

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Tim Pohlemann

Polyploidisierung und Zentrosomamplifikation im entzündeten und tumorösen Bronchialgewebe

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014

Vorgelegt von Daniela Lothschütz,
geboren am 23. Mai 1972 in St. Ingbert.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 ZUSAMMENFASSUNGEN.....	1
1.1 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1.2 SUMMARY.....	2
2 EINLEITUNG	4
2.1 DIE CHRONISCHE ENTZÜNDUNG	4
2.2 DAS BRONCHIALKARZINOM	6
2.2.1 Epidemiologie	6
2.2.2 Ätiologie.....	7
2.2.3 Pathologie.....	8
2.2.4 Pathogenese.....	10
2.3 GENETISCHE VERÄNDERUNGEN BEIM BRONCHIALKARZINOM.....	12
2.4 URSACHE UND MANIFESTATION GENETISCHER VERÄNDERUNGEN.....	14
2.5 FRAGESTELLUNG.....	18
3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 UNTERSUCHUNGSMATERIAL	19
3.1.1 Gewebeentnahme	19
3.1.2 Gewebecharakterisierung.....	19
3.1.3 Gruppenbildung	24
3.1.4 Zellkultivierung.....	24
3.1.5 Zellfixierung.....	25
3.2 IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG	26
3.2.1 Prinzip	26
3.2.2 Epithelzell-spezifischer Antikörper	27
3.2.3 Zentrosom-spezifischer Antikörper	28

3.2.4	Sekundärantikörper	28
3.2.5	Färbung	29
3.3	DNA-DNA-FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG.....	29
3.3.1	Prinzip.....	29
3.3.2	Hybridisierung.....	31
3.3.3	Stringenzwaschung und Detektion.....	31
3.4	MIKROSKOPISCHE QUANTIFIZIERUNG	33
3.4.1	Bestimmung des Ploidiegrades	33
3.4.2	Bestimmung der Zentrosomanzahl	35
3.4.3	Statistik	37
3.4.4	Ausgewählte mikroskopische Aufnahmen.....	38
4	ERGEBNISSE	42
4.1	TETRAPLOIDIE UND ANEUPLOIDIE IN DER ZELLKULTUR-PASSAGE 0.....	43
4.1.1	Proben der leicht entzündlichen Bronchusgewebe	43
4.1.2	Proben der stark entzündlichen Bronchusgewebe.....	44
4.1.3	Proben des Tumorgewebes	45
4.2	TETRAPLOIDIE UND ANEUPLOIDIE DER GEWEBE IN ALLEN ZELLKULTUR-PASSAGEN	47
4.2.1	Zellkultur-Passage 0.....	47
4.2.2	Zellkultur-Passage 1	48
4.2.3	Zellkultur-Passage 2.....	49
4.2.4	Veränderungen im Verlauf der Zellkultur-Passagen.....	51
4.3	TETRAPLOIDIE UND ANEUPLOIDIE IM ADENO- UND PLATTENEPITHELKARZINOM	54
4.3.1	Zellkultur-Passage 0.....	54
4.3.2	Zellkultur-Passage 1	55
4.3.3	Zellkultur-Passage 2.....	56
4.3.4	Veränderungen im Verlauf der Zellkultur-Passagen.....	57
4.4	TRISOMIE 7 UND TRISOMIE 8	60
4.4.1	Zellkultur-Passage 0.....	60
4.4.2	Zellkultur-Passage 1	65
4.4.3	Zellkultur-Passage 2.....	66
4.4.4	Veränderungen im Verlauf der Zellkultur-Passagen.....	67

4.5	ZENTROSOMAMPLIFIKATION.....	70
4.6	MULTIPOLARE MITOSEN	72
5	DISKUSSION.....	73
5.1	DISKUSSION DER METHODEN	73
5.1.1	Zellkultivierung.....	73
5.1.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	75
5.1.3	Immunzytochemische Färbung	77
5.1.4	Mikroskopische Quantifizierung.....	78
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	79
5.2.1	Tetra- und Aneuploidie	79
5.2.2	Tetra- und Aneuploidie im Adeno- und Plattenepithelkarzinom.....	84
5.2.3	Trisomie 7 und Trisomie 8.....	85
5.2.4	Zentrosomamplifikation und multipolare Mitosen	88
5.2.5	Schlussfolgerung und Perspektive	93
6	ANHANG.....	95
6.1	GERÄTE.....	95
6.2	MATERIALIEN	96
6.2.1	Verbrauchsmaterialien	96
6.2.2	Vorbereitung der Objektträger für die Zellkultur.....	98
6.3	VERBRAUCHSLÖSUNGEN.....	98
6.4	TABELLEN.....	100
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
8	PUBLIKATIONEN.....	128
8.1	ORIGINALARBEITEN	128
8.2	VERÖFFENTLICHTE VORTRÄGE (V) UND POSTER (P).....	128
9	DANKSAGUNG.....	129
10	LEBENS LAUF.....	130

Abkürzungsverzeichnis

ACA	Adenokarzinom
AIDS	<i>englisch:</i> acquired immunodeficiency syndrome; erworbenes Immundefektsyndrom
ALK	anaplastische Lymphom-Kinase
ANOVA	<i>englisch:</i> analysis of variance; Varianzanalyse
Ble	leicht entzündliches Bronchusgewebe
BSA	bovines Serumalbumin
Bse	stark entzündliches Bronchusgewebe
bzw.	beziehungsweise
C	Zentrosom
CIN	chromosomale Instabilität
CH	Schweiz
c-MYC	zelluläres MYC
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cy3 TM	Indocarbocyanin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d	Abstand
DDR	<i>englisch:</i> discoidin domain receptor
DE	Deutschland
DMEM-Ham's F12	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium mit HAM's-F12-Nährstoffergänzung
DNA	<i>englisch:</i> deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>englisch:</i> epidermal growth factor; epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	EGF-Rezeptor
EMLA	<i>englisch:</i> echinoderm microtubule-associated protein-like
FACS	<i>englisch:</i> Fluorescence-activated Cell Sorting; Durchflusszytometrie

FCS	<i>englisch:</i> fetal calf serum; fetales Kälberserum
FGFR	<i>englisch:</i> fibroblast growth factor receptor; Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FHIT	<i>englisch:</i> fragile histidine triad
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G0	Zellzyklusphase Gap 0
G1	Zellzyklusphase Gap 1
G2	Zellzyklusphase Gap 2
GvHD	<i>englisch:</i> graft versus host disease; Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion
HCl	Salzsäure
HLA	humane Leukozyten-Antigene
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPV	humanes Papillomavirus
Hybmix	Hybridisierungsmix
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin 6
kDa	Kilodalton
LOH	<i>englisch:</i> loss of heterozygosity; Verlust der Heterozygotie
M	molar
MEF	Mausembryo-Fibroblasten
MIF	Makrophagenmigration inhibierender Faktor
MW	Mittelwert
MYC-Onkogen	Myelocytomatose-Onkogen
n	Anzahl
N	haploider Chromosomensatz
NaOH	Natriumhydroxid
Nr.	Nummer
OP	Operationsaal
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

P	Zellkultur-Passage
PBS	<i>englisch:</i> phosphate buffered saline; Phosphatpuffer
PBST	PBS/0,05 % Tween [®]
PEC	Plattenepithelkarzinom
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
RT	Raumtemperatur
S	Synthesephase im Zellzyklus
SCLC	<i>englisch:</i> small cell lung cancer; kleinzelliges Bronchialkarzinom
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	Zitratpuffer
SSCT	4xSSC/0,5 % Tween [®]
ssDNA	<i>englisch:</i> single strand DNA; Einzelstrang-DNA
TNM	Tumor, Node (Lymphknoten), Metastasen
Tu	Tumorgewebe
U	Unit
UICC	Union internationale contre le cancer
U/min	Umdrehungen pro Minute
US	Vereinigte Staaten von Amerika
VEGF	<i>englisch:</i> vascular endothelial growth factor; vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vs.	versus
W	Watt
z. B.	zum Beispiel

Des Weiteren wurden die Abkürzungen des SI-Systems zur Bezeichnung physikalischer Größen verwendet.

1 Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung

Viele Karzinome entstehen auf dem Boden einer chronischen Entzündung. Das gilt auch für das Bronchialkarzinom, das die häufigste Krebstodesursache weltweit darstellt. Um herauszufinden, ob typische Tumormerkmale wie Aneuploidie, Zentrosomamplifikation oder multipolare Mitosen bereits im leicht und stark entzündlichen Bronchusgewebe vorkommen, wurde von 34 Patienten, bei denen wegen eines Bronchialkarzinoms eine Lungenteilresektion durchgeführt wurde, Tumor- und Bronchusgewebe untersucht. Bei einem Nachweis dieser Merkmale bereits in der frühen Entzündung, könnten diese als diagnostische und prognostische Marker zukünftig Nutzung finden.

Das intraoperativ gewonnene Gewebe wurde kultiviert und in den Passagen P0, P1 und P2 fixiert. An diesen Zellen wurde dann zur Bestimmung der Tetra- und Aneuploidierate nach einer immunzytochemischen Anfärbung der Epithelzellen eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gegen Chromosom 7 und 8 durchgeführt. Um die Anzahl der Zentrosomen in Bezug auf den Ploidiegrad zu bestimmen, wurde die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gegen Chromosom 8 mit einer immunzytochemischen Färbung der Zentrosomen kombiniert. Außerdem wurden die multipolaren Mitosen gezählt.

Im leicht entzündlichen Bronchusgewebe lag der Anteil der genau tetraploiden Epithelzellen im Mittel in Passage 0 bei 4,0 % (0,0 bis 9,5 %) und der der aneuploiden Epithelzellen bei 5,1 % (0,0 bis 11,5 %). Dabei sind unter aneuploiden Zellen tetraploide Zellen und Zellen mit anderen Aneuploidiegraden zu verstehen. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe fanden sich 6,3 % tetraploide (3,3 bis 9,0 %) und 6,7 % aneuploide Epithelzellen (3,5 bis 9,0 %). Im Tumorgewebe wurden 15,6 % tetraploide (0,5 bis 62,0 %) und 25,6 % aneuploide Epithelzellen (1,0 bis 78,5 %) gezählt. Das heißt tetra- und aneuploide Zellen wurden bereits im entzündlichen Bronchusgewebe gefunden und ihre Häufigkeit nahm mit dem Schweregrad der Entzündung zu.

Im entzündlichen Bronchusgewebe bestanden die aneuploiden Zellen im Gegensatz zum Tumorgewebe hauptsächlich aus tetraploiden Zellen. Bei den Nichtepithelzellen fanden sich keine erhöhten Tetra- oder Aneuploidieraten: Die Mittelwerte lagen sowohl für die tetraploiden, als auch für die aneuploiden Zellen bei allen drei Geweben unter 5 %, dem Wert, der für Zellkulturen noch

als normal angesehen wird. Zentrosomamplifikation und multipolare Mitosen fanden sich nicht nur im Tumorgewebe, sondern ebenfalls bereits im entzündlichen Bronchusgewebe.

Das heißt, es fanden sich bereits in Zellkulturen aus entzündlichem Bronchusgewebe tumorspezifische Merkmale, was die Entzündung als Tumorstufe charakterisiert. Dabei scheinen die aneuploiden Tumorzellen aus den tetraploiden Zellen der entzündlichen Bronchialschleimhaut hervorzugehen. Damit könnten diese tumorspezifischen Merkmale, wie erhöhte Tetra- und Aneuploidisierung, Zentrosomamplifikation und multipolare Mitosen, nach weiteren Untersuchungen mit größerem Probenumfang eventuell zukünftig als diagnostische und prognostische Marker genutzt werden.

1.2 Summary

Polyploidization and centrosome amplification in inflammatory bronchi and bronchial carcinoma

Lots of tumours are caused by chronic inflammation. Also lung cancer, the major cause of cancer death in the world, develops in chronically inflamed bronchial tissue. To find out if tumour-specific features like aneuploidy, centrosome amplification or multipolar mitoses occur already in low and high grade inflammatory bronchial tissue, bronchus and tumour tissue of 34 patients, who underwent partial lung resection because of a bronchial carcinoma, was examined. If these features are detected in the early inflammation they could be used as diagnostic and prognostic markers in future.

The cells of these tissues were cultivated and fixed in passage P0, P1 and P2. After immunocytochemical staining of epithelial cells a fluorescence in situ hybridization against chromosome 7 and 8 was performed to determine the degree of tetraploidy and aneuploidy. Furthermore a fluorescence in situ hybridization against chromosome 8 was combined with an immunocytochemical staining of centrosomes to ascertain the number of centrosomes in relation to ploidy. In addition, the multipolar mitoses were counted.

In low grade inflammatory bronchial tissue in passage 0 the part of exactly tetraploid epithelial cells was 4.0 % in the mean and ranged from 0.0 to 9.5 %. The aneuploid epithelial cell fraction was 5.1 % (0.0 to 11.5 %) in this tissue. Aneuploid cells mean exactly tetraploid cells and cells with all other grades of aneuploidy. In high grade inflammatory bronchial tissue 6.3 % tetraploid epithelial

cells (3.3 to 9.0 %) und 6.7 % aneuploid epithelial cells (3.5 to 9.0 %) were found. In tumour tissue 15.6 % tetraploid (0.5 to 62.0 %) and 25.6 % aneuploid epithelial cells (1.0 to 78.5 %) were counted. So, tetraploid and aneuploid cells were found already in inflammatory bronchial tissue. The degree of tetraploidy and aneuploidy was rising with the degree of inflammation.

In contrast to tumour tissue, in inflammatory bronchial tissue the group of aneuploid cells mainly consisted of tetraploid cells. No increased rate of tetraploid or aneuploid cells was detected in the non-epithelial cells. For all three tissues the mean values for tetraploid and aneuploid cells were below 5 %, which is thought to be normal for cell cultures. Centrosome amplification and multipolar mitoses were detected not only in tumour tissue but already in inflammatory bronchial tissue.

In conclusion cell cultures of inflammatory bronchial tissue already showed tumour-specific features thus characterizing the inflammation as a preliminary stage of cancer development. The aneuploid tumour cells seem to arise from the tetraploid cells of the inflammatory bronchial tissue. After further investigations these tumour-specific features like increased tetraploidy and aneuploidy, centrosome amplification and multipolar mitoses might be used as diagnostic or prognostic markers in future. This would require trials involving higher amounts of samples.

2 Einleitung

2.1 Die chronische Entzündung

Die Entzündung ist eine komplexe Abwehrreaktion des Organismus auf schädigende, exogene oder endogene Reize unter Beteiligung von Entzündungszellen, Entzündungsmediatoren und Mechanismen des Gesamtorganismus mit der Funktion, die schädigende Noxe zu eliminieren oder zu inaktivieren und mögliche Schäden zu reparieren. Reize, die eine Entzündung auslösen, können chemische oder physikalische Reize oder Infektionen sein. Nach dem zeitlichen Verlauf unterscheidet man perakute, akute, subakute und chronische Entzündung. Bei der chronischen Entzündung unterscheidet man eine primär-chronische von einer sekundär-chronischen Entzündung, wobei letztere aus einer akuten Entzündung hervorgeht. Bei der primär-chronischen Entzündung zeigt das entzündliche Infiltrat von Anfang an die Merkmale einer chronischen Entzündung. Histopathologisch ist ein chronisches Entzündungsinfiltrat durch das Überwiegen von mononukleären Entzündungszellen, also Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, gekennzeichnet (Thomas 2003).

Es ist bekannt, dass die chronische Entzündung eine entscheidende Rolle im Rahmen der Tumorentstehung spielt. Bereits 1863 hat Robert Virchow auf Grund von Leukozyten, die er in neoplastischem Gewebe fand, eine Verbindung zwischen Entzündung und Krebs hergestellt. Er nahm an, dass die "lymphoretikulären Infiltrate" das Entstehen des malignen Tumors an Stellen der chronischen Entzündung widerspiegeln (Balkwill und Mantovani 2001). Mittlerweile ist die Hypothese, dass maligne Tumore auf dem Boden einer chronischen Entzündung entstehen können, als gesichert anerkannt (O'Byrne und Dalglish 2001).

Chronische Entzündungen können durch Infektionen ausgelöst werden. Beispiele hierfür sind die chronische Hepatitis, ausgelöst durch eine Infektion mit Hepatitis B- oder C-Virus, die dann über das Stadium der Leberzirrhose zur Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms führt (Yang et al. 2011, Castello et al. 2010, El-Serag 2012). Das Bakterium *Helicobacter pylori* verursacht eine Entzündung des Magens, die zu Magengeschwüren, Magenadenokarzinom (Loffeld et al. 1990) sowie dem Magenmukosa assoziierten Lymphom führen kann (Stolte 1992, Dorer et al. 2009). Ebenso können Wurminfektionen über eine chronische Entzündung Karzinome auslösen. Dabei

kann eine Infektion mit *Schistosoma haematobium* zu der Entstehung eines Blasenkarzinoms (Gelfand et al. 1967), sowie mit *Opisthorchis viverrini* oder *Clonorchis sinensis* zu Cholangiokarzinomen führen (Schwartz 1980, Vennervald und Polman 2009). Infektionen sind für 18 % aller Krebserkrankungen weltweit verantwortlich (Parkin 2006).

Eine andere Form der chronischen Entzündung ohne bekannten Auslöser, ist die chronisch entzündliche Darmerkrankung, die das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, erhöht (Ekbohm et al. 1990, Freeman 2008, Waldner und Neurath 2009). Ein weiteres Beispiel hierfür ist die altersbedingte Entzündung des Prostatagewebes, auf deren Boden ein Prostatakarzinom entstehen kann (Sandhu 2008).

Weitere Auslöser einer chronischen Entzündung können dauerhafte chemische oder physikalische Reize sein. So entsteht durch den chronischen Reflux von Magensäure eine Ösophagitis, die dann über eine Metaplasie, den sogenannten Barrett-Ösophagus, zum Karzinom führt (Naef et al. 1975, Reid et al. 2010). Ebenso führt eine chronische Pankreatitis zu einem erhöhten Risiko, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln. Hierbei sind die genauen Ursachen der chronischen Pankreatitis noch unklar. Teilweise kommt es durch einen Aufstau der Pankreasenzyme zu einer chronischen, chemischen Reizung (Raimondi et al. 2010).

In der Lunge löst Zigarettenrauch eine chemische und physikalische Reizung des Bronchialgewebes aus. Zigarettenrauch ist der führende Risikofaktor zur Entwicklung von Lungenkarzinomen und die überwiegende Mehrheit der Lungenkarzinompatienten hat eine Raucheranamnese. Zigarettenrauch verursacht eine entzündliche Reaktion des Lungengewebes (Bracke et al. 2006) und führt dadurch zur Entstehung von Lungenkarzinomen (Moghaddam et al. 2009). Die chronische Entzündung in den Bronchien und Alveolen von Rauchern führt zu einer proteolytischen Zerstörung der Alveolen und einem Umbau der Luftwege, also zu einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) (Saetta et al. 2001, Lee G et al. 2009). Die COPD ist durch inflammatorische Prozesse gekennzeichnet, die zu zyklisch auftretender Schädigung und Reparation des Lungengewebes führen (O'Callaghan et al. 2010). Die COPD ist streng mit dem Auftreten von Lungenkarzinomen korreliert (Wassawa-Kintu et al. 2005). Das heißt, Raucher mit COPD haben ein höheres Risiko ein Lungenkarzinom zu entwickeln als Raucher ohne COPD (Skillrud et al. 1986, Mannino et al. 2003).

Der Stellenwert der chronischen Entzündung im Rahmen der Tumorgenese wird auch dadurch deutlich, dass eine entzündungshemmende Behandlung mit nichtsteroidalen Antiphlogistika

insbesondere bei Rauchern das Risiko senkt, an einen Lungenkarzinom zu erkranken (McCormack et al. 2011).

Zusammengefasst ist die chronische Entzündung - unabhängig von ihrer Ursache - ein Risikofaktor der Karzinomentstehung.

2.2 Das Bronchialkarzinom

2.2.1 Epidemiologie

Das Bronchialkarzinom ist eine bösartige Gewebeneubildung, die von Zellen des Oberflächenepithels der Bronchien oder Bronchiolen ausgeht. Dazu gehören alle malignen, epithelialen Tumoren des Lungenparenchyms einschließlich der neuroendokrinen Karzinome. Man unterscheidet das kleinzellige und das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom. Das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom stellt 85 % aller Bronchialkarzinome dar. Dabei sind das Plattenepithelkarzinom (PEC) und das Adenokarzinom (ACA) die häufigsten Entitäten.

Weltweit ist Lungenkrebs die häufigste Krebserkrankung. 2008 wurden 1,61 Millionen Neuerkrankungen, 13 % aller neu aufgetretenen Krebsfälle, geschätzt. Lungenkrebs stellt weltweit mit 18 % aller Krebstodesfälle die häufigste Krebstodesursache dar. Mit 55 % tritt Lungenkrebs am häufigsten in den Industrieländern auf. Die Häufigkeit hat seit 1980 zugenommen. Lungenkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Männern weltweit, mit den höchsten Inzidenzen im Zentralen Osten, Südeuropa, Nordamerika und Ostasien. Bei Frauen ist Lungenkrebs seltener, mittlerweile ist es jedoch die vierthäufigste Krebserkrankung (8,5 %) und die zweithäufigste Krebstodesursache (12,8 %) weltweit. Die höchste Inzidenz wird in Nordamerika beobachtet, wo Lungenkrebs der zweithäufigste Krebs bei Frauen ist (Ferlay et al. 2010, Jemal et al. 2011).

In Deutschland ist Lungenkrebs die zweithäufigste Krebserkrankung bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen. Bei Männern war 2010 Lungenkrebs mit 24,9 % weiter mit Abstand die häufigste, bei Frauen mit 13,6 % die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Hier erkrankten 2010 etwa 35.000 Männer und 17.000 Frauen an Lungenkrebs. Damit lag die altersstandardisierte Erkrankungsrate für Männer bei 61 und für Frauen bei 26 Erkrankten pro 100.000 Einwohner: Das heißt, Lungenkrebs tritt bei Männern etwa dreimal häufiger auf. Die zeitliche Entwicklung ist bei beiden Geschlechtern jedoch gegenläufig: Sowohl die Erkrankungs-

als auch die Sterberate nimmt bei Männern seit Mitte der 80er-Jahre kontinuierlich ab, bei Frauen nehmen beide Raten kontinuierlich zu. Das mittlere Erkrankungsalter lag für Männer bei 70 und für Frauen bei 68 Jahren. Die Heilungswahrscheinlichkeit ist niedrig: Die 5-Jahre-Überlebensrate beträgt in Deutschland für Männer 16 % und für Frauen 21 % (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013). In den deutschen Statistiken werden als "Lungenkrebs" alle bösartigen Neubildungen von Trachea, Bronchien und Lunge zusammengefasst.

2.2.2 Ätiologie

Der bedeutendste Risikofaktor für das Entstehen eines Bronchialkarzinoms ist das inhalative Tabakrauchen. Ihm sind 80 bis 90 % aller Bronchialkarzinome zuzuschreiben (Deppermann 2011, Alberg et al. 2013). Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Menge gerauchter Zigaretten und dem Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken. Nachdem das Rauchen aufgegeben wurde, fällt das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken, wieder ab, erreicht aber wahrscheinlich nicht die Werte von Nichtrauchern. Mittlerweile gilt als erwiesen, dass auch Passivrauchen über einen langen Zeitraum, das Risiko erhöht an einem Bronchialkarzinom zu erkranken. Patienten, die an einer chronischen Bronchitis leiden, entwickeln ebenfalls häufiger ein Bronchialkarzinom, insbesondere wenn eine obstruktive Komponente besteht (Alberg et al. 2013).

Berufsbedingte Risikofaktoren sind für circa 10 % aller Bronchialkarzinome (Alberg et al. 2013) ursächlich. Der wichtigste Risikofaktor stellt hierbei die berufliche Asbestexposition dar, die durch zusätzliches Rauchen noch weiter potenziert wird. Weitere Berufskarzinogene sind: Arsen, Nickel, Chrom, Beryllium, Quarz, halogenierte Äther und polyzyklische Kohlenwasserstoffe (O'Callaghan et al. 2010). Ebenfalls als Berufserkrankung anerkannt sind Lungenkrebserkrankungen, die durch ionisierende Strahlung aus Radonisotopen entstehen, die als Staub im Erzbergbau inhaliert werden. Ein bekanntes Beispiel ist der "Schneeberger Lungenkrebs", der bei Arbeitern von Erzbergwerken rund um Schneeberg, einer Stadt im Erzgebirge, auftrat oder die Häufung von Lungenkarzinomen bei Beschäftigten im Uranerzbergbau der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik (Dhom 2004). Dass ionisierende Strahlung Lungenkrebs verursachen kann, wird auch durch Studien nach den Atombombenabwürfen von Hiroshima und Nagasaki belegt (Preston et al. 1987). Auch die Schadstoffbelastung der Luft, insbesondere mit Feinstaub, gilt als Risikofaktor (Pope et al. 2002, Turner et al. 2011).

Des Weiteren können Infektionen an der Entstehung von Bronchialkarzinomen beteiligt sein. Dies wurde sehr ausführlich für Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* (Zheng et al. 1987, Engels et al. 2009, Wu et al. 2011) sowie für Infektionen mit *Chlamydia pneumoniae* (Littman et al. 2005) gezeigt. Es scheint auch eine Assoziation mit viralen Infektionen zu bestehen: Hier sind insbesondere Infektionen mit humanen Papillomaviren (HPV) zu nennen. Interessanterweise sind nicht nur Plattenepithelkarzinome, sondern alle histologischen Entitäten betroffen. Die Assoziation des Bronchialkarzinoms mit einer HPV-Infektion ist im europäischen Raum selten und mit 35,7 % in Asien am höchsten (Klein et al. 2009). Außerdem erhöht eine Infektion mit HIV (humanes Immundefizienz-Virus) unabhängig vom Raucherstatus das Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken. Das Bronchialkarzinom ist bei HIV-Patienten nach den AIDS-definierenden Neoplasien (AIDS: erworbenes Immundefektsyndrom), Kaposi-Sarkom und Non-Hodgkin-Lymphom, die dritthäufigste maligne Erkrankung und für 16 % aller Todesfälle von Patienten mit einer HIV-Infektion verantwortlich (Alberg et al. 2013).

Der Einfluss der familiären Prädisposition ist noch nicht endgültig geklärt. Insbesondere bei jungen Patienten sind häufig mehrere Familienmitglieder betroffen (Deppermann 2011) und eine positive Familienanamnese für Lungenkrebs erhöht das Erkrankungsrisiko (Alberg et al. 2013).

2.2.3 Pathologie

Primäre Lungentumoren werden nach den Richtlinien der World Health Organisation histologisch klassifiziert. Bronchialkarzinome werden in 4 Hauptgruppen eingeteilt: Plattenepithelkarzinome (40 %), Adenokarzinome (35 %), groß- (10 %) und kleinzellige (15 %) Karzinome (Herold 2013). Das Plattenepithelkarzinom zeichnet sich durch den Nachweis intrazytoplasmatischer Keratinbildung oder von Interzellularbrücken aus. Das Adenokarzinom ist charakterisiert durch Schleimbildung oder ein Wachstum in Form von azinären, tubulären oder papillären Strukturen sowie durch schleimbildende Zylinderepithelien, die die Alveolarsepten und Bronchiolen austapezieren. Das letztere ist typisch für das bronchioloalveoläre Adenokarzinom, das nach der neuen Klassifikation für Adenokarzinome als "Adenocarcinoma in situ" oder als "minimalinvasives Adenokarzinom" bezeichnet wird (Travis et al. 2013). Das großzellige Karzinom ist eine Ausschlussdiagnose. Darunter versteht man ein kaum differenziertes, nichtkleinzelliges Karzinom, das weder die Merkmale eines Plattenepithelkarzinoms noch die eines Adenokarzinoms aufweist. Kleinzellige Bronchialkarzinome, die von neuroendokrinen Zellen der Bronchialschleimhaut

abstammen, sind ebenfalls schlecht differenziert, zeigen eine hohe Proliferationsrate und kleine Tumorzellen, die nicht größer sind als drei Lymphozyten (Petersen 2011).

Aus therapeutischen Gesichtspunkten werden die Bronchialkarzinome in zwei Gruppen eingeteilt: kleinzellige und nichtkleinzellige Bronchialkarzinome. Die letzte Gruppe besteht aus Plattenepithelkarzinomen, Adenokarzinomen und großzelligen Karzinomen. Die nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome werden in den niedrigen Tumorstadien wenn möglich komplett reseziert und erhalten ab Stadium II eine adjuvante Chemotherapie, gegebenenfalls in Kombination mit einer Radiotherapie (zur Stadieneinteilung siehe Goeckenjan et al. 2011). Bei den fortgeschrittenen Stadien (IIIB und IV) wird eine Kombination aus Chemo- und Radiotherapie empfohlen (Goeckenjan et al. 2011, Zarogoulidis et al. 2013). Bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen werden 70 % der Patienten mit bereits fortgeschrittenen Stadien erstmals diagnostiziert und erhalten eine Chemotherapie, die gegebenenfalls mit einer Radiotherapie kombiniert wird. Eine Resektion ist nur bei sehr kleinen lokalisierten Tumoren sinnvoll (Goeckenjan et al. 2011, Kallianos et al. 2013).

2011 wurde eine neue Klassifikation für Bronchialkarzinome von der Association for the Study of Lung Cancer, der American Thoracic Society und der European Respiratory Society veröffentlicht (Travis et al. 2013). Darin wird unter anderem eine Klassifikation eingeführt, die sich auf Biopsien und Zytologie bei inoperablen Tumoren stützt. Außerdem wird das Adenokarzinom neu klassifiziert. Der Terminus "bronchioloalveoläres Karzinom" wird nicht mehr verwendet und durch Adenocarcinoma in situ bzw. minimalinvasives Adenokarzinom ersetzt. Die invasiven Adenokarzinome werden durch ihr vorherrschendes Differenzierungsmuster klassifiziert. Die neue Einteilung der Adenokarzinome bezieht sich auf Resektionspräparate.

Neue Therapieoptionen machen eine genaue histologische Unterscheidung der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome notwendig. Zum Beispiel darf ein Patient mit einem Plattenepithelkarzinom wegen des hohen Risikos für lebensbedrohliche Blutungen nicht mit Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF (vascular endothelial growth factor), der für die Behandlung inoperabler nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome in fortgeschrittenen Stadien zugelassen ist, behandelt werden. Bronchialkarzinome, bei denen Mutationen des *EGFR*-Gens (EGFR: epidermal growth factor receptor) oder Rearrangements des *ALK*-Gens (ALK: anaplastische Lymphom-Kinase) nachweisbar sind, können mit einem entsprechenden Tyrosinkinaseinhibitor behandelt

werden. Diese Veränderungen kommen jedoch nahezu ausschließlich bei Adenokarzinomen vor (Travis et al. 2013).

Primäre Lungentumore, die nicht als Bronchialkarzinom klassifiziert werden können, sind verhältnismäßig selten (circa 5 %) und spielen damit eine untergeordnete Rolle.

Alle vier Typen des Bronchialkarzinoms werden hauptsächlich durch Zigarettenrauch verursacht (Khuder 2001). Das kleinzellige Bronchialkarzinom und das Plattenepithelkarzinom kommen hauptsächlich in den zentralen Anteilen des Bronchialsystems vor, das Adenokarzinom und das großzellige Karzinom treten meist in den peripheren Abschnitten der Bronchien auf (Khuder 2001). Interessanterweise sind die Bronchialkarzinome, die nicht durch Zigarettenrauch ausgelöst sind, am häufigsten Adenokarzinome.

In den letzten 50 Jahren nimmt die Häufigkeit von Adenokarzinomen zu und gleichzeitig nimmt die Häufigkeit von Plattenepithelkarzinomen ab (Gabrielson 2006). Als Grund dafür wird der vermehrte Konsum von Filterzigaretten seit den Fünfziger Jahren angesehen, da zum einen die Raucher zum Ausgleich tiefere und häufigere Züge nehmen und den Rauch länger anhalten (Wynder und Covey 1987, Gabrielson 2006), so dass ein größeres Volumen eingeatmet wird. Zum anderen werden durch den Filter kleinere Partikel inhaliert, die tiefer in das Bronchialsystem eindringen (Morabia und Wynder 1991, Alberg et al. 2013). So sind auch die peripheren Bronchien dem Zigarettenrauch ausgesetzt, was das vermehrte Entstehen von Adenokarzinomen mit einer Latenzzeit von 20 Jahren erklären könnte. Außerdem hat sich die Tabakzusammensetzung in den letzten Jahrzehnten verändert: Durch den vermehrten Zusatz von Stängeln und Blattrippen im Tabak hat der Benzo[α]pyrengehalt im Tabakrauch um circa 60 % abgenommen und der Gehalt an 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-Butanon um 70 % zugenommen. Diese Substanz scheint ein Karzinogen zu sein, das spezifisch für die Entstehung von Adenokarzinomen ist (Gabrielson 2006).

2.2.4 Pathogenese

Es werden drei interagierende, grundlegende Konzepte bezüglich der Pathogenese des Bronchialkarzinoms diskutiert (Smith et al. 1996).

Zum einen wird die Karzinogenese des Bronchialkarzinoms als Folge allmählicher morphologischer Veränderungen des Epithels angesehen. Diese Veränderungen beginnen vor allem bei der Entstehung des Plattenepithelkarzinoms mit der Epithelhyperplasie. Hierbei entsteht im Rahmen

einer chronischen Entzündung als Zeichen der Regeneration eine Hyperplasie der Basalzellschicht und/oder der Becherzellen. Bleibt der Entzündungsreiz bestehen, entwickelt sich dann eine Plattenepithelmetaplasie. Darunter versteht man den Ersatz des respiratorischen Flimmerepithels durch Plattenepithel. Daraus entsteht dann bei Persistenz der chronischen Reizung bzw. Entzündung die Dysplasie, die durch das Auftreten atypischer Zellen gekennzeichnet ist. Je nach Schwere der Zellatypien, der Häufigkeit von Mitosen und der Verteilung im Epithel wird die Dysplasie in drei Schweregrade unterteilt. Aus der Dysplasie entsteht das Carcinoma in situ, das histologisch wie ein Karzinom aussieht, aber die Basalmembran nicht durchbricht. Wird die Grenze der Basalmembran überschritten, spricht man schließlich vom invasiven Karzinom (Auerbach et al. 1961, Saccomanno et al. 1974, Smith et al. 1996, Lantuéjoul et al. 2009).

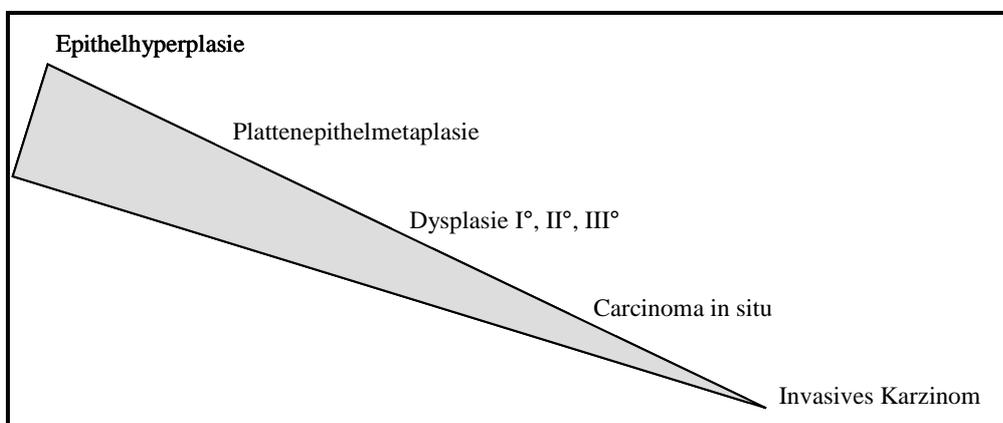


Abbildung 1:
Stufen der Karzinomentstehung am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms.

Diese Stufen folgen jedoch nicht zwangsläufig aufeinander. Abgesehen vom Carcinoma in situ schreiten viele Veränderungen nicht bis zum invasiven Karzinom fort und können sich oft auch spontan wieder zurückbilden (Auerbach et al. 1962, Frost et al. 1986, Ishizumi et al. 2010).

Die Folge morphologischer Veränderungen (Abbildung 1) ist für die Genese des Plattenepithelkarzinoms allgemein akzeptiert. Ähnlich läuft die Entstehung des Adenokarzinoms ab, die jedoch weniger ausführlich beschrieben ist. Das liegt zum Teil daran, dass die peripheren Teile des Bronchialbaums, in denen das Adenokarzinom hauptsächlich entsteht, für Untersuchungen schlecht zugänglich sind. Obwohl die Ursprungszelle für die meisten Adenokarzinome unbekannt ist, geht man mittlerweile davon aus, dass periphere Adenokarzinome von Clara-Zellen oder Pneumozyten Typ II ausgehen. Es bildet sich zunächst eine atypische adenomatöse Hyperplasie. Dabei handelt es sich um eine lokalisierte Proliferation von leicht bis mittelschwer atypischen Zellen, die die

betroffenen Alveolen und Bronchiolen auskleiden. Danach folgt das Adenocarcinoma in situ, das bisher als bronchioloalveoläres Karzinom bekannt war. Diese Läsionen sind größer als die atypische adenomatöse Hyperplasie, die Zellen sind pleomorph und liegen dicht zusammen. Weiterhin wird zwischen dem minimal invasiven und dem invasiven Adenokarzinom unterschieden (Lantuéjoul et al. 2009, Petersen 2011, Travis et al. 2013).

Die zweite Theorie ist die der „field cancerization“. Dabei stellt man sich vor, dass das gesamte Bronchialepithel an einer Vielzahl von Stellen durch die inhalativ einwirkende Noxe (zum Beispiel Benzo[α]pyren im Zigarettenrauch) mutagenisiert wird (Slaughter et al. 1953, Crowell et al. 1996) und in der Folge eine Aneuploidie an vielen unterschiedlichen Stellen des Bronchialepithels entsteht, die dann zu morphologischen Veränderungen des Epithels führt (Smith et al. 1996).

Als dritte mögliche Ursache der Entstehung von Bronchialkarzinomen wird das Auftreten genetischer Veränderungen verantwortlich gemacht. Dazu gehören die Aktivierung von dominanten Onkogenen und die Inaktivierung rezessiver Tumorsuppressorgene.

2.3 Genetische Veränderungen beim Bronchialkarzinom

Beim Bronchialkarzinom wurde eine Vielzahl von genetischen Veränderungen beschrieben, hierbei sind numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen sowie molekulare Veränderungen zu nennen.

Als numerische Aberrationen wurden häufig ein Verlust des Y-Chromosoms, der Chromosomen 9 und 13, sowie Polysomien der Chromosomen 5, 7, 12 (Testa et al. 1997) und 20 (Maturri und Lavezzi 1994) beschrieben. Von einer Polysomie spricht man, wenn ein bestimmtes Chromosom mehr als zweimal in der Zelle vorliegt. Die Polysomie des Chromosoms 7 wurde besonders häufig festgestellt (Zojer et al. 2000, Buckingham et al. 2007) und Lee et al. sowie Lechner et al. beschrieben eine Trisomie 7, das dreimalige Vorliegen des Chromosoms 7 (Lee et al. 1987, Lechner et al. 1998). Eine Polysomie von Chromosom 8 wurde bislang eher selten beschrieben (Schenk et al. 1997, Kubokura et al. 1999 und 2001, Yakut et al. 2003, Kohler et al. 2012).

Es wurde eine Vielzahl an unterschiedlichen strukturellen Aberrationen beschrieben, die fast jedes Chromosom betreffen können. Die häufigste strukturelle Aberration ist, unabhängig vom histologischen Subtyp, die Deletion des kurzen Arms von Chromosom 3 (3p) (Testa et al. 1997). Man nimmt an, dass in dieser Region eines oder mehrere Tumorsuppressorgene liegen, deren

Verlust für die Entwicklung von Bronchialkarzinomen entscheidend sein kann. Andere häufige Aberrationen sind beim kleinzelligen Bronchialkarzinom der Verlust von 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q und 17p sowie Zugewinne von 3q, 5p, 8q, 19q und Xq. Dabei bezeichnen p und q den jeweiligen Arm des Chromosoms. Beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom sind Verluste von 6q, 8p, 9p, 9q, 13q, 17p, 18q, 19p, 21q und 22q, sowie Zugewinne von 1p, 1q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 11q und 12q häufig (Panani und Roussos 2006).

Ebenso ist eine Vielzahl von molekularen genetischen Veränderungen beschrieben. Der Verlust der Heterozygotie (LOH: loss of heterozygosity) auf 3p wird als eine frühe genetische Veränderung bei der Entstehung des kleinzelligen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms angesehen. Zu den LOH-Regionen, die auf 3p identifiziert wurden, gehören 3p25-26, 3p24, 3p21, 3p14 und 3p12. Das *FHIT*-Gen (*FHIT*: fragile histidine triad) ist auf 3p14.2 lokalisiert und reguliert Apoptose und Zellzyklus. Es wird als Tumorsuppressorgen angesehen und ist in 80 % der kleinzelligen und in 40 % der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome verändert (Panani und Roussos 2006, Wen et al. 2011). Ein weiteres, bei Bronchialkarzinomen häufig verändertes und damit inaktiviertes Tumorsuppressorgen ist *P53*. Es ist auf 17p13.1 lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Zelldifferenzierung und Apoptose. Es ist in 80 bis 90 % der kleinzelligen und in 50 % der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome verändert. Außerdem wurde eine *P53*-Mutation bereits in prämaligen Läsionen der Lunge gefunden (Mitsuuchi und Testa 2002, Panani und Roussos 2006). Die Mutation von *P53* ist bei Tabakrauch assoziierten Bronchialkarzinomen häufiger nachweisbar, als bei den Bronchialkarzinomen von Nichtrauchern. Dabei wird die *P53*-Mutation durch die Bindung von Benzo[*a*]pyren-7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxid, einem Stoffwechselprodukt des Benzo[*a*]pyrens im Zigarettenrauch, an die DNA verursacht (Mitsuuchi und Testa 2002, Wen et al. 2011). Ebenso wurde eine Überexpression nach Amplifikation der Onkogene der *MYC*-Familie (*MYC*: Myelocytomatose-Onkogen) bei 15 bis 30 % der kleinzelligen und bei 5 bis 10 % der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome beschrieben. *MYC* codiert für Phosphoproteine, die die Transkription anderer Gene regulieren, die für die Zellproliferation verantwortlich sind (Panani und Roussos 2006). Das *c-MYC*-Onkogen (zelluläres *MYC*) liegt auf 8q24 und eine Amplifikation wurde mit einer Polysomie von Chromosom 8 korreliert (Kubokura et al. 1999 und 2001, Yakut et al. 2003). Weitere wichtige molekulare genetische Veränderungen sind aktivierende Mutationen des *EGFR*-Gens und die Bildung eines Fusionsgens aus dem *EMLA4*-Gen (*EMLA*: echinoderm microtubule-associated protein-like) und dem *ALK*-Gen. Diese beiden

Mutationen werden überwiegend in Adenokarzinomen bei jüngeren Patienten ohne Raucheranamnese gefunden. Bei Nachweis einer dieser Mutationen besteht neuerdings die Möglichkeit einer Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren (Petersen 2011, Wen et al. 2011). Auch für das Plattenepithelkarzinom wurden mittlerweile molekulare Veränderungen beschrieben, die eine Therapieoption mit Tyrosinkinaseinhibitoren ermöglichen könnten: zum Beispiel die *FGFR1*-Amplifikation (FGFR: fibroblast growth factor receptor) oder die *DDR2*-Mutation (*DDR*: discoidin domain receptor) (Heist et al. 2012, Travis et al. 2013).

Insgesamt zeigen Bronchialkarzinome, insbesondere das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom, sehr komplexe Karyotypen. Es wurden aber auch polyploide Bronchialkarzinome mit near-triploidem oder near-tetraploidem Chromosomensatz beschrieben (Masuda und Takahashi 2002).

2.4 Ursache und Manifestation genetischer Veränderungen

Die Tumorentstehung ist ein Prozess allmählicher Veränderungen. Es treten morphologische Veränderungen auf, die sich von der Hyperplasie, über Metaplasie, Dysplasie und Carcinoma in situ, bis hin zum invasiven Karzinom entwickeln. Im Zuge dieser morphologischen Entwicklung treten zunehmend Veränderungen des euploiden Genoms auf, dabei nehmen Häufigkeit und Schweregrad der Aneuploidie zu (Abbildung 2) (Smith et al. 1996, Lantuéjoul et al. 2009, Ishizumi et al. 2010). Die aneuploiden Zellen können aus einer tetraploiden "Zwischenstufe" entstehen (Storchova und Pellman 2004, Davoli und de Lange 2011).

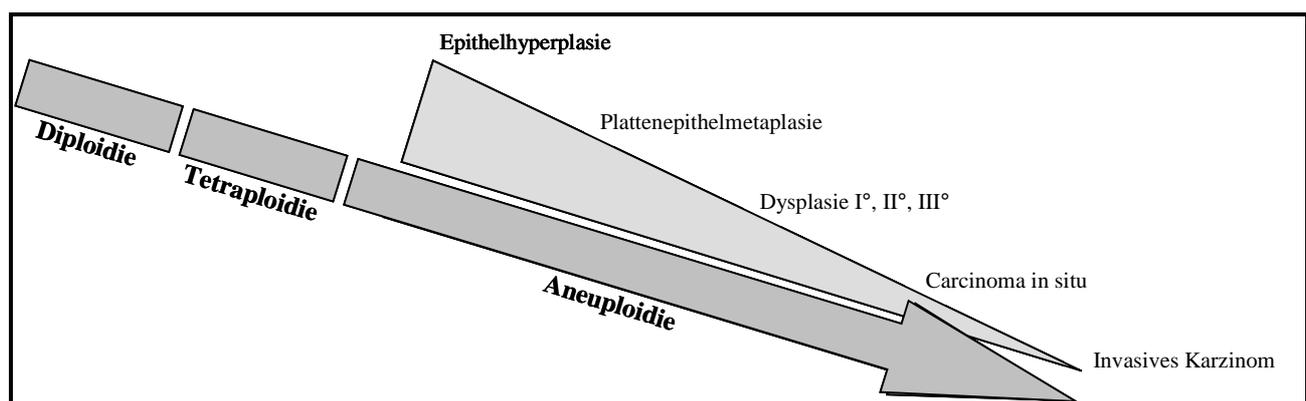


Abbildung 2:

Stufen der Karzinomentstehung am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms mit den Veränderungen des Genoms (Ploidiegrad).

Unter Aneuploidie versteht man jedes Abweichen vom normalen, diploiden Chromosomensatz einer Zelle und unter Polyploidie das Vorhandensein von mehr als zwei kompletten Chromosomensätzen. Die Tetraploidie, die durch das Vorhandensein von vier kompletten Chromosomensätzen definiert ist, stellt einen Sonderfall der Polyploidie dar.

Die somatische Säugetierzelle ist normalerweise diploid. Dieser diploide Status ist durch Kontrollmechanismen während des Zellzyklus streng überwacht, um das Auftreten bzw. die Proliferation von Zellen mit einem abweichenden DNA-Gehalt (DNA: Desoxyribonukleinsäure) zu verhindern. Trotzdem ist das Auftreten polyploider Zellen Teil der normalen Entwicklung und Differenzierung bestimmter spezialisierter Zellarten, wie zum Beispiel Trophoblast-Riesenzellen der Plazenta (Ullah et al. 2008), Megakaryozyten (Ravid et al. 2002, Gao et al. 2012) oder Hepatozyten (Guidotti et al. 2003, Davoli und de Lange 2011). Weitere Beispiele sind Skelettmuskelzellen (Kitzmann und Fernandez 2001) und Osteoklasten (Vignery 2000).

Polyploide Zellen treten auch im Rahmen von Alterung und "Stress" auf. Die mit dem Lebensalter steigende Inzidenz polyploider Zellen wurde sowohl bei Hepatozyten (Celton-Morizur et al. 2010) als auch bei glatten Gefäßmuskelzellen (Hixon und Gualberto 2003) nachgewiesen. Ebenso treten vermehrt tetraploide Zellen bei der Kultivierung von menschlichen Fibroblasten (Walen 2006) und Endothelzellen (Wagner et al. 2001) im Zuge der Seneszenz auf.

Oxidativer Stress und Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie (Gorla et al. 2001, Lazzarini Denchi et al. 2006) ist ebenfalls mit dem vermehrten Auftreten von tetraploiden Zellen verbunden. Ebenso entstehen polyploide Kardiomyozyten (Vliegen et al. 1995) und polyploide glatte Gefäßmuskelzellen (Hixon et al. 2000) unter mechanischer Belastung durch erhöhten Blutdruck. Polyploide Zellen wurden ebenfalls im Randbereich von Myokardinfarkten (Meckert et al. 2005), im Rahmen der Wundheilung (Oberringer et al. 1999) und durch Hypoxie induziert bei einer diploiden Melanomzell-Linie (Rofstad et al. 1996) beschrieben.

Es gibt also eine Vielzahl von unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Bedingungen, unter denen polyploide Zellen entstehen. Hierbei werden die Vorteile polyploider Zellen, wie schnelleres Wachstum, höhere biosynthetische Kapazität und eine höhere genetische Variabilität genutzt (Storchova und Kuffer 2008, Lee HO et al. 2009, Davoli und de Lange 2011, Fox und Duronio 2013), um sich an Situationen, die durch erhöhte mechanische oder toxische Belastung sowie durch Regeneration gekennzeichnet sind, anzupassen.

Tetraploide und höher polypleide Zellen zeigen oft unabhängig von ihrem Entstehungsweg eine erhöhte Anzahl an Zentrosomen, da nicht nur der DNA-Gehalt verdoppelt wird, sondern auch die Anzahl der Zentrosomen (Borel et al. 2002, Davoli und de Lange 2011). Ein Interphasezellkern enthält normalerweise ein Zentrosom, das vor Eintritt in die Mitose verdoppelt wird. Diese beiden Zentrosomen bilden dann eine bipolare Spindel, die eine gleichmäßige Verteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen sicherstellt. Die Verdopplung der Zentrosomen ist im Normalfall streng an die Verdopplung der DNA gebunden (Nigg 2002).

Eine Zentrosomamplifikation, das bedeutet es liegen mehr als zwei Zentrosomen in der Zelle vor, kann in fast allen Arten solider Tumoren - dazu gehören auch die Tumoren der Lunge - nachgewiesen werden (Fukasawa 2005, Pihan et al. 1998). Ebenso wurde eine Amplifikation der Zentrosomen in präinvasiven Karzinomen (Carcinoma in situ) der Cervix, der Mamma und der Prostata nachgewiesen (Pihan et al. 2003). Hierbei nahm die Inzidenz der Zentrosomauffälligkeiten mit dem Grad des präinvasiven Karzinoms zu. Außerdem konnten die Zentrosomauffälligkeiten mit dem Auftreten multipolarer Mitosen und polyploider Zellen korreliert werden. Bereits 1914 stellte Boveri die Hypothese auf, dass aneuploide Zellen durch multipolare Mitosen entstehen, die durch eine Vermehrung der Zentrosomen bedingt sind (Boveri 2008). In der jüngeren Vergangenheit wurde eine Zentrosomamplifikation auch bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen beschrieben und mit dem Auftreten aneuploider Zellen korreliert (Koutsami et al. 2006, Jung et al. 2007).

Chromosomale Instabilität (CIN) und Aneuploidie wurden häufig in Bronchialkarzinomen beschrieben (Masuda und Takahashi 2002, Ninomiya et al. 2006, Takeshita et al. 2013). Unter chromosomaler Instabilität versteht man die Variabilität der Chromosomenzahl von Zelle zu Zelle (Pihan et al. 1998). Dabei beschreibt der Begriff "chromosomale Instabilität" eine dynamische Veränderung des Genoms, während "Aneuploidie" einen Zustand beschreibt (Nigg 2002). CIN und Aneuploidie werden als Folge der Zentrosomamplifikation angesehen, da sich bei dem Vorliegen von mehr als zwei Zentrosomen häufig eine multipolare Spindel ausbildet und es zu einer Fehlverteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen kommt (Nigg 2002, Ganem et al. 2009).

Zentrosomamplifikation, multipolare Mitosen und CIN gelten als Kennzeichen von malignem Gewebe (Pihan et al. 1998, Nigg 2002). Das Auftreten und die Häufigkeit von Zentrosomamplifikationen (Pihan et al. 2003, Koutsami et al. 2006) wurden ebenso wie das Auftreten der Aneuploidie (Smith et al. 1996, Lantuéjoul et al. 2009, Ishizumi et al. 2010) mit den

zunehmenden morphologischen Veränderungen des Bronchialgewebes korreliert. Dabei ist die Hyperplasie die früheste morphologische Veränderung, die mit dem Auftreten von Aneuploidie und amplifizierten Zentrosomen korreliert wurde.

Da viele Karzinome auf dem Boden einer chronischen Entzündung entstehen, die vermutlich den ersten Schritt in der Tumorentstehung darstellt, stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage, ob diese Veränderungen bereits im entzündlichen Gewebe nachweisbar sind.

2.5 Fragestellung

Am Beispiel des Bronchialepithels wurde die chronische Entzündung auf Veränderungen hin untersucht, die bekanntermaßen auf dem Weg der Tumorentstehung vorkommen oder bereits maligne Zellen charakterisieren. Untersucht wurden in vitro an Zellkulturen aus entzündlichem Bronchial- und Karzinomgewebe Tetra- und höhere Aneuploidisierung. Außerdem wurden die Anzahl der Zentrosomen und multipolaren Mitosen bestimmt.

Fragestellung:

1. Können Tetra- und Aneuploidie in Zellkulturen der bronchialen Entzündung und des Bronchialkarzinoms detektiert werden?
2. Finden sich Unterschiede bezüglich des Tetra- und Aneuploidiegrades in Zellkulturen von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen?
3. Sind genetische Veränderungen auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt?
4. Verändert sich der Tetra- und Aneuploidiegrad im Verlauf der Zellkultur-Passagen?
5. Können weitere Phänomene, die mit der Entstehung tetra- und aneuploider Zellen assoziiert sind, wie Zentrosomamplifikation und multipolare Mitosen, nachgewiesen werden?
6. Können Trisomie 7 und Trisomie 8 detektiert werden?
7. Lassen sich diese Parameter mit dem Entzündungsgrad des Bronchialgewebes korrelieren?

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Gewebeentnahme

Insgesamt ging Gewebe von 34 Patienten in die Studie ein. Es handelte sich um Patienten, die wegen eines Lungenkarzinoms zwischen Februar 1997 und August 1998 einer Lungenteilresektion in der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, unterzogen wurden. Es liegt ein positives Votum der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes (Nummer 09/12) vor.

Von 27 Patienten konnte sowohl Tumorgewebe als auch nicht-tumoröses Bronchusgewebe und von sieben weiteren lediglich nicht-tumoröses Bronchusgewebe entnommen werden. Das nicht-tumoröse Bronchusgewebe wird im Folgenden als "Bronchusgewebe" bezeichnet.

Die verwendeten Gewebeproben wurden gewonnen, indem der Operateur aus dem resezierten Lungenlappen, wenn möglich, einen Teil des Tumors und ein tumorfernes Stück Lappenbronchus entnahm. Diese wurden dann in sterilen Behältern direkt aus dem Operationssaal (OP) ins Labor transportiert und sofort unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank Laminair, Heraeus, Hanau) bearbeitet.

Um Kontrollgewebe von Patienten ohne Bronchialkarzinom zu erhalten wurde außerdem versucht, Zellen aus bronchoskopisch gewonnenen Biopsien zu kultivieren. Aber auf Grund der geringen Gewebemenge wuchsen nur bei wenigen Proben genügend Zellen an. Außerdem war, ebenfalls wegen der geringen Größe der Proben, keine histopathologische Beurteilung möglich. Deshalb ging von diesen Patienten kein Gewebe in die vorliegende Studie ein.

3.1.2 Gewebecharakterisierung

Ein Teil der Biopsie (circa 100 mm³) wurde in gepuffertem Formalin (4 % Formaldehyd in Phosphatpuffer (PBS)) fixiert und histopathologisch durch einen erfahrenen Pathologen des Instituts für allgemeine und spezielle Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, beurteilt. Die Tumorbiopsien wurden nach Art des Tumors und Grad der Differenzierung (Grading)

charakterisiert. Bei der Beurteilung des Bronchusgewebes galten Tumordinfiltration, Epitheldysplasie und -hyperplasie als Ausschlusskriterium. Bei fast allen Bronchusproben wurde eine chronische Entzündung unterschiedlichen Ausmaßes festgestellt, die durch Lymphozyteninfiltration, Becherzellhyperplasie, Reservezellhyperplasie und Verdickung der Basalmembran charakterisiert war. Sie wurde an Hand der Anzahl infiltrierter Lymphozyten und der Schwere der Reservezellhyperplasie in Schweregrade von 0 bis 3 (0 = keine, 1 = leichte, 2 = mittelgradige und 3 = schwergradige chronische Entzündung) eingeteilt (Abbildungen 3 bis 5).

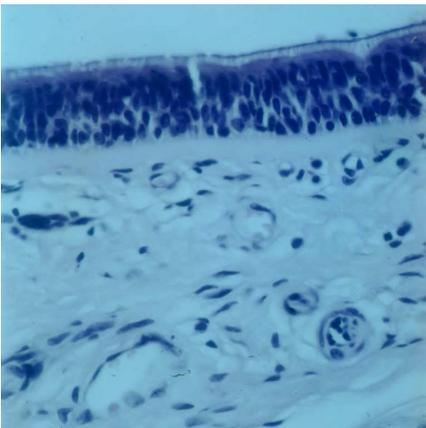


Abbildung 3:

Bronchusgewebe ohne Zeichen der chronischen Entzündung.

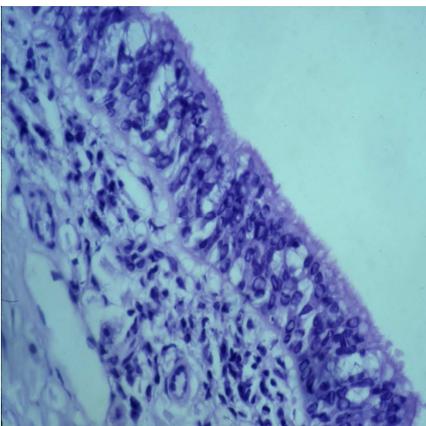


Abbildung 4:

Bronchusgewebe mit mittelgradiger Entzündung.

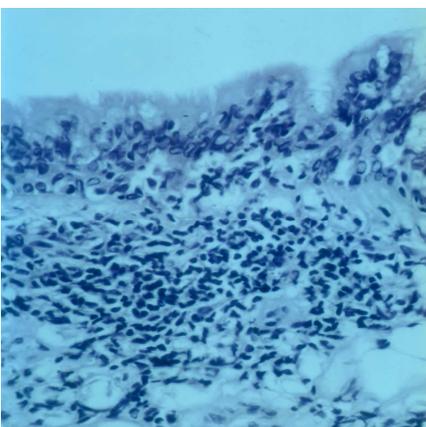


Abbildung 5:

Bronchusgewebe mit schwergradiger Entzündung.

Nach der histopathologischen Untersuchung wurden sechs Bronchusbiopsien von der Studie ausgeschlossen, da die Mukosa schlecht erhalten war und deshalb nicht beurteilt werden konnte. Drei Bronchusbiopsien wurden ausgeschlossen, da sie vom Tumor infiltriert waren, so dass von diesen Patienten nur noch Tumorgewebe in die Studie einging.

Vom Tumorgewebe mussten vier Biopsien ausgeschlossen werden, da histopathologisch kein Karzinomgewebe nachweisbar war. Von diesen Patienten ging nur entzündliches Bronchusgewebe in die Studie ein.

Zwei Patienten waren wegen einer früheren malignen Erkrankung chemotherapiert worden (in Tabelle 1 mit * markiert). Diese Patienten wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Also verblieben letztendlich 14 Patienten, von denen sowohl Bronchus- als auch Tumorgewebe vorlag. Von 9 Patienten ging nur Bronchusgewebe, und von weiteren 9 nur Tumorgewebe in die Untersuchungen ein.

Durch Analyse der Patientenakten ergaben sich weitere Informationen zum TNM-Stadium des Tumors (Staging), Raucheranamnese, Beruf und Krankenvorgeschichte. Bei der TNM-Klassifikation handelt es sich um eine Einteilung für maligne Tumore bezüglich ihrer Ausdehnung (T = Tumor), Vorhandensein oder Fehlen von regionären Lymphknotenmetastasen (N = nodes = Lymphknoten) und Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen (M = Metastasen; zur TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms siehe Goeckenjan et al. 2011).

In Tabelle 1 sind die in die Studie eingegangenen Fälle mit Alter, Geschlecht, Raucherstatus in pack years, Entzündungsgrad des Bronchusgewebes und Art des diagnostizierten Tumors mit Staging und Grading aufgeführt. Außerdem kann man aus der Tabelle ersehen, welche Gewebe der jeweiligen Fälle letztendlich in die Studie eingingen. Zunächst sind die Fälle aufgeführt, von denen nur Tumorgewebe vorlag, geordnet nach der Art des Tumors. Danach folgen die Patienten, von denen sowohl Tumor- als auch Bronchusgewebe vorhanden war und schließlich werden die Fälle genannt, von denen nur Bronchusgewebe vorlag, geordnet nach aufsteigendem Entzündungsgrad.

Bei den Tumoren handelte es sich um 12 Adenokarzinome und 9 Plattenepithelkarzinome, ein klein- und ein großzelliges Karzinom. Die Beurteilung der Entzündung des Bronchusgewebes ergab 15 leicht- und 8 mittel- bis schwergradig entzündliche Bronchusbiopsien.

Tabelle 1:

Überblick über Alter, Geschlecht und Raucherstatus der untersuchten Patienten, Entzündungsgrad des Bronchusgewebes, Tumorhistologie und die in die Studie eingegangenen Gewebe.

	Fall	Alter	Geschlecht 1)	Bronchialgewebe	Diagnostizierter Tumor		Pack Years 5)
				Entzündungsgrad 2)	Tumorart 3)	Staging und Grading 4)	
Tumorgewebe	1	45	M	nicht beurteilbar	ACA	T2 N2 M0 G3	40
	2	65	M	nicht beurteilbar	ACA	T2 N1 G3	nicht bekannt
	3	49	W	nicht beurteilbar	ACA	T3 N1 M1	45
	4	71	M	tumorinfiltriert	ACA	T3 N1 M0 G3	nicht bekannt
	5	63	M	nicht beurteilbar	PEC	T2 N0 G3	nicht bekannt
	6	58	M	tumorinfiltriert	PEC	T1 N1 M0 G2	40-60
	7	62	M	nicht beurteilbar	PEC	T1 N0 G2	nicht bekannt
	8	47	W	tumorinfiltriert	PEC	T2 N0 G2	nicht bekannt
	9	67	M	nicht beurteilbar	großzelliges Ca	T2 N0 M0 G3	20
Tumor- u. Bronchusgewebe	10	55	M	1	ACA	T2 Nx M0 G3	45
	11	49	M	1	ACA	T2 N1 G2	nicht bekannt
	12	64	M	1	ACA	T2 N0 M0 G2	55
	13	76	M	1	ACA	T2 N0 M0 G2	100
	14	58	W	1 bis 2	ACA	T3 N1 G2-3	60-70
	15	63	M	1 bis 2	ACA	T3 N1 M1 G3	40
	16	74	W	2 bis 3	ACA	T1 N1 M0	0
	17	57	W	3	ACA	T2 N2 G2-3	nicht bekannt
	18	75	M	0 bis 1	PEC	T3 N01 G3	30
	19	66	M	1	PEC	T1 N1 G3	nicht bekannt
	20	66	M	1 bis 2	PEC	T2 N0 M0 G2	35
	21	58	M	2	PEC	T2 N1 M0 G2	35
	22	78	M	2	PEC	T2 N0 G3	nicht bekannt
	23*	65	M	2 bis 3	PEC	T3 N2 M0 G3	25
	24	55	M	1	SCLC	T2 N2 G3	nicht bekannt
Bronchusgewebe	25	68	M	0	ACA ⁺	T4 N3 M0 G2	67
	26	73	M	0	ACA ⁺	T4 N3 M1 G3	50
	27	45	M	0 bis 1	kein Ca		30-35
	28	57	W	0 bis 1	kein Ca		nicht bekannt
	29	61	M	0 bis 1	kein Ca		40
	30	55	M	1	kein Ca		0
	31*	72	W	1	ACA ⁺	T2 N1 M0 G2	0
	32	72	M	1	PEC ⁺	T2 N2 M0 G2	90
	33	70	M	1	PEC ⁺	T1 N0 M0 G2	64
	34	49	W	2	ACA ⁺	T2 N2 M0 G3	30

*Patient wurde chemotherapiert; ⁺ bei diesem Patienten lag genannter Tumor vor, es konnte jedoch kein Tumorgewebe für die Studie entnommen werden; ¹⁾ M = männlich, W = weiblich; ²⁾ 0 = keine Entzündung, 1 = leichte chron. Entz., 2 = mittelgradige chron. Entz., 3 = schwergradige chron. Entz.; ³⁾ PEC = Plattenepithelkarzinom, ACA = Adenokarzinom, SCLC = kleinzelliges Karzinom; ⁴⁾ Staging und Grading nach UICC (Union internationale contre le cancer); ⁵⁾ 1 pack year entspricht einem Jahr, in dem pro Tag ein Päckchen Zigaretten geraucht wurde.

Tabelle 2:
Übersicht über die Zuordnung der verschiedenen Gewebe zu den einzelnen Versuchsgruppen.

	entzündliches Bronchusgewebe		Tumorgewebe	
	leicht 0-1	stark >1		
Tumorgewebe	1		P0, P1, P2	
	2		P0, P1, P2	
	3		P0, P1, P2	
	4		P0, P1, P2	
	5		P0, P1, P2	
	6		P0, P1, P2	
	7		P0, P1, P2	
	8		P0, P1, P2	
	9		P0, P1, P2	
Tumor- u. Bronchusgewebe	10	P0*, P1	P0*	
	11	P0*	P0*, P1	
	12	P0*, P1, P2	P0*, P1, P2	
	13	P0, P1, P2	P0, P1, P2	
	14		P0*, P1, P2	
	15		P0*, P1, P2	
	16		P0, P1*, P2	
	17		P0*, P1, P2	
	18	P0, P1, P2		
	19	P0, P1*, P2		
	20		P0*, P1, P2	
	21		P0*	
	22		P0, P1*, P2	
23	chemotherapiert			
24	P0, P1*, P2		P0*, P1, P2	
Bronchusgewebe	25	P0		
	26	P0		
	27	P0*		
	28	P0, P1, P2		
	29	P0		
	30	P0, P1*, P2		
	31	chemotherapiert		
	32	P0, P1, P2		
33	P0			
34		P0		
n	15	8	23	

*= bei dieser Passage wurde zusätzlich eine Zentrosomfärbung kombiniert mit einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gegen Chromosom 8 durchgeführt; P = Zellkultur-Passage, n = Gruppenstärke.

3.1.3 Gruppenbildung

Um die Untersuchungsergebnisse der unterschiedlichen Gewebe statistisch miteinander vergleichen zu können, wurden diese in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bestand aus Bronchusgewebe, das durch keine oder eine leichte Entzündung ($\text{Grad} \leq 1$) charakterisiert war ($n = 15$). Diese wird im Folgenden "leicht entzündliches Bronchusgewebe" (Ble) genannt. Die zweite Gruppe wurde aus mittel- bis schwergradig entzündetem Bronchusgewebe ($\text{Grad} > 1$) gebildet ($n = 8$) und heißt nachfolgend "stark entzündliches Bronchusgewebe" (Bse). Die dritte Gruppe wurde durch das Karzinomgewebe repräsentiert ($n = 23$), im Folgenden "Tumorgewebe" (Tu) genannt (Tabelle 2). Die häufigsten Tumorarten waren hier das Adenokarzinom ($n = 12$) und das Plattenepithelkarzinom ($n = 9$), die in der Auswertung miteinander verglichen wurden.

3.1.4 Zellkultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, das heißt sie erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Die aus dem OP erhaltenen Gewebeproben wurden auf folgende Art und Weise aufbereitet: Bei der Bearbeitung der Bronchusgewebeproben wurde die Mukosa mit einer mikrochirurgischen Schere vom Knorpel abpräpariert, mit einem Skalpell in kleine Stücke zerteilt und in 5 ml Kulturmedium (DMEM/HAM's F12 (PAA, Cölbe) mit Zusätzen; siehe Anhang), das 100 U/ml Kollagenase (Collagenase TypII, Gibco BRL, New York) enthielt, suspendiert. Von der Tumorgewebebiopsie wurden aus mindestens drei unterschiedlichen Bereichen Gewebeproben gewonnen, die gepoolt wurden. Danach wurden sie analog zu den Bronchusgewebeproben zerteilt und in kollagenasehaltigem Kulturmedium (siehe oben) suspendiert. Der Verdau erfolgte dann über Nacht bei Standardkulturbedingungen (37°C , feuchte Atmosphäre, 5 % CO_2) in aufrecht stehenden T25-Kulturflaschen (Greiner, Frickenhausen).

Nach dem Verdau wurde die Zellsuspension mehrmals ein- und auspipettiert, um die Zellseparation zu vervollständigen. Danach wurde die Suspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen (GLW, Würzburg) überführt und mit 1200 U/min 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, indem das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde. Diese Waschung wurde nochmals wiederholt. Danach wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in die Kulturgefäße überführt.

Damit die Zellen der folgenden Immunfärbung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zugänglich sind, wurden sie direkt auf Objektträger angesetzt. Dazu wurden zwei vorbehandelte Glasobjektträger (siehe Anhang) in einer Quadriperm-Schale (Heraeus, Hanau) mit je 4 ml Zellsuspension überschichtet. Nach dem Bewachsen des Objektträgers konnten die Zellen dann ohne Unterkultivierung in Zellkultur-Passage (P) 0 fixiert werden.

Meist war genügend Gewebe vorhanden, so dass parallel zur Objektträger-Kultur eine Zellkultur in einer T25-Kulturflasche mit 4 ml Zellsuspension angelegt werden konnte. Diese wurde dann zur weiteren Zellexpansion und Herstellung von Objektträger-Kulturen in P1 und P2 verwendet.

Die Kultivierung erfolgte unter Standardkulturbedingungen, wobei das Kulturmedium alle 2 bis 3 Tage ausgetauscht wurde.

War in den T25-Kulturflaschen eine mikroskopisch kontrollierte Konfluenz von ungefähr 80 % erreicht, wurden die Zellen unterkultiviert. Dazu wurde der Zellrasen nach Abpipettieren des Kulturmediums zweimal mit je 5 ml sterilem PBS (Oxoid, Wesel) gespült, da das im Kulturmedium enthaltene fetale Kälberserum (FCS) die Aktivität des im Folgenden zugesetzten Trypsins vermindert. Der Zellrasen wurde dann mit 2 ml Trypsin/EDTA (PAA, Cölbe) überschichtet und bei 37 °C 3 min lang inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde der Beginn der Ablösung der Zellen an deren zunehmender Kugelform beurteilt und das Ablösen durch Klopfen an der Seitenwand des Kulturgefäßes vervollständigt. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 U/min abzentrifugiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und auf eine T25-Kulturflasche und zwei Glasobjektträger in einer Quadriperm-Schale verteilt (P1). Ebenso wurde mit den T25-Kulturflaschen in P1 verfahren, um Kulturen in P2 anzulegen.

Da im Verlauf der Passagen die vorhandenen Fibroblasten die Epithelzellen zunehmend verdrängten, wurden die Epithelzellen durch Abtrypsinieren der Fibroblasten angereichert: Die Fibroblasten, die sich während der Trypsinbehandlung früher vom Kulturflaschenboden lösen als die Epithelzellen, wurden abpipettiert und verworfen. Die restlichen Zellen wurden dann vollständig vom Kulturflaschenboden gelöst und wie oben beschrieben weiter kultiviert.

3.1.5 Zellfixierung

War auf den Glasobjektträgern lichtmikroskopisch eine ausreichende Konfluenz der Zellen zu erkennen, wurden sie in den entsprechenden Passagen (P0, P1 und P2) fixiert. Dazu wurde jeder

Objektträger nach Entfernen des Kulturmediums zweimal mit jeweils 5 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml hypotoner Kaliumchlorid-Lösung (0,05 M) 5 min lang bei 37 °C gequollen, um eine Volumenvergrößerung der Zellen und der Zellkerne zu erreichen. Unmittelbar danach wurden die Zellen 10 min in –20 °C kaltem Methanol fixiert, luftgetrocknet und schließlich mit einer Lösung von 10 % PBS in Glycerin eingedeckt. Dazu wurden circa 100 µl der Lösung auf ein Deckglas aufpipettiert, dieses mit der zellbewachsenen Seite des Objektträgers aufgenommen und anschließend bei –20 °C gelagert.

Alle angelegten Zellkulturen wurden in P0, P1 und P2 zunächst einer epithelzellspezifischen immunzytochemischen Färbung und dann einer simultanen FISH gegen die Zentromer-Region von Chromosom 7 und 8 unterzogen. Bei den Zellkulturen der Fälle, von denen sowohl Bronchus- als auch Tumorgewebe vorlag, wurde außerdem in P0 oder P1 (Tabelle 2) eine immunzytochemische Färbung der Zentrosomen mit einer FISH gegen Chromosom 8 kombiniert.

3.2 Immunzytochemische Färbung

3.2.1 Prinzip

Bei einer immunzytochemischen Färbung wird eine Zellstruktur, die eine spezifische antigene Eigenschaft besitzt, mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht (Abbildung 6). Es kann ein direkt markierter Antikörper verwendet werden oder man benutzt wie in der vorliegenden Untersuchung zwei Antikörper und führt eine sogenannte indirekte Immunfärbung durch. Dazu verwendet man einen Antikörper, der die nachzuweisende Zellstruktur erkennt und an sie bindet, den sogenannten Primärantikörper. Nach Auswaschen der nicht gebundenen Primärantikörper wird ein weiterer Antikörper dazu gegeben, welcher den ersten Antikörper erkennt, der sogenannte Sekundärantikörper. An diesen können Moleküle verschiedener Nachweissysteme gekoppelt sein, z. B. ein Enzym, das dann eine Farbreaktion katalysiert oder, wie in dieser Studie, ein Fluoreszenzfarbstoff, der dann mit einem Fluoreszenzmikroskop erkannt werden kann.

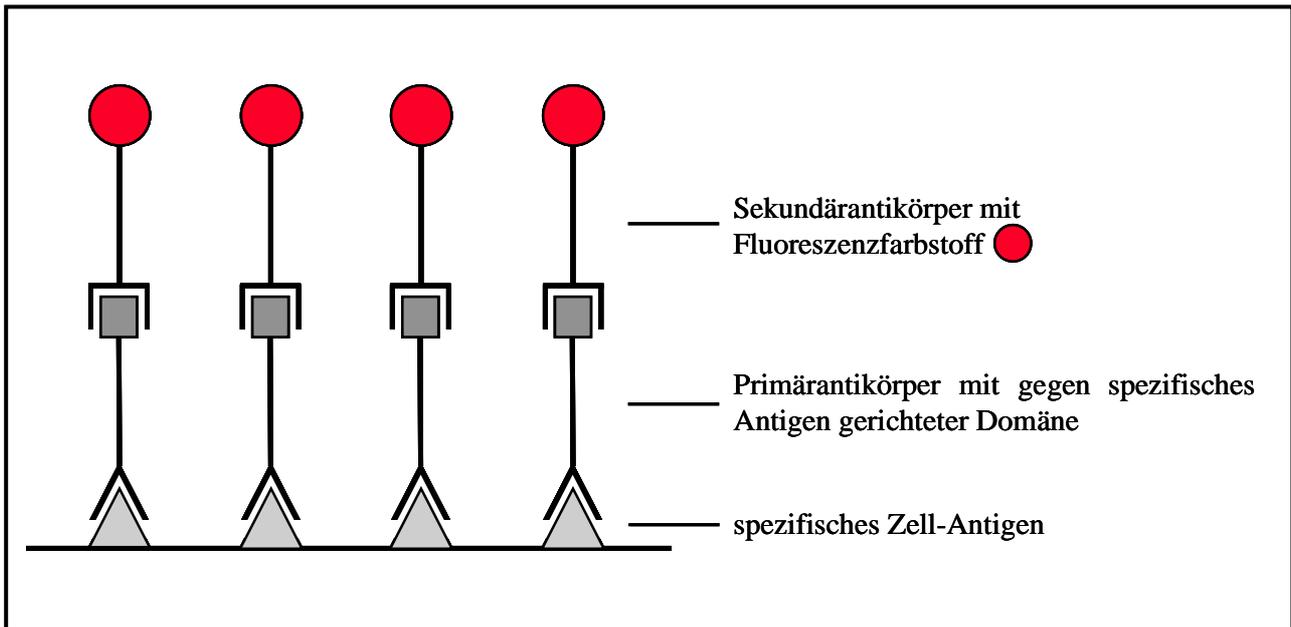


Abbildung 6:
Prinzip einer immunzytochemischen Färbung.

3.2.2 Epithelzell-spezifischer Antikörper

Um die Population der Epithelzellen in der Kultur sicher identifizieren zu können, wurde eine immunzytochemische Färbung mit einem Antikörpergemisch aus zwei monoklonalen Antikörpern (AE1 und AE3) in einem Verhältnis von 4:1 (AE1/AE3, IgG1, DAKO, Carpinteria) durchgeführt (Abbildung 7). Diese Mausantikörper sind gegen menschliche Zytokeratine gerichtet, AE1 gegen Zytokeratine der Masse 40, 48, 50 und 56,5 Kilodalton (kD) und AE3 gegen Zytokeratine der Masse 52, 56, 58, 59, 64 und 65-67 kD.

Da Epithelzellen aus den Atemwegen die Zytokeratine 40, 45, 46, 50, 52,5, 54, 56 und 58 kD präsentieren (Moll et al. 1982), war dieses Antikörpergemisch besonders gut für die Untersuchung der Zellen der Bronchialschleimhaut geeignet. Ebenso werden Bronchialkarzinomzellen (40, 45, 46, 52,5, 54 und 56 kD) durch diese Antikörper erkannt (Tabelle 3).

Tabelle 3:

Übersicht über die Zytokeratine, die vom Bronchialgewebe exprimiert und von dem anti-Zytokeratin-Antikörpergemisch erkannt werden (Moll et al. 1982).

Zytokeratin-Nr.	19	18	17	16	15		8	7	6	10	5	4	9	
Masse [kD]	40	45	46	48	50	52	52,5	54	56	56,5	58	59	64	65-67
Antikörper AE1/AE3	+			+	+	+			+	+	+	+	+	+
Bronchialepithel	+	+	+		+		+	+	+		+			
Bronchialkarzinom	+	+	+				+	+	+					

Das Antikörpermisch wurde generell in PBS/0,1 % BSA (bovines Serumalbumin; siehe Anhang) 1:75 verdünnt. BSA wurde hierbei verwendet, um die Affinität des Antikörpers für unspezifische Bindungen herabzusetzen.

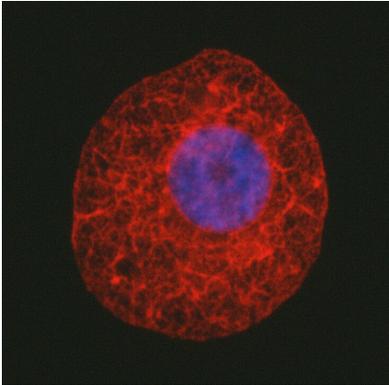


Abbildung 7:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Epithelzelle nach Zytokeratin-Immunfärbung (Cy3TM/rot) und Kerngegenfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI/blau).

3.2.3 Zentrosom-spezifischer Antikörper

Der monoklonale γ -Tubulin-Antikörper (Maus Ig (Immunglobulin) G1 Isotyp, Clone GTU-88, Sigma, Saint Louis) erkennt ein Epitop, das sich am N-Terminus des γ -Tubulins befindet (Aminosäuren 38-53). γ -Tubulin ist ein Bestandteil des Zentrosoms und liegt in dem die beiden Zentriolen umgebenden perizentriolären Material. Von Komplexen, die das γ -Tubulin mit anderen Proteinen aufbaut, bilden sich die Spindelfasern aus, die aus α - und β -Tubulin bestehen.

Der Antikörper gegen γ -Tubulin markiert somit das Zentrosom, dessen Anzahl und Verteilung in den kultivierten Zellen bezogen auf den unterschiedlichen Ploidiegrad bestimmt werden konnten. Eingesetzt wurde er in der Verdünnung 1:2000 in PBS/0,1 % BSA.

3.2.4 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper wurde sowohl bei der Färbung der Zytokeratine als auch bei der des γ -Tubulins ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanin (Cy3TM) markierter Ziegenantikörper verwendet, der an das Maus-Epitop des jeweiligen Primärantikörpers bindet (Goat-anti-Mouse-Cy3TM, Dianova, Hamburg).

Zur Epithelzellfärbung wurde der Sekundärantikörper 1:100 und zur Färbung der Zentrosomen 1:50 in PBS/0,1 % BSA verdünnt.

3.2.5 Färbung

Die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Objektträger wurden bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und dann 5 min in 2xSSC (Zitratpuffer) bei RT in eine Küvette eingestellt, um die Deckgläser zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70 % - 80 % - 96 %) geführt und luftgetrocknet.

Die Objektträger wurden 3 x 5 min in eine Küvette mit PBS/0,05 % Tween[®] (PBST; siehe Anhang) eingestellt. Danach wurden sie mit 75 μl Primärantikörper eingedeckt und 45 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Entfernen des Deckglases erfolgte eine Waschung 3 x 5 min in PBST, bevor die Zellen mit 75 μl Sekundärantikörper eingedeckt und wiederum 45 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Dieser und alle nachfolgenden Inkubations-Schritte einschließlich der FISH erfolgten im Dunkeln.

Nach dem Ausdecken und erneuten Einstellen der Objektträger für 3 x 5 min in PBST, wurden die Zellen 5 min lang in einer frisch angesetzten Lösung von 4 % Paraformaldehyd in PBS (siehe Anhang) bei RT unter ständigem Schütteln nachfixiert. Ein weiteres Mal wurden die Zellen 3 x 5 min in PBST eingestellt, durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und luftgetrocknet. Zum Abschluss wurden sie mit einer Lösung von 10 % PBS in Glycerin eingedeckt und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mindestens 24 h gelagert, bevor die FISH durchgeführt wurde. Dies diente der Stabilisierung der Fluoreszenzsignale.

3.3 DNA-DNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

3.3.1 Prinzip

Bei dieser Art der In-situ-Hybridisierung bindet eine markierte DNA-Sonde an eine bestimmte DNA-Zielsequenz und weist so bestimmte DNA-Abschnitte im Genom nach (Abbildung 8). Diese Methode wurde zunächst für radioaktiv markierte DNA-Sonden etabliert (John et al. 1969, Pardue und Gall 1969) und später auch für Sonden, an die Enzyme (Lichter et al. 1991) gekoppelt sind, die dann eine Farbreaktion katalysieren.

In dieser Studie wurde eine simultane Zwei-Farben-FISH (Eastmond et al. 1995) durchgeführt, um den Ploidiegrad der Zellen zu bestimmen. Durch die Verwendung von DNA-Sonden, die gegen

repetitive α -Satellitenbereiche der Zentromerregion gerichtet sind, kann die Anzahl der Kopien eines bestimmten Chromosoms im Interphasekern einer Zelle bestimmt werden. Um die Verlässlichkeit zu erhöhen, wurden hier zwei DNA-Sonden verwendet, die gegen zwei unterschiedliche Chromosomen gerichtet waren.

Eine Sonde war gegen Chromosom 7 gerichtet. An sie war Digoxigenin gekoppelt (Chromosome 7 α -Satellite (D7Z1), Oncor, Gaithersburg), ein Hapten, das durch einen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3TM markierten Antikörper erkannt wurde (Antidigoxigenin-Cy3TM, Maus-IgG monoklonal, Dianova, Hamburg) (Abbildung 8). An die zweite, gegen Chromosom 8 gerichtete DNA-Sonde (Chromosome 8 α -Satellite (D8Z2), Oncor, Gaithersburg) war das organische Molekül Biotin gebunden. Dieses besitzt eine sehr hohe Affinität zu dem Protein Streptavidin, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert war (Streptavidin-FITC, Vector/Camon, Wiesbaden). Die Fluoreszenzsignale konnten nachfolgend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops begutachtet werden.

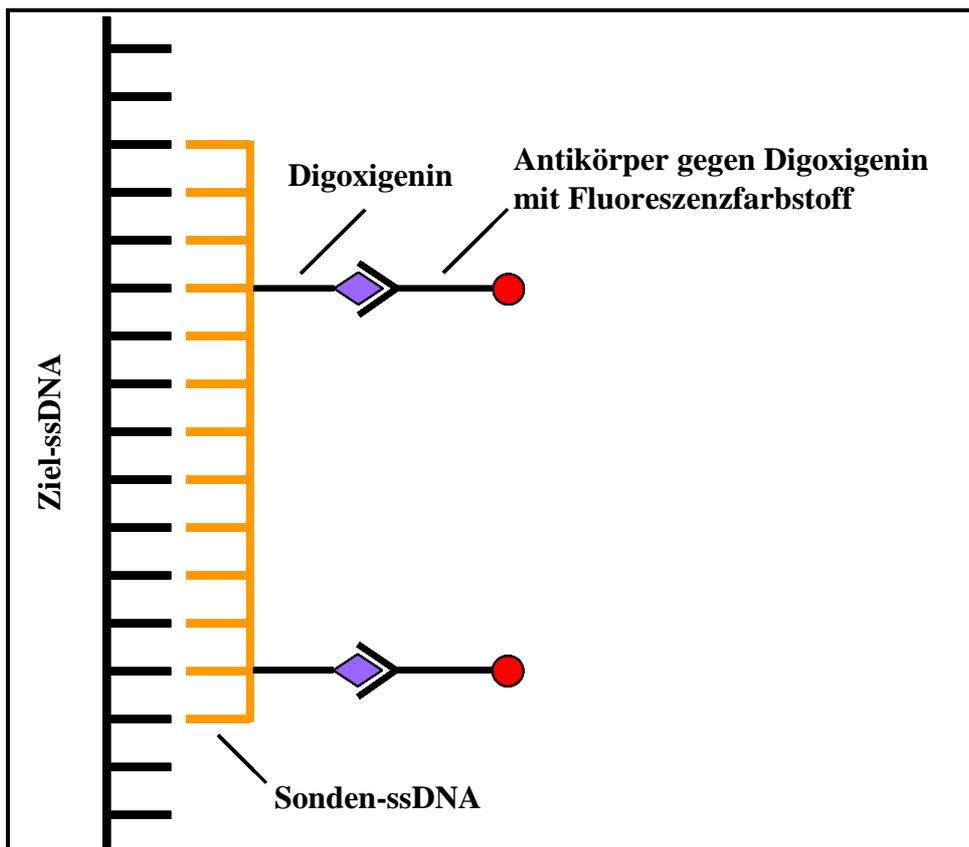


Abbildung 8:

Prinzip einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Beispiel einer mit Digoxigenin markierten DNA-Sonde.

3.3.2 Hybridisierung

Die nach der Immunfärbung bei 4 °C gelagerten Präparate wurden zum Ausdecken 5 min in 2xSSC eingestellt, durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und anschließend luftgetrocknet.

Die Objektträger wurden mit 10 µl Hybridisierungsmix (Hybmix) und Deckgläsern (18 mm x 18 mm) eingedeckt.

Der Hybmix bestand aus:

0,5 µl	digoxigenierte Chromosom 7-Sonde	(50 ng)
0,5 µl	biotinylierte Chromosom 8-Sonde	(50 ng)
6,0 µl	Formamid _{deionisiert}	(Endkonzentration: 60 %)
1,0 µl	20xSSC	(Endkonzentration: 2xSSC)
2,0 µl	H ₂ O _{dd} (doppelt destilliertes Wasser)	

Σ 10,0 µl

Die FISH nach der immunzytochemischen Färbung der Zentrosomen wurde nur gegen Chromosom 8 durchgeführt, um eine Verwechslung der roten Signale der Cy3TM-markierten Zentrosomen mit dem ebenfalls Cy3TM-markierten Chromosom 7 auszuschließen. Der Hybmix enthielt dabei 0,5 µl biotinylierte Chromosom 8-Sonde und, um die gleichen Endkonzentrationen zu erhalten, 2,5 µl H₂O_{dd}.

Nach dem Eindecken wurde der Deckglasrand mit Fixogum (Fixogum rubber cement, Marabu-Werke, Tamm) verschlossen, um das Verdunsten des Hybmixes zu verhindern. Danach wurden die Sonden-DNA und die Ziel-DNA simultan 10 min lang bei 80 °C auf der Heizplatte im Dunkeln denaturiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung über Nacht (14 h bis 16 h) bei 37 °C abgedunkelt in einer feuchten Kammer.

3.3.3 Stringenzwaschung und Detektion

Nach der Hybridisierung wurde das Fixogum abgezogen und die Deckgläser in 2xSSC abgelöst. Um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, wurden anschließend die Stringenzwaschungen durchgeführt. Dies erfolgte durch Einstellen der Objektträger 3 x 5 min in eine 37 °C warme Lösung von 60 % Formamid in 2xSSC (pH 7,0).

Danach erfolgte eine Waschung 5 min in 4xSSC/0,5 % Tween[®] (SSCT; siehe Anhang), um anschließend die Objektträger mit 75 µl der Lösung 0,5 % Blocking-Reagens in 4xSSC (siehe Anhang) zu inkubieren (30 min bei 37 °C; feuchte Kammer). Das Blocking-Reagens diente dazu, unspezifische Bindungen an zelleigene Proteine während der Detektion zu verhindern.

Dann erfolgte die Detektion von Chromosom 8. Hierzu wurden die Objektträger mit 75 µl einer Lösung von Streptavidin-FITC in Blocking-Reagens (Verdünnung 1:250) eingedeckt und wiederum 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurden die Objektträger wieder ausgedeckt und 3 x 5 min in 4xSSCT eingestellt, um nicht gebundenes Streptavidin-FITC zu entfernen.

Danach wurde Chromosom 7 detektiert, indem die Objektträger mit 75 µl einer Lösung von Antidigoxigenin-Cy3[™] in Blocking-Reagens (Verdünnung 1:50) inkubiert wurden (30 min, 37 °C; feuchte Kammer). Es erfolgte eine Waschung 3 x 5 min in 4xSSCT, bevor die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und luftgetrocknet wurden. Bei den Präparaten, bei denen vorher eine Zentrosomfärbung stattgefunden hatte, wurden die letzten beiden Schritte übersprungen und gleich mit der Alkoholreihe fortgefahren.

Zum Abschluss wurden die Zellen mit DAPI/Antifade (siehe Anhang) eingedeckt, wobei DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Sigma, München) zur blauen Gegenfärbung der Zellkerne diente und Antifade das Verblässen der Fluoreszenzsignale verhinderte. Die Verdünnung von DAPI in Antifade wurde der Intensität der Fluoreszenzsignale von Cy3[™] und FITC, sowie der Stärke der Quecksilberdampflampe des Fluoreszenzmikroskops, die mit zunehmendem Alter der Lampe nachließ, angepasst. Die fertigen Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

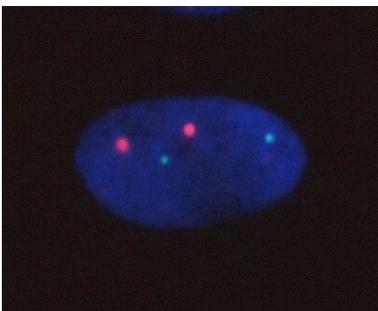


Abbildung 9:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Kerns einer diploiden Zelle mit zwei Kopien des Chromosoms 7 (Cy3[™]/rot) und zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün). Der Kern ist DAPI-gegengefärbt (blau).

3.4 Mikroskopische Quantifizierung

3.4.1 Bestimmung des Ploidiegrades

Die Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena), das mit einer 100 W Quecksilberdampflampe ausgestattet war, bei 1000-facher Vergrößerung begutachtet. Dazu wurde hauptsächlich ein Simultanfilter (Filterset 25, 400 + 495 + 570 nm Anregungswellenlängen, 460 + 530 + 625 nm Emissionswellenlängen, Zeiss, Jena), der die Wellenlängenbereiche aller drei Farbstoffe abdeckte, verwendet. Bei schwachen Signalen erfolgte die Auswertung mit den Einzelfiltern für Cy3TM (Filterset 00, 530 - 585 nm Anregungs- und > 615 nm Emissionswellenlänge, Zeiss, Jena), FITC (Filterset 09, 450 - 490 nm Anregungs- und > 515 nm Emissionswellenlänge, Zeiss, Jena) und DAPI (Filterset 01, 353 - 377 nm Anregungs- und > 397 nm Emissionswellenlänge, Zeiss, Jena).

Durch die immunzytochemische Färbung gegen Zytokeratin konnte zwischen Epithel- und Nichtepithelzellen unterschieden werden (Abbildung 10). Als Epithelzelle galt eine Zelle dann, wenn ihr Zytoplasma eindeutig mit Cy3TM angefärbt war und als Nichtepithelzelle, wenn ihr Zytoplasma nicht angefärbt war. Bei den Nichtepithelzellen handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Fibroblasten, da bei der lichtmikroskopischen Überprüfung des Zellrasens während der Zellkultivierung neben Epithelzellen am häufigsten Zellen zu sehen waren, die morphologisch Fibroblasten entsprachen.

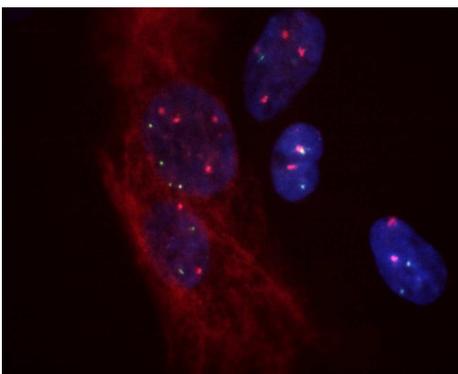


Abbildung 10:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer tetraploiden und einer diploiden Epithelzelle (linke Seite der Abbildung), einer tetraploiden und zwei diploiden Nichtepithelzellen (rechte Seite der Abbildung). Chromosom 7 ist mit Cy3TM (rot) gefärbt, Chromosom 8 mit FITC (grün) und Zytokeratin ebenfalls mit Cy3TM (rot). Die Kerne sind DAPI-gegengefärbt (blau).

Die Objektträger wurden mäanderförmig durchmustert. Es wurden sowohl von den Epithel-, als auch von den Nichtepithelzellen mindestens 200 Zellkerne betrachtet und hinsichtlich ihres Ploidiegrades charakterisiert. Dazu wurden pro Zellkern immer alle roten und grünen Signale

getrennt gezählt und in eine Tabelle eingetragen, wobei in den Spalten die Anzahl der Cy3TM-Signale (Chromosom 7) und in den Zeilen die der FITC-Signale (Chromosom 8) zu finden waren (Abbildung 11).

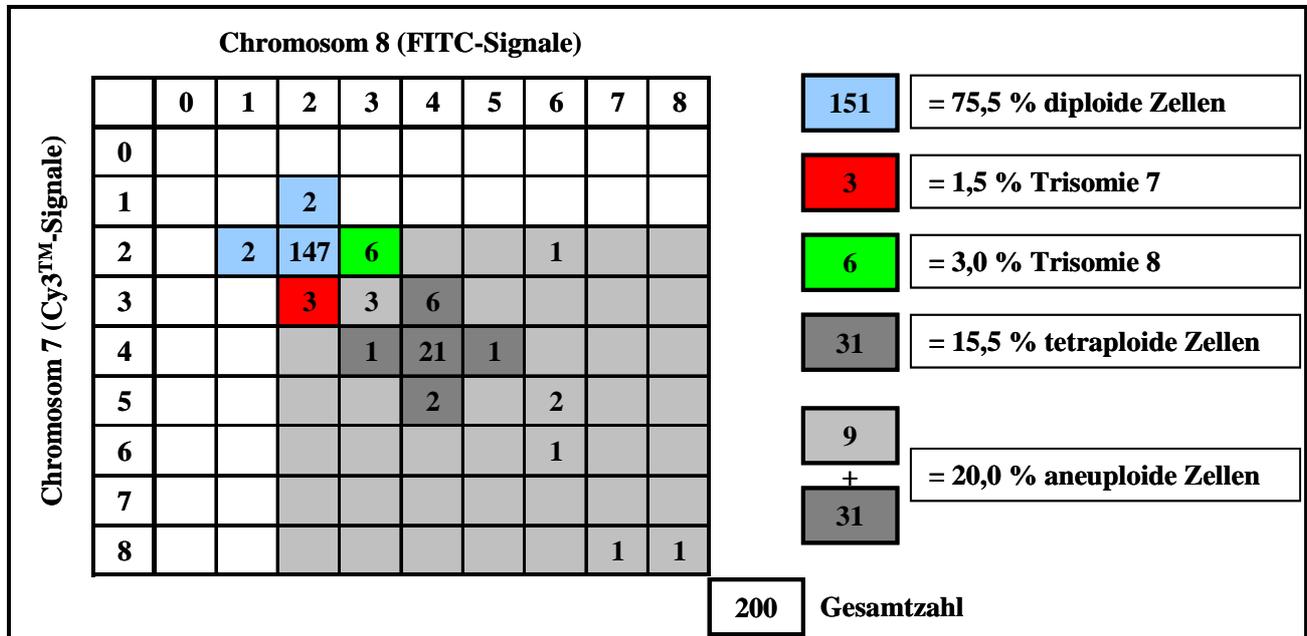


Abbildung 11:
Beispiel einer Auswertungstabelle.

Zur Bestimmung des Ploidiegrades wurden Gruppen definiert. Es galt ein Zellkern als diploid, wenn er folgende Cy3TM/FITC-Signale zeigte: 1/2, 2/1, 2/2 (in Abbildung 11 blau). Die Zellen mit einer isolierten Trisomie 7 (Cy3TM/FITC-Signale: 3/2, in Abbildung 11 rot) und einer isolierten Trisomie 8 (Cy3TM/FITC-Signale: 2/3, in Abbildung 11 grün) wurden gesondert gezählt und ausgewertet. Ein Zellkern galt als aneuploid, wenn er mehr Signale enthielt als ein Zellkern mit einer Trisomie 7 oder 8 (hell- und dunkelgraue Felder in Abbildung 11). Dabei wurden die tetraploiden Zellkerne nochmals gesondert als solche mit folgenden Cy3TM/FITC-Signalen definiert: 3/4, 4/3, 4/4, 4/5 und 5/4 (in Abbildung 11 dunkelgrau). Triploide Zellen (3/3) wurden den aneuploiden Zellen zugerechnet.

Die Häufigkeit der einzelnen Ploidiegrade wurde als Anteil der Zellkerne mit einem bestimmten Ploidiegrad an der Gesamtzahl ausgewerteter Zellkerne (minimal 200) in Prozent angegeben. Im obigen Beispiel waren 151 von 200 Zellen diploid, was einen prozentualen Anteil von 75,5 % ergab. 31 von 200 Zellen waren tetraploid, was einem Anteil 15,5 % entsprach. Insgesamt waren 40

von 200 Zellkernen aneuploid, also 20 %. Drei von 200 Zellen zeigten eine Trisomie 7 (1,5 %) und 6 von 200 Zellen eine Trisomie 8 (3 %)

3.4.2 Bestimmung der Zentrosomanzahl

Diese Auswertung erfolgte mit dem oben genannten Mikroskop in derselben Vergrößerung und mit den gleichen Filtersystemen.

Die Bestimmung der Zentrosomanzahl wurde nach Dichtenberg et al. (1998) durchgeführt: In der G0- und G1-Phase des Zellzyklus liegt das Zentrosom nur einmal in der Zelle vor. Dies wird durch die γ -Tubulin-Färbung als "Doppelpunkt", zwei direkt aneinander liegende Punkte (Abstand $< 2 \mu\text{m}$), dargestellt. Die Verdoppelung des Zentrosoms wird in der späten G1 bzw. frühen S-Phase eingeleitet. Während der S- und G2-Phase reifen die Zentrosomen weiter, dabei werden die Fluoreszenzsignale intensiver, sind jedoch weiter als zwei dicht beieinander liegende Punkte zu erkennen. In der späten G2-Phase liegen zwei reife Zentrosomen vor. Erst in der Prophase der Mitose ist das Auseinanderwandern der beiden Zentrosomen zu erkennen, dabei weichen die γ -Tubulin-Signale auseinander und sind als zwei deutlich getrennte Punkte zu sehen. Während der Mitose sind die Signale am intensivsten und werden dann, auf Grund der verstärkten Anlagerung von γ -Tubulin (Dichtenberg et al. 1998, Khodjakov und Rieder 1999), als ein heller Punkt erkannt. Zum Zeitpunkt der Metaphase sind die Zentrosomen an den Polen lokalisiert. Zum Ende der Mitose, in der Telophase, sind die beiden Zentrosomen, die dann im Anschluss auf die Tochterzellen aufgeteilt werden, wieder jeweils als "Doppelpunkt" zu erkennen (Dichtenberg et al. 1998). In Tabelle 4 sind die Zentrosomsignale bezogen auf die Zellzyklusphase dargestellt. Anschließend werden die entsprechenden Fotos gezeigt (Abbildungen 12 bis 14).

Die Objektträger wurden mäanderförmig durchmustert. Hier wurde nicht in Epithel- und Nichtepithelzellen unterschieden. Es wurde die Anzahl der Zentrosomen pro Zelle bestimmt, wobei mindestens 200 diploide und 25 tetraploide Zellen ausgewertet wurden. Diese wurden dann wiederum in Zellen mit einem regulären Zentrosom und Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen, das heißt amplifizierte Zentrosomen, unterschieden (Abbildungen 12 und 13, Abbildungen 15 und 16, sowie Abbildungen 18 bis 21).

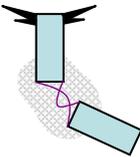
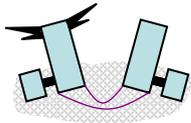
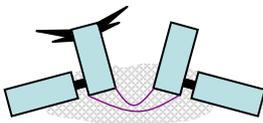
Außerdem wurde hierbei die Konfiguration der vorhandenen Mitosen beurteilt und diese in bi- und multipolare Mitosen eingeteilt. Bei einer bipolaren Mitose waren zwei Pole zu erkennen und es

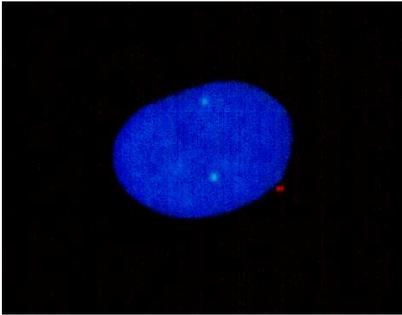
lagen genau zwei Zentrosomen vor (Abbildungen 13 und 14). Entsprechend fanden sich bei einer multipolaren Mitose mehr als zwei Pole und mehr als zwei Zentrosomen (Abbildungen 17, 18 und 22). Die multipolaren Mitosen wurden ebenfalls gezählt.

Tabelle 4:

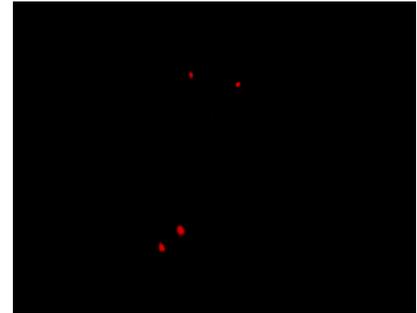
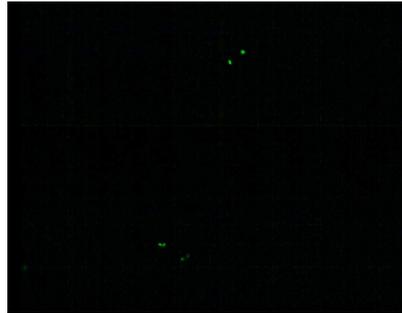
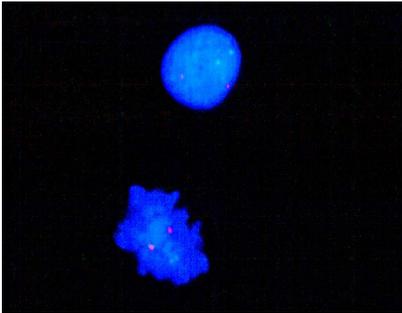
Zentrosomdarstellung (nach Nigg und Stearns 2011) und mikroskopisches Bild nach γ -Tubulin-Färbung (nach Dichtenberg et al. 1998) in den einzelnen Zellzyklusphasen.

Zellzyklus-Phasen: G1 = Gap 1; S = Synthese-Phase; G2 = Gap 2; **Mikroskopisches Bild:** Fluoreszenzsignale der γ -Tubulin-Färbung (d = Abstand der Fluoreszenzsignale voneinander).

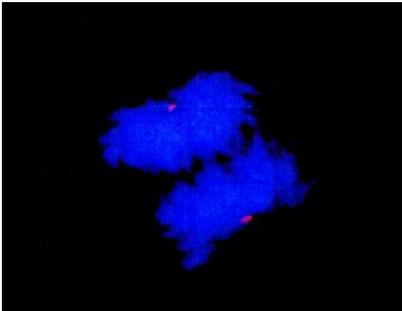
Zellzyklus- phase		Zentrosom	Mikroskopisches Bild
Interphase	G1		●● d < 2 μ m
	S		●● d < 2 μ m
	G2		●● d < 2 μ m
Mitose	Prophase		● ● d = 5 μ m
	Telophase		●● ●● d = 10 μ m

**Abbildung 12:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Interphasekerns einer diploide Zelle mit zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün) und einem Zentrosom, dargestellt als Doppelpunkt (Cy3TM/rot). Der Kern ist DAPI-gegengefärbt (blau).

**Abbildung 13:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Metaphase (unten) und einer Prophase (oben) von zwei diploiden Zellen mit zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und zwei Zentrosomen (Cy3TM/rot/rechtes Bild). Die DNA ist DAPI-gegengefärbt (blau/linkes Bild).

**Abbildung 14:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Telophase mit zwei Zentrosomen, als auseinander liegende Doppelpunkte (Cy3TM/rot) zu erkennen. Die DNA ist DAPI-gegengefärbt (blau).

3.4.3 Statistik

Nachdem die primäre Datenerfassung wie oben beschrieben erfolgt war, wurden die Einzeldaten in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft Corporation, Unterschleißheim) zur elektronischen Datenverarbeitung eingegeben. Aus den Einzeldaten der einzelnen Gruppen wurden der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes der jeweiligen Gruppe errechnet. Zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung wurde die Computersoftware SigmaStat (Version 3.0, Jandel Corporation, San Rafael) und SigmaPlot (Version 8.0, Jandel Corporation, San Rafael) herangezogen.

Für den Vergleich von drei Gruppen miteinander, wurde im Falle normalverteilter Werte und Varianzgleichheit ein One-way ANOVA-Test (ANOVA: analysis of variance) durchgeführt. Dabei wurde als Post-hoc-Test ein Holm-Sidak-Test verwendet. Im Falle nicht-normalverteilter Werte oder Fehlen der Varianzgleichheit wurde ein Rangsummentest (Kruskal-Wallis-Test) durchgeführt. Als Post-hoc-Test wurde ein Dunn-Test angewendet. Für den Vergleich von zwei Gruppen, wurde im Falle normalverteilter Werte und Varianzgleichheit ein t-Test verwendet. Ansonsten wurde ein Mann-Whitney-Rangsummen-Test durchgeführt. Unterschiede ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galten als signifikant.

3.4.4 Ausgewählte mikroskopische Aufnahmen

Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden mit einer Mikroskopkamera (MC100 Spot, Zeiss, Jena), die in den Strahlengang des Fluoreszenzmikroskops eingebracht werden konnte, Diafilme belichtet. Es erfolgte entweder eine Aufnahme im Simultanfilter oder mehrere Aufnahmen des gleichen Bereichs in den Einzelfiltern für DAPI, FITC und Cy3TM. In den folgenden Aufnahmen wird die Qualität der Färbungen deutlich.

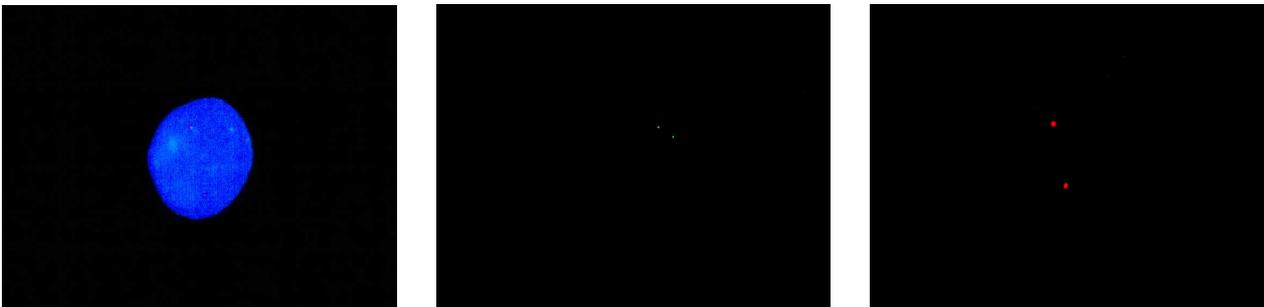
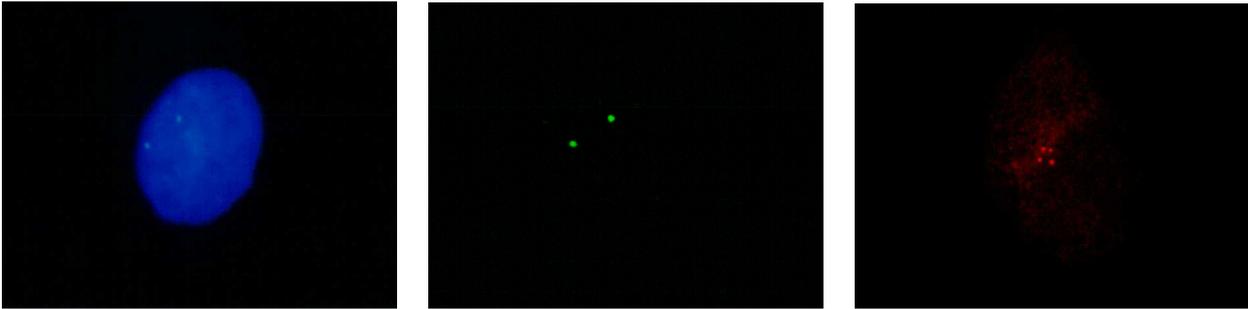
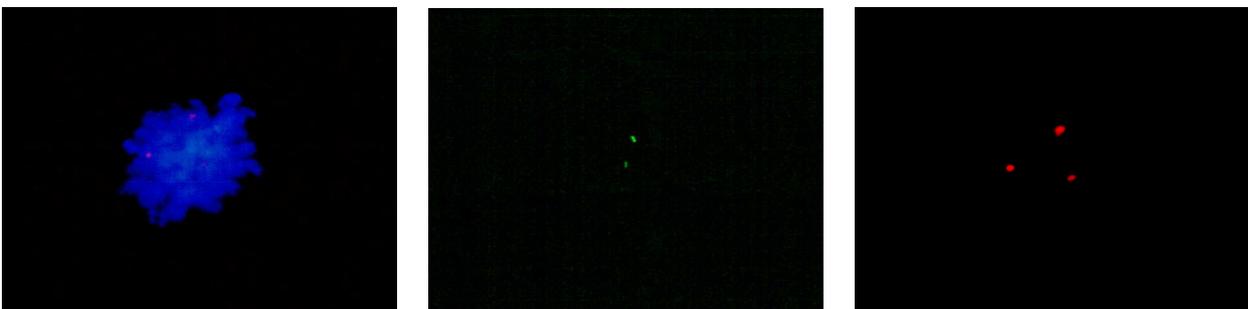


Abbildung 15:

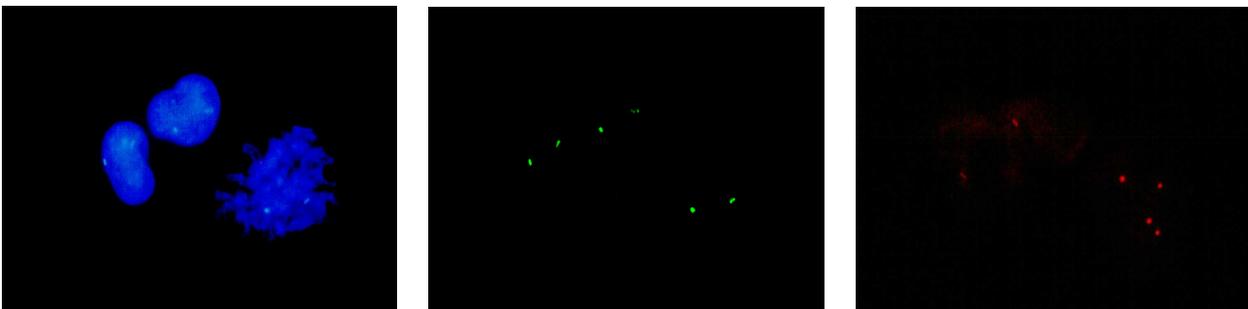
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer diploiden Zelle in der Prophase mit zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und zwei Zentrosomen (Cy3TM/rot/rechtes Bild). Der Kern ist DAPI-gegegenfärbt (blau/linkes Bild).

**Abbildung 16:**

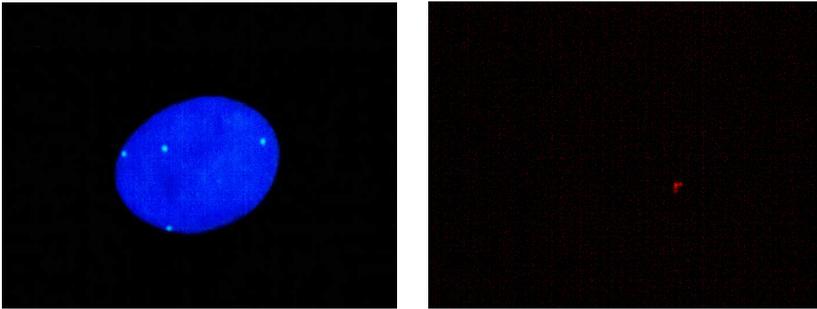
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer diploiden Zelle mit zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und amplifizierten Zentrosomen (Cy3^{TM} /rot/rechtes Bild). Der Kern ist DAPI-gegengefärbt (blau/linkes Bild).

**Abbildung 17:**

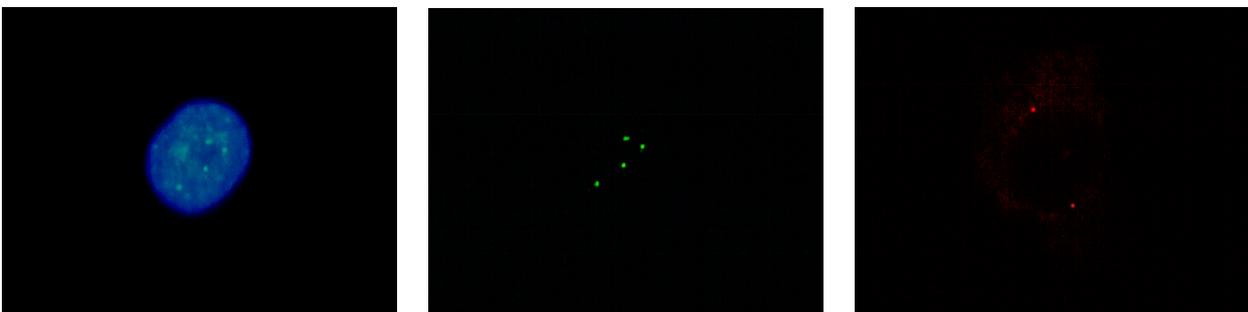
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer tripolaren Mitose mit zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und amplifizierten Zentrosomen (Cy3^{TM} /rot/rechtes Bild). Die DNA ist DAPI-gegengefärbt (blau/linkes Bild).

**Abbildung 18:**

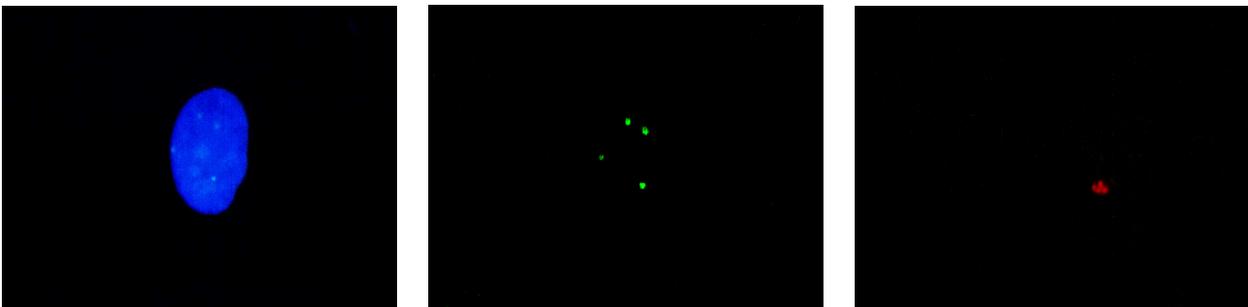
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von zwei diploiden Zellen in der Interphase mit zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und je einem Zentrosom (Cy3^{TM} /rot/rechtes Bild) (links in der Abbildung) und einer tetrapolaren Mitose mit zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und amplifizierten Zentrosomen (Cy3^{TM} /rot/rechtes Bild) (rechts in der Abbildung). Die DNA ist DAPI-gegengefärbt (blau/linkes Bild).

**Abbildung 19:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer tetraploiden Zelle in der Interphase mit vier Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/linkes Bild) und einem Zentrosom (Cy3TM/rot/rechtes Bild). Der Kern ist DAPI-gegegenfärbt (blau/linkes Bild).

**Abbildung 20:**

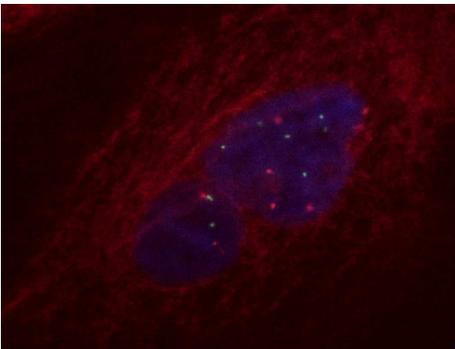
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer tetraploiden Zelle in der Prophase mit vier Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und zwei Zentrosomen (Cy3TM/rot/rechtes Bild). Der Kern ist DAPI-gegegenfärbt (blau/linkes Bild).

**Abbildung 21:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer tetraploiden Zelle mit vier Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und amplifizierten Zentrosomen (Cy3TM/rot/rechtes Bild). Der Kern ist DAPI-gegegenfärbt (blau/linkes Bild).

**Abbildung 22:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer diploiden Zelle in der Interphase mit zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und einem Zentrosomen (Cy3TM/rot/rechtes Bild) (oben in der Abbildung) und einer multipolaren Mitose mit acht Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün/mittleres Bild) und amplifizierten Zentrosomen (Cy3TM/rot/rechtes Bild) (unten in der Abbildung). Die DNA ist DAPI-gegengefärbt (blau/linkes Bild).

**Abbildung 23:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Simultanbild) einer diploiden Epithelzelle mit zwei Kopien des Chromosoms 7 (Cy3TM/rot) und zwei Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün) (links in der Abbildung) und einer hexaploiden Epithelzelle mit sechs Kopien des Chromosoms 7 (Cy3TM/rot) und sechs Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün) (rechts in der Abbildung). Das Zytokeratin ist mit Cy3TM (rot) gefärbt. Die Kerne sind DAPI-gegengefärbt (blau).

4 Ergebnisse

Bei der Analyse der Präparate fiel insbesondere auf, dass Zellen mit gleicher Chromosomenverteilung häufig entweder lokal gehäuft oder in Zellverbänden auftraten. Es zeigten dann alle Zellen dasselbe Verteilungsmuster der Signale für Chromosom 7 und 8. Es wurden sowohl Cluster mit polyploiden Zellkernen, also gleicher Anzahl an Signalen für Chromosom 7 und 8, als auch mit Zellkernen, die unterschiedlich viele Signale für die beiden Chromosomen zeigten, beobachtet. Diese Klonalität wurde vor allem bei den Epithelzellen beobachtet (Abbildungen 24 und 25).

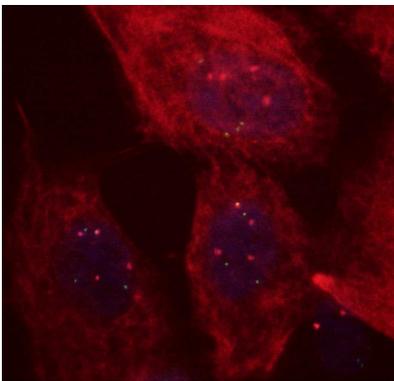


Abbildung 24:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Clusters aus drei tetraploiden Epithelzellen mit je vier Kopien des Chromosoms 7 (Cy3TM/rot) und vier Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün). Zytokeratin ist mit Cy3TM (rot) gefärbt. Die Kerne sind DAPI-gegengefärbt (blau).

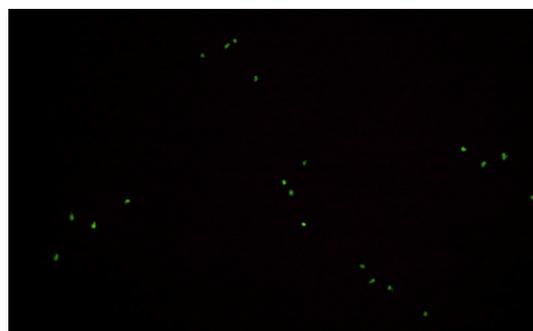
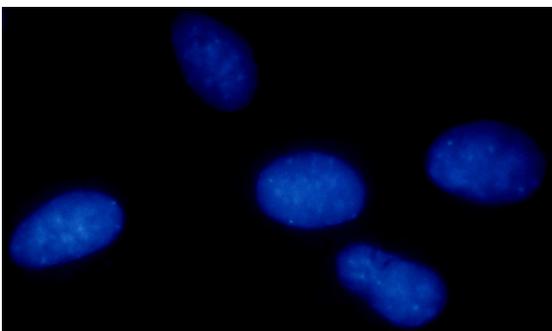


Abbildung 25:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Clusters aus fünf tetraploiden Zellen mit je vier Kopien des Chromosoms 8 (FITC/grün) (rechtes Bild). Die Kerne sind DAPI-gegengefärbt (linkes Bild).

4.1 Tetraploidie und Aneuploidie in der Zellkultur-Passage 0

4.1.1 Proben der leicht entzündlichen Bronchusgewebe

Die Zellkulturen in P0 aus leicht entzündlichem Bronchusgewebe zeigten in 6 von 15 Fällen (40,0 %) eine Rate an tetra- und aneuploiden Epithelzellen von über 5 % (Abbildung 26). Therman und Susman haben für Zellkulturen einen Tetra- und Aneuploidisierungsgrad von bis zu 5 % als Normalwert beschrieben, der für diese Studie übernommen wurde (Therman und Susman 1993).

Die maximale Anzahl an tetra- und aneuploiden Epithelzellen zeigte dabei Fall 30 mit 9,5 % tetraploiden und 11,5 % aneuploiden Epithelzellen.

Bei den Nichtepithelzellen trat eine Anzahl an tetra- und aneuploiden Zellen von über 5 % nur bei einem Fall auf (Abbildung 27). Bei Fall 13 lag die Anzahl für tetraploide Nichtepithelzellen bei 16,8 % und für die aneuploiden Nichtepithelzellen bei 18,3 %.

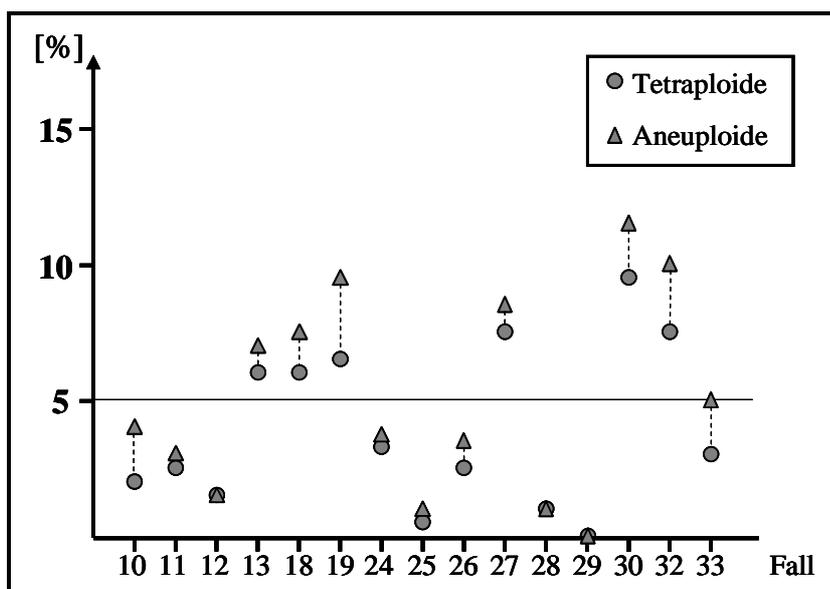


Abbildung 26:

Tetra- und aneuploide Epithelzellen in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen aus leicht entzündlichem Bronchusgewebe in Passage 0.

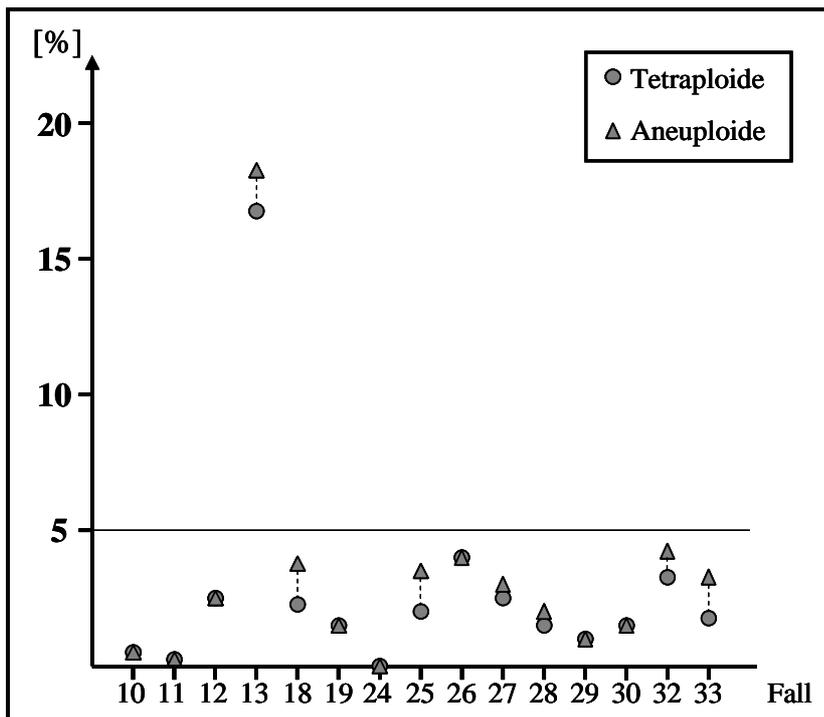


Abbildung 27:

Tetra- und aneuploide Nichtepithelzellen in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen aus leicht entzündlichem Bronchusgewebe in Passage 0.

4.1.2 Proben der stark entzündlichen Bronchusgewebe

Bei den Zellkulturen in P0 aus stark entzündlichem Bronchusgewebe lagen bei 6 von 8 Fällen (75,0 %) die Rate an tetra- und aneuploiden Epithelzellen über der 5 %-Marke mit einer maximalen Rate von 9,0 % sowohl für die tetra- als auch für die aneuploiden Epithelzellen bei den Fällen 20 und 22 (Abbildung 28). Hierbei ist besonders bemerkenswert, dass im Gegensatz zum Tumorgewebe, hier die aneuploiden Epithelzellen nahezu komplett aus tetraploiden Zellen bestanden.

Bei den Nichtepithelzellen lagen alle Werte für die tetra- und aneuploiden Zellen unter der 5 %-Schwelle (Abbildung 29).

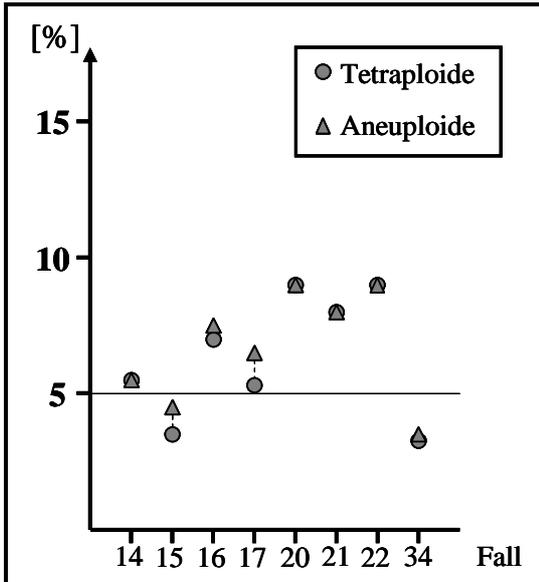


Abbildung 28:

Tetra- und aneuploide Epithelzellen in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen aus stark entzündlichem Bronchusgewebe in Passage 0.

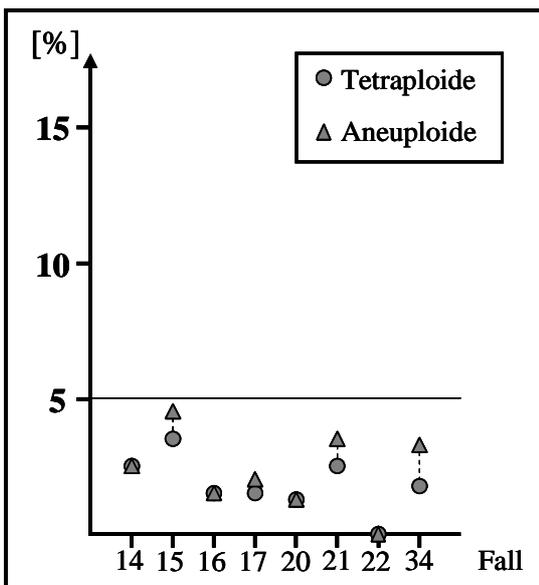


Abbildung 29:

Tetra- und aneuploide Nichtepithelzellen in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen aus stark entzündlichem Bronchusgewebe in Passage 0.

4.1.3 Proben des Tumorgewebes

Die Zellkulturen in P0, die aus dem Tumorgewebe hervorgingen, zeigten bei den Epithelzellen in 14 von 21 Fällen (66,7 %) eine Tetraploidisierungsrate von über 5 % und in 16 von 21 Fällen (76,2 %) eine Aneuploidisierungsrate von über 5 % (Abbildung 30). Insgesamt sechs Kulturen (Fälle 10, 12,

13, 15, 22 und 24) zeigten bei den Epithelzellen eine Aneuploidisierungsrate von über 40,0 % mit der höchsten Rate an aneuploiden Epithelzellen in Fall 13 (78,5 %). Die höchste Rate an tetraploiden Epithelzellen lag bei 62,0 % (Fall 13).

Nur 7 von 21 Fällen (33,3 %) zeigten eine Rate an tetraploiden und 5 von 21 Fällen (23,8 %) eine Rate an aneuploiden Epithelzellen von unter 5 %. Bei den Fällen 20 und 21 waren nicht genügend Epithelzellen angewachsen.

Bei den Nichtepithelzellen fand sich nur bei 3 von 22 Fällen (13,6 %) eine Tetra- und Aneuploidisierungsrate von über 5 % mit einer maximalen Rate an aneuploiden Nichtepithelzellen von 16,0 % bei Fall 8 (Abbildung 31). Dabei bestanden die aneuploiden Zellen hauptsächlich aus tetraploiden Zellen. Bei Fall 5 waren nicht genügend Nichtepithelzellen angewachsen.

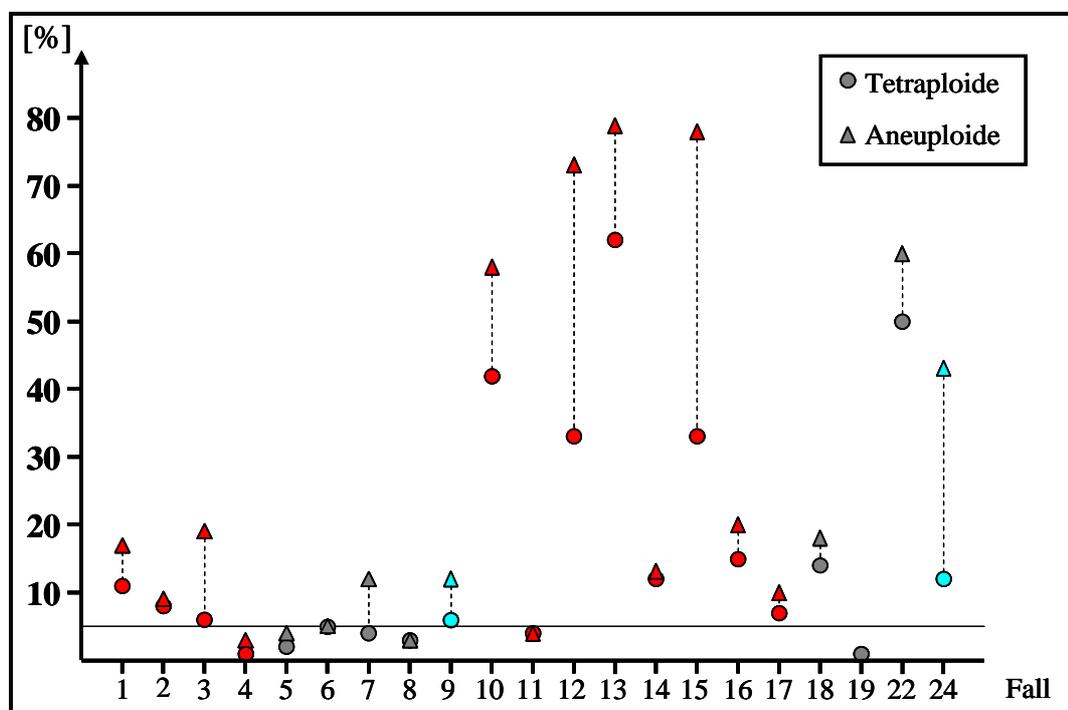


Abbildung 30:

Tetra- und aneuploide Epithelzellen in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen aus Tumorgewebe in Passage 0. Adenokarzinome rot, Plattenepithelkarzinome grau, andere blau.

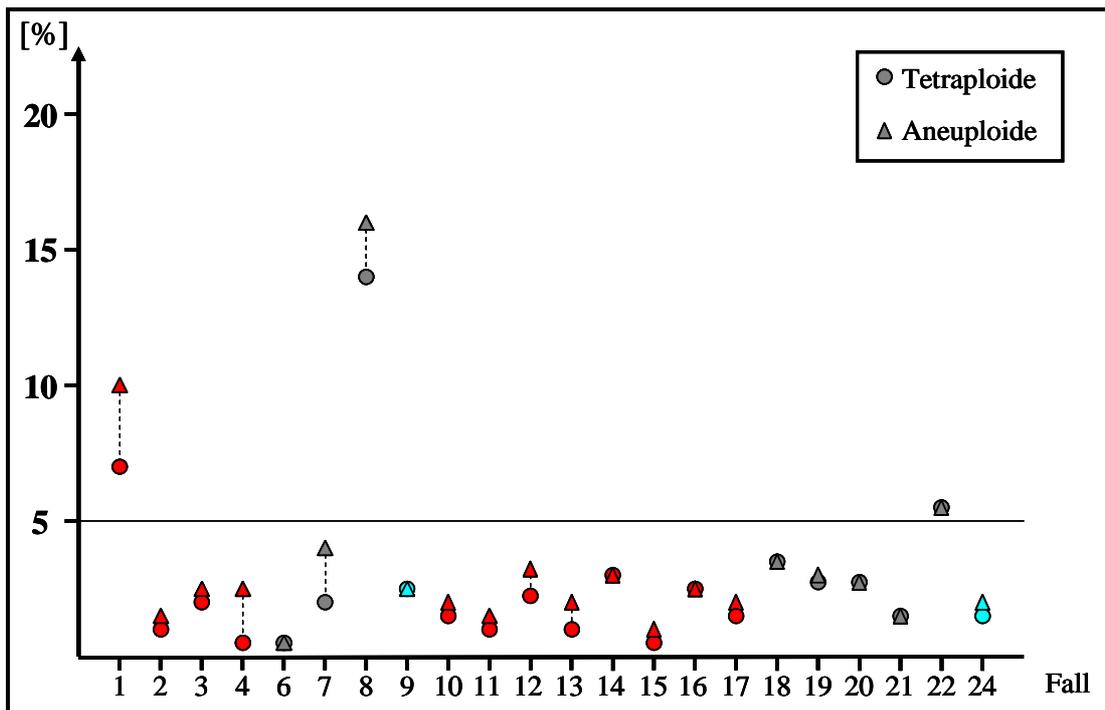


Abbildung 31:

Tetra- und aneuploide Nichtepithelzellen in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen aus Tumorgewebe in Passage 0. Adenokarzinome rot, Plattenepithelkarzinome grau, andere blau.

4.2 Tetraploidie und Aneuploidie der Gewebe in allen Zellkultur-Passagen

4.2.1 Zellkultur-Passage 0

In P0 ergab sich im leicht entzündlichen Bronchusgewebe ein Anteil an tetraploiden Epithelzellen an der Gesamtzahl aller Epithelzellen von im Mittel 4,0 %, wobei die Werte von 0,0 bis 9,5 % streuten (Abbildung 32). Es fanden sich 5,1 % aneuploide Epithelzellen (0,0 bis 11,5 %) in diesem Gewebe. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe fanden sich 6,3 % tetraploide (3,3 bis 9,0 %) und 6,7 % aneuploide Epithelzellen (3,5 bis 9,0 %). Im Tumorgewebe wurden 15,6 % tetraploide (0,5 bis 62 %) und 25,6 % aneuploide Epithelzellen (1,0 bis 78,5 %) nachgewiesen.

Also lagen die Werte für die tetra- und aneuploiden Epithelzellen im stark entzündlichen Bronchusgewebe über denen des leicht entzündlichen Gewebes und die Werte des Tumorgewebes wiederum höher als die Werte des stark entzündlichen Bronchusgewebes. Dabei war der Unterschied zwischen den tetra- und aneuploiden Epithelzellen im Tumorgewebe, verglichen mit denen im leicht entzündlichen Bronchusgewebe, signifikant.

Bei den Nichtepithelzellen im leicht entzündlichen Bronchusgewebe betrug der Anteil der tetraploiden Zellen im Mittel 2,8 % (0,0 bis 16,8 %). Der Anteil der aneuploiden Nichtepithelzellen betrug 3,3 % und reichte von 0,0 bis 18,3 %. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe lagen die Werte der tetraploiden Nichtepithelzellen bei 1,8 % (0,0 bis 3,5 %) und die der aneuploiden bei 2,3 % (0,0 bis 4,5 %). Im Tumorgewebe fanden sich im Mittel 2,7 % tetraploide Nichtepithelzellen (0,5 bis 14,0 %) und 3,4 % aneuploide Nichtepithelzellen (0,5 bis 16,0 %). Es gab hier keine signifikanten Unterschiede.

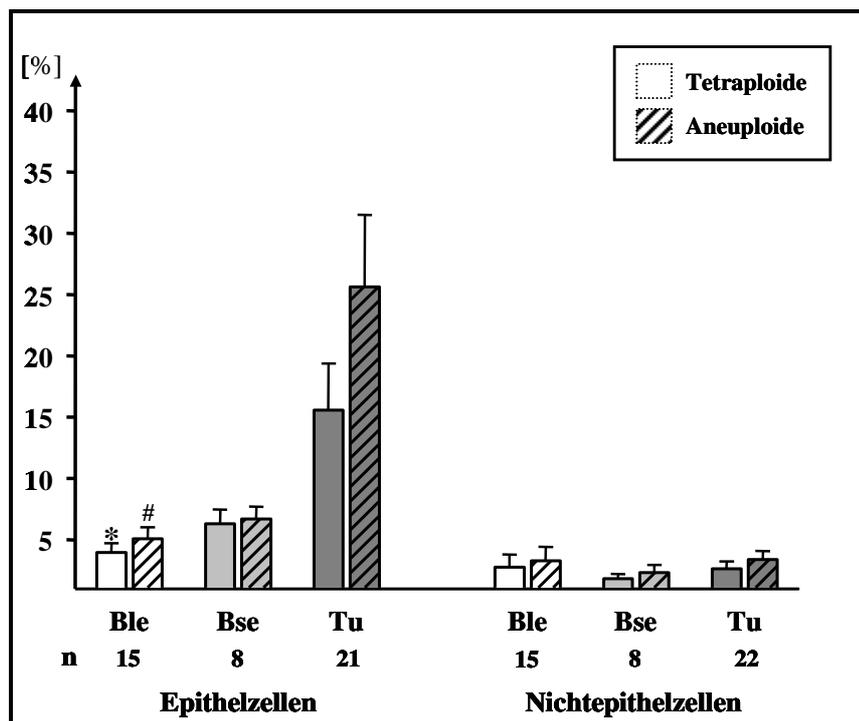


Abbildung 32:

Tetra- und aneuploide Epithel- und Nichtepithelzellen in Prozent aller Epithel- bzw. Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. * $p < 0,05$ vs. tetraploide Epithelzellen des Tumorgewebes, # $p < 0,05$ vs. aneuploide Epithelzellen des Tumorgewebes. n = Anzahl der Fälle.

4.2.2 Zellkultur-Passage 1

Im leicht entzündlichen Bronchusgewebe wurden 7,6 % tetraploide Epithelzellen (2,0 bis 12,0 %) in P1 gezählt (Abbildung 33). Für die aneuploiden Epithelzellen ergab sich hier ein Mittelwert von 8,6 % (2,0 bis 18,5 %). Im stark entzündlichen Bronchusgewebe fanden sich 6,7 % tetraploide (5,0 bis 9,0 %) und 8,1 % aneuploide Epithelzellen (5,0 bis 12,0 %). 13,2 % tetraploide Epithelzellen (1,0 bis 50,0 %) und 18,6 % aneuploide Epithelzellen (3,5 bis 67,0 %) resultierten in P1 des

Tumorgewebes. Hier lagen, im Gegensatz zu P0, nur noch die Werte für die aneuploiden Epithelzellen signifikant höher als im leicht entzündlichen Bronchusgewebe.

Bei den Nichtepithelzellen ergaben sich im leicht entzündlichen Bronchusgewebe 2,6 % tetraploide (1,0 bis 4,5 %) und 3,1 % aneuploide Nichtepithelzellen (1,5 bis 4,5 %). Im stark entzündlichen Bronchusgewebe fanden sich im Mittel 3,2 % tetraploide (0,5 bis 9,0 %) und 3,5 % aneuploide Nichtepithelzellen (1,0 bis 9,5 %). Im Tumorgewebe resultierten in dieser Passage 3,6 % tetraploide (0,0 bis 22,0 %) und 5,2 % aneuploide Nichtepithelzellen (0,0 bis 48,0 %). Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

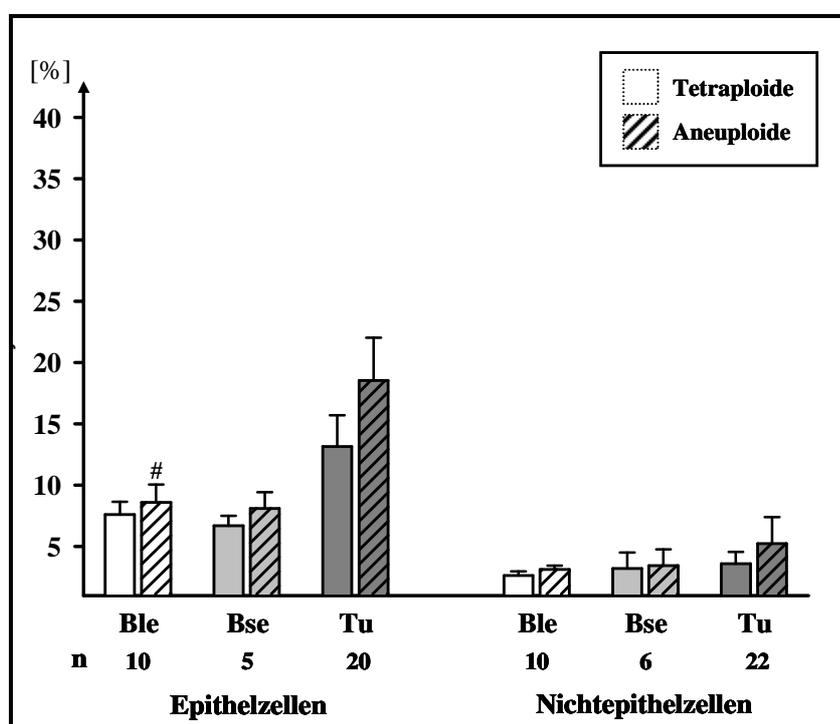


Abbildung 33:

Tetra- und aneuploide Epithel- und Nichtepithelzellen in Prozent aller Epithel- bzw. Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 1 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. #p < 0,05 vs. aneuploide Epithelzellen des Tumorgewebes. n = Anzahl der Fälle.

4.2.3 Zellkultur-Passage 2

In P2 betrug im leicht entzündlichen Bronchusgewebe der Anteil der tetraploiden Epithelzellen im Mittel 11,3 % (2,5 bis 17,0 %) und der Anteil der aneuploiden 13,2 % (2,5 bis 22,5 %) (Abbildung 34). Im stark entzündlichen Bronchusgewebe wurden 11,2 % tetraploide (7,0 bis 16,0 %) und

12,9 % aneuploide Epithelzellen (8,0 bis 17,0 %) gefunden. Im Tumorgewebe ergaben sich hier 11,4 % tetraploide (1,0 bis 46,0 %) und 14,3 % aneuploide Epithelzellen (1,5 bis 56,0 %).

Bei den Nichtepithelzellen des leicht entzündlichen Bronchusgewebes wurden in P2 2,3 % tetraploide (0,0 bis 5,2 %) und 2,6 % aneuploide Nichtepithelzellen (0,5 bis 5,3 %) gefunden. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe entsprach der Anteil der tetraploiden genau dem der aneuploiden Nichtepithelzellen und betrug 2,5 % (1,3 bis 3,5 %). Im Tumorgewebe fanden sich 3,0 % tetraploide (1,0 bis 6,5 %) und 3,2 % aneuploide Nichtepithelzellen (1,0 bis 6,5 %).

In P2 ergaben sich weder für die Epithel- noch für die Nichtepithelzellen signifikante Unterschiede.

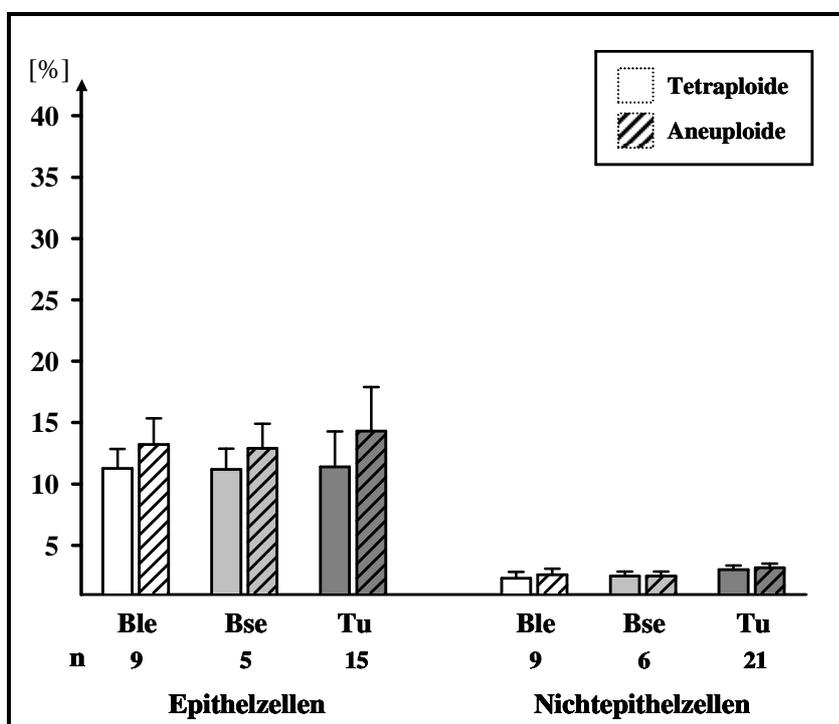


Abbildung 34:

Tetra- und aneuploide Epithel- und Nichtepithelzellen in Prozent aller Epithel- bzw. Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. n = Anzahl der Fälle.

Alle Mittelwerte der tetra- und aneuploiden Nichtepithelzellen lagen - bis auf den Wert der Aneuploiden des Tumorgewebes in P1 - unter 5 %.

Ebenso waren in allen Passagen die Mittelwerte der tetra- und aneuploiden Nichtepithelzellen aus allen drei Geweben niedriger als die der Epithelzellen.

4.2.4 Veränderungen im Verlauf der Zellkultur-Passagen

Betrachtete man die tetraploiden Epithelzellen war zu erkennen, dass die Mittelwerte im Laufe der Passagen von P0 über P1 nach P2 sowohl beim leicht, als auch beim stark entzündlichen Bronchusgewebe kontinuierlich anstiegen (Abbildung 35). Beim leicht entzündlichen Bronchusgewebe betragen die Mittelwerte für die tetraploiden Epithelzellen in P0 4,0 %, in P1 7,6 % und in P2 11,3 %. Dabei waren die Mittelwerte in P0 signifikant niedriger als in P1 und P2, und in P1 signifikant niedriger als in P2. Beim stark entzündlichen Bronchusgewebe lagen die Mittelwerte in P0 bei 6,3 %, in P1 bei 6,7 % und in P2 bei 11,2 %.

Im Gegensatz dazu fielen die Werte für die tetraploiden Epithelzellen in den Kulturen aus Tumorgewebe im Zuge der Passagen tendenziell ab, um in P2 im gleichen Bereich wie die Mittelwerte für die entzündlichen Bronchusgewebe zu liegen. Die Mittelwerte der tetraploiden Epithelzellen des Tumorgewebes lagen dabei in P0 bei 15,6 %, in P1 bei 13,2 % und in P2 bei 11,4 %.

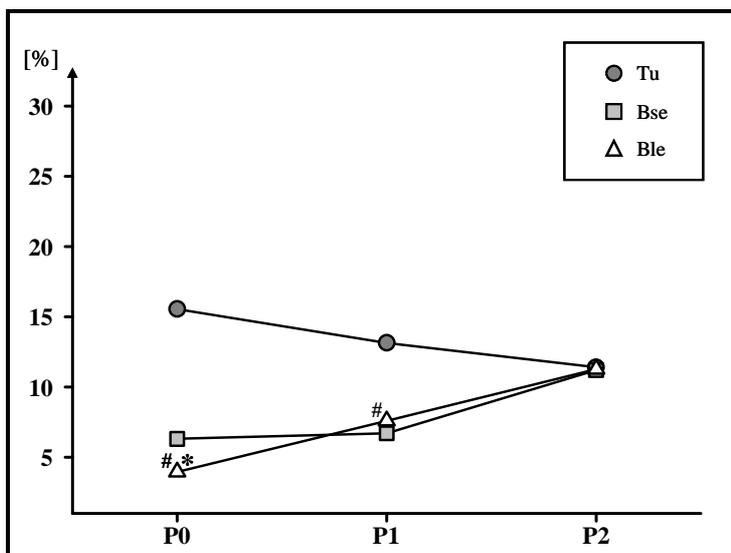


Abbildung 35:

Tetraploide Epithelzellen in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben. * $p < 0,05$ vs. P1(Ble), # $p < 0,05$ vs. P2(Ble).

Bei den aneuploiden Epithelzellen war ein ähnlicher Verlauf der Mittelwerte zu beobachten (Abbildung 36). Bei den Kulturen aus leicht und stark entzündlichem Bronchusgewebe stieg der Anteil an aneuploiden Epithelzellen im Mittel im Verlauf der Passagen kontinuierlich an. Im leicht

entzündlichen Bronchusgewebe lagen die Werte in P0 bei 5,1 %, in P1 bei 8,6 % und in P2 bei 13,2 %. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe betragen die Mittelwerte für die aneuploiden Epithelzellen in P0 6,7 %, in P1 8,1 % und in P2 12,9 %. Bei beiden entzündlichen Bronchusgeweben waren die Mittelwerte in P0 und P1 signifikant niedriger als in P2.

Beim Tumorgewebe war wiederum ein Abfall der Mittelwerte der aneuploiden Epithelzellen im Laufe der Passagen zu beobachten. Die Werte lagen in P0 bei 25,6 %, in P1 bei 18,6 % und in P2 bei 14,3 %. In P2 lagen dann die Werte sowohl für die entzündlichen Bronchusgewebe, als auch für das Tumorgewebe auf gleichem Niveau. Im Tumorgewebe war dieser Abfall bei den aneuploiden Epithelzellen stärker ausgeprägt als bei den tetraploiden Epithelzellen.

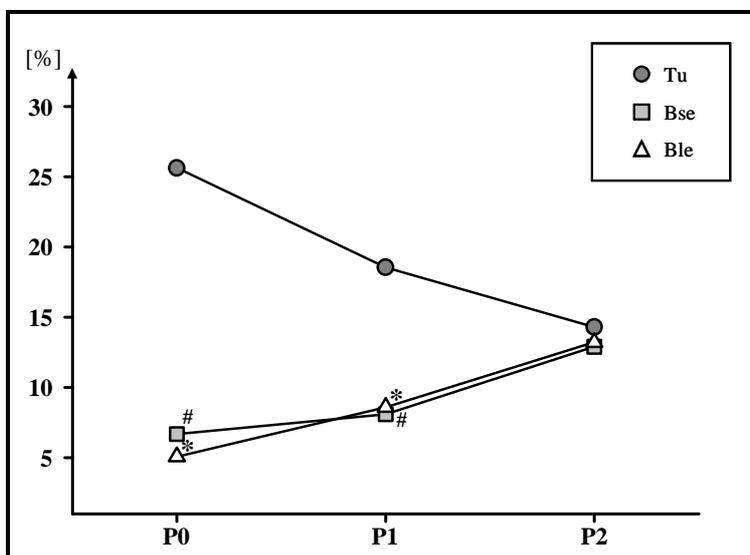


Abbildung 36:

Aneuploide Epithelzellen in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben. * $p < 0,05$ vs. P2(Ble), # $p < 0,05$ vs. P2(Bse).

Bei den Nichtepithelzellen waren im Verlauf der Passagen deutlich geringere Schwankungen der Mittelwerte zu beobachten (Abbildung 37).

Die Mittelwerte der tetraploiden Nichtepithelzellen des leicht entzündlichen Bronchusgewebes lagen im Laufe der Passagen auf ähnlichem Niveau. Die Werte betragen in P0 2,8 %, in P1 2,6 % und in P2 2,3 %. Beim stark entzündlichen Bronchusgewebe und beim Tumorgewebe stiegen die Mittelwerte für die tetraploiden Nichtepithelzellen von P0 zu P1 tendenziell leicht an, um dann in P2 wieder abzufallen. Die Werte lagen für das stark entzündliche Bronchusgewebe in P0 bei 1,8 %, in P1 bei 3,2 % und in P2 bei 2,5 %. Beim Tumorgewebe betragen die Mittelwerte in P0 2,7 %, in

P1 3,6 % und in P2 3,0 %.

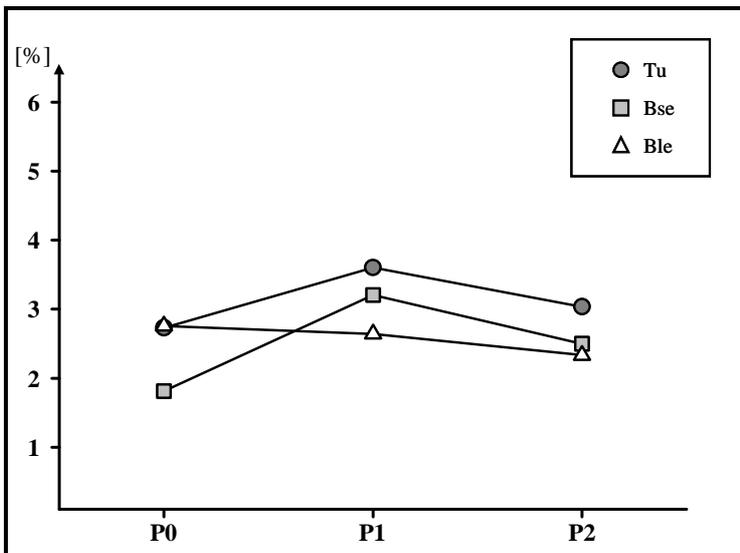


Abbildung 37:

Tetraploide Nichtepithelzellen in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben.

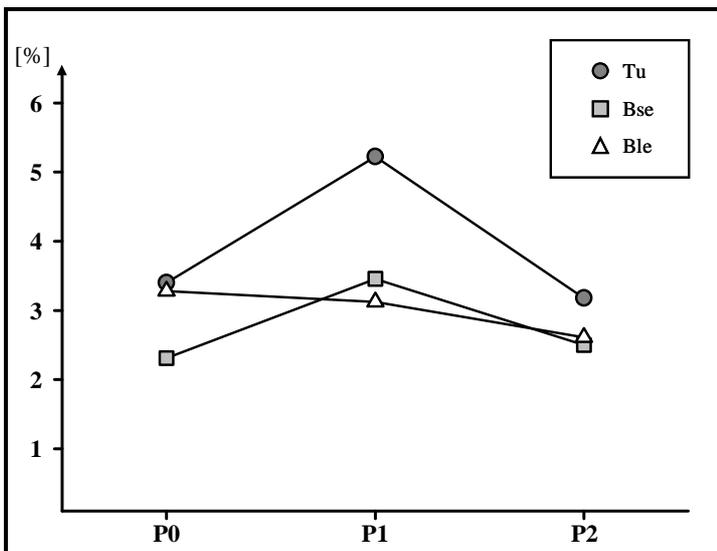


Abbildung 38:

Aneuploide Nichtepithelzellen in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben.

Bei den aneuploiden Nichtepithelzellen sah man, verglichen mit den tetraploiden Nichtepithelzellen, einen sehr ähnlichen Verlauf (Abbildung 38). Die Werte betragen für das leicht entzündliche Bronchusgewebe in P0 3,3 %, in P1 3,1 % und in P2 dann 2,6 %. Im stark entzündlichen Gewebe

fanden sich dann in P0 2,3 %, in P1 3,5 % und in P2 2,5 %. Beim Tumorgewebe lagen die Werte in P0 bei 3,4 %, in P1 bei 5,2 % und in P2 bei 3,2 %.

4.3 Tetraploidie und Aneuploidie im Adeno- und Plattenepithelkarzinom

Adeno- und Plattenepithelkarzinom sind die beiden häufigsten histologischen Entitäten des Bronchialkarzinoms (siehe Einleitung). Bisher wurden diese beiden Karzinome zusammen mit dem großzelligen Bronchialkarzinom aus therapeutischen Gründen als nichtkleinzellige Bronchialkarzinome zusammengefasst. In der jüngeren Vergangenheit gewann die Unterscheidung der Adeno- und Plattenepithelkarzinome an Interesse, da sich mittlerweile unterschiedliche Behandlungsoptionen mit Tyrosinkinaseinhibitoren oder Antikörpern ergeben haben. Im Folgenden werden die Tetra- und Aneuploidisierungsrate dieser beiden Bronchialkarzinome miteinander verglichen.

4.3.1 Zellkultur-Passage 0

Bei den Epithelzellen der Adenokarzinome lag in P0 bei 10 von 12 Fällen (83,3 %) eine Tetra- und Aneuploidisierungsrate von über 5 % vor (Abbildung 30, Seite 46). Bei den Plattenepithelkarzinomen fand sich bei 2 von 7 Fällen (28,6 %) eine Tetraploidisierungsrate und bei 4 von 7 Fällen (57,1 %) eine Aneuploidisierungsrate von über 5 %.

Betrachtet man die Mittelwerte, ergab sich bei den Adenokarzinomen in P0 bei den Epithelzellen ein Anteil von 19,4 % Tetraploiden (0,5 bis 62,0 %) und von 31,7 % Aneuploiden (2,5 bis 78,5 %) (Abbildung 39). Bei den Plattenepithelkarzinomen lagen die Mittelwerte für die tetraploiden Epithelzellen bei 11,0 % (1,0 bis 49,5 %) und für die aneuploiden bei 14,7 % (1,0 bis 60,0 %). Damit traten bei den Epithelzellen der Adenokarzinome im Mittel tendenziell mehr tetra- und aneuploide Zellkerne auf als bei den Plattenepithelkarzinomen.

Bei den Nichtepithelzellen lagen nur bei einem Fall der Adenokarzinome (Fall 1) und bei zwei Fällen der Plattenepithelkarzinome (Fälle 8 und 22) eine Tetra- und Aneuploidisierungsrate von über 5 % vor (Abbildung 31, Seite 47).

Bei den Mittelwerten ergaben sich für die Adenokarzinome 2,0 % tetraploide (0,5 bis 7,0 %) und 2,8 % aneuploide Nichtepithelzellen (1,0 bis 10,0 %) (Abbildung 39). Bei den

Plattenepithelkarzinomen ergaben sich im Mittel 4,0 % Tetraploide (0,5 bis 14,0 %) und 4,6 % Aneuploide (0,5 bis 16,0 %). Signifikante Unterschiede ergaben sich hier nicht.

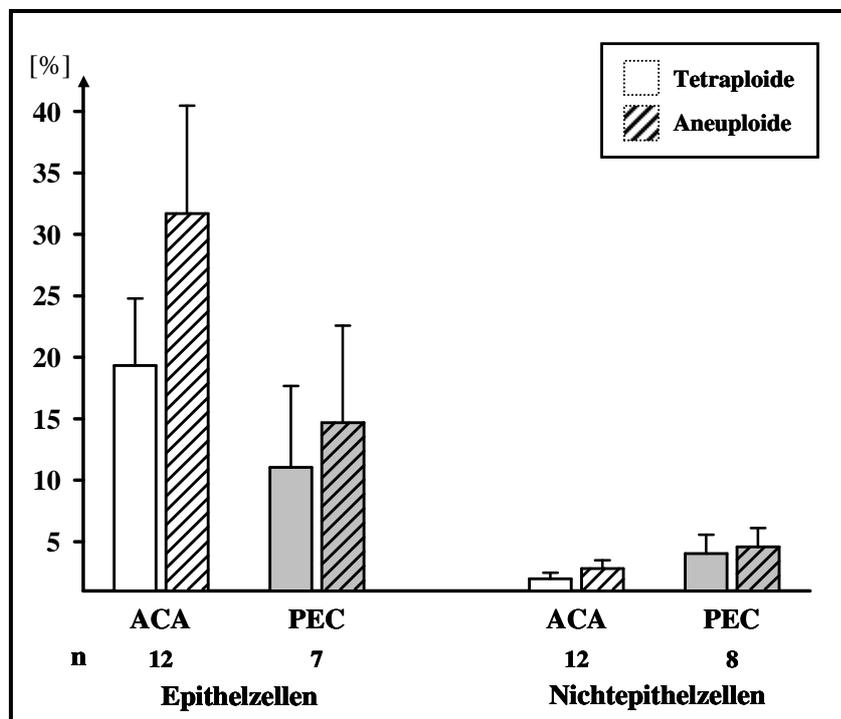


Abbildung 39:

Tetra- und aneuploide Epithel- und Nichtepithelzellen in Prozent aller Epithel- bzw. Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 aus Adenokarzinomen (ACA) und Plattenepithelkarzinomen (PEC). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. n = Anzahl der Fälle.

4.3.2 Zellkultur-Passage 1

In P1 lag bei den Adenokarzinomen der Anteil an tetraploiden Epithelzellen im Mittel bei 11,5 % (1,0 bis 50,0 %) und an aneuploiden Epithelzellen bei 15,9 % (3,5 bis 67,0 %) (Abbildung 40). Bei den Plattenepithelkarzinomen betragen die Werte für die tetraploiden Epithelzellen 15,9 % (4,0 bis 32,0 %) und für die aneuploiden 18,9 % (4,0 bis 34,0 %). In P1 fanden sich tendenziell mehr tetra- und aneuploide Epithelzellen bei den Plattenepithelkarzinomen als bei den Adenokarzinomen.

Bei den Nichtepithelzellen fanden sich bei den Adenokarzinomen 4,4 % Tetraploide (0,0 bis 22,0 %) und 7,1 % Aneuploide (0,5 bis 48,0 %). Bei den Plattenepithelkarzinomen waren es 2,4 % tetraploide (0,0 bis 4,0 %) und 2,9 % aneuploide Nichtepithelzellen (0,0 bis 4,8 %). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

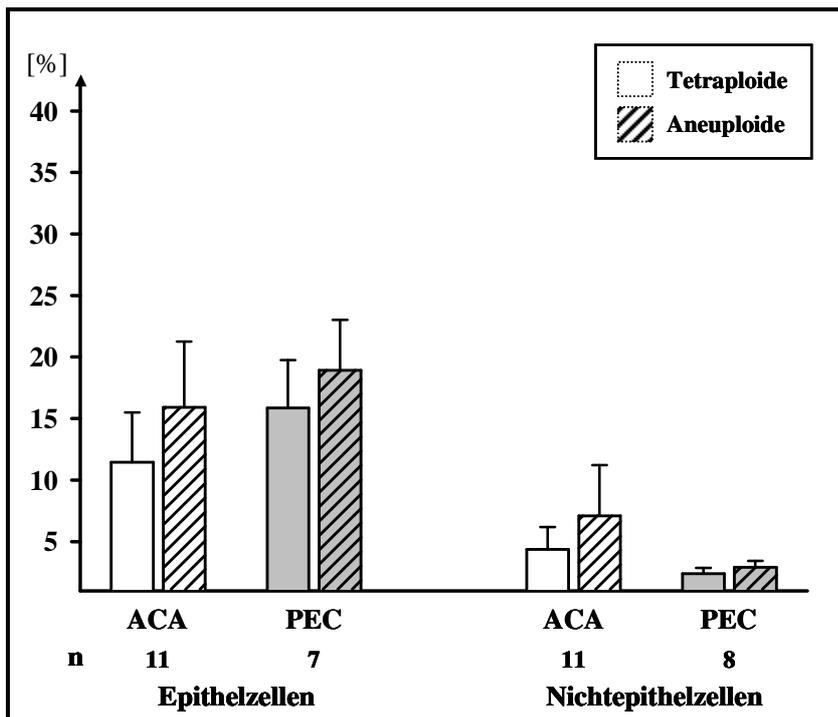


Abbildung 40:

Tetra- und aneuploide Epithel- und Nichtepithelzellen in Prozent aller Epithel- bzw. Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 1 aus Adenokarzinomen (ACA) und Plattenepithelkarzinomen (PEC). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. n = Anzahl der Fälle.

4.3.3 Zellkultur-Passage 2

In der zweiten Passage fanden sich bei den Adenokarzinomen im Mittel 14,2 % tetraploide Epithelzellen (4,5 bis 46,0 %) und 17,8 % aneuploide Epithelzellen (5,5 bis 56,0 %) (Abbildung 41). Bei den Plattenepithelkarzinomen waren es 8,9 % tetra- (1,0 bis 22,0 %) und 11,5 % aneuploide Zellkerne (1,5 bis 28,0 %).

Bei den Nichtepithelzellen fanden sich bei den Adenokarzinomen 3,8 % Tetraploide (1,8 bis 6,5 %) und 3,9 % Aneuploide (1,8 bis 6,5 %). Bei den Plattenepithelkarzinomen lag der Anteil der Tetraploiden bei 2,6 % (1,0 bis 4,0 %) und der der Aneuploiden bei 2,7 % (1,0 bis 4,3 %). Signifikante Unterschiede hatten sich auch in P2 nicht ergeben.

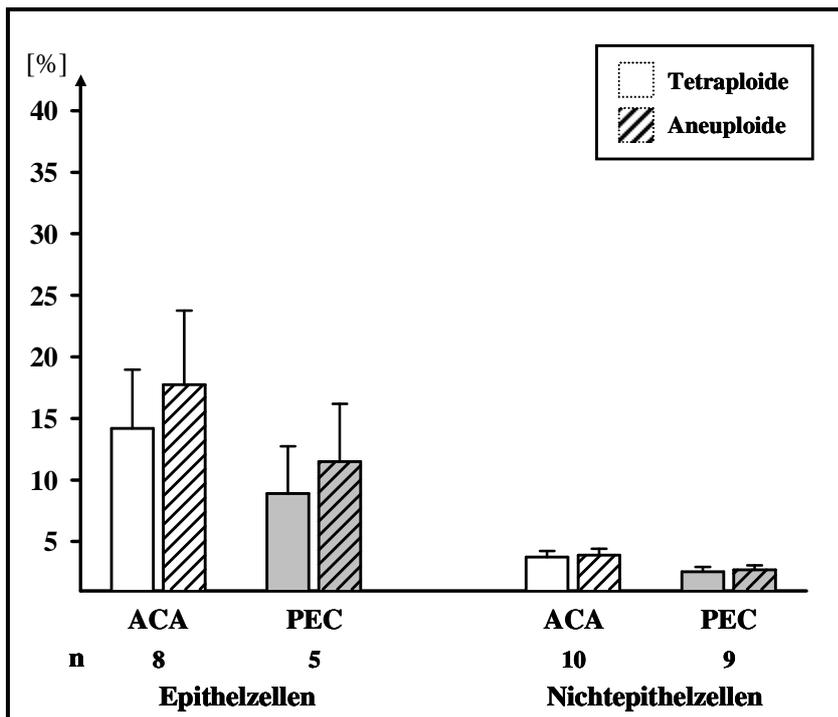


Abbildung 41:

Tetra- und aneuploide Epithel- und Nichtepithelzellen in Prozent aller Epithel- bzw. Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 2 aus Adenokarzinomen (ACA) und Plattenepithelkarzinomen (PEC). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. n = Anzahl der Fälle.

Insgesamt lagen die Werte für die tetra- und aneuploiden Nichtepithelzellen unter dem von Therman und Susman für Zellkulturen beschriebenen Normalwert von bis zu 5 %, außer bei den aneuploiden Nichtepithelzellen des Adenokarzinoms in P1 (Therman und Susman 1993). Der für Nichtepithelzellen relativ hohe Mittelwert in P1 des Adenokarzinoms ergab sich durch eine hohe Anzahl an Aneuploiden bei Fall 12 von 48,0 %, auch die Tetraploiden waren bei diesem Fall sehr hoch (22,0 %). Weiterhin ist bemerkenswert, dass bei den Plattenepithelkarzinomen Fall 8 in P0 mit hohen Werten für die tetra- und aneuploiden Nichtepithelzellen von 14,0 % bzw. 16,0 % auffiel. Diese hohen Zahlen waren in den folgenden Passagen nicht mehr detektierbar.

4.3.4 Veränderungen im Verlauf der Zellkultur-Passagen

Der Anteil der tetra- und aneuploiden Epithelzellen fiel bei den Adenokarzinomen von P0 nach P1 tendenziell ab, wobei sich der Anteil der Aneuploiden sogar annähernd halbierte (Abbildungen 42 und 43). In der weiteren Passage blieben die Werte dann stabil und änderten sich nur wenig.

Bei den Plattenepithelkarzinomen stieg der Anteil an tetra- und aneuploiden Epithelzellen von P0 zu

P1 zunächst tendenziell an, um dann in P2 unter das Niveau von P0 zu fallen. Dabei hatte sich der Anteil an Tetra- und Aneuploiden von P1 nach P2 halbiert. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Passagen.

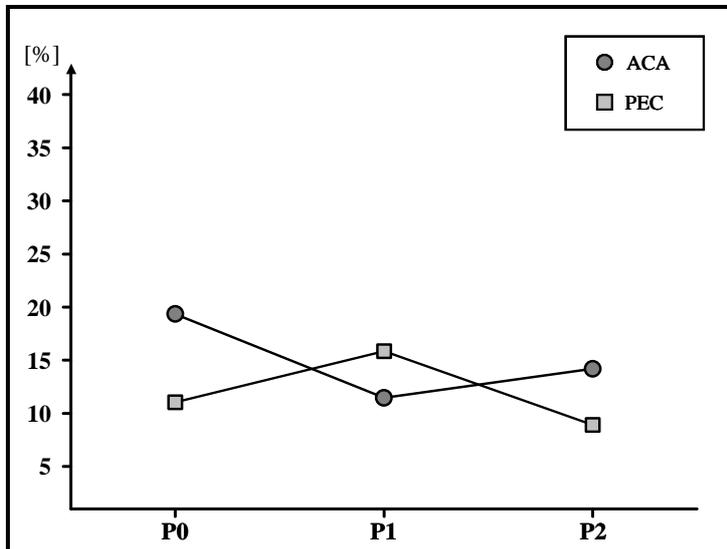


Abbildung 42:

Tetraploide Epithelzellen in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus Adenokarzinomen (ACA) und Plattenepithelkarzinomen (PEC). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben.

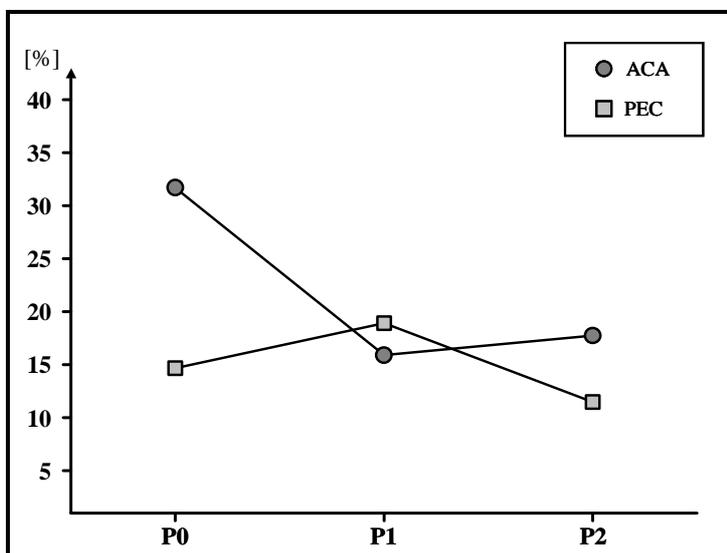


Abbildung 43:

Aneuploide Epithelzellen in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus Adenokarzinomen (ACA) und Plattenepithelkarzinomen (PEC). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben.

Bei den Nichtepithelzellen stiegen die Tetra- und Aneuploiden beim Adenokarzinom von P0 zu P1 tendenziell an (Abbildungen 44 und 45). Die tetraploiden Nichtepithelzellen blieben dann von P1 nach P2 auf ähnlichem Niveau. Dabei lagen die Werte von P0 signifikant tiefer als die von P2. Die aneuploiden Nichtepithelzellen des Adenokarzinoms fielen von P1 nach P2 tendenziell ab.

Bei den Plattenepithelkarzinomen fielen die Werte für die tetra- und aneuploiden Nichtepithelzellen von P0 nach P1 tendenziell ab und blieben dann von P1 nach P2 auf ähnlichem Niveau.

Insgesamt zeigte sich bei Adeno- und Plattenepithelkarzinomen ein umgekehrter Verlauf der zeitlichen Entwicklung von tetra- und aneuploiden Zellen innerhalb der Epithel- und Nichtepithelzellen: Bei den Adenokarzinomen fielen die tetra- und aneuploiden Epithelzellen von P0 nach P1 ab und blieben dann zu P2 auf ähnlichem Niveau, wohingegen die tetra- und aneuploiden Epithelzellen der Plattenepithelkarzinome von P0 nach P1 anstiegen und nach P2 wieder abfielen. Bei den Nichtepithelzellen stiegen die tetra- und aneuploiden Zellen bei den Adenokarzinomen von P0 nach P1 an. Die tetraploiden Nichtepithelzellen blieben dann in P2 auf ähnlichem Niveau und die aneuploiden fielen nach P2 wieder ab. Im Gegensatz dazu fielen die tetra- und aneuploiden Nichtepithelzellen bei den Plattenepithelkarzinomen von P0 nach P1 ab und blieben dann in P2 auf ähnlichem Niveau.

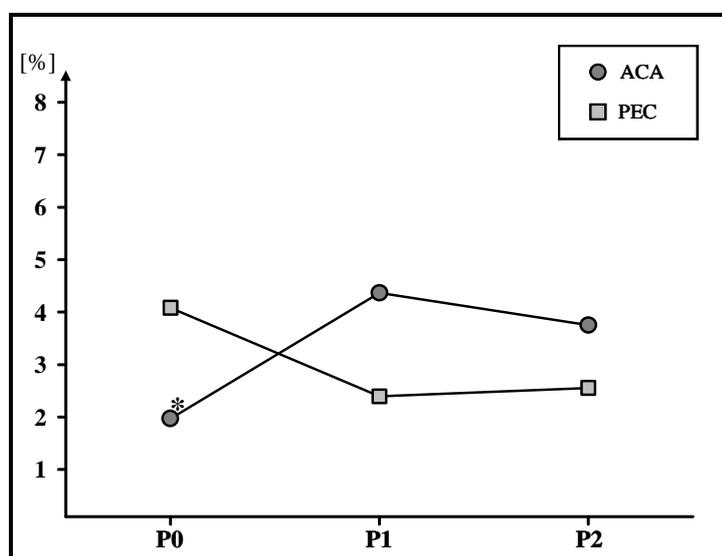


Abbildung 44:

Tetraploide Nichtepithelzellen in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus Adenokarzinomen (ACA) und Plattenepithelkarzinomen (PEC). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben. * $p < 0,05$ vs. P2(ACA).

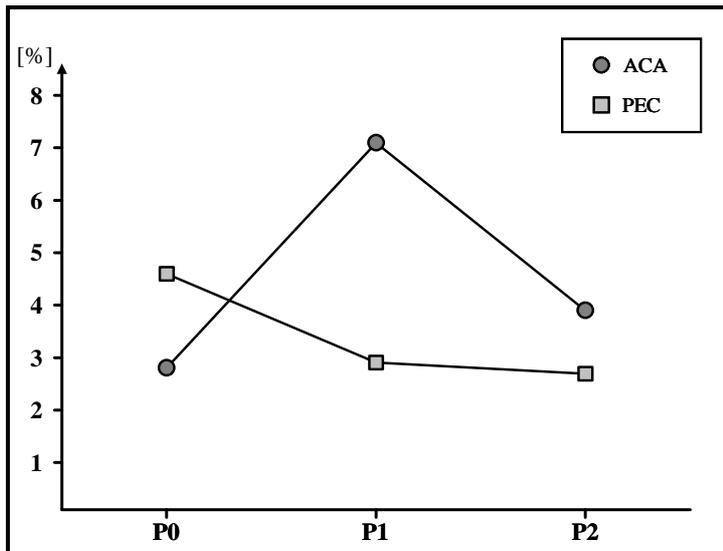


Abbildung 45:

Aneuploide Nichtepithelzellen in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus Adenokarzinomen (ACA) und Plattenepithelkarzinomen (PEC). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben.

4.4 Trisomie 7 und Trisomie 8

Insbesondere die Trisomie 7 wurde häufig als genetisches Merkmal von Bronchialkarzinomen und prämaligem Bronchialgewebe beschrieben (siehe Einleitung). Eine Polysomie von Chromosom 8 wurde deutlich seltener in Zusammenhang mit dem Bronchialkarzinom gebracht. Die Zählung des Chromosoms 8 war in der vorliegenden Studie unter anderem zur Absicherung der korrekten Bestimmung des Ploidiegrades wichtig.

4.4.1 Zellkultur-Passage 0

Die Zellkulturen in P0 aus leicht entzündlichem Bronchusgewebe zeigten in 5 von 15 Fällen (33,3 %) eine Rate an Epithelzellen mit einer Trisomie 7 von über 2 % (Abbildung 46). Der Grenzwert von 2 % wurde aus der Untersuchung von Crowell et al. übernommen, die diesen Wert für Zellen mit einer Trisomie 7 als signifikant erhöht im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe beschrieben (Crowell et al. 1996). Bei den Nichtepithelzellen lag in P0 bei 4 von 15 Fällen (26,7 %) eine Trisomie 7-Rate von über 2 % vor (Abbildung 47).

Für die Trisomie 8 lässt sich kein Grenzwert aus der Literatur angeben. In den Zellkulturen in P0 des leicht entzündlichen Bronchusgewebes lag bei keinem Fall, weder bei den Epithel-, noch bei den Nichtepithelzellen, eine Rate an Zellen mit einer Trisomie 8 von über 2 % vor.

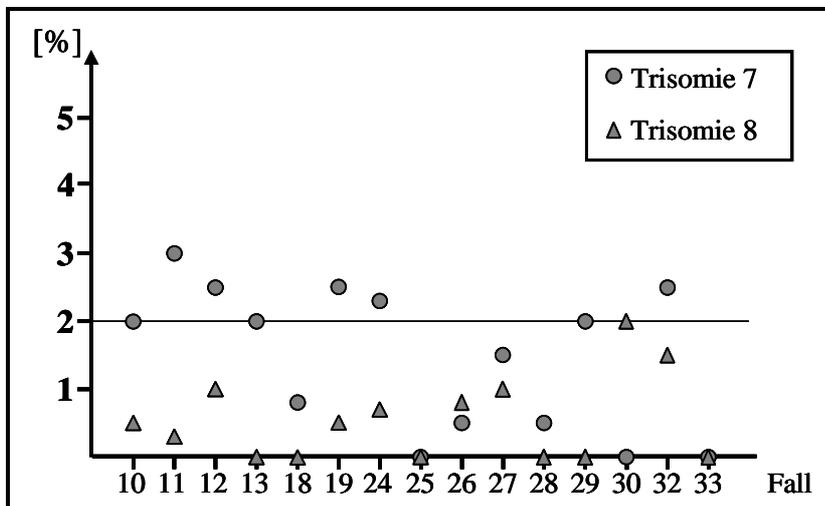


Abbildung 46:

Epithelzellen mit einer Trisomie 7 oder Trisomie 8 in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen aus leicht entzündlichem Bronchusgewebe in Passage 0.

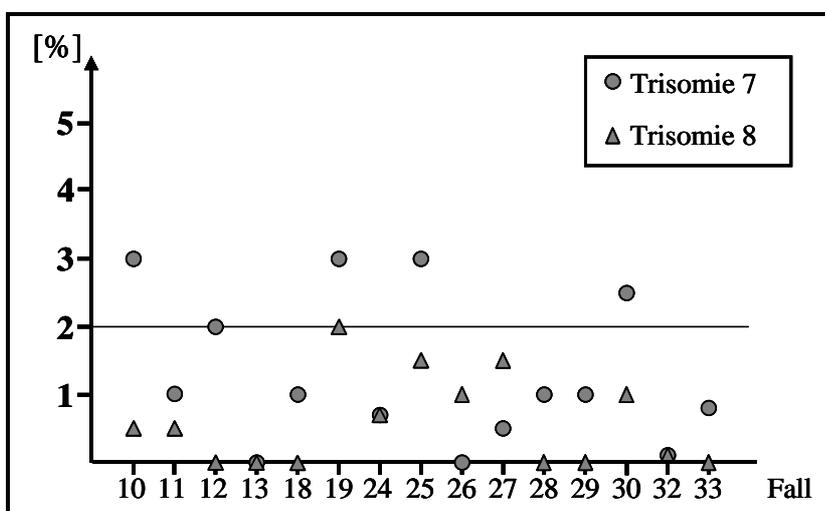


Abbildung 47:

Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 oder Trisomie 8 in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen aus leicht entzündlichem Bronchusgewebe in Passage 0.

Bei den Zellkulturen in P0 aus dem stark entzündlichen Bronchusgewebe fand sich bei den Epithelzellen bei 1 von 8 Fällen (12,5 %) eine Trisomie 7-Rate von über 2 % und bei den Nichtepithelzellen in 2 von 8 Fällen (25,0 %) (Abbildungen 48 und 49). Auch hier lag bei keinem

Fall eine Rate an Zellen mit einer Trisomie 8 von über 2 % vor, weder bei den Epithel- noch bei den Nichtepithelzellen.

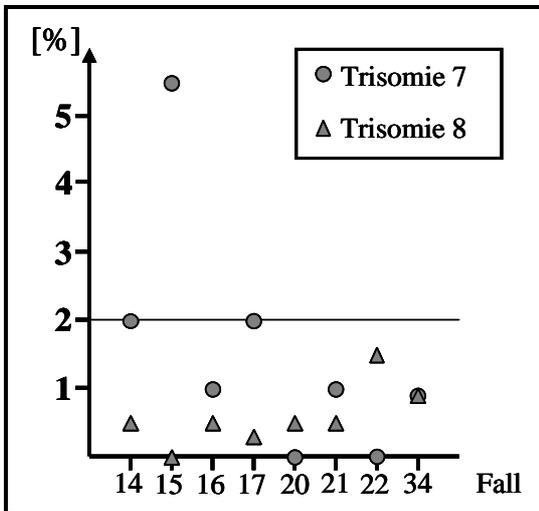


Abbildung 48:

Epithelzellen mit einer Trisomie 7 oder Trisomie 8 in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen aus stark entzündlichem Bronchusgewebe in Passage 0.

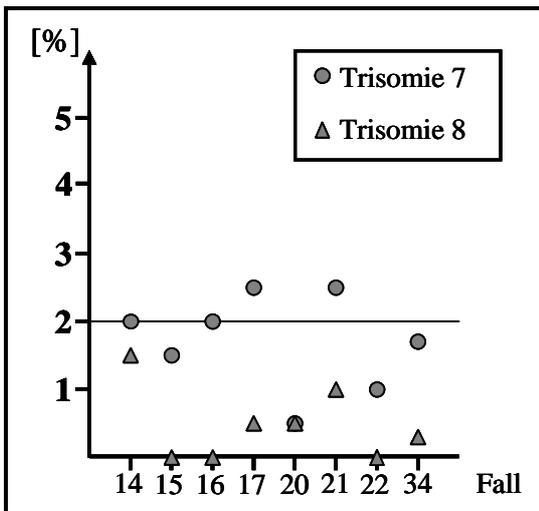


Abbildung 49:

Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 oder Trisomie 8 in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen aus stark entzündlichem Bronchusgewebe in Passage 0.

Bei den Zellkulturen in P0 aus Tumorgewebe fanden sich bei 8 von 21 Fällen (38,1 %) Epithelzellen mit einer Trisomie 7-Rate von über 2 % und bei den Nichtepithelzellen bei 6 von 22 Fällen (27,3 %) (Abbildungen 50 und 51). Eine Trisomie 8-Rate von über 2 % fand sich bei den Epithelzellen bei 6 von 21 Fällen (28,6 %) und bei den Nichtepithelzellen bei 1 von 22 Fällen (4,5 %).

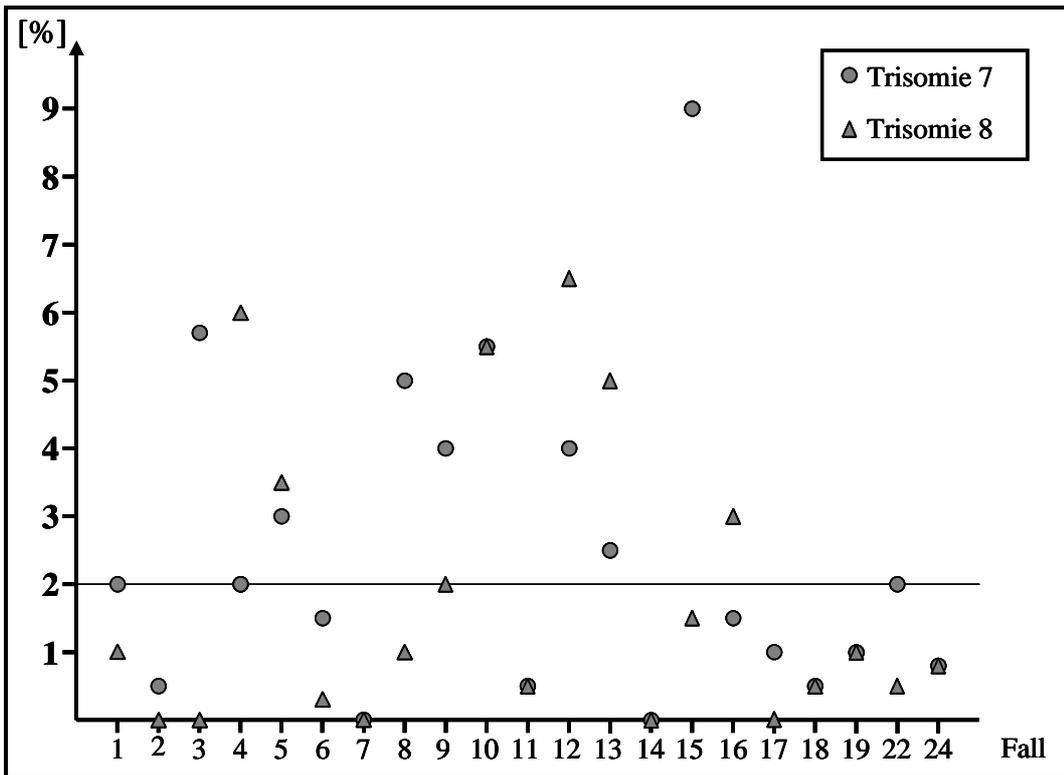


Abbildung 50: Epithelzellen mit einer Trisomie 7 oder Trisomie 8 in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen aus Tumorgewebe in Passage 0.

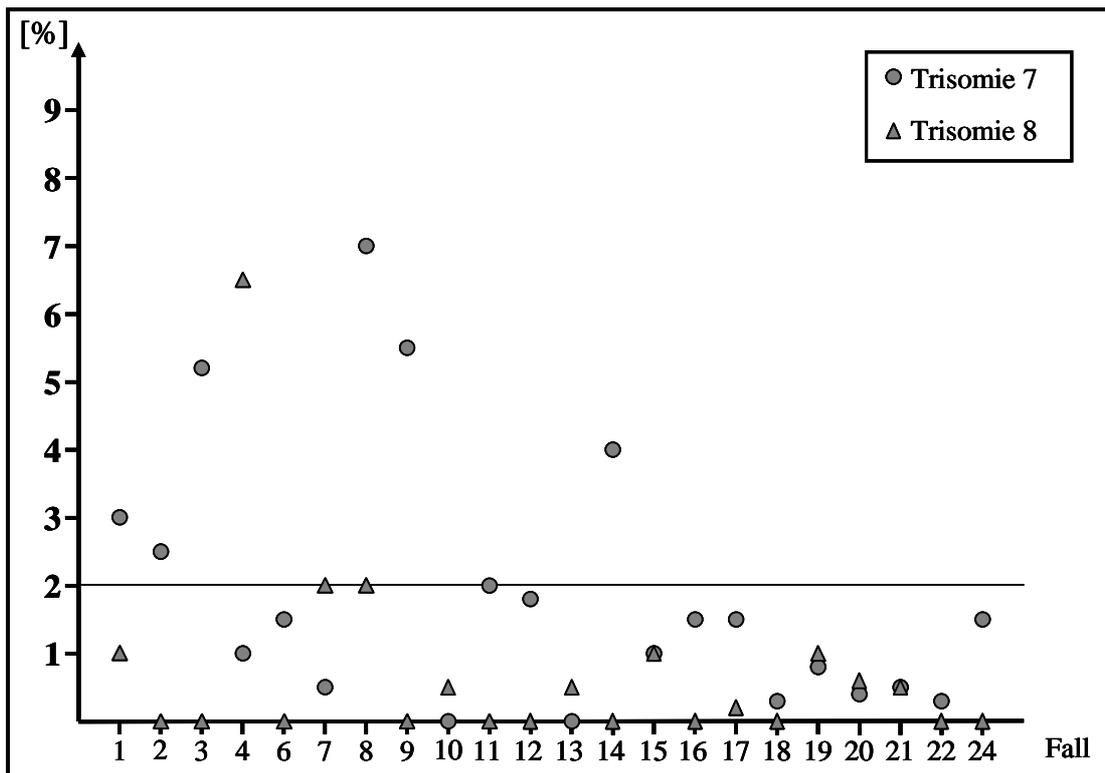


Abbildung 51:

Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 oder Trisomie 8 in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen aus Tumorgewebe in Passage 0.

Betrachtet man die Mittelwerte, betrug in P0 im leicht entzündlichen Bronchusgewebe der Anteil an Epithelzellen mit einer Trisomie 7 im Mittel 1,5 % (0,0 bis 3,0 %) und der Anteil an Epithelzellen mit einer Trisomie 8 0,5 % (0,0 bis 2,0 %) (Abbildung 52). Im stark entzündlichen Bronchusgewebe ergab sich ein Anteil an Epithelzellen mit einer Trisomie 7 von 1,5 % (0,0 bis 5,5 %) und ein Anteil mit einer Trisomie 8 von 0,6 % (0,0 bis 1,5 %). Im Tumorgewebe fanden sich im Mittel 2,5 % Epithelzellen (0,0 bis 9,0 %) mit einer Trisomie 7 und 1,8 % (0,0 bis 6,5 %) mit einer Trisomie 8.

Bei den Nichtepithelzellen fand sich in P0 im leicht entzündlichen Bronchusgewebe bei 1,3 % (0,0 bis 3,0 %) eine Trisomie 7 und bei 0,6 % (0,0 bis 2,0 %) eine Trisomie 8. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe ergaben sich 1,7 % Nichtepithelzellen (0,5 bis 2,5 %) mit einer Trisomie 7 und 0,5 % (0,0 bis 1,5 %) mit einer Trisomie 8. Im Tumorgewebe wiesen 1,9 % (0,0 bis 7,0 %) der Nichtepithelzellen eine Trisomie 7 und 0,7 % (0,0 bis 6,5 %) eine Trisomie 8 auf.

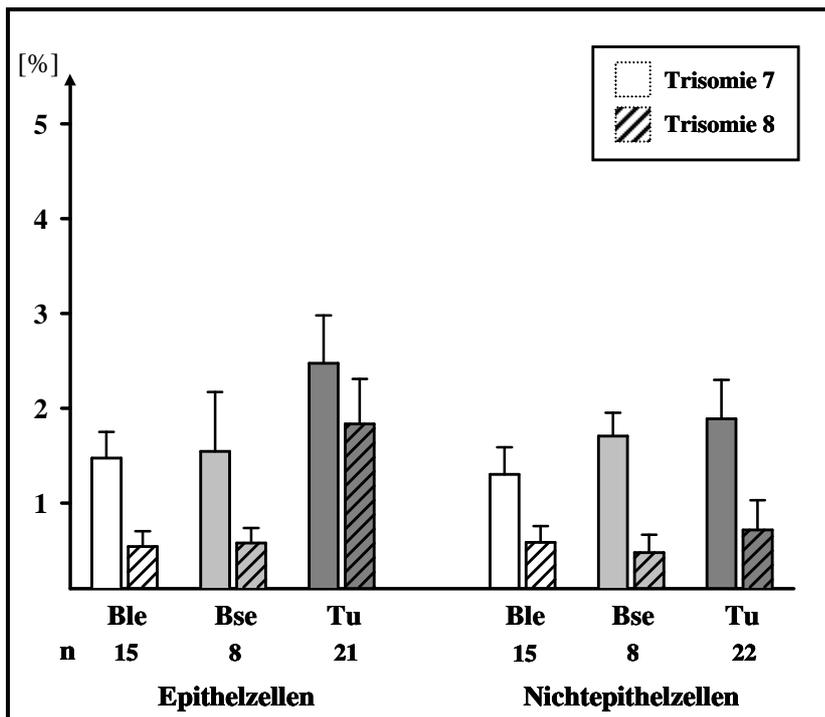


Abbildung 52:

Epithel- und Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 oder 8 in Prozent aller Epithel- bzw. Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. n = Anzahl der Fälle.

4.4.2 Zellkultur-Passage 1

Bei den Epithelzellen des leicht entzündlichen Bronchusgewebes wurden in P1 im Mittel bei 1,3 % (0,0 bis 4,0 %) der Epithelzellen eine Trisomie 7 und bei 0,7 % (0,0 bis 2,0 %) eine Trisomie 8 gefunden (Abbildung 53). Bei 2,7 % (1,0 bis 7,5 %) der Epithelzellen trat im stark entzündlichen Bronchusgewebe eine Trisomie 7 und bei 0,7 % (0,0 bis 1,0 %) eine Trisomie 8 auf. Im Tumorgewebe ergab sich bei 1,4 % (0,0 bis 7,0 %) der Epithelzellen eine Trisomie 7 und bei 2,0 % (0,0 bis 8,0 %) eine Trisomie 8.

In P1 wurden im leicht entzündlichen Bronchusgewebe 0,7 % Nichtepithelzellen (0,0 bis 2,0 %) mit einer Trisomie 7 und 0,5 % Nichtepithelzellen (0,0 bis 4,0 %) mit einer Trisomie 8 gezählt. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe wurden 1,2 % Nichtepithelzellen (0,8 bis 2,0 %) mit einer Trisomie 7 und 0,1 % (0,0 bis 0,3 %) mit einer Trisomie 8 festgestellt. Im Tumorgewebe wurden 1,0 % Nichtepithelzellen (0,0 bis 4,0 %) mit einer Trisomie 7 und 0,7 % (0,0 bis 5,0 %) mit einer Trisomie 8 gefunden.

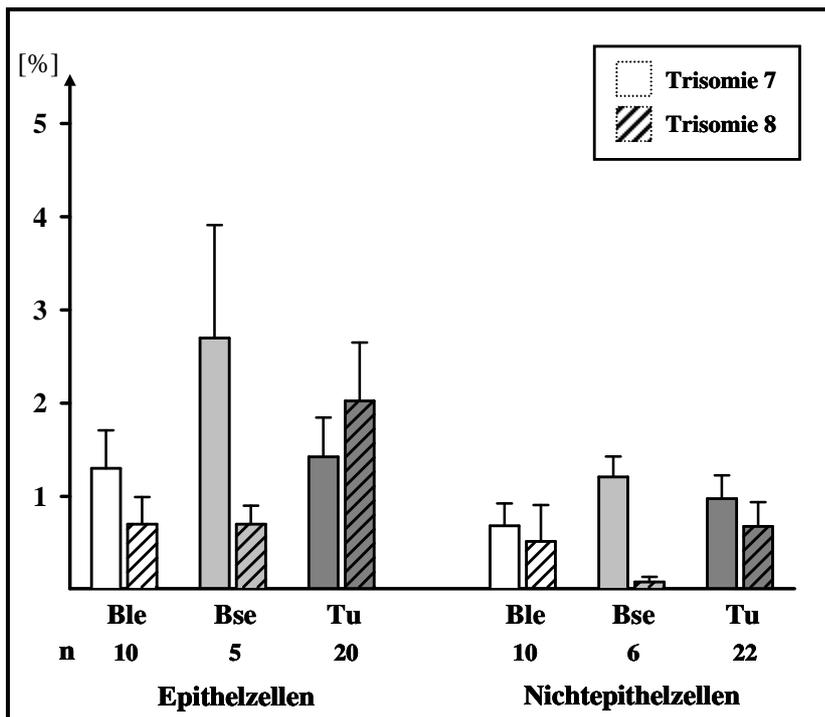


Abbildung 53:

Epithel- und Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 oder 8 in Prozent aller Epithel- bzw. Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 1 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. n = Anzahl der Fälle.

4.4.3 Zellkultur-Passage 2

Nach der zweiten Unterkultivierung wiesen im Mittel 0,6 % (0,0 bis 1,5 %) der Epithelzellen des leicht entzündlichen Bronchusgewebes eine Trisomie 7, und 0,7 % (0,0 bis 2,0 %) eine Trisomie 8 auf (Abbildung 54). Im stark entzündlichen Bronchusgewebe wurden 0,8 % Epithelzellen (0,0 bis 2,0 %) mit einer Trisomie 7 und 0,4 % (0,0 bis 1,0 %) mit einer Trisomie 8 gezählt. Im Tumorgewebe lagen die Werte für die Epithelzellen mit einer Trisomie 7 bei 1,3 % (0,0 bis 4,5 %) und für die mit einer Trisomie 8 bei 1,0 % (0,0 bis 8,0 %).

Bei den Nichtepithelzellen fanden sich im leicht entzündlichen Bronchusgewebe in P2 im Mittel 0,5 % Nichtepithelzellen (0,0 bis 1,5 %) mit einer Trisomie 7 und 0,3 % (0,0 bis 1,0 %) mit einer Trisomie 8. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe lagen die Werte für die Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 bei 1,0 % (0,0 bis 2,0 %) und bei 0,3 % (0,0 bis 1,0 %) für die Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 8. Im Tumorgewebe traten 1,2 % Nichtepithelzellen (0,0 bis 4,5 %) mit einer Trisomie 7 und 0,3 % (0,0 bis 1,0 %) mit einer Trisomie 8 auf.

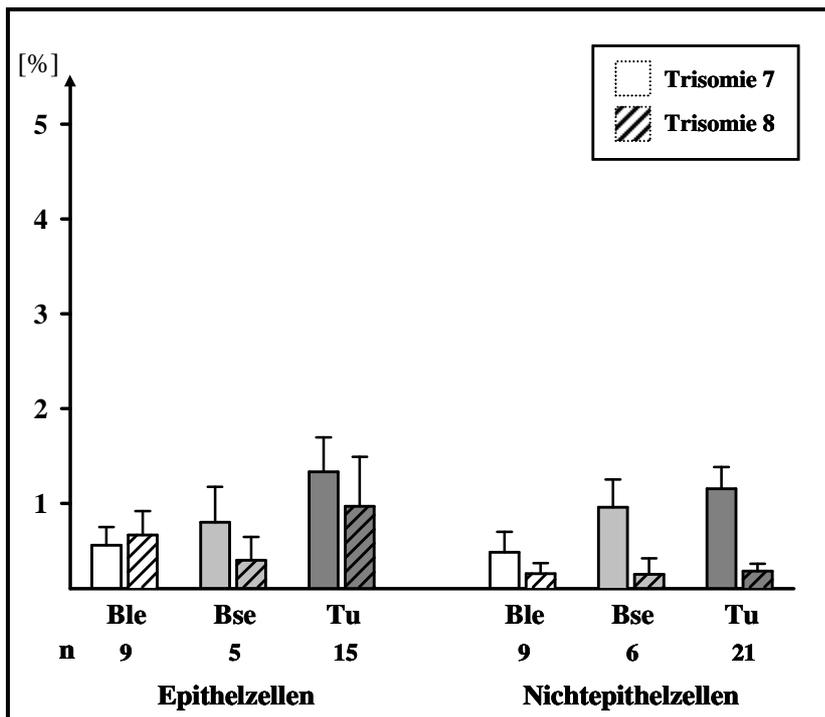


Abbildung 54:

Epithel- und Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 oder 8 in Prozent aller Epithel- bzw. Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. n = Anzahl der Fälle.

In keiner Passage zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Geweben.

4.4.4 Veränderungen im Verlauf der Zellkultur-Passagen

Die Anzahl an Epithelzellen mit einer Trisomie 7 im leicht entzündlichen Bronchusgewebe blieb von P0 nach P1 ungefähr gleich und fiel dann in P2 tendenziell ab (Abbildung 55). Im stark entzündlichen Bronchusgewebe stieg der Anteil an Epithelzellen mit einer Trisomie 7 von P0 nach P1 tendenziell an und sank in P2 wieder ab. Im Tumorgewebe fielen die Epithelzellen mit einer Trisomie 7 von P0 nach P1 ab und blieben dann in P2 auf ähnlichem Niveau.

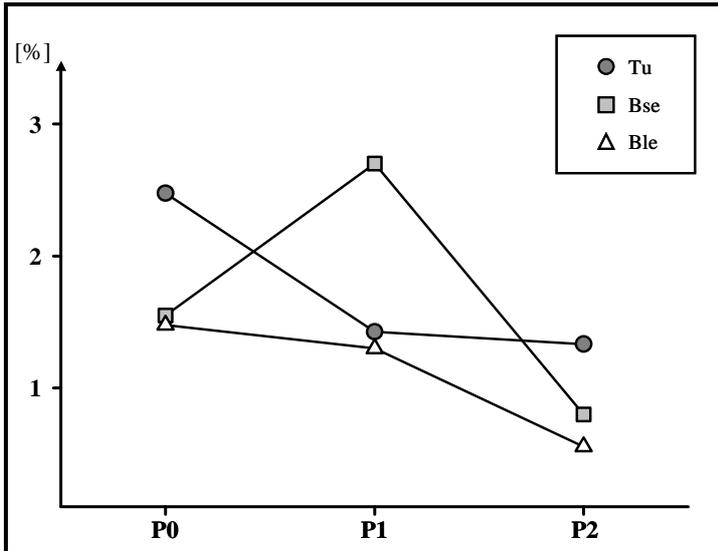


Abbildung 55:

Epithelzellen mit einer Trisomie 7 in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben.

Der Anteil an Epithelzellen mit einer Trisomie 8 im leicht und stark entzündlichen Bronchusgewebe blieb im Verlauf der Passagen ungefähr gleich hoch (Abbildung 56). Im Tumorgewebe blieben die Epithelzellen mit einer Trisomie 8 von P0 nach P1 zunächst auf ähnlichem Niveau und fielen dann in P2 tendenziell ab.

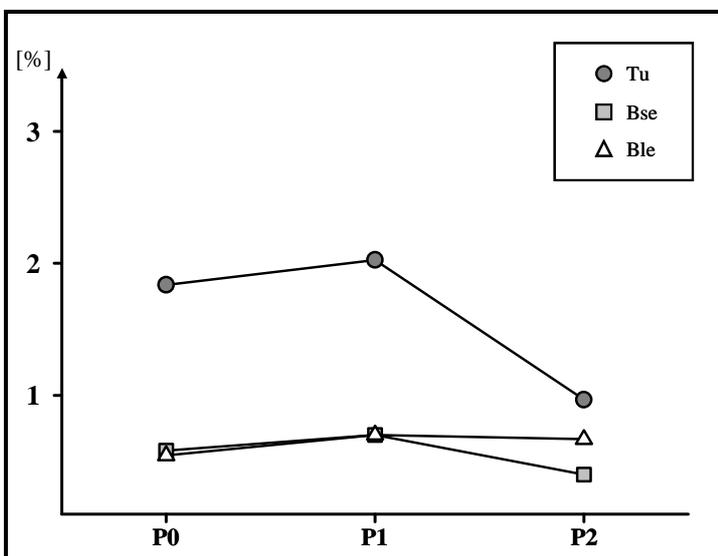


Abbildung 56:

Epithelzellen mit einer Trisomie 8 in Prozent aller Epithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben.

Der Anteil an Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 oder 8 zeigte im Verlauf der Passagen kaum Schwankungen (Abbildungen 57 und 58). Die Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 fielen in allen drei Geweben von P0 nach P1 diskret ab. In P2 war dann der Anteil der Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 des leicht und stark entzündlichen Bronchusgewebes weiter leicht gesunken, wobei im Tumorgewebe ein geringer Anstieg der Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 zu verzeichnen war.

Die Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 8 blieben im leicht entzündlichen Bronchusgewebe und im Tumorgewebe im Verlauf der Passagen auf ähnlichem Niveau. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe fielen die Nichtepithelzellen von P0 nach P1 leicht ab, um dann von P1 nach P2 wieder anzusteigen. In P2 waren dann die Werte für die Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 8 in allen Geweben nahezu gleich hoch.

Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Passagen ergaben sich weder für Epithel- noch für Nichtepithelzellen.

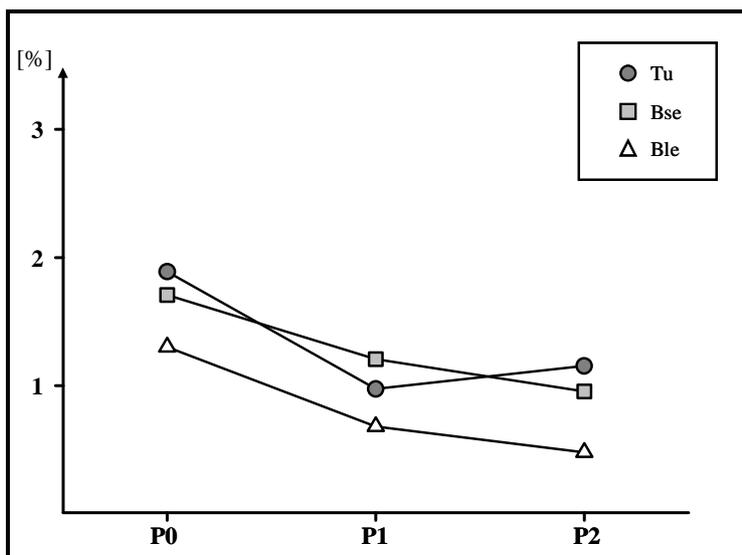


Abbildung 57:

Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben.

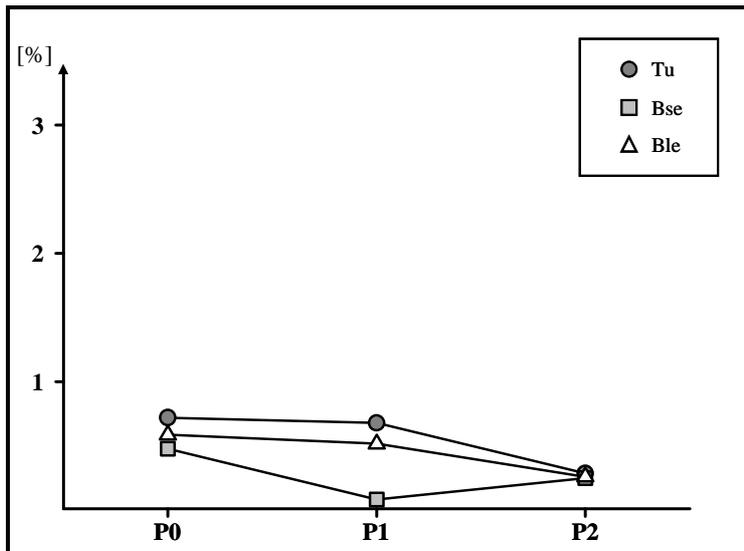


Abbildung 58:

Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 8 in Prozent aller Nichtepithelzellen in Zellkulturen in Passage 0 bis Passage 2 aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist jeweils der Mittelwert angegeben.

4.5 Zentrosomamplifikation

Nach der immunzytochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen γ -Tubulin und einer nachfolgenden FISH gegen Chromosom 8 zur Bestimmung des Ploidiegrades war die numerische Auswertung der Zentrosomen bei diploiden und tetraploiden Zellen möglich (Abbildungen 12 und 13, Seite 37, Abbildungen 15 und 16, Seite 38 und 39, sowie Abbildungen 18 bis 22, Seiten 39 bis 41).

Im leicht entzündlichen Bronchusgewebe fanden sich in der diploiden Zellfraktion im Mittel bei 4,1% der Zellen mehr als zwei Zentrosomen (1,0 bis 8,4 %) (Abbildung 59). Der höchste Anteil an diploiden Zellen mit amplifizierten Zentrosomen fand sich bei den Fällen 12 und 27 mit 7,4 bzw. 8,4 %. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe lag der Mittelwert der diploiden Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen bei 4,5 % (0,5 bis 10,0 %). Hier lagen ebenfalls bei zwei Fällen (Fälle 15 und 16) die höchsten Werte mit 8,4 und 10,0 % vor. Im Tumorgewebe zeigte sich ein Anteil von 3,0 % diploiden Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen (0,5 bis 11,6 %). Dabei fand sich bei Fall 21 der höchste Wert von 11,6 %. Die Rate an diploiden Zellen mit amplifizierten Zentrosomen im Tumorgewebe lag tendenziell niedriger als im leicht und stark entzündlichen Bronchusgewebe.

Bei den tetraploiden Zellen lag der Anteil an Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen im leicht entzündlichen Bronchusgewebe bei 32,7 % (7,7 bis 77,8 %). Der Maximalwert fand sich bei Fall

12. Im stark entzündlichen Bronchusgewebe fanden sich im Mittel 39,8 % tetraploide Zellen mit amplifizierten Zentrosomen (0,0 bis 71,4 %). Der höchste Wert von 71,4 % fand sich bei drei Fällen (Fälle 15, 16 und 21). Beim Tumorgewebe lag der Anteil an tetraploiden Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen bei 33,9 % (2,7 und 72,0 %). Hier traten die maximalen Werte von 60,0 bzw. 72,0 % bei den Fällen 10 und 20 auf.

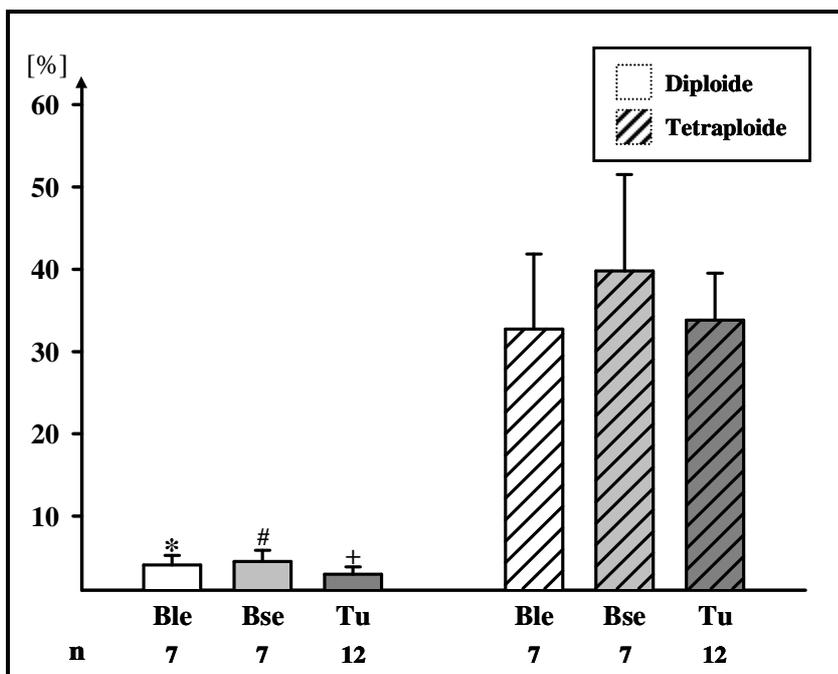


Abbildung 59:

Diploide und tetraploide Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen in Prozent aller diploiden bzw. tetraploiden Zellen in Zellkulturen aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu). Es ist der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. * $p < 0,05$ vs. tetraploide Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen im leicht entzündlichen Bronchusgewebe, # $p < 0,05$ vs. tetraploide Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen im stark entzündlichen Bronchusgewebe, + $p < 0,05$ vs. tetraploide Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen im Tumorgewebe. n = Anzahl der Fälle.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl beim leicht und stark entzündlichen Bronchusgewebe als auch beim Tumorgewebe signifikant mehr tetraploide Zellen mit amplifizierten Zentrosomen vorlagen als diploide Zellen mit amplifizierten Zentrosomen.

Im Vergleich der Gewebe untereinander ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

4.6 Multipolare Mitosen

Bei der Analyse der Präparate mit Zentrosom-Färbung wurden auch vorhandene multipolare Mitosen gezählt (Abbildung 60, Abbildungen 17 und 18, Seite 39, sowie Abbildung 22, Seite 41).

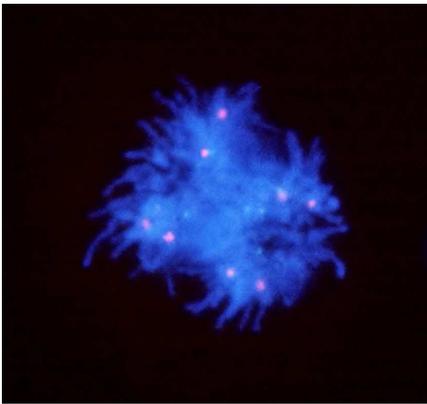


Abbildung 60:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer tetrapolaren Mitose mit acht Kopien des Chromosoms 7 (Cy3TM/rot), von denen je zwei zu einem Pol wandern. Die DNA ist DAPI-gegegenfärbt (blau).

In den Zellkulturen aus leicht entzündlichem Bronchusgewebe fanden sich multipolare Mitosen in 2 von 7 Fällen (28,6 %) (Abbildung 61). Im stark entzündlichen Bronchusgewebe wurden in 5 von 7 Fällen (71,4 %) multipolare Mitosen detektiert. Dabei fanden sich bei Fall 16 zwei und bei Fall 17 drei multipolare Mitosen. Im Tumorgewebe lagen bei 6 von 12 Fällen (50,0 %) multipolare Mitosen vor. Hier fanden sich bei Fall 21 zwei multipolare Mitosen.

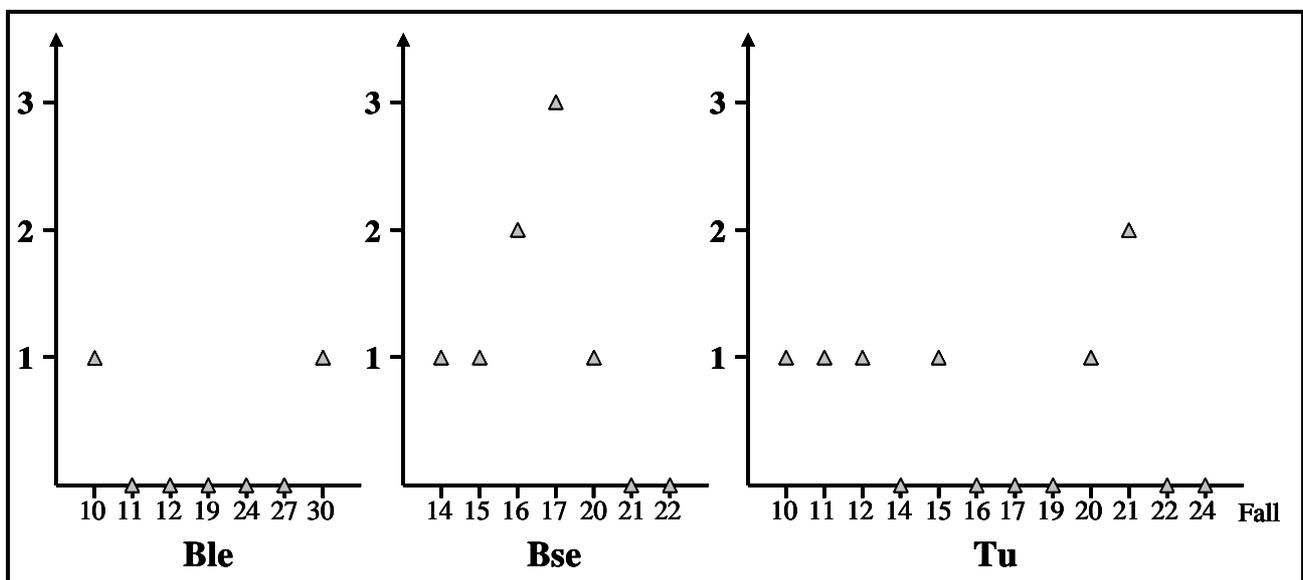


Abbildung 61:

Anzahl multipolarer Mitosen in Zellkulturen aus leicht (Ble) und stark (Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Tumorgewebe (Tu).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Zellkultivierung

Nach Erhalt der Gewebeproben aus dem OP wurde in der vorliegenden Studie immer ein Teil der Probe histopathologisch untersucht. Damit konnte bei den Proben aus der Bronchialschleimhaut zum einen die Beurteilung des Entzündungsgrades erfolgen, zum anderen konnte eine Infiltration mit Tumorgewebe ausgeschlossen werden, was möglicherweise zum Anzüchten von Tumorzellen geführt hätte. Beim Tumorgewebe konnte damit bestätigt werden, dass in der Probe auch wirklich Tumorgewebe vorlag.

Die Methode der Zellkultur wurde gewählt, um durch Expansion Zellen in ausreichender Zahl für die nachfolgende Analytik zu erhalten. Außerdem war es für die nachfolgenden Untersuchungen notwendig, dass die Zellen einschichtig vorlagen, was die Auswertung der Fluoreszenzsignale bezogen auf die einzelne Zelle erst möglich machte. Bei der Untersuchung von Gewebeschnitten tritt das Problem auf, dass die Fluoreszenzsignale nicht eindeutig einer Zelle zugeordnet werden können, da die Zellen übereinanderliegen und die Zellkerne sich überlappen. Das Modell der Zellkultur hat weiterhin den Vorteil, dass man beobachten kann, wie sich der Anteil der einzelnen Zellpopulationen im Verlauf der Passagen verändert.

Zur Kultivierung der unterschiedlichen Zelltypen aus Bronchus- und Tumorgewebe wurde DMEM/HAM's F12-Medium ausgewählt. Hierbei handelt es sich um ein Medium, das keinen Wachstumsvorteil für einen Zelltyp erwarten lässt. Um die Kulturbedingungen zu optimieren, wurde dem Medium 10 % FCS zugesetzt. Das Wachstum der Epithelzellen wurde durch Zusatz von 0,1 % EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) und 0,2 % Hydrocortison unterstützt. Insgesamt waren im Großteil der Zellkulturen ausreichend Epithelzellen für die nachfolgenden Untersuchungen vorhanden. Dies wurde mitunter erreicht, indem die Epithelzellen durch das selektive Abtrypsinieren der Fibroblasten, die im Verlauf der Passagen die Epithelzellen verdrängten, angereichert wurden.

Die Proben wurden unter sterilen Kautelen im OP gewonnen und weiterverarbeitet. Um eine Kontamination der Zellkulturen durch eine potentielle, primäre Keimbesiedelung der Gewebeprobe zu verhindern, wurde dem Medium das Antibiotikagemisch Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Damit wurde erreicht, dass es in der vorliegenden Untersuchung keine Ausfälle durch bakterielle Kontamination der Zellkulturen gab.

Ein sehr ähnliches Zellkulturmodell wurde von Lee et al. zur Kultivierung von Lungentumor- und nichtmalignem Lungengewebe verwendet (Lee et al. 1987).

Durch den Kollagenaseverlauf wurden die Gewebe nicht vollständig in Einzelzellen zerteilt. Einzelne Zellverbände verblieben, die dann auch als Verbände anwuchsen.

Da immer Zellen in P0 direkt auf Objektträgern kultiviert und anschließend fixiert wurden, waren diese Zellen kaum Veränderungen durch die Kultivierung unterworfen.

Im Verlauf der Passagen stieg die Anzahl der tetraploiden Epithelzellen in den Zellkulturen aus den entzündlichen Bronchusgeweben an. Tetraploide Zellen können entstehen, wenn die Zelle ungünstigen Bedingungen ausgesetzt ist. Diese Zellen sind möglicherweise widerstandsfähiger und können eine höhere Proteinsynthese zeigen (Gahan 1977, Rofstad et al. 1996, Bellamy et al. 1997). Geht man davon aus, dass die Zellkultur-Bedingungen für die Zellen aus entzündlichem Bronchusgewebe eventuell nicht ganz optimal waren, könnte dies die Zunahme der tetraploiden Zellen in diesen Kulturen erklären.

Weiterhin wurde gezeigt, dass in Kulturen von gesunden Keratinozyten, die mit allogenen Lymphozyten inkubiert wurden um eine Entzündung zu imitieren, im Laufe der Zellkultur zunächst die Anzahl an tetraploiden Zellen und dann die der Aneuploiden steigt (Sloand et al. 2010). Auch in der vorliegenden Untersuchung nahm die Anzahl an aneuploiden Epithelzellen in den entzündlichen Bronchusgeweben im Verlauf der Passagen zu.

Im Gegensatz hierzu fiel in den Zellkulturen aus Tumorgewebe vor allem die Anzahl an aneuploiden Epithelzellen im Verlauf der Passagen tendenziell ab. Möglicherweise sind diese aneuploiden Zellen weniger widerstandsfähig gegenüber nicht optimalen Zellkulturbedingungen. Zum anderen können durch weitere mitotische Zellteilungen, die wegen einer Zentrosomamplifikation häufig multipolar sein können, Tochterzellen entstehen, die auf Grund der

Fehlverteilung von Chromosomen oder weiterer Chromosomenverluste nicht mehr lebensfähig sind (Vitale et al. 2010).

Testa et al. diskutierten 1997, dass eine isolierte Trisomie 7 in Zellkulturen von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen ein Artefakt und nicht repräsentativ für das Tumorgewebe sei. Sie argumentierten, dass eine Trisomie 7 auch in Kulturen von nichtmalignem Lungen- und Nierengewebe nachgewiesen werden konnte (Testa et al. 1997). Aber Crowell et al. konnten 1996 zeigen, dass sich im Vergleich von unkultivierten Zellen aus Bürstenabstrichen des Bronchialepithels zu Zellen in P1, 4 und 7 keine Unterschiede in der Häufigkeit einer Trisomie 7 ergaben (Crowell et al. 1996). Ebenso konnten numerische Aberrationen für Chromosom 7 durch Zojer et al. an Paraffinschnitten und durch Liu et al. in Zellsuspensionen nachgewiesen werden (Zojer et al. 2000, Liu et al. 2012). In der vorliegenden Untersuchung war die Häufigkeit der Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 im Laufe der Passagen kaum Schwankungen unterworfen. Bei den Epithelzellen fand sich, mit Ausnahme eines tendenziellen Anstiegs der Zellen mit einer Trisomie 7 für das stark entzündliche Bronchusgewebe von P0 nach P1, ein tendenzielles Absinken im Zuge der Passagen, so dass ein Effekt durch die Zellkultur insgesamt betrachtet unwahrscheinlich erscheint.

5.1.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Um den Ploidiegrad der kultivierten Zellen zu bestimmen, wurde die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendet. Die Zellkerne wurden zuvor durch die Behandlung mit einer hypotonen Kaliumchlorid-Lösung vor dem Fixieren gequollen, damit sie und damit die Ziel-DNA, für die DNA-Sonden besser zugänglich wurden.

Ziel war es, die Anzahl bestimmter Chromosomen in einem Interphasekern verlässlich zu bestimmen. Deswegen wurden Sonden gegen DNA-Sequenzen der entsprechenden Zentromerregionen verwendet und keine Sonden, die gegen Gene gerichtet sind, die auf den Chromatiden liegen. Im Zellzyklus werden bereits in der S-Phase die Chromatiden verdoppelt, was für Gene, die dort lokalisiert sind zur Folge hat, dass sie in der S- und G2-Phase schon in doppelter Zahl vorliegen. In Interphasekernen können diese Phasen jedoch morphologisch nicht von der G0- oder G1-Phase unterschieden werden. Mit Zentromer-Sonden umgeht man dieses Problem, da die Chromatiden auch nach ihrer Verdopplung in der S-Phase noch weiter über das Zentromer

verbunden sind. Das markierte Zentromer des ausgewählten Chromosoms ist bis zur G2-Phase als ein distinkter Punkt und dann in der G2-Phase anhand eines Signals, bestehend aus zwei direkt aneinanderliegenden Punkten (●●), zu erkennen. Für die Auszählung der Signale hatte das zur Folge, dass zwei nebeneinander liegende Signale erst dann als zwei gezählt wurden, wenn ihr Abstand größer war als ein Fluoreszenzsignal (Oberringer 1999).

Um den Ploidiegrad verlässlich bestimmen zu können, wurden die Zellen mit zwei DNA-Sonden, die gegen die Zentromerregion zweier unterschiedlicher Chromosomen gerichtet waren, simultan hybridisiert. Damit wurde es sehr unwahrscheinlich, dass der Ploidiegrad auf Grund einer Poly- oder Monosomie eines einzelnen Chromosoms falsch bestimmt wurde. Es wurden DNA-Sonden gegen die Zentromerbereiche von Chromosom 7 und 8 simultan hybridisiert. Durch die beiden unterschiedlichen Detektionssysteme Digoxigenin-Antidigoxigenin (Kessler 1991) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3TM und Streptavidin-Biotin (Chollet und Kawashima 1985) mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC war die eindeutige numerische Bestimmung der Chromosomen 7 und 8 möglich (Hopman et al. 1986). Da eine Trisomie 7 als häufige genetische Veränderung bei Bronchialkarzinomen beschrieben wurde (Lee et al. 1987, Crowell et al. 1996, Zojer et al. 2000), konnte gleichzeitig überprüft werden, ob in den untersuchten Geweben eine Trisomie 7 gehäuft auftrat.

Im Vergleich mit durchflusszytometrischen Verfahren (FACS: fluorescence activated cell sorting) hat die simultane FISH mit zwei Zentromersonden gegen zwei unterschiedliche Chromosomen Vorteile. Zum Ersten kann der Ploidiegrad direkt mit dem Stadium der Zelle im Zellzyklus korreliert werden. Damit wird auch eine Zelle, die ihre DNA in der S-Phase bereits verdoppelt hat und damit den vierfachen DNA-Gehalt trägt (4N), nicht fälschlicherweise als tetraploid gewertet. Zum Zweiten kann die Chromosomenzahl pro Zellkern bestimmt werden, was bei der FACS-Analyse nicht möglich ist: Bei der FACS-Analyse kann eine Zelle mit dem DNA-Gehalt 4N entweder einen tetraploiden Zellkern oder zwei diploide Zellkerne enthalten. Zum Dritten konnte der FISH eine immunzytochemische Fluoreszenzfärbung vorangestellt und entweder Zytokeratin (Abbildung 10, Seite 33, Abbildung 23, Seite 41 sowie Abbildung 24, Seite 42) oder γ -Tubulin (Abbildungen 12 und 13, Seite 37 sowie Abbildungen 15 bis 22, Seite 38 bis 41) angefärbt werden. Dabei musste die Stabilität der Antikörperbindung gewährleistet sein, damit die Farbintensitäten während und nach der FISH qualitativ gleichwertig erhalten blieben. Zum Vierten ist es mit der

FISH möglich, unterschiedliche Mitose-Typen (Abbildungen 17 und 18, Seite 39, Abbildung 22, Seite 41 sowie Abbildung 60, Seite 72) und -Phasen (Abbildungen 13 und 14, Seite 37 sowie Abbildung 15, Seite 38) zu beurteilen. Zum Fünften konnten lokale Anhäufungen (Cluster) von Zellen besser erkannt werden (Abbildungen 24 und 25, Seite 42).

5.1.3 Immunzytochemische Färbung

Der Antikörper zur immunzytochemischen Färbung der Epithelzellen aus Bronchialschleimhaut und Tumorgewebe wurde auf Grund der in diesen Geweben beschriebenen Zytokeratinen (Moll et al. 1982) ausgewählt. Vier der Zytokeratine der Bronchialschleimhaut und zwei der Zytokeratine des Bronchialkarzinomgewebes waren in dem verwendeten Antikörper-Gemisch AE1/AE3 vorhanden (Tabelle 3, Seite 27). Durch die Anfärbung der Zytokeratine waren die Epithelzellen eindeutig von den übrigen Zelltypen zu unterscheiden. Die in dieser Studie untersuchten Tumoren sind epitheliale, bösartige Tumoren, das heißt, sie entstehen aus Zellen des Epithels. Durch die Zytokeratinfärbung konnten die Epithelzellen gesondert untersucht werden. Bei den Zellen ohne Zytokeratinfärbung, den "Nichtepithelzellen", handelte es sich überwiegend um Fibroblasten, basierend auf der lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellmorphologie im Zuge der Zellkultivierung.

Um das Zentrosom immunzytochemisch anzufärben, wurde ein Antikörper gegen γ -Tubulin, eines von zahlreichen Zentrosomproteinen, verwendet. Die Affinität von anti- γ -Tubulin ist ausschließlich auf das Zentrosom beschränkt. Es bindet daran in allen Phasen des Zellzyklus (Joshi et al. 1992), so dass das Zentrosom damit immunzytochemisch markiert werden kann (Stearns et al. 1991, Zheng et al. 1991). Das zytosolische γ -Tubulin wird durch die Immunfluoreszenzfärbung nicht dargestellt (Moudjou et al. 1996). Das Zentrosom besteht aus zwei zylinderförmigen, senkrecht zueinanderstehenden Zentriolen, die aus in neun Triplets angeordneten Mikrotubuli aufgebaut sind. Das ältere Zentriol ("Mutterzentriol") ist an den distalen und subdistalen Anhängseln zu erkennen (Nigg und Stearns 2011) (schematische Zentrosomdarstellung in Tabelle 4, Seite 36). Die Zentriole werden von dem perizentriolären Material umgeben. In dieser Zentrosommatrix liegt auch das γ -Tubulin. γ -Tubulin ordnet sich zusammen mit weiteren Proteinen zu einer Ringstruktur an, dem sogenannten γ -Tubulin-Ringkomplex, von dem ausgehend sich die Mikrotubuli bilden (Zheng et al. 1995).

Die Bestimmung der Zentrosomanzahl auf Grund der γ -Tubulin-Fluoreszenz-Signale nach der immunzytochemischen Färbung erfolgte nach den morphologischen Grundlagen, wie sie 1998 von Dichtenberg et al. formuliert wurden (Dichtenberg et al. 1998).

In der G₀- bzw. G₁-Phase des Zellzyklus liegt das Zentrosom nur einmal in der Zelle vor. Durch die γ -Tubulin-Färbung wird das Zentrosom als zwei direkt aneinanderliegende Punkte, als "Doppelpunkt", dargestellt. Die Verdopplung des Zentrosoms beginnt in der späten G₁- bzw. frühen S-Phase. Dabei lockert sich die Verbindung der beiden Zentriole und an der Basis eines jeden Zentriols beginnt sich ein neues auszubilden (Nigg und Stearns 2011). Durch das weitere Wachstum des neuen Zentriols und damit des Zentrosoms während der S- und G₂-Phase werden die Fluoreszenzsignale intensiver, liegen jedoch weiter direkt aneinander. Erst in der Prophase der Mitose sind zwei Zentrosomen durch das Auseinanderwandern der beiden Zentrosomsignale zu erkennen. Da während der Mitose durch die verstärkte Anlagerung von γ -Tubulin die Signale sehr intensiv sind (Khodjakov und Rieder 1999), können keine "Doppelpunkte" mehr erkannt werden und ein Zentrosom entspricht einem hellen Punkt. Erst in der Telophase sind die beiden Zentrosomen wieder als "Doppelpunkte" zuerkennen. In allen Phasen - außer der Pro-, Meta- und Anaphase - sind zwei eng beieinander liegende Punkte also mit einem Zentrosom gleichbedeutend (Abbildungen 12 und 14, Seite 37). In der Pro-, Meta- und Anaphase ist das Zentrosom auf Grund der starken γ -Tubulin-Anreicherung nur als ein heller Punkt zu sehen (Tabelle 4, Seite 36 und Abbildung 13, Seite 37).

Bei der Auswertung wird davon ausgegangen, dass mehr als zwei γ -Tubulin-Signale in Interphase-Zellen eine Zentrosom-Vermehrung beschreiben (Dichtenberg et al. 1998). Außerdem wird angenommen, dass jedes durch anti- γ -Tubulin angefärbte Zentrosom reguläre Spindeln ausbilden kann (Joshi et al. 1992).

5.1.4 Mikroskopische Quantifizierung

Zur Bestimmung des Tetra- und Aneuploidiegrades der Zellkulturen wurden die Objektträger mäanderförmig durchmustert. Die tetra- und aneuploiden Zellen traten teilweise lokal gehäuft in "Clustern" auf. Trotz dieser Tatsache konnte durch eine ausreichende Anzahl an ausgezählten Zellen, nämlich mindestens je 200 Epithel- und Nichtepithelzellen, von verlässlichen Werten ausgegangen werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Tetra- und Aneuploidiegrad von Zellkulturen aus leicht und stark entzündlichem Bronchusgewebe sowie aus Bronchialkarzinomgewebe mit Hilfe einer simultanen FISH gegen Chromosom 7 und 8 bestimmt. Dabei wurden nach einer immunzytochemischen Zytokeratin-Färbung die Epithel- und Nichtepithelzellen getrennt betrachtet. Weiterhin konnte nach einer immunzytochemischen Färbung von γ -Tubulin eine Zentrosomamplifikation mit dem Ploidiegrad korreliert werden.

Ein Nachteil dieser Arbeit ist, dass kein histologisch komplett normales Gewebe zum Vergleich vorlag. Der Versuch, gesundes Bronchusgewebe aus endoskopisch gewonnenen Biopsien von Patienten ohne Tumor zu gewinnen, scheiterte zum einen an der zu geringen Gewebemenge, die gewonnen werden konnte, zum anderen war aus dem gleichen Grund keine direkte histopathologische Untersuchung und somit keine Beurteilung der Entzündung möglich. Da bei diesen Patienten häufig chronisch entzündliche Lungenerkrankungen vorliegen, hielten wir dies jedoch für unabdingbar.

5.2.1 Tetra- und Aneuploidie

Es gilt als allgemein anerkannt, dass auf dem Weg der Entstehung von Bronchialkarzinomen morphologische Veränderungen auftreten. Diese sind Basalzellhyperplasie, Metaplasie, Dysplasie und Carcinoma in situ (Auerbach et al. 1961, Saccomano et al. 1974, Smith et al. 1996).

Der Aneuploidiegrad scheint im Verlauf dieses Prozesses zuzunehmen (Sennerstam et al. 1989). Dabei wurde das Auftreten der Aneuploidie erstmals beim Übergang von Hyperplasie zu Dysplasie beschrieben. In der vorliegenden Untersuchung traten aneuploide und tetraploide Zellen bereits im Stadium der Entzündung auf.

Im leicht entzündlichen Bronchusgewebe fanden sich in P0 im Mittel 4,0 % tetraploide und 5,1 % aneuploide Epithelzellen, das bedeutet für Zellkulturen unauffällige Werte (Therman und Susman 1993).

Im stark entzündlichen Bronchusgewebe fanden sich dann 6,3 % tetraploide und 6,7 % aneuploide Epithelzellen. Im Tumorgewebe traten deutlich höhere Werte auf: 15,6 % tetraploide und 25,6 %

aneuploide Epithelzellen. Hierbei war der Anteil der Nicht-Tetraploiden innerhalb der Aneuploiden im Vergleich zu den beiden Gruppen des entzündlichen Bronchusgewebes deutlich angestiegen.

Bei den Nichtepithelzellen lagen die Mittelwerte sowohl für die tetraploiden, als auch für die aneuploiden Zellen bei allen drei Geweben deutlich unter 5 %, dem Wert, der für Zellkulturen noch als normal angesehen wird. Bronchialkarzinome entstehen aus epithelialen Zellen. Zusammen mit der Beobachtung, dass eine erhöhte Tetra- und Aneuploidierate in der vorliegenden Studie nur bei den Epithelzellen auftrat, spricht dies dafür, dass die Epithelzellen auch die für zukünftige Untersuchungen relevanten Zellen sind.

Mit der Progression der Entzündung nahm die Anzahl an tetraploiden Epithelzellen zu. Im Tumorgewebe waren dann die tetra- und vor allem die aneuploiden Epithelzellen noch zahlreicher zu finden. Smith et al. beschrieben 1996, dass mit der zunehmenden morphologischen Veränderung des Bronchusgewebes von Hyperplasie über Dysplasie und Carcinoma in situ zum invasiven Karzinom die Aneuploidisierungsrate zunimmt (Smith et al. 1996). Dies wird durch die vorliegende Arbeit unterstützt, da sich im Tumor die höchste Rate an aneuploiden Zellen fand.

Wichtig ist aber vielmehr, dass bereits im entzündlichen Gewebe eine erhöhte Anzahl tetraploider Zellen nachweisbar war.

Normalerweise sind Säugetierzellen diploid (2N). Tetraploide (4N) oder höher polyploide Zellen (> 4N) können entstehen, wenn ein Gewebe einer erhöhten Belastung ausgesetzt ist. Physiologische Beispiele sind Trophoblast-Riesenzellen (Ullah et al. 2008), Megakaryozyten (Ravid et al. 2002, Gao et al. 2012) und Hepatozyten (Guidotti et al. 2003, Davoli und de Lange 2011). Als Reaktion auf pathologische Situationen entstehen polyploide Zellen zum einen bei der Geweberegeneration, wie zum Beispiel bei der Wundheilung (Oberringer et al. 1999), nach Myokardinfarkt (Meckert et al. 2005) oder nach partieller Hepatektomie (Lazerini Denchi et al. 2006). Zum anderen entstehen polyploide Zellen bei Geweben, die einer erhöhten toxischen oder mechanischen Belastung ausgesetzt sind (Vliegen et al. 1995, Hixon et al. 2000, Gorla et al. 2001). Dabei werden Vorteile der polyploiden Zelle wie schnelleres Wachstum, höhere Biosyntheseleistung und größere genetische Variabilität diskutiert.

Es sind drei Mechanismen beschrieben, durch die polyploide Zellen in einem ansonsten diploiden Organismus entstehen: **Endoreplikation** als physiologischer Teil der Entwicklung, **Zellfusion** und **abortiver Zellzyklus**, bedingt durch unterschiedliche Defekte.

Bei der **Endoreplikation** werden zwei Formen unterschieden. Bei **Endozyklen** werden S-Phase, während der die DNA verdoppelt wird, und G-Phase alternierend wiederholt, ohne dass eine Mitose dazwischen geschaltet ist. Endozyklen zeigen keine Kennzeichen einer Mitose (Fox und Duronio 2013). Die zweite Form der Endoreplikation ist die **Endomitose**. Dabei wird eine abortive Mitose ohne Zellteilung durchlaufen. Danach tritt die Zelle erneut in eine S-Phase ein (Ullah et al. 2009, Fox und Duronio 2013).

Sehr gut untersuchte Beispiele sind die Trophoblast-Riesenzelle, die durch einen oder mehrere Endozyklen entsteht (Ullah et al. 2008) und Megakaryozyten, die durch Endomitose entstehen. Hierbei durchlaufen die Zellen die Anaphase nicht komplett, so dass die neue Kernmembran alle getrennten Chromosomen umschließt und ein polylobulierter Kern entsteht (Ravid et al. 2002, Gao et al. 2012). Auch polyploide Hepatozyten können durch Endoreplikation entstehen. Dabei bleibt die Zytokinese aus, wodurch zunächst eine tetraploide Zelle mit zwei diploiden Zellkernen und zwei Zentrosomen entsteht. Durch "Clustern" der Zentrosomen entsteht eine bipolare Spindel und es entstehen in der Folge mononukleäre tetraploide oder sogar oktaploide Zellen (Guidotti et al. 2003).

Bei der **Zellfusion** entstehen durch Verschmelzung mehrkernige polyploide Zellen. Beispiele hierfür sind Hepatozyten (Davoli und de Lange 2011), Skelettmuskelzellen (Kitzmann und Fernandez 2001) und Osteoklasten (Vignery 2000). Gelingt es der Zelle, eine bipolare Spindel aufzubauen und eine bipolare Mitose zu durchlaufen, können aus doppelkernigen Zellen, wie oben bei der Endoreplikation beschrieben, im weiteren Verlauf wieder mononukleäre, polyploide Zellen entstehen (Storchova und Pellmann 2004).

Bei dem dritten Mechanismus, dem **abortiven Zellzyklus**, wird die Mitose zu verschiedenen Zeitpunkten durch unterschiedliche Defekte während der Zellteilung abgebrochen. Solche Defekte können die DNA-Replikation oder -Reparatur (Ganem et al. 2007), das Trennen der Schwesterchromatiden (Shi und King 2005), die Spindelfunktion und die Zytokinese betreffen (Storchova und Pellmann 2004). Durch diese Defekte werden Checkpoints aktiviert, die das Fortschreiten des Zellzyklus blocken und in manchen Fällen eine Apoptose auslösen. Es kann aber auch nur zu einer vorübergehenden Verzögerung des Zellzyklus kommen (Elledge 1996) und die

Zelle kann dann, trotz des weiterbestehenden Fehlers, den Checkpoint umgehen (Andreassen et al. 1996, Lanni und Jacks 1998, Ganem et al. 2007). Durch die abgebrochene Mitose entstehen dann je nach Zeitpunkt des Abbruchs ein- oder mehrkernige, polyploide Zellen (Storchova und Pellmann 2004, Storchova und Kuffer 2008, Davoli und de Lange 2011). Im Unterschied zur Endoreplikation handelt es sich hierbei um einen abgebrochenen, oft unkoordiniert verlaufenden Zellzyklus, der in pathologischen Situationen auftritt (Storchova und Pellmann 2004).

In der vorliegenden Untersuchung wurde im entzündlichen Bronchusgewebe eine erhöhte Anzahl an tetraploiden Zellen gefunden, was die Vermutung nahe legt, dass auch die chronische Entzündung eine Belastung für die Zelle darstellt, an die sie sich durch Tetraploidisierung adaptiert. Dies wird durch die Ergebnisse der Untersuchung von Sloand et al. unterstützt, in der eine signifikante Anzahl an tetraploiden Zellen in von Graft-versus-Host-Disease (GvHD) betroffenen Stellen der Wangenschleimhaut gefunden wurden. Ebenso konnten Sloand et al. zeigen, dass in einem Zellkulturmodell von gesunden Keratinozyten, bei dem eine Entzündung durch Inkubation mit HLA-mismatched allogenen Lymphozyten imitiert wurde, die Anzahl an tetraploiden Zellen ansteigt (Sloand et al. 2010).

In entzündeten Bereichen ist das Gewebe oxidativem Stress ausgesetzt, was die Bildung tetraploider Zellen auslösen kann, wie es im Lebergewebe gezeigt wurde (Marnett 2012). Diese tetraploiden Zellen haben dann generell ein hohes Risiko aneuploid zu werden. Für diesen Weg spricht, dass 70 bis 80 % der Lungenkarzinome Karyogramme mit einem near-triploiden bzw. near-tetraploiden DNA-Gehalt aufweisen (Masuda und Takahashi 2002).

Allerdings wird ebenfalls diskutiert, dass es durch die freien Sauerstoffradikale in der Entzündung zu einer direkten DNA-Schädigung und darüber zur Bildung von aneuploiden Zellen ohne den Zwischenschritt einer tetraploiden Zelle kommt. Ebenso könnte die Belastung der Bronchialschleimhaut mit exogenen Noxen, die zum Beispiel im Zigarettenrauch vorkommen, eine direkte DNA-Schädigung auslösen. Die Theorie der „field cancerization“ (Slaughter et al. 1953, Heyne et al. 1992, Sagman et al. 1992) geht davon aus, dass das gesamte Bronchialepithel von einer inhalativen Noxe mutagenisiert wird. Es wurden prämaligne Läsionen häufig und multifokal im respiratorischen Epithel von Rauchern gefunden (Auerbach et al. 1961). Diese prämaligen Läsionen zeigten bereits genetische Auffälligkeiten; hier sind vor allem Verluste auf 3p, 9p und

Veränderungen von *P53* zu nennen. Andererseits wurden aber auch in histologisch normalem Bronchusgewebe genetische Auffälligkeiten gefunden (Wistuba 2007).

Von Hanselmann und Oberringer wurde 2001 die Hypothese aufgestellt, dass wenn karzinogene Substanzen zu niedrig dosiert auftreten um eine Mutagenese direkt auszulösen, die betroffene Zelle mit einer Nekrose reagiert. Diese Nekrose führt dann zu einer lokalen Inflammation, die dann das Entstehen von tetraploiden Zellen auslösen kann (Hanselmann und Oberringer 2001).

Außer der mutagenisierenden Wirkung verursacht die anhaltende Belastung des Bronchialgewebes mit Zigarettenrauch eine chronische Entzündungsreaktion durch physikalische und chemische Reize, die zur Tumorentstehung führen kann. Die chronische Entzündungsreaktion fördert Proliferation, Überleben und Migration epithelialer Zellen und führt zu Gefäßneubildung, was insgesamt die Tumorentstehung unterstützt (Coussens und Werb 2002).

Die proinflammatorischen Zytokine MIF (Makrophagenmigration inhibierender Faktor; Hudson et al. 1999) und Interleukin-6 (IL-6; Yonish-Rouach et al. 1991) können das Tumorsuppressorgen *P53* inaktivieren. Der zeitweilige Verlust der *P53*-Funktion während der akuten Entzündungsreaktion kann von Vorteil sein, um die lokale Zellproliferation und Gewebereparatur zu ermöglichen. IL-6 gehört zu den Zytokinen, die eine proangiogene und anti-apoptotische Wirkung haben, was ebenfalls das Tumorwachstum unterstützt (O'Callaghan et al. 2010). Erhöhte IL-6-Spiegel wurden auch im induzierten Sputum von Patienten mit COPD (Chung 2001) und in der Darmschleimhaut von Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung (Mitsuyama et al. 1991) gefunden, beides Formen einer chronischen Entzündung, die mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergehen.

Es wurde beschrieben, dass Zigarettenrauch die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der eine zentrale Rolle in allen Stadien der Inflammation spielt, erhöht und darüber eine Entzündung des Lungengewebes und die Entstehung von Lungentumoren auslöst (Stathopoulos et al. 2007, Lee G et al. 2009). NF- κ B induziert die Expression von anti-apoptotischen und angiogenen Faktoren, sowie von Wachstumsfaktoren (Karin 2009). Ebenso wird *P53* durch NF- κ B gehemmt (Gudkov et al. 2011).

Über den Weg der *P53*-Inaktivierung in der Entzündung könnte das Auftreten von tetraploiden Zellen ermöglicht werden, die sonst durch den beschriebenen *P53*-abhängigen Kontrollpunkt in der G1-Phase arretiert würden (Andreassen et al. 2001, Borel et al. 2002, Margolis et al. 2003). Die

Existenz dieses "Tetraploidiekontrollpunktes" wird allerdings kontrovers diskutiert und von einigen Autoren angezweifelt (Uetake und Sluder 2004, Wong und Stearns 2005).

Fujiwara et al. zeigten, dass aus tetraploiden Zellen, die in *P53*-defiziente Nacktmäuse implantiert werden, Tumoren entstehen (Fujiwara et al. 2005). Das Entstehen tetraploider Zellen ist als früherer Schritt der Tumorgenese bereits beschrieben und geht der Bildung von aneuploiden Zellen voraus (Shackney et al. 1989). Dies wird durch Untersuchungen am Barrett-Ösophagus (Rabinovitch et al. 1989, Galipeau et al. 1996) und der Cervix (Heselmeyer et al. 1996, Olaharski et al. 2006) unterstützt und konnte auch im Tiermodell (Levine et al. 1991, Cross et al. 1995) sowie an Zelllinien gezeigt werden (Andreassen et al. 1996, 2001).

Die Hypothese, dass tetraploide Zellen auch in der chronischen Entzündung des Bronchus entstehen und sich dann zu aneuploiden Zellen entwickeln, was zur Entstehung eines Tumors führt, wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bestätigt. Die tetraploiden Zellen waren bereits im entzündeten Bronchusgewebe zu finden und nahmen an Häufigkeit mit dem Grad der Entzündung zu. Im Tumor waren dann vermehrt aneuploide Zellen zu finden.

5.2.2 Tetra- und Aneuploidie im Adeno- und Plattenepithelkarzinom

Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome sind die beiden häufigsten histologischen Subklassen des Bronchialkarzinoms. Im Vergleich ergaben sich in der vorliegenden Untersuchung in P0 bei den Adenokarzinomen im Mittel 19,4 % und bei den Plattenepithelkarzinomen 11,0 % tetraploide Epithelzellen. Bei den aneuploiden Epithelzellen ergaben sich bei den Adenokarzinomen 31,7 % und bei den Plattenepithelkarzinomen 14,7 %. Bei den Adenokarzinomen traten tendenziell mehr tetra- und aneuploide Epithelzellen auf, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied gezeigt hätte. Bei den Adenokarzinomen lag bei 83,3 % der Fälle eine Aneuploidisierungsrate von über 5 % vor und bei den Plattenepithelkarzinomen bei 57,1 %.

Lee et al. beschrieben das Auftreten einer Aneuploidie bei Adenokarzinomen in 2 von 5 Fällen (40 %) und bei Plattenepithelkarzinomen in 3 von 5 Fällen (60 %) (Lee et al. 1987). Smith et al. fanden eine erhöhte Aneuploidierate für Adenokarzinome in 81 % der Fälle und für Plattenepithelkarzinome in 93 % der Fälle (Smith et al. 1996). Tendenziell lag bei beiden Untersuchungen im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit bei den Plattenepithelkarzinomen häufiger eine erhöhte Aneuploidierate vor.

Sy et al. fanden in ihrer Untersuchung keinen signifikanten Unterschied zwischen Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen bezüglich des Ploidie-Status, beschrieben aber ein auffälligeres Genom bei den Plattenepithelkarzinomen mit häufigeren Translokationen und numerischen Aberrationen (Sy et al. 2004).

Ninomiya et al. beschrieben eine chromosomale Instabilität bei circa 30 % der gut und mäßig differenzierten Adenokarzinome, bei 83,4 % der schlecht differenzierten Adenokarzinome und bei 55,5 % der Plattenepithelkarzinome (Ninomiya et al. 2006). Diese Zahlen liegen im Bereich der vorliegenden Untersuchung: Dabei wurde bei den Adenokarzinomen eine erhöhte Aneuploidisierungsrate bei 83,3 % der Fälle gefunden und bei den Plattenepithelkarzinomen bei 57,1 % der Fälle.

Im Verlauf der Passagen entwickelte sich die Anzahl der tetra- und aneuploiden Zellen der Zellkulturen aus Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen unterschiedlich. Die Zahl der tetra- und aneuploiden Epithelzellen der Adenokarzinome fiel von P0 zu P1 ab und stieg zu P2 wieder an, die Zahl der tetra- und aneuploiden Epithelzellen der Plattenepithelkarzinome stieg von P0 zu P1 an und fiel zu P2 wieder ab. Ein ähnlicher Verlauf ließ sich bei den Nichtepithelzellen beobachten. Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf feine Unterschiede in der Regulierung des Ploidiegrades in den beiden Tumortypen.

Insgesamt ist ein Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit der Literatur schwierig, da in den meisten Untersuchungen die nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome zusammengefasst und nicht nach histologischen Subtypen unterschieden sind. Erst in der jüngeren Vergangenheit tritt eine Unterscheidung der Adeno- und Plattenepithelkarzinome wieder in den Vordergrund, da sich unterschiedliche Behandlungsoptionen mit Tyrosinkinaseinhibitoren oder Antikörpern ergeben haben (Travis et al. 2013).

5.2.3 Trisomie 7 und Trisomie 8

Eine Trisomie 7 wurde wiederholt als charakteristisches Merkmal von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und prä malignem Gewebe beschrieben (Lee et al. 1987, Matturri und Lavezzi 1994, Crowell et al. 1996, Lechner et al. 1998, Zojer et al. 2000, Buckingham et al. 2007). Crowell et al. nehmen eine Trisomie 7-Rate von mehr als 2 % als erhöht an (Crowell et al. 1996). Dieser Grenzwert wurde für die vorliegende Untersuchung übernommen.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich in P0 für das leicht und stark entzündliche Bronchusgewebe ein Anteil an Epithelzellen mit einer Trisomie 7 von im Mittel 1,5 % und im Tumorgewebe von 2,5 %. Im weiteren Verlauf der Passagen lagen sämtliche Werte der Epithelzellen aus leicht entzündlichem Bronchusgewebe unter 2 %. Auffallend ist, dass in P1 im stark entzündlichen Bronchusgewebe die Anzahl der Epithelzellen mit einer Trisomie 7 auf 2,7 % angestiegen war. Der Grund für die Erhöhung des Mittelwertes war, dass bei Fall 17 in P1 7,5 % Epithelzellen mit einer Trisomie 7 nachgewiesen wurden (Tabelle 9, Seite 104). Alle anderen Fälle lagen hier bei ≤ 2 %. Die Epithelzellen mit einer Trisomie 7 in den Zellkulturen aus Tumorgewebe lagen bereits in P1 unter 2 % und in P2 fielen dann auch die Epithelzellen mit einer Trisomie 7 des stark entzündlichen Bronchusgewebes wieder unter die Schwelle von 2 %.

Bei den Zellkulturen aus leicht entzündlichem Bronchusgewebe zeigten bei den Epithelzellen 33,3 % der Fälle eine Trisomie 7-Rate von über 2 %, im stark entzündlichen Bronchusgewebe 12,5 % und im Tumorgewebe 38,1 %. Bei den Nichtepithelzellen lag im leicht entzündlichen Bronchusgewebe bei 26,7 % der Fälle, im stark entzündlichen Bronchusgewebe bei 25,0 % der Fälle und im Tumorgewebe bei 27,3 % der Fälle eine erhöhte Trisomie 7-Rate vor.

Crowell et al. untersuchten nichtmalignes Bronchusgewebe, das durch Bürstenabstriche gewonnen wurde, von Patienten mit einem Lungenkarzinom und von Patienten mit einer Risikoanamnese (Rauchen und/oder Radonexposition) ohne Lungenkarzinom. An 43 % der untersuchten Stellen von 12 Patienten mit einem Lungenkarzinom wurde eine erhöhte Rate an Zellen mit einer Trisomie 7 gefunden. Dabei verteilten sich die Proben mit einer erhöhten Trisomie 7-Rate auf 8 der 12 Patienten (66,7 %). Das heißt, im Vergleich mit der vorliegenden Untersuchung trat eine erhöhte Rate an Zellen mit einer Trisomie 7 häufiger auf. Allerdings wurde dabei nicht nur histologisch normales Bronchialgewebe untersucht: Bei 14 der 42 untersuchten Stellen lagen eine Plattenepithelmetaplasie oder atypische Drüsenzellen vor. Weiterhin wurde in der Untersuchung von Crowell et al. bei einem von 4 Rauchern ohne Lungenkarzinom und bei 4 von 7 Patienten mit Radonbelastung eine erhöhte Trisomie 7-Rate beschrieben. Zwei dieser Patienten entwickelten innerhalb von zwei Jahren ein Lungenkarzinom (Crowell et al. 1996).

In der Untersuchung von Zojer et al. wurde eine numerische Aberration des Chromosoms 7 in allen untersuchten Lungenkarzinomen und in 80 % der prämaligen Läsionen gefunden. Dabei lag meist eine Tri- oder Tetrasomie vor. Die Häufigkeit der Zellen mit einer Trisomie 7 nahm von den

präinvasiven Läsionen (8,4 %) zum Lungenkarzinomgewebe (59 %) zu. Auch in der vorliegenden Untersuchung waren im Tumorgewebe mehr Epithelzellen mit einer Trisomie 7 zu verzeichnen als im entzündlichen Bronchusgewebe. Die Werte lagen jedoch für alle Gewebe deutlich niedriger als in der Arbeit von Zojer et al., in der ein Grenzwert von 1,5 % der Zellen mit einer Trisomie 7 angenommen wurde (Zojer et al. 2000).

Lee et al. wiesen bei 4 von 10 Patienten Zellen mit einer Trisomie 7 in normalem Bronchusgewebe und bei 6 von 10 Patienten im Tumorgewebe nach (Lee et al. 1987).

Es wird diskutiert, dass eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors, der auf Chromosom 7 codiert wird, zu einem Wachstumsvorteil derjenigen Zellen führt, die ein zusätzliches Chromosom 7 haben (Lee et al. 1987, Crowell et al. 1996). Eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors wurde von Jeon et al. bei 53 % der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome beschrieben und konnte bei den Plattenepithelkarzinomen signifikant häufiger nachgewiesen werden als bei den Adenokarzinomen (Jeon et al. 2006).

In der vorliegenden Studie fand sich bereits im entzündlichen Bronchusgewebe in P0 für die Epithelzellen eine erhöhte Trisomie 7-Rate, die im Tumorgewebe weiter zunahm. Es ergab sich keine Korrelation mit dem Schweregrad der Entzündung. Im Gegensatz zur Tetra- und Aneuploidie lagen auch bei den Nichtepithelzellen erhöhte Raten an Zellen mit einer Trisomie 7 vor, auch wenn sämtliche Mittelwerte der Anzahl an Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 7 in allen Passagen unter 2 % lagen.

Numerische Aberrationen von Chromosom 8 in Lungentumorgewebe werden deutlich seltener beschrieben als die von Chromosom 7. Kubokura et al. beschreiben numerische Aberrationen von Chromosom 8 in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen. Hierbei wird eine mittlere Aberrationsrate von 38,5 % beschrieben. Außerdem wurde in diesen Arbeiten eine Amplifikation von *c-MYC* gefunden (Kubokura et al. 1999, 2001). Das Proto-Onkogen *c-MYC* liegt auf dem langen Arm von Chromosom 8 und spielt eine Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung, Zellzykluskontrolle und Apoptose. Auch Yakut et al. untersuchten eine Polysomie 8 in Zusammenhang mit einer *c-MYC*-Amplifikation und konnten eine Trisomie 8 bei 5,8 % und eine *c-MYC*-Amplifikation bei 7,8 % der untersuchten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome nachweisen (Yakut et al. 2003). In einer weiteren Studie untersuchten Schenk et al. numerische Aberrationen in Lungenkarzinomen von unterschiedlichen Chromosomen, darunter auch Chromosom 8. Es wurden

Zellen mit einer mittleren Kopienzahl von Chromosom 8 von 3 bis 5,7 gefunden und das bei allen untersuchten Karzinomen (Schenk et al. 1997).

In der vorliegenden Studie lassen sich die relativ hohen Zahlen von Kubokura et al. und Schenk et al. nicht bestätigen. Im entzündlichen Bronchusgewebe lag die Rate an Epithel- sowie Nichtepithelzellen mit einer Trisomie 8 ebenso wie die der Nichtepithelzellen des Tumorgewebes im Mittel unter 1,0 %. Bei den Epithelzellen des Tumorgewebes lag die Rate in P0 und P1 im Mittel bei circa 2,0 % und in P2 bei 1,0 %. Damit lagen bei Chromosom 8 weniger hohe Schwankungen vor als bei Chromosom 7.

5.2.4 Zentrosomamplifikation und multipolare Mitosen

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich bei allen drei Geweben sowohl diploide, als auch tetraploide Zellen mit amplifizierten Zentrosomen. Dabei war die Zahl der tetraploiden Zellen mit amplifizierten Zentrosomen jeweils signifikant höher als die der diploiden mit amplifizierten Zentrosomen. Im leicht entzündlichen Bronchialgewebe lagen im Mittel bei 32,7 % der tetraploiden Zellen amplifizierte Zentrosomen vor, im stark entzündlichen Gewebe bei 39,8 % und im Tumorgewebe bei 33,9 %. Darüber hinaus konnten bereits im entzündlichen Bronchusgewebe multipolare Mitosen nachgewiesen werden. Im leicht entzündlichen Bronchusgewebe fanden sich bei 28,6 % der Fälle multipolare Mitosen, im stark entzündlichen Bronchusgewebe bei 71,4 % und im Tumorgewebe bei 50,0 %.

Das Entstehen tetraploider Zellen gilt als früher Schritt in der Tumorgenese. Tetraploide Zellen tragen ein hohes Risiko bei weiteren Zellteilungen aneuploid zu werden. Auf Grund ihrer amplifizierten Zentrosomen können sie multipolare Spindeln ausbilden, die zu aneuploiden Tochterzellen führen (Ganem et al. 2009). Cortez et al. beschrieben, dass in kultivierten Bronchialkarzinomzellen durch Inkubation mit Asbestfasern über Zentrosomamplifikation und multipolare Mitosen aneuploide Zellen entstehen. Dabei traten auch vermehrt tetraploide Zellen auf (Cortez et al. 2011).

Auch der erhöhte DNA-Gehalt der tetraploiden Zellen verstärkt das Risiko für DNA-Schäden und die Reparatur dauert länger, was Storchova et al. an tetraploiden Hefezellen nachweisen konnten (Storchova et al. 2006). Es gibt Hinweise, dass dies auch bei Säugetierzellen eine Rolle spielen könnte (Fujiwara et al. 2005, Hau et al. 2006, Ganem et al. 2007). Ebenso konnten Yang et al.

zeigen, dass Mitosen mit zusätzlichen Zentrosomen oder Chromosomen länger dauern (Yang et al. 2008).

In seltenen Fällen können durch eine multipolare Mitose (tetrapolar) aus einer tetraploiden Zelle diploide Zellen entstehen. Dies nennt man Reduktionsmitose und ist ein bisher kaum verstandener Prozess (Wang et al. 2003, Storchova und Pellmann 2004). Außerdem können einige Zellen sich an die erhöhte Zentrosomanzahl anpassen, indem diese an den Spindelpolen "geclustert" und so überzählige Zentrosomen inaktiviert werden, so dass sich eine bipolare Spindel ausbilden kann (Storchova und Pellmann 2004, Quintyne et al. 2005).

Normalerweise hat eine Zelle ein Zentrosom, das vor der Mitose verdoppelt wird. Diese beiden Zentrosomen bilden eine bipolare Spindel aus, die für die regelrechte Teilung der Schwesterchromatiden verantwortlich ist. Eine erhöhte Anzahl an Zentrosomen kann im Rahmen der Tetra- bzw. Polyploidisierung entstehen. Ganz gleich durch welchen Mechanismus die tetraploiden Zellen entstehen, wird dabei nicht nur der DNA-Gehalt verdoppelt, sondern auch die Anzahl der Zentrosomen (Borel et al. 2002, Davoli und de Lange 2011). Ein zweiter Mechanismus beinhaltet, dass das Zentrosom mehr als ein Mal während eines Zellzyklus verdoppelt wird. Hierbei entsteht eine Zentrosomamplifikation bei diploidem Chromosomensatz (Nigg 2002, Fukasawa 2005). Bourke et al. stellten fest, dass eine DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung über eine Zentrosomverdoppelung zu amplifizierten Zentrosomen führt (Bourke et al. 2007). Ebenfalls beschrieben als Ursache für amplifizierte Zentrosomen sind ein unkontrolliertes Splitting des Zentriolenpaares, so dass Zentrosomen mit nur einem Zentriol entstehen (Hut et al. 2003), sowie die De-novo-Synthese von Zentrosomen (Khodjakov et al. 2002). Unabhängig vom Entstehungsweg führen zu viele Zentrosomen zur Ausbildung von multipolaren Spindeln, was zum einen zu einer Fehlverteilung der Chromosomen in den Tochterzellen führt, und zusätzlich auch zu DNA-Strangbrüchen führen kann (Doxsey 1998). Das Ergebnis sind aneuploide Zellen.

Diese Mechanismen müssen sich nicht gegenseitig ausschließen. Nigg postulierte 2002 als wahrscheinlichsten Weg, dass es über eine Deregulation von Genen, die im Zusammenhang mit der Zentrosomamplifikation beschrieben wurden, zu einer Beeinflussung des Zellzyklus kommt, der dann in einer abortiven Mitose mündet. Der Phänotyp der entstehenden Zelle ist dann durch zu viele Chromosomen und Zentrosomen charakterisiert (Nigg 2002). Dies wird durch die Feststellung unterstützt, dass die Bildung von tetraploiden Zellen häufiger der von aneuploiden Zellen in soliden

Tumoren vorausgeht (siehe oben, Shackney et al. 1989, Galipeau et al. 1996, Olaharski et al. 2006).

Die Ergebnisse von Meraldi et al. unterstützen ebenfalls diese Hypothese: Im Zellkulturmodell führt eine Aurora A-Überexpression zu einer fehlerhaften Zytokinese und dadurch zu dem Entstehen von tetraploiden Zellen mit amplifizierten Zentrosomen. Zuvor konnte ausgeschlossen werden, dass die Zentrosomamplifikation durch eine direkte Wirkung der Aurora A-Überexpression entstanden war (Meraldi et al. 2002). Der Entstehungsmechanismus der überzähligen Zentrosomen auf dem Weg der abortiven Mitose wird auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung unterstützt: Tetraploide Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen traten signifikant häufiger auf als diploide. Im leicht entzündlichen Bronchusgewebe zeigten im Mittel 32,7 % der tetraploiden Zellen amplifizierte Zentrosomen, im stark entzündlichen Bronchusgewebe 39,8 % und im Tumorgewebe 33,9 %. Diploide Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen traten deutlich seltener auf: Im leicht entzündlichen Bronchusgewebe waren im Mittel bei 4,1 % der diploiden Zellen amplifizierte Zentrosomen zu finden, im stark entzündlichen Bronchusgewebe bei 4,5 % und im Tumorgewebe bei 3,0 %.

Hier wäre zu postulieren, dass diese über den Mechanismus der Zentrosomverdoppelung ohne Verdopplung der Chromosomen entstanden sind. Dieser Weg wird von Tarapore und Fukasawa favorisiert. Sie beschreiben, dass in diploiden Zellen einer Kultur aus *P53*-negativen Mausembryofibroblasten (MEF) mehr als drei Zentrosomen auftraten. Da es unwahrscheinlich ist, dass diese Zellen eine abortive Mitose durchlaufen und sich danach in diploide Zellen geteilt haben, schließen die Autoren daraus, dass die normale Regulation der Zentrosomverdoppelung in *P53*-negativen Zellen aufgehoben ist. Die Zentrosomamplifikation entsteht dann durch mehrfache Verdoppelung der Zentrosomen in einem Zellzyklus (Tarapore und Fukasawa 2002). Dies scheint in der vorliegenden Untersuchung aber nur auf einen geringen Anteil der Zellen zuzutreffen, da insgesamt nur wenig diploide Zellen mit amplifizierten Zentrosomen gefunden wurden.

Zellen mit amplifizierten Zentrosomen stellen also einen Pool für die Entstehung aneuploider Zellen dar. Entweder kommt es über eine multipolare Mitose zur Fehlverteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen, oder die amplifizierten Zentrosomen werden an zwei Spindelpolen zu "Clustern" zusammengefasst und es bildet sich eine pseudo-bipolare Spindel aus. Dadurch können die Chromosomen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden (Storchova und Pellman 2004, Fukasawa 2005). Trotzdem führen diese pseudo-bipolaren Mitosen häufig zu einer Fehlverteilung der einzelnen Chromosomen. Wenn sich eines oder einige wenige der amplifizierten Zentrosomen

nicht in der bipolaren Achse anordnen und Spindeln ausbilden, die an Chromosomen binden, werden diese dann entweder der einen oder der anderen Tochterzelle zugeteilt (Fukasawa 2005).

Zentrosomamplifikation ist in einer Vielzahl solider Tumoren, auch der Lunge (Fukasawa 2005, Pihan et al. 1998), und präinvasiven Karzinomen (Pihan et al. 2003) nachweisbar. Koutsami et al. untersuchten Gewebeproben von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und beschrieben in den Tumorproben eine erhöhte Anzahl an Zentrosomen, die mit dem Auftreten von aneuploiden Zellen korreliert war. Die Autoren konnten auch amplifizierte Zentrosomen in benachbartem, hyperplastischen Gewebe, nicht aber in den normalen Gewebeproben nachweisen (Koutsami et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse beschreiben auch Jung et al. Die Autoren fanden in circa einem Drittel der untersuchten Gewebeproben von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen Auffälligkeiten der Zentrosomen in Anzahl, Größe und Form. Ebenso konnten Zentrosomauffälligkeiten in normalem, dem Tumor benachbartem Gewebe nachgewiesen werden. Nahezu alle Tumorproben mit Zentrosomauffälligkeiten waren aneuploid, während nur die Hälfte der Tumoren ohne Zentrosomauffälligkeit eine Aneuploidie zeigten (Jung et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse fanden sich in der vorliegenden Untersuchung: Bei allen untersuchten Tumorgeweben konnten Zellen mit einer Zentrosomamplifikation nachgewiesen werden. Dabei zeigten die tetraploiden Zellen signifikant häufiger amplifizierte Zentrosomen als die diploiden Zellen.

Pihan et al. untersuchten 1998 Tumor- und benachbartes Gewebe und konnten im gesunden Bronchusgewebe keine Veränderung der Zentrosomen nachweisen (Pihan et al. 1998). Dies steht im Gegensatz zu der vorliegenden Untersuchung. Hier wurden sowohl diploide als auch tetraploide Zellen mit amplifizierten Zentrosomen im nicht tumorösen, entzündlichen Gewebe gefunden. Die diploiden Zellen mit zusätzlichen Zentrosomen waren dabei allerdings, sowohl im Tumor- als auch im entzündlichen Bronchusgewebe, nur selten zu finden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der vorliegenden Untersuchung typische Charakteristika eines Tumorgewebes, wie Tetra- und Aneuploidie, Zentrosomamplifikation und multipolare Mitosen bereits in Zellkulturen aus entzündlichem Gewebe nachgewiesen werden konnten.

Es ist bekannt, dass der Verlust der *P53*-Funktion das Auftreten von Zellen mit zusätzlichen Zentrosomen unterstützt (Nigg 2002). 1996 beschrieben Fukasawa et al., dass der Verlust von *P53* zu amplifizierten Zentrosomen führt (Fukasawa et al. 1996). Dies konnte von Meraldi et al. nachvollzogen werden (Meraldi et al. 2002). Ebenso wurde eine Korrelation zwischen *P53*-

Mutationen und dem Auftreten von Zentrosomamplifikation bei fortgeschrittenen, duktalem Mammakarzinomen und Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals festgestellt (Carroll et al. 1999). Wie bereits weiter oben beschrieben, wurde gezeigt, dass die Überexpression von Aurora A und anderer mitotischer Kinasen eine Zentrosomamplifikation verursachen, in dem sie die Zellteilung unterbrechen. Dabei entstehen polyploide Zellen mit überzähligen Zentrosomen. Es ist bemerkenswert, dass diese Zellen in *P53*-wildtyp MEF-Kulturen nicht weiter proliferieren und es hingegen in *P53*-knock-out Kulturen tun. Außerdem entwickelten *P53*-negative MEF nach Transfektion mit Aurora A, Aurora B oder Plk1 deutlich häufiger amplifizierte Zentrosomen als wildtyp-MEF (Meraldi et al. 2002).

Zusammengefasst kann eine abortive Zellteilung zu einer tetraploiden Zelle mit vermehrten Zentrosomen führen, die nur vor einem *P53*-negativen Hintergrund weiter proliferieren kann. Bei intaktem *P53* werden diese Zellen in G1 arretiert und am Eintreten in die S-Phase gehindert. Es handelt sich hier um den bereits oben beschriebenen *P53*-abhängigen Kontrollpunkt (Lanni und Jacks 1998, Andreassen et al. 2001, Borel et al. 2002).

Dazu kontroverse Beobachtungen hat die Untersuchung von Yi et al. ergeben. Sie konnten an menschlichen Tumorzell-Linien und MEF zeigen, dass die fehlende *P53*-Funktion keinen Effekt auf das Schicksal von tetraploiden Zellen hat. Insbesondere führte die fehlende *P53*-Funktion nicht zum Zelltod der tetraploiden Zellen. Der Verlust der *P53*-Funktion unterstützt vielmehr das Auftreten von multipolaren Mitosen tetraploider Zellen, in dem das "Clustern" der zusätzlichen Zentrosomen verhindert wird (Yi et al. 2011). Diese Ergebnisse sind kongruent mit denen von Uetake und Sluder, sowie von Wong und Stearns, die besagen, dass es keinen "Tetraploidie-Kontrollpunkt" gibt (Uetake und Sluder 2004, Wong und Stearns 2005). Dies könnte auch die Beobachtung erklären, dass die tetraploiden Zellen in der vorliegenden Untersuchung im entzündlichen Bronchusgewebe im Verlauf der Passagen zunehmen. Die *p53*-Funktion scheint notwendig zu sein, um das Auftreten von aneuploiden Zellen zu verhindern. Über welchen Mechanismus dies geschieht, bleibt vorerst unklar.

5.2.5 Schlussfolgerung und Perspektive

Auf Grund der gezeigten Ergebnisse lassen sich die anfangs gestellten Fragen beantworten:

1. Bereits im entzündlichen Bronchusgewebe ließen sich vor allem tetraploide, aber auch aneuploide Epithelzellen nachweisen. Im Tumorgewebe nahmen die tetra- und aneuploiden Epithelzellen dann an Häufigkeit zu.
2. Bezüglich des Tetra- und Aneuploidiegrades in den Zellkulturen von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, wobei bei den Adenokarzinomen tendenziell mehr tetra- und aneuploide Epithelzellen auftraten.
3. Tetra- und Aneuploidie traten nahezu ausschließlich bei den Epithelzellen auf, wohingegen erhöhte Raten an Zellen mit einer Trisomie 7 sowohl bei den Epithel- als auch bei den Nichtepithelzellen zu finden waren.
4. Im Verlauf der Zellkultur-Passagen stieg der Tetraploidiegrad der Epithelzellen im leicht entzündlichen Bronchusgewebe signifikant und im stark entzündlichen Bronchusgewebe tendenziell an. Der Aneuploidiegrad der Epithelzellen stieg sowohl im leicht, als auch im stark entzündlichen Bronchusgewebe signifikant an. Im Tumorgewebe fiel der Tetra- und insbesondere der Aneuploidiegrad der Epithelzellen im Zuge der Passagen tendenziell ab.
5. Weitere Phänomene, die mit der Entstehung tetra- und aneuploider Zellen assoziiert sind, wie Zentrosomamplifikation und Auftreten multipolarer Mitosen, konnten bereits im entzündlichen Bronchialgewebe nachgewiesen werden.
6. Es konnten sowohl bei Epithel- als auch bei Nichtepithelzellen erhöhte Trisomie 7-Raten im entzündlichen Bronchusgewebe und im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Erhöhte Raten an Zellen mit einer Trisomie 8 ließen sich nicht nachweisen.
7. Tetra- und Aneuploidie nahmen mit der Progression der Entzündung zu. Außerdem stieg die Anzahl an multipolaren Mitosen tendenziell mit dem Grad der Entzündung an. Keine Korrelation mit dem Entzündungsgrad ergab sich für die Zentrosomamplifikation und die Trisomie 7.

Mit der vorliegenden Untersuchung konnte die Hypothese unterstützt werden, dass im Rahmen der Entstehung des Bronchialkarzinoms aneuploide Zellen aus tetraploiden Vorläuferzellen entstehen.

Die tetraploiden Zellen waren bereits im entzündlichen Bronchialgewebe nachweisbar und nahmen mit dem Grad der Entzündung zu. Im Tumorgewebe traten dann auch gehäuft aneuploide Zellen auf. Kennzeichen des Tumorgewebes wie Trisomie 7, Zentrosomamplifikation und multipolare Mitosen waren bereits im entzündlichen Bronchialgewebe nachweisbar (Abbildung 62).

Tetraploide Zellen entstehen dabei als Reaktion auf den chronischen Entzündungsreiz. Durch multipolare Mitosen, die sich auf Grund amplifizierter Zentrosomen ausbilden, können dann im Verlauf aneuploide Zellen entstehen.

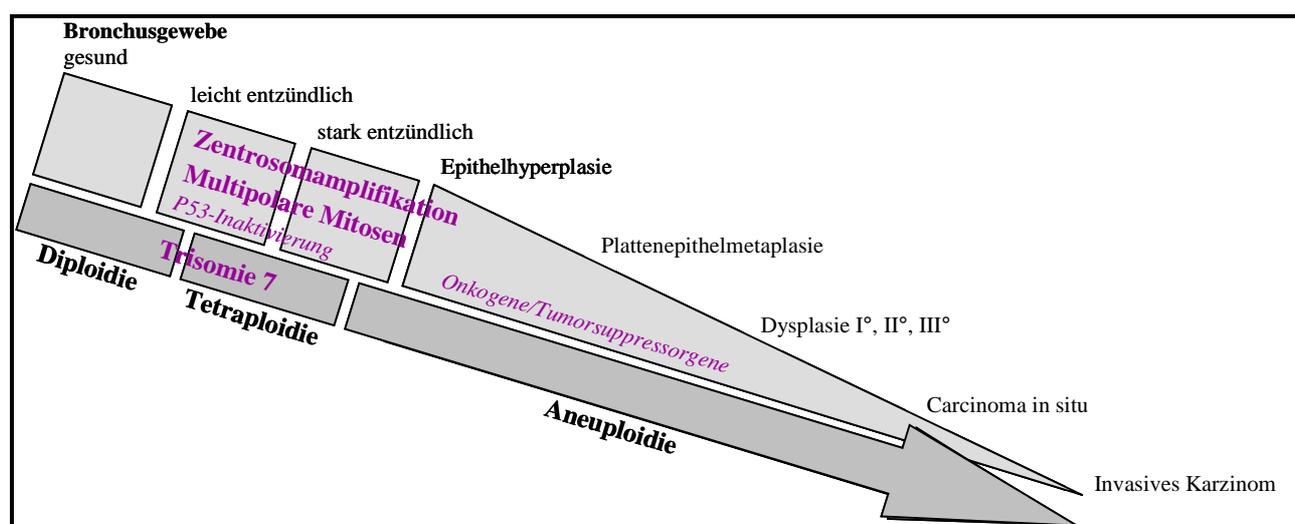


Abbildung 62:

Genetische Veränderungen im Zuge der zunehmenden histopathologischen Veränderungen, ausgehend von gesundem Bronchusgewebe bis hin zum invasiven Bronchialkarzinom.

Die Prognose des Bronchialkarzinoms ist trotz aller Fortschritte weiterhin sehr schlecht. Die Diagnose wird oft erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien gestellt, so dass eine Früherkennung sehr wichtig erscheint. Da die genetischen Veränderungen wie Tetraploidie, Zentrosomamplifikation, multipolare Mitosen und Trisomie 7 bereits im entzündlichen Bronchusgewebe auftreten, könnten diese Parameter nach weiteren Untersuchungen mit größerem Probenumfang eventuell zukünftig zur Früherkennung von Läsionen, die ein hohes Risiko zur Entwicklung eines Bronchialkarzinoms tragen, genutzt werden.

6 Anhang

6.1 Geräte

- Brutschrank Heraeus Instruments Function Line, Hanau, DE
- Fluoreszenzmikroskop Axioskop I, Zeiss, Jena, DE
- Filterset 00, Anregungswellenlänge: 530 - 585 nm; Emissionswellenlänge: > 615 nm Zeiss, Jena, DE
- Filterset 01, Anregungswellenlänge: 353 -377 nm; Emissionswellenlänge: > 397 nm, Zeiss, Jena, DE
- Filterset 09, Anregungswellenlänge: 450 - 490 nm; Emissionswellenlänge: > 515 nm, Zeiss, Jena, DE
- Filterset 25, Anregungswellenlänge 400 + 495 + 570 nm; Emissionswellenlänge: 460 + 530 + 625 nm, Zeiss, Jena, DE
- Heizplatte Heidolph MR 3001, Schwabach, DE
- Mikroskopkamera MC100 Spot, Zeiss, Jena, DE
- Schüttler Cellosaker Variospeed Variotime, Renner GmbH, Darmstadt, DE
- Sterilwerkbank Modell Laminair, Heraeus, Hanau, DE
- Vortex L46, GLW, Würzburg, DE
- Zentrifuge Hermle Z400K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, DE
- Zellkulturmikroskop Axiovert 25, Zeiss, Jena, DE

6.2 Materialien

6.2.1 Verbrauchsmaterialien

	Firma	Standort	Artikelnummer
Anti-Digoxigenin-Cy3 TM	Dianova	Hamburg, DE	200-162-156
Blocking-Reagens	Boehringer	Mannheim, DE	1096176
BSA	Boehringer	Mannheim, DE	238040
Chromosome 7 α -Satellite (D7Z1)	oncor	Gaithersburg, US	P5011-DG.5
Chromosome 8 α -Satellite (D8Z2)	oncor	Gaithersburg, US	P5013-B.5
Collagenase Typ II	Gibco BRL	Karlsruhe, DE	17 101-015
DABCO	Sigma	München, DE	D 2522
DAPI	Sigma	München, DE	D 9542
Deckgläser 18 x 18 mm	Menzel-Gläser	Braunschweig, DE	BB018018A1
DMEM/HAM's F12	PAA Laboratories	Cölbe, DE	E 15-813
EGF	Sigma	München, DE	E-4127
Fixogum rubber cement	Marabu-Werke	Tamm, DE	290117000
FCS	PAA Laboratories	Cölbe, DE	A 15-042
Formaldehyd 37 %	Roth	Karlsruhe, DE	4979.2
Formamid	Roth	Karlsruhe, DE	6749.2
Glycerin	Roth	Karlsruhe, DE	3783.1

	Firma	Standort	Artikelnummer
Goat-anti-mouse-Cy3 TM	Dianova	Hamburg, DE	115-165-062
Hydrocortison	Sigma	München, DE	H-0396
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe, DE	6781.1
Monoclonal anti γ -Tubulin; Clone GTU-88; mouse ascites fluid	Sigma	Saint Louis, US	T 6557
Monoclonal mouse anti-human cytokeratin, AE1/AE3	DAKO	Carpinteria, US	M3515
Natriumazid	Roth	Karlsruhe, DE	K 305.1
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe, DE	3957.1
Natriumhydroxid	Roth	Karlsruhe, DE	6771.1
Objektträger 26 mm x 76 mm	Menzel-Gläser	Braunschweig, DE	AA00000112E
Paraformaldehyd	Fluka Chemika	Buchs, CH	76240
PBS	Oxoid	Wesel, DE	BR14a
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories	Cölbe, DE	P 11-010
QuadriPerm plus	Heraeus	Hanau, DE	261 3690 7
Salzsäure	Roth	Karlsruhe, DE	4625.1
Streptavidin-FITC	Vector/Camon	Wiesbaden, DE	SA-5001
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth	Karlsruhe, DE	3580.1
Tris	Roth	Karlsruhe, DE	4855.2
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories	Cölbe, DE	L 11-004

	Firma	Standort	Artikelnummer
Tween [®] 20	Roth	Karlsruhe, DE	9127.2
Zellkulturflaschen, 25 cm ² mit Filter-Schraubverschluss	Greiner	Frickenhausen, DE	690 175
Zentrifugenröhrchen, 14 ml	GLW	Würzburg, DE	KU 06
Zitronensäure	Roth	Karlsruhe, DE	6490.1

6.2.2 Vorbereitung der Objektträger für die Zellkultur

Die Glasobjektträger (26 mm x 76 mm; Menzel-Gläser, Braunschweig) wurden in Objektträgerschaukeln angeordnet, die in einem 2 l-Becherglas übereinander gestapelt wurden. Dieses wurde mit Seifenwasser gefüllt und die Objektträger über Nacht (bis maximal 24 h) darin belassen. Danach wurden die Objektträger 2 h fließend mit Leitungswasser gewässert und anschließend 1 h in 1%iger HCl (Salzsäure, Roth, Karlsruhe) gelagert. Es folgte erneut eine zweistündige Wässerung, der sich eine Lagerung in 1%igem NaOH (Natriumhydroxid, Roth, Karlsruhe) für 1 h anschloss. Die Objektträger wurden wieder 2 h fließend gewässert, anschließend in H₂O_{dd} und dann in Ethanol 96 % gespült. Danach wurden die Objektträger über Nacht bei RT getrocknet. Die getrockneten Objektträger wurden in Aluminiumfolie gepackt und bei 200 °C für 2 h im Backofen sterilisiert.

6.3 Verbrauchslösungen

- **Herstellung des Zitratpuffers (20xSSC)**

Der Zitratpuffer wurde immer als Stammlösung in 20-facher Konzentration angesetzt. Dazu wurden 3 mol Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe) und 0,3 mol Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Roth, Karlsruhe) in 1 l H₂O_{dd} gelöst und anschließend mit Zitronensäure (1 M) (Roth, Karlsruhe) ein pH von 7 eingestellt. Um die benötigte Arbeitskonzentration zu erhalten, wurde diese Stammlösung dann kurz vor Gebrauch mit H₂O_{dd} verdünnt.

- **4xSSC/0,5 % Tween[®]**

20xSSC wurde 1:5 verdünnt und anschließend mit Zitronensäure ein pH von 7 eingestellt. Zu 100 ml 4xSSC wurden 500 µl Tween[®] 20 (Roth, Karlsruhe) zugegeben.

-
- **PBS/0,05 % Tween[®]**
Zu 100 ml PBS wurden 50 µl Tween[®] 20 zugegeben.
 - **PBS/0,1 % BSA**
Zu 100 ml PBS wurden 100 mg BSA (Boehringer, Mannheim) zugegeben.
 - **Paraformaldehyd 4 % in PBS**
Es wurden 4 g Paraformaldehyd (Fluka Chemika, Buchs) in 100 ml PBS bei circa 60 °C unter ständigem Rühren gelöst.
 - **Blocking-Reagens 0,5 % in 4xSSC**
Es wurden 0,5 g Blocking-Reagens (Boehringer, Mannheim) in 20 ml 20xSSC und 80 ml H₂O_{dd} bei circa 40 °C gelöst und anschließend nach dem Abkühlen sterilfiltriert.
 - **Antifade**
2 g DABCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan; Sigma, München) wurden bei 60 °C im Wasserbad in 90 ml Glycerin (Roth, Karlsruhe) gelöst. Es wurden 10 ml Tris (1 M; pH 7; Roth, Karlsruhe) und 100 µl 20%iges Natriumazid (Roth, Karlsruhe) hinzugefügt. Nach ausführlichem Mischen wurde das Antifade sterilfiltriert.
 - **DAPI/Antifade**
Als Stammlösung wurde 1 µg DAPI in 1 ml Antifade, das auf circa 40 °C erwärmt wurde, gelöst, anschließend gemischt und bei +4 °C aufbewahrt.
 - **Kulturmedium**
Das Basalmedium DMEM HAM's F12 wurde mit folgenden Substanzen supplementiert:
2 % Penicillin/Streptomycin (PAA, Cölbe), 0,1 % EGF (Sigma, München), 0,2 % Hydrocortison (Sigma, München) und 10 % FCS (PAA, Cölbe).

leicht entzündliches Bronchusgewebe P0													
Epithelzellen							Nichtepithelzellen						
Fall-Nr.	Entz-grad	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt
10	1	93,5	2,0	0,5	2,0	2,0	4,0	96,0	3,0	0,5	0,5	0,0	0,5
11	1	94,0	3,0	0,3	2,5	0,3	2,8	98,3	1,0	0,5	0,3	0,0	0,3
12	1	95,0	2,5	1,0	1,5	0,0	1,5	95,5	2,0	0,0	2,5	0,0	2,5
13	1	91,0	2,0	0,0	6,0	1,0	7,0	81,7	0,0	0,0	16,8	1,5	18,3
18	0 bis 1	91,8	0,8	0,0	6,2	1,2	7,3	95,3	1,0	0,0	2,3	1,5	3,8
19	1	87,5	2,5	0,5	6,5	3,0	9,5	93,5	3,0	2,0	1,5	0,0	1,5
24	1	93,3	2,3	0,7	3,3	0,3	3,7	98,7	0,7	0,7	0,0	0,0	0,0
25	0	99,0	0,0	0,0	0,5	0,5	1,0	91,5	3,0	1,5	2,0	1,5	3,5
26	0	95,3	0,5	0,8	2,5	1,0	3,5	95,0	0,0	1,0	4,0	0,0	4,0
27	0 bis 1	89,0	1,5	1,0	7,5	1,0	8,5	95,0	0,5	1,5	2,5	0,5	3,0
28	0 bis 1	98,5	0,5	0,0	1,0	0,0	1,0	97,0	1,0	0,0	1,5	0,5	2,0
29	0 bis 1	98,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	98,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0
30	1	86,5	0,0	2,0	9,5	2,0	11,5	95,0	2,5	1,0	1,5	0,0	1,5
32	1	86,0	2,5	1,5	7,5	2,5	10,0	95,6	0,1	0,1	3,3	0,9	4,1
33	1	95,0	0,0	0,0	3,0	2,0	5,0	96,0	0,8	0,0	1,8	1,5	3,3
	MW	92,9	1,5	0,5	4,0	1,1	5,1	94,8	1,3	0,6	2,8	0,5	3,3
	SD	4,2	1,1	0,6	3,0	1,0	3,7	4,1	1,1	0,7	4,0	0,7	4,4
	SEM	1,1	0,3	0,2	0,8	0,3	0,9	1,0	0,3	0,2	1,0	0,2	1,1

Tabelle 5:

Leicht entzündliches Bronchusgewebe der Passage 0. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

leicht entzündliches Bronchusgewebe P1

Epithelzellen

Nichtepithelzellen

Fall-Nr.	Entz-grad	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt
10	1	90,0	4,0	0,0	6,0	0,0	6,0	95,0	0,5	0,0	4,5	0,0	4,5
11	1	Zellkultur nur bis P0											
12	1	88,0	1,0	0,0	11,0	0,0	11,0	98,0	0,0	0,5	1,5	0,0	1,5
13	1	96,0	0,0	0,0	4,0	0,0	4,0	97,3	0,5	0,0	2,3	0,0	2,3
18	0 bis 1	90,5	0,0	2,0	7,5	0,0	7,5	95,5	1,0	0,5	2,0	1,0	3,0
19	1	90,5	0,5	2,0	5,0	2,0	7,0	95,0	0,5	0,0	3,5	1,0	4,5
24	1	87,0	1,5	1,5	10,0	0,0	10,0	92,0	2,0	4,0	1,0	1,0	2,0
25	0	Zellkultur nur bis P0											
26	0	Zellkultur nur bis P0											
27	0 bis 1	Zellkultur nur bis P0											
28	0 bis 1	98,0	0,0	0,0	2,0	0,0	2,0	97,5	0,0	0,0	2,0	0,5	2,5
29	0 bis 1	Zellkultur nur bis P0											
30	1	79,5	2,0	0,0	12,0	6,5	18,5	96,0	0,0	0,0	4,0	0,0	4,0
32	1	84,5	2,5	1,5	11,0	0,5	11,5	94,5	2,0	0,0	3,0	0,5	3,5
33	1	90,0	1,5	0,0	7,5	1,0	8,5	96,0	0,3	0,2	2,7	0,8	3,5
	MW	89,4	1,3	0,7	7,6	1,0	8,6	95,7	0,7	0,5	2,6	0,5	3,1
	SD	5,3	1,3	0,9	3,4	2,0	4,6	1,7	0,8	1,2	1,1	0,5	1,0
	SEM	1,7	0,4	0,3	1,1	0,6	1,5	0,6	0,2	0,4	0,4	0,1	0,3

Tabelle 6:

Leicht entzündliches Bronchusgewebe der Passage 1. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

leicht entzündliches Bronchusgewebe P2

Epithelzellen

Nichtepithelzellen

Fall-Nr.	Entz-grad	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt
10	1	Zellkultur nur bis P1											
11	1	Zellkultur nur bis P0											
12	1	85,5	0,0	1,0	13,0	0,5	13,5	98,0	0,0	0,0	2,0	0,0	2,0
13	1	83,0	0,0	0,0	15,0	2,0	17,0	96,2	0,0	0,3	3,2	0,3	3,5
18	0 bis 1	81,5	1,5	0,0	13,0	4,0	17,0	94,3	0,2	0,2	5,2	0,2	5,3
19	1	75,0	1,0	1,5	16,0	6,5	22,5	95,0	1,5	0,0	3,5	0,0	3,5
24	1	96,0	1,0	0,5	2,5	0,0	2,5	95,5	1,5	1,0	2,0	0,0	2,0
25	0	Zellkultur nur bis P0											
26	0	Zellkultur nur bis P0											
27	0 bis 1	Zellkultur nur bis P0											
28	0 bis 1	81,0	0,0	0,0	17,0	2,0	19,0	99,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0
29	0 bis 1	Zellkultur nur bis P0											
30	1	87,0	0,5	1,0	9,0	2,5	11,5	97,0	0,0	0,0	2,0	1,0	3,0
32	1	91,0	0,0	0,0	9,0	0,0	9,0	98,0	1,0	0,5	0,0	0,5	0,5
33	1	90,0	1,0	2,0	7,0	0,0	7,0	96,8	0,2	0,3	2,2	0,5	2,7
	MW	85,6	0,6	0,7	11,3	1,9	13,2	96,6	0,5	0,3	2,3	0,3	2,6
	SD	6,3	0,6	0,8	4,8	2,2	6,3	1,5	0,7	0,3	1,5	0,3	1,5
	SEM	2,1	0,2	0,3	1,6	0,7	2,1	0,5	0,2	0,1	0,5	0,1	0,5

Tabelle 7:

Leicht entzündliches Bronchusgewebe der Passage 2. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

stark entzündliches Bronchusgewebe P0

Epithelzellen

Nichtepithelzellen

Fall-Nr.	Entz-grad	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt
14	1 bis 2	92,0	2,0	0,5	5,5	0,0	5,5	94,0	2,0	1,5	2,5	0,0	2,5
15	1 bis 2	90,0	5,5	0,0	3,5	1,0	4,5	94,0	1,5	0,0	3,5	1,0	4,5
16	2 bis 3	91,0	1,0	0,5	7,0	0,5	7,5	96,5	2,0	0,0	1,5	0,0	1,5
17	3	91,3	2,0	0,3	5,3	1,3	6,5	95,0	2,5	0,5	1,5	0,5	2,0
20	1 bis 2	90,5	0,0	0,5	9,0	0,0	9,0	97,8	0,5	0,5	1,3	0,0	1,3
21	2	90,5	1,0	0,5	8,0	0,0	8,0	93,0	2,5	1,0	2,5	1,0	3,5
22	2	89,5	0,0	1,5	9,0	0,0	9,0	99,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
34	2	94,7	0,9	0,9	3,3	0,3	3,5	94,8	1,7	0,3	1,8	1,5	3,3
	MW	91,2	1,5	0,6	6,3	0,4	6,7	95,5	1,7	0,5	1,8	0,5	2,3
	SD	1,6	1,8	0,4	2,3	0,5	2,1	2,1	0,7	0,5	1,0	0,6	1,4
	SEM	0,6	0,6	0,2	0,8	0,2	0,7	0,7	0,2	0,2	0,4	0,2	0,5

Tabelle 8:

Stark entzündliches Bronchusgewebe der Passage 0. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

stark entzündliches Bronchusgewebe P1

Epithelzellen

Nichtepithelzellen

Fall-Nr.	Entz-grad	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	
14	1 bis 2	87,0	1,5	1,0	8,0	2,5	10,5	95,0	0,8	0,3	4,0	0,0	4,0	
15	1 bis 2	zu wenig Epithelzellen							89,8	0,8	0,0	9,0	0,5	9,5
16	2 bis 3	92,0	1,0	0,5	6,5	0,0	6,5	95,5	1,0	0,0	3,5	0,0	3,5	
17	3	85,0	7,5	1,0	5,0	1,5	6,5	96,8	1,8	0,3	1,3	0,0	1,3	
20	1 bis 2	85,5	1,5	1,0	9,0	3,0	12,0	97,0	2,0	0,0	1,0	0,0	1,0	
21	2	Zellkultur nur bis P0												
22	2	93,0	2,0	0,0	5,0	0,0	5,0	97,5	1,0	0,0	0,5	1,0	1,5	
34	2	Zellkultur nur bis P0												
	MW	88,5	2,7	0,7	6,7	1,4	8,1	95,3	1,2	0,1	3,2	0,3	3,5	
	SD	3,7	2,7	0,4	1,8	1,4	3,0	2,9	0,5	0,1	3,2	0,4	3,2	
	SEM	1,7	1,2	0,2	0,8	0,6	1,3	1,2	0,2	0,1	1,3	0,2	1,3	

Tabelle 9:

Stark entzündliches Bronchusgewebe der Passage 1. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

stark entzündliches Bronchusgewebe P2

Epithelzellen

Nichtepithelzellen

Fall-Nr.	Entz-grad	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt
14	1 bis 2	90,0	1,0	1,0	7,0	1,0	8,0	96,8	2,0	0,0	1,3	0,0	1,3
15	1 bis 2	84,0	0,0	0,0	16,0	0,0	16,0	96,5	0,0	0,0	3,5	0,0	3,5
16	2 bis 3	82,0	0,0	1,0	13,5	3,5	17,0	95,5	0,8	0,5	3,3	0,0	3,3
17	3	83,5	1,0	0,0	11,5	4,0	15,5	96,0	1,0	0,0	3,0	0,0	3,0
20	1 bis 2	zu wenig Epithelzellen						96,5	0,5	1,0	2,0	0,0	2,0
21	2	Zellkultur nur bis P0											
22	2	90,0	2,0	0,0	8,0	0,0	8,0	96,5	1,5	0,0	2,0	0,0	2,0
34	2	Zellkultur nur bis P0											
	mean	85,9	0,8	0,4	11,2	1,7	12,9	96,3	1,0	0,3	2,5	0,0	2,5
	SD	3,8	0,8	0,5	3,8	1,9	4,5	0,5	0,7	0,4	0,9	0,0	0,9
	SEM	1,7	0,4	0,2	1,7	0,9	2,0	0,2	0,3	0,2	0,4	0,0	0,4

Tabelle 10:

Stark entzündliches Bronchusgewebe der Passage 2. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

Tumorgewebe P0

Epithelzellen

Nichtepithelzellen

Fall-Nr.	Tumorart	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt
1	ACA	80,0	2,0	1,0	11,0	6,0	17,0	86,0	3,0	1,0	7,0	3,0	10,0
2	ACA	91,0	0,5	0,0	8,0	0,5	8,5	96,0	2,5	0,0	1,0	0,5	1,5
3	ACA	75,4	5,7	0,0	5,7	13,2	18,9	92,4	5,2	0,0	1,9	0,5	2,4
4	ACA	89,5	2,0	6,0	0,5	2,0	2,5	90,0	1,0	6,5	0,5	2,0	2,5
5	PEC	89,5	3,0	3,5	1,5	2,5	4,0	zu wenig Nichtepithelzellen					
6	PEC	93,0	1,5	0,3	4,8	0,5	5,3	98,0	1,5	0,0	0,5	0,0	0,5
7	PEC	88,0	0,0	0,0	4,0	8,0	12,0	93,5	0,5	2,0	2,0	2,0	4,0
8	PEC	91,5	5,0	1,0	2,5	0,0	2,5	75,0	7,0	2,0	14,0	2,0	16,0
9	großzell. Ca	82,0	4,0	2,0	5,5	6,5	12,0	92,0	5,5	0,0	2,5	0,0	2,5
10	ACA	31,0	5,5	5,5	42,0	16,0	58,0	97,5	0,0	0,5	1,5	0,5	2,0
11	ACA	95,1	0,5	0,5	3,5	0,4	3,9	96,5	2,0	0,0	1,0	0,5	1,5
12	ACA	17,0	4,0	6,5	33,0	39,5	72,5	95,0	1,8	0,0	2,3	1,0	3,3
13	ACA	14,0	2,5	5,0	62,0	16,5	78,5	97,5	0,0	0,5	1,0	1,0	2,0
14	ACA	87,0	0,0	0,0	12,0	1,0	13,0	93,0	4,0	0,0	3,0	0,0	3,0
15	ACA	12,0	9,0	1,5	32,5	45,0	77,5	97,0	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
16	ACA	75,5	1,5	3,0	15,0	5,0	20,0	96,0	1,5	0,0	2,5	0,0	2,5
17	ACA	89,0	1,0	0,0	7,0	3,0	10,0	96,3	1,5	0,2	1,5	0,5	2,0
18	PEC	81,0	0,5	0,5	14,0	4,0	18,0	96,3	0,3	0,0	3,5	0,0	3,5
19	PEC	97,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	95,3	0,8	1,0	2,8	0,3	3,0
20	PEC	zu wenig Epithelzellen						96,2	0,4	0,6	2,6	0,1	2,8
21	PEC	zu wenig Epithelzellen						97,5	0,5	0,5	1,5	0,0	1,5
22	PEC	37,5	2,0	0,5	49,5	10,5	60,0	94,3	0,3	0,0	5,5	0,0	5,5
24	SCLC	55,2	0,8	0,8	11,6	31,6	43,2	96,5	1,5	0,0	1,5	0,5	2,0
MW		70,1	2,5	1,8	15,6	10,1	25,6	94,0	1,9	0,7	2,7	0,7	3,4
SD		29,2	2,3	2,2	17,6	13,2	27,0	5,1	1,9	1,4	3,0	0,8	3,4
SEM		6,4	0,5	0,5	3,8	2,9	5,9	1,1	0,4	0,3	0,6	0,2	0,7

Tabelle 11:

Tumorgewebe der Passage 0. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploidie gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

Tumorgewebe P1

Epithelzellen

Nichtepithelzellen

Fall-Nr.	Tumorart	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	
1	ACA	92,0	0,0	0,0	8,0	0,0	8,0	94,0	1,0	0,5	3,5	1,0	4,5	
2	ACA	90,5	2,0	1,0	4,5	2,0	6,5	97,0	0,5	0,0	2,0	0,5	2,5	
3	ACA	74,0	0,0	6,5	15,5	4,0	19,5	95,5	0,5	2,5	1,5	0,0	1,5	
4	ACA	78,0	0,0	4,5	7,5	10,0	17,5	95,0	0,5	0,5	3,5	0,5	4,0	
5	PEC	zu wenig Epithelzellen						96,5	0,0	0,5	3,0	0,0	3,0	
6	PEC	zu wenig Epithelzellen						98,0	1,5	0,5	0,0	0,0	0,0	
7	PEC	96,0	0,0	0,0	4,0	0,0	4,0	97,5	0,5	0,0	2,0	0,0	2,0	
8	PEC	80,0	3,0	3,0	12,0	2,0	14,0	94,5	1,0	0,5	4,0	0,0	4,0	
9	großzell. Ca	82,0	0,0	0,0	15,0	3,0	18,0	96,0	0,0	0,0	4,0	0,0	4,0	
10	ACA	Zellkultur nur bis P0												
11	ACA	88,5	7,0	0,5	1,0	3,0	4,0	98,5	0,0	0,0	1,5	0,0	1,5	
12	ACA	96,5	0,0	0,0	3,5	0,0	3,5	48,0	4,0	0,0	22,0	26,0	48,0	
13	ACA	22,5	2,5	8,0	50,0	17,0	67,0	94,0	0,0	1,5	4,5	0,0	4,5	
14	ACA	85,0	1,0	0,5	11,0	2,5	13,5	94,0	0,8	0,5	4,3	0,5	4,8	
15	ACA	89,0	0,5	0,0	6,0	4,5	10,5	95,5	0,0	0,0	4,0	0,5	4,5	
16	ACA	77,5	0,5	8,0	9,5	4,5	14,0	95,5	3,5	0,5	0,0	0,5	0,5	
17	ACA	86,0	3,0	0,0	9,5	1,5	11,0	96,5	1,8	0,0	1,3	0,5	1,8	
18	PEC	84,0	0,0	0,0	10,0	6,0	16,0	95,0	1,5	0,0	3,2	0,3	3,5	
19	PEC	88,0	0,0	0,0	10,0	2,0	12,0	94,8	0,3	0,3	3,5	1,3	4,8	
20	PEC	62,0	4,0	0,0	32,0	2,0	34,0	zu wenig Nichtepithelzellen						
21	PEC	75,5	0,0	4,0	15,0	5,5	20,5	91,5	0,0	5,0	2,0	1,5	3,5	
22	PEC	64,0	3,0	1,0	28,0	4,0	32,0	93,5	2,5	1,5	1,5	1,0	2,5	
24	SCLC	49,0	2,0	3,5	11,0	34,5	45,5	94,8	0,8	0,0	4,5	0,0	4,5	
MW		78,0	1,4	2,0	13,2	5,4	18,6	93,1	1,0	0,7	3,6	1,6	5,2	
SD		17,6	1,9	2,8	11,5	7,9	15,6	10,5	1,1	1,2	4,4	5,6	9,9	
SEM		3,9	0,4	0,6	2,6	1,8	3,5	2,3	0,2	0,3	1,0	1,2	2,2	

Tabelle 12:

Tumorgewebe der Passage 1. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

Tumorgewebe P2

Epithelzellen

Nichtepithelzellen

Fall-Nr.	Tumorart	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt
1	ACA							92,0	2,5	0,0	5,0	0,5	5,5
2	ACA	93,5	0,5	0,5	5,5	0,0	5,5	95,5	2,0	0,0	2,5	0,0	2,5
3	ACA	89,5	4,5	0,5	4,5	1,0	5,5	96,5	1,0	0,0	2,5	0,0	2,5
4	ACA	zu wenig Epithelzellen						96,5	1,0	0,0	2,5	0,0	2,5
5	PEC	zu wenig Epithelzellen						96,0	0,5	0,5	2,5	0,5	3,0
6	PEC	97,5	1,0	0,0	1,0	0,5	1,5	93,0	4,5	0,5	2,0	0,0	2,0
7	PEC	83,0	1,0	1,0	13,0	2,0	15,0	95,5	0,3	0,0	4,0	0,3	4,3
8	PEC							95,5	0,5	0,0	4,0	0,0	4,0
9	großzell. Ca	86,5	0,0	1,5	10,0	2,0	12,0	96,0	1,8	0,3	1,8	0,3	2,0
10	ACA	Zellkultur nur bis P0											
11	ACA	Zellkultur nur bis P1											
12	ACA	84,0	0,0	0,0	12,0	4,0	16,0	92,5	0,0	1,0	6,5	0,0	6,5
13	ACA	39,5	3,0	1,5	46,0	10,0	56,0	93,0	0,5	1,0	5,5	0,0	5,5
14	ACA	91,0	0,5	0,0	8,0	0,5	8,5	94,8	0,5	0,0	4,5	0,3	4,8
15	ACA	91,0	1,0	0,0	7,5	0,5	8,0	95,5	1,5	0,0	3,0	0,0	3,0
16	ACA	64,0	1,5	8,0	17,0	9,5	26,5	94,0	1,0	0,5	3,8	0,8	4,5
17	ACA	83,0	0,5	0,5	13,0	3,0	16,0	97,0	0,8	0,5	1,8	0,0	1,8
18	PEC	88,0	4,0	0,0	4,0	4,0	8,0	95,5	0,5	0,5	3,5	0,0	3,5
19	PEC	zu wenig Epithelzellen						96,5	2,0	0,5	1,0	0,0	1,0
20	PEC	zu wenig Epithelzellen						98,0	0,5	0,0	1,5	0,0	1,5
21	PEC	95,0	0,0	0,0	4,5	0,5	5,0	97,0	0,0	0,0	3,0	0,0	3,0
22	PEC	70,0	1,0	1,0	22,0	6,0	28,0	96,3	1,0	0,8	1,5	0,5	2,0
24	SCLC	95,5	1,5	0,0	3,0	0,0	3,0	96,5	2,0	0,0	1,5	0,0	1,5
	MW	83,4	1,3	1,0	11,4	2,9	14,3	95,4	1,2	0,3	3,0	0,1	3,2
	SD	15,2	1,4	2,0	11,1	3,3	14,0	1,6	1,0	0,3	1,5	0,2	1,5
	SEM	3,9	0,4	0,5	2,9	0,8	3,6	0,4	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3

Tabelle 13:

Tumorgewebe der Passage 2. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

Adeno- und Plattenepithelkarzinome P0

Epithelzellen								Nichtepithelzellen						
Fall-Nr.	Tumorart	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	
1	ACA	80,0	2,0	1,0	11,0	6,0	17,0	86,0	3,0	1,0	7,0	3,0	10,0	
2	ACA	91,0	0,5	0,0	8,0	0,5	8,5	96,0	2,5	0,0	1,0	0,5	1,5	
3	ACA	75,4	5,7	0,0	5,7	13,2	18,9	92,4	5,2	0,0	1,9	0,5	2,4	
4	ACA	89,5	2,0	6,0	0,5	2,0	2,5	90,0	1,0	6,5	0,5	2,0	2,5	
10	ACA	31,0	5,5	5,5	42,0	16,0	58,0	97,5	0,0	0,5	1,5	0,5	2,0	
11	ACA	95,1	0,5	0,5	3,5	0,4	3,9	96,5	2,0	0,0	1,0	0,5	1,5	
12	ACA	17,0	4,0	6,5	33,0	39,5	72,5	95,0	1,8	0,0	2,3	1,0	3,3	
13	ACA	14,0	2,5	5,0	62,0	16,5	78,5	97,5	0,0	0,5	1,0	1,0	2,0	
14	ACA	87,0	0,0	0,0	12,0	1,0	13,0	93,0	4,0	0,0	3,0	0,0	3,0	
15	ACA	12,0	9,0	1,5	32,5	45,0	77,5	97,0	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	
16	ACA	75,5	1,5	3,0	15,0	5,0	20,0	96,0	1,5	0,0	2,5	0,0	2,5	
17	ACA	89,0	1,0	0,0	7,0	3,0	10,0	96,3	1,5	0,2	1,5	0,5	2,0	
		MW	63,0	2,9	2,4	19,4	12,3	31,7	94,4	2,0	0,8	2,0	0,8	2,8
		SD	33,7	2,7	2,6	18,8	15,2	30,4	3,5	1,5	1,8	1,8	0,9	2,4
		SEM	9,7	0,8	0,8	5,4	4,4	8,8	1,0	0,4	0,5	0,5	0,2	0,7

Epithelzellen								Nichtepithelzellen						
Fall-Nr.	Tumorart	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	
5	PEC	89,5	3,0	3,5	1,5	2,5	4,0	zu wenig Nichtepithelzellen						
6	PEC	93,0	1,5	0,3	4,8	0,5	5,3	98,0	1,5	0,0	0,5	0,0	0,5	
7	PEC	88,0	0,0	0,0	4,0	8,0	12,0	93,5	0,5	2,0	2,0	2,0	4,0	
8	PEC	91,5	5,0	1,0	2,5	0,0	2,5	75,0	7,0	2,0	14,0	2,0	16,0	
18	PEC	81,0	0,5	0,5	14,0	4,0	18,0	96,3	0,3	0,0	3,5	0,0	3,5	
19	PEC	97,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	95,3	0,8	1,0	2,8	0,3	3,0	
20	PEC	zu wenig Epithelzellen						96,2	0,4	0,6	2,6	0,1	2,8	
21	PEC	zu wenig Epithelzellen						97,5	0,5	0,5	1,5	0,0	1,5	
22	PEC	37,5	2,0	0,5	49,5	10,5	60,0	94,3	0,3	0,0	5,5	0,0	5,5	
		MW	82,5	1,9	1,0	11,0	3,6	14,7	93,2	1,4	0,8	4,0	0,5	4,6
		SD	20,4	1,7	1,2	17,5	4,2	20,9	7,5	2,3	0,8	4,3	0,9	4,9
		SEM	7,7	0,6	0,4	6,6	1,6	7,9	2,7	0,8	0,3	1,5	0,3	1,7

Tabelle 14:

Adeno- und Plattenepithelkarzinomgewebe der Passage 0. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

Adeno- und Plattenepithelkarzinome P1

Epithelzellen								Nichtepithelzellen						
Fall-Nr.	Tumorart	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	
1	ACA	92,0	0,0	0,0	8,0	0,0	8,0	94,0	1,0	0,5	3,5	1,0	4,5	
2	ACA	90,5	2,0	1,0	4,5	2,0	6,5	97,0	0,5	0,0	2,0	0,5	2,5	
3	ACA	74,0	0,0	6,5	15,5	4,0	19,5	95,5	0,5	2,5	1,5	0,0	1,5	
4	ACA	78,0	0,0	4,5	7,5	10,0	17,5	95,0	0,5	0,5	3,5	0,5	4,0	
10	ACA	Zellkultur nur bis P0												
11	ACA	88,5	7,0	0,5	1,0	3,0	4,0	98,5	0,0	0,0	1,5	0,0	1,5	
12	ACA	96,5	0,0	0,0	3,5	0,0	3,5	48,0	4,0	0,0	22,0	26,0	48,0	
13	ACA	22,5	2,5	8,0	50,0	17,0	67	94,0	0,0	1,5	4,5	0,0	4,5	
14	ACA	85,0	1,0	0,5	11,0	2,5	13,5	94,0	0,8	0,5	4,3	0,5	4,8	
15	ACA	89,0	0,5	0,0	6,0	4,5	10,5	95,5	0,0	0,0	4,0	0,5	4,5	
16	ACA	77,5	0,5	8,0	9,5	4,5	14,0	95,5	3,5	0,5	0,0	0,5	0,5	
17	ACA	86,0	3,0	0,0	9,5	1,5	11,0	96,5	1,8	0,0	1,3	0,5	1,8	
		MW	80,0	1,5	2,6	11,5	4,5	15,9	91,2	1,1	0,5	4,4	2,7	7,1
		SD	20,2	2,1	3,4	13,4	5,0	17,7	14,4	1,4	0,8	6,0	7,7	13,7
		SEM	6,1	0,6	1,0	4,0	1,5	5,3	4,3	0,4	0,2	1,8	2,3	4,1
Epithelzellen								Nichtepithelzellen						
Fall-Nr.	Tumorart	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	
5	PEC	zu wenig Epithelzellen							96,5	0,0	0,5	3,0	0,0	3,0
6	PEC	zu wenig Epithelzellen							98,0	1,5	0,5	0,0	0,0	0,0
7	PEC	96,0	0,0	0,0	4,0	0,0	4,0	97,5	0,5	0,0	2,0	0,0	2,0	
8	PEC	80,0	3,0	3,0	12,0	2,0	14,0	94,5	1,0	0,5	4,0	0,0	4,0	
18	PEC	84,0	0,0	0,0	10,0	6,0	16,0	95,0	1,5	0,0	3,2	0,3	3,5	
19	PEC	88,0	0,0	0,0	10,0	2,0	12,0	94,8	0,3	0,3	3,5	1,3	4,8	
20	PEC	62,0	4,0	0,0	32,0	2,0	34,0	zu wenig Nichtepithelzellen						
21	PEC	75,5	0,0	4,0	15,0	5,5	20,5	91,5	0,0	5,0	2,0	1,5	3,5	
22	PEC	64,0	3,0	1,0	28,0	4,0	32,0	93,5	2,5	1,5	1,5	1,0	2,5	
		MW	78,5	1,4	1,1	15,9	3,1	18,9	95,2	0,9	1,0	2,4	0,5	2,9
		SD	12,4	1,8	1,7	10,3	2,2	10,8	2,1	0,9	1,7	1,3	0,6	1,5
		SEM	4,7	0,7	0,6	3,9	0,8	4,1	0,8	0,3	0,6	0,5	0,2	0,5

Tabelle 15:

Adeno- und Plattenepithelkarzinomgewebe der Passage 1. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

Adeno- und Plattenepithelkarzinome P2

Epithelzellen								Nichtepithelzellen					
Fall-Nr.	Tumorart	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt
1	ACA	zu wenig Epithelzellen						92,0	2,5	0,0	5,0	0,5	5,5
2	ACA	93,5	0,5	0,5	5,5	0,0	5,5	95,5	2,0	0,0	2,5	0,0	2,5
3	ACA	89,5	4,5	0,5	4,5	1,0	5,5	96,5	1,0	0,0	2,5	0,0	2,5
4	ACA	zu wenig Epithelzellen						96,5	1,0	0,0	2,5	0,0	2,5
10	ACA	Zellkultur nur bis P0											
11	ACA	Zellkultur nur bis P1											
12	ACA	84,0	0,0	0,0	12,0	4,0	16,0	92,5	0,0	1,0	6,5	0,0	6,5
13	ACA	39,5	3,0	1,5	46,0	10,0	56,0	93,0	0,5	1,0	5,5	0,0	5,5
14	ACA	91,0	0,5	0,0	8,0	0,5	8,5	94,8	0,5	0,0	4,5	0,3	4,8
15	ACA	91,0	1,0	0,0	7,5	0,5	8,0	95,5	1,5	0,0	3,0	0,0	3,0
16	ACA	64,0	1,5	8,0	17,0	9,5	26,5	94,0	1,0	0,5	3,8	0,8	4,5
17	ACA	83,0	0,5	0,5	13,0	3,0	16,0	97,0	0,8	0,5	1,8	0,0	1,8
	MW	79,4	1,4	1,4	14,2	3,6	17,8	94,7	1,1	0,3	3,8	0,2	3,9
	SD	18,6	1,5	2,7	13,5	4,1	17,0	1,8	0,7	0,4	1,6	0,3	1,6
	SEM	6,6	0,5	1,0	4,8	1,4	6,0	0,6	0,2	0,1	0,5	0,1	0,5
Epithelzellen								Nichtepithelzellen					
Fall-Nr.	Tumorart	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt	Diploide	Trisomie 7	Trisomie 8	Tetraploide	Aneuploide	Aneuploide gesamt
5	PEC	zu wenig Epithelzellen						96,0	0,5	0,5	2,5	0,5	3,0
6	PEC	97,5	1,0	0,0	1,0	0,5	1,5	93,0	4,5	0,5	2,0	0,0	2,0
7	PEC	83,0	1,0	1,0	13,0	2,0	15,0	95,5	0,3	0,0	4,0	0,3	4,3
8	PEC	zu wenig Epithelzellen						95,5	0,5	0,0	4,0	0,0	4,0
18	PEC	88,0	4,0	0,0	4	4,0	8,0	95,5	0,5	0,5	3,5	0,0	3,5
19	PEC	zu wenig Epithelzellen						96,5	2,0	0,5	1,0	0,0	1,0
20	PEC	zu wenig Epithelzellen						98,0	0,5	0,0	1,5	0,0	1,5
21	PEC	95,0	0,0	0,0	4,5	0,5	5,0	97,0	0,0	0,0	3,0	0,0	3,0
22	PEC	70,0	1,0	1,0	22,0	6,0	28,0	96,3	1,0	0,8	1,5	0,5	2,0
	MW	86,7	1,4	0,4	8,9	2,6	11,5	95,9	1,1	0,3	2,6	0,1	2,7
	SD	11,0	1,5	0,5	8,6	2,4	10,5	1,4	1,4	0,3	1,1	0,2	1,1
	SEM	4,9	0,7	0,2	3,8	1,1	4,7	0,5	0,5	0,1	0,4	0,1	0,4

Tabelle 16:

Adeno- und Plattenepithelkarzinomgewebe der Passage 2. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellen in Prozent sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor. "Aneuploide gesamt" setzt sich zusammen aus Tetraploiden und allen anderen Aneuploiden.

Zellen mit mehr als 2 Zentrosomen

Anzahl an diploiden Zellen mit Zentrosomen > 2C				Anzahl an tetraploiden Zellen mit Zentrosomen > 2C			
Fall-Nr.	Ble >2C [%]	Bse >2C [%]	Tu >2C [%]	Fall-Nr.	Ble >2C [%]	Bse >2C [%]	Tu >2C [%]
10	4,8		3,7	10	15,4		60,0
11	1,6		2,1	11	7,7		28,6
12	7,4		4,3	12	77,8		46,7
14		2,6	2,0	14		20,0	33,3
15		8,4	5,7	15		71,4	2,7
16		10,0	4,0	16		71,4	50,0
17		5,0	2,6	17		0,0	41,7
19	4,3		0,5	19	30,0		37,5
20		0,5	1,1	20		32,0	72,0
21		3,5	11,6	21		71,4	42,1
22		1,6	1,5	22		12,5	50,0
24	1,0		2,2	24	14,3		7,7
27	8,4			27	40,0		
30	1,0			30	44,0		
MW	4,1	4,5	3,0	MW	32,7	39,8	33,9
SD	3,0	3,5	3,0	SD	24,1	31,0	19,7
SEM	1,1	1,3	0,9	SEM	9,1	11,7	5,7

Tabelle 17:

Zellen mit mehr als 2 Zentrosomen (C) in leicht (Ble) und stark(Bse) entzündlichem Bronchusgewebe sowie im Tumorgewebe (Tu). Dargestellt ist der Anteil der Zellen mit mehr als 2 Zentrosomen (>2C) in Prozent aller diploiden bzw. tetraploiden Zellen sowie Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus diesen Werten. Die Werte liegen gerundet vor.

7 Literaturverzeichnis

1. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD (2013). Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 143(Suppl):e1S-29S
2. Andreassen PR, Martineau SN, Margolis RL (1996). Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. *Mutat Res* 372:181-94
3. Andreassen PR, Lohez OD, Lacroix FB, Margolis RL (2001). Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell* 12:1315-28
4. Auerbach O, Stout AP, Hammond EC, Garfinkel L (1961). Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer. *N Engl J Med* 265:253-67
5. Auerbach O, Stout AP, Hammond EC, Garfinkel L (1962). Bronchial epithelium in former smokers. *N Engl J Med* 267:119-25
6. Balkwill F, Mantovani A (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-45
7. Bellamy CO, Clarke AR, Wyllie AH, Harrison DJ (1997). p53 Deficiency in liver reduces local control of survival and proliferation, but does not affect apoptosis after DNA damage. *FASEB J* 11:591-9
8. Borel F, Lohez OD, Lacroix FB, Margolis RL (2002). Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9819-24
9. Bourke E, Dodson H, Merdes A, Cuffe L, Zachos G, Walker M, Gillespie D, Morrison CG (2007). DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO Rep* 8:603-9
10. Boveri T (2008). Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci* 121:1-84
11. Bracke KR, D'hulst AI, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, Joos GF, Brusselle GG (2006). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *J Immunol* 177:4350-9
12. Buckingham LE, Coon JS, Morrison LE, Jacobson KK, Jewell SS, Kaiser KA, Mauer AM, Muzzafar T, Polowy C, Basu S, Gale M, Villaflor VM, Bonomi P (2007). The prognostic value

- of chromosome 7 polysomy in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Thorac Oncol* 2:414-22
13. Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, Gleich LL, Li YQ, Tarapore P, Fukasawa K (1999). Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* 18:1935-44
 14. Castello G, Scala S, Palmieri G, Curley SA, Izzo F (2010). HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clin Immunol* 134:237-50
 15. Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D, Desdouets C (2010). Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling. *Cell Cycle* 9:460-6
 16. Chollet A, Kawashima EH (1985). Biotin-labeled synthetic oligodeoxyribonucleotides: chemical synthesis and uses as hybridization probes. *Nucleic Acids Res* 13:1529-41
 17. Chung KF (2001). Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 34:50s-59s
 18. Coussens LM, Werb Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-7
 19. Cortez Bde A, Quassollo G, Caceres A, Machado-Santelli GM (2011). The fate of chrysotile-induced multipolar mitosis and aneuploid population in cultured lung cancer cells. *PLoS One* 6:e18600.
 20. Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Raskind WH, Reid BJ (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267:1353-56
 21. Crowell RE, Gilliland FD, Temes RT, Harms HJ, Neft RE, Heaphy E, Auckley DH, Crooks LA, Jordan SW, Samet JM, Lechner JF, Belinsky SA (1996). Detection of trisomy 7 in nonmalignant bronchial epithelium from lung cancer patients and individuals at risk for lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:631-7
 22. Davoli T, de Lange T (2011). The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:585-610
 23. Deppermann KM (2011). Epidemiology of lung cancer. *Internist* 52:125-9
 24. Dhom G (2004). Zur Geschichte des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie* 58:680-5
 25. Dichtenberg JB, Zimmermann W, Sparks CA, Young A, Vidair C, Zheng Y, Carrington W, Fay FS, Doxsey SJ (1998). Pericentrin and γ -Tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol* 141:163-74

26. Dorer MS, Talarico S, Salama NR (2009). *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog* 5:e1000544
27. Doxsey S (1998). The centrosome - a tiny organelle with big potential. *Nat Genet* 20:104-6
28. Eastmond DA, Schuler M, Rupa DS (1995). Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutat Res* 348:153-62
29. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1990). Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323:1228-33
30. Elledge SJ (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274:1664-72
31. El-Serag HB (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 142:1264-73
32. Engels EA, Shen M, Chapman RS, Pfeiffer RM, Yu YY, He X, Lan Q (2009). Tuberculosis and subsequent risk of lung cancer in Xuanwei, China. *Int J Cancer* 124:1183-7
33. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). Estimate of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-917
34. Fox DT, Duronio RJ (2013). Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* 140:3-12
35. Freeman HJ (2008). Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 14:1810-1
36. Frost JK, Ball WJ, Levin ML, Tockman MS, Erozan YS, Gupta PK, Eggleston JC, Pressman NJ, Donithan MP, Kimball AJ (1986). Sputum cytopathology: use and potential in monitoring the workplace environment by screening for biological effects of exposure. *J Occup Med* 28:692-703
37. Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437:1043-7
38. Fukasawa K, Choi T, Kuriyama SR, Vande Woude GF (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271:1744-47
39. Fukasawa K (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* 230:6-19
40. Gabrielson E (2006). Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology* 11:533-8

41. Gahan PB (1977). Increased levels of euploidy as a strategy against rapid ageing in diploid mammalian systems: an hypothesis. *Exp Geront* 12:133-6
42. Galipeau PC, Cowan DS, Sanchez CA, Barrett MT, Emond MJ, Levine DS, Rabinovitch PS, Reid BJ (1996). 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7081-4
43. Ganem NJ, Storchova Z, Pellmann D (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17:157-62
44. Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460:278-82
45. Gao Y, Smith E, Ker E, Campbell P, Cheng EC, Zou S, Lin S, Wang L, Halene S, Krause DS (2012). Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev Cell* 22:573-84
46. Gelfand M, Weinberg RW, Castle WM (1967). Relation between carcinoma of the bladder and infestation with *Schistosoma haematobium*. *Lancet* 1:1249-51
47. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lübke AS, Reinhold T, Späth-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeböller H, Böcking A, Bohle RM, Brüske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gütz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heussel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hübner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Müller KM, Müller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rube C, Schmittel A, Schönfeld N, Schütte W, Serke M, Stamatis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H (2011). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft - Kurzfassung. *Pneumologie* 65:e51-75
48. Gorla GR, Malhi H, Gupta S (2001). Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *J Cell Sci* 114:2943-51

49. Gudkov AV, Gurova KV, Komarova EA (2011). Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. *Genes Cancer* 2:503-16
50. Guidotti JE, Br gerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C (2003). Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 278:19095-101
51. Hanselmann RG, Oberringer M (2001). Polyploidization: a Janus-faced mechanism. *Med Hyp* 56:58-64
52. Hau PM, Siu WY, Wong N, Lai PB, Poon RY (2006). Polyploidization increases the sensitivity to DNA-damaging agents in mammalian cells. *FEBS Lett* 580:4727-36
53. Heist RS, Sequist LV, Engelman JA (2012). Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol* 7:924-33
54. Herold G (2013). Innere Medizin. Köln
55. Heselmeyer K, Schr ck E, du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T (1996). Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:479-84
56. Heyne KH, Lippman SM, Lee JJ, Lee JS, Hong WK (1992). The incidence of second primary tumors in long-term survivors of small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 10:1519-24
57. Hixon ML, Obejero-Paz C, Muro-Cacho C, Wagner MW, Millie E, Nagy J, Hassold TJ, Gualberto A (2000). Cks1 mediates vascular smooth muscle cell polyploidization. *J Biol Chem* 275:40434-42
58. Hixon ML, Gualberto A (2003). Vascular smooth muscle polyploidization - from mitotic checkpoints to hypertension. *Cell Cycle* 2:105-10
59. Hopman AH, Wiegant J, Raap AK, Landegent JE, van der Ploeg M, van Duijn P (1986). Bi-color detection of two target DNAs by non-radioactive in situ hybridization. *Histochemistry* 85:1-4
60. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190:1375-82
61. Hut HM, Lemstra W, Blaauw EH, Van Cappellen GW, Kampinga HH, Sibon OC (2003). Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol Biol Cell* 14:1993-2004
62. Ishizumi T, McWilliams A, MacAulay C, Gazdar A, Lam S (2010). Natural history of bronchial preinvasive lesions. *Cancer Metastasis Rev* 29:5-14

63. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90
64. Jeon YK, Sung SW, Chung JH, Park WS, Seo JW, Kim CW, Chung DH (2006). Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 54:387-98
65. John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-7
66. Joshi HC, Palacios MJ, McNamara L, Cleveland DW (1992). γ -tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* 356:80-3
67. Jung CK, Jung JH, Lee KY, Kang CS, Kim M, Ko YH, Oh CS (2007). Centrosome abnormalities in non-small cell lung cancer: correlations with DNA aneuploidy and expression of cell cycle regulatory proteins. *Pathol Res Pract* 203:839-47
68. Kallianos A, Rapti A, Zarogoulidis P, Tsakiridis K, Mpakas A, Katsikogiannis N, Kougioumtzi I, Li Q, Huang H, Zaric B, Perin B, Courcoutsakis N, Zarogoulidis K (2013). Therapeutic procedure in small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 5:S420-S424
69. Karin M (2009). NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a000141
70. Kessler C (1991). The digoxigenin:anti-digoxigenin (DIG) technology - a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. *Mol Cell Probes* 5:161-205
71. Khodjakov A, Rieder CL (1999). The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J Cell Biol* 146:585-96
72. Khodjakov A, Rieder CL, Sluder G, Cassels G, Sibon O, Wang CL (2002). De novo formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase. *J Cell Biol* 158:1171-81
73. Khuder SA (2001). Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 31:139-48
74. Kitzmann M, Fernandez A (2001). Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell Mol Life Sci* 58:571-9
75. Klein F, Amin Kotb WF, Petersen I (2009). Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer* 65:13-8

76. Kohler LH, Mireskandari M, Knösel T, Altendorf-Hofmann A, Kunze A, Schmidt A, Presselt N, Chen Y, Petersen I (2012). FGFR1 expression and gene copy numbers in human lung cancer. *Virchows Arch* 461:49-57
77. Koutsami MK, Tsantoulis PK, Kouloukoussa M, Apostolopoulou K, Pateras IS, Spartinou Z, Drougou A, Evangelou K, Kittas C, Bartkova J, Bartek J, Gorgoulis VG (2006). Centrosome abnormalities are frequently observed in non-small-cell lung cancer and are associated with aneuploidy and cyclin E overexpression. *J Pathol* 209:512-21
78. Kubokura H, Koizumi K, Yamamoto M, Tanaka S (1999). Chromosome 8 copy numbers and the c-myc gene amplification in non-small cell lung cancer. Analysis by interphase cytogenetics. *Nihon Ika Daigaku Zasshi* 66:107-12
79. Kubokura H, Tenjin T, Akiyama H, Koizumi K, Nishimura H, Yamamoto M, Tanaka S (2001). Relations of the c-myc gene and chromosome 8 in non-small cell lung cancer: analysis by fluorescence in situ hybridization. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 7:197-203
80. Lanni JS, Jacks T (1998). Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol* 18:1055-64
81. Lantuéjoul S, Salameire D, Salon C, Brambilla E (2009). Pulmonary preneoplasia - sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology* 54:43-54
82. Lazzerini Denchi E, Celli G, de Lange T (2006). Hepatocytes with extensive telomere deprotection and fusion remain viable and regenerate liver mass through endoreduplication. *Genes Dev* 20:2648-53
83. Lechner JF, Neft RE, Gilliland FD, Crowell RE, Auckley DH, Temes RT, Belinsky SA (1998). Individuals at high risk for lung cancer have airway epithelial cells with chromosome aberrations frequently found in lung tumor cells. *In Vivo* 12:23-6
84. Lee JS, Pathak S, Hopwood V, Tomasovic B, Mullins TD, Baker FL, Spitzer G, Neidhart JA (1987). Involvement of chromosome 7 in primary lung tumor and nonmalignant normal lung tissue. *Cancer Res* 47:6349-52
85. Lee G, Walser TC, Dubinett SM (2009). Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 15:303-7
86. Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ (2009). Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev* 23:2461-77

87. Levine DS, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Reid BJ (1991). Formation of the tetraploid intermediate is associated with the development of cells with more than four centrioles in the elastase-simian virus 40 tumor antigen transgenic mouse model of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6427-31
88. Lichter P, Boyle AL, Cremer T, Ward DC (1991). Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. *Genet Anal Tech Appl* 8:24-35
89. Littman AJ, Jackson LA, Vaughan TL (2005). Chlamydia pneumoniae and lung cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:773-8
90. Liu YZ, Wang Z, Fang LL, Li L, Cao J, Xu X, Han YL, Cai Y, Wang LX, Wang MR (2012). A potential probe set of fluorescence in situ hybridization for detection of lung cancer in bronchial brushing specimens. *J Cancer Res Clin Oncol* 138:1541-9
91. Loffeld RJ, Willems I, Flendrig JA, Arends JW (1990). Helicobacter pylori and gastric carcinoma. *Histopathology* 17:537-41
92. Mannino DM, Aguayo SM, Petty TL, Redd SC (2003). Low lung function and incident lung cancer in the United States: data From the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up. *Arch Intern Med* 163:1475-80
93. Margolis RL, Lohez OD, Andreassen PR (2003). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J Cell Biochem* 88:673-83
94. Marnett LJ (2012). Inflammation and cancer: chemical approaches to mechanisms, imaging, and treatment. *J Org Chem* 77:5224-38
95. Masuda A, Takahashi T (2002). Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene* 21:6884-97
96. Maturri L, Lavezzi AM (1994). Recurrent chromosome alterations in non-small cell lung cancer. *Eur J Histochem* 38:53-8
97. McCormack VA, Hung RJ, Brenner DR, Bickeböller H, Rosenberger A, Muscat JE, Lazarus P, Tjønneland A, Friis S, Christiani DC, Chun EM, Le Marchand L, Rennert G, Rennert HS, Andrew AS, Orlov I, Park B, Boffetta P, Duell EJ (2011). Aspirin and NSAID use and lung cancer risk: a pooled analysis in the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Cancer Causes Control* 22:1709-20

-
98. Meckert PC, Rivello HG, Vigliano C, González P, Favalaro R, Laguens R (2005). Endomitosis and polyploidization of myocardial cells in the periphery of human acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 67:116-23
 99. Meraldi P, Honda R, Nigg EA (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J* 21:483-92
 100. Mitsuuchi Y, Testa JR (2002). Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet* 115:183-8
 101. Mitsuyama K, Sasaki E, Toyonaga A, Ikeda H, Tsuruta O, Irie A, Arima N, Oriishi T, Harada K, Fujisaki K et al (1991). Colonic mucosal interleukin-6 in inflammatory bowel disease. *Digestion* 50:104-11
 102. Moghaddam SJ, Li H, Cho SN, Dishop MK, Wistuba II, Ji L, Kurie JM, Dickey BF, Demayo FJ (2009). Promotion of lung carcinogenesis by chronic obstructive pulmonary disease-like airway inflammation in a K-ras-induced mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:443-53
 103. Moll R, Werner W, Franke W, Schiller DL (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24
 104. Morabia A, Wynder EL (1991). Cigarette smoking and lung cancer cell types. *Cancer* 68:2074-8
 105. Moudjou M, Bordes N, Paintrand M, Bornens M (1996). γ -Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J Cell Sci* 109:875-87
 106. Naef AP, Savary M, Ozzello L (1975). Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition. Report on 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 70:826-35
 107. Nigg EA (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2:815-25
 108. Nigg EA, Stearns T (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* 13:1154-60
 109. Ninomiya H, Nomura K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Fujiwara M, Tsuchiya E, Ishikawa Y (2006). Genetic instability in lung cancer: concurrent analysis of chromosomal, mini- and microsatellite instability and loss of heterozygosity. *Br J Cancer* 94:1485-91
 110. Oberringer M (1999). Dissertation: Molekularzytogenetische und immunzytochemische Charakterisierung polyploider Zellen in gut und schlecht heilenden Wunden des Menschen.

-
111. Oberringer M, Lothschütz D, Jennewein M, Koschnick M, Mutschler W, Hanselmann RG (1999). Centrosome multiplication accompanies a transient clustering of polyploid cells during tissue repair. *Mol Cell Biol Res Commun* 2:190-6
112. O'Byrne KJ, Dalglish AG (2001). Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br J Cancer* 85:473-83
113. O'Callaghan DS, O'Donnell D, O'Connell F, O'Byrne KJ (2010). The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5:2024-36
114. Olaharski AJ, Sotelo R, Solorza-Luna G, Gonsebatt ME, Guzman P, Mohar A, Eastmond DA (2006). Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27:337-43
115. Panani AD, Roussos C (2006). Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett* 239:1-9
116. Pardue ML, Gall JG (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:600-4
117. Parkin DM (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118:3030-44
118. Petersen I (2011). The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch Arztebl Int* 108:525-31
119. Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 58:3974-85
120. Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ (2003). Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* 63:1398-404
121. Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287:1132-41
122. Preston DL, Kato H, Kopecky K, Fujita S (1987). Studies of the mortality of A-bomb survivors. 8. Cancer mortality, 1950-1982. *Radiat Res* 111:151-78
123. Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, Gollin SM, Saunders WS (2005). Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* 307:127-9
124. Rabinovitch PS, Reid BJ, Haggitt RC, Norwood TH, Rubin CE (1989). Progression to cancer in Barrett's esophagus is associated with genomic instability. *Lab Invest* 60:65-71

-
125. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24:349-58
126. Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* 190:7-20
127. Reid BJ, Li X, Galipeau PC, Vaughan TL (2010). Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. *Nat Rev Cancer* 10:87-101
128. Robert Koch-Institut (ed) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (ed) (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Berlin
129. Rofstad EK, Johnsen NM, Lyng H (1996). Hypoxia-induced tetraploidisation of a diploid human melanoma cell line in vitro. *Br J Cancer Suppl* 27:S136-9
130. Saccomanno G, Archer VE, Auerbach O, Saunders RP, Brennan LM (1974). Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer* 33:256-70
131. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM (2001). Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1304-9
132. Sagman U, Lishner M, Maki E, Shepherd FA, Haddad R, Evans WK, DeBoer G, Payne D, Pringle JF, Yeoh JL, et al. (1992). Second primary malignancies following diagnosis of small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 10:1525-33
133. Sandhu JS (2008). Prostate cancer and chronic prostatitis. *Curr Urol Rep* 9:328-32
134. Schenk T, Ackermann J, Brunner C, Schenk P, Zojer N, Roka S, Drach J (1997). Detection of chromosomal aneuploidy by interphase fluorescence in situ hybridization in bronchoscopically gained cells from lung cancer patients. *Chest* 111:1691-6
135. Schwartz DA (1980). Helminths in the induction of cancer: *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* and cholangiocarcinoma. *Trop Geogr Med* 32:95-100
136. Sennerstam R, Kato H, Auer GU (1989). Dissociation of cellular protein and DNA content in mild and moderate dysplasia as a reflection of the degree of aneuploidy in cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 11:255-60
137. Shackney SE, Smith CA, Miller BW, Burholt DR, Murtha K, Giles HR, Ketterer DM, Pollice AA (1989). Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res* 49:3344-54
138. Shi Q, King RW (2005). Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437:1038-42

-
139. Skillrud DM, Offord KP, Miller RD (1986). Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study. *Ann Intern Med* 105:503-7
140. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. Clinical implication and multicentric origin. *Cancer* 6:963-8
141. Sloand EM, Pfannes L, Ling C, Feng X, Jasek M, Calado R, Tucker ZC, Hematti P, Maciejewski J, Dunbar C, Barrett J, Young N (2010). Graft-versus-host disease: role of inflammation in the development of chromosomal abnormalities of keratinocytes. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1665-73
142. Smith AL, Hung J, Walker L, Rogers TE, Vuitch F, Lee E, Gazdar AF (1996). Extensive areas of aneuploidy are present in the respiratory epithelium of lung cancer patients. *Br J Cancer* 73:203-9
143. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Cheng DS, Scoggins RM, Han W, Polosukhin VV, Connelly L, Yull FE, Fingleton B, Blackwell TS (2007). Epithelial NF-kappaB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18514-9
144. Stearns T, Evans L, Kirschner M (1991). γ -Tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65:825-36
145. Stolte M (1992). Helicobacter pylori gastritis and gastric MALT-lymphoma. *Lancet* 339:745-6
146. Storchova Z, Pellmann D (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:45-54
147. Storchova Z, Breneman A, Cande J, Dunn J, Burbank K, O'Toole E, Pellman D (2006). Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature* 443:541-7
148. Storchova Z, Kuffer C (2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci* 121:3859-66
149. Sy SM, Wong N, Lee TW, Tse G, Mok TS, Fan B, Pang E, Johnson PJ, Yim A (2004). Distinct patterns of genetic alterations in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Eur J Cancer* 40:1082-94
150. Takeshita M, Koga T, Takayama K, Ijichi K, Yano T, Maehara Y, Nakanishi Y, Sueishi K (2013). Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 80:85-90
151. Tarapore P, Fukasawa K (2002). Loss of p53 and centrosome hyperamplification. *Oncogene* 21:6234-40

-
152. Testa JR, Liu Z, Feder M, Bell DW, Balsara B, Cheng JQ, Taguchi T (1997). Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 95:20-32
153. Therman E, Susman M (1993). Human chromosomes. Structure, behaviour and effects. 3rd ed. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg
154. Thomas C (ed) (2003). Allgemeine Pathologie. 3rd ed. Schattauer, Stuttgart
155. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ (2013). New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 31:992-1001
156. Turner MC, Krewski D, Pope CA 3rd, Chen Y, Gapstur SM, Thun MJ (2011). Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 184:1374-81
157. Uetake Y, Sluder G (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *J Cell Biol* 165:609-15
158. Ullah Z, Kohn MJ, Yagi R, Vassilev LT, DePamphilis ML (2008). Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity. *Genes Dev* 22:3024-36
159. Ullah Z, Lee CY, Lilly MA, DePamphilis ML (2009). Developmentally programmed endoreduplication in animals. *Cell Cycle* 8:1501-9
160. Vennervald BJ, Polman K (2009). Helminths and malignancy. *Parasite Immunol* 31:686-96
161. Vignery A (2000). Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 81:291-304
162. Vitale I, Senovilla L, Jemaà M, Michaud M, Galuzzi L, Kepp O, Nanty L, Criollo A, Rello-Varona S, Manic G, Métiévier G, Vivet S, Tajeddine N, Joza N, Valent A, Castedo M, Kroemer G (2010). Multipolar Mitosis of tetraploid cells: inhibition by p53 and dependency on Mos. *Embo J* 29:1272-84
163. Vliegen HW, Eulderink F, Brusckhe AV, van der Laarse A, Cornelisse CJ (1995). Polyploidy of myocyte nuclei in pressure overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 5:27-31
164. Wagner M, Hampel B, Bernhard D, Hala M, Zwerschke W, Jansen-Dürr P (2001). Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp Gerontol* 36:1327-47

-
165. Waldner MJ, Neurath MF (2009). Review Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin Immunopathol* 31:249-56
166. Walen KH (2006). Human diploid fibroblast cells in senescence; cycling through polyploidy to mitotic cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 42:216-24
167. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422:897-901
168. Wasswa-Kintu S, Gan WQ, Man SF, Pare PD, Sin DD (2005). Relationship between reduced forced expiratory volume in one second and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 60:570-5
169. Wen J, Fu J, Zhang W, Guo M (2011). Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Mod Pathol* 24:932-43
170. Wistuba II (2007). Genetics of preneoplasia: lessons from lung cancer. *Curr Mol Med* 7:3-14
171. Wong C, Stearns T (2005). Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biol* 6:6
172. Wu CY, Hu HY, Pu CY, Huang N, Shen HC, Li CP, Chou YJ (2011). Pulmonary tuberculosis increases the risk of lung cancer: a population-based cohort study. *Cancer* 117:618-24
173. Wynder EL, Covey LS (1987). Epidemiologic patterns in lung cancer by histologic type. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23:1491-6
174. Yakut T, Egeli U, Gebitekin C (2003). Investigation of c-myc and p53 gene alterations in the tumor and surgical borderline tissues of NSCLC and effects on clinicopathologic behavior: by the FISH technique. *Lung* 181:245-58
175. Yang Z, Loncarek J, Khodjakov A, Rieder CL (2008). Extra centrosomes and/or chromosomes prolong mitosis in human cells. *Nat Cell Biol* 10:748-51
176. Yang JD, Kim WR, Coelho R, Mettler TA, Benson JT, Sanderson SO, Therneau TM, Kim B, Roberts LR (2011). Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9:64-70
177. Yi Q, Zhao X, Huang Y, Ma T, Zhang Y, Hou H, Cooke HJ, Yang DQ, Wu M, Shi Q (2011). p53 dependent centrosome clustering prevents multipolar mitosis in tetraploid cells. *PLoS One* 6:e27304

178. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352:345-7
179. Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Darwiche K, Boutsikou E, Machairiotis N, Tsakiridis K, Katsikogiannis N, Kougioumtzi I, Karapantzos I, Huang H, Spyrtos D (2013). Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Dis* 5:S389-S396
180. Zheng W, Blot WJ, Liao ML, Wang ZX, Levin LI, Zhao JJ, Fraumeni JF Jr, Gao YT (1987). Lung cancer and prior tuberculosis infection in Shanghai. *Br J Cancer* 56:501-4
181. Zheng Y, Jung MK, Oakley BR (1991). γ -tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 65:817-23
182. Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378:578-83
183. Zojer N, Dekan G, Ackermann J, Fiegl M, Kaufmann H, Drach J, Huber H (2000). Aneuploidy of chromosome 7 can be detected in invasive lung cancer and associated premalignant lesions of the lung by fluorescence in situ hybridisation. *Lung Cancer* 28:225-35

8 Publikationen

8.1 Originalarbeiten

Oberringer M, Lothschütz D, Jennewein M, Koschnick M, Mutschler W, Hanselmann RG: Centrosome-multiplication accompanies a transient clustering of tetraploid cells during tissue repair. *Mol Cell Biol Res Commun* 2 (3): 190-196 (1999)

Lothschütz D, Jennewein M, Pahl S, Lausberg HF, Eichler A, Mutschler W, Hanselmann RG, Oberringer M: Polyploidization and centrosome hyperamplification in inflammatory bronchi. *Inflamm Res* 51 (8): 416-422 (2002)

8.2 Veröffentlichte Vorträge (V) und Poster (P)

(P) *Posterpreis der deutschen Gesellschaft für Humangenetik:*

Lothschütz D, Oberringer M, Eichler A, Lausberg H, Pahl S, Mutschler W, Hanselmann RG: Identification of aneuploid cells in chronic inflammatory bronchi and bronchial carcinomas by two-color FISH. *Med Gen* 1: 143 (1998)

(P) Oberringer M, Lothschütz D, Mutschler WE, Hanselmann RG: The clonality of tetraploid cells in the human wound. *Med Gen* 1: 170 (1999)

(V) Jennewein M, Lothschütz D, Oberringer M, Eichler A, Lausberg HF, Pahl S, Mutschler W, Hanselmann RG: Abnormal centrosome amplification in inflammatory bronchi and bronchial carcinomas. *Cytogenet Cell Genet* 85 (1-2): 20 (1999)

(P) Oberringer M, Lothschütz D, Jennewein M, Mutschler WE, Hanselmann RG: Clonal tetraploid cells in the human wound. *Cytogenet Cell Genet* 85 (1-2): 114 (1999)

(P) Jennewein M, Oberringer M, Lothschütz D, Lausberg HF, Pahl S, Mutschler W, Hanselmann RG: Centrosome-multiplication in inflammatory bronchi and bronchial carcinomas. *Med Gen* 132 (1999)

9 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler und Herrn Dr. med. Rainer G. Hanselmann für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung während der Zeit meiner Arbeit sowie für die Bereitstellung von Räumlichkeiten, Geräten und Verbrauchsmitteln im molekularbiologischen Labor der Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie in Homburg bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann und Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Oberringer danke ich für die weitere Betreuung meiner Dissertation, nachdem Prof. Mutschler die Universität des Saarlandes verlassen hatte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Oberringer für die Einweisung in die Methodik und die ausführliche Betreuung während der gesamten Zeit meiner Arbeit. Ich danke ihm für jede wertvolle Anregung sowie für seine ständige Bereitschaft zu fruchtbaren Diskussionen. Des Weiteren danke ich ihm für seine unendliche Geduld und seine Bereitschaft jeden neuen Anlauf mit mir in Angriff zu nehmen.

Besonders bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Martina Jennewein für die technische Unterstützung und jede konstruktive Kritik.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Henning F. Lausberg aus der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Homburg, und bei Dr. med. Andreas Eichler aus der Klinik für Innere Medizin V - Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin, Universitätsklinikum Homburg, für die Entnahme sowie bei Herrn Dr. med. Stefan Pahl vom Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Universitätsklinikum Homburg, für die histopathologische Beurteilung der Gewebeproben bedanken.

Ich danke Dr. med. Thilo Schäfer, der mir insbesondere bei den statistischen Auswertungen zur Seite gestanden hat.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter, Hildegard Lothschütz, für ihre stete Unterstützung nicht nur während der Zeit dieser Arbeit.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniela Lothschütz
Wohnsitz: Banatstraße 33
66424 Homburg
Geburtsdatum: 23. Mai 1972
Geburtsort: St. Ingbert
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1978-1983 Grund- und Hauptschule Merchweiler
1983-1992 Illtal-Gymnasium Illingen/Saar
06/1992 Abitur

Studium

10/1992-09/1993 Universität des Saarlandes, Naturwissenschaftlich-Technische
Fakultät III, Fachrichtung Chemie, Saarbrücken
10/1993-05/2000 Universität des Saarlandes, Medizinische Fakultät, Homburg/Saar
04/2000 Ärztliche Prüfung

Beruf

07/2000-01/2002 Ärztin im Praktikum, allgemeinpädiatrische Abteilung der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Homburg/Saar
01/2002-01/2007 Assistenzärztin, Universitätskliniken für Kinder- und Jugendmedizin,
Homburg/Saar
01/2007 Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin
Seit 02/2007 Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätskliniken
für Kinder- und Jugendmedizin, Homburg/Saar
06/2009 Schwerpunktbezeichnung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie