

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Der DNA-Integritäts-Index K-ras 300 / 60 in der "liquid biopsy" und sein
diagnostischer Nutzen bei Lungentumoren**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Natalie Regina Dörner
geboren am: 25.01.1991 in Groß-Gerau

Betreuer:
apl. Prof. Dr. B. Schmidt

Gutachter/innen:
apl. Prof. B. Schmidt (Berlin/MF)
Prof. D. Vordermark
PD Ch. Schäper (Greifswald)

26.06.2018

14.11.2019

Referat

Hintergrund: Der DNA-Integritäts-Index stellt das Verhältnis von einem großen zu einem kleineren, mittels PCR amplifizierten DNA-Fragment dar. Dabei basiert er auf der Annahme, dass Tumorzellen zirkulierende zellfreie DNA (cfDNA) durch Nekrose sowie Apoptose freisetzen und gesunde Zellen hauptsächlich durch Apoptose. In einigen Studien konnte mittlerweile bei Lungentumoren, sowie auch bei anderen Tumoren, ein signifikanter Unterschied des Index zwischen erkrankten Patienten und gesunden Probanden gezeigt werden. Es konnte jedoch bisher nicht geklärt werden, ob der Index auch zwischen Patienten mit Lungenkrebs und Patienten mit ähnlicher Symptomatik unterscheiden kann (benigne Lungenerkrankungen, andere Neoplasien etc.).

Material und Methoden: Für die Studie wurden Plasmaproben von Patienten aus der Berliner Charité von 2004-2005 sowie 2008 gesammelt und verwendet. Die Patienten wurden gemäß ihrer Histologie in folgende Gruppen eingeteilt: Patienten mit bisher unbehandelten Lungentumoren, Lungentumoren unter/nach Therapie, Patienten mit benignen Lungenerkrankungen sowie Patienten mit diversen anderen Neoplasien. Aus den Plasmaproben wurde DNA extrahiert und die DNA-Integritäts-Indices anhand der Zielsequenz K-ras (K-ras 300/ K-ras 60) mittels qPCR bestimmt.

Ergebnisse: Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der DNA-Integritäts-Indices zwischen Patienten mit unbehandelten Lungentumoren, Lungentumoren unter Therapie sowie Patienten mit benignen Lungenerkrankungen oder Patienten mit anderen Neoplasien ($p > 0,05$). Die entsprechende ROC-Kurve deutete stark auf einen Zufallsprozess hin.

Schlussfolgerungen: Der hier verwendete DNA-Integritäts-Index zeigte sich als zu unspezifisch, um diesen allein genommen für diagnostische Zwecke bei Lungenkrebspatienten einzusetzen. Ob andere Zielsequenzen von Genen bzw. andere Fragmentlängen oder die Kombination von weiteren Biomarkern zu einem verbesserten Ergebnis geführt hätten, muss erst durch weitere Studien evaluiert werden. In Anbetracht der Datenlage und Ergebnisse dieser Studie ist der DNA-Integritäts-Index für diagnostische Zwecke jedoch wenig zielführend.

Dörner, Natalie Regina: Der DNA-Integritäts-Index K-ras 300/60 in der "liquid biopsy" und sein diagnostischer Nutzen bei Lungentumoren, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 68 Seiten, Erscheinungsjahr 2018

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Lungenkrebs	1
1.1.1	Ätiologie und Epidemiologie von Lungenkrebs	1
1.1.2	Diagnostik und Früherkennung	2
1.2	Biomarker	3
1.2.1	Definition und Verwendungszweck	3
1.2.2	Tumormarker als Biomarker in der Onkologie	4
1.2.3	Anforderungen an diagnostische Tumormarker	4
1.3	Zirkulierende zellfreie DNA (cfDNA) als Biomarker	5
1.3.1	Definition und Eigenschaften zirkulierender zellfreier DNA	5
1.3.2	Ursprung zirkulierender zellfreier DNA	6
1.3.3	Quantitative Veränderungen von cfDNA bei Patienten mit Tumorerkrankungen	7
1.3.4	Qualitative Veränderungen von cfDNA bei Patienten mit Tumorerkrankungen: DNA-Integritäts-Index	8
2.	ZIELSTELLUNG	11
3.	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Material	12
3.1.1	Primer	12
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	12
3.1.3	Geräte	13
3.2	Methoden	13
3.2.1	Probengewinnung	13
3.2.2	(Puffer-)Lösungen	14
3.2.3	Isolation von Plasma	15
3.2.4	Lyse der Roten Blutkörperchen	15
3.2.5	Phenolfreie DNA-Extraktion aus Zellsediment	16
3.2.6	DNA-Isolation aus den Plasmaproben der Patienten	16
3.2.7	Standardkurven	17
3.2.8	Konzentrationsbestimmung von cfDNA mittels Real Time PCR	20
3.2.9	Integritäts-Index Analysen	21
3.2.10	Statistische Programme	21

4.	ERGEBNISSE	22
4.1.	Deskriptive Statistik	22
4.1.1	Altersverteilung	23
4.1.2	Geschlecht	24
4.1.3	Raucherstatus	24
4.2.	DNA-Konzentrationen	25
4.3.	DNA Integritäts-Indices	29
4.4.	Diagnostische Sensitivität der DNA Integritäts-Indices	36
5.	DISKUSSION	39
5.1	Präanalytische Faktoren und Limitationen	41
5.2	Interpretation der Ergebnisse	43
5.3	Schlussfolgerung	48
6.	ZUSAMMENFASSUNG	51
7.	LITERATURVERZEICHNIS	53
8.	THESEN	68

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ACCP	American College of Chest Physicians
AUC	Area under the curve
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cfDNA	circulating cell-free deoxyribonucleic acid
CNAPs	circulating nucleic acids in plasma and serum
CT	Computertomographie
Ct-Wert	cycle treshold
DDW	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
etc.	et cetera
e.V.	eingetragener Verein
GBM	Glioblastoma multiforme
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V.
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HPSF	high purity salt free
IBM	International Business Machines Corporation
insg.	insgesamt
kB	Kilobase
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
M	Molare Masse
MA	Bundesstaat Massachusetts
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
MO	Bundesstaat Missouri
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCI	National Cancer Intsitute
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NIH	National Institute of Health
NLST	National Lung Screening Trial

NTC	No Template Control
N.V.	Aktiengesellschaft (Niederlande: naamloze vennootschap)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
(q)PCR	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
re	reverse
RNA	Ribonucleic acid
ROC	Receiver Operating Characteristic
rpm.	revolution per minute: Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
Sig.	Signifikanz
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
St.	Saint
Tm	Schmelztemperatur
TTNA	Transthorakale Nadelaspiration
u.a.	unter anderen
UK	United Kingdom
UKH	Universitätsklinikum Halle (Saale)
USA	United States of America
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WBC	White Blood Cells
xg	Maßeinheit der relativen Zentrifugalkraft
z.B.	zum Beispiel
ZfKD	Zentrums für Krebsregisterdaten

Symbole

Δ	Delta = Differenz
----------	-------------------

1. Einleitung

1.1. Lungenkrebs

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie von Lungenkrebs

In Deutschland lag im Jahre 2013 die altersstandardisierte Sterberate für Lungenkrebs bei Männern bei 48,8 pro 100.000 Einwohner und bei Frauen bei 21,7 pro 100.000 Einwohner (Robert Koch-Institut 2016). Während die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten bei Männern trendmäßig rückläufig waren, stiegen sie bei den Frauen, bedingt durch veränderte Rauchgewohnheiten, deutlich an (Robert Koch-Institut 2016).

Nach den Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Institutes erkrankten so im Jahre 2013 18.810 Frauen und 34.690 Männer an bösartigen Lungentumoren. 15.140 Frauen und 29.708 Männer verstarben in dem gleichen Jahr an Lungenkrebs.

Lungenkrebs zählt u.a. wie Bauchspeicheldrüsenkrebs oder Mesotheliome zu den prognostisch ungünstigen Tumoren und hat eine 5-Jahres-Überlebensrate von gerade einmal 21% bei Frauen und 16% bei Männern (Stand 2013) (Robert Koch-Institut 2016). Lungenkrebs wird durch die späte Symptomatik häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, sodass die Diagnosestellung in den Jahren 2011 bis 2012 in 32% der Fälle (bei Männern sowie bei Frauen in Deutschland) erst im Tumorstadium T4 erfolgte (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2015).

Schon in den 1950er Jahren wurde das Tabakrauchen als eine Hauptursache für die Entstehung von Lungentumoren diskutiert (Wynder E. L. and Graham E. A 1950). Mittlerweile konnte in weiteren Studien die Wirkung von Tabakrauchen auf die Entstehung von Lungenkrebs belegt werden (Peto et al. 2000; Hecht 1999; Tonini et al. 2013), sodass inzwischen das Tabakrauchen als ein Hauptrisikofaktor für Lungentumoren gilt (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2015). In einigen (Meta-)Analysen konnte gezeigt werden, dass auch Passivrauchen das Krebsrisiko wesentlich erhöht (Taylor et al. 2007; Brennan et al. 2004; Hackshaw et al. 1997).

Weitere Risikofaktoren für Lungenkrebs sind kanzerogene Stoffe, die vor allem im beruflichen Umfeld zu einer erheblichen Belastung führen können. Hierunter zählen

Stoffe wie Asbest, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Quarz- und Nickelstäube, aber auch ionisierende Strahlung am Arbeitsplatz kann das Risiko für Krebs erhöhen (Butz 2012). Untergeordnet spielen weiterhin allgemeine Luftverschmutzungen (Raaschou-Nielsen et al. 2013) oder Radonbelastungen (Darby et al. 2005; Darby et al. 2006) in den unteren Stockwerken von Wohnhäusern eine Rolle.

1.1.2 Diagnostik und Früherkennung

Neben ausführlicher Anamnese und Laboruntersuchungen wird nach der aktuellen S3-Leitlinie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie) 2018) das Röntgen Thorax in zwei Ebenen als initiales bildgebendes Verfahren zur Diagnostik von Lungenkarzinomen empfohlen. Weiterhin ist vor jeder Bronchoskopie oder Mediastinoskopie ein CT-Thorax durchzuführen, um die oben genannten Untersuchungsmethoden zeitsparender durchführen zu können und um deren Erfolgsaussichten zu steigern.

Nach den Empfehlungen der S3-Leitlinie ist die Bronchoskopie das wichtigste Verfahren zur Diagnosesicherung und Materialbeschaffung für die morphologische Beurteilung und eignet sich vor allem bei der Diagnostik von zentral gelegenen Lungentumoren (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie) 2018) (Goeckenjanetal.É . Bei peripheren Befunden werden entweder die transthorakale Nadelaspiration (TTNA) oder transbronchiale Biopsieverfahren empfohlen.

Bislang gibt es jedoch noch immer keine adäquaten Früherkennungsmaßnahmen (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2015). Zwar wurden schon in früheren Jahren Untersuchungen über den Nutzen von Vorsorgeuntersuchungen bei Hochrisikopatienten in verschiedenen Studien (Fontana et al. 1986; Melamed et al. 1984; Kubík and Polak 1986; Wilde 1989) durchgeführt, allerdings konnte weder für das Röntgen Thorax noch für Sputumzytologien (Manser et al. 2003) eine Mortalitätsreduktion gezeigt werden.

Mit der Einführung der Computertomographie (CT) kam eine weitere Früherkennungsmethode in Betracht, sodass begonnen wurde, die Eignung der Spiralcomputertomographie als Screeningmethode bei Lungenkrebs zu erforschen (Henschke et al. 1999; Sone et al. 1998). In einer großen Kohortenstudie, der National Lung Screening Trial (NLST), wurde das Low-Dose CT mit konventionellem Röntgen als Screeningmethode verglichen (Aberle et al. 2011). Dabei konnte zwar

eine Mortalitätsreduktion durch das Screening mittels Low-dose CT gegenüber dem Röntgen-Thorax von 20% gezeigt werden, allerdings lag die Rate der falsch-positiven Fälle beim Low-dose CT bei 96,4% und beim konventionellen Röntgen bei 94,5%. Die Number needed to Screen betrug 320 (Aberle et al. 2011). Zusätzlich wurden kleinzellige Bronchialkarzinome weder vom Low-dose CT noch vom Röntgen-Thorax in frühen Stadien erfasst. Aberle et al. kamen zu dem Entschluss, dass die Ergebnisse der NLST allein nicht ausreichen, um zu entscheiden, ob sich das low-dose CT wirklich als Screeningmethode eignet (Aberle et al. 2011). In der US-Leitlinie von 2013 empfiehlt das American College of Chest Physicians (ACCP) zumindest bei Hochrisikogruppen das Low-dose CT als Screening auf Lungenkrebs. Zu den Hochrisikogruppen werden dabei Raucher und ehemalige Raucher zwischen 55 und 75 Jahren, welche mindestens insgesamt 30 Packungsjahre (engl. pack-years) geraucht haben und wo die ehemaligen Raucher erst in den letzten 15 Jahren aufgehört haben, gezählt (Detterbeck et al. 2013). Zum Teil wird dieses Verfahren auch von den Krankenkassen bezahlt.

Ein Screening mittels Tumormarker wird aufgrund der derzeitigen Studienlage nicht für den Routineeinsatz empfohlen. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie) 2018).

1.2 Biomarker

1.2.1 Definition und Verwendungszweck

2001 definierte das amerikanische National Institute of Health (NIH) gemeinsam in Koordination mit einem Programm der WHO (International Programme on Chemical Safety) Biomarker als charakteristische und messbare biologische Merkmale, die auf einen normalen oder krankhaften Prozess im Körper hindeuten bzw. Aufschluss über das Ansprechen einer Therapie geben (WHO International Programme on Chemical Safety 2001).

Eingeteilt werden Biomarker in der Medizin nach ihrem Verwendungszweck. Prognostische Biomarker werden eingesetzt, um Aussagen über Heilungschancen und/oder den Krankheitsverlauf zu machen. Prädiktive Biomarker erlauben es, Aussagen über ein mögliches Therapieansprechen zu machen (Ludwig 2012). Zu guter Letzt gibt es noch Biomarker für das Staging einer Erkrankung und diagnostische Biomarker. Letztere identifizieren Patienten mit einer ganz bestimmten Erkrankung unter Patienten mit ähnlichen Krankheiten oder Symptomen. Ein Beispiel dafür sind erhöhte Glukosespiegel im Blut des Patienten

als Hinweis auf einen Diabetes mellitus (Jr Atkinson A.J., W. A. Colburn, V. G. DeGruttola, D. L. DeMets, G. J. Downing, D. F. Hoth, J. A. Oates, C. C. Peck, R. T. Schooley, B. A. Spilker, J. Woodcock, S. L. Zeger 2001).

1.2.2 Tumormarker als Biomarker in der Onkologie

Tumormarker sind Substanzen, die im Gewebe, Blut oder anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können und auf Krebserkrankungen oder andere benigne Erkrankungen hinweisen können. Die meisten Tumormarker werden dabei sowohl von gesunden Zellen als auch von Tumorzellen freigegeben. Von Letzteren jedoch in einem höherem Maße (NCI Dictionary of Cancer Terms).

Sie sind somit Biomarker von Tumorerkrankungen und können wie diese als prädiktive, prognostische oder diagnostische Marker genutzt werden (NCI Dictionary of Cancer Terms).

1.2.3 Anforderungen an diagnostische Tumormarker

Ziel eines diagnostischen Tumormarker ist es, aus einem Kollektiv von Personen genau die herauszufiltern, die an einem Tumor erkrankt sind, und vor allem möglichst in einem frühen Stadium der Erkrankung. Dies erfordert hohe Anforderungen an diagnostische Tumormarker, da diese gleichzeitig sensitiv, aber auch spezifisch sein müssen. Ideal wären eine Sensitivität und Spezifität von 100%. Da alle bisherigen etablierten Tumormarker auch in geringer Menge von gesunden Zellen abgegeben werden (Löffler et al. 2007, S. 1159), eignen sich die wenigsten von ihnen zum Screening oder zur Diagnostik von Krebserkrankungen (Dörner 2009, S. 372). Ein zu hoher positiver prädiktiver Wert würde viel zu häufig einen später unbegründeten Tumorverdacht auslösen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie) 2018). Andererseits sollten durch falsch negative Ergebnisse nicht zu viele Patienten übersehen werden. Weitere Anforderungen an einen idealen Tumormarker wären außerdem eine leichte Zugänglichkeit des Probenmaterials (zum Beispiel Blut), eine geringe Abweichung zwischen Ergebnissen verschiedener Labore, eine einfache Durchführung und möglichst geringe Kosten des Nachweisverfahrens (Fleischhacker und Schmidt 2010).

1.3 Zirkulierende zellfreie DNA (cfDNA) als Biomarker

1.3.1 Definition und Eigenschaften zirkulierender zellfreier DNA

Extrazelluläre Nukleinsäuren (engl. circulating nucleic acids in plasma and serum = CNAPS) lassen sich unter anderem frei zirkulierend im Blut finden. Dazu gehören RNA, mitochondriale DNA oder genomische DNA. Letztere wird in der Literatur häufig als zirkulierende zellfreie DNA (engl. circulating cell-free DNA = cfDNA) angegeben (Jung et al. 2010). Ausgangsmaterial für die Messung von cfDNA kann sowohl Plasma als auch Serum sein, aber auch andere Körperflüssigkeiten wie Urin, Sputum etc. sind möglich (Fleischhacker und Schmidt 2007). 1948 wurde von Mandel und Metais zum ersten Mal cfDNA im Plasma des Menschen nachgewiesen (MANDEL und METAIS 1948). Leon et al. wiesen einige Jahrzehnte später cfDNA im Serum von Patienten mit Krebserkrankungen nach und konnten bei ca. 40% der Patienten nach Radiotherapie ein Absinken der cfDNA-Menge beobachten. Obwohl dies verschiedene Ursachen haben könnte, schlussfolgerten Leon et al., dass umgekehrt ein fehlendes Absinken der Menge an cfDNA auf ein vermindertes Ansprechen auf die Therapie hinweisen könnte (Leon et al. 1977).

Stroun et al. waren schließlich die ersten, die zeigen konnten, dass cfDNA im Plasma nicht nur doppelsträngig und größtenteils einem geringen molekularen Gewicht vorliegt, sondern dass diese weder durch RNase oder Pronase, aber durch DNase I abgebaut wird (Stroun et al. 1987). Gemessene Werte des molekularen Gewichts von cfDNA variierten in Studien zwischen 0,18kB (Jahr et al. 2001) und maximal 21kB (Stroun et al. 1987). 1997 konnten Anker et al. zum ersten Mal tumorassoziierte genetische Alterationen, nämlich K-ras Mutationen in der cfDNA aus dem Plasma von Patienten mit kolorektalen Karzinomen nachweisen (Anker et al. 1997).

Holdenrieder et al. zeigten in einer Studie, dass cfDNA als nukleosomale Komplexe aus DNA und Histonen im Blut vorliegt (Holdenrieder et al. 2005). Suzuki et al. konnten diese Aussage bestätigen, zeigten aber auch, dass der größte Teil an cfDNA in gesunden Individuen an der Oberfläche von roten Blutkörperchen gebunden war (Suzuki et al. 2008). Laktionov et al. kamen zuvor, ähnlich wie Suzuki et al., in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass der größte Teil an cfDNA bei gesunden Probanden an Blutzellen gebunden vorlag (Laktionov et al. 2004).

Welche Mechanismen bei der Eliminierung von cfDNA eine Rolle spielen, konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass die Leber und untergeordnet die Nieren Einfluss auf die Eliminierung von cfDNA haben

(Minchin et al. 2001; Korabecna et al. 2008). Wie oben schon erwähnt, hat die DNase-Aktivität Einfluss auf die Menge an cfDNA. So konnte im Plasma von Patienten mit gewissen Tumorerkrankungen (Kolonkarzinom, Magenkarzinom, Prostatakarzinom) eine verringerte DNase-Aktivität nachgewiesen werden, welche wiederum zu einem Anstieg der Konzentration von cfDNA führte (Tamkovich et al. 2006; Cherepanova et al. 2008).

1.3.2 Ursprung zirkulierender zellfreier DNA

CfDNA ist sowohl in Plasma-/Serumproben von Patienten mit Tumoren als auch Patienten mit benignen Erkrankungen oder gesunden Individuen nachweisbar.

Dabei konnten die Mechanismen zur Freisetzung von cfDNA in den Blutkreislauf aus gesunden und erkrankten Zellen noch nicht umfassend geklärt werden. In der Literatur werden vor allem zwei mögliche Freisetzungsmechanismen, die zu quantitativen und qualitativen Veränderungen der cfDNA bei Tumorpatienten oder gesunden Individuen führen, diskutiert: Apoptose und Nekrose. Es wird angenommen, dass in gesunden Individuen cfDNA hauptsächlich durch Apoptose aus den Zellen freigegeben wird (Stroun et al. 2001a; Suzuki et al. 2008). Lui et al. vermuten sogar, dass die cfDNA im Blut von gesunden Individuen dabei hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen stammen (Lui et al. 2002).

Dagegen scheint in Patienten mit neoplastischen Erkrankungen cfDNA sowohl durch Apoptose als auch Nekrose freigesetzt zu werden (Giacona et al. 1998; Jahr et al. 2001).

Während bei der Apoptose relativ kleine Fragmente von cfDNA mit einer Größe um die 180 kb freigegeben werden, entstehen bei nekrotischen Prozessen wesentlich größere Fragmentlängen (Suzuki et al. 2008; Jahr et al. 2001). Neuere Studien wie diejenigen von Mouliere et al. konnten allerdings noch kleinere Fragmente als 180 kb Länge bei Patienten mit Tumorerkrankungen und gesunden Kontrollen nachweisen und schlussfolgerten, dass cfDNA nach apoptotischer Freisetzung aus den Zellen im Blutstrom durch Nukleasen, durch ein mononukleosomales Breakdown oder Phagozytose weiter fragmentiert werden könnte (Mouliere et al. 2014). Auch andere Arbeitsgruppen teilen die Ansichten von Mouliere und seiner Arbeitsgruppe (Jahr et al. 2001; Choi et al. 2005). Zum Beispiel die Arbeitsgruppe von Choi et al., die die Phagozytose durch Makrophagen als einen unterstützenden Prozess bei der Freisetzung von cfDNA sieht (Choi et al. 2005).

Aber nicht nur Apoptose und Nekrose allein werden als mögliche Ursache für Auftreten von cfDNA im Serum oder Plasma von Menschen diskutiert. Weitere

Hypothesen schließen die Freisetzung von cfDNA durch Zellyse von fragilen Tumorzellen (Stroun et al. 2000) oder sogar durch aktive Freisetzungsmechanismen von den Zellen in die Blutbahn nicht aus (Stroun et al. 2001b; Stroun et al. 2001a; Anker et al. 1999). Bronkhorst et al. konnten in ihrer in-vitro Studie zeigen, dass in der Zellkultur von 143B (humane Osteosarkom Zelllinie) nach ca. 24 Stunden Inkubation ein 2000 bp langes cfDNA-Fragment am häufigsten in das umliegende Medium freigesetzt wurde. Da diese Länge weder für apoptotische noch nekrotische Prozesse spricht, halten die Autoren es für sehr wahrscheinlich, dass auch aktive Freisetzungsmechanismen eine Rolle spielen könnten (Bronkhorst et al. 2016b).

Jiang et al. untersuchten mittels massiv paralleler Sequenzierung das Größenprofil von DNA im Plasma von Patienten mit HCC, chronischer Hepatitis B, Hepatitis B assoziierter Leberzirrhose und gesunden Kontrollen. Dabei konnten sie zeigen, dass je höher der Anteil an vom Tumor stammenden DNA im Plasma von HCC-Patienten war, desto mehr kleinere Fragmente insgesamt in demselben Plasma gemessen wurden (Jiang et al. 2015). Interessant war jedoch, dass bei Patienten mit HCC, bei denen ein geringerer Anteil an vom Tumor stammenden DNA im Plasma vorlag, insgesamt größere Fragmentlängen gemessen wurden als bei den gesunden Kontrollen. Jiang et al. vermuten, dass dieser Teil der DNA vom nicht neoplastischen Lebergewebe, welches den Tumor umgibt, stammte und somit nekrotischen Ursprungs sein könnte.

1.3.3 Quantitative Veränderungen von cfDNA bei Patienten mit Tumorerkrankungen

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass im Plasma oder Serum von Patienten mit Tumorerkrankungen höhere Mengen an cfDNA messbar waren als bei gesunden Kontrollgruppen (Hauser et al. 2010; Leon et al. 1977; Yoon et al. 2009; Shi et al. 2012). Dabei führen wahrscheinlich die vermehrte Freisetzung von cfDNA aus Tumorzellen sowie die zusätzliche Freisetzung aus gesunden Zellen zu einem generellen Anstieg der totalen cfDNA-Menge (Jung et al. 2010). In einer Studie von Stroun et al. konnte gezeigt werden, dass der größte Anteil an cfDNA im Plasma von Tumorpatienten von den Tumorzellen selbst stammt (Stroun et al. 1989).

Allerdings konnte bislang kein sicherer Nutzen der totalen cfDNA-Menge als Tumormarker bewiesen werden. Grund dafür sind unter anderem die unterschiedlich gemessenen cfDNA-Mengen in den Studien selbst, wahrscheinlich bedingt durch nicht standardisierte präanalytische Faktoren (Schmidt et al. 2008).

Diese machen es praktisch unmöglich, geeignete Cut-off Werte zu setzen, um zwischen Tumorpatienten und gesunden Individuen zu unterscheiden. So gibt es auch Studien, die zwar höhere Mengen an cfDNA bei Tumorpatienten und Patienten mit benignen Erkrankungen gemessen haben, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen fanden (Holdenrieder et al. 2008b; Herrera et al. 2005).

Grund dafür sind die Überschneidungen der Werte bei Tumorpatienten, Patienten mit korrespondierenden benignen Erkrankungen und gesunden Kontrollen (Zaher et al. 2013). Ein niedrig gesetzter Cut-off Wert würde hinsichtlich dieses Problems die Sensitivität des Tests zwar steigern, aber gleichzeitig die Spezifität verringern (Jung et al. 2010). Der diagnostische Wert der totalen Menge an cfDNA, um zwischen Tumorpatienten und gesunden Kontrollen zu unterscheiden, ist somit relativ gering. Es konnte außerdem in weiteren Studien gezeigt werden, dass auch körperliche Betätigungen, Traumata, Verbrennungen oder andere Erkrankungen wie Sepsis, Sichelzellanämie, Myokardinfarkt, SLE die Menge an totaler cfDNA im Plasma oder Serum von Patienten beeinflussen (Atamaniuk et al. 2004; Lo et al. 2000; Chiu et al. 2006; MARTINS et al. 2000; Vasavda et al. 2007; Chang et al. 2003; Tan et al. 1966).

1.3.4 Qualitative Veränderungen von cfDNA bei Patienten mit Tumorerkrankungen: DNA-Integritäts-Index

Zu den qualitativen Veränderungen der cfDNA werden unter anderem Mutationen, Mikrosatelliten-Veränderungen, Abweichungen im Methylierungsstatus oder der DNA-Integritäts-Index gezählt. Da diese wesentlich spezifischer sind, wird deren diagnostische Kapazität bei Tumorerkrankungen höher als die reine Messung der Gesamtmenge an cfDNA prognostiziert. Der DNA-Integritäts-Index beruht dabei auf der Hypothese, dass gesunde Zellen DNA hauptsächlich durch Apoptose in die Blutbahn freisetzen und Tumorzellen eher durch Nekrose (siehe Kapitel 1.3.2) (Jahr et al. 2001; Suzuki et al. 2008). Wang et al. wiesen bei Tumorpatienten eine höhere Menge eines β -Aktin-Fragmentes mit einer Länge von 400bp als jenes mit einer Länge von 100bp im Vergleich zu Patienten mit nicht neoplastischen Erkrankungen nach (Wang et al. 2003). Aus dieser Beobachtung wurde schließlich der DNA-Integritäts-Index, als das Verhältnis von einem großen DNA-Fragment zu einem kleinen, konstruiert. Dazu wurde eine komplexe Formel, basierend auf den gemessenen Ct-Werten der qualitativen PCR, erstellt (Wang et al. 2003). Umetani et al. verwendeten dagegen einen vereinfachten Index, bestehend aus dem

Verhältnis der Konzentration eines großen DNA-Fragmentes zu der Konzentration eines kleineren DNA-Fragmentes (Umetani et al. 2006c; Umetani et al. 2006b).

Es gibt jedoch auch Studien, die wiederum das umgekehrte Verhältnis, also das kleine DNA-Fragment im Verhältnis zu einem großem Fragment, gemessen haben (Tomita et al. 2007). Dieser umgekehrte DNA-Integritäts-Index wird in wenigen Studien auch als apoptotischer Index bezeichnet (Ellinger et al. 2008a; Ellinger et al. 2008b).

Mittlerweile wurden in einigen Studien der Integritäts-Index und dessen Eignung als diagnostischer oder prognostischer Biomarker untersucht. Wang et al. waren die ersten, die die diagnostische Sensitivität des DNA-Integritäts-Index im Plasma von Patienten mit Neoplasien und Patienten ohne neoplastische Erkrankungen analysierten (Wang et al. 2003). Der mittlere DNA-Integritäts-Index bei den Tumorpatienten lag dabei bei 0,66, während er bei der Kontrollgruppe bei 0,14 lag. Mit einer AUC der ROC-Kurve von 0,911 für den DNA-Integritäts-Index, im Gegensatz zu 0,71 für die totale Menge an cfDNA, prognostizierten sie den DNA-Integritäts-Index als einen vielversprechenden Tumormarker (Wang et al. 2003). Andere Studien folgten mit ähnlichen Ergebnissen bei der Untersuchung von Patienten mit Brusttumoren, Kolonkarzinomen, HCC, Rektumkarzinomen, Gliomen, akuten Leukämien, Kopf- und Halstumoren, Nierenzellkarzinomen, Ösophaguskarzinomen oder Prostatakarzinomen versus gesunder Kontrollgruppen (Umetani et al. 2006c; Agostini et al. 2011; Shi et al. 2012; Jiang et al. 2006; Gang et al. 2010; Umetani et al. 2006b; Tomita et al. 2007; Hanley et al. 2006; Gao et al. 2010; Huang et al. 2016). Der DNA-Integritäts-Index war insgesamt bei den Tumorpatienten deutlich höher als bei den gesunden Kontrollen. Trotzdem gibt es auch einige wenige Studien, die ein umgekehrtes Verhältnis von großen zu kleinen DNA-Fragmenten fanden: Der DNA-Integritäts-Index bei gesunden Kontrollen war hier größer als bei den Tumorpatienten (Ellinger et al. 2008b; Mouliere et al. 2011). Viele der oben genannten Studien analysierten außerdem nur den Unterschied zwischen Tumorpatienten und gesunden Probanden. Bisher gibt es nur wenige Studien, die den DNA-Integritäts-Index zwischen Patienten mit Tumorerkrankungen und Patienten mit korrespondierenden benignen Erkrankungen verglichen haben (Schmidt et al. 2008; Holdenrieder et al. 2008b; Stötzer et al. 2014; Hao et al. 2014; Bedin et al. 2016; El-Gayar et al. 2016; Huang et al. 2016; Szpechcinski et al. 2016). In der Studie von Holdenrieder et al. gab es zwischen den Patienten mit Tumorerkrankungen (u.a. Kolorektale Karzinome, Brustkrebs, Ovarialkarzinome etc.) und den Patienten mit korrespondierenden benignen Erkrankungen keinen

signifikanten Unterschied bezüglich des DNA-Integritäts-Index (Holdenrieder et al. 2008b). Auch Schmidt et al. konnten diesbezüglich keinen Unterschied zwischen Patienten mit Lungenkrebs und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen sehen (Schmidt et al. 2008). Stötzer et al. fanden dagegen einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit Brusttumoren, einer kleinen Gruppe von Patienten mit benignen Erkrankungen und gesunden Kontrollen. Sie kamen allerdings zu dem Schluss, dass aufgrund von vermehrt auftretenden Streuwerten bei den gesunden Kontrollgruppen die Verwendbarkeit des DNA-Integritäts-Index als diagnostischer Biomarker im Einzelfall eher limitiert sei (Stötzer et al. 2014).

Andere Studien konnten wie Stötzer et al. einen signifikanten Unterschied des DNA-Integritäts-Index zwischen Patienten mit kolorektalen Karzinomen, Patienten mit benignen Polypen oder Adenomen sowie gesunden Kontrollen feststellen und prognostizierten diesen als geeigneten diagnostischen Biomarker bei der Erkennung von Kolonkarzinomen (Bedin et al. 2016; El-Gayar et al. 2016; Hao et al. 2014).

Szpechcinski et al. fanden im Gegensatz zu Schmidt et al. einen Unterschied mit Tendenz zur Signifikanz zwischen Patienten mit NSCLC und Patienten, bei denen radiologisch ein benigner Rundherd aufgefallen war (Szpechcinski et al. 2016).

2. Zielstellung

Da es bislang noch kaum geeignete Biomarker für die Erkennung von Lungenkrebs gibt und dieser häufig erst spät entdeckt wird, sollte der Nutzen des DNA-Integritäts-Index K-ras 300 / 60 als eventueller diagnostischer Biomarker bei Lungentumoren untersucht werden. In einer früheren Arbeit von Schmidt et al. konnte bisher kein sicherer Nutzen dieses Index festgestellt werden (Schmidt et al. 2008). Da die Stichprobe in der früheren Arbeit jedoch relativ klein war, sollten in dieser Arbeit die bisherigen Ergebnisse überprüft werden. Das Augenmerk lag dabei auf der Unterscheidungsfähigkeit zwischen Patienten mit Lungentumoren und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen, da genau letztere ähnliche Symptome wie beim Lungenkrebs zeigen können. Darüber hinaus sollte dieser DNA-Integritäts-Index bei anderen neoplastischen Erkrankungen sowie bei Patienten mit Lungentumoren, die bereits unter Therapie stehen/standen, zum Vergleich gemessen werden. Schließlich stellen auch Lungenmetastasen eine wichtige Differentialdiagnose zum Lungenkarzinom dar.

Weiterhin sollte ein möglicher Einfluss der Aufbewahrungszeit von Plasmaproben sowie DNA-Proben auf den DNA-Integritätsindex überprüft werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

In den nachfolgenden Tabellen sind die Chemikalien, Geräte und Primer aufgelistet, welche für diese Studie in den einzelnen Messungen bzw. Versuchen genutzt wurden. Der hier verwendete Primer waren HPSF aufgereinigt und stammten von der Firma Eurofins Genomics GmbH (siehe Tabelle 1).

3.1.1 Primer

Tabelle 1: Verwendete Primer. HPSF aufgereinigt, Hersteller: Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg.

Primer	Sequenz	Tm (°C)	Länge des Primers
K-ras 60 Hf (forward primer)	5' GCC TGT GAC CTA CAG TGA AAA 3'	57.9	21
K-ras 300 Hf (forward primer)	5' GGT CCT TTT CCG TGT GTA GG 3'	59.45	20
K-ras 145-300 re (reverse primer)	5' TGA CCA AGC AAA ACA GAC CA 3'	55,3	20

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Produkte	Hersteller
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qiagen N.V., Hilden
Ethanol (100%)	Sigma, St. Louis, Mo. USA
Ethanol (96%)	Sigma, St. Louis, Mo. USA
Ethanol (70%)	Sigma, St. Louis, Mo. USA
PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Linz Österreich
iQ Universal SYBR Green <u>Supermix</u>	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, Kalifornien USA
Isopropanolol (100%)	Sigma, St. Louis, Mo. USA

3.1.3 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte.

Produkte	Hersteller
QIAvac 24 Plus	Qiagen N.V., Hilden
VacSafe 15	LaboGene, Lyngø Dänemark
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, MA USA
Rollenmischer SRT6	Bibby Scientific / Stuart, Staffordshire, UK

3.2 Methoden

3.2.1 Probengewinnung

Für diese Studie wurden in der Berliner Charité zwischen 2004 und 2005 von insgesamt 191 Patienten Blutproben in EDTA-Röhrchen gesammelt. Das Forschungsvorhaben wurde von der ortsständigen Ethik-Kommission am 10.12.2001 bewilligt. Gemäß ihrer klinischen Diagnosen wurden die Patienten retrospektiv in drei Gruppen eingeteilt: Patienten mit einem Lungentumor, Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung (Bronchitis, Pneumonie, Sarkoidose etc.) und Patienten mit diversen anderen Neoplasien (z.B. Kolonkarzinom, Melanom, Magenkarzinom etc.). Die Gruppe der Patienten mit Lungentumoren wurde in dieser Studie dabei folgendermaßen definiert: alle Patienten, bei denen zu dem Zeitpunkt der Blutabnahme ein klinisch bzw. histologisch oder zytologisch gesichertes NSCLC oder SCLC vorlag, wurden dieser Gruppe 1 zugeteilt. Da viele der Patienten dieser Gruppe bereits eine Therapie erhalten haben oder zumindest zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme unter Therapie standen, wurde in einem zweiten Teil die Gruppe noch einmal unterteilt in Patienten, die noch unbehandelt waren und Patienten, die bereits unter Therapie (Chemotherapie, Radiatio oder Operation) standen bzw. behandelt wurden. Alle Patienten dagegen mit histologisch oder zytologisch gesicherten benignen Lungenerkrankungen wurden in Gruppe 2 eingeordnet. Gruppe 3 bestand dagegen aus Patienten, bei denen histologisch bzw. zytologisch eine andere Neoplasie als Ursache für die in der Lunge auftretende Raumforderung gefunden wurde.

Da die Proben aus der Berliner Charité teilweise schon 10 Jahre bei -80°C im Kühlschrank gelagert wurden, wurde zum Vergleich eine zweite Stichprobe von insgesamt 40 weiteren Blutproben aus dem Jahr 2008 von Patienten aus der Berliner Charité. Diese Proben dienten zum Vergleich, ob die Aufbewahrungszeit der Plasmaproben einen Einfluss auf den DNA-Integritäts-Index bzw. auf seine diagnostische Kapazität hat.

Weiterhin wurden von einem gesunden Blutspender aus dem Universitätsklinikum Halle Saale 10 ml Blut in einem EDTA-Röhrchen abgenommen, um aus den weißen Blutkörperchen DNA zu extrahieren. Diese WBC-DNA diente in der Studie zur Generierung von Standardkurven und als Standardprobe. Auch hier lag die Einwilligung des Probanden vor und das Forschungshaben wurde von der ortsständigen Ethik-Kommission bewilligt (Bearbeitungs-Nummer: 201 3-59; Titel der Studie: Aufbau einer Biobank im Rahmen des interdisziplinären Forschungsvorhaben zur molekularbiologischen Charakterisierung maligner Lungenerkrankungen).

3.2.2 (Puffer-)Lösungen

Lysepuffer für Lyse der Roten Blutkörperchen:

1,55 M NH_4Cl	41,45g / 500 ml DDW
100 mM KHCO_3	5g / 500 ml DDW
0,5 mM EDTA	29,2g / 200 ml DDW pH=8,0

NH_4Cl und KHCO_3 1:10 mit DDW verdünnen (jeweils 50ml NH_4Cl -Lösung und 50 ml KHCO_3 -Lösung für insgesamt 500 ml Endvolumen) und 0,2 ml EDTA pro 100 ml Lysepuffer (0,1 mM nach der Mischung) hinzufügen. Das Endvolumen mit DDW auffüllen und bei 4°C aufbewahren.

Die Aufbewahrungszeit lag bei maximal einer Woche.

1x SE:

	<u>300 ml</u>
75 mM NaCl	1,3 g
24 mM EDTA	2,7 g

pH 8,0 mit NaOH einstellen und autoklavieren!

20% SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz):

	<u>50 ml</u>
SDS	10 g
DDW	40 ml

TE-Puffer:

	<u>100ml</u>
2 M TrisHCL (pH=8,0)	0,5ml
0,5 M EDTA (pH=8,0)	0,2ml

Zunächst mit DDW erst auf 80ml auffüllen und den pH-Wert bestimmen. Dann auf 100ml auffüllen.

3.2.3 Isolation von Plasma

Für die Gewinnung von Plasma aus den 191 Blutproben, den 40 neueren Blutproben sowie für die der einen Standardprobe, wurden die EDTA-Röhrchen zunächst für 10 Minuten bei 500 xg (4°C) zentrifugiert. Danach wurde das überstehende Plasma in ein neues 15 ml Röhrchen transferiert. Dieses Röhrchen wurde für 15 Minuten bei 3000 xg erneut bei 4°C zentrifugiert, das Plasma vorsichtig abgenommen, aliquotiert und anschließend bei -80°C eingefroren. Die Proben aus Stichprobe 1 stammen dabei aus den Jahren 2004-2005 und wurden bis 2013-2014 gelagert, während die Proben aus Stichprobe 2 aus den Jahr 2008 abgenommen wurden und bis 2015 gelagert wurden.

3.2.4 Lyse der Roten Blutkörperchen

Nachdem das überstehende Plasma der Standardprobe abgenommen wurde, wurden für die Zellyse 25ml Lysepuffer in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Das Zellsediment der Standardprobe wurde dann mit Lysepuffer aufgefüllt und sorgfältig mit diesem vermischt, um anschließend in das vorbereitete 50 ml Röhrchen gegeben zu werden. Das Röhrchen wurde nun für 3-10 Minuten auf Eis gestellt, bis sich eine komplette Lyse aller Erythrozyten eingestellt hatte. Danach wurde die Probe für 10 Minuten bei 500 xg (4°C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das restliche Zellpellet wurde nochmals mit 20 ml Lysepuffer versehen und ein weiteres Mal für 10 Minuten bei 500 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und die verbliebenen Zellen wurden in 800 µl PBS

resuspendiert, um dann in ein 1,5 ml Tube gegeben zu werden. Das Tube wurde für 3 Minuten bei ca. 900xg rpm zentrifugiert. Auch hier wurde wieder der Überstand abgenommen und das Zellpellet anschließend bei -80°C eingefroren.

3.2.5 Phenolfreie DNA-Extraktion aus Zellsediment

Für die Lyse des Zellpellets wurde dieses zunächst in 5 ml 1x SE-Puffer vollständig resuspendiert. Danach wurden der Probe 100 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 125 µl 20% SDS beigemischt und das ganze gut vermischt über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Die bei Raumtemperatur inkubierte Probe wurde mit 1,5 ml gesättigter, steriler NaCl-Lösung (6 M) versehen und für 15 Sekunden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt. Im Anschluss wurde die Probe für 15 Minuten bei 5,250 xg (Raumtemperatur) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 2 Volumina Ethanol (100%) zu dem Überstand und langsamen Schwenken der Probe kam es zum Ausfällen der DNA. Diese wurde mit einem Glashaken herausgenommen, mit 70% Ethanol kurz gewaschen, um dann in einem Tube zum Trocknen ausgelegt zu werden. Die DNA wurde in 500 µl sterilem Bdest gelöst und über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer zum Rollen ausgelegt. Zum Schluss wurden 500 µl TE-Puffer zugegeben und die Konzentration und Reinheit der DNA photometrisch bestimmt. Die WBC-DNA wurde danach bei -20°C eingefroren.

3.2.6 DNA-Isolation aus den Plasmaproben der Patienten

Die Isolierung von DNA aus insgesamt 2 ml Plasmavolumen erfolgte mittels des QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen N.V., Hilden).

Dazu wurden den auf Raumtemperatur aufgewärmten Plasmaproben zunächst jeweils 200 µl QIAGEN Proteinase K und dann 1,6 ml ACL-Puffer beigemischt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben in einem Wasserbad bei 60°C für 30 Minuten inkubiert.

Dem Lysat wurden nun 3,6 ml ACB-Puffer hinzugefügt und nach weiterem kurzem Vortexen wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Gemäß dem Handbuch von Qiagen N.V erfolgte in weiteren Schritten mittels QIAvac 24 Plus (Qiagen N.V., Hilden) und der Vakuum Pumpe VacSafe 15 (LaboGene, Lyngø Dänemark) zuerst die Bindung der DNA an der Säule, dann die Waschung mittels ACW1- und ACW2-Puffer bzw. 96% Ethanol. Um Rückstände der Waschlösungen bzw. des Ethanols zu entfernen, wurden die Proben für 3 Minuten

bei 25.000 xg zentrifugiert. Die Filtermembran der QIAamp Mini Column (=Säule) wurde bei 56°C für 10 Minuten zum Trocknen inkubiert. Dann wurde die gebundene DNA in 2 Schritten à 30 µl AVE-Puffer für 1 Minute bei 25.000 xg aus der Membran eluiert. Die fertig isolierte DNA wurde für das weitere Verfahren bei -20°C eingefroren. In Stichprobe 1 wurden die DNA-Proben erst nach einem Jahr zur weiteren PCR-Messung verwendet und in Stichprobe 2 direkt im Anschluss an die DNA-Isolation.

3.2.7 Standardkurven

Zur Erstellung von Standardkurven (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2) für das Wildtyp K-ras Amplicon mit 60 bp und 300 bp Länge, sowie für alle anderen Messungen, wurde die Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System Software (Applied Biosystems, Waltham, MA USA) verwendet. Die Zielsequenz beider Primerpaare (K-ras 60 und K-ras 300) war das Intron 2 auf dem humanen Gen K-ras.

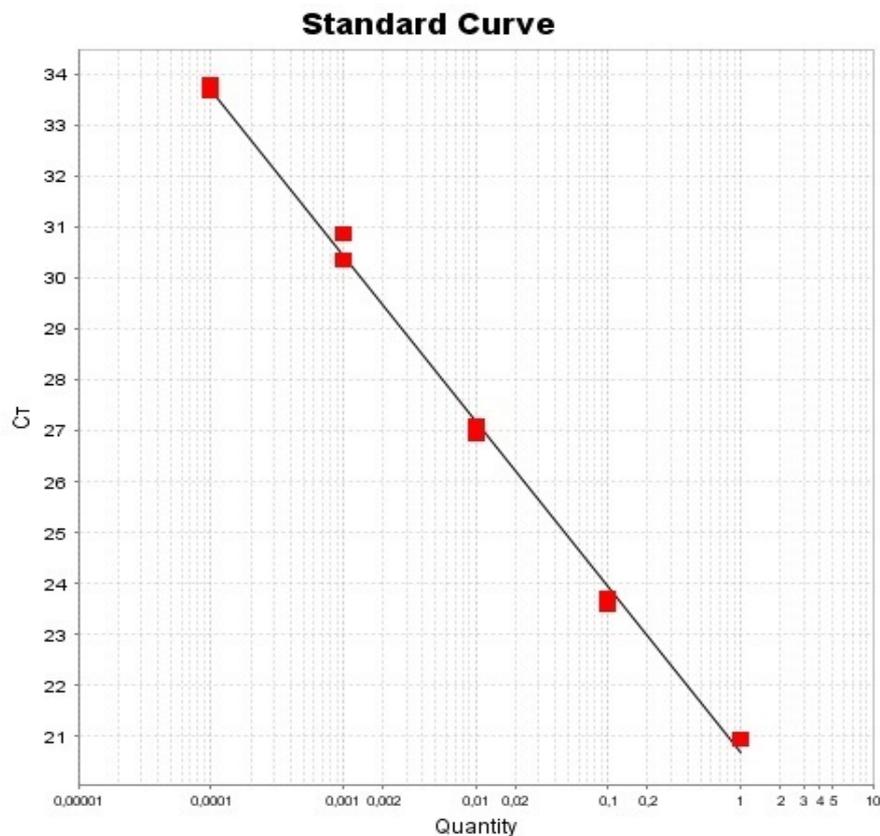


Abbildung 1: Standardkurve der Primerpaare K-ras (für 60bp Amplikon).

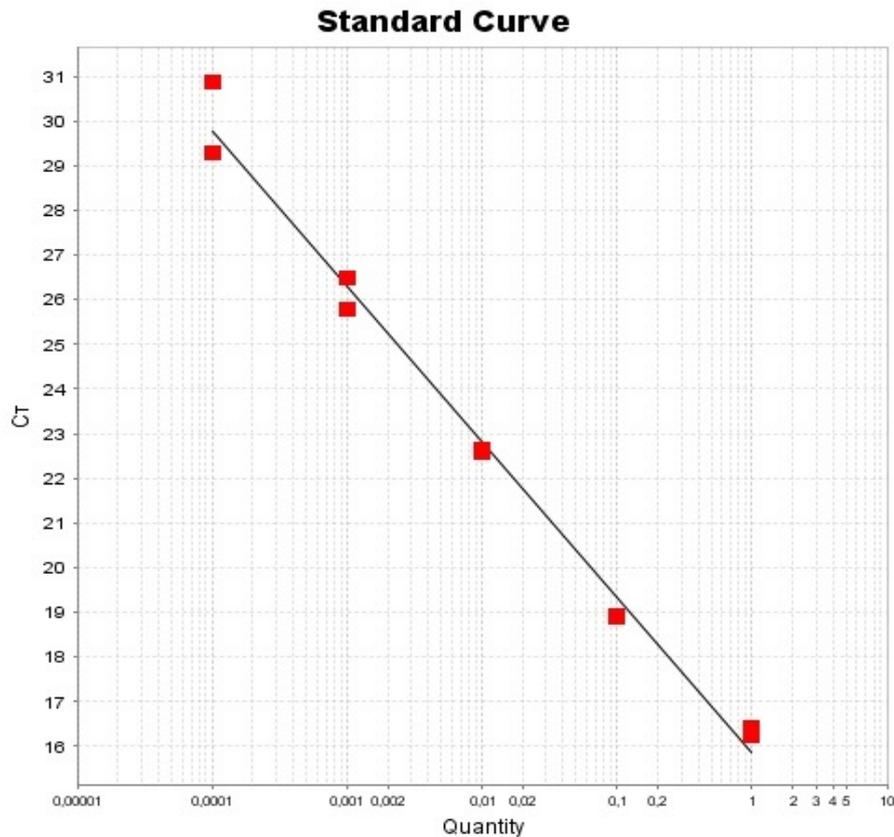


Abbildung 2: Standardkurve der Primerpaare K-ras (für 300bp Amplikon).

WBC-DNA wurde als Standard in einer Verdünnungsreihe von 1:10 (10er Schritte: 1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) verwendet. Die Konzentration an DNA in der Anfangsprobe der Verdünnungsreihe wurde mit Hilfe des NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) bestimmt und betrug 70 ng/µl.

Die qPCR der Verdünnungsreihe erfolgte nach den MIQE-Richtlinien (Bustin et al. 2009) und wurde mittels 7500 Real-Time-PCR Systems (Applied Biosystems, Waltham, MA USA) durchgeführt. Die Proben von je 15 µl Reaktionsvolumen wurden in Duplikaten gemessen. Jeder qPCR-Ansatz bestand dabei aus 7,5 µl PCR Mix (Universal SYBR Green Supermix von BioRad), 1,5 µl Sense Primer (0,3 pmol / µl), 1,5 µl Antisense Primer (0,3 pmol / µl), 1,5 µl destilliertem Wasser und 3 µl der DNA der Verdünnungsreihe (siehe Tabelle 4).

Die Temperaturzyklen bestanden aus mehreren sich wiederholenden Schritten: ein 10 Minuten andauernder Aktivations-Denaturations-Schritt bei 95°C, gefolgt von einem sich in insgesamt 40 Zyklen wiederholenden Schritt für zunächst 10 Sekunden bei 95°C und dann 30 Sekunden bei 56°C.

Um das amplifizierte Fragment sicher von anderen unspezifischen Nebenprodukten unterscheiden zu können, wurden zusätzlich Schmelzkurven erstellt, indem die Temperatur, mit einem zeitlichen Anstieg von insgesamt 1%, von 55°C auf 95°C erhöht wurde. Jedes Amplikon besaß dabei eine eigene spezifische Schmelztemperatur: Bei dem K-ras 60 Primerpaar lag der Höchstwert bei ca. 73°C, während er bei dem K-ras 300 Primerpaar bei ca. 81°C lag (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4).

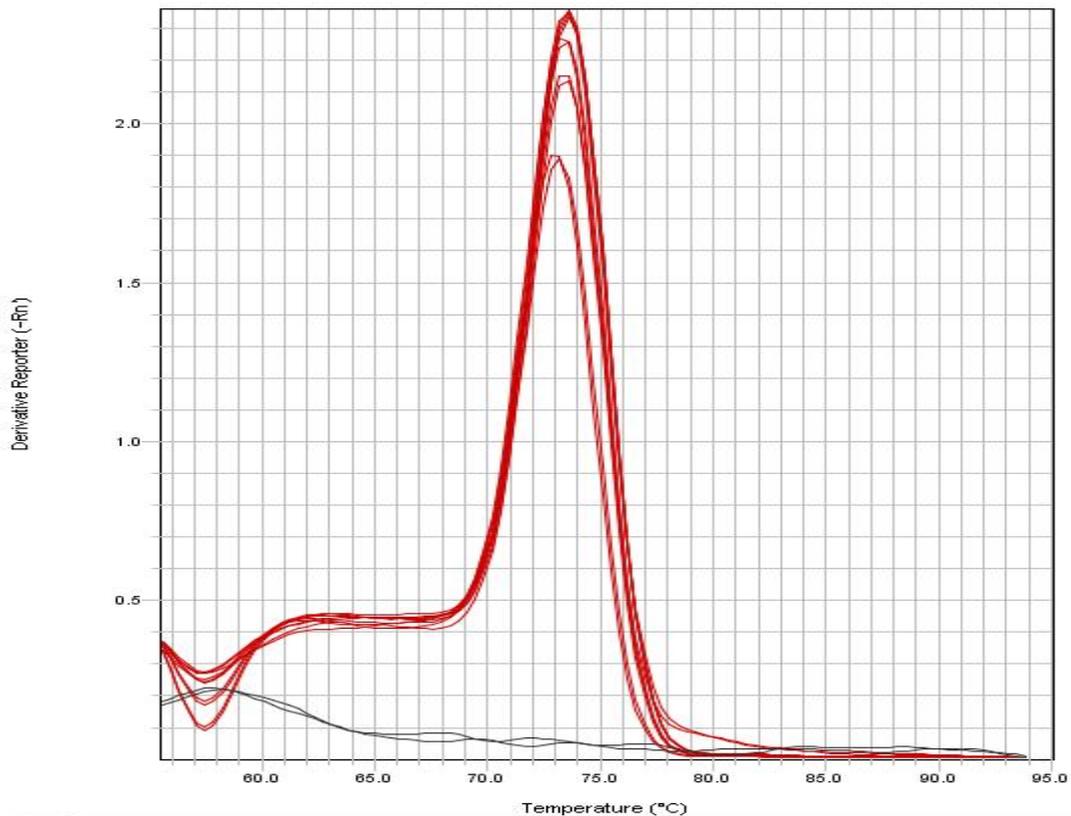


Abbildung 3: Schmelzkurve für K-ras 60. Amplifikationssignale am Beispiel von WBC-DNA. rot = Signal des 60bp Amplikon, grau = NTC

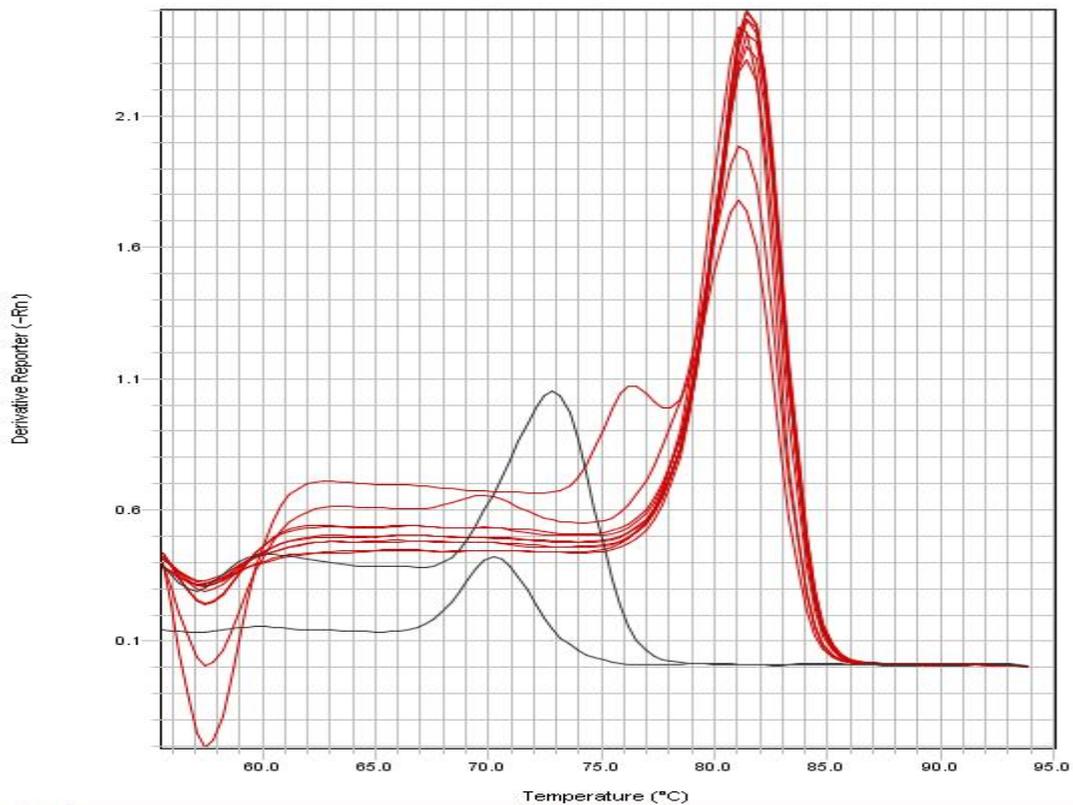


Abbildung 4: Schmelzkurve für K-ras 300. Amplifikationssignale am Beispiel von WBC-DNA. rot = Signal des 300bp Amplikon, grau = NTC

3.2.8 Konzentrationsbestimmung von cfDNA mittels Real Time PCR

Die qPCR der isolierten DNA aus den Plasmaproben erfolgte nach dem gleichen Programm wie die qPCR der Standardkurven (inklusive Schmelzkurven). Auch hier wurden die Proben in Duplikaten gemessen. Außerdem wurde auf jeder PCR-Platte noch WBC-DNA als Standard aufgetragen.

Mit Hilfe der Standardkurven konnten im Anschluss an die Messung die jeweiligen Konzentrationen an DNA ermittelt werden.

Tabelle 4: qPCR-Ansätze

Reagenz	Menge
Universal SYBR Green Supermix	7,5 µl
Sense Primer	1,5 µl
Antisense Primer	1,5 µl
Dest. Wasser	1,5 µl
DNA	3 µl
Gesamt	15 µl

3.2.9 Integritäts-Index Analysen

Der Integritäts-Index stellt das Verhältnis von einem längeren DNA-Fragment zu einem kürzeren DNA-Fragment dar. Insgesamt gibt es zwei verschiedene Berechnungsformeln: die Formel nach Umetani et al. (Integritäts-Index I) und die Formel nach Wang et al. (Integritäts-Index II) (Umetani et al. 2006c; Umetani et al. 2006b; Wang et al. 2003).

In dieser Arbeit wurden beide Formeln verwendet. Der Integritäts-Index I lässt sich als das Verhältnis der Konzentration von K-ras 300 zu der Konzentration von K-ras 60 berechnen. Da sich das 300 bp lange Amplikon im kürzeren 60 bp langen Amplikon wiederfindet, variiert dieser Index theoretisch nur zwischen 0 und 1.

Der Integritäts-Index II berechnet sich durch eine andere Formel, die im Gegensatz zum Integritäts-Index I auf den gemessenen Ct-Werten beruht:

$$\text{Integrity-Index II} = e^{-\Delta\Delta\text{Ct} \times \ln(2)},$$

wobei $\Delta\Delta\text{Ct}$ der Differenz von ΔCt_{60} zu ΔCt_{300} entspricht, und ΔCt_{60} bzw. ΔCt_{300} die Differenz zwischen dem Ct-Wert des Standards und dem Ct-Wert von K-ras 60 bzw. K-ras 300 darstellen.

3.2.10 Statistische Programme

Alle Ct-Werte, aus denen später die entsprechenden Konzentrationen an cfDNA in den Plasmaproben bestimmt wurden, wurden als Medianwerte angegeben.

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests bzw. Man-Whitney-U-Tests wurden die drei Gruppen auf signifikante Unterschiede untersucht. Diese Tests gehören zu den parameterfreien statistischen Tests und eignen sich für unabhängige Messreihen, wie sie auch hier vorgelegen haben.

Die Integritäts-Indices I und II wurden innerhalb der drei Gruppen miteinander verglichen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Vergleich der Integritäts-Indices zwischen der Gruppe Lungentumoren und der Gruppe benigne Lungenerkrankungen.

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet, und alle Berechnungen wurden mittels der IBM SPSS Statistics Software (Version 22, International Business Machines Corporation, Armonk, N.C., USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Deskriptive Statistik

Von den insgesamt 191 Plasmaproben aus den Jahren 2004 bis 2005 konnten bei 183 der Proben (96%) in der qPCR Ct-Werte gemessen und somit die Quantität an cfDNA bestimmt werden. Bei acht Proben (4%) gelang dies nicht, sodass diese für die weitere statistische Auswertung nicht berücksichtigt werden konnten. In Stichprobe 1 gehörten damit 92 Proben zur Gruppe 1 (Patienten mit Lungentumoren, davon 40 ohne bisherige Therapie und 52 mit Therapie), 56 Proben zur Gruppe 2 (Patienten mit benignen Lungenerkrankungen) und 35 Proben zur Gruppe 3 (Patienten mit anderen Neoplasien).

Bei den 40 jüngeren Proben, die im Jahr 2008 gesammelt wurden, konnten bei allen Proben Ct-Werte bestimmt werden. Stichprobe 2 bestand aus 21 Proben der Gruppe 1 (davon 16 ohne bisherige Therapie und 5 mit Therapie), 13 Proben der Gruppe 2 und 6 Proben der Gruppe 3.

Tabelle 5: Zusammensetzung der drei Gruppen in Stichprobe 1.

Stichprobe 1	Häufigkeit
Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren	92 (50,3%)
Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen	56 (30,6%)
Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien	35 (19,1%)
Gesamt	183

Tabelle 6: Zusammensetzung der drei Gruppen in Stichprobe 2.

Stichprobe 2	Häufigkeit
Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren	21 (52,5 %)
Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen	13 (32,5%)
Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien	6 (15,0%)
Gesamt	40

4.1.1 Altersverteilung

Das mittlere Lebensalter der Patienten aus der ersten Stichprobe lag bei ca. 61 Jahren, wobei der jüngste Patient dieser Stichprobe 23 Jahre alt war und der Älteste 80 Jahre (siehe Abbildung 5). Die Altersverteilung innerhalb der drei Gruppen verhielt sich ähnlich zu der gesamten Stichprobe: Auch hier lag das mittlere Lebensalter um die 60 Jahre (siehe Tabelle 7).

Die Altersverteilung der Patienten aus der zweiten Stichprobe war ähnlich der ersten Stichprobe. Auch hier lag das mittlere Lebensalter der Patienten bei ca. 61 Jahren. Der jüngste Patient war dabei 31 Jahre alt und der Älteste 82 Jahre (siehe Tabelle 8).

Tabelle 7: Altersverteilung der Patienten aus Stichprobe 1 (Proben aus der Berliner Charité 2004-2005). Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren, Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen, Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien und insgesamt

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gesamt
Mittelwert \pm SD	61,7 \pm 9,5	57,5 \pm 12,6	62,5 \pm 10,7	60,6 \pm 10,9
Median	63,5	60	64	62
Minimum	40	23	33	23
Maximum	80	80	78	80
N	92	56	35	183

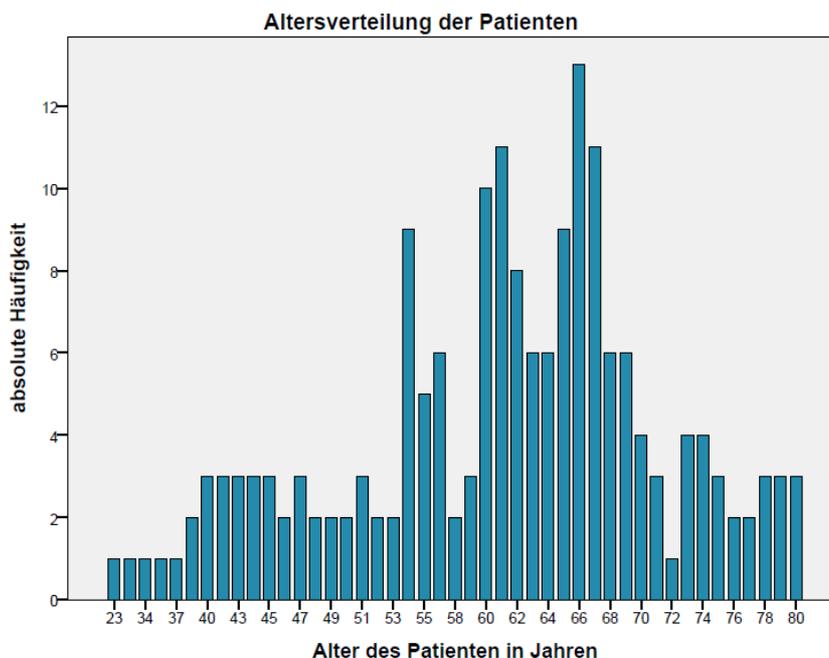


Abbildung 5: Altersverteilung der gesamten Stichprobe 1. (Berliner Charité 2004-2005).

Tabelle 8: Altersverteilung der Patienten aus Stichprobe 2 (Proben aus der Berliner Charité von 2008). Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren, Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen, Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien und insgesamt

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gesamt
Mittelwert \pm SD	64,2 \pm 11,8	56,9 \pm 12,0	60,0 \pm 18,5	61,2 \pm 13,1
Median	69	56	64,5	65,5
Minimum	36	33	31	31
Maximum	80	77	82	82
N	21	13	6	40

4.1.2 Geschlecht

Unter Ausschluss der oben genannten acht Proben bestand Stichprobe 1 aus Blutproben von insgesamt 116 männlichen und 67 weiblichen Patienten (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Geschlecht der Patienten aus Stichprobe 1

	Häufigkeit (relativ)
M	116 (63%)
W	67 (37%)
N	183

Die zweite Stichprobe bestand aus 21 männlichen und 19 weiblichen Patienten (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Geschlecht der Patienten aus Stichprobe 2

	Häufigkeit
M	21 (52,5%)
W	19 (47,5%)
N	40

4.1.3 Raucherstatus

Von den 183 Patienten aus Stichprobe 1 waren 72 (39%) Raucher, 55 (30%) ehemalige Raucher und 56 (31%) Nichtraucher. In Gruppe 1 war die Anzahl an Rauchern und Ex-Rauchern höher als in Gruppe 2 (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Raucherstatus der Patienten in Stichprobe 1. Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren; Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen, Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien und insgesamt

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gesamt
Raucher	44 (48%)	13 (23%)	15 (43%)	72 (39%)
Ex-Raucher	32 (35%)	13 (23%)	10 (29%)	55 (30%)
Nichtraucher	16 (17%)	30 (54%)	10 (29%)	56 (31%)
N	92	56	35	183

Tabelle 12: Raucherstatus der Patienten in Stichprobe 2. Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren; Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen, Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien und insgesamt

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gesamt
Raucher	10 (47,6%)	2 (15,4%)	3 (50%)	15 (37,5%)
Ex-Raucher	9 (42,9)	4 (30,8%)	1 (16,7%)	14 (30%)
Nichtraucher	2 (9,5%)	7 (53,8%)	2 (33,3%)	11 (31%)
N	21	13	6	40

In Stichprobe 2 waren insgesamt 15 (37,5%) Raucher, 14 (35%) ehemalige Raucher und 11 (27,5%) Nichtraucher. Auch hier war die Anzahl an Rauchern und Ex-Rauchern in Gruppe 1 größer als in Gruppe 2 (siehe Tabelle 12: Raucher: 47,6% in Gruppe 1 vs. 15,4% in Gruppe 2, Ex-Raucher: 42,9% in Gruppe 1 vs. 30,8% in Gruppe 2).

4.2. DNA-Konzentrationen

In Stichprobe 1 zeigten sich Schwankungen bezüglich der Konzentration der Fragmente K-ras 60 und K-ras 300. So variierte die Konzentration des Fragmentes K-ras 60 insgesamt zwischen Werten von 0,10 ng/µl bis 14,20 ng/µl (Median: 0,53 ng/µl), während die Werte bei K-ras 300 zwischen 0,01 ng/µl und 3,21 ng/µl (Median: 0,10 ng/µl) lagen (siehe Tabelle 13, Abbildung 6 und Abbildung 7). Der Median und die Perzentilen 25 sowie 75 liegen im Vergleich dazu aber wieder sehr dicht beieinander.

Tabelle 13: Stichprobe 1. Median, Minimum, Maximum sowie Perzentile 25 und 75 für die Konzentrationen von K-ras 60 und K-ras 300 innerhalb der drei Gruppen. A) Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren. B) Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen. C) Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien

A)

Gruppe 1	Konzentration K-ras 60 bp in ng/µl	Konzentration K-ras 300 bp in ng/µl
Median	0,52	0,11
Minimum	0,17	0,02
Maximum	14,2	2,5
Perzentile 25	0,35	0,06
Perzentile 75	1,7	0,18

B)

Gruppe 2	Konzentration K-ras 60 bp in ng/µl	Konzentration K-ras 300 bp in ng/µl
Median	0,59	0,09
Minimum	0,15	0,01
Maximum	4,37	3,21
Perzentile 25	0,31	0,06
Perzentile 75	0,86	0,13

C)

Gruppe 3	Konzentration K-ras 60 bp in ng/µl	Konzentration K-ras 300 bp in ng/µl
Median	0,5	0,1
Minimum	0,1	0,03
Maximum	3,59	3,21
Perzentile 25	0,35	0,05
Perzentile 75	1,65	0,14

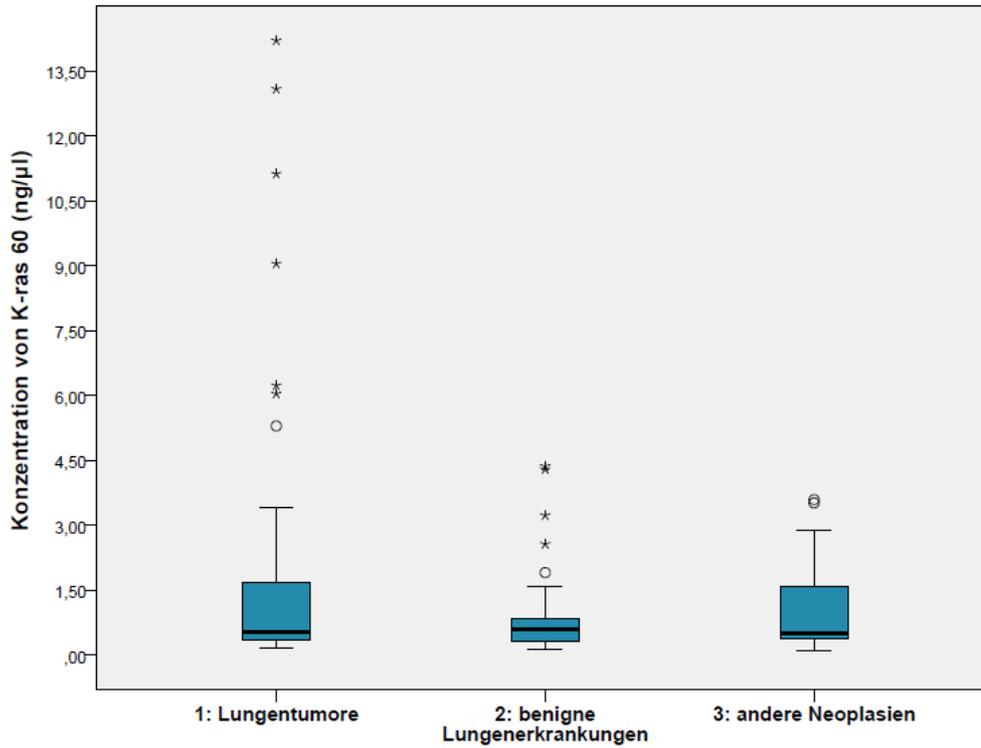


Abbildung 6: Konzentration von K-ras 60 in ng/μl im Plasma von Patienten mit Lungentumoren, benignen Lungenerkrankungen oder anderen Neoplasien aus Stichprobe 1

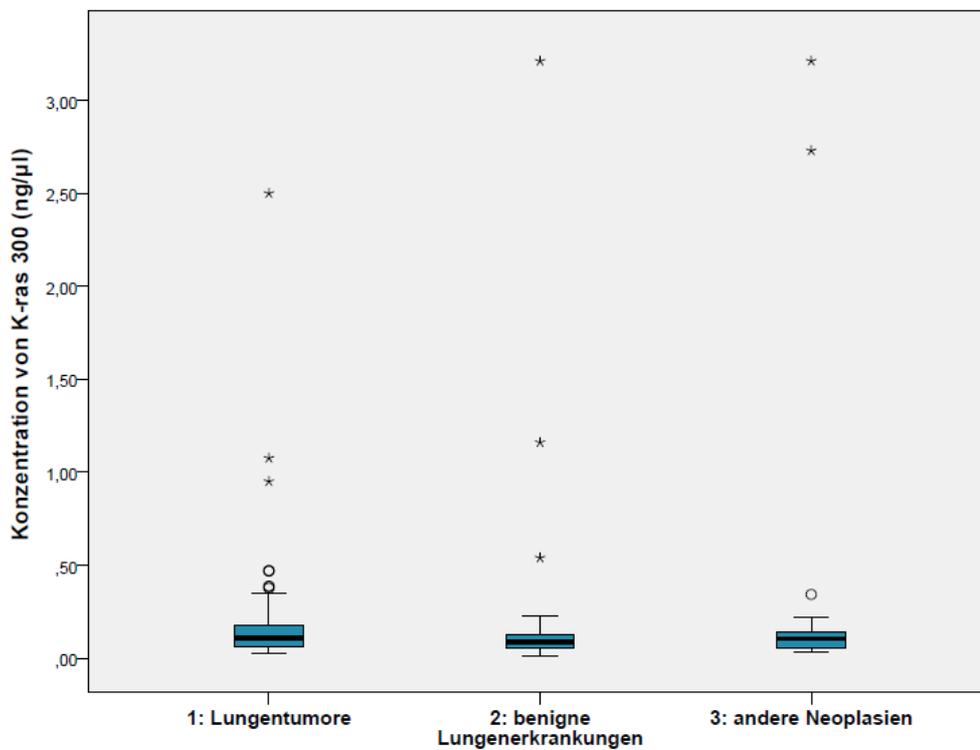


Abbildung 7: Konzentration von K-ras 300 in ng/μl im Plasma von Patienten mit Lungentumoren, benignen Lungenerkrankungen oder anderen Neoplasien aus Stichprobe 1

In der zweiten Stichprobe verhielten sich die Werte für die Konzentrationen ähnlich wie die aus Stichprobe 1, nur dass der Bereich der Schwankung etwas geringer war. Die Konzentration des Fragmentes K-ras 60 schwankte zwischen Werten von 0,13 ng/µl und 3,34 ng/µl (Median 0,35 ng/µl), und die Werte für das Fragment K-ras 300 lagen zwischen 0,04 ng/µl und 0,24 ng/µl (Median 0,09 ng/µl) (siehe auch Tabelle 14).

Tabelle 14: Stichprobe 2. Median, Minimum, Maximum sowie Perzentile 25 und 75 für die Konzentrationen von K-ras 60 und K-ras 300 innerhalb der drei Gruppen. A) Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren. B) Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen. C) Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien

A)

Gruppe 1	Konzentration K-ras 60 bp in ng/µl	Konzentration K-ras 300 bp in ng/µl
Median	0,40	0,11
Minimum	0,20	0,04
Maximum	1,07	0,22
Perzentile 25	0,32	0,08
Perzentile 75	0,59	0,15

B)

Gruppe 2	Konzentration K-ras 60 bp in ng/µl	Konzentration K-ras 300 bp in ng/µl
Median	0,34	0,08
Minimum	0,13	0,04
Maximum	3,28	0,17
Perzentile 25	0,19	0,04
Perzentile 75	0,84	0,11

C)

Gruppe 3	Konzentration K-ras 60 bp in ng/µl	Konzentration K-ras 300 bp in ng/µl
Median	0,24	0,06
Minimum	0,17	0,04
Maximum	3,34	0,24
Perzentile 25	0,20	0,04
Perzentile 75	1,03	0,12

4.3. DNA-Integritäts-Indices

Auch bei den Integritäts-Indices zeigte sich eine große Spannweite. Insgesamt variierte der Integritäts-Index I innerhalb der Stichprobe 1 zwischen Werten von 0,01 und 1,27 (Median: 0,17) und der Integritäts-Index II von 0,01 bis 1,60 (Median: 0,20). Im Vergleich der drei Gruppen untereinander zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Integritäts-Indices (siehe Tabelle 15, Abbildung 8).

In Stichprobe 2 variierte der Integritäts-Index I zwischen Werten von 0,11 und 0,52 (Median: 0,25) und der Integritäts-Index II von 0,01 bis 0,25 (Median: 0,12). Auch hier zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Integritäts-Indices innerhalb der drei verschiedenen Gruppen (siehe Tabelle 16, Abbildung 9).

Tabelle 15: Stichprobe 1. Median, Minimum, Maximum sowie Perzentile 25 und 75 der Integritäts-Indices I und II innerhalb der drei Gruppen. A) Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren. B) Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen. C) Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien

A)

Gruppe 1	Integritäts-Index I	Integritäts-Index II
Median	0,16	0,20
Minimum	0,02	0,02
Maximum	1,27	1,60
Perzentile 25	0,11	0,14
Perzentile 75	0,23	0,27

B)

Gruppe 2	Integritäts-Index I	Integritäts-Index II
Median	0,19	0,23
Minimum	0,00	0,01
Maximum	0,74	1,24
Perzentile 25	0,13	0,17
Perzentile 75	0,24	0,26

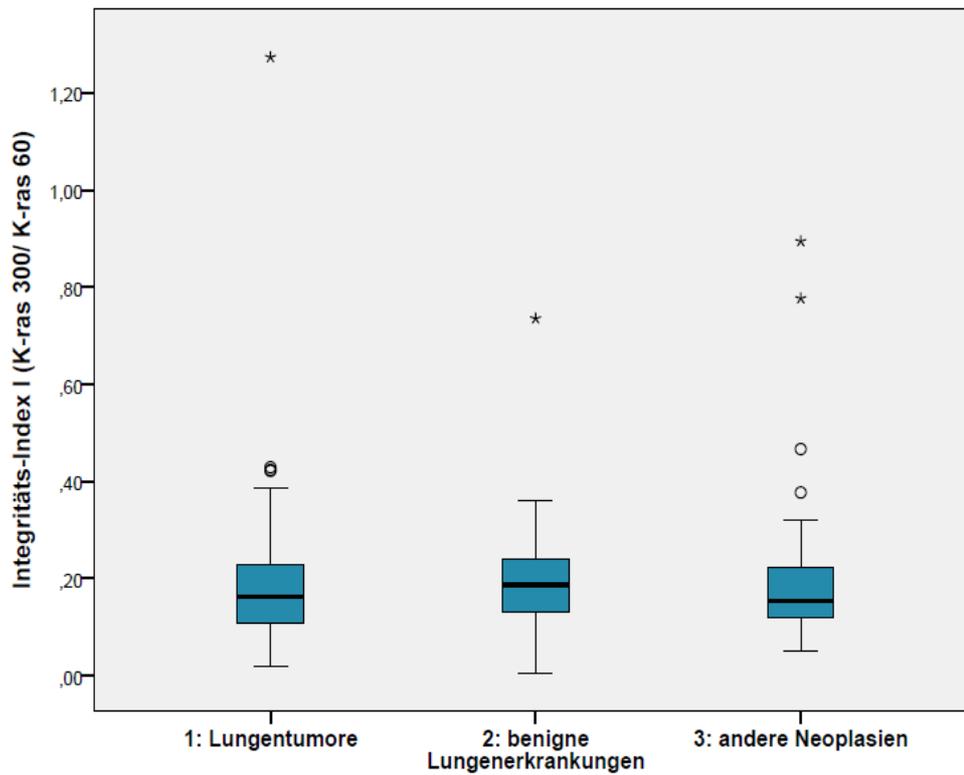
Fortsetzung von Tab. 15

C)

Gruppe 3	Integritäts-Index I	Integritäts-Index II
Median	0,15	0,19
Minimum	0,05	0,07
Maximum	0,89	1,50
Perzentile 25	0,12	0,14
Perzentile 75	0,22	0,28

Selbst unter nochmaliger Unterteilung von Gruppe 1 in Gruppe 1a: Patienten mit bisher unbehandelten Lungentumoren und Gruppe 1b: Patienten mit schon behandelten Lungentumoren waren die Medianwerte für die DNA-Integritäts-Indices in Stichprobe 1 vergleichbar (DNA-Integritäts-Index I: 0,12 für Gruppe 1a vs. 0,11 für Gruppe 1b, DNA-Integritäts-Index II: 0,16 für Gruppe 1a vs. 0,18 für Gruppe 1b). Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Werte für die DNA-Integritäts-Indices nach nochmaliger Unterteilung der Gruppe 1.

A)



B)

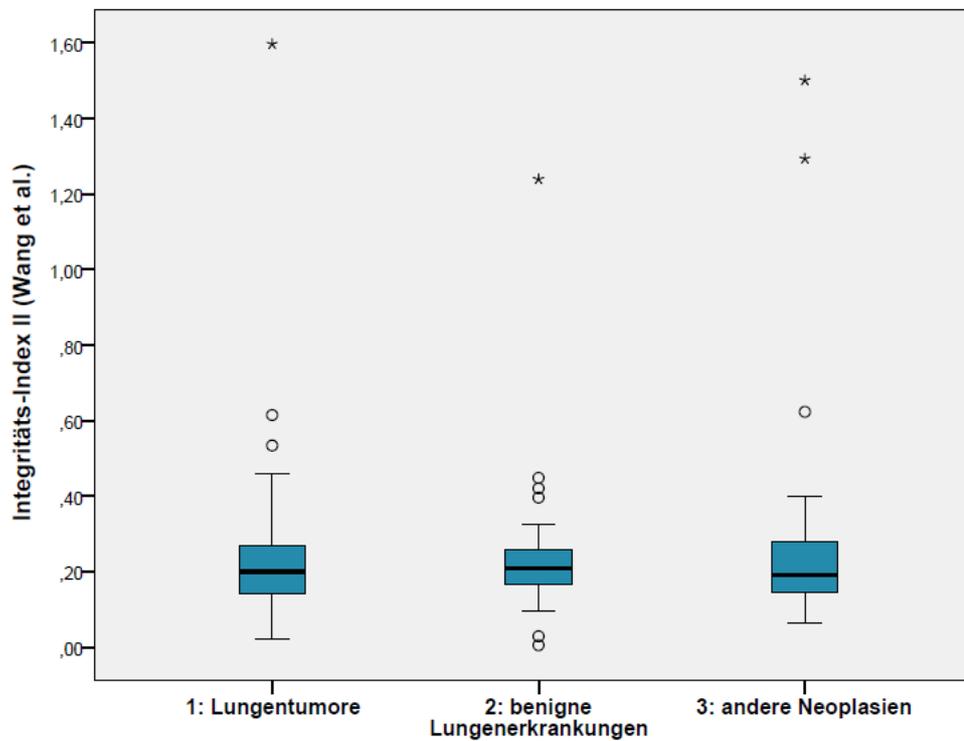


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Integritäts-Indices im Plasma von Patienten mit Lungentumoren, benignen Lungenerkrankungen oder anderen Neoplasien in Stichprobe 1. A) Integritäts-Index I (Umetani et al.). B) Integritäts-Index II (Wang et al.)

Tabelle 16: Stichprobe 2. Median, Minimum, Maximum sowie Perzentile 25 und 75 der Integritäts-Indices I und II innerhalb der drei Gruppen. A) Gruppe 1: Patienten mit Lungentumoren. B) Gruppe 2: Patienten mit benignen Lungenerkrankungen. C) Gruppe 3: Patienten mit anderen Neoplasien

A)

Gruppe 1	Integritäts-Index I	Integritäts-Index II
Median	0,26	0,12
Minimum	0,14	0,06
Maximum	0,52	0,25
Perzentile 25	0,18	0,09
Perzentile 75	0,33	0,16

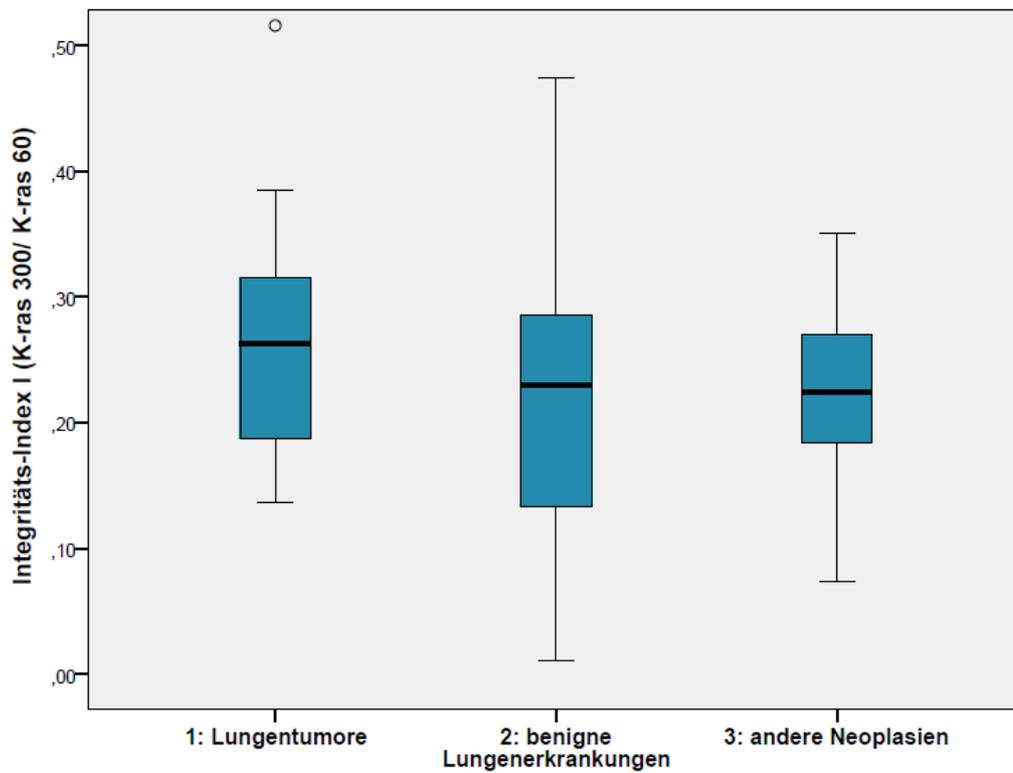
B)

Gruppe 2	Integritäts-Index I	Integritäts-Index II
Median	0,23	0,10
Minimum	0,01	0,01
Maximum	0,47	0,22
Perzentile 25	0,12	0,06
Perzentile 75	0,29	0,14

C)

Gruppe 3	Integritäts-Index I	Integritäts-Index II
Median	0,22	0,10
Minimum	0,07	0,04
Maximum	0,35	0,16
Perzentile 25	0,16	0,07
Perzentile 75	0,29	0,13

A)



B)

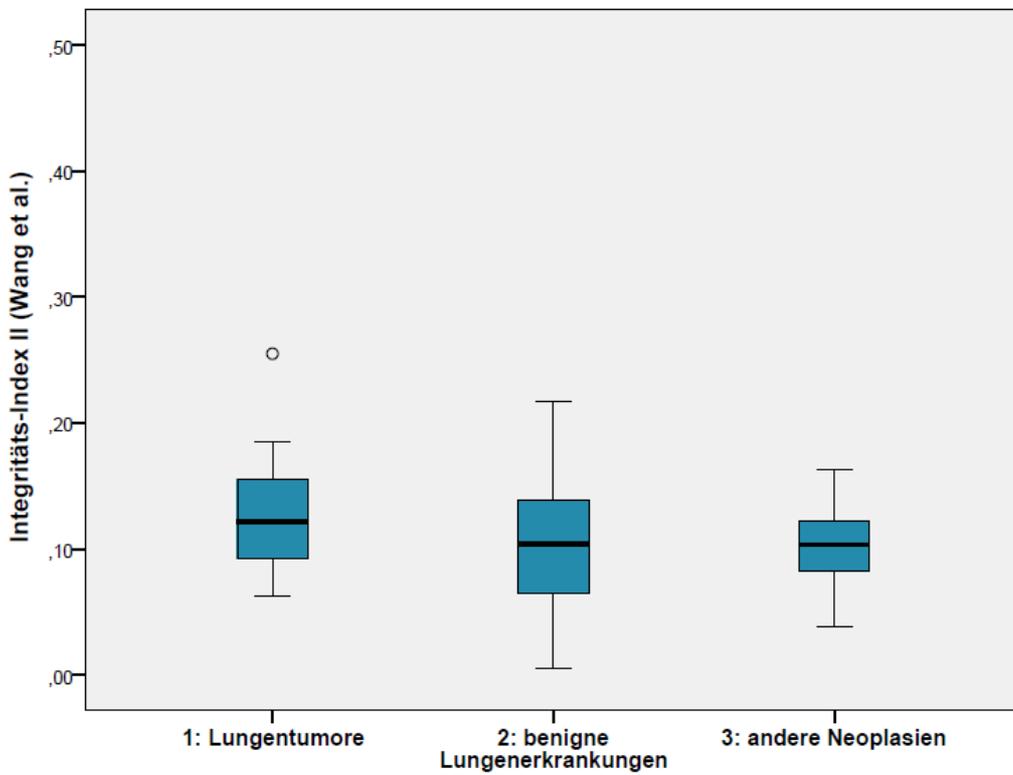
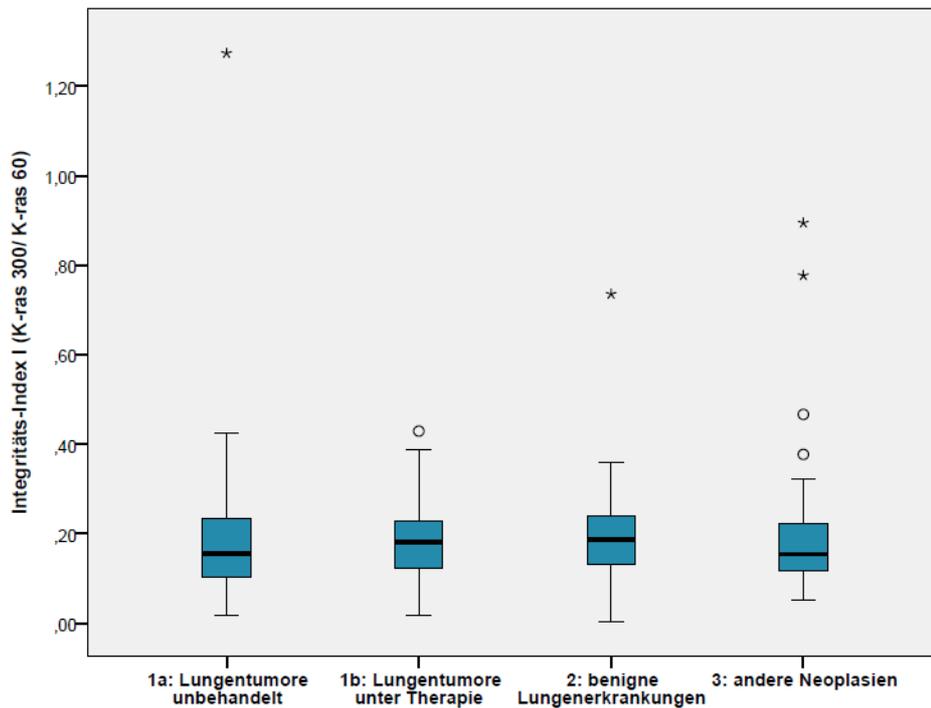


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Integritäts-Indices im Plasma von Patienten mit Lungentumoren, benignen Lungenerkrankungen oder anderen Neoplasien in Stichprobe 2. A) Integritäts-Index I (Umetani et al.). B) Integritäts-Index II (Wang et al.)

A)



B)

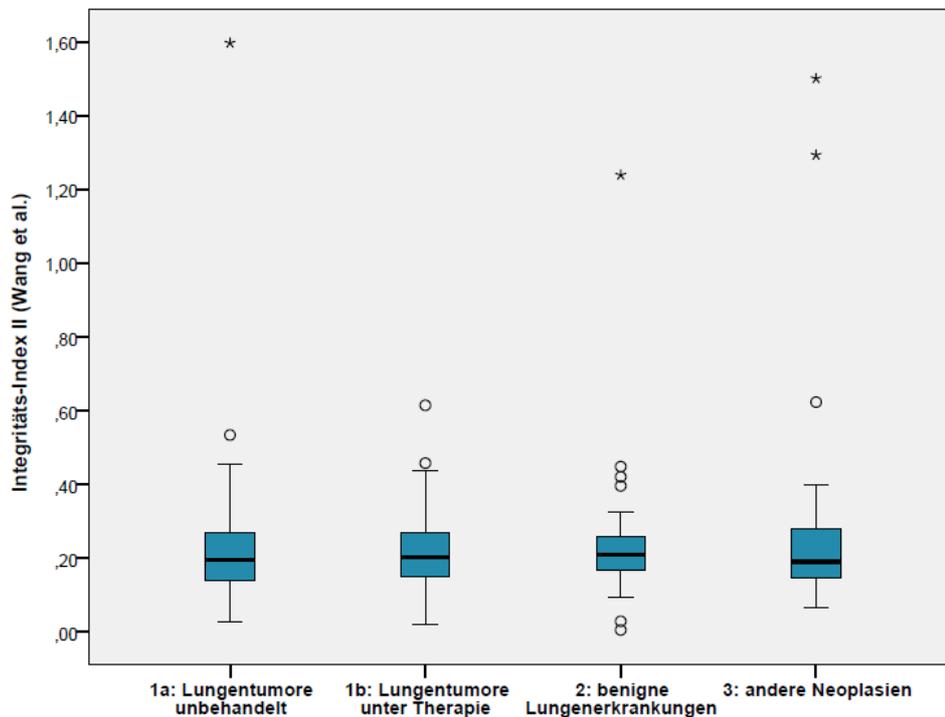
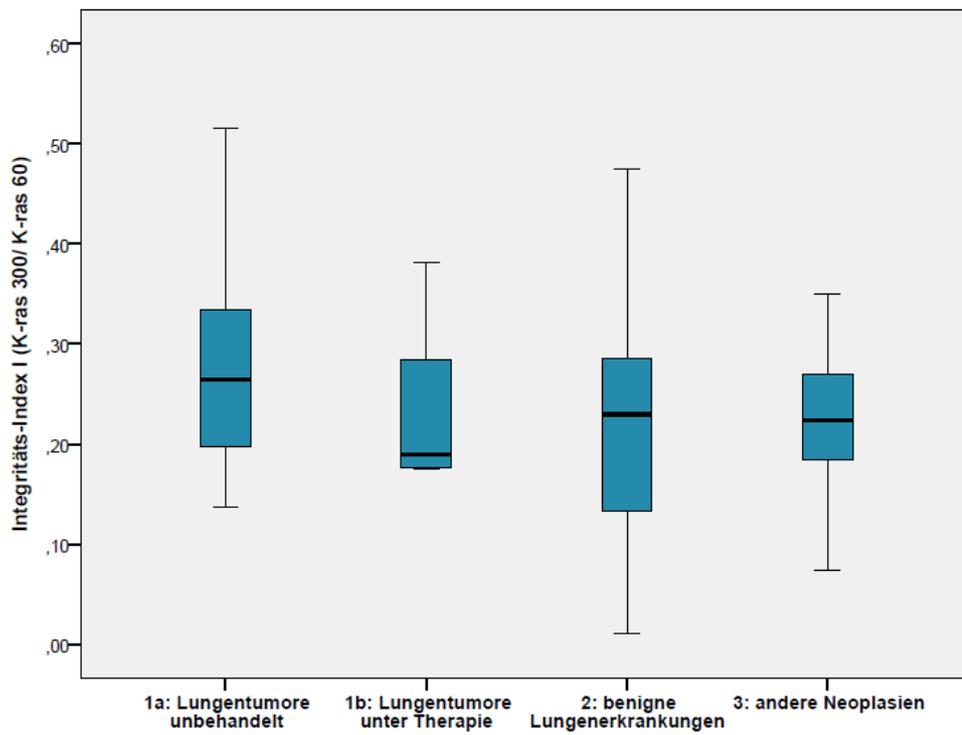


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Integritäts-Indices im Plasma von Patienten mit unbehandelten Lungentumoren, Lungentumore unter Therapie, benignen Lungenerkrankungen oder anderen Neoplasien in Stichprobe 1. A) Integritäts-Index I (Umetani et al.). B) Integritäts-Index II (Wang et al.)

Auch in Stichprobe 2 war eine ähnliche Verteilung der DNA-Integritäts-Indices erkennbar (siehe Abbildung 11).

A)



B)

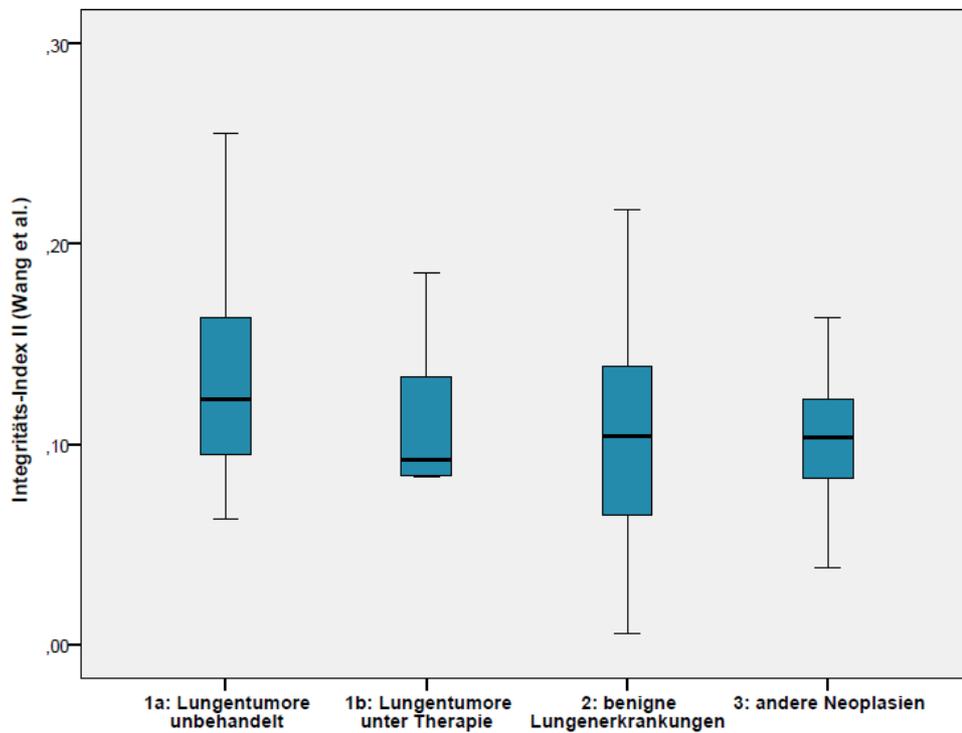


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Integritäts-Indices im Plasma von Patienten mit unbehandelten Lungentumoren, Lungentumore unter Therapie, benignen Lungenerkrankungen oder anderen Neoplasien in Stichprobe 2. A) Integritäts-Index I (Umetani et al.). B) Integritäts-Index II (Wang et al.)

4.4. Diagnostische Sensitivität der DNA-Integritäts-Indices

Weder für den Integritäts-Index I noch für den Integritäts-Index II konnte in Stichprobe 1 im Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen festgestellt werden (p-Werte: 0,424 und 0,851). Auch nach der weiteren Unterteilung von Gruppe 1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (p-Werte 0,536 und 0,839). Im Man-Whitney-U-Test bei der Unterscheidung zwischen Gruppe 1a und Gruppe 2 zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der DNA-Integritäts-Indices, obwohl sich eine Tendenz in Richtung Signifikanz für den DNA-Integritäts-Index I abzeichnete (p-Wert: 0,181). Die diagnostische Kapazität der beiden DNA Integritäts-Indices, bezogen auf den Vergleich von Patienten mit bisher unbehandelten Lungentumoren (Gruppe 1a) und jenen mit korrespondierenden benignen Lungenerkrankungen (Gruppe 2), war jedoch gering. Die Area under the curve (AUC) der Receiver operating characteristic (ROC)-Kurve erreichte für den Integritäts-Index I einen Wert von 0,420 und für den Integritäts-Index II 0,449 (siehe Abbildung 12).

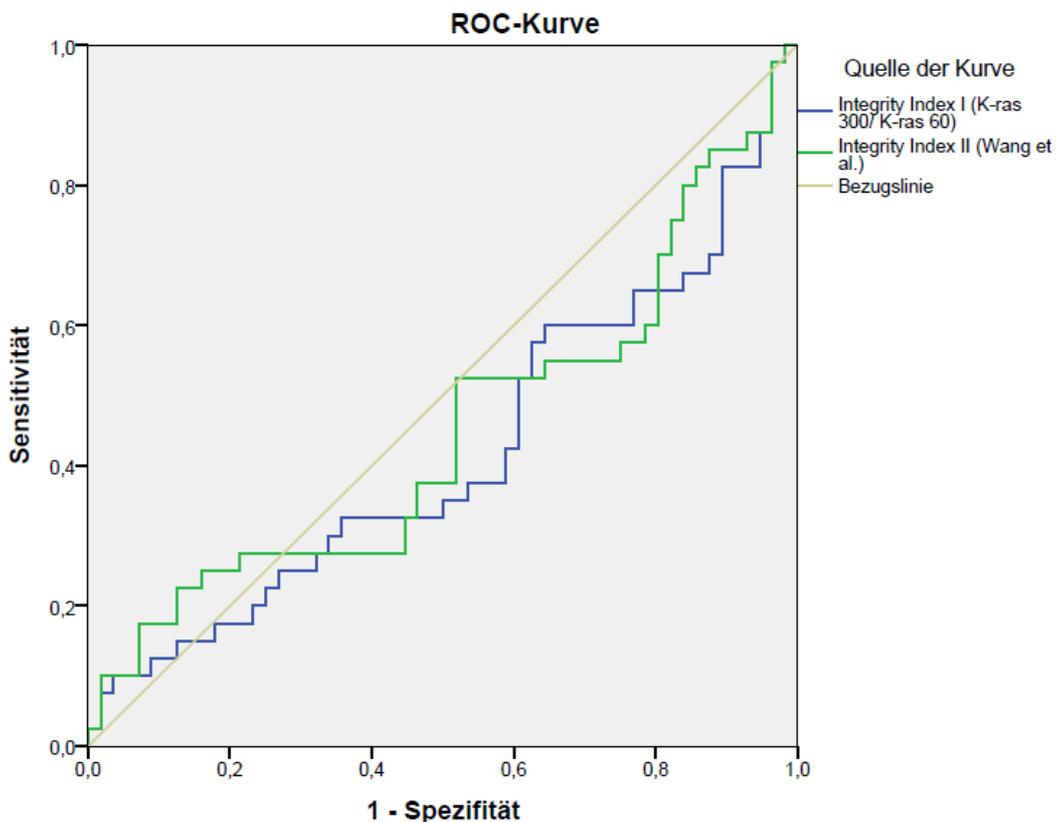


Abbildung 12: Receiver operating characteristic (ROC)-Kurve für beide Integritäts-Indices in Stichprobe 1

Die Area under the curve (AUC) der Receiver operating characteristic (ROC)-Kurve für Stichprobe 2 erreichte dagegen für den Integritäts-Index I einen Wert von 0,635 und für den Integritäts-Index II 0,659 (siehe Abbildung 13). Die diagnostische Kapazität der beiden DNA Integritäts-Indices, bezogen auf den Vergleich von Patienten mit bisher unbehandelten Lungentumoren (Gruppe 1a) und mit benignen Lungenerkrankungen (Gruppe 2), war damit im Schnitt größer als in Stichprobe 1. Im Vergleich der 95%-Konfidenzintervalle zeigen sich jedoch Überschneidungen der AUC-Werte (siehe Tabelle 17). Der gemessene Unterschied zwischen den AUC-Werten beider Stichproben war somit nicht signifikant.

Letzten Endes konnte auch in Stichprobe 2 kein signifikanter Unterschied zwischen den drei bzw. 4 Gruppen im Kruskal-Wallis-Test für die DNA-Integritäts-Indices festgestellt werden (p-Werte > 0,05).

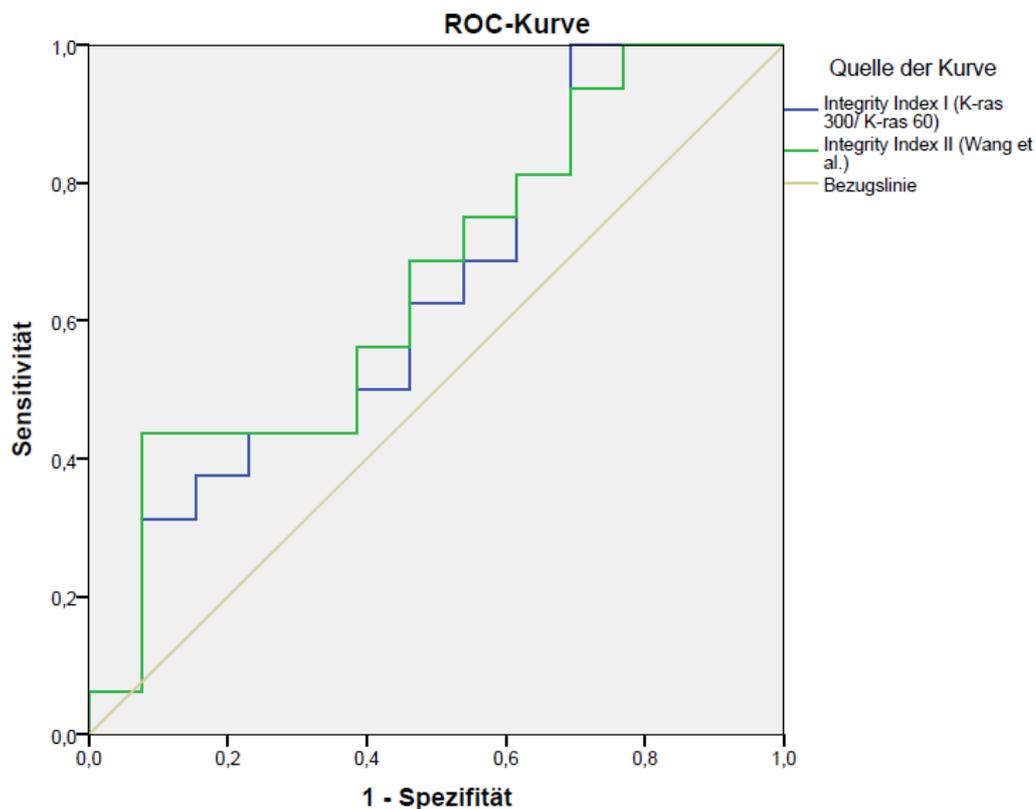


Abbildung 13: Receiver operating characteristic (ROC)-Kurve für beide Integritäts-Indices in Stichprobe 2

Tabelle 17: AUC-Werte für die ROC-Kurven mit jeweiligen 95%-Konfidenzintervall

Stichprobe 1	AUC	Standard- fehler	Asymp- totische Sig.	Asymptotische 95%- Untergrenze	Asymptotische 95%- Obergrenze
Integritäts- Index I	0,42 0	0,061	0,181	0,300	0,539
Integritäts- Index II	0,44 9	0,062	0,397	0,327	0,571
Stichprobe 2	AUC	Standard- fehler	Asymp- totische Sig.	Asymptotische 95%- Untergrenze	Asymptotische 95%- Obergrenze
Integritäts- Index I	0,63 5	0,106	0,219	0,427	0,843
Integritäts- Index II	0,65 9	0,104	0,148	0,455	0,862

5. Diskussion

Mit einer hohen Inzidenzrate und Anzahl von jährlichen Todesfällen nimmt Lungenkrebs national sowie international eine bedeutende Stellung unter allen Krebserkrankungen ein (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2015; Robert Koch-Institut 2016; Siegel et al. 2015).

Zur Diagnosesicherung von Lungentumoren werden heutzutage v.a. bioptische Methoden verwendet (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie) 2018). Allerdings handelt es sich dabei um mehr oder weniger invasive Verfahren, deren Erfolgsaussichten zwar sehr gut, aber häufig von der Größe und Lokalisation des Tumors abhängig sind (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie) 2018).

Herkömmliche Biomarker wie CYFRA 21-1, CEA, NSE etc. sind einzeln genommen weder sehr sensitiv noch organ- oder tumorspezifisch. Daher eignen sie sich nicht für Screeningzwecke bei Lungentumoren. Ein viel versprechender Marker könnte jedoch ProGRP sein, welcher sich in Studien zusammen mit NSE als ein guter Tumormarker für SCLC und als einer der sensitivsten Marker bei der Unterscheidung zwischen SCLC und NSCLC bzw. SCLC und benignen Lungenerkrankungen zeigte (Molina et al. 2005; Molina et al. 2004; Shibayama et al. 2001; Oh et al. 2016). Dennoch kann die diagnostische Wertigkeit dieses Markers durch äußere Einflüsse wie die Nierenfunktion beeinträchtigt werden: Es zeigten sich die meisten falsch-positiven Ergebnisse bei ProGRP bei gleichzeitigem Vorliegen von Nierenversagen (Molina et al. 2004). In einer weiteren Studie von Molina et al. war ProGRP immerhin bei 13% der Patienten mit benignen Erkrankungen erhöht (Molina et al. 2005).

Das Problem der meisten der oben genannten Marker liegt schließlich darin, dass sie auch bei anderen Tumorerkrankungen oder benignen Lungenerkrankungen erhöht sein können (Molina et al. 2005; Oremek et al. 2007; Okamura et al. 2013; Barak et al. 2004). Außerdem gibt es nicht immer einen klaren Zusammenhang zwischen einigen dieser Marker und einem bestimmten histologischen Tumortyp (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom SCLC etc.) (Molina et al. 2005). Die Untersuchung von mehreren verschiedenen Biomarkern könnte hierbei bei der Unterscheidung zwischen den histologischen Tumortypen bzw. Subtypen eine nützliche Hilfe sein (Yang et al. 2016). Einige Studien konnten ebenfalls zeigen,

dass eine Kombination der oben genannten Biomarker die Sensitivität und diagnostische Wertigkeit erhöht (Molina et al. 2003; Gruber et al. 2008; Okamura et al. 2013). Seemann et al. dagegen fanden bei einer Kombination von CEA, CYFRA 21-1 und NSE zwar eine erhöhte Sensitivität in Bezug auf die Unterscheidung zwischen malignen und benignen Lungenrundherden, allerdings wurde dadurch die Spezifität im Vergleich zu den Biomarkern einzeln vermindert. (Seemann et al. 1999). Auch Nukleosomen sind nach Holdenrieder et al. keine geeignete Alternative, da sie auch bei benignen Erkrankungen erhöht sein können (Holdenrieder et al. 2008a) Ob sich die oben genannten Marker jemals für die Diagnostik von Lungentumoren eignen, bleibt offen und muss durch weitere, v.a. prospektive, Studien erst erforscht werden.

Die Bestimmung von cfDNA oder des DNA-Integritäts-Index in so genannten "liquid biopsies", könnte somit eine weniger invasive, schnelle und einfache Alternative im Vergleich zu bioptischen Verfahren oder zumindest ein zusätzliches Mittel bei der Diagnostik von Lungentumoren sein.

In der Literatur wurde die Messung der Gesamtmenge an cfDNA bei Tumorerkrankungen als diagnostischer Biomarker bislang kontrovers diskutiert.

In einer Meta-Analyse über die quantitative Analyse von cfDNA bei NSCLC kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die Gesamtmenge an cfDNA ein vielversprechender Biomarker bei der Unterscheidung von Patienten mit NSCLC und gesunden Personen sei, vor allem wenn dieser mit anderen Biomarkern kombiniert würde (Jiang et al. 2016). Zhang et al. sind dagegen der Meinung, dass die Messung der Gesamtmenge an cfDNA zwar nicht schlechter als konventionelle diagnostische Biomarker sei, aber die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen Patienten mit Lungentumoren und gesunden Individuen zu gering wäre, um diesen als einzigen Marker einzusetzen (Zhang et al. 2010). Jung et al. halten es ebenfalls für ungewiss, ob die Messung der Gesamtmenge an cfDNA im Plasma oder Serum von Tumorkranken jemals als alleiniger diagnostischer Biomarker eingesetzt werden oder ob dieser lediglich als zusätzlicher Marker dienen kann (Jung et al. 2010).

In einem Paper von Gao et al. äußerten die Autoren die Vermutung, dass der DNA-Integritäts-Index einen größeren Nutzen haben könnte als die reine gemessene Menge an cfDNA bei Patienten mit akuter Leukämie (Gao et al. 2010). Fleischhacker und Schmidt kamen ebenfalls zu dem Entschluss, dass die reine Messung an cfDNA zu unspezifisch sei, um definierte Erkrankungen voneinander zu unterscheiden (Fleischhacker und Schmidt 2007).

Das Augenmerk dieser Arbeit lag daher auf qualitativen Veränderungen der cfDNA in Form von DNA-Integritäts-Indices nach Wang et al. und Umetani et al. (Wang et al. 2003; Umetani et al. 2006c; Umetani et al. 2006b) zur Unterscheidung zwischen Patienten mit Lungenkrebs (unbehandelt sowie unter/nach Therapie) und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen wie Bronchitis, Sarkoidose, Asthma etc. Zum Vergleich wurden zusätzlich Patienten mit anderen Neoplasien untersucht.

5.1 Präanalytische Faktoren und Limitationen

In der Literatur finden sich bezüglich des DNA-Integritäts-Index und seiner diagnostischen Kapazität bei Tumorerkrankungen widersprechende Ergebnisse. So vermuten Schmidt et al. sowie Holdenrieder et al., dass präanalytische und analytische Faktoren einer der Gründe für die unterschiedlichen Resultate der Studien sein könnten (Schmidt et al. 2008; Holdenrieder et al. 2008b). Es liegt nahe, dass Aspekte wie die Wahl des Ausgangsmaterials (Serum, Plasma etc.), die Vorauswahl der Patienten oder die Behandlung und Aufbewahrung von Proben einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse einer Studie haben können.

Somit konnte auch in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Auswahl der Patienten eine Verzerrung der Ergebnisse provoziert wurde. Um diesen Effekt zu mindern, wurden die Patienten aus der Datenbank zufällig ausgewählt und erst nachträglich in die entsprechenden drei bzw. vier Gruppen einkategorisiert.

Weiterhin ist die Größe der Stichprobe eine mögliche Limitation der Studie. Diese ist mit 183 Patienten in Stichprobe 1 und 40 Patienten in Stichprobe 2 relativ klein, um unbedingt auf die Grundgesamtheit schließen zu können, sodass die Ergebnisse dieser Studie erst durch weitere Studien, v.a. auch durch multizentrische Studien, validiert werden müssen. Im Gegensatz zu dieser Studie sollten diese auch prospektiv sein, um überhaupt eine Aussage über den generellen Wert dieser Marker für die Klinik fällen zu können. Verglichen mit anderen Studien ist der Umfang von 183 Patienten in Stichprobe 1 jedoch ähnlich groß oder teilweise sogar größer (vgl. Bedin et al. 2016: insg. 192 Patienten, Szpechcinski et al. 2016: insg. 109 Patienten, El-Gayar et al. 2016: insg. 80 Patienten). Das inhaltliche Problem, dass der DNA-Integritäts-Index als diagnostischer Marker bei Lungentumoren wenig geeignet ist, würde wahrscheinlich bleiben.

Des Weiteren wurde bei den Patienten mit Lungentumoren keine weitere Unterscheidung zwischen NSCLC oder SCLC vorgenommen. Möglicherweise verhalten sich diese beiden Tumortypen jedoch unterschiedlich bezüglich der

Freisetzung von bestimmten DNA-Fragmenten und verfälschen folglich das Ergebnis der Studie. Die histologischen Typen bzw. Subtypen unterscheiden sich scheinbar zumindest bei der Freisetzung von bestimmten Proteinen (Yang et al. 2016).

Des Weiteren wurde auch keine weitere Differenzierung in Chemotherapie, Radiotherapie, Radio-Chemotherapie oder OP bei den Patienten mit Lungentumoren, welche unter Therapie standen, durchgeführt.

Die Wahl des Ausgangsmaterials ist zusätzlich ein wichtiger Faktor, der berücksichtigt werden sollte. Da der DNA-Integritäts-Index in Blutproben von Patienten untersucht werden sollte, gab es nur die zwei Möglichkeiten: Plasma oder Serum. Auch hier gibt es in der Literatur widersprüchliche Meinungen. Umetani et al. sind zum Beispiel der Auffassung, dass Serum ein besseres Ausgangsmaterial als Plasma sei, da die in ihrer Studie gemessene Menge an cfDNA sechsmal so hoch war wie im vergleichbaren Plasma (Umetani et al. 2006a). Generell konnte auch in anderen Studien eine insgesamt höhere Konzentration von cfDNA im Serum als im Plasma gemessen werden (Thijssen et al. 2002; Lui et al. 2002; Lee et al. 2001). Viele Autoren halten dennoch Plasma für wesentlich geeigneter, denn sie konnten zum Teil zeigen, dass die Konzentrationsunterschiede zwischen Plasma und Serum hauptsächlich Folge einer in-vitro Lyse von Leukozyten durch Koagulations-Prozesse sind und dass am Ende nicht nur reine cfDNA im Serum gemessen wurde (Lee et al. 2001; Lui et al. 2002; Thijssen et al. 2002). In einer anderen Studie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Gehalt an der von Tumorzellen stammenden cfDNA wesentlich höher im Plasma als im Serum von Patienten war (Thierry et al. 2010).

Aufgrund dieser Studienlage wurde in dieser Studie Plasma als Ausgangsmaterial gewählt, um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch genomische DNA aus degenerierten, also zugrunde gegangenen Leukozyten reduzieren zu können. Die Blutproben wurden dazu in EDTA-Röhrchen gesammelt, da EDTA als zuverlässiges Antikoagulum für DNA-Analysen von Plasma gilt (Lam et al. 2004).

Der Einsatz von Assays mit verschiedenen Zielsequenzen wie K-ras oder ALU-Sequenzen stellt ein weiteres Problem dar und mindert die Vergleichbarkeit aller bisherigen Studien. So könnte die Art des Tumors bei der Messung von ganz bestimmten cfDNA-Fragmenten in Plasma- oder Serumproben von Tumorpatienten eine entscheidende Rolle spielen. Damit wäre die Auswahl idealer Sequenzen für eine ganz bestimmte Tumorerkrankung von größter Wichtigkeit für die Ergebnisse der Studien. Bronkhorst et al. äußern in einer ihrer Studien ebenfalls die Vermutung, dass cfDNA selektiv freigesetzt werden könnte (Bronkhorst et al. 2016c). Sie

konnten zeigen, dass die Zellkulturen 143B, RD, ZANLP zwar die Haushaltsgene (engl. house keeping genes) SDHA, ATP5B sowie CYC1 exprimierten, jedoch nicht als cfDNA in ihre Umgebung freisetzen. Puszyk et al. konnten weiterhin eine ungleiche Repräsentation verschiedener genomischer DNA Sequenzen in gesunden Probanden nachweisen (Puszyk et al. 2009). Ob dieser beobachtete Effekt Folge einer selektiven Freisetzung von DNA-Sequenzen (Bronkhorst et al. 2016c), einer nichtzufälligen Spaltung bei der Produktion von cfDNA und / oder einer selektiven Elimination bestimmter DNA-Sequenzen ist (Puszyk et al. 2009) bleibt offen. Eventuell spielen auch mehrere Faktoren eine Rolle.

Doch nicht nur die Auswahl der Ziel-Sequenzen, sondern auch der Fragmentlängen hat wahrscheinlich einen Einfluss auf den Integritäts-Index und letzten Endes auch auf die Ergebnisse einer Studie. So untersuchten Mouliere et al. mehrere verschiedene Fragmentlängen des Zielgens K-ras und bestimmten deren Konzentration und die Integritäts-Indices im Plasma von Patienten mit metastasierten Kolonkarzinomen und gesunden Individuen (Mouliere et al. 2011). Interessanterweise fanden sie, genauso wie Ellinger et al., einen niedrigeren DNA-Integritäts-Index bei den Tumorpatienten als bei den gesunden Kontrollen (Ellinger et al. 2008b). Die Differenz zwischen den DNA-Integritäts-Indices bei Patienten mit Kolonkarzinom versus denen bei gesunden Individuen war dabei abhängig von den gemessenen Fragmenten zueinander. Die höchste Differenz erzielte der DNA-Integritäts-Index K-ras 300 / K-ras 60. Mouliere et al. schlussfolgerten, dass die Diskrepanz zwischen den Studien u.a. auch durch die Wahl der zu messenden Fragmentlängen entstehe und dass der größte Teil an cfDNA aus Tumorzellen womöglich als Fragmente <100bp vorliegen könnte (Mouliere et al. 2011).

Underhill et al. kamen in ihrer Studie ebenfalls zu der Erkenntnis, dass die Untersuchung von ganz bestimmten Fragmentlängen die Chance der Detektion von cfDNA, welche vor allem von Tumorzellen stammt, erhöht (Underhill et al. 2016).

5.2 Interpretation der Ergebnisse

Mit dieser Studie sollte überprüft werden, inwieweit es möglich ist, mit Hilfe des DNA-Integritäts-Index (Index I nach Umetani et al. und Index II nach Wang et al.), zwischen Patienten mit Lungentumoren und solchen mit benignen Lungenerkrankungen, wie z.B. Bronchitis, Pneumonie oder Sarkoidose, zu differenzieren. Weiterhin wurde untersucht, ob es zusätzlich möglich ist, mit Hilfe dieses Index sogar zwischen Patienten mit Lungentumoren und Patienten mit anderen Neoplasien unterscheiden zu können.

Dazu wurden die Konzentrationen von einem 60bp und einem 300bp langem Fragment des Gens K-ras gemessen und der Integritäts-Index I nach Umetani et al. sowie der Integritäts-Index II nach Wang et al. bestimmt. Die Primer wurden dabei aus einer Arbeit von Mouliere et al. übernommen (Mouliere et al. 2011).

Von den gesamten 191 Proben aus Stichprobe 1 konnten 183 Proben für die Studie verwendet werden, denn bei acht Proben ergab die qPCR kein valides Ergebnis von Ct-Werten. Dies könnte an einer möglicherweise zu geringer Menge an DNA in den Proben selbst gelegen haben. Schließlich wurden die Proben aus Stichprobe 1 ein Jahr aufbewahrt, bevor sie weiterverwendet wurden. Zwar konnte gezeigt werden, dass eine längere Aufbewahrung von DNA-Proben zu einer Abnahme des Gehalts an DNA in den Proben führt (El Messaoudi et al. 2013; Sozzi et al. 2005), allerdings wird der Verlust an DNA doch häufig höher, mit bis zu 30% pro Jahr durch die Aufbewahrung bei -20°C, angegeben (Sozzi et al. 2005). In dieser Studie war der Verlust aber mit gerade einmal 4% deutlich geringer. Eine Studie von Daniotti et al. konnte dagegen bei der quantitativen Bestimmung von cfDNA aus DNA-Proben, welche bei -20 °C für mindestens zwölf Monate aufbewahrt wurden, ähnliche Resultate erzielen als wäre die quantitative Bestimmung direkt im Anschluss an die DNA-Extraktion erfolgt (Daniotti et al. 2007). Bei der Aufbewahrung von Plasmaproben bei -80°C für mindestens zwölf Monate zeigte sich allerdings ein Absinken der Menge an DNA (Daniotti et al. 2007). Ähnliche Effekte konnten in einer Studie von Pinzani et al. beobachtet werden. Sie konnten insgesamt eine Reduktion der Menge an DNA um 38% nachweisen, wenn die Plasmaproben zunächst bei -80°C für fünf bis einundzwanzig Monate aufbewahrt wurden (Pinzani et al. 2014).

Im Vergleich zu Stichprobe 1 dieser Studie konnten in Stichprobe 2, wo die PCR-Messung relativ zeitnah nach der DNA-Isolation durchgeführt wurde, bei allen 40 DNA-Proben Ct-Werte ermittelt werden. Insgesamt betrachtet konnten aber auch für den größten Teil (ca. 96%) der ca. ein Jahr aufbewahrten DNA-Proben aus Stichprobe 1 Ct-Werte gemessen werden und daraus dann die entsprechenden DNA-Integritäts-Indices bestimmt werden.

Wie in Kapitel 3.2.8 schon erwähnt, kann der DNA-Integritäts-Index theoretisch nur zwischen 0 und 1 variieren. Bei vier Proben aus Stichprobe 1, davon zwei Proben aus der Gruppe mit anderen Neoplasien und jeweils einer aus der Gruppe mit Lungentumoren sowie aus der Gruppe mit benignen Lungenerkrankungen, ergaben die errechneten Integritäts-Indices II allerdings Werte über 1. Der entsprechende DNA-Integritäts-Index I war dagegen nur bei einer Probe aus der Gruppe mit anderen Neoplasien über 1. Dies könnte an technischen Gründen wie einem

unvollständigen Pipettieren der DNA-Probe, einer inkonsistenten Abnahme von Plasma oder eben wieder an dem Alter der DNA-Proben selbst gelegen haben. Im Unterschied zu Stichprobe 1 kamen bei Stichprobe 2 keine Werte für die DNA-Integritäts-Indices über 1 vor.

Letzten Endes konnte jedoch sowohl in Stichprobe 1 als auch in Stichprobe 2 weder für den Integritäts-Index I noch für den Integritäts-Index II ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test). Da einige der Patienten aus Gruppe 1 bereits behandelt oder zumindest anbehandelt waren und es bislang nicht sicher ist, welchen Einfluss eine Therapie wie Chemotherapie, Radiotherapie etc. auf diesen DNA-Integritäts-Index bei Patienten mit Lungentumoren hat, wurde die Gruppe 1 noch einmal aufgeteilt in Patienten mit Erstdiagnose, also unbehandelten Lungentumoren (Gruppe 1a) und Patienten mit Lungentumoren unter/nach Therapie (Gruppe 1b). Ein möglicher Einfluss einer Therapie auf den DNA-Integritäts-Index, welcher zumindest schon bei anderen Tumorerkrankungen (Kolorektales Karzinom, klarzelliges Nierenzellkarzinom, Nasopharyngeales Karzinom) und DNA-Integritäts-Indices gezeigt werden konnte (Agostini et al. 2011; Chan et al. 2008; Gang et al. 2010; Hao et al. 2014;), sollte somit ausgeschlossen werden. Allerdings konnte in jenen Studien nicht bei allen Patienten ein Absinken des DNA-Integritäts-Index beobachtet werden, was als ein unzureichendes Ansprechen auf die Therapie gedeutet wurde und nur in einer der Studien histologisch verifiziert wurde (Agostini et al. 2011). Von einer kompletten Remission war jedoch bei den wenigsten Patienten die Rede.

Somit zeigte sich auch nach einer weiteren Unterteilung kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Im Man-Whitney-U-Test zeigte sich zwar eine leichte Tendenz in Richtung Signifikanz bei der Unterscheidung zwischen Patienten mit unbehandelten Lungentumoren und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen ($p=0,181$ für den DNA-Integritäts-Index I in Stichprobe 1), doch zeigte sich in der entsprechenden ROC-Kurve eine relativ geringe diagnostische Kapazität des Index (s.u.).

Insgesamt gesehen hatten das Alter der Plasmaproben und deren Aufbewahrungszeit im Tiefkühlschrank bei -80°C sowie die Aufbewahrungszeit der DNA-Proben bei -20°C einen vernachlässigbaren Einfluss auf die DNA-Integritäts-Indices und deren diagnostische Kapazität bei der Unterscheidung Lungentumor versus benigne Lungenerkrankung. So erreichte die AUC in Stichprobe 1 bei der Differenzierung zwischen bisher unbehandelten Lungentumoren und benignen Lungenerkrankungen für den Integritäts-Index I einen Wert von 0,420 und bei dem Integritäts-Index II 0,449. In Stichprobe 2 lag die AUC für den Vergleich von

Patienten mit unbehandelten Lungentumoren und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen für den Integritäts-Index I bei 0,635 und für den Integritäts-Index II bei 0,659. In Stichprobe 1 lagen dabei die AUC-Werte für den DNA-Integritäts-Index I mit einer 95% Wahrscheinlichkeit zwischen 0,300 und 0,539. In Stichprobe 2 dagegen zwischen 0,427 und 0,843. Der DNA-Integritäts-Index II verhielt sich in beiden Stichproben ähnlich wie der DNA-Integritäts-Index I (siehe Tabelle 17). Die 95%-Konfidenzintervalle der AUC-Werte beider Stichproben sowie beider Indices beinhalteten somit den Wert 0,5. Ein Ergebnis, welches auf einen Zufallsprozess hindeutet. Folglich war es auch reiner Zufall, dass in Stichprobe 1 ein größerer Wert der DNA-Integritäts-Indices tendenziell eher für Patienten mit benignen Lungenerkrankungen sprach, während es sich in Stichprobe 2 genau andersherum verhielt.

In Stichprobe 2 zeigte sich zusammengefasst eine geringere Spannweite der Konzentrationen für K-ras 60 sowie K-ras 300 (z.B. 0,13 - 3,34 ng/µl für die Konzentration von K-ras 60 vs. 0,10 - 14,20 ng/µl in Stichprobe 1). Auch die DNA-Integritäts-Indices zeigten in Stichprobe 2 weniger Schwankungen (vgl. Kapitel 4.3). Allerdings lagen der Median und die Perzentilen 25 und 75 der Konzentrationen für K-ras 60, K-ras 300 sowie der DNA-Integritäts-Indices beider Stichproben innerhalb der Gruppen wieder relativ dicht beieinander (vgl. Tabelle 12 mit Tabelle 13 und Tabelle 14 mit Tabelle 15). Im Vergleich zu Stichprobe 2 kamen also in Stichprobe 1 zusammengefasst mehr Ausreißer vor. Diese Schwankungen könnten möglicherweise bedingt sein durch die längere Aufbewahrungszeit der Plasmaproben und/oder der DNA-Proben in Stichprobe 1. Abgesehen von diesen Ausreißern jedoch hatte die längere Aufbewahrung der Plasmaproben sowie die längere Aufbewahrung der DNA-Proben in Stichprobe 1 insgesamt gesehen einen geringen Einfluss auf die Menge der DNA-Fragmente K-ras 60, K-ras 300 und somit auch auf die DNA-Integritäts-Indices.

In Stichprobe 2 zeigte sich außerdem ein leicht besserer AUC-Wert für die jeweiligen Integritäts-Indices als in Stichprobe 1. Dabei lag z.B. das 95%-Konfidenzintervall der AUC für den Integritäts-Index I in Stichprobe 1 zwischen 0,300 und 0,539, während es für den gleichen Index in Stichprobe 2 zwischen 0,427 und 0,843 lag (siehe Tabelle 17). Da sich allerdings diese beiden Konfidenzintervalle in ihren Werten überschneiden, ist davon auszugehen, dass der vermeintlich bessere AUC-Wert (0,635 vs. 0,427 für den DNA-Integritäts-Index I) in Stichprobe 2 insgesamt jedoch nicht signifikant war. Dieser Trend zeigte sich ebenfalls für den DNA-Integritäts-Index II. Der im Mittel bessere AUC-Wert in Stichprobe 2 für beide DNA-Integritäts-Indices ist möglicherweise auch durch die

kleinere Stichprobenzahl bedingt. Um eine genauere Aussage tätigen zu können, müsste dieser Versuch mit nur einer Stichprobe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt werden.

Zunächst betrachtet stehen die Ergebnisse dieser Studie im Widerspruch zu den Ergebnissen von Szpehcinski et al., welche einen Unterschied des DNA-Integritäts-Index zwischen Patienten mit NSCLC sowie Patienten mit benignen radiologischen Rundherden sowie gesunden Kontrollen festgestellt haben (Szpehcinski et al. 2016).

Tatsächlich war allerdings in jener Studie nur zwischen den Patienten mit NSCLC und den gesunden Kontrollen ein signifikanter Unterschied zu sehen. Die Autoren betrachteten lediglich die ROC-Kurve zwischen Patienten mit NSCLC versus Patienten mit benignen Rundherden plus den gesunden Kontrollen. Sie verglichen diese Diskriminationsfähigkeit des DNA-Integritäts-Index mit herkömmlichen diagnostischen Mitteln wie Kontrastmittel-CT, 18F-FDG PET oder Spiral-CT und kamen zu der Schlussfolgerung, dass die Unterscheidungsfähigkeit des Integritäts-Index vergleichbar mit den bisherigen diagnostischen Verfahren sei. Der AUC-Wert von 0,80 könnte aber auch lediglich Folge der Miteinbeziehung der gesunden Kontrollen sein, da sich dort zumindest ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte.

Wichtiger wäre jedoch, gesondert die AUC für die Diskrimination zwischen Patienten mit NSCLC und den Patienten mit benignen Rundherden allein zu betrachten. Denn schließlich muss der DNA-Integritäts-Index, wenn er für diagnostische Zwecke eingesetzt werden soll, nicht zwischen Patienten mit Lungentumoren und gesunden Personen, sondern v.a. jene Patienten unterscheiden können, die ähnliche Symptome wie die Patienten mit Lungenkrebs zeigen oder Rundherde in der Radiologie aufweisen, letzten Endes jedoch nicht an Lungenkrebs erkrankt sind. Daher wurden in dieser Studie auch keine weiteren gesunden Kontrollen miteinbezogen. Da Szpehcinski et al. zudem eine andere Zielsequenz (Aktin) und somit auch einen anderen Index verwendeten, ist die Vergleichbarkeit dieser Arbeit mit jener Studie schwierig.

Andere Studien konnten ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Krebspatienten und den korrespondierenden benignen Erkrankungen zeigen (Hao et al. 2014; Bedin et al. 2016; El-Gayar et al. 2016; Huang et al. 2016; Stötzer et al. 2014). Allerdings fällt auf, dass in diesen häufig nur wenige Patienten (häufig deutlich unter 56 Patienten wie in dieser Studie in Stichprobe 1) mit benignen Erkrankungen in die Studien mit einbezogen wurden, sodass deren Aussagekraft eingeschränkt bleibt. Zudem untersuchten jene Studien, abgesehen von der Studie

von Szpechcinski et al., keine Lungentumore sondern andere Tumorentitäten (Kolorektale Karzinome, Brusttumoren etc.).

Letzten Endes bestätigen die Ergebnisse dieser Studie frühere Ergebnisse mit einer kleineren Stichprobe (Schmidt et al. 2008). In einer Studie von Holdenrieder et al. konnten die Autoren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit Tumorerkrankung und Patienten mit korrespondierenden benignen Erkrankungen erkennen (Holdenrieder et al. 2008b).

5.3 Schlussfolgerung

Insgesamt ist eine Vergleichbarkeit der Studien über den DNA-Integritäts-Index sehr schwierig, da präanalytische Faktoren sicherlich einen Einfluss auf die Ergebnisse der Studien haben und es bislang kein standardisiertes Verfahren für DNA-Integritäts-Index-Assays gibt (Schmidt et al. 2008; Holdenrieder et al. 2008b). Ein wichtiger Schritt wäre deshalb die Erstellung von standardisierten Methoden für die Aufbereitung, Behandlung und Messung von Proben, so wie es Jung et al. vorschlagen (Jung et al. 2010). In einem Paper von El Messaoudi et al. analysierten die Autoren so zum Beispiel mit Hilfe den Ergebnissen aus anderen Studien präanalytische Faktoren, welche einen Einfluss auf quantitative Messungen von cfDNA haben, um somit eine Art Leitstruktur finden zu können, anhand derer sich andere Wissenschaftler orientieren können (El Messaoudi et al. 2013). Drei Jahre später veröffentlichten Bronkhorst et al. ebenfalls ein Paper, in dem sie Vorschläge zu dem Umgang, der Aufbereitung von cfDNA etc. geben, um damit eine Standardvorgehensweise zu erstellen (Bronkhorst et al. 2016a).

Zusätzlich müssten mittels Grundlagenforschung die Mechanismen zur Freisetzung von cfDNA aus gesunden, entzündeten und malignen Zellen zunächst ausreichend geklärt werden. Denn der DNA-Integritäts-Index beruht auf der Hypothese, dass Tumorzellen cfDNA auch durch nekrotische Prozesse freisetzen (Jahr et al. 2001). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten jedoch, dass in Patienten mit Lungentumoren nicht nur größere Fragmente über 100bp freigesetzt wurden (K-ras 60bp langes Fragment). Wie auch in anderen Studien schon erwähnt, lässt dies vermuten, dass noch weitere Mechanismen wie Apoptose etc. eine Rolle spielen könnten (Stroun et al. 2001a; Suzuki et al. 2008; Stroun et al. 2001b).

Eine Analyse von Fragmentlängen und der daraus ermittelten DNA-Integritäts-Indices, wie sie Mouliere et al. durchgeführt haben, könnte wertvolle Erkenntnisse für die Erstellung der bestmöglichen Fragmentkonstellation geben. Denn möglicherweise ist die Differenzierungsfähigkeit des DNA-Integritäts-Index zwischen

Tumorerkrankung oder gesunden Kontrollen abhängig von den verwendeten Fragmentlängen (Mouliere et al. 2011). Underhill et al. schlagen vor, eine "experimentell oder bioinformatische Isolation von ganz bestimmten Fragmentlängen" durchzuführen, um gerade cfDNA, welche v.a. von Tumorzellen stammt, zu identifizieren (Underhill et al. 2016). In Tiermodellen von GBM und Hepatozellulären Karzinomen fanden sie heraus, dass der größte Anteil an cfDNA, welcher vom Tumor stammt (ctDNA = circulating tumor DNA) 134 und 144 bp lang war, während normale cfDNA dagegen im Mittel 167 bp lang war. Sie schlussfolgerten, dass ctDNA im Vergleich zu normaler cfDNA durch bestimmte Prozesse mehr fragmentiert werden könnte, wobei die genauen Mechanismen noch unklar bleiben (Underhill et al. 2016). Jiang et al. untersuchten das Größenprofil von cfDNA bei Patienten mit Hepatozellulärem Karzinomen, chronischer Hepatitis, Hepatitis assoziierter Zirrhose und gesunden Kontrollen und fanden eine positive Korrelation zwischen kurzen cfDNA Molekülen und der Konzentration an vom Tumor stammenden DNA. Das heißt, je höher der Anteil der Konzentration an vom Tumor stammenden DNA war, desto kürzere cfDNA Fragmente wurden im Mittel gemessen (Jiang et al. 2015).

Erkenntnisse aus solchen Studien könnten zur Verbesserung von DNA-Integritäts-Index-Assays herangezogen werden. Es könnte ermittelt werden, ob sich ein anderer DNA-Integritäts-Index besser für die Diagnostik von Lungentumoren, als der in dieser Studie verwendete Index mit den Fragmenten K-ras 300 und K-ras 60, eignet. Eventuell ist jedoch auch die Auswahl der Zielsequenz bzw. des Gens K-ras zu unspezifisch für die Verwendung bei Patienten mit Lungentumoren.

Aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich schließlich folgern, dass der Einsatz von den Fragmenten K-ras 60 und K-ras 300 sowie die daraus errechneten DNA-Integritäts-Indices (DNA-Integritäts-Index I und DNA-Integritäts-Index II) ungeeignet waren, um zwischen Patienten mit bisher unbehandelten Lungentumoren, mit an- oder behandelten Lungentumoren, mit benignen Lungenerkrankungen oder sogar mit anderen Neoplasien zu unterscheiden. Diese Ergebnisse bestätigen vorherige Versuche mit einer kleineren Stichprobe (Schmidt et al. 2008).

Damit scheidet dieser gemessene DNA-Integritäts-Index alleine als diagnostischer Biomarker bei Lungentumoren aus. Inwieweit die Untersuchung einer anderen DNA-Sequenz oder die Verwendung von anderen Fragmenten einen Unterschied gemacht hätten, lässt sich nur schwer einschätzen und muss erst durch weitere Studien ermittelt werden. Ggf. kann, wie es z.B. auch andere Autoren vorschlagen (Yu et al. 2014; Zaher et al. 2013; Holdenrieder et al. 2008b), durch die Verknüpfung

von weiteren Biomarkern wie der Gesamtmenge an cfDNA etc. eine höhere Sensitivität erreicht werden.

Außerdem ist zu bedenken, dass in dieser Studie vereinfachend retrospektiv alle Lungentumoren betrachtet wurden und keine weitere Unterscheidung zwischen NSCLC oder SCLC vorgenommen wurde. Möglicherweise verhalten sich diese Tumoren jedoch unterschiedlich bezüglich des verwendeten DNA-Integritäts-Index. Auch dies muss in weiteren Studien noch geklärt werden.

Ohne weitere Grundlagenforschung über cfDNA und deren Freisetzung aus den Zellen wird es jedoch erst einmal schwierig, diesen oder andere DNA-Integritäts-Indices für diagnostische Zwecke bei Lungentumoren zu etablieren, da zu viele Dinge nur spekulativ bleiben.

6. Zusammenfassung

In einer Arbeit von Wang et al. wurde zum ersten Mal die diagnostische Sensitivität des DNA-Integritäts-Index untersucht (Wang et al. 2003). Dazu wurden im Plasma von Patienten mit gynäkologischen Tumoren und Patienten ohne neoplastische Erkrankungen die Konzentrationen von einem 400bp und einem 100bp langem PCR-Produkt des β -Aktin Gens gemessen und der Integritäts-Index entsprechend berechnet. Der DNA-Integritäts-Index basiert auf der Annahme, dass Tumorzellen cfDNA durch Nekrose sowie Apoptose freisetzen und gesunde Zellen nur durch Apoptose. Er stellt das Verhältnis von einem großen DNA-Fragment (Entstehung bei nekrotischen Prozesse) zu einem kleinen DNA-Fragment (Entstehung eher bei Apoptose) dar. Tatsächlich kamen Wang et al. zu dem Ergebnis, dass der Index ein geeigneter Biomarker bei der Diagnostik von Tumorerkrankungen sein könnte (Wang et al. 2003). Viele weitere Studien folgten und konnten ebenso signifikante Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Tumorerkrankungen wie z.B. Brust-, Hals- und Kopftumoren, Rektumkarzinom, Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom, Ösophaguskarzinom oder NSCLC finden (Umetani et al. 2006c; Jiang et al. 2006; Agostini et al. 2011; Hanley et al. 2006; Tomita et al. 2007; Gang et al. 2010; Tomita et al. 2007; Szpechcinski et al. 2016). Dennoch gibt es bislang nur wenige Studien, die den DNA-Integritäts-Index auch zwischen Tumorerkrankungen und benignen Erkrankungen untersuchten (Holdenrieder et al. 2008b; Schmidt et al. 2008; Stötzer et al. 2014; Szpechcinski et al. 2016; Huang et al. 2016; Hao et al. 2014; El-Gayar et al. 2016; Bedin et al. 2016). Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der DNA-Integritäts-Index auch zwischen Patienten mit Lungentumoren, unbehandelt sowie bereits unter oder nach Therapie, und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen unterscheiden kann und sich folglich als diagnostischer Biomarker bei Lungentumoren eignen könnte. Zusätzlich wurden zum Vergleich die DNA-Integritäts-Indices bei Patienten mit anderen neoplastischen Erkrankungen analysiert. Gemessen wurde ein 60 bp und ein 300 bp langes DNA-Fragment des Gens K-ras im Plasma von 191 Patienten in Stichprobe 1 und 40 Patienten in Stichprobe 2. Letztere diente als Kontrolle, da die Proben aus Stichprobe 1 bereits über 10 Jahre alt waren und ein möglicher Einfluss des Alters der Plasmaproben auf den DNA-Integritäts-Index mitberücksichtigt werden sollte.

Unter Berücksichtigung von Erkenntnissen aus dieser und anderen Studien, sollte im zweiten Teil die Eignung des DNA-Integritäts-Index als Biomarker bei der Diagnostik von Tumorerkrankung kritisch hinterleuchtet werden.

Letzten Endes konnte gezeigt werden, dass der hier zusammengesetzte DNA-Integritäts-Index (K-ras 300 / K-ras 60) nicht geeignet war, zwischen bisher unbehandelten Lungentumoren, Lungentumoren unter bzw. nach Therapie, benignen Lungenerkrankungen (Bronchitis, Pneumonie, Sarkoidose etc.) und anderen Neoplasien zu unterscheiden. Auch wenn die Stichprobe insgesamt gesehen zu klein war, um auf die Grundgesamtheit schließen zu können und durch die Einordnung der Patienten in die drei bzw. vier Kategorien: Lungentumor: behandelt sowie unbehandelt, benigne Lungenerkrankungen und andere Neoplasien schon ein gewisser Bias entstanden sein könnte, so ist dieser Index allein ungeeignet, um als diagnostischer Biomarker bei Lungenkrebspatienten eingesetzt zu werden. Da es bisher kein einheitliches Verfahren für die DNA-Isolation und die Bestimmung des DNA-Integritäts-Index gibt und die Studien auch häufig verschiedene Zielsequenzen verwendeten, ist es schwer einzuschätzen, ob z.B. die Untersuchung von anderen Sequenzen und Fragmentlängen einen Unterschied gemacht hätte. Um diese Frage klären zu können, könnte es nützlich sein, durch Untersuchungen von mehreren Fragmenten und unterschiedlichen Zielsequenzen das Verhalten des daraus ermittelten DNA-Integritäts-Index bei Tumorpatienten, Patienten mit benignen Erkrankungen und gesunden Kontrollen zu analysieren. Angesichts der Datenlage und Ergebnisse dieser Studie wird es allerdings mit Sicherheit schwierig, den DNA-Integritäts-Index als diagnostischen Biomarker bei Lungentumoren und vermutlich auch bei anderen Tumorerkrankungen zu etablieren.

7. Literaturverzeichnis

Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD (2011) Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *The New England journal of medicine* 365:395–409. doi:10.1056/NEJMoa1102873

Agostini M, Pucciarelli S, Enzo MV, Del Bianco P, Briarava M, Bedin C, Maretto I, Friso ML, Lonardi S, Mescoli C, Toppan P, Urso E, Nitti D (2011) Circulating Cell-Free DNA: A Promising Marker of Pathologic Tumor Response in Rectal Cancer Patients Receiving Preoperative Chemoradiotherapy. *Annals of surgical oncology* 18:2461–2468. doi:10.1245/s10434-011-1638-y

Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, Stroun M, Mulcahy HE, Farthing MJ (1997) K-ras Mutations Are Found in DNA Extracted From the Plasma of Patients With Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 112:1114–1120

Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M (1999) Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer metastasis reviews* 18:65–73

Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Müller MM (2004) Increased Concentrations of Cell-Free Plasma DNA after Exhaustive Exercise. *Clinical chemistry* 50:1668–1670. doi:10.1373/clinchem.2004.034553

Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R (2004) Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clinical biochemistry* 37:529–540. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.05.009

Bedin C, Enzo MV, Del Bianco P, Pucciarelli S, Nitti D, Agostini M (2016) Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *International journal of cancer*. doi:10.1002/ijc.30565

Brennan P, Buffler PA, Reynolds P, Wu AH, Wichmann HE, Agudo A, Pershagen G, Jöckel K-H, Benhamou S, Greenberg RS, Merletti F, Winck C, Fontham ETH, Kreuzer M, Darby SC, Forastiere F, Simonato L, Boffetta P

(2004) SECONDHAND SMOKE EXPOSURE IN ADULTHOOD AND RISK OF LUNG CANCER AMONG NEVER SMOKERS: A POOLED ANALYSIS OF TWO LARGE STUDIES. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 109:125–131. doi:10.1002/ijc.11682

Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ (2016a) Adjustments to the preanalytical phase of quantitative cell-free DNA analysis. *Data in brief* 6:326–329. doi:10.1016/j.dib.2015.12.009

Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Aucamp J, van Dyk E, Du Plessis L, Pretorius PJ (2016b) Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1863:157–165. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.10.022

Bronkhorst AJ, Aucamp J, Wentzel JF, Pretorius PJ (2016c) Reference gene selection for in vitro cell-free DNA analysis and gene expression profiling. *Clinical biochemistry* 49:606–608. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.01.022

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical chemistry* 55:611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797

Butz M (2012) Beruflich verursachte Krebserkrankungen; Eine Darstellung der im Zeitraum 1978 bis 2000 anerkannten Berufskrankheiten; Dokumentation des Berufskrankheiten-Geschehens in Deutschland - BK-DOK. http://publikationen.dguv.de/dguv/pdf/10002/berufl_krebs-07-14-06.pdf. Zugriffen: 05. Februar 2016

Chan KCA, Leung S-F, Yeung S-W, Chan ATC, Lo YMD (2008) Persistent Aberrations in Circulating DNA Integrity after Radiotherapy Are Associated with Poor Prognosis in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:4141–4145. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0182

Chang CP-Y, Chia R-H, Wu T-L, Tsao K-C, Sun C-F, Wu JT (2003) Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* 327:95–101. doi:10.1016/S0009-8981(02)00337-6

- Cherepanova AV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP (2008) Deoxyribonuclease Activity and Circulating DNA Concentration in Blood Plasma of Patients with Prostate Tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137:218–221. doi:10.1196/annals.1448.016
- Chiu TW, Young R, Chan LYS, Burd A, Lo DYM (2006) Plasma cell-free DNA as an indicator of severity of injury in burn patients. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 44:13–17. doi:10.1515/CCLM.2006.003
- Choi J-J, Reich CF3, Pisetsky DS (2005) The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* 115:55–62. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02130.x
- Daniotti M, Vallacchi V, Rivoltini L, Patuzzo R, Santinami M, Arienti F, Cutolo G, Pierotti MA, Parmiani G, Rodolfo M (2007) Detection of mutated BRAFV600E variant in circulating DNA of stage III-IV melanoma patients. *International journal of cancer* 120:2439–2444. doi:10.1002/ijc.22598
- Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, Deo H, Falk R, Forastiere F, Hakama M, Heid I, Kreienbrock L, Kreuzer M, Lagarde F, Mäkeläinen I, Muirhead C, Oberaigner W, Pershagen G, Ruano-Ravina A, Ruosteenoja E, Rosario AS, Tirmarche M, Tomásek L, Whitley E, Wichmann H-E, Doll R (2005) Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ (Clinical research ed.)* 330:223. doi:10.1136/bmj.38308.477650.63
- Darby S, Hill D, Deo H, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, Falk R, Farchi S, Figueiras A, Hakama M, Heid I, Hunter N, Kreienbrock L, Kreuzer M, Lagarde F, Makelainen I, Muirhead C, Oberaigner W, Pershagen G, Ruosteenoja E, Rosario AS, Tirmarche M, Tomasek L, Whitley E, Wichmann H-E, Doll R (2006) Residential radon and lung cancer--detailed results of a collaborative analysis of individual data on 7148 persons with lung cancer and 14,208 persons without lung cancer from 13 epidemiologic studies in Europe. *Scandinavian journal of work, environment & health* 32 Suppl 1:1–83

Detterbeck FC, Mazzone PJ, Naidich DP, Bach PB (2013) Screening for Lung Cancer; Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 143:e78S-e92S. doi:10.1378/chest.12-2350

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (2018) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion. <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>.
Zugegriffen: 25. Mai 2018

Dörner K (2009) *Klinische Chemie und Hämatologie*; 69 Tabellen. Thieme, Stuttgart

El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR (2013) Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 424:222–230. doi:10.1016/j.cca.2013.05.022

El-Gayar D, El-Abd N, Hassan N, Ali R (2016) Increased Free Circulating DNA Integrity Index as a Serum Biomarker in Patients with Colorectal Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 17:939–944. doi:10.7314/APJCP.2016.17.3.939

Ellinger J, Bastian PJ, Ellinger N, Kahl P, Perabo FG, Büttner R, Müller SC, Ruecker A von (2008a) Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: A prognostic entity. *Cancer letters* 264:274–280. doi:10.1016/j.canlet.2008.01.038

Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, Heukamp LC, Buettner R, Fimmers R, Mueller SC, Ruecker A von (2008b) Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 122:138–143. doi:10.1002/ijc.23057

Fleischhacker M, Schmidt B (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--A survey. *Biochimica et biophysica acta* 1775:181–232. doi:10.1016/j.bbcan.2006.10.001

Fleischhacker M, Schmidt B (2010) Free circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) -- Useful for the detection of lung cancer patients?

Cancer biomarkers : section A of Disease markers 6:211–219.

doi:10.3233/CBM-2009-0131

Fontana RS, Sanderson DR, Woolner LB, Taylor WF, Miller WE, Muhm JR (1986) Lung Cancer Screening: The Mayo Program. *Journal of occupational medicine. : official publication of the Industrial Medical Association* 28:746–750

Gang F, Guorong L, An Z, Anne G-P, Christian G, Jacques T (2010) Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Integrity of Cell-free DNA in Serum. *Urology* 75:262–265. doi:10.1016/j.urology.2009.06.048

Gao Y-J, He Y-J, Yang Z-L, Shao H-Y, Zuo Y, Bai Y, Chen H, Chen X-C, Qin F-X, Tan S, Wang J, Wang L, Zhang L (2010) Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 48:1651–1656. doi:10.1515/CCLM.2010.311

Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD (1998) Cell-Free DNA in Human Blood Plasma: Length Measurements in Patients with Pancreatic Cancer and Healthy Controls. *Pancreas* 17:89–97

Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M et al (2010) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms; Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft.

<https://www.onkopedia.com/de/wissensdatenbank/wissensdatenbank/wissensdatenbank/lungenkarzinom/AWMFS3LeitlinieLungenkarzinom2010.pdf>.

Zugegriffen: 03. Februar 2016

Gruber C, Hatz R, Reinmiedl J, Nagel D, Stieber P (2008) CEA, CYFRA 21-1, NSE, and ProGRP in the diagnosis of lung cancer: a multivariate approach; CEA, CYFRA 21-1, NSE und ProGRP in der Diagnostik des Lungenkarzinoms: eine multivariate Analyse. *LaboratoriumsMedizin* 32:361–371. doi:10.1515/JLM.2008.050

Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ (1997) The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 315:980–988.

doi:10.1136/bmj.315.7114.980

Hanley R, Rieger-Christ KM, Canes D, Emara NR, Shuber AP, Boynton KA, Libertino JA, Summerhayes IC (2006) DNA Integrity Assay: A Plasma-Based Screening Tool for the Detection of Prostate Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12:4569–4574. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0130

Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J, Wu XH, Wu Y, Tang YY, Ju SQ (2014) Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *British journal of cancer* 111:1482–1489. doi:10.1038/bjc.2014.470

Hauser S, Zahalka T, Ellinger J, Fechner G, Heukamp LC, Ruecker A von, Müller SC, Bastian PJ (2010) Cell-free Circulating DNA: Diagnostic Value in Patients with Renal Cell Cancer. *Anticancer research* 30:2785–2789

Hecht SS (1999) Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 91:1194–1210. doi:10.1093/jnci/91.14.1194

Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, Libby DM, Pasmantier MW, Koizumi J, Altorki NK, Smith JP (1999) Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet (London, England)* 354:99–105. doi:10.1016/S0140-6736(99)06093-6

Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, El-Hefnawy T, Kelly L, Luketich JD, Godfrey TE (2005) Quantitative Analysis of Circulating Plasma DNA as a Tumor Marker in Thoracic Malignancies. *Clinical chemistry* 51:113–118. doi:10.1373/clinchem.2004.039263

Holdenrieder S, Stieber P, Chan LYS, Geiger S, Kremer A, Nagel D, Lo YMD (2005) Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. *Clinical chemistry* 51:1544–1546. doi:10.1373/clinchem.2005.049320

Holdenrieder S, Nagel D, Schalhorn A, Heinemann V, Wilkowski R, Pawel J von, Raith H, Feldmann K, Kremer AE, Muller S, Geiger S, Hamann GF, Seidel D, Stieber P (2008a) Clinical Relevance of Circulating Nucleosomes in

- Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137:180–189.
doi:10.1196/annals.1448.012
- Holdenrieder S, Burges A, Reich O, Spelsberg FW, Stieber P (2008b) DNA Integrity in Plasma and Serum of Patients with Malignant and Benign Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137:162–170.
doi:10.1196/annals.1448.013
- Huang A, Zhang X, Zhou S-L, Cao Y, Huang X-W, Fan J, Yang X-R, Zhou J (2016) Plasma Circulating Cell-free DNA Integrity as a Promising Biomarker for Diagnosis and Surveillance in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer* 7:1798–1803. doi:10.7150/jca.15618
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R (2001) DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer research* 61:1659–1665
- Jiang W-W, Zahurak M, Goldenberg D, Milman Y, Park HL, Westra WH, Koch W, Sidransky D, Califano J (2006) Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 119:2673–2676. doi:10.1002/ijc.22250
- Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, Cheng SH, Wong J, Wong VW-S, Wong GLH, Chan SL, Mok TSK, Chan HLY, Lai PBS, Chiu RWK, Lo YMD (2015) Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:E1317-E1325.
doi:10.1073/pnas.1500076112
- Jiang T, Zhai C, Su C, Ren S, Zhou C (2016) The diagnostic value of circulating cell free DNA quantification in non-small cell lung cancer: A systematic review with meta-analysis. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 100:63–70. doi:10.1016/j.lungcan.2016.06.013
- Jr Atkinson A.J., W. A. Colburn, V. G. DeGruttola, D. L. DeMets, G. J. Downing, D. F. Hoth, J. A. Oates, C. C. Peck, R. T. Schooley, B. A. Spilker, J. Woodcock, S. L. Zeger (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics* 69:89–95. doi:10.1067/mcp.2001.113989

- Jung K, Fleischhacker M, Rabien A (2010) Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker--A critical appraisal of the literature. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 411:1611–1624. doi:10.1016/j.cca.2010.07.032
- Korabecna M, Opatrna S, Wirth J, Rulcova K, Eiselt J, Sefrna F, Horinek A (2008) Cell-Free Plasma DNA during Peritoneal Dialysis and Hemodialysis and in Patients with Chronic Kidney Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137:296–301. doi:10.1196/annals.1448.014
- Kubík A, Polak J (1986) Lung Cancer Detection; Results of a Randomized Prospective Study in Czechoslovakia. *Cancer* 57:2427–2437
- Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV (2004) Cell-Surface-Bound Nucleic Acids; Free and Cell-Surface-Bound Nucleic Acids in Blood of Healthy Donors and Breast Cancer Patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1022:221–227. doi:10.1196/annals.1318.034
- Lam NYL, Rainer TH, Chiu RWK, Lo YMD (2004) EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. *Clinical chemistry* 50:256–257. doi:10.1373/clinchem.2003.026013
- Lee T-H, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP (2001) Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 41:276–282. doi:10.1046/j.1537-2995.2001.41020276.x
- Lehner J, Stötzer OJ, Fersching D, Nagel D, Holdenrieder S (2013) Circulating plasma DNA and DNA integrity in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 425:206–211. doi:10.1016/j.cca.2013.07.027
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ (1977) Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer research* 37:646–650
- Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA (2000) Plasma DNA as a Prognostic Marker in Trauma Patients. *Clinical chemistry* 46:319–323

- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg) (2007) Biochemie und Pathobiochemie. Springer Medizin, Heidelberg
- Ludwig W-D (2012) Möglichkeiten und Grenzen der stratifizierenden Medizin am Beispiel von prädiktiven Biomarkern und "zielgerichteten" medikamentösen Therapien in der Onkologie. Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen 106:11–22.
doi:10.1016/j.zefq.2011.12.001
- Lui YYN, Chik K-W, Chiu RWK, Ho C-Y, Lam CWK, Lo YMD (2002) Predominant Hematopoietic Origin of Cell-free DNA in Plasma and Serum after Sex-mismatched Bone Marrow Transplantation. Clinical chemistry 48:421–427
- MANDEL P, METAIS P (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales 142:241–243
- Manser RL, Irving LB, Byrnes G, Abramson MJ, Stone CA, Campbell DA (2003) Screening for lung cancer: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. Thorax 58:784–789
- MARTINS GA, KAWAMURA MT, CARVALHO, MARIA DA GLORIA DA COSTA (2000) Detection of DNA in the Plasma of Septic Patients. Annals of the New York Academy of Sciences 906:134–140. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06603.x
- Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB, Heelan RT, Perchick WA, Martini N (1984) Screening for Early Lung Cancer; Results of the Memorial Sloan-Kettering Study in New York. Chest 86:44–53
- Minchin RF, Carpenter D, Orr RJ (2001) Polyinosinic Acid and Polycationic Liposomes Attenuate the Hepatic Clearance of Circulating Plasmid DNA. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 296:1006–1012
- Molina R, Filella X, Auge JM, Fuentes R, Bover I, Rifa J, Moreno V, Canals E, Vinolas N, Marquez A, Barreiro E, Borrás J, Viladiu P (2003) Tumor Markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer as an Aid in Histological Diagnosis and Prognosis;

Comparison with the Main Clinical and Pathological Prognostic Factors.

Tumour biology : the journal of the International Society for

Oncodevelopmental Biology and Medicine 24:209–218

Molina R, Auge JM, Alicarte J, Filella X, Vinolas N, Ballesta AM (2004) Pro-Gastrin-Releasing Peptide in Patients with Benign and Malignant Diseases.

Tumour biology : the journal of the International Society for

Oncodevelopmental Biology and Medicine 25:56–61. doi:10.1159/000077724

Molina R, Auge JM, Filella X, Vinolas N, Alicarte J, Domingo JM, Ballesta AM (2005) Pro-gastrin-releasing Peptide (proGRP) in Patients with Benign and Malignant Diseases: Comparison with CEA, SCC, CYFRA 21-1 and NSE in Patients with Lung Cancer. Anticancer research 25:1773–1778

Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, Gongora C, Thierry AR (2011) High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. PloS one 6. doi:10.1371/journal.pone.0023418

Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, Dritschilo A, Thierry AR (2014) Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. Molecular oncology 8:927–941.

doi:10.1016/j.molonc.2014.02.005

NCI Dictionary of Cancer Terms.

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=46636>.

Zugegriffen: 28. Januar 2018

Oh H-J, Park H-Y, Kim K-H, Park C-K, Shin H-J, Lim J-H, Kwon Y-S, Oh I-J, Kim Y-I, Lim S-C, Kim Y-C, Kim S-H, Shin M-G (2016) Progastrin-releasing peptide as a diagnostic and therapeutic biomarker of small cell lung cancer.

Journal of thoracic disease 8:2530–2537. doi:10.21037/jtd.2016.08.72

Okamura K, Takayama K, Izumi M, Harada T, Furuyama K, Nakanishi Y (2013) Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) 80:45–49.

doi:10.1016/j.lungcan.2013.01.002

Oremek GM, Sauer-Eppel H, Bruzdziak TH (2007) Value of Tumour and Inflammatory Markers in Lung Cancer. Anticancer research 27:1911–1915

- Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R (2000) Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ* 321:323–329. doi:10.1136/bmj.321.7257.323
- Pinzani P, Salvianti F, Orlando C, Pazzagli M (2014) Circulating Cell-Free DNA in Cancer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1160:133–145. doi:10.1007/978-1-4939-0733-5_13
- Puszyk WM, Crea F, Old RW (2009) Unequal representation of different unique genomic DNA sequences in the cell-free plasma DNA of individual donors. *Clinical biochemistry* 42:736–738. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.11.006
- Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R et al (2013) Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet Oncology* 14:813–822. doi:10.1016/S1470-2045(13)70279-1
- Robert Koch-Institut (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016:32–35
- Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (Hrsg) (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012, Berlin
- Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M (2008) Integrity of Cell-Free Plasma DNA in Patients with Lung Cancer and Nonmalignant Lung Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137:207–213. doi:10.1196/annals.1448.034
- Seemann MD, Beinert T, Fürst H, Fink U (1999) An evaluation of the tumour markers, carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin marker (CYFRA 21-1) and neuron-specific enolase (NSE) in the differentiation of malignant from benign solitary pulmonary lesions. *Lung Cancer* 26:149–155. doi:10.1016/S0169-5002(99)00084-7
- Shi W, Lv C, Qi J, Zhao W, Wu X, Jing R, Wu X, Ju S, Chen J (2012) Prognostic Value of Free DNA Quantification in Serum and Cerebrospinal

Fluid in Glioma Patients. *Journal of molecular neuroscience* : MN 46:470–475. doi:10.1007/s12031-011-9617-0

Shibayama T, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, Tabata M, Miyatake K, Kitajima T, Harada M (2001) Complementary roles of pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) and neuron specific enolase (NSE) in diagnosis and prognosis of small-cell lung cancer (SCLC). *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 32:61–69

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015) *Cancer statistics, 2015*. CA: A Cancer Journal for Clinicians 65:5–29. doi:10.3322/caac.21254

Sone S, Takashima S, Li F, Yang Z, Honda T, Maruyama Y, Hasegawa M, Yamanda T, Kubo K, Hanamura K, Asakura K (1998) Mass screening for lung cancer with mobile spiral computed tomography scanner. *Lancet (London, England)* 351:1242–1245. doi:10.1016/S0140-6736(97)08229-9

Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Verderio P, Pastorino U (2005) Effects of Prolonged Storage of Whole Plasma or Isolated Plasma DNA on the Results of Circulating DNA Quantification Assays. *Journal of the National Cancer Institute* 97:1848–1850. doi:10.1093/jnci/dji432

Stötzer OJ, Lehner J, Fersching-Gierlich D, Nagel D, Holdenrieder S (2014) Diagnostic relevance of plasma DNA and DNA integrity for breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35:1183–1191. doi:10.1007/s13277-013-1158-4

Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA (1987) Isolation and Characterization of DNA from the Plasma of Cancer Patients. *European journal of cancer & clinical oncology* 23:707–712

Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M (1989) Neoplastic Characteristics of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology* 46:318–322

Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P (2000) The Origin and Mechanism of Circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* 906:161–168

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P (2001a) About the possible origin and mechanism of circulating DNA Apoptosis and active DNA release. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 313:139–142

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Mulcahy HE, Anker P (2001b) Alu Repeat Sequences Are Present in Increased Proportions Compared to a Unique Gene in Plasma/Serum DNA; Evidence for a Preferential Release from Viable Cells? *Annals of the New York Academy of Sciences* 945:258–264

Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y (2008) Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 387:55–58. doi:10.1016/j.cca.2007.09.001

Szpechcinski A, Rudzinski P, Kupis W, Langfort R, Orłowski T, Chorostowska-Wynimko J (2016) Plasma cell-free DNA levels and integrity in patients with chest radiological findings: NSCLC versus benign lung nodules. *Cancer letters* 374:202–207. doi:10.1016/j.canlet.2016.02.002

Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, Laktionov PP (2006) Circulating DNA and DNase Activity in Human Blood. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075:191–196. doi:10.1196/annals.1368.026

Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG (1966) Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of clinical investigation* 45:1732–1740. doi:10.1172/JCI105479

Taylor R, Najafi F, Dobson A (2007) Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *International journal of epidemiology* 36:1048–1059. doi:10.1093/ije/dym158

Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, Del Rio M, Molina F (2010) Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic acids research* 38:6159–6175. doi:10.1093/nar/gkq421

- Thijssen MA, Swinkels DW, Ruers TJM, Kok JB de (2002) Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. *Anticancer research* 22:421–425
- Tomita H, Ichikawa D, Ikoma D, Sai S, Tani N, Ikoma H, Fujiwara H, Kikuchi S, Okamoto K, Ochiai T, Otsuji E (2007) Quantification of Circulating Plasma DNA Fragments as Tumor Markers in Patients with Esophageal Cancer. *Anticancer research* 27:2737–2741
- Tonini G, D'Onofrio L, Dell'Aquila E, Pezzuto A (2013) New molecular insights in tobacco-induced lung cancer. *Future oncology (London, England)* 9:649–655. doi:10.2217/fon.13.32
- Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DSB (2006a) Higher Amount of Free Circulating DNA in Serum than in Plasma Is Not Mainly Caused by Contaminated Extraneous DNA during Separation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075:299–307. doi:10.1196/annals.1368.040
- Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, Hoon DSB (2006b) Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. *Clinical chemistry* 52:1062–1069. doi:10.1373/clinchem.2006.068577
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, Hoon DSB (2006c) Prediction of Breast Tumor Progression by Integrity of Free Circulating DNA in Serum. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24:4270–4276. doi:10.1200/JCO.2006.05.9493
- Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, Gligorich KM, Rostomily RC, Bronner MP, Shendure J (2016) Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS genetics* 12:e1006162. doi:10.1371/journal.pgen.1006162
- Vasavda N, Ulug P, Kondaveeti S, Ramasamy K, Sugai T, Cheung G, Rees DC, Awogbade M, Bannister S, Cunningham J, Menzel S, Thein SL (2007) Circulating DNA: a potential marker of sickle cell crisis. *British journal of haematology* 139:331–336. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06775.x

- Wang BG, Huang H-Y, Chen Y-C, Bristow RE, Kassaei K, Cheng C-C, Roden R, Sokoll LJ, Chan DW, Shih I-M (2003) Increased Plasma DNA Integrity in Cancer Patients. *Cancer research* 63:3966–3968
- WHO International Programme on Chemical Safety (2001) Biomarkers in Risk Assessment; Validity And Validation. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm#1.0>). Zugegriffen: 16. Juli 2018
- Wilde J (1989) A 10 year follow-up of semi-annual screening for early detection of lung cancer in the Erfurt County, GDR. *The European respiratory journal* 2:656–662
- Wynder E. L., Graham E. A (1950) Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *The Journal of the American Medical Association* 143:329–336
- Yang RH, Tian RF, Ren QL, Chui HY, Guo ST, Zhang XD, Song X (2016) Serum protein profiles of patients with lung cancer of different histological types. *Asia-Pacific journal of clinical oncology* 12:70–76. doi:10.1111/ajco.12441
- Yoon K-A, Park S, Lee SH, Kim JH, Lee JS (2009) Comparison of Circulating Plasma DNA Levels between Lung Cancer Patients and Healthy Controls. *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 11:182–185. doi:10.2353/jmoldx.2009.080098
- Yu J, Gu G, Ju S (2014) Recent Advances in Clinical Applications of Circulating Cell-free DNA Integrity. *Laboratory medicine* 45:6–12
- Zaher ER, Anwar MM, Kohail HMA, El-Zoghby SM, Abo-El-Eneen MS (2013) Cell-free DNA concentration and integrity as a screening tool for cancer. *Indian journal of cancer* 50:175–183. doi:10.4103/0019-509X.118721
- Zhang R, Shao F, Wu X, Ying K (2010) Value of quantitative analysis of circulating cell free DNA as a screening tool for lung cancer: A meta-analysis. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 69:225–231. doi:10.1016/j.lungcan.2009.11.009

8. Thesen

1. Der hier verwendete DNA-Integritäts-Index I nach Umtani et al., bestehend aus den Fragmenten K-ras 300bp / K-ras 60bp, sowie der DNA-Integritäts-Index II nach Wang et al., berechnet aus den Ct-Werten für die beiden Fragmente, ließen keine signifikante Unterscheidung zwischen Patienten mit Lungentumoren (sowohl behandelt als auch bisher unbehandelt), Patienten mit korrespondierenden benignen Lungenerkrankungen oder Patienten mit anderen Neoplasien zu.
2. Die verwendete qPCR-Messung war sensitiv genug, um auch bei DNA-Proben, die ein Jahr bei -20°C gelagert wurden, DNA-Fragmente zu messen, sogar wenn diese Fragmente unter 100bp groß waren (K-ras 60 bp langes Fragment).
3. Selbst bei fast zehn Jahre gelagerten Plasmaproben konnte DNA in ca. 96% der Fälle erfolgreich isoliert werden bzw. konnten weitere Messungen vorgenommen werden.
4. Weder die Aufbewahrungszeit der Plasmaproben noch die Aufbewahrungszeit der DNA-Proben hatte einen großen Einfluss auf die diagnostische Kapazität der Integritäts-Indices.
5. Deskriptive Analysen konnten zeigen, dass prozentual mehr Raucher bzw. Ex-Raucher unter den Patienten mit Lungentumoren waren, als unter den Patienten mit benignen Lungenerkrankungen.
6. Der hier verwendete DNA-Integritäts-Index, mit einer AUC von 0,420 bzw. 0,449 in Stichprobe 1 und 0,635 bzw. 0,659 in Stichprobe 2 bezogen auf die Unterscheidung zwischen Patienten mit unbehandelten Lungentumoren und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen, ist zumindest allein gesehen ungeeignet bei der Diagnostik von Lungenkrebs.
7. Der hier verwendete DNA-Integritäts-Index war nicht in der Lage, zwischen verschiedenen Tumorerkrankungen zu unterscheiden (Vergleich Gruppe 1 und Gruppe 3 in den Tests). Ein Ergebnis, welches dafürspricht, dass der DNA-Integritäts-Index nicht spezifisch für eine ganz bestimmte Tumorerkrankung ist.

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel: „Der DNA-Integritäts-Index K-ras 300 / 60 in der "liquid biopsy" und sein diagnostischer Nutzen bei Lungentumoren“ selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften oder Medien entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Karlsruhe, der 09.06.2018



Natalie Dörner

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Karlsruhe, der 09.06.2018



Natalie Dörner

Lebenslauf

Personalien

Name: Natalie Regina Dörner
Anschrift: Steinhäuserstraße 18a, Appartement 419
76135 Karlsruhe
Geburtsdaten: 25.01.1991, Groß-Gerau

Schulbildung / Studium:

2001 - 2010 Bischöfliches Gymnasium Josephinum,
Hildesheim

2010 Allgemeine Hochschulreife

10/2010 - 12/2017 Studium der Medizin an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

Ärztliche Tätigkeit

18.12.2017 Ärztliche Approbation

Seit 02/2018 Assistenzärztin am Institut für Pathologie, ViDia
Christliche Kliniken Karlsruhe

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen, die mir bei der Realisierung dieser Arbeit geholfen haben, herzlich bedanken.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. der. med. Bernd Schmidt für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die Begleitung zum DGP-Kongress 2015 in Berlin und die Motivation danken.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer im Labor, Herrn Dr. rer. nat. Michael Fleischhacker und Frau Dana Reinicke für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit, die Hilfe bei der Recherche und bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Frau Dipl.-Math. S. Behl danke ich für die unterstützende Hilfe und Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Viel Unterstützung fand ich außerdem in der Zusammenarbeit mit meiner Co-Doktorandin Frau Julia Wagner, für die ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Ein besonderer Dank gilt insgesamt meiner Familie, die mich immer unterstützt und aufgebaut haben, wenn mal etwas nicht so lief, wie es sollte.

Zuletzt, aber nicht am wenigsten, danke ich allen, die hier nicht genannt wurden, aber nichtsdestoweniger große und kleinere Beiträge zum Abschluss dieser Arbeit geleistet haben.