



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

BESTIMMUNG DES PLOIDIESTATUS BEIM
NICHT-KLEINZELLIGEN LUNGENKARZINOM IM
KLINISCHEN VERLAUF

Aus der Klinik für Chirurgie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med Tobias Keck

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Katharina Wargenau

aus Lübeck

Lübeck 2019

1.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Emanuel Palade

2.Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Jutta Kirfel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2019

Zum Druck genehmigt, Lübeck den 23.10.2019

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lungenkarzinom in Deutschland	2
1.2	Klinik des Lungenkarzinoms	3
1.2.1	Anatomie der Lunge	3
1.2.2	Ätiologie	5
1.2.3	Lokalisation und Histopathologie	6
1.2.4	Genetik und Molekularbiologie	10
1.2.5	Ploidie	12
1.2.6	Diagnostik	14
1.2.7	Therapie und Prognose	21
1.2.8	Nachsorge	23
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Patientenkollektiv	25
2.1.2	Verbrauchsmaterial/Chemikalien	28
2.1.3	Puffer und Lösungen	28
2.1.4	Geräte	28
2.1.5	Software	29
2.2	Methoden	29
2.2.1	Ploidiemessung	29
2.2.2	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Korrelation zwischen Ploidie und klinischen Parametern	32
3.1.1	Statistische Auswertung des Gesamtkollektivs Adeno- und Plattenepithelkarzinom (n = 118)	32
3.1.2	Statistische Auswertung des Adenokarzinoms (n = 62)	35
3.1.3	Statistische Auswertung des Plattenepithelkarzinoms (n = 56)	37
3.2	Korrelation zwischen Ploidie und Überleben	39
4	Diskussion	45
4.1	Fazit	49
4.2	Ausblick	49
5	Zusammenfassung	50
	Literaturverzeichnis	51

Anhang	57
Danksagung	66
Lebenslauf	67

Abkürzungsverzeichnis

<i>ACAS</i>	AhrensICM Software
<i>ADK</i>	Adenokarzinom
<i>ATS</i>	American Thoracic Society
<i>BALT</i>	Bronchus assoziiertes Lymphsystem
<i>BRAF</i>	B-Raf-Protoonkogen
<i>CCD</i>	Charge-coupled Devise
<i>CD56</i>	Neuronales Zelladhäsionsmolekül
<i>CEA</i>	Karzinoembryonales Antigen
<i>CK</i>	Zytokeratin
<i>CO₂</i>	Kohlenstoffdioxid
<i>COPD</i>	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
<i>CRISPR/Cas</i>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
<i>CT</i>	Computertomographie
<i>CYFRA21 – 1</i>	Zytokeratinfragment 21-1
<i>DLCO</i>	Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität
<i>DNA</i>	Desoxyribonuklein Säure
<i>EBUS</i>	Endobronchialer Ultraschall
<i>ECOG</i>	Eastern Cooperative Oncology Group
<i>EGFR</i>	Epidermal Growth Factor Receptor
<i>EML4 – ALK</i>	Anaplastic Lymphoma Kinase Echinoderm Microtubule associated protein like 4
<i>ERS</i>	European Respiratory Society
<i>ERBB2</i>	= HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2)
<i>ESTS</i>	European Society of Thoracic Surgeons
<i>FCM</i>	Flow-Cytometrie
<i>FEV₁</i>	Funktionelle Einsekunden-Kapazität
<i>FISH</i>	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung

<i>FTS</i>	FrISChe Gewebeprobe
<i>GEKID</i>	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
<i>HE</i>	Hämatoxylin-Eosin
<i>HCL</i>	Salzsäure
<i>HNO</i>	Hals-Nasen-Ohren
<i>IASLC</i>	International Association for the Study of Lung Cancer
<i>K – Ras</i>	Kirsten Rat sarcoma viral oncogene
<i>K₂S₂O₅</i>	Kaliumpyrosulfit
<i>LOH</i>	Loss of Heterozygosity
<i>MET</i>	MET-Protoonkogen
<i>Na₂S₂O₅</i>	Natriumpyrosulfit
<i>NGS</i>	Next Generation Sequencing
<i>NOS</i>	Not Otherwise Specified
<i>NSCLC</i>	Non-Small Cell Lung Cancer
<i>NSE</i>	Neuronenspezifische Enolase
<i>O₂</i>	Sauerstoff
<i>PAS</i>	Periodic Acid Schiff
<i>PEK</i>	Plattenepithel-Karzinom
<i>PES</i>	Paraffin eingebettete Gewebeprobe
<i>PET</i>	Positronen Emmissions Tomographie
<i>PD – L1</i>	Programmed death-ligand 1
<i>PiK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
<i>ProGRP</i>	Pro-Gastrin-Releasing Peptide
<i>PY</i>	Pack Years = gerauchte Zigarettenpackungen pro Tag multipliziert mit Anzahl der Raucherjahren
<i>RET</i>	RET-Protoonkogen
<i>R0 – Resektion</i>	Entfernung des Tumors im Gesunden, kein Tumorgewebe im Resektionsrand nachweisbar

<i>ROS1</i>	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase 1
<i>SAC</i>	Spindle Assembly Checkpoint
<i>SCLC</i>	Small Cell Lung Cancer
<i>SCM</i>	Densitometrie
<i>SIADH</i>	Syndrom der inadäquaten Antidiuretischen Hormonsekretion
<i>SO₂</i>	Schwefeldioxid
<i>SPSS</i>	Statistik- und Analyse-Software von IBM
<i>Surfactant</i>	Surface Active agent
<i>TNM</i>	Klassifikation zum Staging von Tumorerkrankungen
<i>TP53</i>	Tumorsuppressorgen 53
<i>TTF1</i>	Thyroid Transcription Factor 1
<i>UKSH</i>	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
<i>UICC</i>	Union Internationale Contre le Cancer
<i>WHO</i>	World Health Organization
<i>5JÜR</i>	5-Jahres-Überlebensrate
<i>18F – FDG – PET</i>	18F-Fluordeoxyglukose-Positron-Emissions-Tomographie

Abbildungsverzeichnis

1.1	Altersspezifische Inzidenz des Lungenkarzinoms (ICD-10 C33 - C34) in Deutschland [61]	2
1.2	Inzidenz und Mortalität des Lungenkarzinoms (ICD-10 C33 -C34) in Deutschland [61]	3
1.3	Lepidisches Adenokarzinom (siehe rechte Bildhälfte) der Lunge, Differenzierungsgrad G1 (HE-Färbung, Orginalvergrößerung x 84), bereitgestellt durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck	7
1.4	Azinäres Adenokarzinom der Lunge, Differenzierungsgrad G2 (HE-Färbung, Orginalvergrößerung x 84), bereitgestellt durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck	8
1.5	Solides Adenokarzinom der Lunge, Differenzierungsgrad G3 (HE-Färbung, Orginalvergrößerung x 84), bereitgestellt durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck	8
1.6	Verhornendes Plattenepithelkarzinom der Lunge (HE-Färbung, Orginalvergrößerung x 84), bereitgestellt durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck	9
1.7	Aneuploidie als Folge von mitotischen Defekten [47]	13
1.8	Algorithmus zur Abschätzung der Operabilität (nach ERS/ESTS-Guidelines, Brunelli [10])	20
1.9	Therapiekonzept für das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) [42] . .	23
2.1	Übersicht der in die Studie eingeschlossenen Patientendaten	26
2.2	Labor-Report	31
3.1	3-Jahres-Follow-up Adeno- und Plattenepithelkarzinom	43
3.2	3-Jahres-Follow-up Plattenepithelkarzinom	43
3.3	3-Jahres-Follow-up Adenokarzinom	44

Tabellenverzeichnis

1.1	Standardisierte Erfassung des Allgemeinzustandes und der Leistungsfähigkeit [22]	15
1.2	TNM Klassifikation Version 2017 [59]	18
1.3	Klassifikation der Tumorstadien nach UICC8 [23]	19
2.1	Häufigkeitsverteilung	27
2.2	Häufigkeitsverteilung erhobener klinischer Parameter	27
3.1	Chi-Quadrat Analyse des Gesamtkollektivs Adeno- und Plattenepithelkarzinom n = 118	32
3.2	Chi-Quadrat Analyse des Adenokarzinoms n = 62	35
3.3	Chi-Quadrat Analyse des Plattenepithelkarzinoms n = 56	37
3.4	Beziehung zwischen der Ploidie der Tumore und der Überlebenszeit der Patienten	40
3.5	Überlebenszeit nach post-operativen Jahren	41
3.6	Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit nach UICC8 verglichen mit dem Ploidiestatus der Tumore	42
4.1	Ploidiestudien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms [12]	48

1 Einleitung

In der heutigen Zeit spielt eine personalisierte Tumorthherapie basierend auf der jeweiligen Karzinogenese mit der Expression von Tumormarkern eine bedeutende Rolle. Es gibt längst nicht mehr nur ein Chemotherapeutikum für eine Erkrankung; die Bandbreite der Chemotherapeutika und Immuntherapien steigt von Tag zu Tag auf Grund unseres besseren Verständnisses der Karzinogenese und prognostischen Faktoren. In der Medizin und der Wissenschaft wird jede einzelne Zelle des menschlichen Körpers analysiert und auf ihre Funktion und Wirkungsweise hin überprüft. Ziel ist es, ähnlich wie in der Mathematik eine Formel zu erstellen, die den Weg vom Entstehen eines bösartigen Tumors, dessen Entwicklung und die Beeinflussung auf das Überleben des Menschen beschreibt. Doch jeder Tumor hat seine eigenen Tumormarker und jede einzelne Bestimmung gestaltet sich als aufwändig und kostenintensiv. Der Ploidiestatus stellt hier eine kostengünstige und sensitive Alternative dar.

Obwohl die Aneuploidie als ältester Ursprung eines Karzinoms Anfang des 20. Jahrhunderts durch Theodor Boveri beschrieben wurde [7, 8], galt der DNA-Ploidiestatus in Studien aus den frühen 2000er Jahren als kontrovers; die bestimmte Zellanzahl war zu klein, die untersuchten Kohorten zu heterogen und es wurden zu viele unterschiedliche Analysemethoden verwendet [17]. Es konnte kein konkreter Zusammenhang zwischen einer Aneuploidie und einer Tumoraggressivität mit einer schlechteren Überlebensprognose festgestellt werden.

In den beiden letzten Jahren erfuhr der DNA-Ploidiestatus jedoch erneutes Aufsehen durch verbesserte Verfahren zur dessen Untersuchung mittels Densitometrie in Studien beim Kolorektal-, Prostata-, Ovarial- und Mammakarzinom. Durch die optimierte Technologie ist der Begriff der Aneuploidie heutzutage greifbarer. Es konnte bereits festgestellt werden, dass bei diesen Tumorentitäten die Aneuploidie ein unabhängiger und starker Vorhersagewert für das Überleben darstellt [31, 32, 36, 43]. Im Gegensatz zu spezifischen Tumormarkern und einer immunhistochemischen Untersuchung, ist der Ploidiestatus als prognostischer Marker universal. In nahezu jeder Tumorentität ist eine Aneuploidie nachweisbar und sie dient als Marker für ein Rezidiv oder einen Tumorprogress [17]. Gegenstand aktueller Studien ist noch, inwiefern die Aneuploidie die Immunantwort in den Zellen beeinflusst und es wird versucht, mittels CRISPR/Cas-Methode dessen Wirkungsweise und Interaktion zu verstehen [3, 19, 50].

Die Motivation dieser Arbeit besteht darin, den Ploidiestatus beim Adeno- und Plattenepithelkarzinom des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zu analysieren und so einen Beitrag zur zukünftigen besseren Klassifikation und Prognoseeinschätzung zu leisten.

Im Folgenden wird zunächst auf die Epidemiologie und dem klinischen Erscheinungsbild des Lungenkarzinoms eingegangen.

1.1 Lungenkarzinom in Deutschland

Das Lungenkarzinom zählt weltweit zur häufigsten Krebserkrankung. In Deutschland betrug 2018 die geschätzte Anzahl an Neuerkrankungen an einem Lungenkarzinom rund 53.700 [61]. Beim Mann ist es nach dem Prostata-Karzinom die zweithäufigste Tumorerkrankung in Deutschland und die häufigste Todesursache als Karzinom. In den letzten Jahren hat das Lungenkarzinom bei Frauen bezüglich seiner Mortalität das kolorektale Karzinom abgelöst, so dass es nun das zweithäufigste letale Karzinom nach dem Mamma-Karzinom ist. Bei Frauen ist es die dritthäufigste bösartige Neuerkrankung in Deutschland [61].

In den altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten verhalten sich die beiden Geschlechter entgegengesetzt. Seit Ende 1990 stieg die Rate bei Frauen um 30 % an, während bei den Männern die Rate um 20 % sank. Es ist davon auszugehen, dass diese Entwicklungen auf eine Veränderung der Rauchgewohnheit basiert; der Trend wird in Zukunft auch fortgesetzt werden.

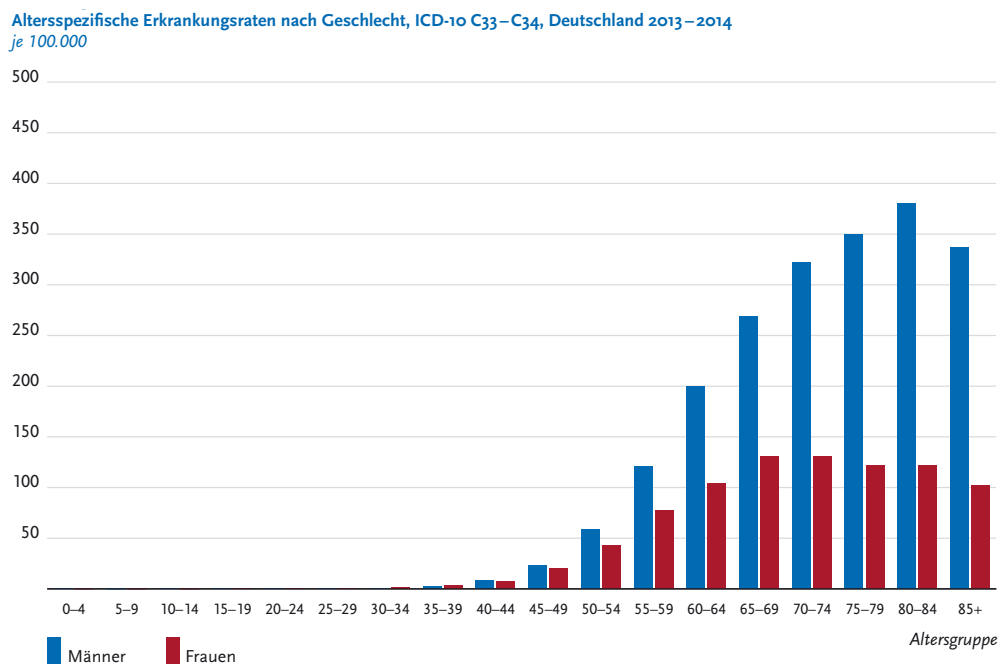


Abbildung 1.1: Altersspezifische Inzidenz des Lungenkarzinoms (ICD-10 C33 - C34) in Deutschland [61]

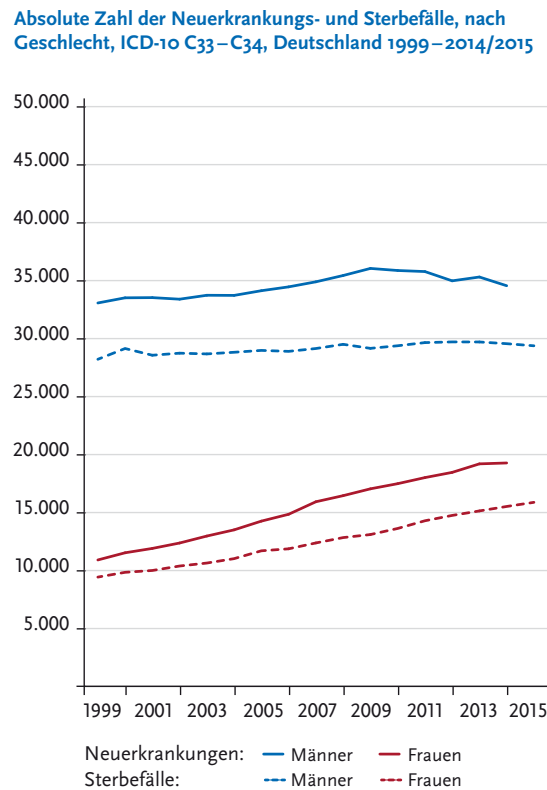


Abbildung 1.2: Inzidenz und Mortalität des Lungenkarzinoms (ICD-10 C33 -C34) in Deutschland [61]

Das Lungenkarzinom ist ein maligner Tumor, der sich aus Vorläuferzellen (Stammzellen) der Bronchien, Bronchiolen und der terminalen bronchioalveolären Einheit bildet.

Mit Stammzellen sind hierbei keine embryonalen Stammzellen gemeint, sondern organspezifische Stammzellen der zentralen und peripheren Atemwege.

1.2 Klinik des Lungenkarzinoms

Im Folgenden wird auf die klinische Situation und die Hintergründe des Lungenkarzinoms eingegangen, um im weiteren Verlauf die Auswertung verstehen zu können.

1.2.1 Anatomie der Lunge

Der Thoraxraum besteht aus einem rechten und einem linken Lungenflügel sowie paarig angelegten Pleurahöhlen, welche seitlich vom zentral gelegenen Mediastinum mit in ihm

befindlichem Herzen liegen. Die Pleurahöhle besteht aus zwei serösen Blättern: der Pleura visceralis, die fest mit der Lunge verwachsen ist und der Pleura parietalis, welche die Thoraxwand, das Mediastinum und das Zwerchfell auskleidet. Zwischen den beiden Pleurablättern befindet sich eine geringe Menge an klarer Flüssigkeit, die ein reibungsloses Gleiten der Pleurablätter aneinander ermöglicht. Der rechte Lungenflügel ist mit einem Volumen von ca. 1500 ccm ein wenig größer als der linke Lungenflügel, da dieser durch die asymmetrische Lage des Herzens komprimiert wird. Des Weiteren weist der rechte Lungenflügel drei Lappen (Lobi superior, medius und inferior) und zwei Furchen (Fissura obliqua und Fissura horizontalis) auf. Der linke Lungenflügel kennzeichnet sich durch zwei Lappen und einer Fissura obliqua. Die kleinste morphologische Einheit der Lunge ist das Lungenläppchen, welches von einem Bronchiolus belüftet wird. Beide Lungenflügel haben 10 Segmente, wobei beim linken Lungenflügel das Segment VII aufgrund seiner Größe oft nicht als eigenes Segment erkannt wird und somit dem Segment VIII zugerechnet wird.

Der Tracheobronchialbaum gliedert sich in einer Luftröhre, welche sich an der Carina in paarige Hauptbronchien teilt. Der rechte Hauptbronchus verläuft dabei steiler als der linke, so dass sich in der Krankheitsentstehung einige Besonderheiten ergeben. Als nächstes verzweigen sich zwei bzw. drei Lappenbronchien, mehrere Segmentbronchien, kleinere Bronchiolen und Bronchioli und schließlich Alveolen, wobei die Bronchien sich asymmetrisch verzweigen. Ein Bronchus teilt sich in einen Hauptast zu zwei Drittel und zu einem Drittel in einen Nebenast. Die Wand der Bronchien wird aus Knorpel, Muskel, zilienträgenden Epithelzellen und Becherzellen gebildet, die zu den Alveolen hin in der Anzahl abnehmen und gar verschwinden. Die Alveolen dienen dem Gasaustausch zwischen der Atemluft und den angrenzenden Kapillaren. Kohlenstoffdioxid (CO_2) wird aus dem Blut abgeatmet während die Erythrozyten den Sauerstoff (O_2) aus der Atemluft binden.

Für diverse Noxen bieten sich in diesem sensiblen System zahlreiche Angriffspunkte, die der Körper durch den Hustenreflex als Abwehrsystem versucht aufzuhalten, welcher durch die turbulenten Luftströme an den Bifurkationen der asymmetrisch angelegten Bronchien erzeugt wird. Gelangen größere Partikel in die Atemwege, setzt der Hustenreflex ein. Kleinere Partikel werden durch die Flimmerhärchen und dem produzierten Schleim der Becherzellen retrograd transportiert und schließlich abgehustet, was sich mukoziliäre Clearance nennt.

In den Alveolen selbst finden sich Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten und pulmonale Lymphozyten, welche das Bronchus-assoziierte-Lymphsystem (BALT) bilden. Surfactant („surface active agent“ = oberflächenaktive Substanz) senkt die Oberflächenspannung der Alveolen herab und sorgt für eine bessere Belüftung durch eine leichtere Dehnung der Lunge [6, 49].

1.2.2 Ätiologie

Hauptursache des Lungenkarzinoms aller histologischer Subtypen ist mit 85 bis 90 % die aktive Inhalation von Zigarettenrauch. Zahlreiche hochwirksame Kanzerogene sind im Zigarettenrauch enthalten wie zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe vom Typ der Nitrosamine und N-Nitroso-Verbindungen, Benzo-(a)-Pyrenverbindungen und kanzerogene Metallverbindungen (Nickelcarbonyl, Cadmiumhydroxid). Durch langjähriges Zigarettenrauchen verschlechtert sich die mukoziliäre Clearance: Die Flimmerhärchen werden unbeweglicher und die Schleimproduktion nimmt zu. Der Schleim kann nicht abtransportiert werden und reichert sich an, es resultiert der Raucherhusten und Bakterien vermehren sich. Die im Schleim enthaltenen kanzerogenen Substanzen haben eine längere Kontaktzeit zum Lungengewebe. Durch kovalente Bindungen an die DNA (Desoxyribonuklein Säure) und fehlende Entfernungen durch DNA-Reparaturmechanismen können durch anfallende DNA-Addukte permanente Mutationen im Gewebe entstehen. Des Weiteren resultiert eine unkontrollierte Proliferation und Karzinogenese durch die Modulation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen [1, 6, 16]. Obwohl in den letzten Jahren der Nikotin-, Teer- und Kohlenmonoxidgehalt im Zigarettenrauch in den meisten Ländern gesenkt werden konnte, zeigte sich keine Verringerung im Krebsrisiko. Die steigende Inzidenz des Adenokarzinoms wird in Verbindung mit dem reduzierten Nikotingehalt gebracht: die Zigaretten werden intensiver geraucht, mit einer höheren Anzahl an Zügen pro Minute und tieferer Inhalation. Die im Zigarettenrauch enthaltenen Giftstoffe gelangen dadurch vermehrt in die Peripherie der Lunge, dem Entstehungsort des Adenokarzinoms [25, 60].

Dauer und Ausmaß des Zigarettenkonsums bestimmen das Lebenskrebsrisiko, entscheidend hierfür sind die Zahl der täglich gerauchten Packungen multipliziert mit den Raucherjahren = Pack Years (PY). Ab 40 PY steigt die Inzidenz von 3,4/100.000 pro Jahr von einem Nichtraucher auf 217,5/100.000 pro Jahr. Wird der Zigarettenrauch mit einer Exposition gegenüber beruflichen Karzinogenen kombiniert, potenziert sich das Lungenkrebsrisiko [6]. Für Passivraucher konnte auch eine erhebliche Risikoerhöhung festgestellt werden, wenn sie im Jugendalter einer Exposition ausgesetzt waren, einen rauchenden Partner haben oder im Beruf Zigarettenrauch ausgesetzt sind [29, 55]. Berufliche Karzinogene, die für 5 % des Lungenkarzinoms verantwortlich sind, bestehen zu mehr als 90 % aus Asbest. Die restlichen Prozentangaben verteilen sich auf Radon, Industrie- und Verkehrsabgasen und Dieselabgasen. Durch Arbeitsschutzmaßnahmen konnte in den letzten Jahren das Krebsrisiko deutlich gesenkt werden, so dass es zahlenmäßig heutzutage eine eher untergeordnete Rolle spielt [16, 41].

Andere Risikofaktoren sind unter anderem Lungennarben und chronische Erkrankungen wie die chronisch obstruktive pulmonale Krankheit (COPD). Zudem darf nicht übersehen werden, dass auch Nicht- und Nieraucher an Lungenkarzinomen erkranken, welche meist gut differenzierte Adenokarzinome sind. Eine genetische Disposition wird zur Zeit noch diskutiert, ein

erhöhtes Risiko haben jedoch Personen, deren Verwandte 1. Grades an einem Lungenkarzinom erkrankt sind [24].

Von der Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen, über genetische Schäden durch die Kanzerogene bis hin zur Epitheldysplasie mit anschließendem Carcinoma in situ können bis zu 30 Jahre vergehen.

1.2.3 Lokalisation und Histopathologie

Die Topografie des Lungenkarzinoms ist für die Früherkennung, Operabilität und den Metastasierungsweg wichtig.

Es werden folgende drei Wachstumsformen unterschieden: einerseits zentrale hilusnahe Tumoren (60-70 %), bei denen das Plattenepithel- und das kleinzellige Karzinom auftreten und andererseits periphere Tumoren (30-40 %) mit dem vorwiegend vorkommenden Adenokarzinom, welche vor allem früh bildlich diagnostiziert werden. Die dritte Wachstumsform äußert sich in diffus infiltrierenden „pneumonisch“ wachsenden Tumoren.

Histologisch werden die Lungenkarzinome anhand der WHO-Klassifikation von 2015 eingeteilt, einer Erweiterung und Ergänzung der IASLC/ATS/ERS (International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society) Klassifikation von 2011 [52, 53]. Für die neue Klassifikation ist eine histologische Aufarbeitung inklusive immunhistochemischer und gegebenenfalls molekular-pathologischer Untersuchung essentiell, da der histologische Typ so genau identifiziert werden und eine entsprechende personalisierte Therapie auf Basis der verschiedenen genetischen Defekte eingeleitet werden kann.

Morphologisch kann das Lungenkarzinom in ein nicht-kleinzelliges Karzinom (NSCLC) und ein kleinzelliges Karzinom (SCLC) unterschieden werden, wobei das NSCLC mit 85 % häufiger ist. Das Adenokarzinom und das Plattenepithelkarzinom stellen den größten Anteil des NSCLC dar. Die genaue Einteilung ist essentiell für eine optimale Therapie.

Adenokarzinom

Das Adenokarzinom ist heutzutage mit 42 % in den industrialisierten Ländern der häufigste Karzinomtyp und zudem der häufigste Karzinomtyp bei Nichtrauchern. Man unterscheidet nach Wachstumsmuster prädominant lepidische, azinäre, papilläre, mikropapilläre und solide Formen sowie den schleimbildenden (mucinösen) Typ [56]. Das Wachstumsmuster bestimmt das Grading (den Differenzierungsgrad): G1 bei lepidischen, G2 bei azinären/papillären und G3 bei mikropapillären oder soliden Tumoren. Der Großteil wächst peripher und infiltriert im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten häufiger die Pleura und die Thoraxwand und exprimiert TTF1 (Thyroid Transcription Factor 1), der andere Anteil wächst zentral und ist meist TTF1-negativ. TTF1 kommt in der Schilddrüse und in Pneumozyten Typ II vor und wird nicht vom Plattenepithel-Karzinom produziert. TTF-1 ist bei ca. 80 % der Adenokarzinome positiv,

womit es sicher vom Plattenepithel-Karzinom abgegrenzt werden kann, sowie meist von Adenokarzinomen anderen Ursprungs [26]. Die peripher wachsenden Adenokarzinome können des Weiteren in EGFR-positiv (Epidermal Growth Factor Receptor) (beim Nichtraucher) oder K-Ras-positiv (Kirsten Rat sarcoma viral oncogene) (beim Raucher) eingeteilt werden. Napsin A als Protease ist ein weiterer Marker für primär pulmonale Adenokarzinome.

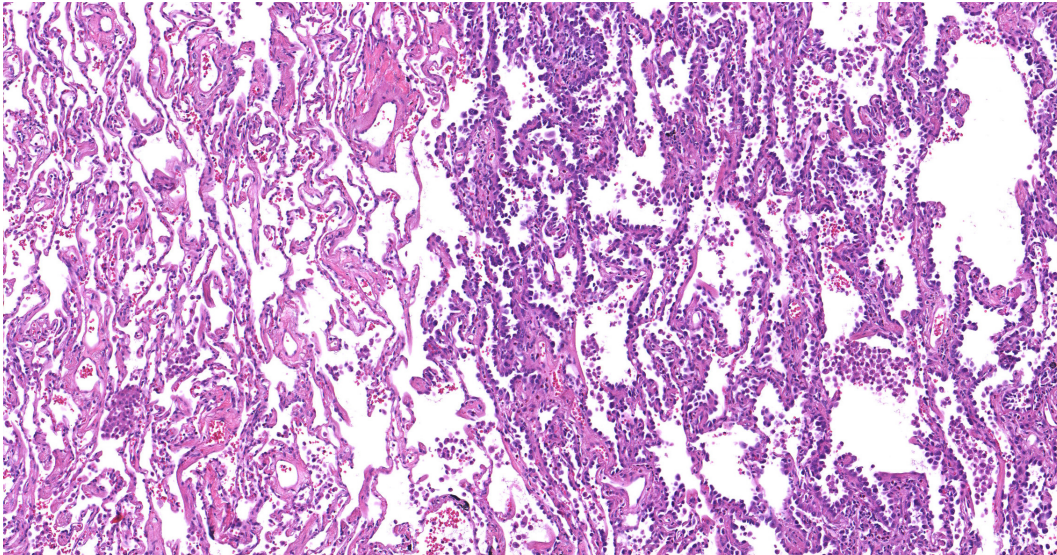


Abbildung 1.3: Lepidisches Adenokarzinom (siehe rechte Bildhälfte) der Lunge, Differenzierungsgrad G1 (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 84), bereitgestellt durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck

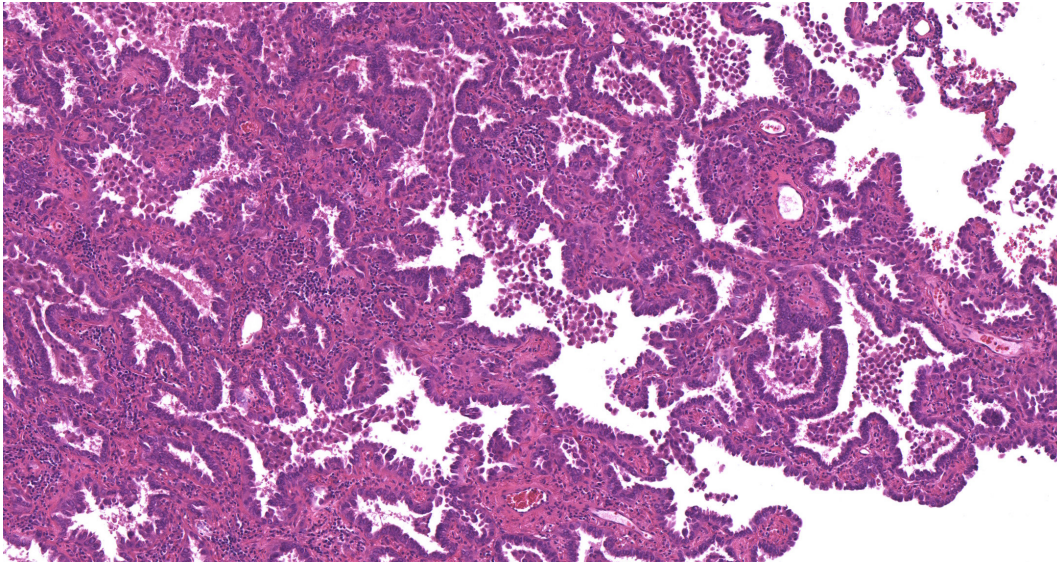


Abbildung 1.4: Azinäres Adenokarzinom der Lunge, Differenzierungsgrad G2 (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 84), bereitgestellt durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck

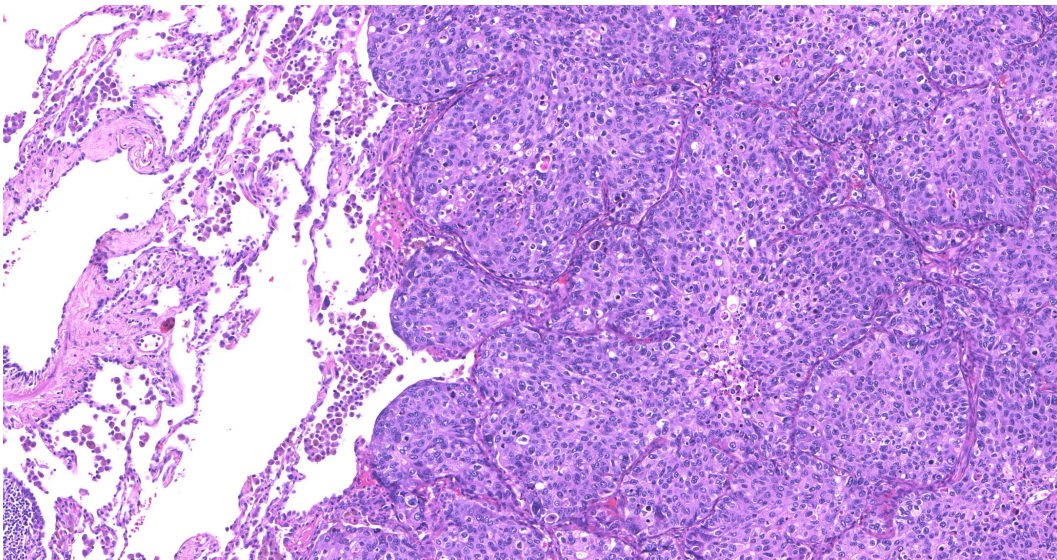


Abbildung 1.5: Solides Adenokarzinom der Lunge, Differenzierungsgrad G3 (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 84), bereitgestellt durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck

Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom als maligner epithelialer Tumor äußert sich histologisch durch Verhornung und/oder Interzellularbrückenbildung. Die relative Häufigkeit hat in den letzten Jahren abgenommen, zu 90 % tritt es jedoch bei Rauchern auf. Bis zu 60 % liegen zentral, wodurch das Plattenepithelkarzinom früher als periphere Tumoren durch eine Obstruktion, Hämoptysen, Atelektasen oder Retentionspneumonien symptomatisch werden kann, so dass es eher in einem früheren Stadium auffällig wird als primär periphere Tumortypen [4]. Größere Tumoren weisen ausgedehnte Nekrosen auf, die mit einer typischen Kavernenbildung einhergehen. Seltener Subtypen sind das papilläre, klarzellige, kleinzellige und basaloide Plattenepithelkarzinom.

Immunhistochemisch ist das Plattenepithelkarzinom positiv gegen p40, p63 und Zytokeratin (CK) 5/6 [5, 33, 37, 45, 51, 57]. Fehlen die morphologischen Merkmale bei einem undifferenzierten nichtkleinzelligen Karzinom, ist eine immunhistochemische Untersuchung auf p40, p63, CK 5/6, TTF1 und Napsin für die Zuordnung und Diagnose unabdingbar (siehe dazu Kapitel 1.2.4).

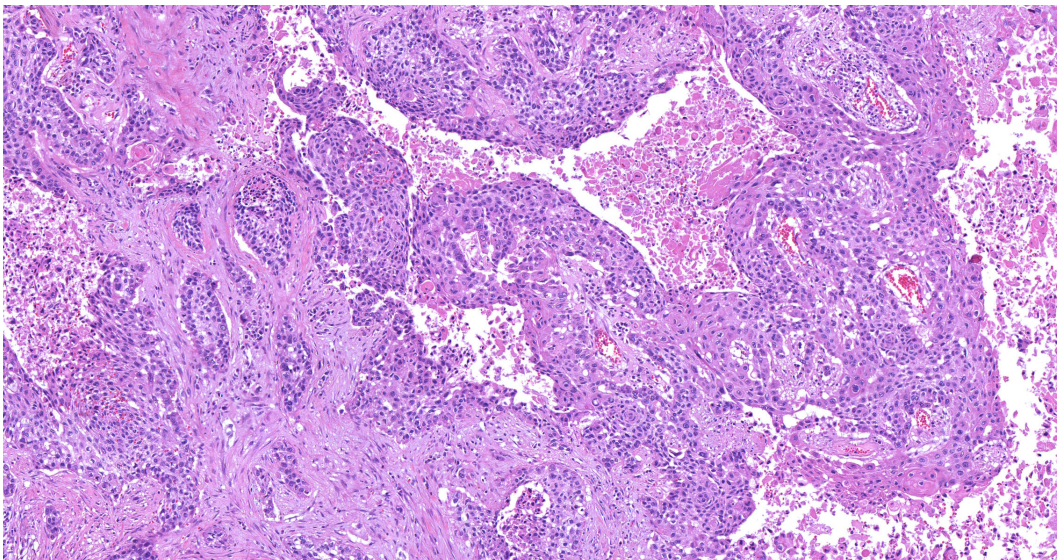


Abbildung 1.6: Verhornendes Plattenepithelkarzinom der Lunge (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 84), bereitgestellt durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck

SCLC

Das kleinzellige Lungenkarzinom besteht aus malignen, epithelialen kleinen Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation. Es ist ein Tumor, der nahezu ausschließlich bei Rauchern auftritt und sich entlang der Bronchien submukös und zirkumferenziell ausbreitet. Ein histologisches

Tumorgrading kann hier nicht angewendet werden, da es per Definition als „high grade“ eingestuft wird. Es werden CD56 und Synaptophysin als Marker einer neuroendokrinen Differenzierung exprimiert, zu dem ist das SCLC oft positiv gegen TTF-1 [52].

1.2.4 Genetik und Molekularbiologie

Lungenkarzinome entstehen aus zahlreichen genetischen und epigenetischen Veränderungen, dessen Prozess als Mehrschritt-Kanzerogenese beschrieben werden kann.

Das NSCLC weist eine größere Kerngröße auf als das SCLC. Es geht einher mit einem erhöhten Chromosomensatz (hyperdiploid) und einer triploiden oder höheren Chromosomenzahl [38]. Als Aneuploidie wird die chromosomale Veränderung im Tumorgenom beschrieben, wobei es im Rahmen einer chromosomalen Instabilität zu einem Verlust oder Gewinn von Chromosomen und -abschnitten kommen kann. Diese chromosomale Instabilität in Form von Aneuploidie, allelische Verluste (LOH=loss of heterozygosity), Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sowie aberrante Expressionen von Genen spielen in der mehrschrittigen Karzinogenese des NSCLC als auch SCLC eine entscheidende Rolle, wobei diese beim Plattenepithel-Karzinom und SCLC besonders groß sind [21, 47, 52]. Die epigenetischen Veränderungen der Tumorzellen wirken sich dabei auf die Regulation der Genexpression aus. Ziel einer vollständigen histopathologischen Untersuchung des Tumorgewebes ist es, den Tumortypen und zugrunde liegende Mutationen zu identifizieren.

Das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck nutzt folgendes Schema zur Analyse der Tumorproben von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, welcher von der IASLC/ATS/ERS Klassifikation für Lungenkarzinome aus dem Jahr 2011 abgewandelt wurde [53]. Im Folgenden wird dieses Schema erläutert.

Liegt eine Tumorprobe eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms vor, wird diese mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und zusätzlicher Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) konventionell-morphologisch analysiert. Eine Verhornung oder Interzellularbrückenbildung spricht bereits für ein Plattenepithelkarzinom, welches mit dem immunhistochemischen Nachweis von CK 5/6 und p40 bewiesen wird. Zeigt sich bei der mikroskopischen Betrachtung eine drüsige Differenzierung in Form eines lepidischen, azinären oder papillären Wachstums und Muzin, so ist von einem Adenokarzinom auszugehen. In der immunhistochemischen Analyse lässt sich TTF1, Napsin A und CK 7 nachweisen. Im Falle einer nicht eindeutigen konventionell-morphologischen Einteilung, erfolgt zur Differenzierung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms eine immunhistochemische Analyse mittels eines Marker-Panels (CK 5/6 und p40 für das Plattenepithelkarzinom, TTF1, Napsin und CK 7 für das Adenokarzinom) [5, 33, 37, 45, 51, 57].

Bei jeder Erstdiagnose eines NSCLC wird zudem der PD-L1-Status (Programmed death-ligand 1) immunhistochemisch erhoben, da dieses Protein ein möglicher Biomarker für eine Therapie

mittels Checkpoint-Inhibitoren ist. Dieser hat jedoch keine diagnostische Bedeutung.

Im Falle eines Adenokarzinoms oder eines NSCLC NOS (not otherwise specified) erfolgt automatisch eine molekular-pathologische Untersuchung. Parallel durchgeführt wird dabei das Next-Generation-Sequencing (NGS) und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs (FISH)-Analyse, bei denen ganze Genome in kurzer Zeit sequenziert und Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Bei der FISH-Analyse werden auf EML4-ALK (Echinoderm Microtubule Associated Ligand 4 - Anaplastic large cell Lymphoma receptor-tyrosine Kinase)-, ROS1- und RET- (Rearranged during Transfection) Translokation untersucht, während bei der NGS-Analyse eine Mutationsanalyse von EGFR, BRAF, K-Ras, ERBB2 (= HER2 Human Epidermal growth factor Receptor 2), MET, PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha) und TP53 erfolgt.

Die zielgerichtete Analyse der beschriebenen Mutationen ist entscheidend für eine nachfolgende Therapie. Im Folgenden werden die zu untersuchenden Mutationen des Lübecker Schemas des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck beschrieben.

Die Mutation des TP53-Tumorsuppressorgens ist die häufigste Mutation, welche das p53-Protein kodiert. Das p53-Protein spielt im Zellzyklus z.B. mit seiner antiproliferativen Wirkung als Antwort auf genomtoxischen Stress eine entscheidende Rolle. Inaktivierende TP53 Mutationen finden sich zu 50 % im NSCLC und in über 70 % im SCLC [39]. Liegt beim NSCLC eine TP53 Mutation vor, so ist dies mit einer schlechteren Prognose und einer hohen Resistenz gegenüber einer Chemotherapie und Bestrahlung assoziiert [58].

Die zweithäufigste Mutation mit ca. 25 % betrifft K-Ras, welche vor allem beim Adenokarzinom von aktiven und ehemaligen Rauchern auftritt und ein ungehemmtes Wachstum des Tumors bewirkt [44].

Die EGFR-Mutation wird in 10-16 % der Fälle beim Adenokarzinom beschrieben, wobei diese Mutation vor allem bei Nichtrauchern und Frauen auftritt. Diese aktivierende Mutation wirkt sich als onkogener Treiber stark auf das Tumorstadium aus. Anhand für EGFR spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitoren besteht heutzutage eine zielgerichtete Therapieoption [34, 40, 46, 48, 54].

Die folgenden Treibermutationen sind zwar weniger häufig, jedoch auch für die jetzige und möglicherweise zukünftige personalisierte Behandlung von entscheidender Bedeutung.

Die konstitutionelle Aktivierung des ALK- mit Fusion der EML4-Gensequenz kommt zu ca. 2-5 % beim Adenokarzinom von jungen Nichtrauchern vor. Diese Translokation schließt eine EGFR- und K-Ras Mutation aus, das heißt diese Mutationen treten nicht gleichzeitig auf [62]. Durch diese chromosomale Translokation kommt es zum Wachstum von Tumorzellen.

Bei einer ERBB2(HER2)-Mutation, welche zu 2 % beim NSCLC vorkommt, können sich Resistenzen gegenüber einer EGFR-inhibierenden Therapie beim EGFR-mutierten Adenokar-

zinom entwickeln. Auch eine BRAF-V600 Mutation kommt nur zu 2-4 % in der Lunge von nicht-kleinzelligen Tumoren vor, welches bei Aktivierung zu einem Tumorwachstum führt. Eine ROS1-, RET-, MET- und PiK3CA-Mutation kommt in weniger als 2 % beim NSCLC vor, eine zielgerichtete Chemotherapie diesbezüglich ist noch Gegenstand aktueller Forschung [11].

1.2.5 Ploidie

Die Ploidie beschreibt den chromosomalen Anteil einer Zellpopulation eines Gewebes. Im Rahmen der Mitose kommt es durch die Replikation der DNA zu einem diploiden Chromosomensatz, bestehend aus einem maternalen und einem paternalen Anteil (DNA-Gehalt $2c$). Anhand zahlreicher Kontroll- und Steuereinheiten im Zellzyklus werden Mutationen, unkontrollierte Zellvermehrung, Tumorentwicklung oder ein Zelltod unterbunden. Im Falle einer Störung dieser Kontroll- und Steuerpunkte resultieren schwerwiegende Folgen für die einzelne Zelle: es kommt zur chromosomalen Instabilität. Folge dieser chromosomalen Instabilität ist die Aneuploidie, welches bereits vor ca. 100 Jahren gezeigt werden konnte [9]. Als aneuploid werden von der Norm abweichende Chromosomenpaare beschrieben (DNA-Gehalt $5c-16c$). Im Folgenden wird die DNA-Aneuploidie betrachtet, welche sich in der Interphase der DNA befindet. Als Ursache für die Aneuploidie konnten zahlreiche Defekte in der Mitose festgestellt werden, welche in der Abbildung 1.8 in B-F dargestellt werden. Kommt es bei der Anheftung der Kinetochoren an den mitotischen Spindelapparat zu einem Defekt, so greift normalerweise der mitotische Checkpoint ein (Beispiel A in Abbildung 1.8). Im Falle eines Defekt des mitotischen Checkpoints, resultiert eine erhöhte aneuploide Zellzahl. Ebenfalls könnte es zu einer fehlerhaften Befestigung der Mikrotubuli aneinander oder zu einer fehlerhaften Chromosomen Amplifikation bei Replikationsstress kommen. Je nach Defektausmaß kommt es dabei zu einer niedrigen bis hohen chromosomalen Instabilität mit daraus entsprechend resultierender Aneuploidie [47]. Zu dem konnte gezeigt werden, dass eine DNA-Hypomethylierung zu einem aneuploiden DNA-Status führt. Bezüglich einer Hypomethylierung konnte bereits gezeigt werden, dass diese mit einer erhöhten Malignität bei der Karzinogenese resultiert [13, 14, 18, 27]. In Maus-Modellen konnte gezeigt werden, dass nur eine moderate chromosomale Instabilität lebensfähig ist und mit der einhergehenden Aneuploidie im Chromosomensatz als Ursprung der Karzinogenese gilt [20, 47] (Beispiel E in Abbildung 1.8). Ebenso gilt sie als Mitwirker einer genetischen Heterogenität mit Entwicklung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika [2, 15, 35]. Extreme chromosomale Instabilitäten sind nicht lebensfähig (siehe Beispiel F in Abbildung 1.8).

Obwohl eine erstmalige Beschreibung der Aneuploidie bereits 1902 und 1904 von Theodor Boveri [7, 8] mit der Feststellung erfolgte, dass ein chromosomaler Gewinn oder Verlust in einer Zelle zur abnormalen Entwicklung und Tod von Seeigel Eiern führte, so ist die

genaue Bedeutung der Aneuploidie für das Karzinom aufgrund der Komplexität einzelner Tumor-Phänotypen und der Inkongruenz von statistischen Analysen noch unbekannt.

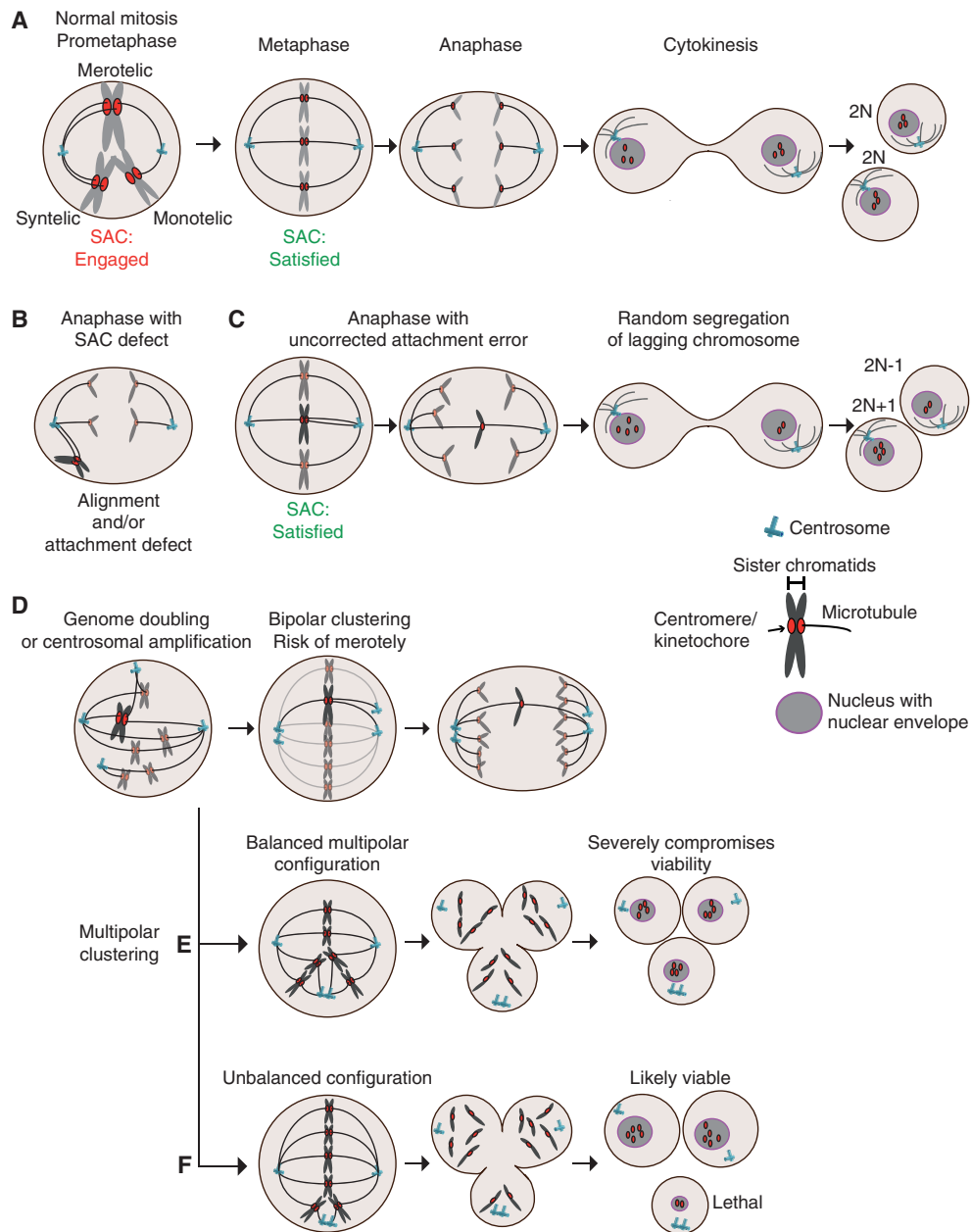


Abbildung 1.7: Aneuploidie als Folge von mitotischen Defekten [47]

1.2.6 Diagnostik

Eine exakte Bestimmung des histologischen Typs sowie die Tumorausdehnung sind für die Prognose und die Therapie beim Lungenkarzinom wesentlich. Es wird zwischen einer potentiellen kurativen Therapie (eine Operation) und einer palliativen Therapie unterschieden. Ziel der Diagnostik ist es hierbei, den Patienten auf Operabilität hin zu identifizieren und somit eine bestmögliche Therapie zu erreichen.

Die diagnostischen Methoden sind abhängig vom Tumortyp, der Größe und Lokalisation des Primärtumors, dem Vorhandensein möglicher Metastasen und dem klinischen Erscheinungsbild des Patienten. Das Lungenkarzinom wird durch einen positiven histologischen oder zytologischen Befund bewiesen. Um eine zielgerichtete Therapie in Form von speziellen Chemotherapeutika zu ermöglichen, bedarf es einer exakten Tumorklassifikation mit Mutationsanalyse.

Die Basisdiagnostik bei Verdacht auf Lungenkarzinom besteht aus Anamnese/klinischer Untersuchung, Labor, Röntgen Thorax in zwei Ebenen, Spiral-CT Thorax, Bronchoskopie und einer Sonografie vom Abdomen.

Klinische Untersuchung

Bei der Erstvorstellung eines Patienten mit Lungenkarzinom werden folgende Symptome häufig berichtet: Husten, Dyspnoe, Brustschmerzen, Gewichtsverlust, supraclaviculäre Lymphknotenschwellungen, Hämoptysen, Knochenschmerzen, Heiserkeit und Schluckbeschwerden. Zudem kann es zu paraneoplastischen Syndromen wie neuromuskuläre Erkrankungen (Lambert-Eaton-Syndrom), Hautmanifestationen (Dermatomyositis), endokrinologischen Erkrankungen (Cushing-Syndrom, Syndrom der inadäquaten Antidiuretischenhormonsekretion = SIADH) sowie Anämien und anderen Syndromen kommen. Für die Prognose ist die Dauer und Ausprägung der Symptome wichtig. Für die Therapieentscheidung sollte zudem die aktuelle klinische Situation des Patienten anhand des Karnofsky-Index (siehe Tabelle 1.1) beurteilt werden.

Tabelle 1.1: Standardisierte Erfassung des Allgemeinzustandes und der Leistungsfähigkeit [22]

Karnofsky-Index in %		ECOG-Performance Status in Grad	
100	Normalzustand, keine Beschwerden keine manifesten Erkrankungen	Normale, uneingeschränkte Aktivität, wie vor der Erkrankung	0
90	Normale Leistungsfähigkeit, minimale Krankheitssymptome		
80	Normale Leistungsfähigkeit mit Anstrengung, geringe Krankheitssymptome	Einschränkung bei körperlicher Anstrengung, gehfähig, leichte körperliche Arbeit möglich	1
70	Eingeschränkte Leistungsfähigkeit, arbeitsunfähig, kann sich selbst versorgen		
60	Eingeschränkte Leistungsfähigkeit, benötigt gelegentlich fremde Hilfe	Gehfähig, Selbstversorgung möglich, aber nicht arbeitsfähig, kann mehr als 50 % der Wachzeit aufstehen	2
50	Eingeschränkte Leistungsfähigkeit, braucht krankenschwägerische und ärztliche Betreuung, nicht dauernd bettlägerig		
40	Bettlägerig, spezielle Pflege erforderlich	Nur begrenzte Selbstversorgung möglich; 50 % oder mehr der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden	3
30	Schwer krank, Krankenhauspflege notwendig		
20	Schwer krank, Krankenhauspflege und supportive Maßnahmen erforderlich	Völlig pflegebedürftig, keinerlei Selbstversorgung möglich, völlig an Bett oder Stuhl gebunden	4
10	Moribund, Krankheit schreitet schnell fort		
0	Tot	Tot	5

Bildgebung

Die Grundlage der bildgebenden Diagnostik ist das Röntgen des Thorax in zwei Ebenen, welches oft den Tumorverdacht erhärtet oder Ausgangspunkt weiterer bildgebenden Verfahren darstellt.

Das Kontrastmittel verstärkte CT-Thorax ist die Methode erster Wahl zur Abklärung pulmonaler und mediastinaler Raumforderungen. Hier können zahlreiche mediastinale und pulmonale Raumforderungen mit ihrer Größe und Lagebeziehung zu wichtigen Gefäßen, Bronchien, Nachbarorganen wie Zwerchfell, Herz, Leber, Skelett und Lymphknoten überlagerungsfrei dargestellt werden.

Der Vorteil eines PET/CTs mit ¹⁸F-FDG-PET ist die Darstellung des Tumorstoffwechsels und dessen Vitalität, welches auch Methode erster Wahl ist. Vor allem nach neoadjuvanter Behandlung kann mit einer PET/CT ein möglicher OP- oder Bestrahlungsplan erarbeitet werden sowie kann das Ansprechen eines Chemotherapeutikums hiermit früher nachgewiesen werden als mit einem herkömmlichen CT. Mögliche unbekanntete Fernmetastasen können

detektiert werden, so dass das PET/CT zur Bestimmung des initialen Tumorstadiums des Lungenkarzinoms und zur Verlaufskontrolle eine besondere Rolle in der Diagnostik spielt.

Bronchoskopie

Häufig wird die flexible Bronchoskopie unter Lokalanästhesie und leichter Sedierung durchgeführt. Bei unklaren Rundherden, rezidivierenden und therapieresistenten Pneumonien, unklarer Heiserkeit, Hämoptysen und klinischen Tumorhinweisen ist die Indikation hierfür gegeben. Ein vorheriges, nicht älter als 3 Wochen, CT-Thorax erleichtert die Tumorsuche und die Navigation, so dass 3-5 Biopsien bei sichtbaren Tumoren ausreichen. Zusätzlich sollte eine Bronchiallavage mit zytologischer Aufarbeitung erfolgen. Für nicht sichtbare Tumoren bedarf es mindestens an 5-10 Biopsien. Bei Patienten mit zentraler Tumorlokalisation ist die Bronchoskopie das sensitivste Verfahren zur Sicherung der Diagnose, bei Patienten mit kleinen peripheren Rundherden (<2cm) bedarf es zusätzlicher Hilfsmittel wie EBUS (=endobronchialer Ultraschall). Durch den EBUS ist eine Feinnadelpunktion von Lymphknoten und submukös wachsenden Tumoren möglich.

Stadieneinteilung

Nach Sicherung der Tumordiagnose werden alle Patienten bei Einverständnis den zuständigen Tumorzentren gemeldet.

Für die Therapieplanung und zur Einschätzung der Prognose ist die Stadieneinteilung (Staging) von größter Wichtigkeit. Die Tumorgöße, die lokale Tumorausbreitung mit Lappen- oder Organüberschreitung, der Befall hilärer und mediastinaler Lymphknoten und eine potentielle Fernmetastasierung spielen dabei eine Rolle. Zudem ist das Staging für eine mögliche operative Therapie oder Radiochemotherapie entscheidend. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom und/oder schlechtem Allgemeinzustand, die nur noch einer palliativen Therapie zugeführt werden können, werden weitere Staginguntersuchungen wegen fehlender Konsequenzen unterbunden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen werden nach dem TNM-System eingeteilt, anhand derer eine stadiengerechte Therapieplanung für jedes Lungenkarzinom ermöglicht wird. Seit dem 1. Januar 2017 ist die IASLC/UICC8 Klassifikation gültig. Für das SCLC gibt es neben der TNM-Klassifikation noch die Einteilung in Limited oder Extensive Disease. In Limited Disease werden die Stadien I-IIIB eingeteilt, Extensive Disease bedeutet eine Metastasierung außerhalb des betroffenen Hemithorax.

T-Staging Als T-Staging wird die Ausbreitungsdiagnostik des Primärtumors verstanden. Vor allem das CT mit Kontrastmittel wird zur Diagnostik angewendet.

N-Staging Lymphknotenmetastasen werden mit dem N-Staging erfasst. Vor allem beim NSCLC ist ein genaues mediastinales Lymphknotenstaging obligat, um im frühen Stadium eine kurative Operation zu ermöglichen. Im CT mit Kontrastmittel können die Lymphknoten gut dargestellt werden, sensitiver ist jedoch das PET/CT.

M-Staging Das M-Staging befasst sich mit der Suche nach Fernmetastasen. Bei Patienten mit klinischem Verdacht sollte eine entsprechende Diagnostik wie Abdomen-CT, CT vom Schädel oder eine Skelett-Szintigrafie laufen.

UICC Die 8. UICC (Union Internationale Contre le Cancer) Klassifikation von 2017 gilt als einheitliche TNM Klassifikation zum Staging von Tumorerkrankungen. Die internationale Vereinigung publiziert neue Daten zur Prävention, Therapie und Erforschung von Karzinom-erkrankungen.

Tabelle 1.2: TNM Klassifikation Version 2017 [59]

T: Primärtumor	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar oder maligne Zellen im Sputum oder BAL ohne radiologischen oder bronchoskopischen Tumornachweis
T0	kein Nachweis eines Primärtumors
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm im größten Durchmesser, umgeben von Lunge oder Pleura visceralis ohne bronchoskopischen Hinweis auf Invasion proximal eines Lappenbronchus
T1mi	minimalinvasives Adenokarzinom
T1a	Tumor ≤ 1 cm im größten Durchmesser
T1b	Tumor > 1 cm aber ≤ 2 cm im größten Durchmesser
T1c	Tumor > 2 cm aber ≤ 3 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor > 3 cm aber ≤ 5 cm oder Tumor mit einer der folgenden Eigenschaften: Befall des Hauptbronchus, unabhängig vom Abstand zur Carina aber ohne Beteiligung der Hauptcarina Befall der Pleura visceralis Assoziation mit Atelektase oder instruktiver Pneumonitis, die bis in hiliäre Region reicht
T2a	Tumor > 3 cm oder ≤ 4 cm im größten Durchmesser
T2b	Tumor > 4 cm aber ≤ 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor > 5 cm aber ≤ 7 cm im größten Durchmesser oder Assoziation mit separaten Tumorherden im selben Lappen wie der Primarius oder Invasion des Primärtumors in eine der folgenden Strukturen: Thoraxwand, N. Phrenicus, Perikard
T4	Tumor > 7 cm im größten Durchmesser oder Assoziation mit separaten Tumorherden in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen oder Invasion des Primärtumors in eine der folgenden Strukturen: Diaphragma, Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, N. Recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Hauptcarina
N: Regionale Lymphknotenbeteiligung	
Nx	regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hiliären sowie intrapulmonalen Lymphknoten
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subcarinären Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hiliären, ipsilateralen oder kontralateralen skalenen oder supraclaviculären Lymphknoten
M: Fernmetastasierung	
M0	keine Fernmetastasierung
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	separate Tumorherde in einem kontralateralen Lungenlappen, Pleura oder Perikardmetastasen, maligner Pleura- oder Perikarderguss
M1b	einzelne extrathorakale Metastasen
M1c	multiple extrathorakale Metastasen in einem oder mehreren Organen

Tabelle 1.3: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC8 [23]

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fermetastasen
0	Tis	N0	M0
IA ₁	T1a(mi)	N0	M0
	T1a	N0	M0
IA ₂	T1b	N0	M0
IA ₃	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a-c	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a-c	N2	M0
	T2a-b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIB	T1a-b	N3	M0
	T2a-b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
IIIC	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
IVA	jedes T	jedes N	M1a
	jedes T	jedes N	M1b
IVB	jedes T	jedes N	M1c

Operabilität

Nach onkologischen Kriterien kann in eine kurative oder palliative Operabilität eingeteilt werden. Eine Inoperabilität ist meist durch die Tumorausbreitung bedingt oder gar durch eine eingeschränkte kardiopulmonale Leistungsfähigkeit, wobei besonders die Lungenfunktion eine zentrale Rolle spielt.

Eine kurative Operation ist durchführbar, wenn folgende Kriterien erfüllt sind: Keine Fernmetastasen, keine Pleurametastasen oder maligner Pleuraerguss, keine tumorbedingte Recurrensparese, keine ipsilateral supraclaviculären, kontralateral hiläre oder mediastinalen Lymphknotenmetastasen, keine Infiltration der Aorta, des Ösophagus und der Trachea.

Eine allgemeine Einschätzung zur Operabilität besteht aus folgenden Grenzwerten: biologisches Alter > 80 Jahre, ECOG-Performancestatus (Eastern Cooperative Oncology Group) > 2 und Karnofsky-Index < 50 %.

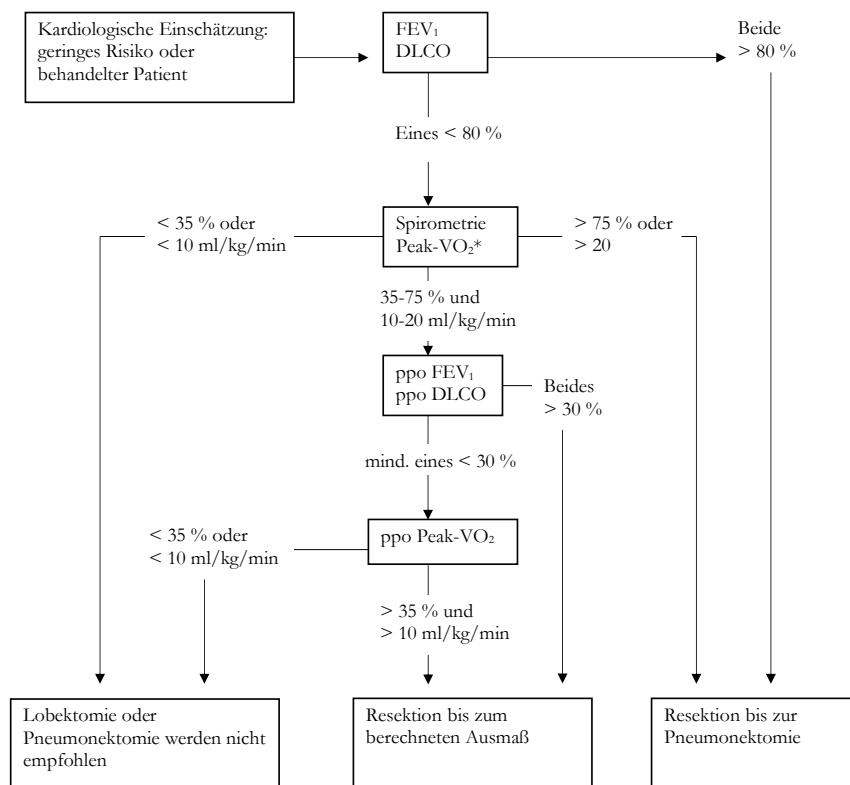


Abbildung 1.8: Algorithmus zur Abschätzung der Operabilität (nach ERS/ESTS-Guidelines, Brunelli [10])

*Falls Spiroergometrie nicht möglich, dann alternativ Treppensteigen 22 m

1.2.7 Therapie und Prognose

Um das entsprechende Therapieverfahren und die Prognose zu entscheiden, bedarf es einer exakten Erfassung der Histologie, des Tumorstadiums und ggf. einer Molekularbiologie.

Kleinzelliges Lungenkarzinom

Im Stadium I und II mit peripheren Tumoren (Limited Disease) wird primär eine Operation und anschließend 4-6 Zyklen adjuvanter Chemotherapie angewendet. Zu dem wird eine Nachbestrahlung empfohlen. Insgesamt gibt es jedoch wenig Patienten im Stadium I und II mit peripher gelegenem, operablem Tumor.

Im Stadium I und II mit zentralem Sitz bzw. fehlender Operabilität, IIIA und IIIB (Limited Disease) wird primär eine Kombinationschemotherapie in 4-6 Zyklen angestrebt. Eine simultane Kombination mit einer Strahlentherapie ist zu empfehlen, um bessere Ergebnisse zu erzielen.

Stadium IV (Extensive Disease) wird primär mit einer Chemotherapie behandelt, auch bei metastasierten Formen. Häufiger kommt es hierbei jedoch aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes des Patienten zu toxischen Nebenwirkungen, welche besonderer Beachtung bedürfen. Gegebenenfalls kann eine lokale Strahlentherapie hinzugezogen werden [52, 42].

Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom

Stadium IA Therapie der Wahl ist die Operation, sofern keine Kontraindikationen vorliegen. Die postoperative 5-Jahresüberlebensrate (5JÜR) liegt bei 75-80 %. Eine adjuvante Therapie ist dabei nicht nötig. Bei inoperablem Tumor oder schwerwiegenden Komorbiditäten wird eine Strahlentherapie angewendet.

Stadium IB Therapie der Wahl ist die Operation, sofern keine Kontraindikationen vorliegen. Die postoperative 5-Jahresüberlebensrate (5JÜR) liegt bei 55-60 %. Gegebenenfalls profitieren einige Patienten (Tumorgröße > 4 cm) von einer adjuvanten Chemotherapie. Alternativ kann auch eine neoadjuvante Chemotherapie bei folgenden Kriterien empfohlen werden: Tumorgröße > 4 cm, Kandidat für adjuvante Chemotherapie, Pneumonektomie geplant. Eine adjuvante Strahlentherapie ist nur indiziert bei inkompletter Resektion oder als primäre Therapiemaßnahme bei inoperablen Patienten.

Stadium IIA und IIB Therapie der Wahl ist die Operation, sofern keine Kontraindikationen vorliegen. Die postoperative 5-Jahresüberlebensrate (5JÜR) liegt für das Stadium IIA zwischen 45 - 55 %, für das Stadium IIB zwischen 35 - 45 %. Eine adjuvante Chemotherapie wird empfohlen, da das 5JÜR um 5 % absolut verbessert wird. Alternativ zur adjuvanten

Chemotherapie kann auch eine neoadjuvante Therapie angewendet werden. Auch hier ist eine Strahlentherapie nur als primäre Therapiemaßnahme bei inoperablen Patienten zu empfehlen.

Stadium III Die 5-Jahresüberlebensrate liegt für das Stadium IIIA zwischen 15 - 40 %, für das Stadium IIIB zwischen 5 - 10 %. Hier spielt vor allem das Ausmaß und die Lokalisation der Lymphknotenmetastasen eine prognostische Rolle.

Stadium IIIA Die Operation ist die lokale Therapie der Wahl. Bei Patienten mit Infiltration der Thoraxwand (T3), Wirbelkörper, Pulmonalarterie, Mediastinum, Trachea oder Bifurkation (T4), sollten zur Abklärung einer möglichen Resektabilität einem erfahrenen Thoraxchirurgen vorgestellt werden. Bei Infiltration der Aorta oder des Ösophagus sollte aufgrund der hohen Mortalität zurückhaltend gehandelt werden. In jedem Fall ist eine Besprechung in einer interdisziplinären Tumorboardkonferenz indiziert. Nach einer R0-Resektion sollte eine adjuvante Chemotherapie erfolgen. Der Nutzen einer postoperativen Strahlentherapie wird zur Zeit noch diskutiert, in einer N2 Situation bei Patienten unter 65 Jahren mit guten Allgemeinzustand wird sie aber zur Reduktion eines lokalen Rezidivs angeboten.

Stadium IIIB Es wird eine kombinierte Radiochemotherapie angewendet, womit eine Steigerung der 2 Jahresüberlebensrate um 8 % absolut erzielt wird. Ein anschließendes operatives Verfahren ist nicht auszuschließen bei jungen Patienten mit guten Allgemeinzustand.

Stadium IV 35-40 % der Patienten mit NSCLC werden im Stadium IV diagnostiziert. Eine palliative Therapie ist hierbei indiziert. In Ausnahmefällen kann bei einer einzelnen Lungenmetastase der Gegenseite, bei solitären Nebennierenmetastasen oder bei wenigen (meist weniger als 3) therapierbaren Hirnmetastasen eine kurative Operation angeboten werden, sofern der Lymphknotenbefall nicht N2 lautet. Bei multiplen Metastasen ist das Therapieziel palliativ; besonders immunhistochemische und genetische Marker spielen für die Therapie eine wichtige Rolle [42, 52].

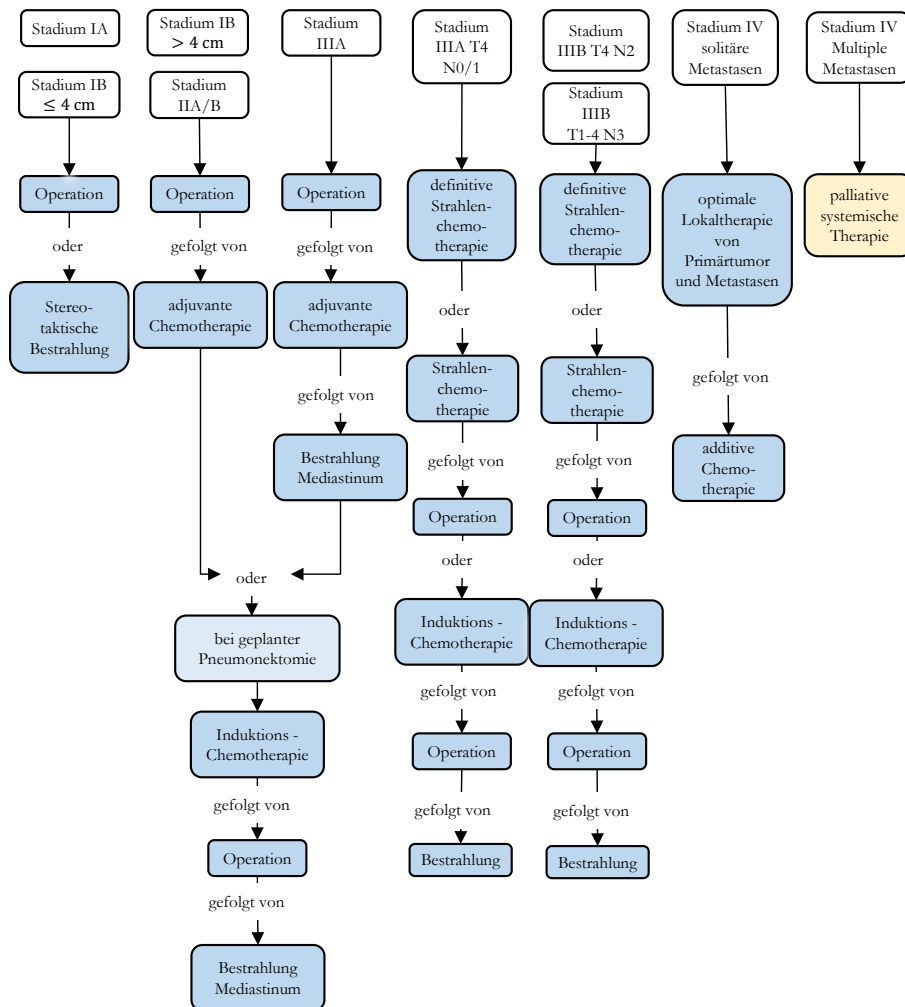


Abbildung 1.9: Therapiekonzept für das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) [42]

1.2.8 Nachsorge

Die Nachsorge verfolgt das primäre Ziel, ein Rezidiv möglichst frühzeitig zu detektieren, die Überlebenszeit zu verlängern und Nebenwirkungen der Therapie und Vorsorge zu erkennen. Am Krebszentrum des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck erfolgt die postoperative Nachsorge im ersten und zweiten Jahr alle 3 Monate mittels Überprüfung der Lungenfunktion sowie alle 6 Monate mittels CT vom Thorax und Oberbauch. Im dritten bis fünften postoperativen Jahr wird jedes halbe Jahr die Funktion der Lunge überprüft und einmal im Jahr eine Untersuchung mittels CT durchgeführt. Die darauffolgenden Jahre reicht eine Lungenfunktionsprüfung einmal im Jahr.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Dissertation widmet sich der Frage, welche Rolle der DNA-Ploidiestatus beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom spielt. Bei vielen anderen Tumoren konnte gezeigt werden, dass der Ploidiestatus ein bedeutender Marker für das klinische Outcome der Patienten darstellt [31, 32, 36, 43]. Zudem gilt die Aneuploidie als Ursprung bei der Entwicklung von bösartigen Tumoren [20] und nimmt Einfluss auf die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika [35]. Bezüglich des Lungenkarzinoms gibt es bis auf zwei Studien aus den frühen 2000 [12, 30] keine ausreichende aktuelle wissenschaftliche Dokumentation, welche Rolle die Aneuploidie bei klinischen Parametern spielt und wie sehr sie den Verlauf der Erkrankung beeinflusst. Aufgrund der veralteten Methodik Anfang des 21. Jahrhundert und den heutzutage neuen Möglichkeiten der Genomuntersuchungen, ist das Ziel dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken, Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holsteins, Lübeck, den Ploidiestatus beim Adeno- und Plattenepithel-Karzinom des Lungenkarzinoms auf folgenden drei Teilaspekten zu untersuchen:

- 1) Ist der Ploidiestatus abhängig von klinischen Parametern wie Nikotinabusus, Alter und Geschlecht und gibt es eine Differenzierung zwischen Ploidiestatus beim Adeno- und Plattenepithelkarzinom?
- 2) Verursacht die Aneuploidie ein fortgeschritteneres TNM-Stadium und ist sie folglich aggressiver im Verlauf?
- 3) Haben Patienten mit einem diploiden Chromosomensatz ein besseres klinisches Outcome als aneuploide und gilt somit der Ploidiestatus beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom auch als Prognosemarker?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Die Patientenkohorte der retrospektiven Studie wurde aus einem Patientenkollektiv der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holsteins, Lübeck zusammengestellt. Im Zeitraum von 2010 bis 2016 wurden 118 Patienten erfasst. Die Patientenproben wurden mit Einverständnis des Patienten und nach den Leitlinien der lokalen Ethikkommission zusammengetragen und verwendet (Universität zu Lübeck, Aktenzeichen 17-043). Es wurden nur Patienten in die Studie eingeschlossen, die ein Adenokarzinom oder Plattenepithel-Karzinom der Lunge haben und weder eine neoadjuvante Radio- noch Chemotherapie erhalten haben. Die Selektion des Patientenkollektivs erfolgte chirurgisch und beinhaltet Patienten, welche ein maximales UICC-Stadium von IIIA bei Diagnosestellung aufwiesen und operativ im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck versorgt wurden.

Das endgültige Patientenkollektiv besteht aus 42 Frauen und 76 Männern im Alter zwischen 48 und 78 Jahren (siehe Tabelle 2.1), die an einem Lungenkarzinom erkrankt sind. Das in der Operation entnommene Lungengewebe wurde vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck, in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und histologisch beurteilt. Es wurde für jede einzelne Patientenprobe ein Paraffinblock für die Anfertigung von Gewebsschnitten ausgewählt. Dabei entstanden 4 Objektträger mit Gewebestücke vom Tumor und 4 Objektträger mit Gewebestücke von gesundem Gewebe, welche Imprints genannt werden.

Es wurde das Alter zum Diagnosezeitpunkt, das Geschlecht, die Tumorhistologie, das Staging und Grading, die Ploidie, die Tumorlokalisierung, die Tumorgroße, der Raucherstatus und die Überlebenszeit danach erhoben (siehe Tabelle 2.2). Für die statistische Analyse der 3-Jahres-Überlebenszeit erfolgte eine Selektion des Patientenkollektiv bis einschließlich dem 01.08.2017, so dass 57 Patientendaten für das Follow-Up eingeschlossen werden konnten.

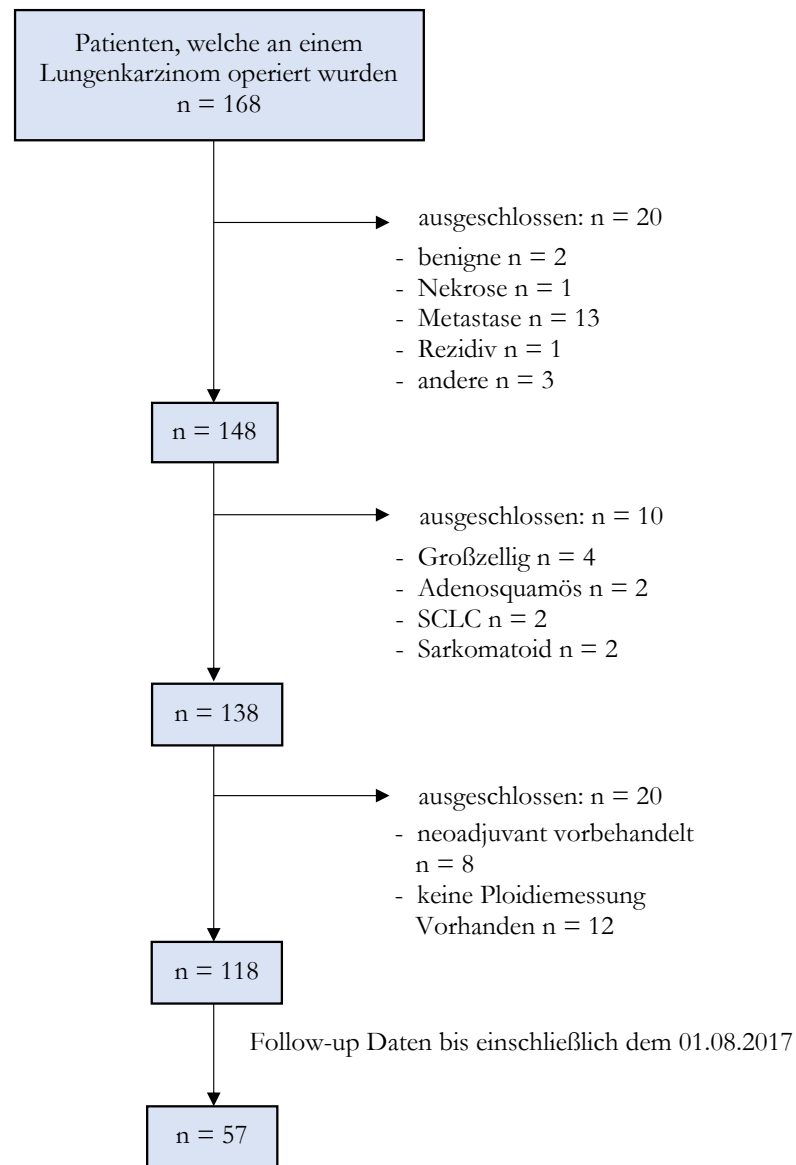


Abbildung 2.1: Übersicht der in die Studie eingeschlossenen Patientendaten

Tabelle 2.1: Häufigkeitsverteilung

klinischer Parameter		Wert in %
Geschlecht	<i>Frauen</i>	42
	<i>Männer</i>	76
Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation	<i>Mittelwert</i>	66,47
	<i>Spannweite</i>	48 - 87
Überleben (Monate)	<i>Mittelwert</i>	35,21
	<i>Spannweite</i>	1 - 81

Tabelle 2.2: Häufigkeitsverteilung erhobener klinischer Parameter

klinischer Parameter		Lungenkarzinom-Gewebe n (%)
Histologie	Adenokarzinom	62 (52,5 %)
	Plattenepithel-Karzinom	56 (47,5 %)
Tumorlokalisation	rechter Oberlappen	52 (44,1 %)
	Mittellappen	2 (1,7 %)
	rechter Unterlappen	27 (22,9 %)
	linker Oberlappen	27 (22,9 %)
	linker Unterlappen	10 (8,5 %)
T-Stadium	T1	34 (28,8 %)
	T2	54 (45,8 %)
	T3	24 (21,2 %)
	T4	5 (4,2 %)
N-Stadium	0	73 (61,9 %)
	1	25 (21,2 %)
	2	20 (16,9 %)
M-Stadium	0	107 (80,7 %)
	1	11 (9,3 %)
Grading	0	4 (3,4 %)
	1	61 (51,7 %)
	2	53 (44,9 %)

2.1.2 Verbrauchsmaterial/Chemikalien

Aktivkohle	Hassa, 111.751.000
Deckgläser 24x60 mm	Menzel, 9.161060
Entellan	Merck, 1.07961.0100
Ethanol absolut, 96 % und 70 % (vergällt)	Ethanol UKSH, SAP: 49010016
Filter 595½, Durchmesser 240 mm	Schleicher & Schnell, 10311651
Formaldehyd, 4,5 %	Roth, 2213.3
HCL 1 M, HCL 5 M	
Kaliumpyrosulfit	Sigma-Aldrich, P2522-500G
Natriumpyrosulfit/ $Na_2S_2O_5$	Sigma-Aldrich, P255556-100G
Paraffinschnitte (8 µm)/luftgetrocknete Imprints	
Pararosanilin/Parafuchsin	Sigma-Aldrich, P3750-25G
Pinzette/Präpariernadel	
Präparate-Mappe	
Xylol (reinst.)	J.T.Baker, 8118.5000

2.1.3 Puffer und Lösungen

HCL 1 mol/l (1 Liter):

917,30 ml Millipore + 82,70 ml HCL (37 %, rauchend)

HCL 5 mol/l (1 Liter):

587 ml Millipore + 413 ml HCL (37 %, rauchend)

Natriumpyrosulfit/ $Na_2S_2O_5$: (immer frisch ansetzen)

Stammlösung: 2,4 g $Na_2S_2O_5$ + 125 ml Millipore

Daraus Gebrauchslösung ansetzen: 10 ml $Na_2S_2O_5$ + 10 ml HCL 1 M + 180 ml Millipore

Schiff's Reagenz:

(15 ml HCL 1 M + 0,5 g Pararosanilin/Parafuchsin) + (85 ml Millipore-Wasser + 0,5 g

Kaliumpyrosulfit ($K_2S_2O_5$))

(Zubereitung siehe Anhang)

2.1.4 Geräte

Autoklav

Färbekammer

Gefrierschrank

Lichtmikroskop

Videokamera

2.1.5 Software

DNA-Analyse Software ACAS-ICM O. Ahrens, Bargteheide, Deutschland

SPSS Statistics Version 25 IBM

2.2 Methoden

2.2.1 Ploidiemessung

Mittels Feulgen-Bildzytometrie wird die DNA des untersuchten Gewebes selektiv gefärbt, so dass der DNA-Gehalt der jeweiligen Zellkerne mikroskopisch nachweisbar und messbar ist. Anhand von diploiden Referenzkerne wird der Ploidiegehalt der untersuchten Kerne ermittelt.

Reaktion der Feulgenfärbung

Die Feulgen-Färbung ist die meistverwendete und quantitativste Technik der Zyto- und Histochemie und dient als Methode zum Nachweis der DNA. Sie wurde 1924 erstmals durch Dr. Feulgen und Dr. Rosenbeck beschrieben und dient der Bildung freier Aldehydgruppen im Molekül Desoxyribose der DNA. Anschließend werden die freien Aldehydgruppen der depurinierten DNA mittels Schiff's Reagenz sichtbar gemacht. Die Schiff's Reagenz wurde vom deutsch-italienischen Chemiker Hugo Schiff erfunden und beruht auf einer Reaktion vom Farbstoff Fuchsin.

Mittels Säurebehandlung werden die Wasserstoffbrücken des DNA-Doppelstranges getrennt und die N-glykosidischen Bindungen zwischen Desoxyribose und den Purinbasen hydrolysiert. Die nun freistehenden Aldehydgruppen an den Desoxyriboseresesten werden durch Zugabe von Pararosanilin/Parafuchsin, Kaliumpyrosulfit ($K_2S_2O_5$) und Salzsäure (HCL) im Sinne des Schiff's Reagenz gebunden, welches als Nachweisreaktion gilt. Die freien Aldehydgruppen binden Aminogruppen des Pararosanilin/Parafuchsin kovalent über SO_2 . Durch die Freisetzung des SO_2 wird die Fällung des Farbstoffs von Pararosanilin/Parafuchsin wieder hergestellt, so dass die Menge gebundenen Farbstoffs proportional zum DNA-Gehalt der Zellkerne ist, welcher sich mittels Extinktionsmessung mikroskopisch ermitteln lässt.

Färbung

Die zu färbenden Paraffinschnitte (Imprints) werden zunächst in Xylol entparaffiniert und anschließend im sinkenden Alkoholgehalt rehydriert. Über Nacht erfolgt die Fixierung in 4,5 % Formaldehyd (Protokoll im Anhang). Am folgenden Tag erfolgt die Färbung der Präparate mit Färbung der Referenz (Tonsillenpräparat, bereitgestellt aus der HNO-Klinik UKSH, Campus Lübeck).

Nach einer ersten Spülung erfolgt die saure Hydrolyse für 60 Minuten bei Raumtemperatur, danach erneut Spülung und für 120 Minuten Färbung mittels Schiff's Reagenz im Dunklen bei Raumtemperatur. Nach einer Spülung erfolgt die dreimalige Waschung mittels Natriumpyrosulfit ($Na_2S_2O_5$) für 10 Minuten, danach erneut spülen der Präparate. Im Anschluss erfolgt die Dehydrierung im steigenden Alkoholgehalt und Xylolbad sowie ein Eindeckeln mit Entellan.

Messprinzip des Densitometers

Als Densitometrie wird eine quantitative Messung einer Farbdichte bezeichnet. Bei der Feulgen-Densitometrie wird die Lichttransmission einer Kernregion gemessen. Durch unterschiedlich starker Lichtabsorption des an die DNA gebundenen Farbstoffes, bedingt durch den DNA-Gehalt, und unterschiedlicher Schichtdicke ergeben sich hier einzelne Werte, welche durch das Lambert-Beersche Gesetz berechnet werden. Durch ein Charge-coupled Device (CCD) Sensor der Videokamera wird das Mikroskopbild auf einen Computer übertragen. Nun erfolgt zur besseren Beurteilung die Einteilung in ein Raster aus optisch homogenen Pixeln gleicher Größe. Die Lichtintensität der einzelnen Pixel wird über Graustufen gemessen, so dass aus den jeweiligen Werten die Absorbanz des jeweiligen Kerns errechnet wird.

Quantitative Analyse des DNA-Gehaltes pro Einzelzelle (-kern)

Die DNA-Analyse der Imprints erfolgt automatisch durch AhrensICM Software (ACAS). Es werden dabei 25 % des Gesamtpräparates gemessen. Die auf dem Mikroskop installierte CCD-Video-Kamera erzeugt vom Präparat ein digitales Bild auf einem Computer. Anschließend werden die Zellkerne selektiv für die Untersuchung ausgewählt. Als Minimum sind 1000 Analysezellen erwünscht, die mit 88 Referenzzellen vom Tonsillenpräparat bezüglich Ploidiegehalt analysiert werden. Die Tumorzellen decken dabei einen DNA-Gehalt von unter 2c Zellen bis über 4,4c Zellen ab, welche mit einem unterschiedlichen Farbcode markiert sind. (Protokoll im Anhang)

Interpretation der DNA-Histogramme

Nach abgeschlossener DNA-Analyse erfolgt der Ausdruck des jeweiligen Labor-Reports pro Präparat, bei welchem das DNA-Histogramm, die Anzahl der Referenz- und Analysezellen, der Ploidiebereich, die 5c-Exzision-Stelle und die Stammlinie, welche mindestens 2,0c entsprechen sollte, zu sehen sind. Die DNA-Histogramme werden von zwei erfahrenen Begutachter analysiert und als diploider oder aneuploider Tumor letztendlich eingeordnet. Die DNA Aneuploidie bezeichnet eine zusätzliche Stammlinie im Histogramm oder Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt größer als 5c.

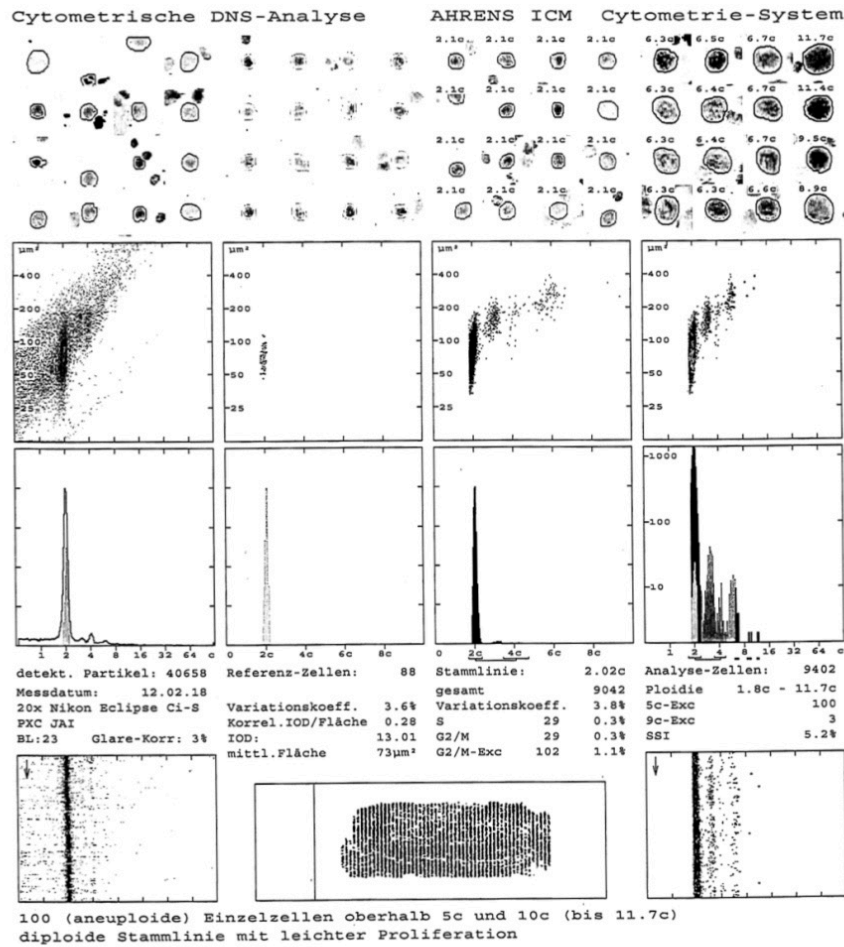


Abbildung 2.2: Labor-Report

2.2.2 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS Statistics Version 25. Zur Prüfung der Korrelation zwischen dem Ploidie-Status des Tumors und klinischen Parametern wie Geschlecht, Histologie, Altersgruppe, TNM-Status und Grading, UICC-Stadium, PackYears, Tumorlokalisation, Tumorgröße und Satellitenherde diente bei unverbundenen dichotomen Parametern der Chi-Quadrat-Test nach Pearson und Fisher's exakter Test.

Es erfolgte eine Analyse der Überlebenszeit nach Kaplan-Meier, beginnend ab Operationstag des Patienten. Die Überlebenskurven wurden mittels Log-Rank Test miteinander verglichen. Bei allen Analysen wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Korrelation zwischen Ploidie und klinischen Parametern

Es erfolgt die statistische Auswertung des Gesamtkollektivs in Hinblick auf klinische Parameter verglichen mit dem Ploidiestatus.

3.1.1 Statistische Auswertung des Gesamtkollektivs Adeno- und Plattenepithelkarzinom (n = 118)

Bei der Korrelation des Geschlechts, des Alters eingeteilt in Altersgruppen (unter 70 Jahren und 70 Jahre oder älter) und dem Raucherstatus erhoben in PackYears (unter 45 PY und 45 PY oder mehr) zeigten sich keine statistische Signifikanz (siehe Tabelle 3.1). Die Anzahl des erhobenen Raucherstatus zeigte sich auch verringert, da es entweder keine Informationen bezüglich des Rauchverhaltens gab oder die Patienten Nichtraucher waren. Zu dem erfolgte die Betrachtung der Korrelation zwischen Ploidiestatus und der einzelnen Histologien. Hier zeigte sich, dass es keinen statistischen Zusammenhang zwischen Adeno- oder Plattenepithelkarzinom und dem Vorkommen von aneuploiden Zellen gibt ($p = 0,243$).

Es folgt die Korrelation des TNM-Stadium mit dem Ploidiestatus. Weder das pT-Stadium, in Gruppen eingeteilte pT-Stadien, das UICC-Stadium, der pN-Status noch der cM-Status lieferten signifikante Werte.

Bei der Lokalisation des Tumors in Hinblick auf die betroffene Lungenflügelseite und Lungenlappen mit möglichen Satellitenherden sowie bei der Tumorengröße zeigten sich keine signifikanten Werte (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Chi-Quadrat Analyse des Gesamtkollektivs Adeno- und Plattenepithelkarzinom n = 118

Variable		diploid	aneuploid	P-Wert
Geschlecht	männlich	23	53	0,301
	weiblich	9	33	
	Gesamt	32	86	

Fortsetzung nächste Seite

Variable		diploid	aneuploid	P-Wert
Altersgruppe in Jahren	< 70	18	58	0,259
	≥ 70	14	28	
	Gesamt	32	86	
pT	1	14	20	0,089
	2	11	43	
	3	7	18	
	4	0	5	
	Gesamt	32	86	
pT- Gruppe	pT1-2	25	63	0,589
	pT3-4	7	23	
	Gesamt	32	86	
UICC	0 – IA_{1-3}	9	14	0,833
	<i>IB</i>	6	15	
	<i>IIA</i>	3	9	
	<i>IIB</i>	7	21	
	<i>IIIA</i>	4	16	
	<i>IIIB – IIIC</i>	1	2	
	<i>IVA – IVB</i>	2	9	
	Gesamt	32	86	
PY ohne Nichtraucher	< 45	12	31	0,381
	≥ 45	7	29	
	Gesamt	19	60	
Thoraxseite	rechts	23	57	0,563
	links	9	29	
	Gesamt	32	86	
Tumorlokalisation	rechter Oberlappen	14	38	0,225
	Mittellappen	2	0	
	rechter Unterlappen	7	20	
	linker Oberlappen	7	20	
	rechter Oberlappen	2	8	
	Gesamt	32	86	

Fortsetzung nächste Seite

Variable		diploid	aneuploid	P-Wert
Histologie	Adenokarzinom	14	48	0,243
	Plattenepithelkarzinom	18	38	
	Gesamt	32	86	
Tumorgrößengruppe in cm	0 - 4,9	21	54	0,916
	5,0 - 7,0	7	22	
	> 7,0	4	10	
	Gesamt	32	86	
Satellitenherde	keine	30	73	0,279
	gleicher Lappen	2	7	
	Nachbarlappen	0	6	
	Gesamt	32	86	
pN	keine	23	50	0,394
	1	5	20	
	2	4	16	
	Gesamt	32	86	
cM	keine	30	77	0,484
	1	2	9	
	Gesamt	32	86	
Lymphangiosis carcinomatosa	keine	29	68	0,145
	1	3	18	
	Gesamt	32	86	
Veneninfiltration	keine	26	77	0,23
	1	6	9	
	Gesamt	32	86	
Grading	1	1	3	0,965
	2	16	45	
	3	15	38	
	Gesamt	32	86	
Grading dichotom	1 - 2	17	48	0,794
	3	15	38	
	Gesamt	32	86	

3.1.2 Statistische Auswertung des Adenokarzinoms (n = 62)

Die klinischen Parameter Geschlecht, Alter eingeteilt in Altersgruppen und Raucherstatus zeigten bei der Korrelation mit dem Ploidiestatus keine statistische Signifikanz, sowie bei der Tumorengröße und Tumorlokalisierung mittels betroffener Lungenflügelseite, Lungenlappen und Satellitenherden (siehe Tabelle 3.2).

Das TNM-Stadium und das UICC-Stadium korreliert mit dem Ploidiestatus zeigte auch keinen Anhalt auf statistische Signifikanz.

Tabelle 3.2: Chi-Quadrat Analyse des Adenokarzinoms n = 62

Variable		diploid	aneuploid	P-Wert
Geschlecht	männlich	8	26	0,844
	weiblich	6	22	
	Gesamt	14	48	
Altersgruppe in Jahren	< 70	6	31	0,145
	≥ 70	8	17	
	Gesamt	14	48	
pT	1	8	12	0,145
	2	4	24	
	3	2	10	
	4	0	2	
	Gesamt	14	48	
pT- Gruppe	pT1-2	12	36	0,399
	pT3-4	2	12	
	Gesamt	14	48	
UICC	0 – IA1 – 3	4	8	0,666
	IB	3	7	
	IIA	0	5	
	IIB	2	10	
	IIIA	2	11	
	IIIB – IIIC	1	1	
	IVA – IVB	2	6	
	Gesamt	14	48	

Fortsetzung nächste Seite

Variable		diploid	aneuploid	P-Wert
PY ohne Nichtraucher	< 45	6	21	0,613
	≥ 45	2	11	
	Gesamt	8	32	
Thoraxseite	rechts	12	31	0,131
	links	2	17	
	Gesamt	14	48	
Tumorlokalisation	rechter Oberlappen	7	26	0,146
	Mittellappen	1	0	
	rechter Unterlappen	4	6	
	linker Oberlappen	2	13	
	rechter Oberlappen	0	3	
	Gesamt	14	48	
Tumorgrößengruppe in cm	0 - 4,9	11	31	0,611
	5,0 - 7,0	2	12	
	> 7,0	1	5	
	Gesamt	14	48	
Satellitenherde	keine	13	39	0,516
	gleicher Lappen	1	6	
	Nachbarlappen	0	3	
	Gesamt	14	48	
pN	keine	9	26	0,781
	1	2	10	
	2	3	12	
	Gesamt	14	48	
cM	keine	12	42	0,861
	1	2	6	
	Gesamt	14	48	
Lymphangiosis carcinomatosa	keine	12	37	0,485
	1	2	11	
	Gesamt	14	48	

Fortsetzung nächste Seite

Variable		diploid	aneuploid	P-Wert
Veneninfiltration	keine	13	43	0,715
	1	1	5	
	Gesamt	14	48	
Grading	1	1	3	0,637
	2	8	21	
	3	5	24	
	Gesamt	14	48	
Grading dichotom	1 - 2	9	24	0,346
	3	5	24	
	Gesamt	14	48	

3.1.3 Statistische Auswertung des Plattenepithelkarzinoms (n = 56)

Bei der statistischen Korrelation von Geschlecht, Alter eingeteilt in Altersgruppen, Rauch-erstatus und Tumorengröße zeigten sich keine Signifikanz (siehe Tabelle 3.3). Auch bei der Tumorlokalisation mittels betroffener Lungenflügel-seite, Lungenlappen und Satellitenherde konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte beim TNM-Stadium und UICC-Stadium keine signifikante Korrelation zum Ploidiestatus hergestellt werden.

Tabelle 3.3: Chi-Quadrat Analyse des Plattenepithelkarzinoms n = 56

Variable		diploid	aneuploid	P-Wert
Geschlecht	männlich	15	27	0,322
	weiblich	3	11	
	Gesamt	18	38	
Altersgruppe in Jahren	< 70	12	27	0,739
	≥ 70	6	11	
	Gesamt	18	38	
pT	1	6	8	0,437
	2	7	19	
	3	5	8	
	4	0	3	
	Gesamt	18	38	

Fortsetzung nächste Seite

Variable		diploid	aneuploid	P-Wert
pT- Gruppe	pT1-2	13	27	0,928
	pT3-4	5	11	
	Gesamt	18	38	
UICC	0 – IA1 – 3	5	6	0,767
	IB	3	8	
	IIA	3	4	
	IIB	5	11	
	IIIA	2	5	
	IIIB – IIIC	0	1	
	IVA – IVB	0	3	
	Gesamt	18	38	
PY ohne Nichtraucher	< 45	6	10	0,282
	≥ 45	5	18	
	Gesamt	11	28	
Thoraxseite	rechts	11	26	0,589
	links	7	12	
	Gesamt	18	38	
Tumorlokalisation	rechter Oberlappen	7	12	0,345
	Mittellappen	1	0	
	rechter Unterlappen	3	14	
	linker Oberlappen	5	7	
	rechter Oberlappen	2	5	
	Gesamt	18	38	
Tumorgrößengruppe in cm	0 - 4,9	10	23	0,92
	5,0 - 7,0	5	10	
	> 7,0	3	5	
	Gesamt	18	38	
Satellitenherde	keine	17	34	0,418
	gleicher Lappen	1	1	
	Nachbarlappen	0	3	
	Gesamt	18	38	

Fortsetzung nächste Seite

Variable		diploid	aneuploid	P-Wert
pN	keine	14	24	0,545
	1	3	10	
	2	1	4	
	Gesamt	18	38	
cM	keine	18	35	0,22
	1	0	3	
	Gesamt	18	38	
Lymphangiosis carcinomatosa	keine	17	31	0,199
	1	1	7	
	Gesamt	18	38	
Veneninfiltration	keine	13	34	0,101
	1	5	4	
	Gesamt	18	38	
Grading	1	0	0	0,186
	2	8	24	
	3	10	14	
	Gesamt	18	38	
Grading dichotom	1 - 2	8	24	0,186
	3	10	14	
	Gesamt	18	38	

3.2 Korrelation zwischen Ploidie und Überleben

Aus dem Gesamtkollektiv ($n = 118$) konnten 57 Patientendaten für ein 3-Jahres-Follow-up nach Tag der Operation erhoben werden. Es zeigte sich in 17 Fällen ein diploider Tumor (29,8 %) und in 40 ein aneuploider Tumor (70,2 %). Die mittlere Überlebenszeit der Patienten nach dem Tag der Operation betrug 49,1 Monate (Spannweite: 40,7 - 57,5 Monate). Patienten mit einem diploiden Tumor hatten mit einer mittleren Überlebenszeit von 44,7 die kürzeste und Patienten mit aneuploiden Tumor mit 47,6 Monaten die längste Überlebenszeit. Die Kaplan-Meier-Analyse ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen einer Aneuploidie und einer Diploidie (Tabelle 3.4, Abbildung 3.1). Es wurde das Überleben nach einem, nach zwei und nach drei Jahren gegenübergestellt, bei dem man eine statistische Tendenz nach zwei Jahren für das Adenokarzinom mit $p = 0,173$ feststellen konnte (siehe Tabelle 3.5). In dieser Tabelle mit aufgeführt sind die nach einem, nach zwei und nach drei Jahren noch lebende

Patienten mit jeweils aneuploiden oder diploiden Tumor.

Zudem erfolgte noch eine Überlebenszeitanalyse mit definiertem UICC-Tumorstadium. Für das UICC-Stadium IIA, bestehend aus 7 von 57 Patientendaten, konnte eine statistische Tendenz mit $p = 0,114$ festgestellt werden (siehe Tabelle 3.6). Zudem zeigte sich für das Adenokarzinom mit UICC-Stadium IIB eine Signifikanz mit $p = 0,046$, bei dem Patienten mit einem diploiden Tumor eine geringere Überlebenszeit aufwiesen als Patienten mit einem aneuploiden Tumor.

Von den 57 Patientendaten erfolgte des Weiteren eine statistische Auswertung hinsichtlich der einzelnen Histologien. So konnten 29 Patientendaten des Plattenepithelkarzinoms und 28 Patientendaten des Adenokarzinoms analysiert werden. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom nach Operation betrug 43,6 Monate (Spannweite: 34,8 - 52,4 Monate), wobei Patienten mit einem aneuploiden Tumor mit 41,3 Monate die kürzeste und Patienten mit einem diploiden Tumor mit 46,1 Monaten die längste Überlebenszeit zu verzeichnen hatten. Der Chi-Quadrat-Test ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen aneuploiden und diploiden Tumoren (Abbildung 3.2). Bei Patienten mit einem Adenokarzinom betrug die mittlere Überlebenszeit nach Operation 48,4 Monate (Spannweite: 36,2 - 60,7 Monate). Die kürzeste mittlere Überlebenszeit hatten auch hier Patienten mit einem diploiden Tumor mit 39,4 Monate und die längste mittlere Überlebenszeit Patienten mit aneuploidem Tumor mit 49,6 Monaten. Der Chi-Quadrat-Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Entitäten (Abbildung 3.3).

Tabelle 3.4: Beziehung zwischen der Ploidie der Tumore und der Überlebenszeit der Patienten

Histologie	Ploidiestatus	Anzahl	Überlebenszeit (Monate)			P-Wert
			Mittelwert \pm Std.	Minimum	Maximum	
Adenokarzinom	diploid	8	39,4 \pm 10,4	19,0	59,7	0,71
	aneuploid	20	49,6 \pm 7,1	35,7	63,5	
	Gesamt	28	48,4 \pm 6,3	36,2	60,7	
Plattenepithelkarzinom	diploid	9	46,1 \pm 8,1	30,2	62,1	0,331
	aneuploid	20	41,3 \pm 5,1	31,3	51,2	
	Gesamt	29	43,6 \pm 4,5	34,8	52,4	
Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom	diploid	17	44,7 \pm 6,9	31,2	58,2	0,591
	aneuploid	40	47,6 \pm 4,9	37,9	57,2	
	Gesamt	57	49,1 \pm 4,3	40,7	57,5	

Tabelle 3.5: Überlebenszeit nach post-operativen Jahren

Überleben	aneuploide Tumore	diploide Tumore	Histologie	p-Wert
1 Jahr	35	14	ADK PEK ADK + PEK	0,45 0,892 0,535
2 Jahre	30	10	ADK PEK ADK + PEK	0,173 0,64 0,216
3 Jahre	18	10	ADK PEK ADK + PEK	0,710 0,331 0,591

Tabelle 3.6: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit nach UICC8 verglichen mit dem Ploidiestatus der Tumore

UICC8 - Stadium	Histologie	Anzahl	p-Wert
$0 - IA_{1-3}$	ADK	3	0,48
	PEK	6	zensiert
	ADK + PEK	9	0,264
IB	ADK	2	0,317
	PEK	5	0,299
	ADK + PEK	7	0,906
IIA	ADK	3	-
	PEK	4	0,317
	ADK + PEK	7	0,114
IIB	ADK	5	0,046
	PEK	8	0,475
	ADK + PEK	13	0,734
$IIIA$	ADK	9	0,219
	PEK	5	0,207
	ADK + PEK	14	0,133
$IIIB - IIIC$	ADK		
	PEK	0	-
	ADK + PEK		
$IVA - IVB$	ADK	6	0,984
	PEK	1	-
	ADK + PEK	7	0,813

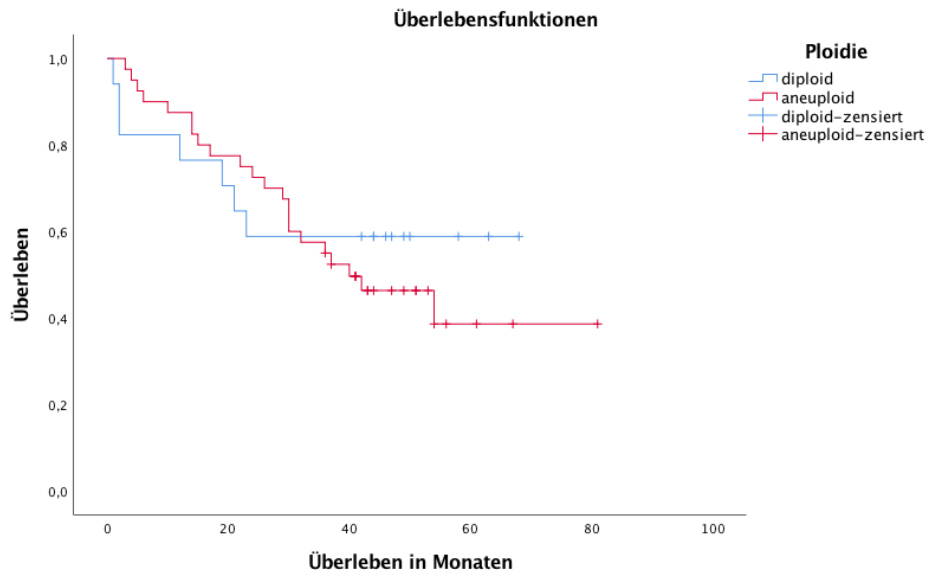


Abbildung 3.1: 3-Jahres-Follow-up Adeno- und Plattenepithelkarzinom

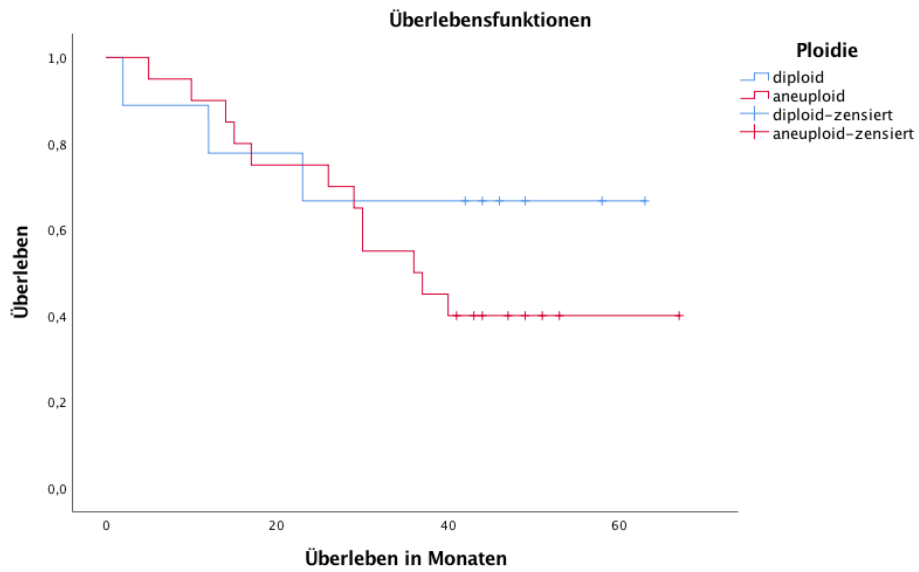


Abbildung 3.2: 3-Jahres-Follow-up Plattenepithelkarzinom

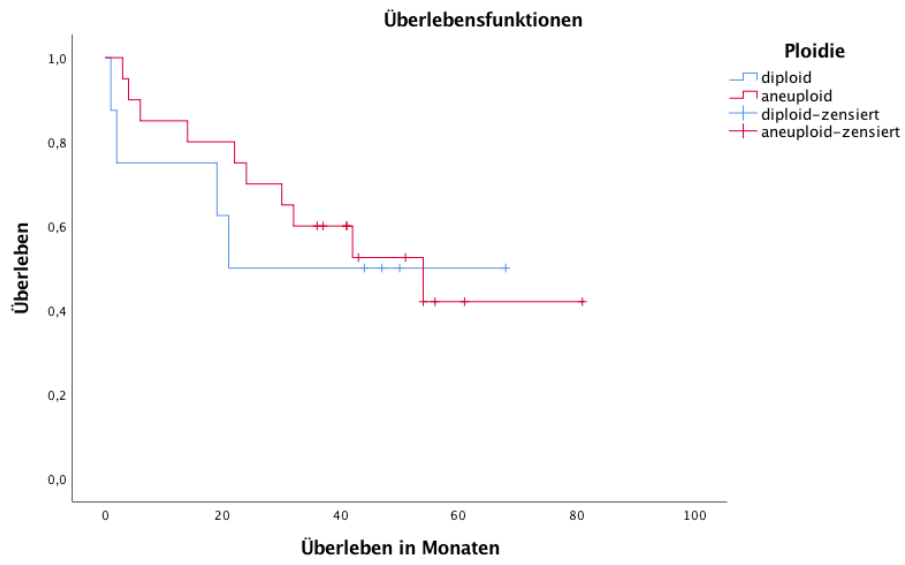


Abbildung 3.3: 3-Jahres-Follow-up Adenokarzinom

4 Diskussion

Trotz eines großen Gesamtkollektivs mit 118 Patientendaten konnte bei der statistischen Untersuchung zwischen klinischen Parameter und dem Ploidiestatus kein Zusammenhang ermittelt werden (siehe Tabelle 2 im Anhang). Bei der statistischen Korrelation der beiden Histologien mit dem Ploidiestatus zeigte sich lediglich eine Tendenz mit $p = 0,243$, welche sich möglicherweise mit einem größeren Patientenkollektiv als statistisch signifikant darstellen lassen könnte. Des Weiteren zeigte sich eine Tendenz beim pT-Status korreliert mit dem Ploidiestatus ($p = 0,089$). Bei der histologisch getrennten statistischen Auswertung des pT-Status konnte für das Adeno- und Plattenepithelkarzinom keine weiteren signifikanten Auffälligkeiten festgestellt werden (siehe Tabelle 3 und 4 im Anhang). Die Ergebnisse der Korrelation zwischen dem Ploidiestatus und klinischen Parametern dieser Arbeit spiegeln somit die Ergebnisse aus einer polnischen Studie von 2006 wider [30]. Auch hier zeigte sich bei 80 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom kein signifikanter Unterschied. Die Tumorproben wurden zwar auch in Paraffin fixiert, jedoch erfolgte die DNA-Analyse mittels Durchflusszytometrie. Zudem wurden nur zwei verschiedene Tumorpräparate hergestellt, in dieser Arbeit jedoch 4 unterschiedliche.

Bei der Untersuchung hinsichtlich der prognostischen Relevanz des Ploidiestatus beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zeigte sich in der 3-Jahres-Follow-up Kohorte mit 57 Patienten keine signifikanten Unterschiede zwischen einem diploiden oder aneuploiden Tumor. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten wie das Mamma-, Ovarial-, Prostata- und Kolorektal-Karzinom, bei denen der Ploidiestatus als unabhängiger prognostischer Marker bewiesen werden konnte [31, 32, 36, 43], zeigt sich somit in dieser Arbeit keine signifikant kürzere Überlebenszeit mit einem aneuploiden Tumor. Zusätzlich konnte sich der Ploidiestatus auch in einer spezifischen Überlebenszeitanalyse mit vorgegebenem UICC-Stadium, ähnlich wie in einer Studie zum Colon-Karzinom [28], nicht als Prognosemarker beweisen (siehe Tabelle 1 im Anhang). Lediglich beim Plattenepithelkarzinom und für das UICC-Stadium III zeigte sich eine Tendenz hinsichtlich der Überlebenszeit (siehe Tabelle 3.1 und Tabelle 1 im Anhang). Im Vergleich zu vorangegangenen Studien aus den frühen 2000 mit gleicher 3-Jahres Überlebensanalyse [12, 30] kommt diese Arbeit somit zu anderen Ergebnissen.

Am ehesten vergleichbar sind die Ergebnisse dieser Arbeit mit einer deutschen Studie aus dem Jahr 2009, bei welcher sowohl die DNA mittels Densitometrie nach Feulgen-Färbung als auch das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom untersucht wurde [38]. 115 Patienten mit einem

Adeno- oder Plattenepithelkarzinom wurden dabei untersucht und eine Überlebenszeitanalyse erfolgte mit 107 Daten des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Als Unterschiede in der Analyseverfahren sind hier die geringe Anzahl an analysierten Zellen (300 Zellen) und die Referenzzellen, bestehend aus Fibroblasten, zu nennen. Als Ergebnis der Studie wird berichtet, dass die sogenannte reine Aneuploidie keine Signifikanz bei der Korrelation mit dem Überleben der Patienten zeigt, jedoch die Kerngröße und dessen Variabilität [38]. Daraufhin zeigte sich ein Umdenken bei der Klassifikation des Lungenkarzinoms und es erfolgte ein Einbeziehen der Kerngröße und der genetischen Diagnostik [52, 53].

Aufgrund der anders ausfallenden statistischen Ergebnisse dieser Arbeit, sollten die oben genannten Studien kontrovers diskutiert und mit möglichen Fehler in dieser Dissertation verglichen werden.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Studien aus den frühen 2000 und dieser Arbeit besteht in der Analyseverfahren zur Bestimmung des Ploidiestatus. In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2001 erfolgte die Betrachtung mehrerer Studien zum Ploidiestatus des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom zwischen 1987 bis 1999. Die jeweiligen Tumorproben wurden dabei in Paraffin gebettet, als Zellsuspension bereitgestellt oder beides. Es wurde dabei vor allem die Durchflusszytometrie als Methode zur Bestimmung des Ploidiestatus verwendet; nur wenige Studien verwendeten die heute als Standard etablierte Computer-unterstützte Bildanalyse nach Feulgen-Densitometrie. Im Vergleich zur heutigen Analyse mit einem Minimum von 1000 Analysezellen, erfolgte die damalige Analyse nur an ein paar hundert Zellen [12]. Zu dem ist verständlich, dass sich nach 15 Jahren sowohl die Technik zur Analyse des Ploidiestatus (AhrensICM Software ACAS) verbessert hat, als auch das histologische Verständnis. Bei der DNA-Densitometrie kann zwischen Tumorzelle und physiologischer Zelle unterschieden werden und Zellfragmente werden mittels Software aussortiert, so dass nur die Analyse der reinen Tumorzellen erfolgt. Sowohl bei der damaligen Densitometrie als auch bei der Durchflusszytometrie mittels Zellsuspension wird es Verfälschungen durch andere Zellen und Zellfragmente gegeben haben, so dass die Genauigkeit der Messung beeinträchtigt und der Anteil an diploiden Zellen womöglich falsch dargestellt wurde.

Trotz dessen kann es auch bei dieser Arbeit zu Verfälschungen der zu analysierenden Zellen gekommen sein, zum Beispiel bereits durch ein falsch gewähltes Präparationsgebiet im Tumorgewebe durch den Pathologen. Erfolgt der Schnitt im Tumor in einem zellärmeren Gewebe, so kommt es zur inkorrekten Darstellung der vorherrschenden Tumorzellen. Des Weiteren kann es zu Verzerrungen der Analysezellen bei der Densitometrie durch ein fehlerhaftes Anfärben der Imprints oder schlechter Selektion der zu analysierenden Zellen kommen. Letzteres wird jedoch durch mehrmalige Abfrage in AhrensICM-Software (ACAS) und Kontrollparameter verhindert. Letztlich ist auch die Interpretation der DNA-Histogramme von höchster Wichtigkeit, welche in dieser Arbeit von zwei unabhängigen erfahrenen Gutachter analysiert und eingeordnet

wurden. Im Vergleich zu den Studien aus den frühen 2000 ist es fraglich, inwiefern eine Kontrolle der DNA-Histogramme erfolgte. Der hohe prozentuale Anteil an aneuploiden Zellen in den von der Metaanalyse erfassten Studien lässt sich einerseits durch die geringe Anzahl an zu analysierenden Zellen erklären und andererseits durch die fehlerhaften Analysemethoden. Ein weiterer zu diskutierender Punkt ist in dieser Arbeit die zusammengestellte Patientenkohorte. Bei den insgesamt 118 Patientendaten handelt es sich um 62 Patienten mit einem Adenokarzinom und 56 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom, wodurch es sich um ein histologisch ausgewogenes Kollektiv handelt. Im Vergleich dazu eine polnische Studie aus 2006, bei welcher lediglich 80 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom analysiert wurden, jedoch ähnlich wie in dieser Studie eine rein chirurgische Kohorte gewählt wurde. In dieser Studie konnte beim Plattenepithelkarzinom eine prognostische Relevanz für den Ploidiestatus in einem 3-Jahres-Follow-up nachgewiesen werden ($p < 0,05$), jedoch zeigte sich auch hier keine statistische Korrelation zwischen klinischen Parameter und dem Ploidiestatus [30]. Diese Studie ist aufgrund des gleichen Überlebenszeitraums und ähnlichem Patientenkollektiv beim Plattenepithelkarzinom gut mit dieser Arbeit vergleichbar. Ein grundlegender Unterschied ist jedoch die DNA-Analyse mittels Durchflusszytometrie. Unklar bleibt, ob man mit einem größeren Patientenkollektiv für das Plattenepithelkarzinom ähnliche Ergebnisse erzielt hätte wie in der Studie aus 2006.

Im Vergleich zu den Patientendaten aus der Metaanalyse aus 2001, der polnischen Studie aus 2006 und der deutschen Studie aus 2009, befindet sich das hier verwendete Patientenkollektiv im Durchschnitt; in der Metaanalyse gab es in nur 14 von 35 veröffentlichten Studien größere Kohorten (siehe Tabelle 4.1) [12, 30, 38].

Tabelle 4.1: Ploidiestudien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms [12]

Veröffentlichungen	Probenart ¹	Analysemethode ²	Studiendesign	Anzahl der Patientendaten	% Aneuploidie	% ADK	% PEK
Zimmermann et al., 1987	PES	FCM	retrospektiv	100	0,45	0,40	0,48
Tirindelli et al., 1987	FTS	FCM	prospektiv	63	0,51	unb.	unb.
Ten velde et al., 1988	PES	FCM	retrospektiv	67	0,66	0,09	0,88
Volm et al., 1988	FTS	FCM	prospektiv	175	0,85	0,28	0,57
Yamaoka et al., 1989	PES	FCM	unb.	179	0,77	unb.	unb.
Cibas et al., 1989	PES	FCM	prospektiv	93	0,85	1	0
Dazzi et al., 1990	PES	FCM	retrospektiv	136	0,70	0,22	0,64
Isobe et al., 1990	PES	FCM	prospektiv	80	0,75	0,53	0,48
Sahin et al., 1990	PES	FCM	prospektiv	146	0,58	0,51	0,38
Shiota et al., 1990	PES	FCM	unb.	94	0,57	unb.	unb.
Miyamoto et al., 1991	PES	FCM	retrospektiv	83	0,77	0,52	0,48
Mizumoto et al., 1991	PES/FTS	FCM	unb.	155	0,68	1	0
Liewald et al., 1992	PES/FTS	FCM	prospektiv	99	0,48	0,41	0,48
Ogawa et al., 1992	PES	FCM	retrospektiv	56	0,63	0,66	0,27
Filderman et al., 1992	PES	FCM	retrospektiv	44	0,20	0,61	0,34
Morkve et al., 1993	PES	FCM	retrospektiv	112	0,45	0,49	0,45
Cheon et al., 1993	PES	FCM	retrospektiv	56	0,46	0,29	0,64
Pence et al., 1993	FTS	SCM	prospektiv	61	0,64	0,46	0,43
Rice et al., 1993	FTS	FCM	prospektiv	272	0,82	0,42	0,37
Ichinose et al., 1993	PES	FCM	prospektiv	151	0,65	0,62	0,36
Yu et al., 1993	PES	FCM	retrospektiv	47	0,66	0,13	0,49
Lima et al., 1993	PES	FCM	retrospektiv	45	0,60	1	0
Shimizu et al., 1993	unb.	unb.	retrospektiv	82	0,80	unb.	unb.
Usuda et al., 1994	PES	FCM	unb.	65	0,72	0,60	0,32
Salvati et al., 1994	FTS	FCM	prospektiv	142	0,58	unb.	unb.
Tanaka et al., 1995	PES	FCM	retrospektiv	160	0,68	1	0
Pujol et al., 1996	FTS	SCM	prospektiv	137	0,58	0,25	0,62
Huang et al., 1996	PES	FCM	retrospektiv	87	0,72	1	0
Nagai et al., 1996	PES	FCM	prospektiv	340	0,65	0,57	0,38
Jeanfaivre et al., 1997	FTS	FCM	retrospektiv	61	0,82	0	1
Muguerza et al., 1997	PES/FTS	FCM	prospektiv	124	0,60	0,28	0,63
Kolodziejewski et al., 1997	PES	FCM	retrospektiv	207	0,42	0	1
Graziano et al., 1997	PES	FCM	retrospektiv	145	0,70	unb.	unb.
Dalquen et al., 1997	PES	FCM	prospektiv	97	0,76	unb.	unb.
Asamura et al., 1999	PES	FCM	prospektiv	72	0,51	1	0

¹ PES: Paraffin eingebettete Gewebeprobe; FTS: frische Gewebeprobe; ADK: Adenokarzinom, PEK: Plattenepithelkarzinom

² FCM: Flow-Cytometrie; SCM: Densitometrie; unb.: unbekannt

4.1 Fazit

Mit dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde eine gute methodische Grundlage für zukünftige Untersuchungen des DNA-Ploidiestatus gelegt, da mehrere Fachabteilungen als Kompetenzzentrum am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck zusammen gearbeitet haben und das Patientenkollektiv als auch die histologischen Präparate sorgfältig auswählten. Es wurde auf ein hohes Qualitätsniveau geachtet.

Obwohl diese Arbeit den Ploidiestatus beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom nicht als prognostischen Marker beweist, so liefert sie trotz dessen einen Beitrag zur zukünftigen Diagnostik dieser Erkrankung. Die chromosomale Instabilität verursacht nicht nur eine Aneuploidie in der Karzinogenese, sondern auch eine Verschiebung im genomischen Bereich mit größeren und schwereren Zellen. Der Einfluss der Genom-Größe auf die Prognose der Patienten wird momentan noch in aktuellen Studien untersucht [17].

Das in dieser Arbeit abgebildete Patientenkollektiv stellt ein chirurgisch selektiertes Patientenkollektiv dar, welches nur durch operativ behandelte Patienten am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck repräsentiert ist. Es bleibt offen, wie eine Korrelation des Ploidiestatus mit dem Überleben und klinischen Parameter aussähe, wenn das Kollektiv um internistisch behandelte Patienten erweitert werden würde. Zu dem wäre es interessant, wie sich die Überlebensprognose nach 5 Jahren und 10 Jahren bei aneuploiden Tumoren verhält.

4.2 Ausblick

Der DNA-Ploidiestatus eignet sich hervorragend als Marker für die genomische Instabilität im menschlichen Körper und lässt sich einfach und schnell durch eine Densitometrie bestimmen. Zukünftig wird die Aneuploidie bei der Betrachtung der Karzinogenese weiterhin eine große Rolle spielen, da sich die Technologie zur Untersuchung des Genoms weiter verbessert und das Verständnis über zelluläre Abläufe immer größer wird. Bei jeder Tumorentität wird eine Interaktion mit Immunzellen bedeutsamer, so dass auch beim Lungenkarzinom eine Korrelation vom Ploidiestatus mit dem PD-L1-Status erforscht werden sollte. Ein Nachweis dessen würde eine neue Therapieform implizieren. Des Weiteren müsste der Ploidie-Status mit immunhistochemischen Markern untersucht werden, um die gezielte Therapie zu optimieren und so gegebenenfalls die Klassifikation des pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinom zu aktualisieren.

Diese Arbeit befürwortet kommende wissenschaftliche Arbeiten zu dem Thema und hat sie hoffentlich in weiteren Forschungen bezüglich des DNA-Ploidiestatus bestärkt.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung vom pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinom in Hinblick auf den Ploidiestatus. Das Lungenkarzinom stellt in Deutschland die zweithäufigste Tumorerkrankung beim Mann und die dritthäufigste bei Frauen dar. Es gilt zudem als die häufigste letale Karzinomform bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen. In dieser Studie erfolgte eine post-operative Überlebenszeitanalyse sowie eine Korrelation des Ploidiestatus mit klinischen Parameter. Die operativ entnommenen Tumorpräparate wurden pathologisch aufgearbeitet und in der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck mittels Feulgen-Färbung und Densitometrie analysiert. Nach jeweiligem Erscheinungsbild der Tumorzellen erfolgte eine Einteilung in einen diploiden oder aneuploiden Tumor. Die Aneuploidie als Folge einer chromosomalen Instabilität gilt als Ursache der Karzinogenese und Resistenzentwicklung von Chemotherapeutika [9, 20, 35, 47]. Aufgrund ungenügender wissenschaftlicher Dokumentation für die prognostische Bedeutung des Ploidiestatus beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, bestand die Motivation zum Anfertigen dieser Arbeit in dessen Analyse.

Eine 3-Jahres-Überlebenszeitanalyse für 57 Patientendaten mittels Kaplan-Meier konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen diploiden und aneuploiden Tumore feststellen. Bei der statistischen Korrelation mittels Chi-Quadrat-Analyse für das Gesamtkollektiv bestehend aus 118 Patientendaten zeigte sich auch keine signifikante Bedeutung des Ploidiestatus mit klinischen Parametern wie dem Geschlecht, Alter, Histologie, TNM-Status und Rauchverhalten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten wie dem Kolorektal-, Ovarial-, Mamma- und Prostata-Karzinom keine statistische Relevanz für den Ploidiestatus als Prognosemarker beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [31, 32, 36, 43]. Somit bedarf es keiner neueren Einteilung des Adeno- und Plattenepithelkarzinoms für den klinischen Verlauf.

Literaturverzeichnis

- [1] G. Akopyan und B. Bonavida: *Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis*. International Journal of Oncology, 29(4):745–752, 2006.
- [2] S. Bakhoun und C. Swanton: *Chromosomal instability, aneuploidy, and cancer*. Frontiers in Oncology, 4:161, 2014.
- [3] C. Barkauskas, M. Chung, B. Fioret, X. Gao, H. Katsura und B. Hogan: *Lung organoids: current uses and future promise*. Development, 144(6):986–997, 2017.
- [4] M. Beckles, S. Spiro, G. Colice und R. Rudd: *Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes*. Chest, 123(1):97S–104S, 2003.
- [5] J. Bishop, J. Teruya-Feldstein, W. Westra, G. Pelosi, W. Travis und N. Rekhtman: *p40 ($\Delta Np63$) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma*. Modern pathology, 25(3):405, 2012.
- [6] W. Böcker, H. Denk, Ph. U. Heitz, G. Höfler, H. Kreipe und H. Moch: *Pathologie*. 5. Auflage. Elsevier, 2012.
- [7] T. Boveri: *Über mehrpolige Mitosen als Mittels zur Analyse des Zellkerns*. Verhandlungen der physikalisch-medizinischen Gesellschaft zu Würzburg. Neue Folge 35: 67-90, 1902.
- [8] T. Boveri: *Ergebnisse über die Konstitution der Cromatischen Substanz des Zellkerns*. Gustav Fischer, 1904.
- [9] T. Boveri: *Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris*. Journal of Cell Science, 121(Supplement 1):1–84, 2008.
- [10] A. Brunelli, A. Charloux, C. Bolliger, G. Rocco, J. Sculier, G. Varela, M. Licker, M. Ferguson, C. Faivre-Finn, R. Huber *et al.*: *ERS/ESTS clinical guidelines on fitness for radical therapy in lung cancer patients (surgery and chemo-radiotherapy)*. European Respiratory Journal, 34(1):17–41, 2009.
- [11] S. Cardarella und B. Johnson: *The impact of genomic changes on treatment of lung cancer*. American journal of respiratory and critical care medicine, 188(7):770–775, 2013.

-
- [12] D. Choma, J. Daures, X. Quantin und J. Pujol: *Aneuploidy and prognosis of non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of published data*. British Journal of Cancer, 85(1):14, 2001.
- [13] G. Costa, V. Barra, L. Lentini, D. Cilluffo und A. Di Leonardo: *DNA demethylation caused by 5-Aza-2-deoxycytidine induces mitotic alterations and aneuploidy*. Oncotarget, 7(4):3726, 2016.
- [14] J. Costello und C. Plass: *Methylation matters*. Journal of medical genetics, 38(5):285–303, 2001.
- [15] J. Coward und A. Harding: *Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer*. Frontiers in Oncology, 4:123, 2014.
- [16] C. Cruz, L. Tanoue und R. Matthay: *Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention*. Clinics in Chest Medicine, 32(4):605–644, 2011.
- [17] H. Danielsen, M. Pradhan und M. Novelli: *Revisiting tumour aneuploidy—the place of ploidy assessment in the molecular era*. Nature Reviews Clinical Oncology, 13(5):291, 2016.
- [18] J. Davidsson: *The epigenetic landscape of aneuploidy: constitutional mosaicism leading the way?* Epigenomics, 6(1):45–58, 2014.
- [19] T. Davoli: *The role of aneuploidy during tumorigenesis*. Clinical Cancer Research, 24(17 Supplement):IA02–IA02, 2018, ISSN 1078-0432. http://clincancerres.aacrjournals.org/content/24/17_Supplement/IA02, Zuletzt aufgerufen am 16.12.2018.
- [20] T. Davoli, A. Xu, K. Mengwasser, L. Sack, J. Yoon, P. Park und S. Elledge: *Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome*. Cell, 155(4):948–962, 2013.
- [21] P. Duesberg, A. Fabarius und R. Hehlmann: *Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells*. IUBMB life, 56(2):65–81, 2004.
- [22] G. Goekenjan, H. Sitter, M. Thomas, D. Branscheid, M. Flentje, F. Griesinger, N. Niederle, M. Stuschke, T. Blum, K. Deppermann *et al.*: *Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms*. Pneumologie, 65(08):e51–e75, 2011.
- [23] P. Goldstraw, K. Chansky, J. Crowley, R. Rami-Porta, H. Asamura, W. Eberhardt, A. Nicholson, P. Groome, A. Mitchell, V. Bolejack *et al.*: *The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming*

- (*eighth*) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(1):39–51, 2016.
- [24] O. Gorlova, S. Weng, Y. Zhang, C. Amos und M. Spitz: *Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients*. *International Journal of Cancer*, 121(1):111–118, 2007.
- [25] N. Gray: *The consequences of the unregulated cigarette*. *Tobacco Control*, 15(5):405–408, 2006.
- [26] J. Hecht, J. Pinkus, L. Weinstein und G. Pinkus: *The value of thyroid transcription factor-1 in cytologic preparations as a marker for metastatic adenocarcinoma of lung origin*. *American Journal of Clinical Pathology*, 116(4):483–488, 2001.
- [27] L. Herrera, D. Prada, M. Andonegui und A. Dueñas-González: *The epigenetic origin of aneuploidy*. *Current genomics*, 9(1):43–50, 2008.
- [28] T. Hveem, M. Merok, M. Pretorius, M. Novelli, M. Bævre, O. Sjo, N. Clinch, K. Liestøl, A. Svindland, R. Lothe *et al.*: *Prognostic impact of genomic instability in colorectal cancer*. *British Journal of Cancer*, 110(8):2159, 2014.
- [29] D. Janerich, W. Thompson, L. Varela, P. Greenwald, S. Chorost, C. Tucci, M. Zaman, M. Melamed, M. Kiely und M. McKneally: *Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household*. *New England Journal of Medicine*, 323(10):632–636, 1990.
- [30] M. Kasprzyk, W. Dyszkiewicz, C. Piwkowski, L. Gasiorowski und E. Kaczmarek: *Prognostic value of DNA ploidy: 5-year follow-up of patients with resectable squamous cell carcinoma (SCC) of the lung*. *Lung Cancer*, 51(2):201–206, 2006.
- [31] G. Kristensen, W. Kildal, V. Abeler, J. Kaern, I. Vergote, C. Trope und H. Danielsen: *Large-scale genomic instability predicts long-term outcome for women with invasive stage I ovarian cancer*. *Annals of Oncology*, 14(10):1494–1500, 2003.
- [32] L. Li, K. Mu, G. Zhou, L. Lan, G. Auer und A. Zetterberg: *Genomic instability and proliferative activity as risk factors for distant metastases in breast cancer*. *British journal of cancer*, 99(3):513, 2008.
- [33] P. Loo, S. Thomas, M. Nicolson, M. Fyfe und K. Kerr: *Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens*. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(4):442–447, 2010.
- [34] A. Marchetti, C. Martella, L. Felicioni, F. Barassi, S. Salvatore, A. Chella, P. Camplese, T. Iarussi, F. Mucilli, A. Mezzetti *et al.*: *EGFR mutations in non-small-cell lung cancer:*

- analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment.* Journal of clinical oncology, 23(4):857–865, 2005.
- [35] N. McGranahan, R. Burrell, D. Endesfelder, M. Novelli und C. Swanton: *Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges: ‘Exploring aneuploidy: the significance of chromosomal imbalance’ review series.* EMBO reports, 13(6):528–538, 2012.
- [36] D. Mouradov, E. Domingo, P. Gibbs, R. Jorissen, S. Li, P. Soo, L. Lipton, J. Desai, H. Danielsen, D. Oukrif *et al.*: *Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations.* The American Journal of Gastroenterology, 108(11):1785, 2013.
- [37] S. Mukhopadhyay und A. Katzenstein: *Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6.* The American journal of surgical pathology, 35(1):15–25, 2011.
- [38] W. Petersen, I. and Kotb, K. Friedrich, K. Schlüns, A. Böcking und M. Dietel: *Core classification of lung cancer: correlating nuclear size and mitoses with ploidy and clinicopathological parameters.* Lung cancer, 65(3):312–318, 2009.
- [39] G. Pfeifer, M. Denissenko, M. Olivier, N. Tretyakova, S. Hecht und P. Hainaut: *Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers.* Oncogene, 21(48):7435, 2002.
- [40] D. Pham, M. Kris, G. Riely, I. Sarkaria, T. McDonough, S. Chuai, E. Venkatraman, V. Miller, M. Ladanyi, W. Pao *et al.*: *Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas.* J Clin Oncol, 24(11):1700–1704, 2006.
- [41] W. Popp, T. Bruning und K. Straif: *Krebserkrankungen durch den Beruf.* Deutsches Ärzteblatt, 100(1/2):32–37, 2003.
- [42] Diagnostik Prävention: *Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft.* Pneumologie, 64(Suppl 02):e1–e164, 2010.
- [43] M. Pretorius, H. Wæhre, V. Abeler, B. Davidson, L. Vlatkovic, R. Lothe, K. Giercksky und H. Danielsen: *Large scale genomic instability as an additive prognostic marker in early prostate cancer.* Analytical Cellular Pathology, 31(4):251–259, 2009.

-
- [44] The Clinical Lung Cancer Genome Project und Network Genomic Medicine NGM: *A genomics-based classification of human lung tumors*. *Science translational medicine*, 5(209):209ra153, 2013.
- [45] L. Righi, P. Graziano, A. Fornari, G. Rossi, M. Barbareschi, A. Cavazza, G. Pelosi, G. Scagliotti und M. Papotti: *Immunohistochemical subtyping of nonsmall cell lung cancer not otherwise specified in fine-needle aspiration cytology: a retrospective study of 103 cases with surgical correlation*. *Cancer*, 117(15):3416–3423, 2011.
- [46] R. Rosell, T. Moran, C. Queralt, R. Porta, F. Cardenal, C. Camps, M. Majem, G. Lopez-Vivanco, D. Isla, M. Provencio *et al.*: *Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. *New England Journal of Medicine*, 361(10):958–967, 2009.
- [47] L. Sansregret und C. Swanton: *The role of aneuploidy in cancer evolution*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(1):a028373, 2017.
- [48] G. Sartori, A. Cavazza, A. Sgambato, A. Marchioni, F. Barbieri, L. Longo, M. Bavieri, B. Murer, E. Meschiari, S. Tamberi *et al.*: *EGFR and K-ras mutations along the spectrum of pulmonary epithelial tumors of the lung and elaboration of a combined clinicopathologic and molecular scoring system to predict clinical responsiveness to EGFR inhibitors*. *American journal of clinical pathology*, 131(4):478–489, 2009.
- [49] M. Schünke: *Prometheus-Lernatlas der Anatomie: Innere Organe; 118 Tabellen*. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2009.
- [50] A. Taylor, J. Shih, G. Ha, G. Gao, X. Zhang, A. Berger, S. Schumacher, C. Wang, H. Hu, J. Liu *et al.*: *Genomic and functional approaches to understanding cancer aneuploidy*. *Cancer Cell*, 33(4):676–689, 2018.
- [51] J. Terry, S. Leung, J. Laskin, K. Leslie, A. Gown und D. Ionescu: *Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples*. *The American journal of surgical pathology*, 34(12):1805–1811, 2010.
- [52] W. Travis, E. Brambilla, A. Nicholson, Y. Yatabe, J. Austin, M. Beasley, L. Chirieac, S. Dacic, E. Duhig, D. Flieder *et al.*: *The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification*. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9):1243–1260, 2015.
- [53] W. Travis, E. Brambilla, M. Noguchi, A. Nicholson, K. Geisinger, Y. Yatabe, D. Beer, C. Powell, G. Riely, P. Van Schil *et al.*: *International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International*

- multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma*. Journal of Thoracic Oncology, 6(2):244–285, 2011.
- [54] A. Tsao, X. Tang, B. Sabloff, L. Xiao, H. Shigematsu, J. Roth, M. Spitz, W. Hong, A. Gazdar und I. Wistuba: *Clinicopathologic characteristics of the EGFR gene mutation in non-small cell lung cancer*. Journal of Thoracic Oncology, 1(3):231–239, 2006.
- [55] P. Vineis, G. Hoek, M. Krzyzanowski, F. Vigna-Taglianti, F. Veglia, L. Airoidi, K. Overvad, O. Raaschou-Nielsen, F. Clavel-Chapelon, J. Linseisen *et al.*: *Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study*. Environmental Health, 6(1):7, 2007.
- [56] H. Wakelee, E. Chang, S. Gomez, T. Keegan, D. Feskanich, C. Clarke, L. Holmberg, L. Yong, L. Kolonel, M. Gould *et al.*: *Lung cancer incidence in never smokers*. Journal of Clinical Oncology, 25(5):472–478, 2007.
- [57] W. Wallace und D. Rassl: *Accuracy of Cell Typing in Non-Small Cell Lung Cancer by EBUS/EUS-FNA Cytology Samples*. European Respiratory Journal, Seiten erj01764–2010, 2011.
- [58] K. Wiman: *Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer*. Cell Death and Differentiation, 13(6):921, 2006.
- [59] C. Wittekind: *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017.
- [60] E. Wynder und D. Hoffmann: *Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities*. Cancer Res., 54(20):5284–5294, 1994.
- [61] Zentrum für Krebsregisterdaten: *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. Robert Koch-Institut, 2017. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html, Zuletzt aufgerufen am 16.12.2018.
- [62] X. Zhang, S. Zhang, X. Yang, J. Yang, Q. Zhou, L. Yin, S. An, J. Lin, S. Chen, Z. Xie *et al.*: *Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression*. Molecular cancer, 9(1):188, 2010.

Anhang

Material:

- Paraffinschnitte (8µm) / luftgetrocknete Imprints
- Pararosanilin/Parafuchsin
Sigma-Aldrich, P3750-25G
- Kaliumpyrosulfit
Sigma-Aldrich, P2522-500G
- Natriumpyrosulfit/ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
Sigma-Aldrich, P255556-100G
- Aktivkohle
Hassa, 111.751.000
- HCL 1M, HCL 5M
- 4,5% Formaldehyd
Roth, 2213.3
- Filter 595 $\frac{1}{2}$ ø 240mm
Schleicher & Schnell, 10311651
- Ethanol absolut, 96%, 70% (vergällt)
Ethanol UKSH, SAP: 49010016
- Xylol (reinst.)
J.T.Baker, 8118.5000
- Entellan
Merck, 1.07961.0100
- Deckgläser 24x60mm
Menzel, 9.161060
- Pinzette/Präpariernadel
- Präparate-Mappe

Färbung:

- Ansatz für 1 Küvette (14 Schnitte) ! 1x Tonsillen-Präparat als Kontrolle mitfärben!

1. Tag: Ansetzen des Schiff's - Reagenz (Schiff's - Reagenz = lichtempfindlich!)

1. Handschuhe, Haarnetz und Mundschutz anlegen! Licht ausschalten! Fenster schließen!

!! Pararosanilin/Parafuchsin ist eine stark färbende und kanzerogene Substanz!!

!! Direkten Kontakt meiden!!

2. Lsg. A :

- 15 ml HCL 1 mol/l (RT) in dunkle 0,5 l Flasche geben.
- dazu portionsweise 0,5 g Pararosanilin/Parafuchsin geben, dabei die Flasche immer wieder leicht schwenken bis Pulver gelöst ist.

3. Lsg. B :

- 85 ml Millipore-Wasser in Becherglas geben.
- 0,5 g Kaliumpyrosulfit ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) abwiegen und dazugeben, mit Spatel rühren bis alles gelöst ist.

4. Lsg. A + Lsg. B :

- kleine Mengen der Lsg. B portionsweise in die dunkle Flasche zur Lsg. A geben, dabei Flasche immer wieder leicht schwenken und kurz auf den Rührer stellen bis eine homogene rote Lösung entsteht.

5. Die dunkle Flasche mit dem Schiff's-Reagenz in Alufolie einwickeln (lichtundurchlässig) und bei RT über Nacht im Schrank lagern.

2. Tag: Fertigstellung des Schiff's - Reagenz

1. Alufolie entfernen, der Lösung 0,3 g Aktivkohle hinzufügen und die angesetzte Lösung > 4 min rühren lassen.
2. Lösung unter dem Abzug filtrieren, erst in eine dunkle Flasche, Vorgang wiederholen, zum Schluss in eine durchsichtige Flasche bis eine lachsfarbende transparente Lösung entsteht.

Wichtig: Filter nach jeder Füllung wechseln! (3 x filtern !)

3. Die durchsichtige Flasche mit der fertigen Lösung wieder in Alufolie einwickeln und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahren.

Achtung: Lösung ist max. 3 Tage verwendbar! Danach beginnt die Ausfällung des Farbstoffes, womit die DNS-Zytometrie nicht mehr möglich ist!

4. Vorbehandlung der Paraffinschnitte:

Zu färbende Paraffinschnitte in Färbeeinsatz geben (Gewebeseiten zeigen in dieselbe Richtung).

1. Entparaffinierung:

- Färbeeinsatz 2x für je 5 min in Xylol stellen.

2. Rehydrierung:

- Färbeeinsatz 2x für je 5 min in 100% Ethanol stellen.
- Färbeeinsatz 2x für je 5 min in 96% Ethanol stellen.
- Färbeeinsatz 1x für 5 min in 70% Ethanol stellen.
- Färbeeinsatz 1x in Millipore spülen.

5. Refixierung:

- Paraffinschnitte bzw. luftgetrocknete Imprints in Küvette mit 4,5% Formaldehyd geben und über Nacht bei RT unter dem Abzug lichtgeschützt in einem schwarzen Karton lagern.

3. Tag: Feulgen - Färbung

1. Spülen:

- Formaldehyd in den vorgesehenen Abfallbehälter gießen und Schnitte unter fließendem Leitungswasser spülen, bis kein Formaldehyd-Geruch mehr vorhanden ist.

2. Saure Hydrolyse:

- Küvette mit HCL 5 mol/l füllen und für 60 min bei RT in den Schrank stellen.

3. Spülen:

- HCL in den vorgesehenen Abfallbehälter gießen und Schnitte 3x vorsichtig mit Millipore spülen.

4. Färben:

- Küvette mit Schiff's-Reagenz füllen und für 120 min bei RT im Dunkeln (Alufolie + Schrank) inkubieren.

Wichtig: Kurz vor Schritt 5 (Spülen) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ - Lsg. frisch für Punkt 6) ansetzen!

5. Spülen:

- Schiff's-Reagenz in Farbabfallbehälter gießen und Schnitte unter fließendem Leitungswasser spülen bis sich Spülflüssigkeit nicht mehr verfärbt.

6. Waschen:

- Küvette 3x für 10 min mit frisch angesetzter $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ - Lsg. füllen.

7. Spülen:

- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ - Lsg. in den vorgesehenen Abfallbehälter gießen und Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser spülen.

8. Dehydrierung / Aufsteigende Alkoholreihe:

- Färbeeinsatz 1x für 3 min in 70% Ethanol stellen.
- Färbeeinsatz 2x für je 3 min in 96% Ethanol stellen.
- Färbeeinsatz 1x für 3 min in 100% Ethanol stellen.
- Färbeeinsatz 1x für 3 min in 100 % reinst Ethanol stellen.

9. Klärung:

- Schnitte 3x kurz in Xylol spülen und in der letzten Küvette verbleiben.

10. Eindecken:

- Schnitt aus Xylol nehmen, etwas Entellan auf den Objektträger geben und ein großes Deckgläschen (24x60mm) auflegen (Luftblasen mit der Pinzette/Präpariernadel rausdrücken und überflüssiges Entellan abstreifen).
- Eingedeckte Schnitte in eine Präparate-Mappe legen und über Nacht waagrecht trocknen lassen.

Ansatz – Lösungen

HCL 1 mol/l (1Liter) :

917,30 ml Millipore + 82,70 ml HCL (37%, rauchend)

HCL 5 mol/l (1Liter) :

587 ml Millipore + 413 ml HCL (37%, rauchend)

Natriumpyrosulfit / $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$: (immer frisch ansetzen!)

Stammlösung: 2,4g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ + 125 ml Millipore

Daraus Gebrauchslösung ansetzen: 10 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ + 10 ml HCL 1 M + 180 ml Millipore

**Methode: Quantitative Analyse des DNA-Gehaltes pro Einzelzelle (-kern)
über die Lichtabsorption nach Feulgen-Färbung**

Material:

Probenmaterial: Imprints auf Objektträger nach Feulgenfärbung

Auswertung: AhrenlCM Software zur automatischen DNA-Analyse inkl. Mikroskopeinheit

Einschalten der Einheit:

1. Stromleiste: Kippschalter auf on schalten,
2. Computer anstellen,
3. Programm **DNS-Messung** durch Doppelklick aufrufen,
Mikroskop fährt automatisch alle Positionen ab,
4. Lichtweg am Okular öffnen (schwarzen Deckel unter Mikroskopiertisch entfernen),
5. 20er Planobjektiv wählen

Messablauf:

1. Objektträger mit dem Beschriftungsfeld nach rechts zeigend unter das Mikroskop legen und mit den Halteklammern fixieren.
2. Einstellungen in der Software prüfen:
unter Einstellungen –
- Glare – Wert 3
- Automatik Messungen – gesamtes Präparat . konv. 25 %
- CAM – 1/10 000 markieren
- Rechts neben Live/Messungen den Wert -2 eingeben.
3. Button „ neues Präparat „ anklicken
unter Name die Nr. des Patienten eingeben, z. B. T 938, mit o.k.: weiter bestätigen.
4. Mauszeiger auf Button „ LIVE-Messung“ positionieren, mit Joy-Stick durch links und rechts Bewegungen ein Zellfeld suchen, durch Drehen des Joy-Sticks vorsichtig die Bildschärfe regulieren (Achtung: Objektiv sollte nicht zu nah an den Objektträger kommen!).
5. Ist das Bild fokussiert, die Belichtung kontrollieren:
Belichtungsbalken muss grün mittig positioniert sein. Ist Belichtung nicht optimal, am Drehrad links vom Mikroskop die Belichtung einstellen.
6. Unter Sichtfeld der Zellen befindet sich ein Schema des Objektträgers. Darauf ist in blau der Bereich markiert, der vom Mikroskop gescannt werden soll.

7. Sind alle Einstellungen o. k. Button „**Automatik**“ klicken.
Mikroskop scannt automatisch vorgegebenen Bereich ab und stoppt nur vorher, wenn bereits 95.000 Partikel gemessen wurden.
Während der Messung ist die Verteilung der Punktwolke (= gemessene Zellen) zu prüfen.

Bei einer erkennbaren Verbiegung ist eine **Glare-Korrektur** (Streulicht) vorzunehmen:
ESC drücken = Messung stoppen
Linksverbiegung – Glare senken,
Rechtsverbiegung – Glare erhöhen
Messung verwerfen unter Bearbeiten / Löschen aktuelle Messdaten
Messung neu starten.
8. Beendigung der Messung → Button „**Zellgalerie**“ klicken → Zelldaten werden sortiert.
9. **DNA-Skala auf 2c normieren** (rechts bei Graphikdarstellung gefundener Zellen):
bei gedrückter linker Maustaste die 2c-Rasterlinie auf den ersten linken Histogramm-Peak schieben oder Histogramm durch Drücken der Strg-Taste und Pfeiltasten bewegen
IOD-Wert („integrierte optische Dichte“) muss zwischen 10 und 20 liegen und unter den einzelnen Messungen nicht stark abweichen.
10. **Selektion der Zellen**
Links neben Graphik den oberen Button auf DNA und den unteren auf SEL für Selektieren stellen.
 - Kohlepartikel, schlecht dargestellte unscharfe Zellen, Zellen, die sich in der Teilung befinden etc. herausselektieren (weiß markieren)
 - mit linkem Mausklick werden Zellen im Raster selektiert bzw. deselektiert
 - mit rechtem Mausklick wird eine Zelle als Referenzzelle rot markiert
 - ein Klick unmittelbar neben einer Bildzeile invertiert die gesamte Zeile
 - Taste Entf invertiert die gesamte Bildseite
 - mit Bildpfeiltasten weiterscrollen
 - Tasten-Kombination Strg+Entf entfernt alle Zellen von der aktuellen Seite zu kleineren Werten hin bis null (Werte kleiner als 1,8 oft unscharf)Nach dem Sortieren der Kerne nach DNA-Wert, erfolgt die Sortierung nach Fläche (Button neben der Graphik verändern.) → nochmals selektieren.
11. **Referenzzellen anzeigen:** Tasten- Kombination Strg F7
Anzeige von 88 Zellen. Nicht verwertbare Zellen müssen wieder weiß markiert werden (z. B. degenerierte, Hintergrund-behaftete oder defokussierte Kerne).
Als Nachweis sind die gewählten Ref-zellen jederzeit in der Zellgalerie abrufbar. (Button Sel auf Ref umstellen.)

Referenzzellen:

Optimal: möglichst großes Spektrum verschiedener als normal erkennbarer Zelltypen: größere intakte Granulozyten, mittelgroße Epithelzellkerne → repräsentativ für alle Normalzellen des Präparates.

Tumorzellen:

Farbcodierungen der Kerne entsprechend dem DNA-Gehalt:

Zellen unter 2c :	grün, hypodiploide Zellen oder Trümmer
Zellen um 2c:	blau, diploide Zellen
zwischen 2.2 u. 3.6c:	gelb, verdächtige Zellen (oder S-Phase)
Zellen um 4c:	hellblau, tetraploide Zellen oder Dubletten
Zellen über 4,4c:	lila (z.B. hoch aneuploide Zellen)

Sind insgesamt zu wenig Zellen gemessen worden, kann unter Einstellungen → automatische Messungen der Wert von 25 % auf 50 % oder sogar 100% erhöht werden.

Für Patienten mit dieser Einstellung muss eine neue Messung erfolgen. Für die endgültige Auswertung sind als Minimum 1000 Analysezellen gewünscht.

Sind diese vorhanden, auf den Ausw. Button klicken und die erste gelbe Klammer auf den ersten Peak (2c Peak) schieben. Dann auf ok klicken, der Befundtext verändert sich entsprechend.

12. Wenn Auswertung beendet → Button „Report“ drücken → Labor-Report unter entsprechendem Ordner sichern. Ausdruck wird auf dem Bildschirm angezeigt, Seite schließen.
13. Um nächstes Präparat zu messen, auf LIVE-Messung umschalten und neu beginnen.



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. Dr. Jens Habermann
Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und
Biomaterialbanken
Klinik für Chirurgie

im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 17-043

Datum: 10. Februar 2017

Verkürztes Verfahren (Stufe 3 ICB-L)

Erforschung von Lungenkrebs für verbesserte (Früh-)Diagnose, Therapie, Nachsorge und Prognose

Ihr Schreiben vom 24. Januar 2017

Sehr geehrter Herr Prof. Habermann,

mit Ihrem o.g. Schreiben informieren Sie die Ethik-Kommission über ein geplantes Vorhaben, das auf für die ICB-L gewonnenen Biomaterial zurückgreift. .

Vorgelegt wurden das Basisformualr vom 24.01.2017 sowie ein Studienprotokoll (undatiert).

Die Ethik-Kommission hat **keine Bedenken** gegen das Studienvorhaben.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

Danksagung

Es erfolgt die Danksagung für all Jene, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben:

Hiermit danke ich PD Dr. Emanuel Palade für die Bereitstellung meiner Thematik, vielen Anregungen, die tatkräftige Unterstützung und Betreuung zum Schreiben meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jens Habermann danke ich für die Betreuung bei der Auswertung der Ploidie-Ergebnisse sowie der Hilfsbereitschaft bei der Analyse des Patientenkollektivs.

Ich danke Prof. Dr. Timo Gemoll für die zahlreichen Ratschläge, hilfreichen Unterstützungen und stets zügiger Beantwortung meiner vielen Fragen.

Dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck und insbesondere Dr. C. Kümpers danke ich für die Bereitstellung der histopathologischen Bilder sowie des Lübecker Schemas für die Treibermutationen beim Lungenkarzinom.

Zudem möchte ich allen Mitarbeitern der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken für die außerordentliche Freundlichkeit und allgegenwärtige Hilfsbereitschaft danken.

Mein Dank gilt ebenso meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund Gian F. Mewes, die für mich eine große Stütze sind und mir viel Liebe schenken.

Lebenslauf



Persönliche Daten

Name Katharina Wargenau
Mail-Adresse katharina_wargenau@web.de
Geburtsdatum 05. Januar 1992 in Lübeck

Beruf

seit 10/2018 Assistenzärztin der Urologie in der Martini-Klinik am UKE GmbH

Ausbildung

05/2018 Approbation
10/2011 - 05/2018 Studium, Humanmedizin, Universität zu Lübeck, Staatsexamen
Note 2,66
09/2002 - 07/2011 Gymnasium, Katharineum zu Lübeck, Abitur
Note 1,5

Praktisches Jahr

12/2017 - 04/2018 Innere-Tertial, Innere Medizin, Segeberger Kliniken
09/2017 - 12/2017 Wahl-Tertial, Urologie, Kantonspital Baden, Schweiz
05/2017 - 09/2017 Chirurgie-Tertial, Allgemein- und Viszeralchirurgie, Thoraxchirurgie, UKSH Lübeck

Außeruniversitäre Tätigkeiten

10/2011 - 12/2016 Mitglied der Fachschaft Medizin, für 4 Jahre gewähltes Mitglied
06/2016 - 04/2017 Studentische Hilfskraft, CRS, Clinical Research Services, Lübeck
10/2014 - 04/2017 Studentische Hilfskraft, Augenpraxisklinik Lübeck

Dissertation

10/2015 - 06/2018 Bestimmung des Ploidiestatus beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom im klinischen Verlauf