille stark zurück ging, sind heute Familien mit mehr als drei bis vier Kindern eher selten. Dies könnte auch ein Grund für die seltene Beobachtung einer familiären Häufung von Lungenkarzinomen sein, was jedoch eine latent in der Bevölkerung vorhandene genetische Suszeptibilität für das Lungenkarzinom nicht ausschließen kann. Dies würde bedeuten, daß auch einem isoliert auftretenden Lungenkarzinom eine genetischen Prädisposition zugrunde liegen kann.

Auch die in dieser Studie erfaßte und beschriebene Familie stellt eine „Großfamilie“ dar, bei der ein Elternpaar 13 gemeinsame Kinder hatte und diese in einer ländlichen Gegend Niederbayerns aufzog. Ähnlich wie in den meisten in der Literatur beschriebenen Fällen wurden die noch lebenden Personen mit der Erkrankung nur in einer Generation erfaßt. Die Gründe dafür können im relativ späten Erkrankungsalter von höher als 50 Jahren liegen, was das gleichzeitige „Erleben“ eines Lungenkarzinoms in zwei aufeinanderfolgenden Generationen kaum möglich erscheinen läßt. Dennoch lag das mittlere Erkrankungsalter deutlich niedriger als das des klassischen sporadischen Lungenkarzinoms. Ähnlich zu den in der Literatur beschriebenen Familien fanden sich auch in der niederbayerischen Familie Geschwister mit anderen Tumoren, in einem Fall ein Melanom und in einem anderen Fall ein Zervixkarzinom. Mit Ausnahme des Melanompatienten, der bereits im Alter von 31 Jahren verstorben war, traten die Karzinome und ein

weiteres noch nicht gesichertes „Lungenkarzinom“ jenseits des 50sten Lebensjahres auf. Andere erblich bedingte Tumorerkrankungen zeichnen sich im Gegensatz dazu durch ein früheres Manifestationsalter aus, das in der Regel deutlich unter einem Lebensalter von 50 Jahren liegt. Beispiele sind das Retinoblastom, das sich klassischerweise im Kindesalter manifestiert (Knudson, 1971) und das von Hippel-Lindau-Syndrom, dessen assoziierte Tumoren schon im Kindesalter, in der Regel aber bis zum 45sten Lebensjahr entstanden sind (Neumann, 1987) sowie die adenomatöse *Polyposis coli*, die ebenfalls schon im Kindesalter auftreten kann (Haggit und Reid, 1986).

Multiplizität und bilaterales Auftreten bei doppelseitigen Organen als Merkmal einer genetischen Prädisposition scheinen beim Lungenkarzinom in der hier untersuchten Familie keine wesentliche Rolle zu spielen. Mit Ausnahme einer Patientin in der von Brisman et al. beschriebenen Familie, bei der während des operativen Eingriffs zur Resektion des Plattenepithelkarzinoms ein SCLC als Zweitumor in der Nachbarschaft entdeckt wurde, sind Angaben über multiple Lungenkarzinome bei Familien selten (Brisman et al., 1967; Nagy et al., 1968; Joishy et al., 1977; Goffman et al., 1982; Paul et al., 1987; Biran et al., 1991). Eine Erklärung dafür könnte in der überaus schlechten Prognose des Lungenkarzinoms liegen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beim Lungenkarzinom beträgt laut Angaben der Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland für Männer lediglich 9% und für Frauen 17% (<http://www.rki.de/GBE/KREBS/BROSCHUERE2/BROSCHUERE2.HTM>). Die Überlebenszeit bis zum möglichen Auftreten eines Zweittumors ist somit möglicherweise zu kurz.

Das mittlere Manifestationsalter von 56 Jahren wirft die Frage nach zusätzlichen Risikofaktoren für das Lungenkarzinom bei der untersuchten Familie aus Niederbayern auf. Ähnlich wie bei der von Brisman et al. beschriebenen schwarzen Familie (Brisman et al., 1967) waren alle Patienten starke Raucher. Rauchen ist bekanntermaßen ein Hauptrisikofaktor des Lungenkarzinoms (Müller, 1939; Doll et al., 1980; Doll und Hill, 1999). Raucher sind 22 mal häufiger und Raucherinnen 12 mal häufiger vom Lungenkarzinom betroffen als Nichtraucher und Nichtraucherinnen. Dabei erhöht sich die Sterblichkeit mit der Verdopplung der „Pack-years“ um das zwei- bis vierfache (Häubinger und Huber, 1996). Wer früh mit dem Rauchen beginnt kann ein bis zu 30-fach

erhöhtes Risiko haben, das sich nach Aufgabe der Rauchgewohnheit mit der Zunahme des rauchfreien Intervalls wieder verringert (Häußinger und Huber, 1996). Während in Deutschland nach den Angaben der Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland bei Männern mindestens 90% und bei Frauen 30-60% der Lungenkrebserkrankungen dem Hauptrisikofaktor Rauchen zugeschrieben werden (<http://www.rki.de/GBE/KREBS/BROSCHUERE2/BROSCHUERE2.HTM>), liegen die Angaben einer internationalen Studie sogar noch höher (Capewell et al., 1991). Auch Passivrauchen erhöht das Lungenkarzinomrisiko. Bei Nichtrauchern sollen 20% der Bronchialkarzinome auf das Passivrauchen zurückzuführen sein (Correa et al., 1983; Zöchbauer et al., 1994).

Unter den mehr als 5000 Haupt- und Nebenprodukten des Zigarettenrauches befinden sich Kanzerogene wie N-Nitrosamine, Benzpyrene, Benzanthrazene und Ko-Kanzerogene (Promotoren) wie Phenole und Terpene (Zöchbauer et al., 1994; Horch, 1993). Zigarettenrauch gilt dabei als komplettes Kanzerogen, das sowohl als Initiator als auch als Promotor wirken kann (Leanderson, 1993). Für tabakspezifische Nitrosamine konnte gezeigt werden, daß sie schon in geringen Dosen in Tierexperimenten Lungentumoren verursachen (Hecht und Hoffmann, 1988). Zigarettenrauch enthält auch hohe Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffmetaboliten wie Wasserstoffperoxid und Radikale, die die Hydroxylierung von DNA und somit DNA-Strangbrüche verursachen können (Leanderson, 1993). Ein weiterer molekularer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Rauchen und Lungenkrebs ist der Nachweis von Addukten zwischen Benzo[a]pyrenmetaboliten und dem *p53*-Gen, das häufig bei Lungenkarzinomen mutiert ist (Denissenko et al., 1996). Generell geht man davon aus, daß Benzpyrene aus dem Zigarettenrauch durch DNA-Adduktbildung das Tumorgeschehen initiieren können (Lorenz, 1994).

In der Auseinandersetzung mit der Umwelt bedient sich der Körper unterschiedlicher Abwehrmechanismen die genetischen Einflüssen unterliegen. So ist z. B. die Effektivität der mukoziliaren *Clearance* genetisch determiniert. Sie hat ihre herausragende Bedeutung in der Beseitigung von Noxen aus dem Tracheobronchialsystem. Bei gleicher Anzahl von „Pack-years“ ist sie bei Lungenkarzinompatienten schlechter als bei Patienten mit reiner Raucherbronchitis (Köhler und Vastag, 1991).

Besonders hervorzuheben für die Abwehr und Entgiftung von Fremdstoffen sind wegen ihrer großen Zahl die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme (FME), die sowohl funktionell als auch genetisch polymorph sein können. Heute ist allgemein bekannt, daß auf der Basis konstitutionell determinierter FME-Polymorphismen Individuen in gute und weniger gute Metabolisierer unterschieden werden können und dieselbe Dosis eines Karzinogens interindividuell einen unterschiedlichen Effekt haben kann (Colditz et al., 1996). Es wird heute vermutet, daß diese genetisch determinierten Eigenschaften auch über die Suszeptibilität für die Entstehung von Krebs mitentscheidet (Puga et al., 1997; Evans und Relling, 1999). Beim Abbau der beim Rauchen inhalierten Karzinogene sind möglicherweise Polymorphismen der Enzymfamilien des Cytochrom P450, der Glutathion S-Transferasen (GST) und der N-Acetyltransferasen beteiligt (Hirvonen, 1999), Kouri et al., 1982; Law, 1990; Hengstler et al., 1998; Kihara et al., 1993, Antilla et al., 1995). Allgemein wird angenommen, daß die FME als Suszeptibilitätsgene im Vergleich zu hochpenetranten, prädisponierenden Genen nur einen kleinen intrinsischen Beitrag zum Krebsrisiko leisten, der erst in Verbindung mit einer Karzinogenexposition relevant werden kann. Allerdings erhöht sich durch das synergistische Zusammenwirken verschiedener FME-Polymorphismen das individuelle Krebsrisiko. Darüber hinaus könnte das hohe Krebsrisiko der Bevölkerung, das mit einer Inzidenz von jährlich mehr als 335.000 Neuerkrankungen einhergeht, durch die hohe Prävalenz der FME-Polymorphismen zu erklären sein (Puga et al., 1997). Wahrscheinlich spielen diese Zusammenhänge auch beim Lungenkarzinom eine wichtige Rolle. Im Speziellen könnte bei der hier untersuchten Familie mit fünf, wahrscheinlich sechs betroffenen Patienten eine genetische Prädisposition für das Lungenkarzinom durch mit dem Rauchen assoziierte Suszeptibilitätsfaktoren verstärkt worden sein. Die familiäre Häufung des Lungenkarzinoms würde sich somit auf der Grundlage einer genetischen Prädisposition, die ein frühes Erkrankungsalter begünstigt, im Zusammenspiel mit genetischen Suszeptibilitätsfaktoren und dem Einfluß von Rauchen erklären lassen. Diese Interpretation steht im Einklang mit der Erkenntnis, daß das Lungenkarzinom die Folge von Gen-Umweltinteraktionen ist (Tokuhata und Lilienfeld, 1963; Tokuhata, 1964; Brisman et al., 1967; Sellers et al., 1992 b).

Hinsichtlich anderer Umwelteinflüsse zur Erklärung der familiären Häufung des Lungenkarzinoms in der Familie aus Niederbayern kann keine Bewertung vorgenommen werden. Ein vergleichsweise geringer Teil aller Lungenkarzinomfälle wird auf berufliche Expositionen gegenüber verschiedenen kanzerogenen Stoffen zurückgeführt. Dazu gehören Asbest, Arsen- und Chrom VI-Verbindungen, Dichloräthylsulfid, Haloäther, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Stoffe, die ionisierende Strahlen abgeben sowie Arbeitsmaterialien wie Glas-, Keramik- und Siliziumkarbidfasern, Steinwolle und Kaliumtitanatverbindungen (Baur et al., 1994; Zöchbauer et al., 1994). Zwar ist die Lebensregion der beschriebenen Familie durch Industrie (z. B. Waschmittel, Polyäthylenglykol, Stickstoff-Kali, Aluminium u.a.) belastet und einige Patienten hatten beruflich Umgang mit Chemikalien (organische Lösungsmittel, Farben und Lacke), es kann jedoch nicht auf eine detaillierte epidemiologische Studie in der Region zurückgegriffen werden, die mögliche Zusammenhänge zu einem Lungenkarzinomrisiko erklären könnten.

Die in der Familie aus Niederbayern erfaßten Lungenkarzinompatienten gehören alle einer Generation an. Die vertikale Segregation eines möglichen Krankheitsgens wurde zwar laut Angaben der von der Familie designierten Auskunftsperson in den beiden vorangegangenen Generationen dokumentiert, es fehlen aber für diese verstorbenen Personen detaillierte und klinisch gesicherte Angaben. Dennoch erscheint die Häufung der Fälle in dieser Familie nicht zufällig. Erwähnenswert ist das auftreten dieser familiären Häufung in Bayern, einem Bundesland, das in Deutschland mit die niedrigste Mortalitätsrate beim Lungenkrebs einnimmt (Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland, 1998).

Obwohl der molekulare Nachweis einer genetischen Prädisposition in dieser Familie noch nicht erbracht werden konnte, handelt es sich hierbei um die Beschreibung einer der größten Lungenkarzinomfamilien in Hinblick auf die Anzahl von fünf, möglicherweise sogar sechs Patienten mit einem Lungenkarzinom in einer Generation.

Das Vorliegen einer genetischen Prädisposition kann nur durch die Identifizierung eines Lungenkarzinom-spezifischen genetischen Defektes erbracht werden. Seit langem ist auf der Grundlage zytogenetischer und molekulargenetischer Befunde klar, daß dem Chromosom 3p dabei eine besondere Rolle zukommt (Whang-Peng et al., 1982; Brauch

et al., 1987; Kok et al., 1987; Naylor et al., 1987; Brauch et al., 1990; Rabbits et al., 1990; Testa und Siegfried, 1992; Wistuba et al 2000). Die häufigen 3p-Verluste bei SCLC und NSCLC weisen auf mindestens ein Tumorsuppressorgen auf diesem Chromosomenabschnitt hin, das bei der Entstehung von Lungenkarzinomen eine Rolle spielt. Ein Lungenkarzinomgen konnte jedoch bis heute weder für SCLC noch für NSCLC identifiziert werden und unser Verständnis über die genetischen Veränderungen beim Lungenkarzinom sind immer noch sehr unvollständig (Sekido et al., 1998 b). Da beim Lungenkarzinom der Weg über die genetische Kopplungsanalyse aus Gründen fehlender geeigneter Familien für die Identifizierung eines Tumorsuppressorgens nicht beschritten werden konnte, konzentrierten sich die Bemühungen zunächst auf Kartierungsexperimente „zufällig“ identifizierter, seltener homozygoter 3p-Deletionen in SCLC-Zelllinien (Rabbits et al., 1990; Daly et al., 1993; Kok et al., 1994; Wei et al., 1996). Am interessantesten erschien ein kleinster überlappender deletierter Abschnitt in der 3p21.3-Region der Zelllinien GCL20, NCI-H740 und NCI-H1450, der ca. 400 kb umfaßt. Eine tumorsupprimierende funktionelle Bedeutung dieses Abschnittes konnte durch Transfektion eines insgesamt 2Mb-umfassenden DNA-Fragments in eine Maus-Sarkom-Zelllinie demonstriert werden (McNeill Killary et al., 1992). Allelverluste dieser Region sind bereits in präneoplastischen Läsionen und sogar im histologisch normal erscheinenden Lungenepithel von Rauchern und ehemaligen Rauchern identifiziert worden (Hung et al., 1995; Wistuba et al., 1997; Wistuba et al., 1999; Wistuba et al., 2000). Interessanterweise fanden sich bei Lungenkarzinompatienten sogar Verluste dieser 3p-Region in peripheren Lymphozyten, die *in vitro* mit einem im Zigarettenrauch enthaltenen Karzinogen Benzo[a]pyren-diolepoxid behandelt worden waren (Wu et al., 1998). Zusammengekommen rückten diese Befunde die 3p21.3-Region ins Zentrum der weiteren Suche nach einem Lungenkarzinomgen.

Mit Hilfe moderner Klonierungsstrategien wurde diese Region systematisch weiter erforscht, indem zunächst jeweils ein partielles *YAC contig* (Kok et al., 1994), ein *P1 contig* (Xiang et al., 1996) und ein 600 kb *cosmid contig* (Wei et al., 1996) konstruiert wurden. Homozygote Deletionen, die in SCLC-Zelllinien und bei einem Mammakarzinom identifiziert worden waren, erlaubten es schließlich die Region von Interesse auf ein 120 kb-Stück einzugrenzen (Kok et al., 1994; Wei et al., 1996; Sekido et al., 1998 a). Mammakarzinome zeichnen sich durch den häufigen Verlust der gleichen 3p-Loci wie

die Lungenkarzinome aus und es ist wahrscheinlich, daß ein Mammakarzinomgen in der Nähe eines Lungenkarzinomgens lokalisiert sein könnte (Devilee et al., 1989; Buchenhagen et al., 1994).

Im Rahmen der hier vorgelegten Studie wurden in Zusammenarbeit mit dem National Cancer Institute (Frederick, Maryland) zwei Gene der 3p21.3-Region auf konstitutionelle Defekte in der genomischen DNA der Patienten aus der niederbayerischen Lungenkarzinomfamilie, einem nicht-verwandten 33-jährigen Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge sowie auf somatische Defekte bei neun Lungenkarzinom- und sieben Zervixkarzinomzelllinien untersucht. Bei den untersuchten Genen handelte es sich um das *RON*-Gen (Ronsin et al., 1993; Angeloni et al., 2000) und das *a2ä2*-Gen (Gao et al., 2000).

RON (*MSTIR*) kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) aus der *MET* Familie, die zusammen mit dem Liganden *MSP* (*macrophage stimulating factor*) die zelluläre Proliferation antreibt und bei der Entwicklung epithelialer und neuroektodermaler Gewebe sowie von Knochen eine Rolle spielt (Wang et al., 1994; Gaudino et al., 1995; Quantin et al., 1995). *RON* wird als Vorläufermolekül synthetisiert und proteolytisch in zwei Ketten gespalten, die sich über Disulfidbrücken aneinander lagern. Das reife heterodimere Protein hat eine 35 kD extrazellulär lokalisierte α -Kette und eine 150 kD β -Kette mit einem extrazellulären, einem transmembranösen und einem intrazellulären Anteil. Die Tyrosinkinaseaktivität liegt intrazellulär. Da Mutationen in einer anderen Tyrosinkinasedomäne, dem *MET* Proto-Onkogen, mit der Tumorgenese des vererbba- ren papillären Nierenzellkarzinoms assoziiert sind (Schmidt et al., 1997 und 1998; Zbar und Lerman, 1998), schien *RON* ein sinnvoller Kandidat zur Untersuchung auf prädisponierende Mutationen beim familiären Lungenkarzinom zu sein. Bestätigt wurde diese Sichtweise auch durch Berichte über Mutationen in anderen RTKs wie *KIT* bei Mastozytomen und Gastrointestinaltumoren (Nagata et al., 1995; Piao und Bernstein, 1996; Hirota et al., 1998), und *RET* bei der multipler endokriner Neoplasie Typ 2A und 2B sowie dem familiären medullären Schilddrüsenkarzinom (Mulligan et al., 1993; Hofstra et al., 1994). Weitere Gründe, warum *RON* ein Kandidatengen für das Lungenkarzinom sein könnte, sind die Beobachtung der Induktion onkogener und metastatischer Eigenschaften nach gezielter Mutation in der *RON*-Kinasedomäne (Santoro et al., 1998). Aus-

serdem kann die Aktivierung von *RON* in Brustkrebszelllinien zur erhöhten Proliferationsrate, Migration und Metastasierung (Maggiore et al., 1998) und *Rearrangements* im für den extrazellulären Bereich kodierenden Abschnitt zu einer Veränderung der Kinasaktivität führen (Collesi et al., 1996).

In der hier vorgelegten Studie wurden weder in den untersuchten konstitutionellen DNA-Proben der Patienten und Familienmitglieder der niederbayerischen Lungenkarzinomfamilie, noch bei einem nicht-verwandten 33-jährigen Patienten mit einem Adenokarzinom Anhaltspunkte für eine im *RON*-Gen verankerte Prädisposition für das Lungenkarzinom gefunden. Gleichermäßen gab es keine Anhaltspunkte für somatische Veränderungen bei den untersuchten Zelllinien von SCLC, NSCL und Zervixkarzinomen.

Das *a2ä2* (*CACNA2D2*)-Gen ist in der gemeinsam überlappenden Region homozygoter Deletionen von SCLC und Mammakarzinom lokalisiert (Gao et al., 2000; Sekido et al., 1998 a; Wei et al., 1996). *a2ä2* stellt eine Hilfsuntereinheit spannungsabhängiger Kalziumkanäle dar, die überwiegend in Lunge, Hoden, Herz und Pankreas exprimiert werden (Gao et al., 2000). Eine klinische Verbindung zwischen spannungsabhängigen Kalziumkanälen und dem SCLC ist im Rahmen des Lambert-Eaton-Syndroms bekannt, einem pseudomyasthenischen Syndrom, bei dem es infolge einer Autoimmunreaktion gegen Peptide spannungsabhängiger Kalziumkanäle zur Störung der neuromuskulären Reizübertragung infolge der Blockade von Acetylcholinrezeptoren der motorischen Endplatte kommt (O'Neill et al., 1988). Wahrscheinlich werden diese Antikörper infolge starker Expression der Kanalproteine beim SCLC gebildet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Teile des *a2ä2*-Gens molekulargenetisch analysiert. Mit Ausnahme des Nachweises polymorpher Allele bei gesunden Personen gab es keine Anhaltspunkte dafür, daß das *a2ä2*-Gen eine prädisponierende Rolle beim Lungenkarzinom spielt. Gleichermäßen konnten keine Anhaltspunkte für somatische Veränderungen bei Zelllinien von SCLC und NSCL sowie Zervixkarzinomen identifiziert werden.

Während der Zeit dieser Doktorarbeit wurden bis heute mit Hilfe experimenteller und Informatik-gestützter Methoden 25 Gene in der 120 kb umfassenden kritischen Region der kleinsten gemeinsamen Überlappungen homozygoter Mutationen identifiziert (Ler-

man and Minna, im Druck). Ziel allgemeiner Anstrengungen ist es jetzt, diese Gene systematisch auf prädisponierende oder tumorspezifische Alterationen hin zu untersuchen. Eines dieser Gene, *RASSF1*, das ein Ras-assoziiertes, lösliches, zytoplasmatisches Protein codiert, wurde von Dammann et al. geklont und das Transkriptionsprodukt A der drei Transkriptionsprodukte A, B und C, das zusammen mit dem Transkriptionsprodukt C in allen normalen Geweben exprimiert wird, konnte in keiner der untersuchten SCLC-Zelllinien festgestellt werden. Eine Reexpression dieses Transkripts in Lungenkarzinomzellen konnte die Tumorbildung in Nacktmäusen verhindern (Dammann et al., 2000).

Das gewonnene biologische Material der in dieser Studie beschriebenen und dokumentierten Lungenkarzinomfamilie aus Niederbayern steht in ausreichender und integrierter Form für weiterführende molekularbiologische Untersuchungen dieser zur Gene Verfügung und sollte einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung eines Lungenkarzinomgens leisten können.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Frühjahr 1996 bis Frühjahr 1998 am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie in Zusammenarbeit mit der thoraxchirurgischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar und im Forschungslabor der Frauenklinik und Poliklinik des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf, Hamburg, durchgeführt. Teile der molekularbiologischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Debora Angeloni und Herrn Dr. Michael Lerman, Laboratory of Immunobiology, National Cancer Institute, Frederick/USA, durchgeführt. Hauptsächliches Ziel der Arbeit war, einen wissenschaftliche Beitrag zu leisten, der zur Klärung der Genese von Lungenkarzinomen beitragen kann.

Das Lungenkarzinom trägt wesentlich zur Morbidität in unserer Gesellschaft bei und zeigt bei Frauen eine immer noch steigende Inzidenz. Trotz intensiver Bemühungen sind bisher die molekularen Ursachen noch nicht aufgeklärt. Krebsbelastete Familien spielten bei der Aufklärung der molekularen Ursachen von Tumorerkrankungen schon vielfach eine Rolle. Beispiele sind das Retinoblastom, die familiäre adenomatöse *Polyposis coli*, das VHL-Syndrom, das Mammakarzinom u. a..

In Analogie könnten auch Lungenkarzinomfamilien bei der Klonierung eines Lungenkarzinomgens hilfreich sein, jedoch sind diese Familien extrem selten.

In dieser Arbeit ist es gelungen, eine solche seltene Familie zu beschreiben, die durch das häufige Auftreten von Lungenkarzinomen unter Geschwistern aufgefallen war. Es handelt sich dabei um eine der größten erfaßten und beschriebenen Lungenkarzinomfamilien. Von 13 Geschwistern haben fünf ein gesichertes Lungenkarzinom und bei einem weiterer Bruder besteht der klinisch-radiologische Verdacht eines Lungenkarzinoms. Bei zwei weiteren Geschwistern traten jeweils ein malignes Melanom und ein Zervixkarzinom auf. Wegen der möglicherweise herausragenden Bedeutung dieser Familie für die weitere Erforschung der Genese des Bronchialkarzinoms wurde von den Mitgliedern der Familie, d. h. der betroffenen Geschwistergeneration und auch von der noch nicht betroffenen Generation der Nachkommen eine umfassende Sammlung von Daten angelegt, die Auskunft über den individuellen Gesundheitszustand, den histopathologischen Befund und Krankheitsverlauf der Patienten, den Raucherstatus und mögliche anderen Expositionen geben. Darüber hinaus wurde von allen Personen biolo-

gisches Material in Form von DNA und B-Zellkulturen für zukünftige weiterführende Forschungsarbeiten asserviert und mit ersten molekularen Arbeiten zur Identifizierung eines relevanten Lungenkarzinomlokus begonnen.

Folgende Beiträge zur Erforschung der Ätiologie des Lungenkarzinoms wurden geleistet:

- Es wurde anamnestisch der Stammbaum einer Familie mit häufigem Lungenkarzinom über vier Generationen erstellt.
- Es wurden die Gesundheitsdaten, die Rauchgewohnheiten und möglichen Expositionen mit Hilfe eines Fragebogens für 26 Mitglieder dieser Familie erfaßt.
- Es wurden die klinischen und pathologischen Daten von fünf Lungenkarzinompatienten und einem Lungenkarzinom-Verdachtspatienten anhand der Krankenakten sowie von einer Patientin mit Zervixkarzinom und von einem Melanompatienten anhand der Auskunft eines Familienmitgliedes erfaßt.
- In zwei Fällen wurde das Lungenkarzinom histopathologisch überprüft und gesichert.
- Es wurde bei den Patienten starke Rauchergewohnheiten dokumentiert.
- Es wurden von den Familienmitgliedern DNA-Proben aus Blut isoliert.
- Es wurden B-Zellkulturen als permanente DNA-Quelle der Familienmitglieder angelegt und asserviert.
- Mittels Mikrosatellitenanalysen wurden Kreuzkontaminationen zwischen diesen Proben ausgeschlossen.
- Die konstitutionelle DNA der Mitglieder dieser Lungenkarzinomfamilie wurden für die Analyse von 25 kürzlich neu kartierten und zum Teil neu identifizierten Genen der kritischen 3p21.3-Verdachtsregion für ein Lungenkarzinomgen zur Verfügung gestellt.
- Zum Vergleich wurden ebenfalls DNA-Proben aus Tumorzelllinien von SCLC und NSCLC und von Zervixkarzinomen bereitgestellt.

- Erste Mutationsanalysen in zwei dieser Gene *RON* und *a2ä2* zeigten weder Hinweise auf das Vorliegen einer Keimbahnmutation bei Mitgliedern der Lungenkarzinomfamilie noch Hinweise auf somatische Mutationen in den Tumorzelllinien.

Zusammengenommen wurde mit dieser Arbeit die Basis zum Verständnis der familiären Häufung des Lungenkarzinoms in der beschriebenen Familie geschaffen. Aufbauend auf dieser Datensammlung können zukünftig mögliche Befunde hinsichtlich des Auftretens neuer Tumoren in dieser Familie in die Datensammlung integriert und der Informationsgehalt zum Lungenkarzinomrisiko noch erweitert werden. Allgemein betrachtet wurde somit die Voraussetzung zur molekularen Analyse von Lungenkarzinom-Kandidatengenen an geeignetem biologischen Material geschaffen. An diesem biologischen Material könnte künftig die Identifizierung eines prädisponierenden Gens oder eines Suszeptibilitätsgens für das Lungenkarzinom möglich sein. Die Identifizierung eines Lungenkarzinomgens wäre ein erster Schritt hin zur Prävention des Lungenkarzinoms und möglicherweise auch hin zu verbesserten Therapieansätzen.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- Angeloni D., Danilkovitch-Miagkova A., Ivanov S. V., Breathnach R., Johnson B. E., Leonard E. J., Lerman M. I.: Gene Structure of the Human Receptor Tyrosine Kinase RON and Mutation Analysis in Lung Cancer Samples; *Genes, Chromosomes & Cancer*; 2000; 29: 147-156
- Anttila S., Luostarinen L., Hirvonen A., Elovaara E., Karjalainen A., Nurminen T., Hayes J. D., Vainio H., Ketterer B.: Pulmonary expression of glutathione S-transferase M3 in lung cancer patients: association with GSTM1 polymorphism, smoking, and asbestos exposure; *Cancer Res.*; 1995; 55: 3305-3309
- Baer R., Bankier A. T., Biggin M. D., Deininger P. L., Farrell P. J., Gibson T. J., Hatfull G., Hudson G. S., Satchwell S. C., Seguin C., Tuffnell P. S., Barrell B. G.: DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome; *Nature*; 1984; 310: 207-211
- Baur X., Marczyński B., Voß B.: Bronchopulmonale Präkanzerosen und Tumoren: Risikogruppen aus Arbeitsmedizinischer Sicht; *Pneumologie*; 1994; 48: 825-834
- Baur X., Konietzko N.: Umwelt- und Berufskrankheiten; *Pneumologie*; 1996; 50: 604-606
- Becker N., Wahrendorf J. (Hrsg.): Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland; Springer-Verlag Berlin-Heidelberg; 3. Auflage; 1998
- Bennett W.P., Colby T. V., Travis W. D., Borkowski A., Jones R. T., Lane D. P., Metcalf R. A., Samet J. M., Takeshima Y., Gu J. R., Vähäkangas K. H., Soini Y., Pääkkö P., Welsh J. A., Trump B. F., Harris C. C.: p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia; *Cancer Res.*; 1993; 53: 4817-4822
- Biran D. H., Goldstein J., Cohen Y.: A cancer-prone kindred with four siblings afflicted by aggressive poorly differentiated bronchogenic carcinoma; *Lung Cancer*; 1991; 7: 345-353
- Bishop M. J.: Cellular oncogenes and retroviruses; *Ann. Rev. Biochem.*; 1983; 52: 301-354
- Bishop J. M.: Molecular themes in oncogenesis; *Cell*; 1991; 64: 235-248
- Blot W. J., Fraumeni J. F., Jr.: Geographic patterns of lung cancer: industrial correlations; *Am. J. Epidemiol.*; 1976; 103: 539-550
- Bohmann D., Bos T. J., Admon A., Nishimura T., Vogt P. K., Tjian R.: Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1; *Science*; 1987; 238: 1386-1392
- Brack C., Nattaj I. W., Gautschi J., Cammisuli S.: Cyclosporin A is a differential inhibitor of eukaryotic RNA polymerases; *Exp. Cell Res.*; 1984; 151(2): 314-321
- Branscheid D., Beqiri S., Vogt-Moykopf J.: Chirurgische Behandlung des Bronchialkarzinoms; *Internist*; 1994; 35: 751-754
- Brauch H., Johnson B., Hovis J., Yano T., Gazdar A., Pettengill O. S., Graziano S., Sorenson G. D., Poiesz B. J., Minna J., Linehan M., Zbar B.: Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small-cell and non-small-cell carcinoma of the lung; *N. Engl. J. Med.*; 1987; 317: 1109-1113
- Brauch H., Tory K., Kotler F., Gazdar A., Pettengill O. S., Johnson B., Graziano S., Winton T., Buys C.H. C. M., Sorenson G. D., Poiesz B. J., Minna J. D., Zbar B.: Molecular mapping of deletion sites in the short arm of chromosome 3 in human lung cancer; *Genes, Chromosomes & Cancer*; 1990; 1: 240-246

- Brauch H., Weirich G., Brieger J., Glavac D., Rodl H., Eichinger M., Feurer M., Weidt E., Puranakanitstha C., Neuhaus C., Pomer S., Brenner W., Schirmacher P., Storkel S., Rotter M., Masera A., Gugeler N., Decker H.J.: VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation; *Cancer Res.*; 2000; 60(7): 1942-1948
- Brisman R., Baker R. R., Elkins R., Hartmann W. H.: Carcinoma of lung in four siblings; *Cancer*; 1967; 20: 2048-2053
- Buchhagen D. L.: Frequent involvement of chromosome 3p alterations in lung carcinogenesis: Allelotypes of 215 established cell lines at six chromosome 3p loci; *J. Cell. Biochem. Suppl.*; 1996; 24: 198-209
- Buchhagen D. L., Qiu L., Etkind P.: Homozygous deletion, rearrangement and hypermethylation implicate chromosome region 3p14.3-3p21.3 in sporadic breast-cancer development; *Int. J. Cancer*; 1994; 57(4): 473-479
- Burch P. R. J.: Carcinogenesis and cancer Prevention; *Nature*; 1963; 197: 1145-1151
- Capewell S., Sankaran R., Lamb D., McIntyre M., Sudlow M. F.: Lung cancer in lifelong non-smokers; *Thorax*; 1991; 46:565-568
- Carbone D. P.: The biology of lung cancer; *Sem. Onc.*; 1997; 24: 388-401
- Carritt B., Kok K., van den Berg A., Osinga J., Pilz A., Hofstra R. M. W., Davis M. B., van der Veen A. Y., Rabbitts P. H., Gulati K., Buys C. H. C. M.: A gene from human chromosome region 3p21 with reduced expression in small-cell lung cancer; *Cancer Res.*; 1992; 52: 1536-1541
- Cavenee W. K., Dryja T. P., Phillips R. A., Benedict W. F., Godbout R., Gallie B. L., Murphree A. L., Strong L. C., White R. L.: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma; *Nature*; 1983; 305: 779-784
- Chiba I., Takahashi T., Nau M. M., D'Amico D., Curiel D. T., Mitsodomi T., Buchhagen D. L., Carbone D., Piantadosi S., Koga H., Reissman P. T., Slamon D. J., Holmes E. C., Minna J. D.: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer; *Oncogene*; 1990; 5: 1603-1610
- Cohen A. J., Li F. P., Berg S., Marchetto D. J., Tsai S., Jacobs S. C., Brown R. S.: Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation; *N. Engl. J. Med.*; 1979; 301(11):592-595
- Colditz, G., DeJong W., Hunter D., Trichopoulos D., Willett W (Hrsg.): *Harvard Report on Cancer Prevention*; *Cancer Causes and Control*; 1996; 7: 3-59
- Collesi C., Santoro M. M., Gaudino G., Comoglio P. M.: A splicing variant of the RON transcript induces constitutive tyrosine kinase activity and an invasive phenotype; *Mol. Cell Biol.*; 1996; 16(10): 5518-5526
- Comings D. E.: A General Theory of Carcinogenesis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1973; 70: 3324-3328
- Cook R. M., Burke B. J., Buchhagen D. L., Minna J. D., Miller Y. E.: Human aminoacylase-1; cloning, sequence, and expression analysis of a chromosome 3p21 gene inactivated in small cell lung cancer; *J. Biol. Chem.*; 1993; 268: 17010-17017
- Cook R. M., Franklin W. A., Moore M. D., Johnson B. E., Miller Y. E.: Mutational inactivation of aminoacylase-I in a small cell lung cancer cell line; *Genes, Chromosomes & Cancer*; 1998; 21: 320-325
- Cooper C.A., Carey F. A., Bubb V. J., Lamb D., Kerr K. M., Wyllie A. H.: The pattern of K-ras mutation in pulmonary adenocarcinoma defines a new pathway of tumour development in the human lung; *J. Pathol.*; 1997; 181: 401-404

- Correa P., Pickle L. W., Fontham E., Lin Y., Haenszel W.: Passive smoking and lung cancer; *Lancet*; 1983; 2: 595-597
- Crissman J.D., Visscher D. W., Sakr W.: Premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: Pathologic classification; *J. Cell Biochem.; Suppl.*; 1993; 17F: 49-56
- Dalla-Favera R., Bregni M., Erikson J., Patterson D., Gallo R. C., Croce C. M.: Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1982; 79: 7824-7827
- Daly M. C., Xiang R.-H., Buchhagen D., Hensel C. H., Garcia D. H., Killary A. M., Minna J. D., Naylor S. L.: A homozygous deletion on chromosome 3 in a small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressor activity; *Oncogene*; 1993; 8: 1721-1729
- D'Amico D., Carbone D. P., Johnson B. E., Meltzer S. J., Minna J. D.: Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very frequent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer; *Cancer Res.*; 1992; 52: 1996-1999
- Dammann R., Li C., Yoon J. H., Chin P. L., Bates S., Pfeifer G. P.: Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3; *Nat. Genet.*; 2000; 25(3):315-319
- Denissenko M. F., Pao A., Tang M-S., Pfeifer G. P.: Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53; *Science*; 1996; 274: 430-432
- Devilee P., van den Broek M., Kuipers-Dijkshoorn N., Kolluri R., Khan P. M., Pearson P. L., Cornelisse C. J.: At least four different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinoma; *Genomics*; 1989; 5(3): 554-556
- Diez M., Maestro M., Torres A., Ortega D., Gómez A., Sánchez A., Hernando F., Balibrea J. L.: Prediction of recurrence by quantification of p185neu protein in non-small-cell lung cancer tissue; *Br. J. Cancer*; 1997; 75: 684-689
- Dillman R. O., Seagren S. L., Propert K. J., Guerra J., Eaton W. L., Perry M. C., Carey R. W., Frei E. F., Green M. R.: A randomized trial of induction chemotherapy plus high-dose radiation versus radiation alone in stage III non-small-cell lung cancer; *N Engl J Med*; 1990; 323: 940-945
- Doll R., Gray R., Hafner B., Peto R.: Mortality in relation to smoking: 22 years' observations on female British doctors; *Br. Med. J.*; 1980; 280(6219): 967-971
- Doll R., Hill A. B.: Smoking and carcinoma of the lung. Preliminary report. 1950; *Bull. World Health Organ.*; 1999; 77(1):84-93
- Downward J., Yarden Y., Mayes E., Scrace G., Totty N., Stockwell P., Ullrich A., Schlessinger J., Waterfield M. D.: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences; *Nature*; 1984; 307: 521-527
- Dragani T. A., Manenti G., Pierotti M. A.: Genetics of murine lung tumors; *Adv. Cancer Res.*; 1995; 67: 83-112
- Eckersberger F.: Bronchuskarzinom; *Wien. med. Wschr.*; 1994; 144: 545-547
- Evans W. E., Relling M. V.: Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics; *Science*; 1999; 286(5439): 487-491
- Fearon E. R., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis; *Cell*; 1990; 61: 759-767
- Feddersen C.O., v. Wichert, P.: Diagnostische Strategien beim Bronchialkarzinom; *Internist*; 1994; 35: 724-729

- Fong K. M., Biesterveld E. J., Virmani A., Wistuba I., Sekido Y., Bader S. A., Ahmadian M., Ong S. T., Rassool F. V., Zimmerman P. V., Giaccone G., Gazdar A. F., Minna J. D.: FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations; *Cancer Res.*; 1997; 57: 2256-2267
- Fraumeni J. F., Jr., Wertelecki W., Blattner W. A., Jensen R. D., Leventhal B. G.: Varied manifestations of a familial lymphoproliferative disorder; *Am. J. Med.*; 1975; 59: 145-151
- Friend S. H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R. A., Rapaport J. M., Albert D. M., Dryja T. P.: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma; *Nature*; 1986; 323: 643-646
- Fung Y.-K. T., Murphree A. L., T'Ang A., Qian J., Hinrichs S. H., Benedict W. F.: Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene; *Science* ; 1987; 236:1657-1661
- Gao B., Sekido Y., Maximov A., Saad M., Forgacs E., Latif F., Wei M. H., Lerman M., Lee J. H., Perez-Reyes E., Bezprozvanny I., Minna J. D.: Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2); *J. Biol. Chem.*; 2000; 275(16): 12237-12242
- Gaudino G., Avantaggiato V., Follenzi A., Acampora D., Simeone A., Comoglio P. M.: The proto-oncogene RON is involved in development of epithelial, bone and neuro-endocrine tissues; *Oncogene*; 1995; 11(12): 2627-2637
- Gazdar A. F., Bader, S., Hung J., Kishimoto Y., Sekido Y., Sugio K., Virmani A., Fleming J., Carbone D. P., and Minna J. D.: Molecular genetic changes found in human lung cancer and its precursor lesions; *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*; 1994; 59: 565-572
- Gessler M., Poustka A., Cavenee W., Neve R. L., Orkin S. H., Bruns G. A. P.: Homozygous deletion in Wilms tumors of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping; *Nature*; 1990; 343: 774-778
- Gnarra J.R., Tory K., Weng Y., Schmidt L., Wei M.H., Li H., Latif F., Liu S., Chen F., Duh F. M.: Mutations of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma; *Nature Genet.*; 1994; 7(1): 85-90
- Goffman T. E., Hassinger D. D., Mulvihill J. J.: Familial respiratory tract cancer: Opportunities for research and prevention; *JAMA*; 1982; 247:1020-1023
- Haggitt R. C., Reid B. J.: Hereditary gastrointestinal polyposis syndromes; *Am. J. Surg. Pathol.*; 1986; 10(12): 871-887
- Häußinger K., Huber R. M.: Bronchialkarzinom (Lungenkrebs); *Pneumologie*; 1996; 50: 599-603
- Hamilton S. R.: Molecular Genetics of Colorectal Carcinoma; *Cancer Suppl.*; 1992; 70: 1216-1221
- Harris H., Miller O.J., Klein G., Worst P., Tachibana T.: Suppression of malignancy by cell fusion; *Nature*; 1969; 223: 363-368
- Hecht S. S., Hoffmann D.: Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke; *Carcinogenesis*; 1988; 9(6): 875-84
- Heim S., Mitelman F.: Primary Chromosome Abnormalities In Human Neoplasia; *Adv. Canc. Res.*; 1989; 52: 1-43
- Heisterkamp N., Stephenson J. R., Groffen J., Hansen P. F., de Klein A., Bartram C. R., Grosveld G.: Localisation of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelotic leukaemia; *Nature*; 1983; 306: 239-242

- Hengstler J. G., Arand M., Herrero M. E., Oesch F.: Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility; *Recent Results Cancer Res.*; 1998; 154: 47-85
- Herskowitz I.: Functional inactivation of genes by dominant negative mutations; *Nature*; 1987; 329: 219-222
- Hibi K., Takahashi T., Yamakawa K., Ueda R., Sekido Y., Ariyoshi Y., Suyama M., Takagi H., Nakamura Y., Takahashi T.: Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer; *Oncogene*; 1992; 7: 445-449
- Hillerdal G.: Pleural plaques and risk for bronchial carcinoma and mesothelioma. A prospective study; *Chest*; 1994; 105: 144-150
- Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y., Hashimoto K., Nishida T., Ishiguro S., Kawano K., Hanada M., Kurata A., Takeda M., Muhammad Tunio G., Matsuzawa Y., Kanakura Y., Shinomura Y., Kitamura Y.: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors; *Science*; 1998; 279(5350): 577-580
- Hirvonen A.: Chapter 20. Polymorphic NATs and cancer predisposition; *IARC Sci. Publ.*; 1999; 148: 251-270
- Hofstra R. M., Landsvater R. M., Ceccherini I., Stulp R. P., Stelwagen T., Luo Y., Pasini B., Hoppener J. W., van Amstel H. K., Romeo G.: A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma; *Nature*; 1994; 367(6461): 375-376
- Horch R.: Bronchialkarzinome: Die Bedeutung des Tabakrauchens für die Karzinomentwicklung; *Versicherungsmedizin*; 1993; 45: 191-194
- Hung J., Kishimoto Y., Sugio K., Virmani A., McIntire D., Minna J., Gazdar A. F.: Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the Pathogenesis of lung carcinoma; *JAMA*; 1995; 273: 558-563
- Hunter T., Sefton B. M.: Transforming gene product of rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine; *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*; 1980; 77: 1311-1315
- Johnston M. R.: Selecting patients with lung cancer for surgical therapy; *Sem. Oncol.*; 1988; 15: 246-254
- Joishy S. K., Cooper R. A., Rowley P. T.: Alveolar cell carcinoma in identical twins. Similarity in time of onset, histochemistry, and site of metastasis; *Ann. Int. Med.*; 1977; 87: 447-450
- Kappos A. D.: Bronchialkarzinom durch Umweltfaktoren; *Pneumologie*; 1994; 48: 523-525
- Khuri F. R., Kurie J. M., Hong W. K.: Chemoprevention of respiratory tract cancer; *Hem./Onc. Clinics of North America*; 1997; 11: 387-408
- Kihara M., Kihara M., Noda K., Okamoto N.: Increased risk of lung cancer in Japanese smokers with class mu glutathione S-transferase gene deficiency; *Cancer Lett.*; 1993; 71: 151-155
- Kishimoto Y., Sugio K., Hung J. Y., Virmani A. K., McIntire D. D., Minna J. D., Gazdar A. F.: Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small-cell lung cancer; *J. Natl. Cancer Inst.*; 1995; 87: 1224-1229
- Knudson A. G., Jr.: Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1971; 68: 820-823
- Knudson A. G., Jr.: Hereditary cancer: clues to mechanisms of carcinogenesis; *Br. J. Cancer*; 1989; 59: 661-666
- Köhler D., Vastag E.: Bronchiale Clearance; *Pneumologie*; 1991; 45: 314-332

- Kok K., van den Berg A., Veldhuis P. M. J. F., van der Veen A. Y., Franke M., Schoenmakers E. F. P. M., Hulsbeek M. M. F., van der Hout A. H., de Leij L., van de Ven W., Buys C. H. C. M.: A homozygous deletion in a small cell lung cancer cell line involving a 3p21 region with a marked instability in yeast artificial chromosomes; *Cancer Res.*; 1994; 54: 4183-4187
- Kok K., Hofstra R., Pilz A., van den Berg A., Terpstra P., Buys C. H. C. M., Carritt B.: A gene in the chromosomal region 3p21 with greatly reduced expression in lung cancer is similar to the gene for ubiquitin-activating enzyme; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1993; 90: 6071-6075
- Kok K., Naylor S. L., Buys C. H. C. M.: Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for tumor suppressor genes; *Adv. Canc. Res.*; 1997; 52: 27-92
- Kok K., Osinga J., Carritt B., Davis M. B., van der Hout A. H., van der Veen A. Y., Landsvater R. M., de Leij L. F. M. H., Berendsen H. H., Postmus P. E., Poppema S., Buys C. H. C. M.: Deletion of a DNA-sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer; *Nature*; 1987; 330: 578-581
- Kouri R. E., McKinney C. E., Slomiany D. J., Snodgrass D. R., Wray N. P., McLemore T. L.: Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes; *Cancer Res.*; 1982; 42: 5030-5037
- Koutselini H., Kappatou G., Yiagnisis M., Field J. K., Spandidos D. A.: Immunocytochemical study of RAS oncoprotein in cytologic specimens of primary lung tumours; *Anticancer Res.*; 1990; 10: 597-603
- Kovacs G., Brusa P., De Riese W.: Tissue-specific expression of a constitutional 3;6 translocation: development of multiple bilateral renal-cell carcinomas; *Int. J. Cancer*; 1989; 43(3): 422-427
- Krönke M., Leonard W. J., Depper J. M., Arya S. K., Wong-Staal F., Gallo R. C., Waldmann T. A., Greene W. C.: Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1984; 81(16):5214-5218
- Land H., Parada L. F., Weinberg R. A.: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes; *Nature*; 1983; 304: 596-602
- Latif F., Tory K., Gnarr J., Yao M., Duh F.-M., Orcutt M. L., Stackhouse T., Kuzmin I., Modi W., Geil L., Schmidt L., Zhou F., Li H., Wei M. H., Chen F., Glenn G., Choyke P., Walther M. M., Weng Y., Duan D.-S. R., Dean M., Glavac D., Richards F. M., Crossey P. A., Ferguson-Smith M. A., Le Paslier D., Chumakov I., Cohen D., Chinault A. C., Maher E. R., Linehan W. M., Zbar B., Lerman M. I.: Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene; *Science*; 1993; 260: 1317-1320
- Law M. R.: Genetic predisposition to lung cancer; *Br. J. Cancer*; 1990; 61: 195-206
- Leal F., Williams L. T., Robbins K. C., Aaronson S. A.: Evidence that the v-sis gene product transforms by interaction with the receptor for platelet-derived growth factor; *Science*; 1985; 230: 327-330
- Leanderson P.: Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 1993; 28: 249-261
- Leduc F., Brauch H., Hajj C., Dobrovic A., Kaye F., Gazdar A., Harbour W., Pettengill O. S., Sorenson G. D., van den Berg A., Kok K., Campling B., Paquin F., Bradley W. E. C., Zbar B., Minna J., Buys C., Ayoub J.: Loss of heterozygosity in a gene coding for a thyroid hormone receptor in lung cancer; *Am. J. Hum. Genet.*; 1989; 44:282-287
- Lee W.-H., Bookstein R., Hong F., Young L.-J., Shew J.-Y., Lee E. Y.-H. P.: Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning Identification, and sequence; *Science* ; 1987; 235: 1394-1399
- Lerman M. I. and Minna J. D.: The 630-kb Lung Cancer Homozygous Deletion Region on Human Chromosome 3p21.3: Identification and Evaluation of the Resident Candidate Tumor Suppressor Genes; *im Druck*

- Li F. P., Decker H. J., Zbar B., Stanton V. P. Jr., Kovacs G., Seizinger B. R., Aburatani H., Sandberg A. A., Berg S., Hosoe S.: Clinical and genetic studies of renal cell carcinomas in a family with a constitutional chromosome 3;8 translocation. *Genetics of familial renal carcinoma; Ann. Intern. Med.*; 1993; 118(2): 106-111
- Little C. D., Nau M. M., Carney D. N., Gazdar A. F., Minna J. D.: Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines; *Nature*; 1983; 306: 194-196
- Lorenz J.: Neue Zellbiologische Erkenntnisse zur Entstehung des Bronchialkarzinoms; *Internist*; 1994; 35: 692-699.
- Lynch H. T., Kimberling W. J., Markvicka S. E., Biscone K. A., Lynch J. F., Whorton E., Mailliard J.: Genetics and smoking-associated cancers: A study of 485 families; *Cancer*; 1986; 57: 1640-1646
- Maggiore P., Marchio S., Stella M. C., Gai M., Belfiore A., De Bortoli M., Di Renzo M. F., Costantino A., Sismondi P., Comoglio P. M.: Overexpression of the RON gene in human breast carcinoma; *Oncogene*; 1998; 16(22): 2927-2933
- Malkin D., Li F. P., Strong L. C., Fraumeni J. F., Jr., Nelson C. E., Kim D. H., Kassel J., Gryka M. A., Bischoff F. Z., Tainsky M. A., Friend S. H.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms; *Science*; 1990; 250: 1233-1238
- Marino P., Preatoni A., Cantoni A.: Randomized trials of radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in stages III a and III b nonsmall cell lung cancer; *Cancer*; 1995; 76: 593-601
- McNeill Killary A. M., Wolf M. E., Giamberti T. A., Naylor S. L.: Definition of a tumor suppressor locus within human chromosome 3p21-p22; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1992; 89: 10877-10881
- Merlo A., Gabrielson E., Askin F., Sidransky S.: Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer; *Cancer Res.*; 1994; 54: 640-642
- Miller G. and Lipman M.: Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus; *J. Exp. Med.*; 1973; 138(6): 1398-1412
- Müller J. H.: Tabakmißbrauch und Lungenkarzinom; *Z. Krebsforsch.*; 1939; 49: 57-85
- Müller K.-M.; Theile A.: Lungentumoren: Pathologisch-anatomische Diagnostik; *Internist*; 1994; 35: 710-723
- Mulligan L. M., Kwok J. B., Healey C. S., Elsdon M. J., Eng C., Gardner E., Love D. R., Mole S. E., Moore J. K., Papi L.: Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A; *Nature*; 1993; 363(6428):458-460
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction; *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*; 1986; 51 Pt 1: 263-273
- Nagata H., Worobec A. S., Oh C. K., Chowdhury B. A., Tannenbaum S., Suzuki Y., Metcalfe D. D.: Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1995; 92(23): 10560-10564
- Nagy I.: Zur Beobachtung von Bronchialkarzinomen bei drei Brüdern; *Prax. Pneumol.*; 1968; 22: 718-723
- Nau M. M., Brooks B. J., Battey J., Sausville E., Gazdar A. F., Kirsch I. R., McBride O. W., Bertness V., Hollis G. F., Minna J. D.: L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer; *Nature*; 1985; 318: 69-73
- Naylor S. L., Johnson B. E., Minna J. D., Sakaguchi A. Y.: Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer; *Nature*; 1987; 329: 451-454

- Neitzel H.: A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines; *Hum. Genet.*; 1986; 73: 320-326
- Neumann H. P.: Basic criteria for clinical diagnosis and genetic counselling in von Hippel-Lindau syndrome; *J. Vasc. Dis.*; 1987; 16(3): 220-226
- O'Briant K. C., Bepler G.: Delineation of the centromeric and telomeric chromosome segment 11p15.5 lung cancer suppressor regions LOH 11A and LOH 11B; *Genes Chromosom. Cancer*; 1997; 18: 111-114
- Ohh M., Kaelin W. G. Jr.: The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: new perspectives; *Mol. Med. Today*; 1999; 5(6):257-263
- Olopade O. I., Buchhagen D. L., Malik K., Sherman J., Nobori T., Bader S., Nau M. M., Gazdar A. F., Minna J. D., Diaz M. O.: Homozygous loss of the interferon genes defines the critical region on 9p that is deleted in lung cancers; *Cancer Res.*; 1993; 53: 2410-2415
- O'Neill J. H., Murray N. M., Newsom-Davis J.: The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases; *Brain*; 1988; 111(Pt 3): 577-596
- Papadopoulos N., Nicolaidis N. C., Wei Y.-F., Ruben S. M., Carter K. C., Rosen C. A., Haseltine W. A., Fleischmann R. D., Fraser C. M., Adams M. D., Venter J. C., Hamilton S. R., Petersen G. M., Watson P., Lynch H. T., Peltomäki P., Mecklin J.-P., de la Chapelle A., Kinzler K. W., Vogelstein B.: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer; *Science*; 1994; 263: 1625-1629
- Pathak S., Strong L. C., Ferrell R. E., Trinidad A.: Familial renal cell carcinoma with a 3;11 chromosome translocation limited to tumor cells; *Science*; 1982; 217(4563): 939-941
- Paul S. M., Bacharach B., Goepf C.: A genetic influence on alveolar cell carcinoma; *J. Surg. Oncol.*; 1987; 36: 249-252
- Piao X., Bernstein A.: A point mutation in the catalytic domain of c-kit induces growth factor independence, tumorigenicity, and differentiation of mast cells; *Blood*; 1996; 87(8): 3117-3123
- Puga A., Nebert D. W., McKinnon R. A., Menon A. G.: Genetic polymorphisms in human drug-metabolizing enzymes: potential uses of reverse genetics to identify genes of toxicological relevance; *Crit. Rev. Toxicol.*; 1997; 27(2): 199-222
- Quantin B., Schuhbauer B., Gesnel M. C., Doll'e P., Breathnach R.: Restricted expression of the ron gene encoding the macrophage stimulating protein receptor during mouse development; *Dev. Dyn.*; 1995; 204(4): 383-390
- Rabbitts P., Bergh J., Douglas J., Collins F., Waters J.: A submicroscopic homozygous deletion at the D3S3 locus in a cell line isolated from a small cell lung carcinoma; *Genes Chromosom. Cancer*; 1990; 2: 231-238
- Rabin H., Neubauer R. H., Hopkins R. F., Nonoyama V.: Further characterization of a Herpes virus-positive orang-utan cell line and comparative aspects of in vitro transformation with lymphotropic old world primate Herpes viruses; *Int. J. Cancer*; 1978; 21: 762-767
- Rickinson A.: Epstein-Barr virus in epithelium; *Nature*; 1984; 310(5973): 99-100
- Rodenhuis S. and Slebos R. J. C.: Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer; *Cancer Res.*; 1992; Suppl. 52: 2665s-2669s
- Rosenthal R., Doermer A.: Der Spontanverlauf des Bronchialkarzinoms: Eine Untersuchung zur Überlebenszeit; *Versicherungsmedizin*; 1989; 41: 149-150

- Roth J. A., Nguyen D., Lawrence D. D., Kemp B. L., Carrasco C. H., Ferson D. Z., Hong W. K., Komaki R., Lee J. J., Nesbitt J. C., Pisters K. M. W., Putnam J. B., Schea R., Shin D. M., Walsh G. L., Dolormente M. M., Han C-I., Martin F. D., Yen N., Xu K., Stephens L. C., McDonnell T. J., Mukhopadhyay T., Cai D.: Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer; *Nature Medicine*; 1996; 2: 985-991
- Rusch V, Klimstra D., Linkov I., Dmitrovsky E.: Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development; *Cancer Res.*; 1995; 55: 1365-137
- Santoro M., Wong W. T., Aroca P., Santos E., Matoskova B., Grieco M., Fusco A., di Fiore P. P.: An epidermal growth factor receptor/ret chimera generates mitogenic and transforming signals: evidence for a ret-specific signaling pathway; *Mol. Cell Biol.*; 1994; 14(1): 663-675
- Sato S., Nakamura Y., Tsuchiya E.: Difference of allelotype between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung; *Cancer Res.*; 1994; 54: 5652-5655
- Satoh H., Lamb P. W., Dong J. T., Everitt J., Boreiko C., Oshimura M., Barrett J. C.: Suppression of tumorigenicity of A549 lung adenocarcinoma cells by human chromosomes 3 and 11 introduced via microcell-mediated chromosome transfer; *Mol. Carcinog.*; 1993; 7: 157-164
- Satoh Y., Ishikawa Y., Nakagawa K., Hirano T., Tsuchiya E.: A follow-up study of progression from dysplasia to squamous cell carcinoma with immunohistochemical examination of p53 protein overexpression in the bronchi of ex-chromate workers; *Br. J. Cancer*; 1997; 75: 678-683
- Schmidt L., Li F, Brown R. S., Berg S., Chen F., Wei M. H., Tory K., Lerman M.I., Zbar B.: Mechanism of Tumorigenesis of Renal Carcinomas Associated with the Constitutional Chromosome 3;8 Translocation; *Cancer J. Sci. Am.*; 1995 1(3):191
- Schmidt L., Duh F. M., Chen F., Kishida T., Glenn G., Choyke P., Scherer S. W., Zhuang Z., Lubensky I., Dean M., Allikmets R., Chidambaram A., Bergerheim U. R., Feltis J. T., Casadevall C., Zamarron A., Bernues M., Richard S., Lips C. J., Walther M. M., Tsui L. C., Geil L., Orcutt M. L., Stackhouse T., Zbar B.: Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas; *Nat. Genet.*; 1997; 16(1): 68-73
- Schmidt L., Junker K., Weirich G., Glenn G., Choyke P., Lubensky I., Zhuang Z., Jeffers M., Vande Woude G., Neumann H., Walther M., Linehan W. M., Zbar B.: Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene; *Cancer Res.*; 1998; 58(8): 1719-1722
- Sekido Y., Ahmadian M., Wistuba I. I., Latif F., Bader S., Wei M.-H., Duh F.-M., Gazdar A. F., Lerman M. I., Minna J. D.: Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene; *Oncogene*; 1998; 16: 3151-3157 a
- Sekido Y., Fong K. M., Minna J. D.: Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer; *Biochim. Biophys. Acta*; 1998; 1378(1): F21-59 b
- Sellers T. A., Elston R. C., Atwood L. D., Rothschild H.: Lung cancer histologic type and family history of cancer; *Cancer*; 1992; 69: 86-91 a
- Sellers T. A., Potter J. D., Bailey-Wilson J. E., Rich S. S., Rothschild H., Elston R. C.: Lung cancer detection and Prevention: Evidence for an interaction between smoking and genetic predisposition; *Cancer Res. Suppl.*; 1992; 52: 2694s-2697s b
- Sellers T. A., Ooi W. L., Elston R. C., Chen V. W., Bailey-Wilson J. E., Rothschild H.: Increased familial risk for non-lung cancer among relatives of lung cancer patients; *Am. J. Epidemiol.*; 1987; 126: 237-246

Sozzi G., Miozzo M., Donghi R., Pilotti S., Cariani C. T., Pastorino U., Della Porta G., Pierotti M. A.: Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung; *Cancer Res.*; 1992; 52: 6079-6082

Sozzi G., Miozzo M., Pastorino U., Pilotti S., Donghi R., Giarola M., De Gregorio L., Manenti G., Radice P., Minoletti F., Della Porta G., Pierotti M. A.: Genetic evidence for an independent origin of multiple preneoplastic and neoplastic lung lesions; *Cancer Res.*; 1995; 55: 135-140

Stanbridge E. J.: Suppression of malignancy in human cells; *Nature*; 1976; 260: 17-20

Stanbridge E. J.: A genetic basis for tumor suppression; *CIBA Symposium*; 1989; 142: 149-159; John Wiley and Sons, New York

Steppling H.: Lokal angreifende therapeutische Maßnahmen beim Bronchialkarzinom; *Internist*; 1994; 35: 730-739

Sugden B., Phelps M., Domoradzki J.: Epstein-Barr virus DNA is amplified in transformed lymphocytes; *J. Virol*; 1979; 31(3): 590-595

Sundaresan V., Ganly P., Hasleton P., Rudd R., Sinha G., Blechen N. M., Rabbitts P.: p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumors, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus; *Oncogene*; 1992; 7: 1989-1997

Takahashi T., Takahashi T., Suzuki H., Hida T., Sekido Y., Ariyoshi Y., Ueda R.: The p53 gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern; *Oncogene*; 1991; 6: 1775-1778

Tanaka H., Shimizu M., Horikawa I., Yokota J., Barrett J. C., Oshimura M.: Evidence for a putative telomerase repressor gene in the 3p14.2-p21.1 region; *Genes Chromosom. Cancer*; 1998; 23: 123-133

Taub R., Kirsch I., Morton C., Lenoir G., Swan D., Tronick S., Aaronson S., Leder P.: Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1982; 79: 7837-7841

Testa J. R., Siegfried J. M.: Chromosome abnormalities in human non-small cell lung cancer; *Cancer Res.*; 1992; 52: 2702s-2706s

Thiberville L., Bourguignon J., Metayer J., Bost F., Diarra-Mehrpour M., Bignon J., Lam S., Martin J.-P., Nouvet G.: Frequency and prognostic evaluation of 3p21-22 allelic losses in non-small-cell lung cancer; *Int. J. Cancer (Pred Oncol)*; 1995; 64: 371-377

Todd S., Franklin W. A., Varella-Garcia M., Kennedy T., Hilliker C. E., Hahner L., Anderson M., Wiest J. S., Drabkin H. A., Gemmill R. M.: Homozygous deletions of human chromosome 3p in lung tumors; *Cancer Res.*; 1997; 57: 1344-1352

Tokuhata G. K. und Lilienfeld A. M.: Familial aggregation of lung cancer among hospital patients; *Public Health Reports*; 1963; 78: 277-283

Tokuhata G. K.: Familial factors in human lung cancer and smoking; *Am. J. Pub. Health.*; 1964; 54: 24-32

Tran Y. K.; Bögler O., Gorse K. M., Wieland I., Green M. R., Newsham I. F.: A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer; *Cancer Res.*; 1999; 59:35-43

Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität (Hrsg.): Tumoren der Lunge und des Mediastinums; Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Tumorzentrum München; 4. Auflage; 1997

- Virmani A. K., Fong K. M., Kodagoda D., McIntire D., Hung J., Tonk V., Minna J. D., Gazdar A. F.: Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types; *Genes, Chromosomes & Cancer*; 1998; 21: 308-319
- Volm M.: Prognostische Bedeutung der DNS-Ploidie und der Verteilung der Zellzyklus-Phasen beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom: Eine 5-Jahres-Überlebenszeit-Studie; *Versicherungsmedizin*; 1989; 41: 2-6
- Wang M. H., Ronsin C., Gesnel M. C., Coupey L., Skeel A., Leonard E. J., Breathnach R.: Identification of the ron gene product as the receptor for the human macrophage stimulating protein; *Science*; 1994; 266(5182): 117-119
- Wei M.-H., Latif F., Bader S., Kashuba V., Chen J.-Y., Duh F.-M., Sekido Y., Lee C.-C., Geil L., Kuzmin I., Zbarovsky E., Klein G., Zbar B., Minna J. D., Lerman M. I.: Construction of a 600-kilobase cosmid contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG; *Cancer Res.*; 1996; 56: 1487-1492
- Weinberg R. A.: Tumor suppressor genes; *Science*; 1991; 254: 1138-45
- Werner J., Henle G., Pinto C. A., Haff R. F., Henle W.: Establishment of continuous lymphoblast cultures from leukocytes of gibbons (*Hylobates lar*); *Int. J. Cancer*; 1972; 10: 557-567
- Whang-Peng J., Kao-Shan C. S., Lee E. C.: Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer: Deletion 3p(14-23); *Science*; 1982; 215: 181-182
- Wistuba I. I., Behrens C., Virmani A. K., Mele G., Milchgrub S., Girard L., Fondon J. W. 3rd, Garner H. R., McKay B., Latif F., Lerman M. I., Lam S., Gazdar A. F., Minna J. D.: High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints; *Cancer Res.*; 2000; 60(7): 1949-1960
- Wistuba I. I., Bryant D., Behrens C., Milchgrub S., Virmani A. K., Ashfaq R., Minna J. D., Gazdar A. F.: Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors; *Clin. Cancer Res.*; 1999; 5(5): 991-1000
- Wistuba I. I., Lam S., Behrens C., Virmani A. K., Fong K. M., LeRiche J., Samet J. M., Srivastava S., Minna J. D., Gazdar A. F.: Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers; *J. Natl. Cancer Inst.*; 1997; 89(18): 1366-1373
- Wolf M., Havemann K.: Chemotheraphie und kombinierte Radiochemotherapieverfahren beim Bronchialkarzinom; *Internist*; 1994; 35: 740-750
- Wu X., Gu J., Amos C. I., Jiang H., Hong W. K., Spitz M. R.: A parallel study of in vitro sensitivity to benzo[a]pyrene diol epoxide and bleomycin in lung carcinoma cases and controls; *Cancer*; 1998; 83(6):1118-1127
- Xiang R. H., Hensel C. H., Garcia D. K., Carlson H. C., Kok K., Daly M. C., Kerbacher K., van den Berg A., Veldhuis P., Buys C. H., Naylor S. L.: Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer; *Genomics*; 1996; 32(1): 39-48
- Xu H.-J., Quinlan D. C., Davidson A. G., Hu S.-X., Summers C. L., Li J., Benedict W. F.: Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma; *J. Natl. Cancer Inst.*; 1994; 86: 695-699
- Yamakawa K., Takahashi T., Horio Y., Murata Y., Takahashi E., Hibi K., Yokoyama S., Ueda R., Takahashi T., Nakamura Y.: Frequent homozygous deletions in lung cancer cell lines detected by a DNA marker located at 3p21.3-p22; *Oncogene*; 1993; 8: 327-330

Yates J., Warren N., Reisman D., Sugden B.: A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells; Proc. Natl. Acad. Sci USA; 1984; 81(12): 3806-3810

Yokota J., Wada M., Shimosato Y., Terada M., Sugimura T.: Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1987; 84: 9252-9256

Zbar B., Lerman M.: Inherited carcinomas of the kidney; Adv. Cancer Res.; 1998; 75: 163-201

Zöchbauer S., Krajnik K., Huber H.: Bronchuskarzinom-Entstehung, Diagnose, Therapie, Prognose; Wien. Klin. Wochenschr.; 1994; 106: 431-447

7.2 Rezepte und Arbeitsstoffe

Alle wäßrigen Lösungen und Puffer wurden mit entmineralisiertem Wasser (Aqua dest.) hergestellt. Die hochmolekularen Stammlösungen wurden durch einen 0,45 µl Sterilfilter (Nalgene) gereinigt. Soweit nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von der Firma Sigma bezogen.

Gele

1%iges Agarosegel

1 g SeaKem-Agarose (FMC, Biozym) wurde in 100 ml 1×TBE gestreut und im Mikrowellenherd erhitzt, bis sie vollständig gelöst war. Unter das noch flüssige Agarosegel wurden 5 µl Ethidiumbromid gemischt und anschließend das Gel luftblasenfrei in eine Gelform (15×10 cm) gegossen. Der eingesetzte Gelkamm konnte nach einer Stunde Aushärten herausgezogen werden.

2%iges Agarosegel

Das 2%ige Agarosegel wurde analog dem 1%igen unter Verwendung von 2 g Agarose pro 100 ml 1×TBE hergestellt.

8%iges Polyacrylamidgel

Sequagel-Konzentrat (Biozym)

Sequagel-Diluent (Biozym)

Sequagel-Puffer (Biozym)

Ammoniumpersulfat (APS)

TEMED

32 ml Sequagel-Konzentrat, 58 ml Sequagel-Diluent und 10 ml Sequagel-Puffer wurden gemischt. Zur Initiation der Polymerisation wurden im Anschluß zu dem Gemisch 1 ml 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) und 20 µl TEMED gegeben, gemischt und zügig luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen.

Lösungen und Puffer

10%iges Ammoniumpersulfat (APS)

APS

1 g APS wurde in 10 ml Wasser gelöst und in 1 ml Portionen bei -20°C aufbewahrt.

Chloroform-IAA

Chloroform p.a. (Merck)

Isoamylalkohol p.a. (IAA) (Merck)

960 ml Chloroform wurden mit 40 ml IAA gemischt. Der Zusatz von IAA verhindert das Schäumen bei der DNA-Extraktion.

Chloroform wirkt narkotisch und ist krebserregend.

Cyclosporin A (1 mg/ml)

Cyclosporin A

absoluter Ethanol

Tween 80 (Merck)

RPMI (Gibco BRL)

10 mg Cyclosporin A wurden in 1ml absolutem Ethanol gelöst. 100 µl dieser Stammlösung wurden mit 20 µl Tween 80 versetzt und anschließend mit 880 µl RPMI vermischt. Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

0,5 M EDTA pH 8,0

EDTA

NaOH-Pellets

186,1 g Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat $\times 2\text{H}_2\text{O}$ wurden in 800 ml Wasser zusammen mit ca. 20 g NaOH-Pellets gelöst. Es wurden solange NaOH-Pellets zugegeben bis das EDTA gelöst und ein pH von 8,0 erreicht war. Die Lösung wurde auf 1000 ml aufgefüllt.

Einfriermedium 20%

8 ml Kulturmedium werden mit 2 ml DMSO vermischt.

70%iger Ethanol

Absolutes Ethanol (Merck)

700 ml des absoluten Ethanols wurden auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

Ethidiumbromid

Ethidiumbromid

1 g Ethidiumbromid wurde für mehrere Stunden unter Rühren in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde in 1 ml-Portionen in Eppendorf-Gefäße überführt. Diese wurden vor Licht geschützt bei 4°C aufbewahrt. Ethidiumbromid ist hoch toxisch und mutagen.

Deionisiertes Formamid

Formamid

DOWEX mixed resin MR-3

500 ml Formamid und 50 g DOWEX mixed resin MR-3 werden gemischt und über einen doppelten Papierfilter filtriert. Die Lösung wird zu 50 ml aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Formamid Dyes

98% Deionisiertes Formamid

0,02% Xylencyanol

0,02% Bromphenolblau

2 mM EDTA pH 8,0

10 ml deionisiertes Formamid, 10 mg Xylencyanol, 10 mg Bromphenolblau und 200 μl EDTA pH 8,0 wurden vermischt und ergaben eine 5 \times Stocklösung. Diese wurde 1:5 mit deionisiertem Formamid verdünnt.

Gel-Ladepuffer

0,25%iges Bromphenolblau

0,25%iges Xylencyanol

30%iges Glycerin

250 mg Bromphenolblau und 100 mg Xylencyanol wurden in 100 ml einer 30%igen Glycerinlösung (30 ml Glycerin und 70 ml Wasser) unter Rühren über Nacht gelöst.

Hybridisierungslösung

20% SDS (Biorad)

PEG 8000

5 M NaCl

Na₂HPO₄-Puffer pH 7,0

70 ml 20% SDS, 10 ml 5 M NaCl, 26ml Na₂HPO₄-Puffer pH 7,0 wurden gemischt und darin 20 g PEG 8000 gelöst. Die Lösung wurde mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

Kulturmedium

RPMI (Gibco BRL)

15% fötales Kälberserum (Gibco BRL)

4 mM Glutamin (Gibco BRL)

1% Antibiotikalösung (Penicillin und Streptomycin) (Gibco BRL)

500 ml RPMI wurden mit mit 75 ml fötalem Kälberserum, 5 ml Glutamin und 5 ml Antibiotikalösung versetzt. Das Kulturmedium war bei 4°C ca. 4 Wochen haltbar.

1 M MgCl₂

MgCl₂

203,3 g MgCl₂×6H₂O wurden in 800 ml Wasser gelöst und dann auf 1000 ml aufgefüllt.

5 M NaCl

NaCl

292,2 g NaCl wurden in 800 ml Wasser aufgelöst und dann auf 1000 ml aufgefüllt.

10 M NaOH

NaOH-Pellets

200 g NaOH-Pellets wurden in 400 ml gelöst und auf 500 ml aufgefüllt.

3M Natriumazetat pH 7,0

Natriumazetat (Merck)

408,1 g Natriumazetat × 3 H₂O wurden in 800 ml Wasser gelöst und der pH wurde mit Eisessig auf pH 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde auf 1000 ml aufgefüllt, steril filtriert, in 10 ml Portionen aliquotiert und im Kühlschrank aufbewahrt.

PCR-Primer

Primer D9S1198 (MWG Biotec)

Primer D3S1350 (AG BIODV)

Primer D3S1038 (AG BIODV)

Die Konzentration der Primer-Arbeitslösungen wurde auf 20 pmol/µl eingestellt.

20 ´ MgCl₂ für die PCR

50 mM MgCl₂ (Eurobio)

Für die 10 mM MgCl₂-Lösung wurde die 50 mM MgCl₂-Lösung 1:2,5, für die 15 mM MgCl₂-Lösung 1:3,33 verdünnt. Die Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

PCR-Reagenzien

H₂O

10×Puffer (Eurobio)

dNTPs (Eurobio)

Primer (1) und (2)

Taq-Polymerase (Eurobio)

15,25 µl Wasser, 2,5 µl 10×Puffer, 4,0 µl dNTPs (je 1,25 mM), je 1 µl (20 pmol/µl) Primer (1) und (2) und 0,25 µl Taq-Polymerase (1,25 U) wurden vermischt. Zu dem Reaktionsgemisch wurde 1 µl der zu amplifizierenden DNA (100 ng/µl) pipettiert.

Phenol-Chloroform-Mix

Fertiglösung der Firma Roth

Proteinase K (20 mg/ml)

Proteinase K (Böhringer Mannheim)

1g Proteinase K wurde in 50 ml sterilem Wasser gelöst und in 1 ml Portionen bei -20°C aufbewahrt.

10%iges SDS

SDS

100g SDS wurden unter dem Abzug in 800 ml Wasser überführt, unter Rühren aufgelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

SDS ist toxisch.

20 ×SSC und 5 ×SSC

NaCl

Na-Citrat

350,6 g NaCl und 176,4 g Na-Citrat wurden in 1600 ml Wasser aufgelöst. Der pH wurde mit 6 N HCl auf 7,0 eingestellt und dann auf 2000 ml aufgefüllt. Die 5×SSC-Lösung wurde durch eine 1:4 Verdünnung aus der 20×SSC-Lösung hergestellt.

2 ×SSC, 0,1% SDS

100 ml 20×SSC-Lösung wurden mit 10 ml 10%igem SDS versetzt und das Gemisch auf 1000 ml aufgefüllt

10 ×TBE (Tris-Borat-EDTA) und 1 ×TBE

0,9 M Trisbase

0,9 M Borsäure

0,02 M EDTA pH 8,0

108 g Trisbase, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 M EDTA wurden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die 1×TBE-Lösung wurde durch eine 1:10 Verdünnung aus der 10×TBE-Lösung hergestellt.

TE-Puffer pH 7.4

10 mM Tris-HCl pH 7.5

1 mM EDTA pH 8.0

10 ml einer 1 M Tris-HCl pH 7,5-Lösung und 2 ml einer 0,5M EDTA pH 8,0-Lösung wurden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

1 M Tris-HCl pH 7,5

Trisbase

121,1 g Trisbase wurden in 800 ml Wasser gelöst und der pH mit 6 N HCl auf 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde dann auf 1000 ml aufgefüllt.

Zellkernfällungspuffer

0.075 M NaCl

0.024 M EDTA pH 8.0

15 ml einer 5 M NaCl-Lösung und 48 ml einer 0,5 M EDTA pH 8,0-Lösung wurden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Zellysepuffer

0.3 M Saccharose (USB, ultrapure)

10 mM Tris-HCl pH 7.5

5 mM MgCl₂

1% Triton X 100 (Merck)

106,9 g Saccharose wurden in ca. 800 ml Wasser gelöst und unter Rühren mit 10 ml einer 1 M Tris-HCl pH 7,5-Lösung und 5 ml einer 1 M MgCl₂-Lösung sowie 10 ml Triton X 100 versetzt. Die Lösung wurde auf 1000 ml aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

7.3 Firmenverzeichnis

American National Can TM; Chicago; IL 60631

Amersham Buchler GmbH, Gieselweg 1; D-38110 Braunschweig

Beckman Instruments, Inc.; 2500 Harbour Blvd; Fullerton, CA 92634-3100

Biorad Laboratories GmbH; Dachauer Str. 511; D-80993 München

Biozym Diagnostik GmbH; Postfach; D-31833 Hess. Oldendorf

Boehringer Mannheim GmbH; Sandhofer Str. 116; D-68305 Mannheim

Deutsches Krebsforschungszentrum; D-69009 Heidelberg

Eppendorf; Frankfurter Str. 462; 51145 Köln

Eurobio GmbH; Kelsterbacherstr. 20; D-65479 Raunheim

Gibco BRL/Life Technologies GmbH; Dieselstr. 5; D-76344 Eggenstein

Greiner Labortechnik; Postfach 1320; D-7440 Nürtingen

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; D-52348 Düren

Merck; Frankfurter Str. 250; D-64293 Darmstadt

MJ Research, Inc.; 149 Grove Street 149; Watertown, Massachusetts 02172 USA

MWG-Biotec Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH; Anzinger Str. 7; D-85560 Ebersberg

Nalgene; M&B Laborfachhandel; Bruckmannring 8-10; D-85764 Oberschleißheim

Nunc GmbH & Co. KG; Hagenauer Str. 21 a; 65203 Wiesbaden-Biebrich

Perkin Elmer Cetus/Applied Biosystems GmbH; Brunnenweg 13; D-64331 Weiterstadt

Pharmacia Biotech Europa GmbH; Munzingerstr. 9; D-79111 Freiburg

Polaroid; Wheathampstead; Hertfordshire; England

Roth GmbH&Co; D-76185 Karlsruhe

Sarstedt; D-51588 Nümbrecht

Schleicher und Schuell GmbH; Postfach 4; 37582 Dassel

Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Postfach; D-82039 Deisenhofen

USB (United States Biochemical); Gieselweg 1; D-38110 Braunschweig

7.4 Personencodierung

Wegen der besseren Übersicht und der Veranschaulichung der Abstammungsverhältnisse in den einzelnen Familien des Stammbaums wurden den Personen in dieser Arbeit von den Laborbezeichnungen abweichende Nummern gegeben.

Die 13 Geschwister der karzinombelasteten Generation sind von 1-13 durchnummeriert, deren Kinder bekamen nach Geburtsjahrgängen beispielsweise die Nummern 4.1 und 4.2.

Person	Labornummer
1.0	D 2053
2.0	D 2031
2.1	D 2044
3.0	keine Studienteilnahme und Labornummer
4.0	vor Studienbeginn verstorben, daher keine Labornummer
4.1	D 2033
4.2	D 2035
5.0	D 2037
5.1	D 2036
5.2	D 2034
5.3	D 2038
6.0	vor Studienbeginn verstorben, daher keine Labornummer
7.0	D 2047
7.1	D 2049
7.1.1	D 2060
7.2	D 2048
7.3	D 2045
8.0	vor Studienbeginn verstorben, daher keine Labornummer
8.1	D 2039
8.2	D 2040
9.0	D 2030
10.0	vor Studienbeginn verstorben, daher keine Labornummer
10.1	D 2046
11.0	D 2003
11.1	D 2041
11.2	D 2032
12.0	D 2061
13.0	D 2043
13.1	D 2052
13.2	D 2042

7.5 Darstellung der Studie für das Ethikvotum

Molekulargenetische Analysen zur Identifizierung eines familiären Lungenkarzinomgens

Dr. rer. nat. H. Brauch, Labor für Molekulare Pathologie, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie und Prof. Dr. med. H. W. Präger, Chirurgische Klinik der TU München

Darstellung der Studie:

Das genetische Merkmal der kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome ist der Verlust eines 3p-Alleles. (Whang-Peng *et al.*, 1982, Brauch *et al.*, 1987). Die kritische Region, die ein oder mehrere Tumorsuppressorgene enthalten könnte, liegt im Bereich 3p21.3 (Daly *et al.*, 1993). Ähnliche Befunde haben zur erfolgreichen Identifizierung des Retinoblastomgens (Friend *et al.*, 1986) oder des von Hippel-Lindau-Gens (Latif *et al.*, 1993) geführt. Die Voraussetzung dazu war die molekulargenetische Testung von Kandidaten-Genen in einer familiären Form der Tumorerkrankung.

Die Arbeiten zur Identifizierung von Lungenkarzinomgenen hat inzwischen dazu geführt, daß die kritische Chromosomenregion kartiert wurde und mehr als 20 Gene mit noch unbekannter Funktion identifiziert werden konnten (Wei MH *et al.*, 1996). Jetzt stagniert die weitere Entwicklung, weil keine familiäre Form dieser Erkrankung zur Verfügung steht, in der die Kandidatengene getestet werden können.

Im Rahmen von Tumor-Nachsorgeuntersuchungen wurden wir auf eine Familie mit einer familiären Häufung von Lungenkarzinomen aufmerksam. Von 13 Geschwistern entwickelten 5 im Alter von 50-56 Jahren ein Lungenkarzinom (eine weitere Patientin hatte ein Cervixkarzinom). Die geplante Studie soll dem Zweck dienen, sowohl die klinischen Daten als auch die DNA-Proben von den Familienmitgliedern aus drei Generationen zu sammeln und zu prüfen, ob sich diese Familie für die notwendigen molekulargenetischen Untersuchungen eignet.

Durchführung:

Die Mitglieder der Familie sollen angeschrieben und mit einem Informationsschreiben über die geplanten Arbeiten aufgeklärt und zur Mitarbeit eingeladen werden. Alle Teilnehmer der Studie sollen ihr freiwilliges Einverständnis schriftlich erteilen.

Die klinischen Daten aller Familienmitglieder sollen in der Chirurgischen Klinik (Sektion Thoraxchirurgie) unter Wahrung der ärztlichen Schweigepflicht zusammengetragen und ausgewertet werden.

Für weibliche Familienmitglieder soll eine gynäkologische Krebsvorsorgeuntersuchung empfohlen werden.

Von allen Familienmitgliedern soll eine Blutprobe entnommen werden (2 mal 10 ml). Dies soll entweder in der Chirurgischen Klinik der TUM erfolgen oder alternativ, wenn dies von den Familienmitgliedern erwünscht wird, vom jeweiligen Hausarzt. In diesem Fall soll der Hausarzt zunächst schriftlich informiert werden.

Von 10 ml des Blutes soll im Labor für Molekulare Pathologie DNA isoliert werden. Diese wird mit Eco RI verdaut und im *Southern Blot*-Verfahren mit den 20 Kandidatengenen (cDNA) aus der Chromosomenregion 3p21.3 getestet werden. Die DNA-Proben werden mit Nummern verschlüsselt, so daß die Anonymität der Personen gewahrt wird.

Von weiteren 10 ml des Blutes sollen im Labor für Molekulare Pathologie Zellen gewonnen werden, die mit EBV transformiert, in Kultur genommen und aserviert werden. Dies ist notwendig um die Durchführbarkeit von künftigen Experimenten, wie z.B. Untersuchungen zur Genexpression und Identifizierung von Proteinen zu ermöglichen. Die Zellkulturen werden ebenfalls mit Nummern verschlüsselt, so daß auch in diesem Fall die Anonymität gewährleistet bleibt.

Alle Daten sollen unter Wahrung der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes ausgewertet und publiziert werden.

Literatur:

Brauch H *et al.* (1987) Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small cell and non-small cell carcinoma of the lung (1987) *New England Journal of Medicine* 317:1109-1113

Daly *et al.* (1993) A homozygous deletion on chromosome 3 in a small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressor activity *Oncogene* 8:1721-1729

Friend SH *et al.* (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma *Nature* 323:643-650

Latif F *et al.* (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene *Science* 260: 1317-1320

Wei MH *et al.* (1996) Construction of a 600 kb cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3 *Cancer Research* in press

Whang-Peng J *et al.* (1982) Small-cell lung cancer: deletion 3p(14-23) *Science* 215:181-182

7.6 Informationsschreiben und Einwilligungserklärung

Informationsschreiben

Sehr geehrter Studienteilnehmer,
sehr geehrte Studienteilnehmerin,

wir schreiben Sie heute an, um Sie zur Teilnahme an einer Studie zu gewinnen, die Klarheit über die Entstehung von Lungentumoren bringen soll. Aus ihrer Familiengeschichte ging im Rahmen einer Untersuchung hier am Klinikum rechts der Isar hervor, daß in Ihrer Familie mehrere Mitglieder an einem Lungentumor erkrankt sind. Wir möchten Ihnen nachfolgend den Zusammenhang zu unseren wissenschaftlichen Arbeiten erklären und Ihnen erläutern, warum wir uns an Sie wenden.

Seit einigen Jahren weiß man, daß bösartige Geschwülste auf Veränderungen im Genom (Erbgut) beruhen können. Diese Störungen können im Laufe des Lebens in einer Körperzelle erzeugt werden und dazu führen, daß diese Zelle unkontrolliert wächst und einen Tumor bildet. Die meisten Tumorerkrankungen entstehen auf diese Weise und treten durchschnittlich ab dem 60. Lebensjahr auf.

Sehr selten sind Tumoren erblich bedingt. Dies ist dann der Fall, wenn eine Störung des Genoms schon in einer Keimzelle vorliegt und von einem betroffenen Elternteil an die Nachkommen weitervererbt wird. Charakteristisch für diese Form der Tumorentstehung ist ein früheres Auftreten des Tumors und eine familiäre Häufung.

In der Vergangenheit haben Familien, bei denen eine familiäre Tumorerkrankung vorkommt, maßgeblich zum Verständnis und zur Aufklärung der Entstehung von z.B. Augen- und Nierentumoren beigetragen. Dies war möglich, weil bei den erblich bedingten Tumoren die ursächliche Störung bereits im Blut nachgewiesen werden konnte, ohne daß sie dort schon einen Schaden verursachte. Personen mit einer solchen Störung erkrankten später. Die Neuentdeckung solcher Störungen in den Tumoren von Patienten ist nicht möglich, weil im Laufe des Tumorstadiums andere Störungen auftreten können, die die eigentliche Ursache überdecken können. Die Ursachen können daher nur durch Blutuntersuchungen in Familien mit einem erblich bedingten Tumor gefunden werden. Unser Verständnis über die Tumorentstehung verdanken wir also den Familien und ihren Mitgliedern, die durch ihre Bereitschaft eine Blutprobe zur Verfügung zu stellen, den Weg dafür geebnet haben.

Die Häufung von Lungentumoren und auch das Vorkommen eines Unterleibstumors in Ihrer Familie läßt uns vermuten, daß diese erblich bedingt sein könnten. Somit besteht die besondere und einmalige Gelegenheit, durch Ihre Mithilfe die Ursachen dieser beiden Tumorerkrankungen zu entdecken. Im Hinblick darauf, daß die Lungentumoren eine der häufigsten Tumorerkrankungen in unserer modernen Gesellschaft sind, könnte mit Ihrer Mithilfe ein schwerwiegendes Gesundheitsproblem verstanden und zukünftig vielleicht gelöst werden.

Wir laden sie somit ein, sich an dieser Studie zahlreich zu beteiligen. Der Erfolg wird von der Teilnahme aller ihrer Familienmitglieder abhängen. Dies betrifft besonders diejenigen Personen, die bereits an einem Tumor erkrankt sind oder waren, aber auch alle gesunden Personen. Wir möchten besonders die Patienten ermutigen, diese Blutprobe zu spenden. Sie helfen damit ihrer gesamten Familie aber auch vielen anderen gefährdeten Menschen.

Für die praktische Durchführung der Blutentnahme können Sie je nach Wunsch entweder zu uns ins Klinikum rechts der Isar kommen, oder zu Ihrem Hausarzt gehen, der uns dann die Blutprobe zusenden wird. Wir werden uns mit Ihrem Hausarzt dann in Verbindung setzen, wenn Sie Ihre Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie gegeben und uns Ihren Wunsch mitgeteilt haben.

Aus ihrer Blutprobe werden wir DNA, d.h. das Genom isolieren und mit ca. 20 heute bekannten Gensonden testen, die als Kandidaten für den Lungentumor in Frage kommen. Diese Untersuchungen sind neu und werden zum ersten mal durchgeführt. Von einem Teil des Blutes möchten wir eine Zellkultur anlegen, die es uns in Zukunft ermöglicht, falls nötig, weitere Untersuchungen durchzuführen, ohne daß Sie erneut Blut spenden müssen. Es werden insgesamt 20ml Blut pro Person benötigt. Nach einer Blutentnahme aus der Vene können in seltenen Fällen bei einer Fehlpunktion ein Bluterguß oder eine lokale Entzündung entstehen.

Wir möchten Sie auch darüber informieren, daß alle aus dieser Studie gewonnenen Daten und Ergebnisse im Sinne des Datenschutzgesetzes unter Wahrung der Anonymität ihrer Person behandelt und nicht an dritte weitergegeben werden. Sofern sie es wünschen, werden Ihnen die Ergebnisse mitgeteilt. Wenn Sie dies nicht wünschen, werden die Ergebnisse ausschließlich zur wissenschaftlichen Auswertung benutzt.

Falls Sie zusätzliche Fragen haben, können Sie sich jederzeit, auch telefonisch, an uns unter den Nummern 089/4140-2161 (Prof. Dr. Präger) oder 089/4140-4592 (Dr. Brauch) wenden.

Wir danken Ihnen für Ihre Bereitschaft und Mithilfe und freuen uns auf Ihre Antwort.

Mit freundlichen Grüßen


Dr. rer.nat. H. Brauch

Prof.Dr.med. H. Präger



Einwilligungserklärung

Ich wurde von Herrn Prof. Dr. H. Präger und Frau Dr. H. Brauch über die geplante Studie aufgeklärt und habe das Informationsschreiben zur Kenntnis genommen.

Ich habe die schriftliche Information gelesen und die Möglichkeit gehabt, Fragen zu stellen. Ich hatte genügend Zeit, meine Entscheidung zu treffen. Ich verstehe die Art und den Zweck der Studie.

Ich bin mit der genetischen Analyse meiner Blutprobe einverstanden.

Ich verstehe, daß die Studienteilnahme freiwillig ist und ich das Recht habe, meine Teilnahme zu verweigern oder rückgängig zu machen.

Ich weiß, daß im Laufe dieser Studie relevante ärztliche Information für wissenschaftliche Studien und möglicherweise Publikationen verwendet werden. Ich stimme dem unter der Bedingung zu, daß meine persönlichen Daten nicht der Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden.

Ich bin damit einverstanden, daß mein behandelnder Arzt die im Rahmen dieser Studie benötigten klinischen Untersuchungsbefunde an Herrn Prof. Dr. Präger und Frau Dr. Brauch weiterfaltet.

Ich gebe freiwillig die Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie

Datum:

Erwachsene:

Name des Studienteilnehmers:

Unterschrift des Studienteilnehmers:

Kinder und Minderjährige:

Name des Studienteilnehmers:

Geburtsdatum:

Unterschrift des Vaters:

Unterschrift der Mutter:

Unterschrift der Personen zwischen 14 und 18 Jahren:

7.7 Fragebogen

<h3>Erhebungsbogen zu Risikofaktoren von Bronchial-Karzinomen</h3>	<p>Name: _____ Vorname: _____</p> <p>Geburtsdatum: _____</p> <p>Wohnort: _____ Straße: _____</p> <p>Telefon: _____</p> <p>Körpergewicht: z.Zt.: _____ kg Größe: _____ cm</p> <p>vor 5 Jahren: _____ kg</p>
--	--

1. Berufszweige, die mit einem erhöhten Gesundheitsrisiko verbunden sind.

Haben Sie in einem der folgenden Bereiche länger als 6 Monate gearbeitet (bitte ankreuzen, unterstreichen und einfügen)

Asbestverarbeitende Industrie Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Baugewerbe Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)
(Isolierer, Dachdecker, Straßenbauarbeiter, Tiefbauarbeiter, Maler/Lackierer, Schlosser, Rohrinstateur, Lüftungs-Klimatechniker, Maurer, Betonbauer, Elektriker, sonstige Berufe.....)

Metallerzeugung Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)
(Eisen- und Stahlerzeugung, Nicht-Eisenerzeugung, Schmelzer, Gießer, Former, Walzer, Galvaniseur, sonstige Berufe

Metallverarbeitung Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)
(Stahl-Leichtmetallbauer, Dreher, Schweißer, KFZ-, Schienenfahrzeug-, Schiffsbauer, Beschäftigte in der Aluminiumproduktion, sonstige Berufe

Lager- und Transportindustrie Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)
(Tankwart, KFZ-Mechaniker, Bahnarbeiter, Berufskraftfahrer, Baumaschinenführer, Lagerarbeiter, sonstige Beruf

Chemische Industrie Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Erdölverarbeitung (-raffinerie) Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Gummiherstellung/-verarbeitung Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Kunststoffindustrie Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Glas- und Keramikindustrie Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

2

Lederherstellung oder -verarbeitung Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Holzbearbeitung- und -verarbeitung Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)
(Schreiner, Tischler, Zimmerer, Parkettleger, sonstige Berufe

Papier- und Zellstoffherstellung Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Textilindustrie Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Land- und Forstwirtschaft Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)
(Weinbauer, Waldarbeiter, Gärtner, Landwirte, sonstige Berufe

Bergbau Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Kerntechnische Industrie Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)

Gaserzeugung Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)
(Kokereiarbeiter, Gaswerkerbeiter, sonstige Berufe

Sonstige Berufszweige Zeit: von (Jahr) bis (Jahr)
(Friseur/in, Gaststättenbeschäftigte/r, Beschäftigte in Getreidemühle, Metzger/Schlachter, Drucker, Hitzebeitsplatz)

3

2. Bisherige berufliche Tätigkeiten

Geben Sie bitte alle von Ihnen früher ausgeübten Berufe und berufliche Tätigkeiten an, in denen sie länger als 6 Monate beschäftigt waren.
Geben Sie bitte Ihren Aufgabenbereich möglichst genau an und beschreiben Sie Ihre Tätigkeit.

Beispiel:

Von (Jahr)	Bis (Jahr)	Beruf	Tätigkeitsbeschreibung
1960	1980	Dachdecker	Montage von Dachkonstruktionen, Beschichten derselben, dabei häufiges Auftragen von teerhaltigem Material (Einatmen von heißen Teerdämpfen), Verarbeitung von Asbestbeton und Mineralfasern

Eigene berufliche Tätigkeiten (seit Schulabschluß bis heute)

Von (Jahr)	Bis (Jahr)	Beruf	Tätigkeitsbeschreibung

4

Von (Jahr)	Bis (Jahr)	Beruf	Tätigkeitsbeschreibung

5

3. Umgang mit Gefahrstoffen

3.1 Hatten Sie am Arbeitsplatz Umgang mit Asbest?

(z.B.: Spritzasbest, Asbestbeton, Asbestplatten, feuerfeste Textilien, Bremsbeläge)

Ja:
Nein:

Falls "Ja",

1. Bestand der Umgang mit Asbest täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

2. Dauer des Umgangs mit Asbest: von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Können Sie einige verwendete asbesthaltige Arbeitsstoffe benennen?

4. Können Sie angeben, bei welchen Arbeiten Asbest verwendet wurde?

3.2 Hatten Sie am Arbeitsplatz Umgang mit künstlichen Mineralfasern?

Ja:
Nein:

Falls "Ja",

1. Bestand der Umgang mit Mineralfasern: täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

6

2. Dauer des Umgangs mit künstlichen Mineralfasern:

von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Können Sie einige verwendete mineralfaserhaltige Arbeitsstoffe benennen?

4. Können Sie angeben, bei welchen Arbeiten mineralfaserhaltige Arbeitsstoffe verwendet wurden?

3.3 Hatten Sie am Arbeitsplatz Kontakt mit Quarzstaub?

Ja:
Nein:

Falls "Ja",

1. Bestand der Kontakt mit Quarzstaub: täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

2. Dauer des Kontaktes mit Quarzstaub: von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Können Sie angeben, bei welchen Arbeitsverfahren/-bereichen quarzhaltige Stäube auftraten?

7

3.4 Hatten Sie am Arbeitsplatz Umgang mit **Verbrennungsprodukten**?
(z.B.: Rauchgase, Ruß, Kokereiohrgase, KFZ-Auspuffgase)
Ja:
Nein:

Falls "Ja",
1. Bestand der Umgang mit Verbrennungsprodukten: täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

2. Dauer des Umgangs mit Verbrennungsprodukten:
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3a. Welche Stoffe wurden verbrannt (z.B. Kohle, Diesel, Schweröl)?

3b. Können Sie die Art der Verbrennungsprodukte benennen?
(z.B. Rauchgase, Ruß)

4. Können Sie angeben, bei welchen Arbeiten Sie Umgang mit
Verbrennungsprodukten hatten?

3.5 Hatten Sie am Arbeitsplatz Umgang mit **Teer, Bitumen, Pech** (z.B. im Straßenbau,
beim Dachdecken)?
Ja:
Nein:

8

Falls "Ja",
1. Bestand der Umgang mit Teer: täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

2. Dauer des Umgangs mit Teer: von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Können Sie angeben, bei welchen Arbeiten Sie Umgang mit
Teerprodukten hatten?

3.6 Hatten Sie am Arbeitsplatz Umgang mit **Cadmium**?
(z.B.: Verhüttung von cadmiumhaltigen Erzen, Herstellung von Nickel-Cadmium-
Akkumulatoren, Schweißen/Brennschneiden)
Ja:
Nein:

Falls "Ja",
1. Bestand der Umgang mit Cadmium: täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

2. Dauer des Umgangs mit Cadmium: von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Können Sie einige verwendete cadmiumhaltige Arbeitsstoffe benennen?

9

4. Können Sie angeben bei welchen Arbeiten welche cadmiumhaltigen
Arbeitsstoffe verwendet wurden?

3.7 Hatten Sie am Arbeitsplatz Umgang mit **Chrom-verbindungen**?
(z.B.: in Chromatproduktion, in Chrompigment-Berleiben, in der Galvanik
(Verchromen), Gebrauch von chromhaltigen Sprühfarben, Verhüttung von
chromhaltigen Erzen, Schweißen (Verw. von Edelstahl-Elektroden))
Ja:
Nein:

Falls "Ja",
1. Bestand der Umgang mit Chrom: täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

2. Dauer des Umgangs mit Chrom: von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Können Sie einige verwendete chromhaltige Arbeitsstoffe benennen?

4. Können Sie angeben bei welchen Arbeiten welche chromhaltigen
Arbeitsstoffe verwendet wurden?

10

3.8 Waren Sie am Arbeitsplatz mit **Schweißarbeiten** beschäftigt?
Ja:
Nein:

Falls "Ja",
1. Häufigkeit der Schweißarbeiten täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

2. Dauer der Schweißarbeiten von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Welche Schweißarbeiten haben Sie durchgeführt?
 Autogenschweißen Punktschweißen
 E-Schweißen (Lichtbogen-) Schneidbrennen
 Schutzgasschweißen (MAG, MIG, WIG)

4. Mit welchen Elektroden wurden die Schweißarbeiten durchgeführt?

5. Welche Materialien wurden verschweißt?

6. Können Sie angeben, mit welchen Stoffen Sie beim Schweißen Umgang
hatten (z.B. Chrom, Nickel, Eisen, Silizium, Beryllium, Kobalt, Mangan,
Molybdän, Vanadium, Arsen, Zinn, Quecksilber, Blei, Zink)

3.9 Hatten Sie am Arbeitsplatz Umgang mit **Arsen**? (z.B. bei der Herstellung bzw.
Verwendung von Pestiziden, bei der Akkumulatorenherstellung)
Ja:
Nein:

11

Falls "Ja",

1. Bestand der Umgang mit Arsen: täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

2. Dauer des Umgangs mit Arsen: von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Können Sie einige verwendete arsenhaltige Pestizide benennen?

4. Können Sie angeben, wie arsenhaltige Stoffe angewendet wurden?

5. Mit welchen nicht-arsenhaltigen Pestiziden bestand außerdem Umgang?

3.10 Hatten Sie Umgang mit **Kühlschmierstoffen**?
(z. B. als Schleifmittel, Bohr- oder Schneidöl)
Ja:
Nein:

Falls "Ja",

1. Bestand der Umgang mit Kühlschmierstoffen täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

2. Dauer des Umgangs mit Kühlschmierstoffen:
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

12

3. Können Sie angeben, bei welchen Arbeiten Kühlschmierstoffe verwendet wurden?

3.11 Hatten Sie am Arbeitsplatz Kontakt mit **Holzstaub**?
Ja:
Nein:

Falls "Ja",

1. Welche Hölzer haben Sie be-/verarbeitet?
Eichenholz
Buchenholz
Tropische Hölzer
Spanplatte
Weichhölzer (Kiefer, Fichte, Tanne)
sonstige Hölzer

2. Bestand der Kontakt mit Holzstaub: täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

3. Dauer der Holzbearbeitung/-verarbeitung:
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

4. Können Sie angeben, bei welchen Arbeitsverfahren/-bereichen Holzstäube auftraten?

13

3.12 Hatten Sie am Arbeitsplatz Kontakt mit **radioaktiven Stoffen** bzw. mit **ionisierender Strahlung**?
Ja:
Nein:

Falls "Ja",

1. Mit welchen radioaktiven Stoffen hatten Sie Kontakt?

2. Bestand der Kontakt mit Radioaktivität: täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

3. Dauer des Kontaktes mit Radioaktivität:
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Können Sie angeben, bei welchen Arbeitsverfahren/-bereichen Sie Umgang mit Radioaktivität hatten?

3.14 Hatten Sie beruflichen Umgang mit **Vinylchlorid**?
(z.B. PVC-Herstellung)
Ja:
Nein:

Falls "Ja",

1. Bestand der Umgang mit Vinylchlorid täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

14

2. Dauer des Umgangs mit Vinylchlorid:
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

3. Können Sie angeben, bei welchen Arbeiten Vinylchlorid verwendet wurde?

3.14 Hatten Sie Umgang mit **weiteren Chemikalien**?
(z.B. Monochlordimethylether (CMME), Dichlordimethylether (BCME))
Ja:
Nein:

Falls "Ja",

1. Können Sie einige verwendete Chemikalien benennen?

2. Bestand der Umgang mit Chemikalien täglich
 __ mal pro Woche
 __ mal pro Monat

3. Dauer des Umgangs mit Chemikalien:
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)
von (Jahr) bis (Jahr)

4. Können Sie angeben, bei welchen Arbeiten welche Chemikalien verwendet wurden?

15

4. Individueller Lebensstil

4.1. **Rauchen** Sie oder haben Sie jemals geraucht? nein = 0; ja = 1

falls ja:

4.1.1 In welchem Alter haben Sie mit dem Rauchen begonnen?
(unzutreffendes bitte streichen)

Alter/Jahr
im Alter von _____ oder im Jahr 19____

4.1.2 Was haben Sie geraucht?

Art: Zigaretten = 1
Zigarren/Zigarillos = 2
Pfeife = 3
anderes = 4

4.1.3 Für Zigarettenraucher: falls Filter, seit 19____

4.1.4 Wieviel haben Sie täglich durchschnittlich geraucht _____

4.1.5 Falls Sie zwischen durch einmal aufgehört haben sollten, von wann bis wann war das?

Art	Menge/Tag	19	Beginn	Ende
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Art	Menge/Tag	19	Beginn	Ende
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Art	Menge/Tag	19	Beginn	Ende
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

4.1.6 Nur für Exraucher: Wann haben Sie mit dem Rauchen aufgehört?
19____

16

4.3 **Alkoholkonsum** in den letzten 20 Jahren

kein Alkoholkonsum
 gelegentlich
 mehrmals in der Woche
 täglich

4.4 Regelmäßig länger als einen Monat eingenommene **Medikamente** in den letzten 20 Jahren:

5. **Umweltfaktoren**

5.1 **Passivrauchen**, nur für Gelegenheitsraucher (weniger als 10 Zigaretten/Woche) und Nichtraucher:

5.1.1 Wohnt(e) in Ihrer Wohnung ein starker Raucher in den letzten 20 Jahren? nein = 0; ja = 1

5.1.2 Hatten Sie starke Raucher als Kollegen und arbeiten/arbeiteten Sie in den letzten 20 Jahren mit ihnen in geschlossenen Räumen? nein = 0; ja = 1

5.1.3 Halten Sie sich sonst regelmäßig in verrauchten Räumen auf? (pro Woche mehr als zwei Stunden) nein = 0; ja = 1

5.1.4 Waren in Ihrer Kindheit starke Raucher in der Familie? nein = 0; ja = 1

17

5.2 **Lebensraum**

5.2.1 In welcher geographischen Region sind Sie geboren?

5.2.2 Wo haben Sie bisher überwiegend gelebt?

größere Städte/Ballungszentren (ab 250.000 Einwohner)
 mittelgroße Städte (50.000 bis 250.000 Einwohner)
 ländliche Gebiete (< 50.000 Einwohner)

5.2.3 Wohnraum

Größe der Wohnung m²
 Etage
Vogelhaltung: Ja: Nein:

6. **Erbliche Faktoren**

Sind Ihnen **Krebserkrankungen** in Ihrer eigenen Familie bekannt?
Ja:
Nein:

Falls "Ja",
Welche Krebserkrankungen sind in Ihrer Familie (z.B. Großeltern, Eltern, Geschwister, Kinder) bekannt?
(Bsp.: Lungenkrebs - Bruder _____)

_____ - _____

_____ - _____

_____ - _____

_____ - _____

18

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit habe ich im Zeitraum vom Frühjahr 1996 bis zum Frühjahr 1998 am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums rechts der Isar und im Forschungslabor der Frauenklinik und Poliklinik des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf, Hamburg, durchgeführt. Teile der molekularbiologischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Debora Angeloni und Herrn Dr. Michael Lerman, Laboratory of Immunobiology, National Cancer Institute, Frederick/USA, durchgeführt.

Mein größter Dank geht an Frau Priv. Doz. Dr. rer. nat. Hiltrud Brauch, Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie, Stuttgart, die trotz starker beruflicher Belastung jederzeit in allen praktischen und theoretischen Belangen Zeit für mich aufbrachte. Eine bessere Betreuung kann ich mir nicht vorstellen.

In diesem Zusammenhang gilt auch besonderer Dank den technischen Assistentinnen der oben genannten Labore, namentlich Frau Anja Müller und Frau Cornelia Coith.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Präuer, Leiter der Thoraxchirurgie im Klinikum rechts der Isar, bedanken, über den die Krankengeschichten der nicht im Klinikum rechts der Isar behandelten Personen bezogen werden konnten und der an der Planung und Durchführung der Arbeit maßgeblich beteiligt war.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. med. Gregor Weirich, Institut für Pathologie am Klinikum rechts der Isar und an Herrn Dr. P. Fritz vom Robert-Bosch Krankenhaus und Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie, Stuttgart, die mir bei der Beschaffung der histologischen Abbildungen behilflich waren, sowie an Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Brüning, Institut für Arbeitsphysiologie der Universität Dortmund, für die Ausarbeitung des Fragebogens.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an eine namentlich nicht genannte weibliche Person aus der „Lungenkarzinom-Familie“, die bei der Sammlung epidemiologischer Daten, der Motivation der einzelnen Familienmitglieder und als ständige Ansprechpartnerin stets behilflich war. Mein Dank gilt allen Familienmitgliedern, die diese Arbeit aufopferungsbereit unterstützten.

Schließlich war diese Arbeit jedoch nur durch die umfassende Unterstützung von Herrn Universitäts-Professor Dr. med. Heinz Höfler, Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie am Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, möglich. Für seinen wissenschaftlichen Rat, die Möglichkeit zur Benutzung des Forschungslabors und die Möglichkeit zur Anfertigung der Promotionsschrift möchte ich mich herzlichst bedanken.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name und Anschrift: Klaus Thorsten Rehe
Brentanostr. 22
30625 Hannover

Telefon: 0511-5332733

Geburtsdatum: 24.06.1972

Geburtsort: Augsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: Grundschule: 1979-1983 in Fürstenfeldbruck
Gymnasium: 1983-1992 in Fürstenfeldbruck

Studium: 1992-1999: Medizinstudium an der TU-München

Physikum: 17.08.1994

1. Staatsexamen: 29.08.1995

2. Staatsexamen: 31.03.1998

3. Staatsexamen: 04.05.1999

Beruf: AiP seit dem 01.08.1999 in der pädiatrischen Hämatologie/Onkologie an der medizinischen Hochschule Hannover