

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. Patrick Michl)
Schwerpunkt Pneumologie

**Quantitativer Nachweis zellfreier methylierter short stature
homeobox 2 DNA von Lungentumorpatienten vor und nach
operativer Therapie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Christian Georg Fuhrmann
geboren am 1. November 1987 in Oldenburg

Betreuer: Prof. Dr. Bernd Schmidt (Berlin)

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. J. Neudecker (Berlin)
2. PD Dr. med. A. Zipprich
3. PD Dr. med. C. Schäfer (Greifswald)

02.05.2017

04.12.2017

Referat

Die vorliegende Dissertation untersucht den molekularen Marker mSHOX2 in Bezug auf dessen Eignung als Tumormarker für das Lungenkarzinom. Dies mit besonderem Augenmerk auf dessen Verhalten vor und nach operativer Tumorthherapie.

Untersucht wurde der Methylierungsgrad des SHOX2-Gens bei 28 Patienten mit Lungenkarzinom im Stadium I-IIIa, welche sich zur operativen Tumorthherapie im Studienzentrum vorstellten.

Es wurden prä-/postoperative Plasmaproben, sowie Bronchiallavage und intraoperativ Tumorgewebe gewonnen und auf ihren Gehalt an mSHOX2 untersucht. Darüberhinaus wurden die Patienten, soweit möglich, postoperativ weiter verfolgt und bei diesen im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen in weiteren follow-up Blutplasmaproben erneut der Methylierungsgrad des SHOX2-Gens gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Patienten, die präoperativ einen hohen Methylierungsgrad aufwiesen, es postoperativ zu einem deutlichen Abfall von mSHOX2 kam. Ebenso weisen einige Patienten in den follow-up Untersuchungen nach initial unauffälligem mSHOX2 Nachweis im Verlauf ansteigende Werte auf. Schließlich zeigte sich, dass mSHOX2 sowohl in Blutplasma als auch in Lavage und Tumorgewebe nachweisbar ist und einige wichtige Charakteristika eines Tumormarkers aufweist.

Die durch diese Pilotstudie gewonnenen Erkenntnisse sind vielversprechend. Einzelne Aspekte bedürfen jedoch der Überprüfung in einem größeren Maßstab im Rahmen einer multizentrischen Studie.

Fuhrmann, Christian Georg: [Quantitativer Nachweis zellfreier methylierter short stature homeobox 2 DNA von Lungentumorpatienten vor und nach operativer Therapie](#), Halle/Saale, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 50 Seiten, 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Lungenkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Histologische Einteilung	2
1.1.3	Diagnostik	2
1.1.4	Stadieneinteilung	2
1.1.5	Symptome	5
1.1.6	Screeningmethoden	5
1.2	Therapie des Nicht-Kleinzelligen-Bronchialkarzinoms (NSCLC)	6
1.2.1	Operation	7
1.2.2	Radiatio	7
1.2.3	Chemotherapie	7
1.2.4	Immuntherapie	8
1.3	Therapie des Kleinzelligen-Bronchialkarzinoms (SCLC)	8
1.4	Genetische Alterationen von Lungentumoren	9
1.4.1	Epigenetik	9
1.4.2	Punktmutationen	9
1.4.3	Numerische Chromosomenaberrationen	10
1.4.4	DNA-Methylierung	10
1.5	Freie zirkulierende Nukleinsäuren (CNA)	12
2	Zielstellung	13
3	Material und Methoden	14
3.1	Patienten	14
3.2	Probengewinnung	14
3.2.1	Blutproben	14
3.2.2	Bronchiallavage	14
3.2.3	Tumorgewebe	15
3.3	DNA Isolation	15
3.3.1	DNA Isolation aus Blutplasma	15
3.3.2	DNA Isolation aus Bronchiallavagezellen	16
3.3.3	DNA Isolation aus Tumorgewebe	17
3.4	Bisulfitbehandlung	17
3.4.1	Bisulfitbehandlung und Aufreinigung der Blutplasmaproben	17
3.4.2	Bisulfitbehandlung und Aufreinigung der Bronchiallavage- und Tumorgewebeproben	18
3.5	PCR-Untersuchung	19

3.6	Bestimmung der Vaskularisierung im Tumorgewebe	20
3.7	Statistische Berechnungen	20
4	Ergebnisse	21
4.1	Demographische und klinische Daten	21
4.1.1	Geschlechtsverteilung	21
4.1.2	Alter	21
4.1.3	Raucherstatus	22
4.2	Tumore	23
4.2.1	Tumorhistologie	23
4.2.2	Tumorgröße	24
4.2.3	Lymphknotenstatus	27
4.2.4	Fernmetastasen	27
4.2.5	Tumorstadium	28
4.3	PMR-Werte	28
4.3.1	Vergleich prä- / postoperative Werte im Blutplasma	28
4.3.2	Follow-up Blutplasmawerte	30
4.3.3	Vergleich PMR-Werte in Gewebe / Bronchiallavage / Blutplasma	31
5	Diskussion	36
5.1	Diskussion der Methoden	36
5.1.1	Das Patientenkollektiv	36
5.1.2	Probengewinnung	36
5.1.3	Tumorstadien	37
5.1.4	Angewandte analytische Methoden	38
5.2	Diskussion der PMR-Werte	38
5.2.1	Vergleich prä- / postoperativer Werte im Blutplasma	38
5.2.2	Follow-up Blutplasmawerte	40
5.2.3	Vergleich PMR-Werte in Gewebe / Bronchiallavage / Blutplasma	41
5.3	Limitationen	43
6	Zusammenfassung	44
7	Literaturverzeichnis	45
8	Thesen	50

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AML	Akute Myeloische Leukämie
bezgl.	Bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CNA	circulating nucleic acids (zirkulierende Nukleinsäuren)
CpG	Cytosin-Phosphat-Guasin (5'-3')
CT	Computertomographie
Δ CT	Differenz Cycle Threshold
CTC	Circulating tumor cells
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	desoxiribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferasen
DTT	Dithiotreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ggf.	gegebenenfalls
HPV	Humane Papillomaviren
HPF	High Power Field – hochauflösendes Gesichtfeld
mSHOX2	methyliertes Short-Homeobox-Gen 2
n.d.	not determined (nicht bestimmt)
NEC	Neuroendokrines Karzinom
Nr.	Nummer
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer (Nicht-Kleinzelliges-Bronchialkarzinom)
o.g.	oben genannt
Pat.	Patient
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PET	Positronenemissionstomographie
PMR	Prozent-Methylierung-Ratio
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

SCLC	Small-Cell Lung Cancer (Kleinzelliges Bronchialkarzinom)
SD	Standard-Deviation (Standardabweichung)
SHOX2	Short-Stature-Homeobox-Gen 2
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TNM	Tumor, node, metastasis – Primärtumor, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen
UICC	Union internationale contre le cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
v.a.	vor allem
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel
♂	männlich
♀	weiblich

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Verteilung Tumorhistologie	23
Abb. 2	Verteilung PMR-Werte im Plasma Prä-OP / T-Stadium	26
Abb. 3	Verteilung PMR-Werte in Bronchiallavage Prä-OP / T-Stadium	26
Abb. 4	Verlauf PMR-Werte follow-up (Pat: 5; 11; 14; 16; 17; 24) im Plasma	31
Tab. 1	TNM Klassifikation nach UICC (7.Auflage)	3
Tab. 2	UICC-Stadien (7. Auflage)	4
Tab. 3	Geschlechtsverteilung	21
Tab. 4	Altersstatistik	21
Tab. 5	Altersverteilung	22
Tab. 6	Raucherstatus	22
Tab. 7	Tumorhistologie	23
Tab. 8	Korrelation T-Stadium / PMR-Werte Gewebe, Lavage, Plasma	25
Tab. 9	Tumorgröße (T)	25
Tab. 10	Lymphknotenstatus (N)	27
Tab. 11	Fernmetastasen (M)	27
Tab. 12	Tumorstadium	28
Tab. 13	Vergleich %-Methylierung prä- / postoperativ im Blutplasma	29
Tab. 14	follow-up PMR-Werte im Blutplasma	31
Tab. 15	Verteilung PMR-Werte Gewebe / Lavage / Plasma	32
Tab. 16	Übersicht PMR Werte in einzelnen Subgruppen (Median + SD)	33
Tab. 17	Korrelationen Gewebe / Lavage / Plasma nach Spearman	33
Tab. 18	PMR-Werte Gewebe / Lavage / Plasma	34
Tab. 19	Korrelation Plasma / Lavage / Vaskularisierung	35
Tab. 20	Korrelation Plasma / Neutrophile Granulozyten	35

1 Einleitung

1.1 Das Lungenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Lungenkarzinom ist weltweit das am häufigsten zum Tode führende Karzinom beim Mann und das 4. häufigste bei der Frau und insgesamt verantwortlich für 18% aller karzinombedingten Todesfälle.^{1,2}

Während sich bei den anderen häufigen Karzinomarten wie Mamma- oder Kolonkarzinom die Überlebenswahrscheinlichkeit in den letzten Jahren verbessert hat, liegt das 5-Jahres-Überleben beim Lungenkarzinom immer noch bei unter 20%.³

Dies liegt vor allem daran, dass Patienten mit einem Lungenkarzinom nur in 16% der Fälle zu einem Zeitpunkt diagnostiziert werden, in dem der Tumor noch lokal begrenzt und damit eine kurative Therapie möglich ist.⁴

Die Hauptursache für das Entstehen eines Lungenkarzinoms ist inhalativer Tabakkonsum.⁵ 80% aller Patienten mit Lungenkarzinom sind Raucher und bis zu 20% aller Raucher entwickeln im Laufe ihres Lebens ein Lungenkarzinom.² Es ist davon auszugehen, dass Langzeitraucher ein 10-30fach höheres Risiko haben, an einem Lungenkarzinom zu erkranken als Nichtraucher.⁶

So steigt das Risiko proportional zu der Menge an täglich gerauchten Zigaretten, der Dauer und dem Alter bei Beginn des Konsums, der Menge an in den Zigaretten enthaltenem Teer und Nikotin, sowie Dauer und Tiefe der Inhalation.^{7,8} Hierbei muss die Zigarette noch nicht einmal selbst konsumiert werden, denn auch Passivrauchen erhöht nachweislich das Karzinomrisiko.⁹

Weitere wichtige Karzinogene sind eine berufsbedingte Arsenexposition (Metallverarbeitung, Bergbau) und der Umgang mit Asbest (Zementherstellung, Baugewerbe). Besonders gefährlich ist hierbei die parallele Exposition von Asbest und Zigarettenkonsum. Man schätzt, dass sich durch diese Kombination das relative Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken gegenüber einem Nicht-Exponierten um bis zu 60-fach erhöht.

1.1.2 Histologische Einteilung

Die WHO unterteilt das Lungenkarzinom in Kleinzellige- (SCLC) und Nichtkleinzellige Karzinome (NSCLC). Letztere beinhalten das Plattenepithel-, Adeno- sowie das Großzellige Karzinom.

Weitere seltene Karzinome sind adenosquamöse Mischtumoren, das sarkomatoide Karzinom sowie das neuroendokrine Karzinom (NEC).

1.1.3 Diagnostik

Ergibt sich bei der klinischen Untersuchung und Anamnese oder einer Röntgenaufnahme des Thorax (Strahlengang p.a. und seitlich) des Patienten der Verdacht auf ein Lungenkarzinom empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie die initiale Durchführung einer weitergehenden Diagnostik mit kontrastmittelverstärkter CT-Untersuchung des Thorax und eine Bronchoskopie. Bei verdächtigen Läsionen/Lymphknoten schließt sich eine Biopsie an, welche lageabhängig entweder endobronchial im Rahmen der Bronchoskopie oder transthorakal, ggf. jeweils unter Zuhilfenahme von Ultraschall zur besseren Lokalisation, durchgeführt wird.¹⁰ Die gewonnenen Biopsien werden anschließend vom Pathologen zytologisch bzw. histologisch untersucht.

Bei Bestätigung des Karzinoms folgen weitere Staginguntersuchungen. Hierzu zählen Sonographie und Computertomographie des Abdomens sowie des Schädels. Ergänzt werden diese durch nuklearmedizinische Untersuchungen wie Szintigraphie oder Positronenemissionstomographie (PET) zur Metastasensuche und Lymphknotenbeurteilung.

1.1.4 Stadieneinteilung

Nach erfolgtem Staging wird das Karzinom nach der TNM-Klassifikation der WHO (Tab.1) eingeteilt und einem UICC-Stadium (Tab.2) zugeteilt. Hierbei sind maßgeblich die Tumorgöße sowie -Lokalisation (T), der Lymphknotenstatus (N) und die Fernmetastasierung (M).

Tab. 1 - TNM Klassifikation nach UICC (7. Auflage)

T1a	Tumor ≤ 2cm in größter Ausdehnung
T1b	Tumor > 2cm, aber ≤ 3cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 3cm, aber ≤ 7cm oder Tumor mit Invasion des Hauptbronchus, > 2cm distal der Hauptcarina, Invasion der viszeralen Pleura, oder Atelektase/obstruktive Pneumonitis von weniger als einer ganzen Lunge
T2a	Tumor > 3cm, aber ≤ 5cm in größter Ausdehnung
T2b	Tumor > 5cm, aber ≤ 7cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor > 7cm oder direkte Invasion von Brustwand, Diaphragma, N. phrenicus, mediastinaler Pleura, parietalem Perikard, oder Tumor im Hauptbronchus < 2cm von der Hauptcarina entfernt oder Atelektase/obstruktive Pneumonitis einer ganzen Lunge oder separate/r Tumorknoten im gleichen Lungenlappen
T4	Tumor jeder Größe mit Invasion von Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. laryngeus linksseitig, Ösophagus, Wirbelkörper, Hauptcarina oder separater Tumorknoten in einem ipsilateralen separaten Lungenlappen
M	Fernmetastasen
M1a	Separate/r Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlappen; Tumor mit Pleuraknoten oder maligner Pleura- / Perikarderguss
M1b	Fernmetastasen
N	Regionale Lymphknoten
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder hilären Lymphknoten
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen Lymphknoten und/oder ipsilateralen subcarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen Lymphknoten von paratracheal bis Lig. subpulmonale oder in kontralateralen hilären Lymphknoten oder in ipsi- / kontralateralen Skalenus- oder subklavikulären Lymphknoten

Tab. 2 - UICC – Stadien (7.Auflage)

Stadium	Tumorgröße	Lymphknoten- status	Fernmetastasen
Okkultes Karzinom	Tx	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3 (gleicher Lappen)	N0	M0
Stadium IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T3 (gleicher Lappen)	N1	M0
	T3 (gleicher Lappen)	N2	M0
	T4 Ausdehnung	N0	M0
	T4 Ausdehnung	N1	M0
	T4 Herd ipsilateral	N0	M0
	T4 Herd ipsilateral	N1	M0
Stadium IIIB	T4 Ausdehnung	N2	M0
	T4 Herd ipsilateral	N2	M0
	Jedes T4	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1a (mal. Pleura- /Perikarderguss od. kontralat. Metastase)
	Jedes T	Jedes N	M1b (Fernmetastase)

1.1.5 Symptome

Etwa 90% der Patienten mit Lungenkarzinom zeigen – oft unspezifische - klinische Symptome wie Husten, Dyspnoe, Brustschmerzen, sowie die klassischen B-Symptome Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Fieber. Ebenso sind paraneoplastische Symptome oder das komplette Ausbleiben von Symptomen zu beobachten.¹¹ Insgesamt ist die Ausprägung der Symptome stark von der Lage, der Größe und dem Stadium des Tumors bzw. dessen Metastasen abhängig.¹²

1.1.6 Screeningmethoden

In einer großangelegten Studie in den Vereinigten Staaten, in die mehr als 50.000 Patienten eingeschlossen wurden, konnte gezeigt werden, dass ein Screening mittels Low-Dose Computertomographie im Vergleich zur herkömmlichen Röntgendiagnostik die relative Mortalität in der Testgruppe (d.h. LDCT Patienten) um 20% reduzierte.¹³ In diese Untersuchungen wurden Hochrisikopatienten im Alter von 55 bis 74 Jahren eingeschlossen, die ein Tabakkonsum von mindestens 30 pack-years aufwiesen bzw. mit dem Rauchen innerhalb der letzten 15 Jahre aufgehört hatten.

Diese Methode ist zwar in den USA als Screeningverfahren zugelassen, jedoch stehen die hohen Kosten einer breiten Implementierung in die tägliche Routine entgegen.¹⁴

Ein weiteres Problem ist die große Anzahl (>95%) an Falsch-Positiven Ergebnissen im Screening mit Low-Dose CT, welche weitere teure und invasive Folgeuntersuchungen wie Bronchoskopie und Biopsie notwendig machen.¹⁵

Ein weiterer aktueller Forschungsansatz zur Früherkennung des Lungenkarzinoms sind molekulare Biomarker.¹⁶ Per Definition ist ein Biomarker „eine Eigenschaft, welche in vitro gemessen oder identifiziert werden kann und hilfreich bei der Prävention, Diagnose, Prognose, Behandlung und Nachsorge von Krankheiten, sowie deren Verständnis ist“.¹⁷

Unter diese Definition fallen verschiedenste Marker wie Blutparameter, Proteine, Hormone, Lipide, sowie genetische- und epigenetische DNA-Merkmale.¹⁸

Trotz verschiedener Anstrengungen in den letzten Jahren gibt es bisher keinen zufriedenstellenden Tumormarker zur Früherkennung des Lungenkarzinoms.

1.2 Therapie des Nicht-Kleinzelligen-Bronchialkarzinoms (NSCLC)

Bei der Therapie des Lungenkarzinoms wird zwischen den Nicht-Kleinzelligen-Bronchial-Karzinomen (NSCLC) und den Kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC) unterschieden. Des Weiteren erfolgt die Therapie Stadien bezogen und ist vom Alter und der Verfassung des Patienten abhängig.

Das therapeutische Arsenal zur Behandlung von Patienten mit einem Lungentumor beinhaltet eine operative Tumor-/Metastasenresektion, Radiotherapie, Chemotherapie sowie die Kombination einzelner Verfahren. Die folgenden Abschnitte beruhen auf der aktuellen S3-Leitlinie zur Therapie des Lungenkarzinoms.¹⁰

Darüberhinaus etablieren sich in den letzten Jahren zunehmend sog. targeted therapies, welche zielgerichtet in das Tumorwachstum eingreifen.

Zu diesen gehören einerseits die monoklonalen Antikörper wie Bevacizumab, die gegen den VEGF-Rezeptor (Vascular Endothelial Growth Factor) gerichtet sind und so die Bildung von Tumorgefäßen unterbinden und damit das Tumorwachstum einschränken.

Auf der anderen Seite sind die spezifischen Tyrosinkinase Inhibitoren wie Gefitinib, Erlotinib und Nintedanib zu nennen, die ebenfalls zielgerichtet die Signalübertragung von Wachstumssignalen über die Tyrosinkinase des EGF (Epidermal Growth Factor) Rezeptors hemmen und auf diese Weise das Tumorwachstum beeinflussen. Eine weitere zielgerichtete Therapie ist für Lungenkarzinome mit einer spezifischen Translokation (EML4/ALK oder ROS) zugelassen.

Diese neuen Therapieansätze gewinnen zunehmend, vor allem auf Grund ihres Überlebensvorteils und des geringeren Nebenwirkungsspektrums, an Bedeutung für die Therapie des fortgeschrittenen Lungenkarzinoms.¹⁰

Ein weiterer aktueller Forschungsschwerpunkt sind Wirkstoffe auf dem Gebiet der Immuntherapie, welche ebenfalls vielversprechende neue Ansätze zur Therapie des Lungenkarzinoms liefern (s. 1.2.4).

1.2.1 Operation

Für Patienten mit ausreichender Lungenfunktion und ohne limitierende Komorbiditäten, stellt die Resektion des Tumors die präferierte Therapie dar. Für eine Operation kommen nach derzeitigen Empfehlungen der S3-Leitlinie nur Patienten bis einschließlich Stadium IIIA in Frage. Hierbei stellen die Lobektomie bzw. bei eingeschränkter Lungenfunktion eine parenchymsparende Lungenlappenteilresektion mit anschließender radikaler Lymphknotendissektion das Verfahren der Wahl dar.¹⁹ Das Ziel ist die vollständige Entfernung des Tumors im gesunden Gewebe.

Bei Vorliegen einer R1-Situation, d.h. einer unvollständigen Tumorentfernung, ist eine Nachresektion zu empfehlen. Bei Vorliegen solitärer Hirn- oder Nebennierenmetastasen wird deren Resektion empfohlen, sofern es sich um einen operablen Primärtumor und einen Patienten in gutem Allgemeinzustand handelt.^{20,21} Bei diesen Patienten mit einem Karzinom im Stadium IV bleibt eine chirurgische Therapie eine Einzelfallentscheidung.

1.2.2 Radiatio

Auch die Empfehlungen zur Strahlentherapie beim Lungenkarzinom sind Stadien abhängig. So werden auf Grund von Komorbiditäten oder aus sonstigen Gründe inoperable Patienten alternativ zur sonst angestrebten Operation (bis einschließlich Stadium IIIA) mit einer fraktionierten Bestrahlung von >60 Gy z.B. nach dem CHART-Schema (hyperfraktionierte, akzelerierte Radiotherapie) therapiert.²²

Darüberhinaus kommt die Radiatio bei Patienten in höheren Tumorstadien, Stadium IIIB oder Stadium IV, entweder als alleinige Therapieoption oder in Kombination mit einer Chemotherapie zur Anwendung.

Eine neoadjuvante Bestrahlung wird in den aktuellen Therapieleitlinien mit Ausnahme zur Behandlung eines Pancoast-Tumors nicht empfohlen.^{23,24}

1.2.3 Chemotherapie

Die Chemotherapie ist ein weiterer wichtiger Baustein in der Therapie des Lungenkarzinoms. Während die Operation vornehmlich bei Patienten mit niedrigeren Stadien Anwendung findet, wird die Chemotherapie heutzutage vor allem in höheren Tumorstadien bzw. postoperativ als adjuvante Therapie angewendet. Hierbei kommen verschiedene Therapieschemata zur Anwendung.

Als Grundmedikament werden häufig Platin-haltige Chemotherapeutika eingesetzt, diese können ggf. mit einem weiteren Chemotherapeutikum wie Pemetrexed oder auch mit Antikörpern wie Bevacizumab kombiniert werden.

1.2.4 Immuntherapie

Ein weiterer Meilenstein in der Behandlung des Lungenkarzinoms zeichnet sich aktuell im Bereich der Immuntherapie ab.

So konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, mittels programmiertem Zelltod, T-Zellen in ihrer Umgebung inhibieren und so das Immunsystem im Bereich des Tumors hemmen können. Diesen Effekt erreicht die Tumorzelle über den PD-L1 und PD-L2 (PD- Programmed Death) Liganden der T-Zellen.

Neuartige Checkpoint-Inhibitoren inhibieren diesen Mechanismus und ermöglichen so dem körpereigenen Immunsystem effektiver gegen den Tumor vorzugehen.

So zeigte eine aktuelle Vergleichsstudie zwischen dem neuen PD-L1 Checkpoint Inhibitor Nivolumab und der klassischen Platin-basierten Chemotherapie bei Patienten mit metastasiertem NSCLC einen signifikanten Überlebensvorteil von 3,2 Monaten bei Plattenepithelkarzinomen (HR: 0,59; KI: 0,44-0,79; p: .00025) und bei Nicht-Plattenepithelkarzinomen von 2,8 Monaten (HR: 0,73; KI: 0,59-0,89; p: .0015).^{25,26}

Diese und weitere Substanzen wie Pembrolizumab sind aktuell in der Erforschung und teilweise für einzelne Subgruppen bereits zur Therapie zugelassen.²⁷

1.3 Therapie des Kleinzelligen-Bronchialkarzinoms (SCLC)

Die Therapieoptionen beim kleinzelligen Bronchialkarzinom sind denen beim Nicht-Kleinzelligen Karzinom sehr ähnlich. Der Hauptunterschied besteht in der Tatsache, dass bei ca. 70% der Patienten kleinzellige Bronchialkarzinome erst im Extensive-Disease-Stadium diagnostiziert werden und daher auf Grund der Inoperabilität palliativ mittels Polychemotherapie und Radiatio behandelt werden. Bei Patienten im Limited-Disease Stadium besteht die Möglichkeit der kurativen operativen Tumorthherapie mit anschließender adjuvanter Polychemotherapie bzw. Radiatio.

1.4 Genetische Alterationen von Lungentumoren

1.4.1 Epigenetik

Die Epigenetik bezeichnet verschiedene DNA-Modifikationen, welche Einfluss auf die Genexpression haben, ohne die DNA-Sequenz selbst zu verändern.²⁸ Diese führen zu einer Beeinflussung des Phänotyps, nicht jedoch des Genotyps.²⁹ Zu diesen Modifikationen zählen die DNA-Methylierung, Histonveränderungen und eine epigenetisch-basierte Modifikation der Expression kleiner nichtcodierender Mikro-RNA. Diese DNA-Modifikationen entstehen während der Zelldifferenzierung und können über mehrere Zellzyklen bestehen bleiben. Ebenso führt das Altern der Zelle und die Tumorgenese zu epigenetischen Veränderungen. Auf diese Weise ermöglichen diese Modifikationen den Zellen trotz des gleichen Erbgutes unterschiedlichen Eigenschaften zu entwickeln.³⁰

1.4.2 Punktmutationen

Bei der Punktmutation kommt es zu Veränderungen eines einzelnen Nukleotids. Diese Veränderungen können sich entweder durch den Ersatz einer Base durch eine andere (Substitution) oder durch das Hinzufügen (Insertion) bzw. Entfernen (Deletion) einer Base äußern.

Wird eine Base durch eine andere ersetzt, bleibt das ursprüngliche Leseraster zwar erhalten, aber die codierende Sequenz wird verändert.

Ein Beispiel, bei dem Punktmutationen zur Tumorgenese beitragen, ist die Veränderung der ras-Gene. Hierbei kommt es durch Punktmutationen an den Codons 12, 13 und 61 zu einem veränderten ras-Protein, das die Fähigkeit zur Inaktivierung verloren hat und so autonom das Zellwachstum und ihre Differenzierung fördert.³¹

Bei der Substitution werden vier verschiedene Arten unterschieden:

Erstens die sog. Nonsense-Mutation, bei der das neu entstandene Triplet als Stopp-Codon fungiert oder in ein Stopp-Codon umgewandelt wird.

Zweitens die sog. Read-Through-Mutation, bei der aus einem ursprünglichen Stopp-Codon eine kodierende Sequenz entsteht.

Als dritte Möglichkeit kann es zu einer Missense-Mutation kommen, wodurch eine andere Aminosäure codiert wird und so ein fehlerhaftes Protein entsteht.

Als vierte und letzte Möglichkeit kann es zu einer sog. silenten, also stummen Mutation kommen, bei der die ersetzte Base für die gleiche Aminosäure codiert und es dadurch zu keiner Veränderung kommt.

Bei der Insertion bzw. der Deletion kommt es durch das Hinzufügen/Löschen einer einzelnen Base zu einer Verschiebung des nachfolgenden Leserasters, dem sog. Frameshift. Dies führt dazu, dass sämtliche im DNA-Strang folgenden Basentriplets in dem betroffenen Gen verändert werden. Durch Insertionen bzw. Deletionen kommt es somit meist zu einem vollständigen Funktionsverlust des zu codierenden Proteins.

1.4.3 Numerische Chromosomenaberrationen

Zu den wichtigsten numerischen Chromosomenaberrationen oder auch Genommutationen beim Menschen werden die Polyploidie und die Aneuploidie gezählt.

Polyploidie beschreibt einen Zustand, bei dem der gesamte Chromosomensatz nicht wie normal diploid sondern triploid oder noch häufiger vorkommt. Meist beruht diese Veränderung auf einer fehlenden Ausbildung des Spindelapparats während der Zellteilung. Beim Menschen ist die Polyploidie in der Regel letal.

Ausgelöst durch non-disjunction während der Meiose kommt es bei der Aneuploidie zu einer Vermehrung bzw. Verminderung einzelner Chromosomen, es entstehen Monosomien oder Trisomien. Bekanntestes Beispiel hierfür ist die Trisomie 21.

1.4.4 DNA-Methylierung

Die Methylierung von DNA wurde in den 1960er Jahren ursprünglich in prokaryontischen Zellen entdeckt und 1977 von Razin und Cedar als 5-Methylcytosin in eukaryontischen Zellen nachgewiesen.³²

Seitdem ist die DNA-Methylierung eine der am besten erforschten epigenetischen Veränderungen. Im Rahmen dieser Forschung zeigte sich, dass die DNA-Methylierung vor allem eine wichtige Rolle in der zellulären Differenzierung, der X-Chromosom Inaktivierung und der DNA-Reparatur spielt.³³⁻³⁵

Enzyme aus der Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT) methylieren Cytosinbasen durch Übertragung einer Methylgruppe von einem S-Adenosylmethionin an die C5-Stelle des Cytosins zu Methylcytosin.³⁶ Es werden jedoch fast ausschließlich Cytosine methyliert, die innerhalb eines Cytosin-Guanosin-Komplexes (5'-CpG-3') vorliegen.^{36,37}

CpG-Dinukleotide finden sich vermehrt in bestimmten Regionen des DNA-Stranges, z.B. in Promotorregionen. Diese Ansammlungen von CpG-Dinukleotiden werden dann als sogenannte CpG-Inseln bezeichnet. In einer gesunden Zelle sind diese CpG-Inseln in der Regel unmethyliert und ermöglichen so die Transkription beispielsweise der Housekeeping Gene.³⁸

Kommt es jedoch zu einer Hypermethylierung dieser CpG-Inseln, können Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden und es kommt zusätzlich zu einer Anlagerung sog. Methylierter-CpG-Binding Proteine, welche ihrerseits zu einer Veränderung der Histone führen. Letztlich kommt es dadurch zu einer Unterdrückung der Genexpression.

Es konnte nachgewiesen werden, dass es durch Hypermethylierung in nahezu allen Tumortypen zum Abschalten diverser Gene kommt. Beispiele hierfür sind DNA-Reparaturgene, Zellzyklus-regulierende Gene, sowie diverse Gene, die einen Einfluss auf die Signalwege, die Transkription und die Apoptose der Zelle haben.³⁹

Ein Beispiel für ein solches Gen, ist das in dieser Studie untersuchte SHOX2 Gen:

Das Short Stature Homeobox-Gen 2 (SHOX2) gehört zur Familie der Homöobox-Gene und ist auf dem langen Arm von Chromosom 3 lokalisiert (3q25.32).⁴⁰

Der Namen der SHOX Familie rührt daher, dass Mutationen innerhalb der SHOX Gene zu verschiedenen Krankheiten führen können, bei denen Wachstumsretardierungen eine wesentliche Rolle spielen, wie z.B. beim Turner-Syndrom.⁴¹ Das SHOX2-Gen spielt im Speziellen in der Entwicklung von Skelett und Herz eine Rolle.⁴²⁻⁴⁴

In den letzten Jahren sind von verschiedenen Arbeitsgruppen Veränderungen in der Methylierung im SHOX2-Gen bei mehreren Tumore wie z.B. dem hepatozellulärem- und Mammakarzinom nachgewiesen worden.^{45,46} Insbesondere konnte methylierte SHOX2 (mSHOX2) DNA bei Patienten mit Lungenkarzinomen nachgewiesen werden und hier besonders bei Plattenepithelkarzinomen.⁴⁷

Bei genaueren Untersuchungen stellte sich heraus, dass sich mSHOX2 als Biomarker für die Diagnose von Lungenkarzinomen eignen könnte.^{48,49} So konnten Schmidt et al. 2010 zeigen, dass Lungenkarzinome über den quantitativen Nachweis von mSHOX2 in der Bronchiallavage mit einer Sensitivität von 68% und einer Spezifität von 95% detektiert werden können.⁴⁸ In einer Folgestudie von Kneip et al. 2011, in der der Nachweis von mSHOX2 im Blutplasma untersucht wurde, zeigte der Test eine Sensitivität von 60% und eine Spezifität von 90% bei der Identifizierung von Lungenkarzinomen.⁴⁹ In weiteren Studien wurde untersucht, welchen Benefit die Kombination einer Messung von mSHOX2 mit Standardmethoden der Tumordiagnostik bietet. So zeigte sich z.B. durch die zusätzliche Messung von mSHOX2 eine Verbesserung der Genauigkeit und Verlässlichkeit der Untersuchung mittels EBUS gewonnener Lymphknotenbiopsien. Ebenso konnte hierdurch die Qualität der zytologischen Untersuchung von Bronchiallavage gesteigert werden.^{50,51}

1.5 Freie zirkulierende Nucleinsäuren (CNA)

Circulating Nucleic Acids (CNA) also freie (= extrazelluläre) zirkulierende Nucleinsäuren beschreiben DNA, RNA oder Mikro-RNA, welche frei im Plasma/Serum zirkulieren. Entdeckt wurden die CNAs 1948 von Mandel und Métails, die nachwiesen, dass CNAs sowohl bei gesunden als auch bei kranken Menschen vorkommen.⁵²

Zirkulierende Nucleinsäuren gerieten nach ihrer frühen Entdeckung zunächst schnell in Vergessenheit, und wurden erst in den 1960er Jahren im Zusammenhang mit Forschungen zu Lupus Erythematoses wieder neu entdeckt.⁵³

1989 zeigte eine Arbeitsgruppe um Stroun et al., dass Veränderungen in den CNAs bei vielen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden können.⁵⁴ Die Herkunft der zirkulierenden DNA aus den Tumorzellen konnte schließlich mit dem Nachweis von Tumor-assoziierten Veränderungen des N-ras Genes bei Patienten mit AML oder Myelodysplastischem Syndrom durch Vasioukhin et al. bewiesen werden.⁵⁵

Mit der Möglichkeit des Nachweises von Tumor-assoziierten Alterationen im Plasma/Serum rückten CNAs 1996 durch die Arbeiten von Chen et al. sowie Nawroz et al. zur Detektion und Charakterisierung von Tumoren ins Interesse der Forschung.^{56,57}

Heute kennt man diverse Tumor-assoziierte Veränderungen der CNAs wie z.B. Mutationen im Bereich von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Kras, p53).⁵⁸⁻⁶⁰

Darüberhinaus konnten CNAs bei vielen Karzinomen wie Mamma-, Lungen- und Kolonkarzinom im Plasma/Serum nachgewiesen werden.⁶¹⁻⁶³

Diese Untersuchungen von CNAs werden heutzutage zusammen mit den zirkulierenden Tumorzellen unter dem Begriff der „Liquid Biopsy“ zusammengefasst. Diese neue Entwicklung ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung und soll in Zukunft eine genauere Diagnostik und ein besseres Monitoring von Tumoren ermöglichen.^{64,65}

In den letzten Jahren konnte auch gezeigt werden, dass im Plasma/Serum freie Virus DNA zirkuliert und deren Menge mit Remission und Rezidiven korreliert. Beispiele hierfür sind der quantitative Nachweis der Epstein-Barr-Virus DNA (EBV-DNA) beim Larynx-/Pharynxkarzinom und des Humanen-Papilloma-Virus (HPV-DNA) beim Zervixkarzinom.^{66,67}

2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Methylierungsmarker mSHOX2 im Hinblick auf seine Eignung als Tumor- bzw. Verlaufsmarker bei Patienten mit einem Lungenkarzinom im frühen Stadium genauer zu untersuchen. Dies geschah mit besonderem Augenmerk auf die Veränderung der Werte nach operativer Tumorthherapie. Weiter sollte geklärt werden, ob sich mSHOX2 in verschiedenen Probenarten nachweisen lässt und inwieweit die erhaltenen Werte zwischen den einzelnen Probenarten korrelieren.

Diese Untersuchung ist von besonderem Interesse, da der Marker mSHOX2 bereits in einer Pilotstudie seine Qualität als Verlaufparameter im Therapiemonitoring bei Radiochemotherapie des fortgeschrittenen Lungenkarzinoms bewiesen hat.⁶⁸

Prospektiv soll diese Untersuchung ihren Beitrag zur Erweiterung der Früherkennungsmethoden und Verlaufsbeurteilung des Lungenkarzinoms leisten, vor dem Hintergrund, dass trotz intensiver Forschung diesbezüglich bisher noch kein signifikanter Fortschritt gelungen ist.

Um dies zu erreichen wurden über einen Zeitraum von 2 Jahren bei 28 Patienten Daten erhoben mit dem Ziel folgende Fragen zu beantworten:

- 1.) Wie verhält sich der Methylierungsmarker mSHOX2 prä-/postoperativ?
- 2.) Wie verhält sich die Menge an mSHOX2 in den unterschiedlichen Probenarten (Blut/Lavage/Gewebe) eines Patienten?
- 3.) Eignet sich mSHOX2 als möglicher Tumor-/Rezidivmarker bei Patienten mit einem Lungenkarzinom?

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

In die Untersuchungen wurden 28 Patienten mit einem nachgewiesenen Lungenkarzinom im Tumorstadium I-III^A⁶⁹ einbezogen, die sich zur Therapie im Krankenhaus Maria-Martha in Halle-Dörlau (Chefarzt: Prof. Dr. W. Schütte) vorstellten. Die Volljährigkeit wurde überprüft und eine schriftliche Einwilligungserklärung eingeholt.

Die Aufklärung der Patienten und die Vorstellung der Studie wurden bei stationärer Aufnahme durch den behandelnden Arzt durchgeführt.

Das Studienprotokoll wurde der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt, es bestanden keine Einwände gegen die Durchführung des Projektes (Votum-Nummer: 2012-72 vom 20.08.2012).

3.2 Probengewinnung

3.2.1 Blutproben

Im Rahmen der standardmäßig durchgeführten Blutentnahmen vor der Tumorresektion wurden zusätzlich jeweils 2 x 10 mL EDTA Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Weitere Blutentnahmen fanden vor Entlassung und bei den follow-up Untersuchung statt, die postoperativ in der Regel alle 6 Monate durchgeführt werden sollen.

Die Proben wurden am Tag der Abnahme aufgearbeitet. Dazu wurden die Abnahmeröhrchen für 10 min bei 4°C und 350 xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Plasmaüberstand vorsichtig abgenommen und in einem neuen Probenröhrchen erneut bei 2900 xg für weitere 15 min zentrifugiert. Die zellfreien Plasmen wurden in Aliquots von ca. 3 mL aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2 Bronchiallavage

Im Rahmen der diagnostischen Abklärung wurde bei Aufnahme der Patienten in der Regel eine Bronchoskopie durchgeführt. Von der gewonnenen Bronchiallavage wurde uns ein Aliquot für die molekularen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Bronchiallavage wurde für 15 min bei 2900 xg zentrifugiert und der Überstand durch Zusatz von Saccomanno Reagenz fixiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Das gewonnene Zellpellet wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Tumorgewebe

Von denen im Rahmen der Operation gewonnenen Tumorgewebeproben wurden, sofern genügend Material für weitergehende klinische Fragen vorhanden war, durch den bearbeitenden Pathologen 1-3 Schnitte (abhängig von deren Zellularität) zu je 10 µm angefertigt. In diesen wurde dann zur Erhöhung der Tumorzellzahl in der untersuchten Probe mikroskopisch die vorhandenen Tumorareale markiert, anschließend makroskopisch ausgeschnitten und in 2 mL Reaktionsgefäßen gelagert. Alle Proben wurden nach Entnahme durch die behandelnden Ärzte im Krankenhaus Martha-Maria durch fortlaufende Nummern pseudonymisiert, sodass die Zuordnung von Proben mit Patientendaten nur den behandelnden Ärzten möglich ist.

3.3 DNA Isolation

Sämtliche gewonnenen Untersuchungsproben wurden nach den unten erläuterten Verfahren aufgearbeitet. Hierzu zählen die DNA-Extraktion aus den unterschiedlichen Ausgangsmaterialien, die Bisulfitumwandlung und das abschließende Messen des Methylierungsgrades mittels Real-Time PCR.

Der Zwischenschritt der Bisulfitbehandlung ist notwendig, da sich Methylcytosin und unmethyliertes Cytosin auf Grund gleicher Basenpaarungseigenschaften, bei Verfahren, die auf Hybridisierung basieren, nicht voneinander unterscheiden.

Im Rahmen der Bisulfitkonversion der DNA werden unmethylierte Cytosine zu Uracil desaminiert, während Methyl- und Hydroxymethylcytosin unverändert bleiben.

Auf diese Weise werden die durch das spezifische Methylierungsmuster vermittelten epigenetischen Informationen in eine DNA-Sequenzinformation umgewandelt und so durch Standardmethoden wie eine PCR messbar gemacht.

3.3.1 DNA Isolation aus Blutplasma

Die eingefrorenen Plasmaproben wurden bei 37°C für 45 min im Brutschrank aufgetaut und anschließend mit 3,5 mL des Silane Lysis/Binding Puffers versetzt (Life Technologies, viral NA). Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Plasmaproben mit einem kleineren Volumen wurden vor Zugabe des Lyse/Bindungspuffers mit destilliertem Wasser auf 3,5 mL aufgefüllt.

Zu der lysierten (s.o.) Lösung wurden anschließend 75 µl frisch resuspendierte Dynabeads® Silane (Life Technologies, Art-Nr. 37005D) sowie 2,5 mL absoluter Ethanol zugegeben und für 45 min bei 20 rpm bei Raumtemperatur auf einem Rotator (Winkel ca. 45°) gemischt.

Das Zentrifugationsröhrchen wurde für 5 min in den DynaMag™-15 Magneten (Life Technologies, Art-Nr. 123-01D) gestellt und der Überstand vorsichtig mit einer 15,5 cm Transferpipette abpipettiert und verworfen. Darauf folgte eine Waschung der Partikel mit 1,5 mL Waschpuffer 1 (50% (v/v) Silane Lysis/Binding Puffer, 50% (v/v) Ethanol. Die Lösung mit den resuspendierten Magnetpartikeln wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Unter Benutzung des DynaMag™-2 Magneten (Life Technologies, Art-Nr. 123-21D) und einer 1 mL Pipette wurde möglichst viel vom Überstand abpipettiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurde dieser Schritt wiederholt. Zur Elution der DNA wurden 100 µL Elutionspuffer (1% (v/v) 1 M Tris, pH 8,0, 99% (v/v) dest. Wasser) hinzugegeben und die Suspension bei 85°C und 1000 rpm für 10 min im Thermomixer inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde nun der gesamte Überstand mit der darin enthaltenen DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Reaktionsgefäß mit den Magnetpartikeln verworfen. Die extrahierte DNA ist max. 24 h bei 8°C im Kühlschrank lagerbar.

3.3.2 DNA Isolation aus Bronchiallavagezellen

Die Bronchiallavageproben wurden mit dem InnuCONVERT Bisulfit Conversion All in One-Kit der Firma Analytik Jena AG entsprechend mitgeliefertem Protokoll aufgearbeitet.

Um die Lavageproben für die weitere Untersuchung vorzubereiten, mussten die Proben aufgereinigt werden. Hierzu wurden zur Reduzierung der vorhandenen Muzine 10 mL Bronchiallavage in einem 15 mL Falconröhrchen abgefüllt und mit 50 µL DTT (Dithiothreitol) mittels Vortexen vermischt.

Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lavage bei 3500 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen.

Das gewonnene Zellpellet wurde in 5 mL PBS gelöst und erneut bei 3500 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit 1 mL PBS wiederholt und das gewonnene Pellet anschließend mit 190 µL Lysepuffer und 15µL Proteinase K vermischt. Schließlich wurde die Lösung bei 60° C und 800 rpm für 3 Stunden im Thermomixer inkubiert.

3.3.3 DNA Isolation aus Tumorgewebe

Die Tumorgewebsproben wurden mit dem InnuCONVERT Bisulfit Conversion All in One-Kit der Firma Analytik Jena AG entsprechend beiliegendem Protokoll aufgearbeitet.

Die in 2 mL Reaktionsgefäßen gelagerten Schnitte wurden bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min herunterzentrifugiert und mit 190 µL Lysepuffer und 15 µL Proteinase K vermischt. Die Proben wurden anschließend bei 60° C und 800 rpm für 3 Stunden im Thermomixer inkubiert.

Anschließend erfolgte die u.g. Bisulfitbehandlung.

3.4 Bisulfitbehandlung

3.4.1 Bisulfitbehandlung und Aufreinigung der Blutplasmaproben

Für die notwendige Bisulfitumwandlung wurden zu der DNA im 2 mL Reaktionsgefäß 150 µL Bisulfitreagenz und 25 µL Denaturierungspuffer hinzugegeben. Nach gutem Mischen und kurzer Zentrifugation zur Vermeidung von Tröpfchenbildung am Deckel wurde das Reaktionsgemisch für 45 min bei 85°C im Wasserbad inkubiert. Bei diesem Schritt ist die genaue Zeit- und Temperatureinhaltung wichtig. Im Anschluss erfolgte die sofortige Aufreinigung der Proben.

Hierzu wurden in das Reaktionsgefäß 1000 µL Waschpuffer 1 (50% (v/v) Silane Lysis/Binding Puffer, 50% (v/v) Ethanol, und 15 µL frisch resuspendierte Dynabeads® Silane hinzugegeben und bei 23° C und 1000 rpm für 45 min im Thermomixer gemischt.

Unter Zuhilfenahme eines DynaMag™-2 Magneten und einer 1 mL Pipette wurde der Überstand entfernt und die Magnetpartikel anschließend erneut mit 800 µL Waschpuffer (50% (v/v) Silane Lysis/Binding Puffer, 50% (v/v) Ethanol) gewaschen.

Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der DNA mit jeweils 800 µL, 900 µL und 1000 µL Waschpuffer 2 (15% (v/v), 85% (v/v) Ethanol) und jeweils Entfernen des Überstandes mittels DynaMag™-2 Magneten und 100-1000 µL Pipette. Dabei war darauf zu achten, keine Magnetpartikel zu verwerfen.

Nach kurzer Zentrifugation wurde der restliche Überstand mit dem DynaMag™-2 Magneten und einer 2,5-10 µL Pipette entfernt und die Magnetpartikel im offenen Reaktionsgefäß für 10 min bei 60°C im Thermomixer ohne Schütteln getrocknet.

Zur Elution der DNA wurden 68 µL Elutionspuffer (1% (v/v) 1M Tris, pH 8,0, 99% (v/v) dest. Wasser) hinzugegeben und nach gründlichem Mischen bei 85°C und 1000 rpm für 10 min inkubiert. Abschließend wurde der Überstand mit der enthaltenen gereinigten DNA mit Hilfe des DynaMag™-2 Magneten und einer Pipette in neues Reaktionsgefäß transferiert und war nach diesem Schritt bereit für die PCR-Messung.

3.4.2 Bisulfitbehandlung und Aufreinigung der Bronchiallavage- und Gewebeproben

Die Bisulfitbehandlung der Lavage- und Tumorgewebeproben erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

Hierzu wurde ein Reaktionsansatz aus 50 µL der oben beschriebenen extrahierten DNA 70 µL Konversionsreagenz und 30 µL Konversionspuffer hergestellt. Dieser Ansatz wurde dann bei 85°C für 45 min inkubiert.

In diesem Schritt war darauf zu achten, dass eventuelle Tröpfchen am Deckel des Reaktionsgefäßes vor Beginn der Inkubation herunterzentrifugiert wurden. Für die Inkubation war die Einhaltung der Zeit und der genauen Temperatur essentiell.

Es folgte die zeitnahe Desulfonierung und Aufreinigung.

Hierzu wurde die konvertierte DNA in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µL Bindepuffer vermischt. Anschließend wurde das Gemisch auf die in einem Receiver Tube platzierte Spinnsäule geladen (im Kit enthalten) und für 3 min bei 14000 xg zentrifugiert. Nach Wechseln des Receiver Tubes wurden 200 µl Waschlösung auf die Spinnsäule gegeben und erneut für 1min bei 14000 xg zentrifugiert.

Für die Desulfonierung wurden 700 µL Desulfonation Buffer auf die Spinnsäule gegeben, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend für 1min bei 14000 xg zentrifugiert. Nach erneutem Wechsel des Receiver Tubes wurde die DNA zweimalig mit je 400 µL Washing Solution und Zentrifugation für je 1min bei 14000 xg gewaschen. Um eventuellen Restalkohol im Filter zu entfernen wurde das Reaktionsgefäß vor der Elution nochmals für 3 min bei 14000 xg zentrifugiert.

Sodann wurde die Spinnsäule in ein Elution Tube platziert, wobei das Übertragen von Waschpufferesten unbedingt zu vermeiden war. Die Säulen wurden für 10 min bei 60°C im Thermomixer getrocknet.

Zur Elution der DNA wurde 50 µL Elution Buffer auf die Mitte der Membran gegeben, 1 min inkubiert und abschließend bei 8000 xg für 1 min zentrifugiert. Dieser letzte Schritt kann zur Erhöhung der Gesamtausbeute ggf. mit 50 µL Elution Buffer wiederholt werden. Die gewonnen DNA war nun bereit für die PCR-Untersuchung.

3.5 PCR-Untersuchung

Für die PCR-Untersuchung wurde ein Methylierungs-spezifischer Heavy-Methyl Assay für die quantitative Bestimmung von methyliertem SHOX2 in einem Duplexformat verwendet. Dabei werden die Menge an mSHOX2 und beta-Actin DNA (letzteres als Referenzgen) parallel gemessen. Verwendet wurde hierzu das Protokoll nach Dietrich et al.⁷⁰

Jeweils 10 µL der vorbereiteten DNA-Proben sowie 10 µL des Mastermixes bestehend aus jeweils 6 mM MgCl₂, 35 mM Tris (aus 1 M Tris pH 8,4), 50 mM KCl, 5% Glycerol, 0,006 µl ROX wurden in einem Reaktionsgefäß vermischt.

Dieser Mischung wurden 0,5 µL dNTP/dUTP-Mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 20 mM dUTP) der Firma Bioline (Best-Nr.: BIO-39041; Bioline USA Inc, Taunton, MA, USA), 0,4 µl FastStart™ Taq Polymerase der Firma Roche (Best-Nr.: 4738420001; Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) und 1,6 µL gereinigtes Wasser der Firma Sigma-Aldrich (Best-Nr.: W4502-6X1L; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) zugegeben. Jede Probe wurde in vier Replikaten gemessen, um eine hohe Validität der Messung zu gewährleisten. Von der Kontroll-DNA (= Kalibrator) und Negativkontrollen (Wasser oder NTC _ no template control) wurden jeweils Triplikate gemessen.

Die Kalibratorprobe wurde ebenfalls nach dem Protokoll von Dietrich et al. hergestellt: Hierzu wurde 80 µL methylierte DNA (100 ng/mL, CpGenome Universal Methylated DNA, Millipore, Billerica, MA) mit 80 µL Bisulfit- [65% ammonium bisulfite, pH 5.3 (TIB Chemicals, Mannheim, Germany)] und 40 µl Denaturierungsreagenz [0.07 g/mL Trolox (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in THFA (VWR International, Darmstadt, Germany)] vermischt und anschließend für 45min bei 85°C und 1000rpm im Thermomixer inkubiert.⁷¹

Durchgeführt wurden die Messungen an einem Applied Biosystem™ 7500 Real-Time PCR System der Firma Life Technologies (Life Technologies™, Foster City, CA, USA), mit folgendem Temperaturprofil:

Nach initialer Denaturierung bei 95°C für 20 min folgten 50 Zyklen mit jeweils 2 sec bei 62°C, 45 sec bei 56°C und 15 sec bei 95°C. Für die quantitative Bestimmung des methylierten SHOX2 verwendeten wir die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode.⁷²

Hierzu wurde ermittelt wie viele PCR-Zyklen benötigt werden, um ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal des methylierungsspezifischen Assays über dem Hintergrundsignal zu erhalten.

Der Punkt, an dem erstmals ein Signal über dem Hintergrundsignal detektiert wird, wird als Cycle-Threshold (Ct) bezeichnet und gilt als Maß für die Anzahl der Zielmoleküle zu Beginn der Reaktion. Anschließend wird eine Differenz (Δ Ct) aus den CT-Werten der methylierungsspezifischen SHOX2-PCR und der methylierungsunspezifischen Referenz-PCR, hier Beta-Actin, aus dem Duplex-Assay der gleichen Probe berechnet. Die erhaltene Zahl stellt einen quantitativen Wert der Methylierung des SHOX2 Genlocus dar. Abschließend erfolgte die Kalibrierung.

Die aus dieser Kalibrator-DNA gewonnenen Δ Ct-Werte wurden zur Kalibrierung der Δ Ct-Werte der Patientenproben verwendet. Als Ergebnis erhält man den kalibrierten $\Delta\Delta$ Ct-Wert der Patientenprobe, der auch als PMR-Wert (=percent methylation ratio) bezeichnet wird und ein Maß für die relative Menge an mSHOX2-Gen im Vergleich zum Referenzgen Beta-Actin darstellt.

3.7 Bestimmung der Vaskularisierung im Tumorgewebe

Für den Nachweis eines möglichen Zusammenhangs zwischen einer erhöhten Tumovaskularisierung und hohen PMR-Werten im Blutplasma wurde der Grad der Vaskularisierung für jeden Tumor durch einen erfahrenen Pathologen bestimmt.

Hierfür wurden die Tumorschnitte mit einem Monoklonalen Maus Anti-Human CD31 Antikörper (Dako, High Wycombe, UK) inkubiert, der Endothelzellen markiert und damit Untersuchungen zur Gefäßversorgung in normalem und Tumorgewebe ermöglicht. Dabei wurde die Zahl der Gefäße in je 10 high power field Gesichtsfeldern gezählt.⁷³

3.8 Statistische Berechnungen

Die Statistischen Berechnungen wurden mit SPSS 21 der Firma IBM (Armonk, NY) durchgeführt. Als Signifikanzniveau für die Berechnung der Korrelationen wurde ein Standardfehler von 0,05 angesetzt.

Für die Untersuchung der Korrelation unter den verschiedenen Probenarten wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho errechnet. Bei der weiteren genaueren Analyse hinsichtlich der einzelnen Histologie-Subtypen, sowie der Tumorstadien wurden die nicht-parametrischen Tests nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney verwendet. Des Weiteren erfolgte eine deskriptive Statistik der erhobenen Patientendaten, der untersuchten Tumore sowie der gemessenen PMR-Werte.

4 Ergebnisse

4.1 Demographische und klinische Daten

Die 28 Patienten, die nach den oben genannten Kriterien in die Studie eingeschlossen wurden (s. 3.1), wiesen folgende Charakteristika auf

4.1.1 Geschlechtsverteilung

Die Geschlechterverteilung zeigte mit 78,6% eine deutliche Mehrheit der männlichen Probanden im Vergleich zu den weiblichen Probanden mit 21,4% (s. Tab. 3).

Tab. 3 - Geschlechtsverteilung

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Männlich	22	78,6	78,6	78,6
Weiblich	6	21,4	21,4	100,0
Gesamt	28	100,0	100,0	

4.1.2 Alter

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 72 Jahre. Dabei war der jüngste Patient 53 Jahre und der älteste Patient 84 Jahre alt.

Die Altersverteilung zeigt, dass 2/3 der eingeschlossenen Patienten zwischen 65 und 79 Jahre alt waren (s. Tab. 4+5).

Tab. 4 - Altersstatistik

N	Gültig	28
	Fehlend	0
Mittelwert		72,32
Standardabweichung		7,124
Minimum		53
Maximum		84
Perzentile	20	66,60
	40	72,60
	60	76,00
	80	78,00

Tab. 5 - Altersverteilung

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
53	1	3,6	3,6	3,6
59	1	3,6	3,6	7,1
60	1	3,6	3,6	10,7
63	1	3,6	3,6	14,3
65	1	3,6	3,6	17,9
67	1	3,6	3,6	21,4
68	1	3,6	3,6	25,0
70	2	7,1	7,1	32,1
71	1	3,6	3,6	35,7
72	1	3,6	3,6	39,3
Gültig 73	1	3,6	3,6	42,9
74	2	7,1	7,1	50,0
75	2	7,1	7,1	57,1
76	4	14,3	14,3	71,4
77	2	7,1	7,1	78,6
78	2	7,1	7,1	85,7
79	2	7,1	7,1	92,9
80	1	3,6	3,6	96,4
84	1	3,6	3,6	100,0
Gesamt	28	100,0	100,0	

4.1.3 Raucherstatus

Bei 71,4% der Patienten konnte im Rahmen der Anamnese ein Tabakkonsum erhoben werden. Insgesamt gaben 39,3% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung an Ex-Raucher zu sein, während 32,1% der Patienten nach eigenen Angaben nie geraucht haben (s. Tab. 6).

Tab. 6 - Raucherstatus

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Nicht Raucher	8	28,6	28,6	28,6
Ex-Raucher	11	39,3	39,3	67,9
Raucher	9	32,1	32,1	100,0
Gesamt	28	100,0	100,0	

4.2 Tumore

4.2.1 Tumorhistologie

Die histologische Untersuchung zeigte, dass alle Patienten an einem Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) erkrankt waren. Dabei handelte es sich bei 53,6% der untersuchten Karzinome um Plattenepithelkarzinome, 32,1% der Patienten hatten ein Adenokarzinom. Bei 3 Patienten wurden die Karzinome als undifferenzierte- und bei einem Patienten als ein adenosquamöses Bronchialkarzinom klassifiziert (s. Abb. 1/ Tab. 7).

Hinsichtlich des Einflusses der Tumorhistologie auf die Höhe der gemessenen PMR-Werte in den unterschiedlichen Probenarten konnte keine statistische Korrelation nach Kruskal-Wallis nachgewiesen werden.

Tab. 7 - Tumorhistologie

	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
Adenokarzinom	9	32,1	32,1
Plattenepithelkarzinom	15	53,6	85,7
Adenosquamöses Karzinom	1	3,6	89,3
Undifferenziertes Karzinom	3	10,7	100,0
Gesamt	28	100,0	

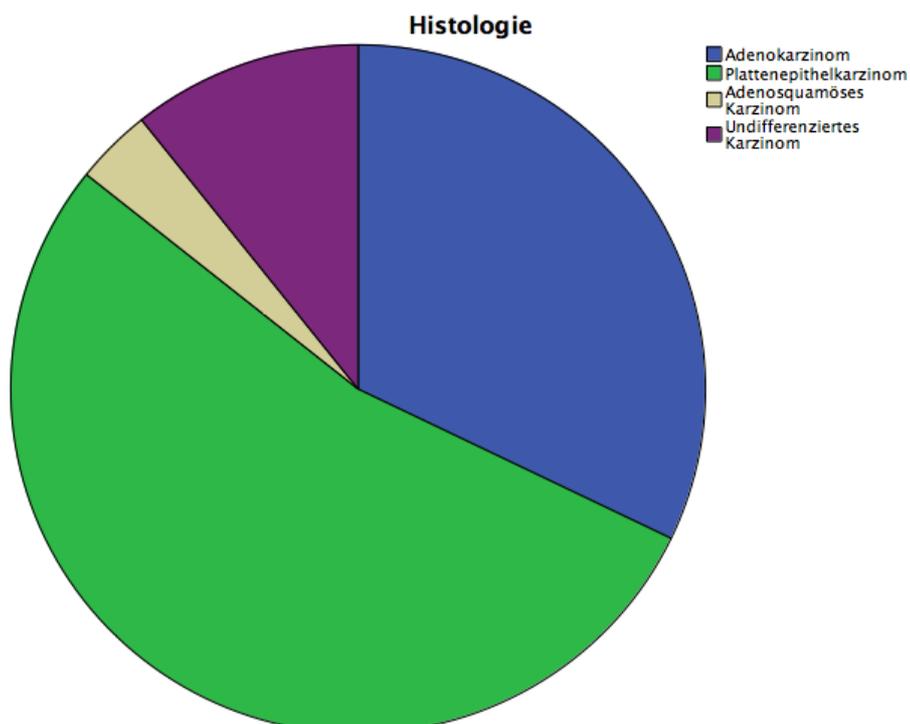


Abb. 1 - Verteilung Tumorhistologie

4.2.2 Tumorgröße

Etwa die Hälfte der untersuchten Tumore war zum Diagnosezeitpunkt kleiner als 3 cm und wurde daher als pT1 klassifiziert. Bei diesen insgesamt 13 Patienten mit pT1-Tumoren wurden in 7 Fällen Tumore der Größe pT1a und in 6 Fällen Tumore der Größe pT1b festgestellt. Die mit insgesamt 8 Patienten (28,6%) größte Einzelgruppe wies Tumore der Größe pT2a auf.

Bei drei Patienten wurden Tumore >7 cm nachgewiesen und diese daher einem pT3 Stadium zugeordnet. Bei weiteren 4 Patienten wurden Tumore der Klasse pT4 diagnostiziert (s. Tab. 9).

Es zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen Tumorgröße (T-Stadium TNM) und den PMR-Werten in Lavage und Blutplasma (Korrelationskoeffizient Lavage: 0,528 p: 0,004; Plasma: 0,501 p: 0,007). Bei den PMR-Werten im Gewebe ist ebenfalls eine Korrelation zur Tumorgröße erkennbar, die jedoch beim angewandten Standardfehler nicht signifikant ist (s. Tab. 8 sowie Abb. 2+3).

Tab. 8 – Korrelation T-Stadium / PMR-Werte Gewebe, Lavage, Plasma

		Gewebe	Lavage Prä-OP	Plasma Prä-OP	T-Stadium	
Spearman- Rho	Gewebe	Korrelationskoeffizient	1,000	,466	,362	,365
		Sig. (2-seitig)	.	,016	,069	,067
		N	26	26	26	26
	Lavage Prä-OP	Korrelationskoeffizient	,466	1,000	,247	,528
		Sig. (2-seitig)	,016	.	,205	,004
		N	26	28	28	28
	Plasma Prä-OP	Korrelationskoeffizient	,362	,247	1,000	,501
		Sig. (2-seitig)	,069	,205	.	,007
		N	26	28	28	28
	T-Stadium	Korrelationskoeffizient	,365	,528	,501	1,000
		Sig. (2-seitig)	,067	,004	,007	.
		N	26	28	28	28

Deutliche Korrelation zwischen den PMR-Werten von Lavage und Blutplasma mit der Tumorgöße (T-Stadium) (Lavage: 0,53 p=0,004; Plasma: 0,5 p=0,007).

Tab. 9 – Tumorgöße (T)

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
pT1a (<2 cm)	7	25,0	25,0	25,0
pT1b (2-3 cm)	6	21,4	21,4	46,4
pT2a (3-5 cm)	8	28,6	28,6	75,0
pT3 (>7 cm)	3	10,7	10,7	85,7
pT4	4	14,3	14,3	100,0
Gesamt	28	100,0	100,0	

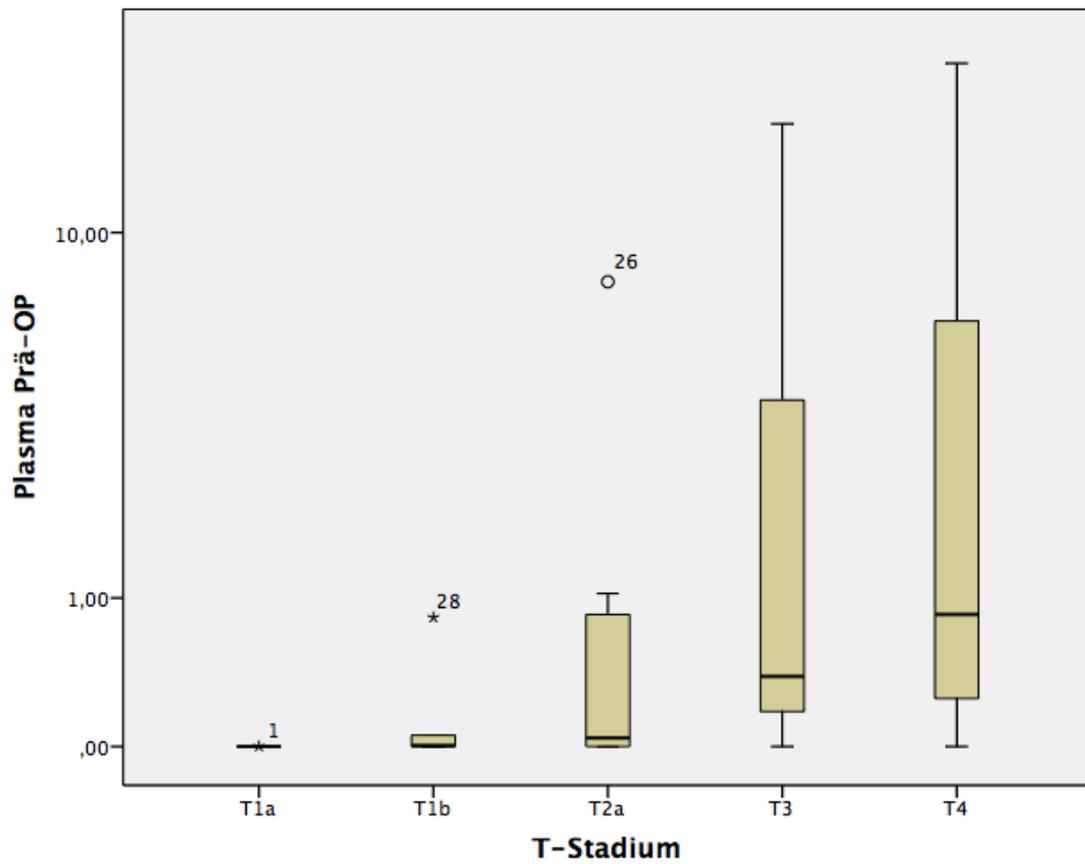


Abb. 2 – Verteilung PMR-Werte im Plasma Prä-OP / T-Stadium

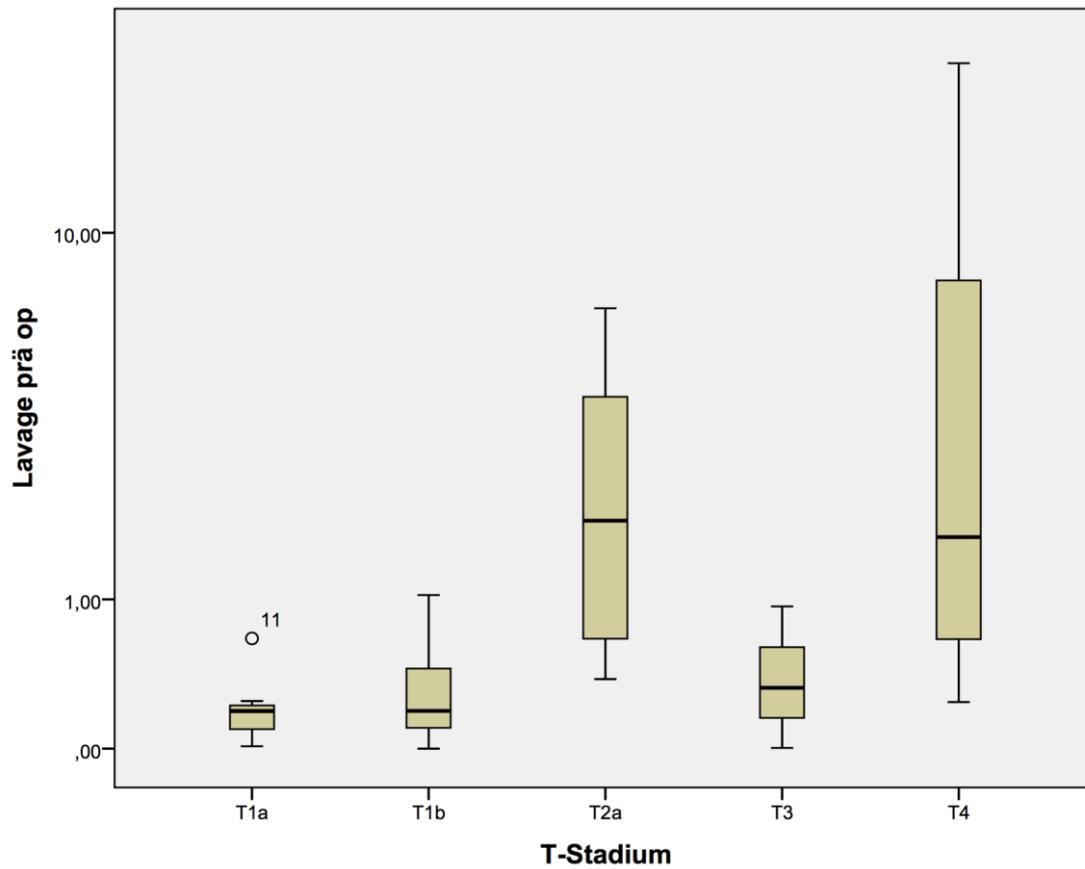


Abb. 3 – Verteilung PMR-Werte in Bronchiallavage Prä-OP / T-Stadium

4.2.3 Lymphknotenstatus

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung konnte bei 18 der 28 Patienten (=64,3%) kein Befall der regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden (N0). Bei 6 Patienten (=21,4%) wurde ein ipsilateraler peribronchialer und/oder hilärer Lymphknotenbefall diagnostiziert (N1). Bei 4 Patienten (=14,3%) fand sich Befall ipsilateraler subcarinaler- oder mediastinaler Lymphknoten (N2) (s. Tab. 10).

Bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen einer Lymphknotenmetastasierung und der Höhe der PMR-Werte, zeigte sich in den Lavageproben ein messbarer Zusammenhang. Der durchgeführte Mann-Whitney-Test ergab hier einen durchschnittlich höheren Rang für Patienten mit N1-/N2-Status als für solche mit N0 (N0: 12,44; N1/N2: 18,20; p: 0,076).

Tab. 10 - Lymphknotenstatus (N)

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	N0	18	64,3	64,3	64,3
	N1	6	21,4	21,4	85,7
	N2	4	14,3	14,3	100,0
	Gesamt	28	100,0	100,0	

35,7% zeigten bei Diagnosestellung einen positiven Lymphknotenbefall.

4.2.4 Fernmetastasen

Im Rahmen der präoperativen Diagnostik wurden bei 89,3% der Patienten keine Fernmetastasen nachgewiesen.

Drei Patienten zeigten zu diesem Zeitpunkt bereits Fernmetastasen (M1), und zwar in einem Fall ossäre- und in zwei Fällen cerebrale Metastasen.

In unserer Untersuchung konnten wir keinen Einfluss der Fernmetastasen auf die Höhe der PMR Werte nachweisen.

Tab. 11 – Fernmetastasen (M)

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	M0	25	89,3	89,3	89,3
	Cerebral	2	7,1	7,1	96,4
	Ossär	1	3,6	3,6	100,0
	Gesamt	28	100,0	100,0	

Bei drei Patienten wurden im Rahmen der Untersuchungen Fernmetastasen festgestellt und diese als Stadium IV klassifiziert.

4.2.5 Tumorstadium

Bei der Untersuchung zur Verteilung der Tumorstadien zeigte sich, dass 50% der Karzinome dem UICC Stadium I zuzuordnen waren. Von diesen 14 Patienten waren 10 im Stadium Ia und 4 im Stadium Ib. Auf das Stadium II entfielen 5 Patienten (=17,9%). Von den 6 Patienten mit einem Stadium III Tumor wiesen 5 Patienten (=17,9%) einen Stadium IIIa Tumor und ein Patient (=3,6%) einen Stadium IIIb Tumor auf. Bei weiteren drei Patienten (=10,7%) wurden Tumore im UICC Stadium IV diagnostiziert (s. Tab. 12). Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und der Höhe der PMR Werte in Blutplasma oder Bronchiallavage finden.

Tab. 12 - Tumorstadium

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Stadium Ia	10	35,7	35,7	35,7
Stadium Ib	4	14,3	14,3	50,0
Stadium IIa	4	14,3	14,3	64,3
Stadium IIb	1	3,6	3,6	67,9
Stadium IIIa	5	17,9	17,9	85,7
Stadium IIIb	1	3,6	3,6	89,3
Stadium IV	3	10,7	10,7	100,0
Gesamt	28	100,0	100,0	

4.3 PMR – Werte

Im Folgenden werden die gemessenen PMR-Werte der unterschiedlichen Probenarten unter verschiedenen Fragestellungen ausgewertet.

4.3.1 Vergleich prä- / postoperative PMR-Werte im Blutplasma

Von den 28 Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten und von denen eine präoperative Blutplasmaprobe vorhanden war, erhielten wir in 21 Fällen ebenfalls eine postoperative Probe.

Wie in Tabelle 13 dargestellt, konnte bei 16 Patientenproben präoperativ keine Methylierung im SHOX2-Gen nachgewiesen werden während wir bei den übrigen 12 Patienten PMR-Werte bis maximal 23,22% messen konnten.

Bei der Untersuchung der 21 postoperativen Plasmaproben ergab sich, dass nach der Operation noch in vier Fällen eine Methylierung messbar (Pat. 13;14;16;21) war.

In den übrigen Proben war die prozentuale Methylierung entweder auf 0,00% abgefallen oder auf diesem Wert konstant geblieben.

Die genauere Betrachtung der Differenz zwischen prä- und postoperativen Werten zeigte, dass 9 Patienten einen Abfall der prozentualen Methylierung um durchschnittlich 93,88% aufwiesen während bei 11 Patienten der Ausgangswert von 0,00% konstant blieb.

Ein Patient (Pat. 14) zeigte postoperativ einen Anstieg von 0,00% auf 0,24% (s. Tab. 13).

Tab. 13 – Vergleich %-Methylierung prä- / postoperativ im Blutplasma

Pat.	Präoperativer PMR	Postoperativer PMR	Differenz abs.	Differenz %
1	0,00	0,00	0,00	0,00%
2	0,00	0,00	0,00	0,00%
4	0,00	0,00	0,00	0,00%
5	1,19	0,00	-1,19	-99,99%
7	0,00	0,00	0,00	0,00%
8	0,00	0,00	0,00	0,00%
9	0,00	0,00	0,00	0,00%
11	0,00	0,00	0,00	0,00%
12	0,05	0,00	-0,05	-100,00%
13	17,27	3,23	-14,04	-81,30%
14	0,00	0,24	0,24	100,00%
15	0,00	0,00	0,00	0,00%
16	0,57	0,04	-0,53	-93,88%
17	0,00	0,00	0,00	0,00%
19	0,00	0,00	0,00	0,00%
20	0,00	n.d.	---	---
21	1,04	0,21	-0,83	-80,26%
22	0,00	0,00	0,00	0,00%
23	0,00	n.d.	---	---
24	0,08	0,00	-0,08	-100,00%
25	0,00	n.d.	---	---
26	23,22	0,00	-23,22	-100,00%
27	0,00	0,00	0,00	0,00%
28	0,39	n.d.	---	---
29	0,00	n.d.	---	---
30	0,68	0,00	-0,68	-100,00%
31	7,74	n.d.	---	---
32	0,01	n.d.	---	---
33	0,83	0,00	-0,83	-100,00%

Bei 9 Patienten war postoperativ ein Abfall in den PMR-Werten von durchschnittlich 95% zu messen.

n.d. – not determined

4.3.2 Follow-up Blutplasmawerte

Sechs Patienten stellten sich zur regelmäßigen Nachuntersuchung im Studienzentrum Krankenhaus Maria-Martha in Halle-Dölau vor, sodass von diesen follow-up Proben abgenommen werden konnten (siehe Tab. 14 / Abb. 4).

Von drei Patienten (Pat. 5; 14; 26) erhielten wir jeweils eine follow-up Probe, von drei Patienten jeweils 3 follow-up Proben (Pat. 11; 16; 24) und von Patient Nr. 17 konnten wir vier follow-up Werte untersuchen.

Die Ergebnisse der Untersuchung dieser Proben lassen sich in drei Gruppen aufteilen:

1.) Bei den Patienten 5 und 26 blieb der PMR-Wert nach einem Abfall der Methylierung auf 0,00% nach der Operation in der ersten follow-up Untersuchung konstant.

2.) Die Patienten 11 und 24 zeigten postoperativ einen kurzzeitigen Anstieg der PMR-Werte. In den jeweils letzten untersuchten follow-up Proben dieser Patienten war in beiden Fällen der PMR-Wert wieder auf 0,00% abgefallen.

3.) Die dritte Gruppe schließt jene Patienten ein, bei denen es zu einem Anstieg der prozentualen Methylierung im Verlauf der postoperativen Untersuchungen kam. Hierzu zählen die Patienten 14, 16 und 17.

Während bei Patient 14 präoperativ kein mSHOX2 nachgewiesen werden konnte, kam es postoperativ zu einem leichten Anstieg und einem weiteren fast linearen Anstieg in der ersten follow-up Probe.

Patient 16 zeigt nach einem kurzzeitigen Abfall in der post-operativen Probe einen kontinuierlichen Anstieg in den darauf folgenden drei Nachsorgeuntersuchungen bis auf einen Maximalwert von 3,8%.

Eine Sonderstellung nimmt Patient 17 ein, bei dem es nach komplett unauffälligen prä-/postoperativen Untersuchungen sowie den gleichfalls unauffälligen ersten drei follow-up Proben erst in der 4. Nachsorgeuntersuchung zu einem Anstieg der Methylierung kam. In der 5. follow-up Untersuchung fiel der Wert jedoch wieder auf 0,00% ab.

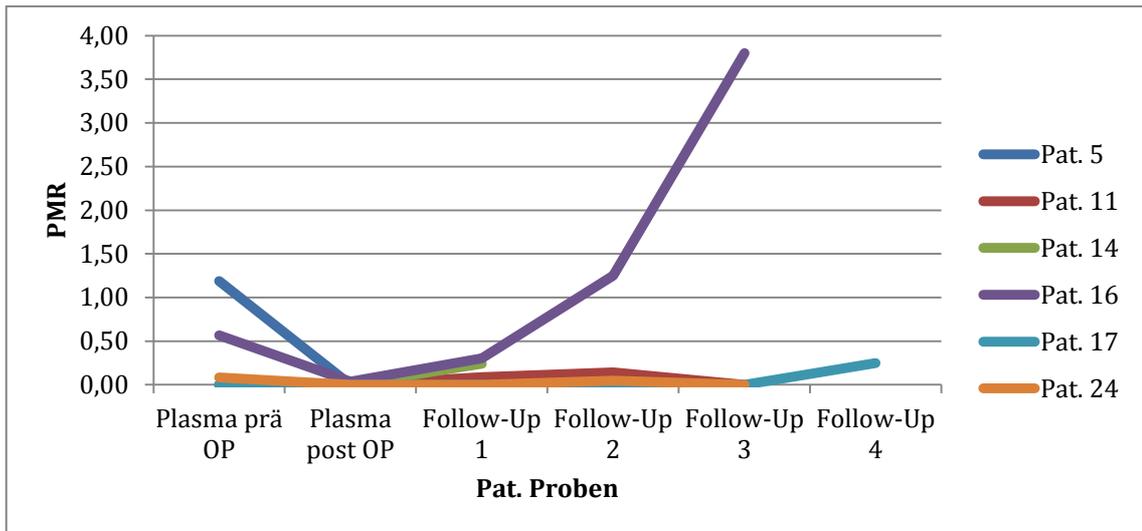


Abb. 4 - Verlauf follow-up PMR-Werte (Pat. 5; 11; 14; 16; 17; 24) im Plasma

Es zeigte sich bei Patient 14, 16 und 17 im Verlauf ein Anstieg der PMR-Werte, teilweise eine Erhöhung auf das 7-fache des präoperativen Wertes (Pat. 16).

Tab. 14 - Follow-up PMR-Werte im Blutplasma

Pat. ID	Prä-OP	Post-OP	follow-up 1	follow-up 2	follow-up 3	follow-up 4	follow-up 5
5	1,19	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	0,00	0,00	0,09	0,14	0,00	n.d.	n.d.
14	0,00	n.d.	0,24	0,59	n.d.	n.d.	n.d.
16	0,57	0,04	0,30	1,25	3,80	n.d.	n.d.
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00
24	0,08	0,00	0,00	0,05	0,00	n.d.	n.d.
26	23,22	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – not determined

4.3.3 Vergleich PMR-Werte in Gewebe / Bronchiallavage / Blutplasma

Im Rahmen der Studie konnte von allen 28 eingeschlossenen Patienten eine präoperative Lavage- sowie Plasmaprobe gewonnen werden. Bei zwei Patienten (Pat.: 13;14) stand kein Tumorgewebe zur Verfügung, da bei der Operation nicht genügend Tumorgewebe zur weiteren Untersuchung gewonnen werden konnte.

Es konnte in allen gewonnenen Gewebeproben mSHOX2 mit einem medianen PMR-Wert von 55,55% mit einer Standardabweichung von 85,55% nachgewiesen werden.

Die präoperativen Lavageproben zeigten eine mediane Shox2-Methylierung von 0,42% bei einer Standardabweichung von 4,47%.

Bei der Untersuchung der präoperativ gewonnenen Plasmaproben wurde bei mehr als der Hälfte der Patienten (53,6%) keine Methylierung gemessen.

Bei der Analyse der Daten konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den PMR-Werten im Gewebe und den Lavageproben nachgewiesen werden (Tab. 17, - Korrelation nach Spearman: 0,47; p: 0,02).

Wir konnten aber keine Korrelation zwischen der Menge an mSHOX2 in den unterschiedlichen Probenarten nachweisen. So zeigten etwa Patienten mit einem hohen mSHOX2 Anteil in der Blutplasmaprobe nicht automatisch einen hohen PMR-Wert in der Bronchiallavage.

Ebenso zeigte sich keine Korrelation zwischen der Höhe der PMR-Werte im Blutplasma und dem Grad der Vaskularisierung der Gewebe.

Dies gilt in gleicher Weise für den Vergleich der PMR-Werte mit der Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blutplasma., welche eine wichtige Rolle im Rahmen einer Tumorerkrankung spielen. So werden sie u.a. mit einer erhöhten Thromboseneigung bei Tumorpatienten in Verbindung gebracht.⁷⁴

Tab. 15 – Verteilung PMR-Werte Gewebe / Lavage / Plasma

		Plasma Prä-OP	Lavage Prä-OP	Gewebe
N	Gültig	28	28	26
	Fehlend	0	0	2
Median		0	0,42	55,55
Standardabweichung		5,45	4,47	83,55
Minimum		0,00	0,00	0,00
Maximum		23,22	23,20	238,64

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der medianen Methylierung, absteigend von den Gewebe- (55,55%) über die Lavage- (4,47%) bis zu den Plasmaproben (0%).

Tab. 16 – Übersicht PMR Werte in einzelnen Subgruppen (Median + SD)

	N	Gewebe	Bronchiallavage	Blutplasma
Adenokarzinom	9	24,29 ± 39,70	0,12 ± 0,19	0,00 ± 0,25
Plattenepithelkarzinom	15	58,35 ± 85,15	1,23 ± 5,85	0,05 ± 4,68
Adenosquamöses Karzinom	1	238,64	1,04	0,01
Undifferenziertes Karzinom	3	0,67 ± 118,87	0,24 ± 0,30	0,00 ± 13,40
T1a (<2cm)	7	4,63 ± 52,69	0,19 ± 0,2	0,00
T1b (2-3cm)	6	71,4 ± 81,15	0,19 ± 0,38	0,01 ± 0,33
T2a (3-5cm)	8	77,43 ± 76,78	1,11 ± 1,62	0,04 ± 2,68
T3 (>7cm)	3	1,32 ± 13,37	0,33 ± 0,48	0,39 ± 9,86
T4	4	197,43 ± 97,01	1,72 ± 11,01	0,88 ± 11,33
N0	18	46,54 ± 69,71	0,31 ± 5,20	0 ± 4,34
N1	6	183,06 ± 105,83	2,96 ± 8,56	0 ± 0,58
N2	4	49,48 ± 91,09	0,28 ± 0,19	0,61 ± 11,41

Wir konnten keine Korrelation der unterschiedlichen Histologien und den PMR-Werten der einzelnen Probenarten nachweisen. Es zeigten sich jedoch signifikante Zusammenhänge zwischen der Tumorgröße (T-Stadium) und den PMR-Werten von Lavage und Plasma.

Tab. 17 – Korrelationen Gewebe / Lavage / Plasma nach Spearman

		Gewebe	Lavage Prä-OP	Plasma Prä-OP	
Spearman- Rho	Gewebe	Korrelationskoeffizient	1,00	,47	,36
		Sig. (2-seitig)	.	,02	,07
		N	26	26	26
	Lavage Prä-Op	Korrelationskoeffizient	,47	1,00	,25
		Sig. (2-seitig)	,02	.	,21
		N	26	28	28
	Plasma Prä-Op	Korrelationskoeffizient	,36	,25	1,00
		Sig. (2-seitig)	,07	,21	.
		N	26	28	28

Die errechneten Korrelationen zeigen bis auf eine leichte Korrelation zwischen Gewebe und Bronchiallavage (0,47 p=0,02) keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den gemessenen PMR-Werte der verschiedenen Probenarten.

Tab. 18 – PMR-Werte Gewebe / Lavage / Plasma

Pat.	Gewebe	Lavage Prä-OP	Plasma Prä-OP	Vaskularisierung	Neutrophile Granulozyten
1	10,03	0,07	0,00	30	0,87
2	133,21	0,12	0,00	73	0,72
4	232	23,2	0,00	65	0,56
5	188,58	1,23	1,19	24	0,63
7	172,86	0,77	0,00	44	0,73
8	5,75	0,25	0,00	23	0,61
9	2,62	0,2	0,00	38	0,6
11	10,31	0,00	0,00	42	0,77
12	145,64	0,14	0,05	43	n.d.
13	n.d.	0,94	17,27	n.d.	0,72
14	n.d.	0,67	0,00	n.d.	0,56
15	0,09	0,19	0,00	76	0,73
16	18,31	2,21	0,57	49	0,39
17	56,09	0,10	0,00	65	0,64
19	68,11	0,25	0,00	28	0,59
20	42,19	0,38	0,00	11	0,51
21	210,59	3,51	1,04	60	n.d.
22	3,51	0,01	0,00	61	0,68
23	177,53	6,74	0,00	40	0,72
24	50,88	4,84	0,08	36	0,71
26	206,27	0,24	23,22	44	0,67
27	24,29	0,33	0,00	23	0,59
28	1,32	0,00	0,39	n.d.	0,92
29	0,37	2,42	0,00	42	0,71
30	54,75	0,57	0,68	28	0,69
31	100,11	1,44	7,74	2	n.d.
32	238,64	1,04	0,01	7	n.d.
33	74,68	0,45	0,83	14	0,74

n.d. – not determined

Tab. 19 – Korrelation Plasma / Lavage / Vaskularisierung

			Plasma Prä-OP	Lavage Prä-OP	Vaskularisierung
Spearman- Rho	Plasma Prä-OP	Korrelationskoeffizient	1,000	,247	-,278
		Sig. (2-seitig)	.	,205	,178
		N	28	28	25
	Lavage Prä-OP	Korrelationskoeffizient	,247	1,000	-,197
		Sig. (2-seitig)	,205	.	,345
		N	28	28	25
	Vaskularisierung	Korrelationskoeffizient	-,278	-,197	1,000
		Sig. (2-seitig)	,178	,345	.
		N	25	25	25

Zwischen den PMR-Werten im Plasma bzw. Lavage und dem Grad der Vaskularisierung im untersuchten Tumorgewebe ist keine statistisch signifikante Korrelation nachweisbar.

Tab. 20 – Korrelation Plasma / Neutrophile Granulozyten

			Plasma Prä-OP	Neutrophile Granulozyten
Spearman-Rho	Plasma Prä-OP	Korrelationskoeffizient	1,000	,202
		Sig. (2-seitig)	.	,344
		N	28	24
	Neutrophile Granulozyten	Korrelationskoeffizient	,202	1,000
		Sig. (2-seitig)	,344	.
		N	24	24

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der SHOX2-Werten im Plasma und der Anzahl an neutrophilen Granulozyten.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Das Patientenkollektiv

Bei unserem Studiendesign handelt es sich um eine prospektive Beobachtungsstudie, bei der alle Patienten eingeschlossen wurden, die sich im Studienzentrum mit der Fragestellung der operablen Tumorversorgung vorstellten und dem Studienprotokoll zustimmten. Es erfolgte keine Randomisierung nach Alter, Geschlecht oder Tumorstadium.

Die Geschlechterverteilung unserer Patienten zeigte im Vergleich zum weltweiten Durchschnitt eine leichte Verschiebung zu den Männern (weltweit: ♂ 60%, ♀: 40% im Vergleich zu ♂ 78%, ♀: 22% in unserem Patientenkollektiv).⁷⁵

Das mediane Alter der Patienten bei Diagnosestellung eines Lungenkarzinoms entspricht mit 72 Jahren in unserer Studie nahezu dem weltweiten Durchschnitt von ca. 70 Jahren.⁷⁵

Während im Durchschnitt bei Männern bis zu 90% und bei Frauen bis zu 65% der Lungenkarzinome einen Bezug zu Tabakkonsum haben, zeigten in unserer Studie nur 2/3 der Patienten eine positive Raucheranamnese.⁷⁶ Ebenso konnten wir keinen Zusammenhang zwischen Raucherstatus und Höhe der PMR-Werte nachweisen.

Die genannten Abweichungen lassen sich sowohl durch regionale Unterschiede, als auch durch die geringe Fallzahl von 28 Patienten und die damit verbundene statistische Abweichung erklären.

5.1.2 Probengewinnung

Die Gewinnung der prä- und postoperativen Plasmaproben, sowie der Bronchiallavage konnte im Rahmen der Aufnahme- bzw. Entlassungsuntersuchung problemlos durchgeführt werden. Die Tatsache, dass das Krankenhaus Maria-Martha in Halle/Dölau ein überregionales Zentrum in der operativen Tumorversorgung bei Lungenkarzinomen ist, erschwerte jedoch die Nachbeobachtung der Patienten und die Gewinnung von follow-up Proben. Viele Patienten wurden in ihren regionalen Krankenhäusern primär diagnostiziert und befanden sich dann lediglich zur operativen Versorgung und dem postoperativen Aufenthalt in unserem Studienzentrum.

Die weiteren Kontrolluntersuchungen fanden in der Regel wieder in den Heimatkrankenhäusern statt. Dies erklärt den Umstand, dass lediglich von einem Viertel der eingeschlossenen Patienten follow-up Werte erhoben werden konnten.

5.1.3 Tumorstadien

Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war ein Lungenkarzinom im operablen Stadium, also UICC-Stadium I-IIIa. Auf Grund dieser Einschlusskriterien entspricht unsere Stadienverteilung nicht dem üblichen Durchschnitt, bei dem nur 15% aller diagnostizierten Karzinome im lokalen Stadium diagnostiziert werden.

Von den eingeschlossenen 28 Patienten zeigten vier Patienten einen dem Stadium IIIB oder Stadium IV entsprechenden Tumor. Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass diese Patienten bei Diagnosestellung als operabel eingestuft wurden, während des Klinikaufenthaltes jedoch bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte Fern-/Lymphknotenmetastasen diagnostiziert wurden, sodass die Tumorformel bei Entlassung daher ein Stadium IIIB/IV-Tumor auswies.

Darüber hinaus könnte es sich um Einzelfallentscheidungen gehandelt haben, welche z.B. bei paralleler Therapie solitärer cerebraler oder adrenaler Metastasen eine chirurgische Tumortherapie auch im Stadium IV rechtfertigt.

Wir konnten in unserer Untersuchung keine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und der Höhe der PMR Werte in Bronchiallavage und Blutplasma nachweisen. Dies führen wir auf die vornehmlich frühen Tumorstadien in unserer Studie zurück.

Sowohl Kneip et al. als auch Schmidt et al. konnten zeigen, dass die Methylierungsrate mit höherem Tumorstadium ansteigt.^{48,49}

Die gefundene Korrelation zwischen einem positiven Lymphknotenstatus (N1+N2) und einer erhöhten Methylierung des SHOX2-Gens spricht für eine höhere Wahrscheinlichkeit des Nachweises von mSHOX bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen.

Gründe hierfür sind möglicherweise eine größere Tumormasse, aggressivere Eigenschaften des individuellen Tumortyps oder vermehrter Anschluss an das Gefäß- und Bronchialsystem durch die Metastasen. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass ein p-Wert von 0,076 nicht signifikant im Rahmen unseres angesetzten Standardfehlers von 0,05 ist. Wir halten den gefundenen Zusammenhang aber dennoch für einen deutlichen Trend und sehen die fehlende statistische Signifikanz der geringen Fallzahl geschuldet. Daher wird eine größere Nachfolgestudie benötigt, um den gefundenen Zusammenhang zu verifizieren.

Die nachgewiesene signifikante Korrelation zwischen der Tumorgöße und der Höhe der PMR-Werte in Bronchiallavage (Korrelationskoeffizient: 0,528; p=0,004) und Blutplasma (Korrelationskoeffizient: 0,501; p=0,007) ist ein weiterer interessanter Befund (siehe Tab.8).

Unter Berücksichtigung der sehr groben Einteilung der Tumorgöße in der TNM-Klassifikation zeigt diese Korrelation, dass es einen Zusammenhang zwischen der

Größe von Tumoren und der Höhe an methylierter SHOX2 DNA gibt. Diese Beobachtung sollte ebenfalls in einer weiteren Nachfolgestudie mittels genauerer Messung der Tumorgöße z.B. durch Volumenmessung im CT-Bild verifiziert werden.

5.1.4 Angewandte analytische Methoden

Die von uns verwendeten Methoden zur Aufarbeitung und Messung der Probe mittels HeavyMethyl (HM) PCR-Assay für die quantitative Bestimmung von methyliertem SHOX2-Gen wurde bereits erfolgreich in Blutplasma und Lavage angewandt.^{48,49}

Dieser Test erhielt zudem die CE-Zertifizierung und ist daher für die Anwendung am Patienten zugelassen.⁷⁷ Die CE-Zertifizierung garantiert ein hohes Maß an Sensitivität und Spezifität, sowie eine zuverlässige Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse.

Um die Konzentration an Tumorzellen in den untersuchten Gewebeproben zu erhöhen, wurden die angefertigten Tumorschnitte von einem Facharzt für Pathologie begutachtet und tumorzellreiche Areale unter dem Mikroskop markiert.

Anschließend konnten diese markierten Areale makroskopisch ausgeschnitten und im weiteren Prozess untersucht werden. Auf diese Weise erreichten wir eine höchstmögliche Menge an Tumorzellen in unserer Messprobe.

Mit der quantitativen Bestimmung von mSHOX2 in mehreren Untersuchungsmaterialien (Blutplasma, Lavage, Tumorgewebe) des gleichen Patienten konnten wir erstmals einen Eindruck von der Verteilung und dem Vorkommen von methylierter SHOX2-DNA in den verschiedenen Probenarten gewinnen. Dies wird eine Rolle bei der Auswahl der Probenart für zukünftige Untersuchungen des mSHOX2-Gens spielen.

5.2 Diskussion der PMR-Werte

5.2.1 Vergleich prä- / postoperativer Plasmawerte

Bei der Suche nach neuen Tumormarkern steht häufig auch die Frage nach deren Verhalten unter Therapie im Mittelpunkt. In Bezug auf mSHOX2 konnte in einer aktuellen Pilotstudie bereits gezeigt werden, dass sich dieser Marker sehr gut dazu eignet, das Ansprechen auf eine Radio-Chemotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom festzustellen.⁶⁸

Ziel unserer Studie war es, die quantitative Messung von mSHOX2 bei Lungentumorpatienten durchzuführen, die zu einem Zeitpunkt diagnostiziert wurden, zu dem eine operative Tumorthherapie möglich war. Dabei handelte es sich um Patienten, die ein frühes Tumorstadium (I bis IIIA) zeigten.

Diese frühen Tumorstadien bedingen auch die verhältnismäßig niedrigen gemessenen PMR-Werte für SHOX2 im Blutplasma. Wir konnten damit die von Kneip et. al. publizierten Ergebnisse replizieren und zeigen, dass es eine Korrelation zwischen Tumorstadium und der Menge an methylierter SHOX2-DNA im Blutplasma gibt.⁴⁹

Wir konnten auch nachweisen, dass sich bei den 9 Patienten, bei denen präoperativ eine Methylierung gemessen wurde, die Werte postoperativ um durchschnittlich knapp 95% verringerten. Dieser Abfall spricht für einen deutlichen Zusammenhang von methyliertem SHOX2 und dem Tumor, da sich mit Entfernung des Tumors auch der gemessene PMR-Wert stark verringerte. Die postoperativen Proben wurden in der Regel am Tag der Entlassung des Patienten abgenommen, sodass sich der gezeigte PMR-Abfall innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums von nur wenigen Tagen vollzog. Dieses Ergebnis bestätigt damit die Messungen einer Pilotstudie an Patienten mit einem fortgeschrittenen Lungentumor, die zeigten, dass eine systemische Chemotherapie innerhalb von 7 bis 10 Tagen zu einer starken Reduktion der Plasma mSHOX2 Werte führt.^{68,78}

Mit diesem schnellen Abfall der Werte nach Beginn einer Therapie erfüllt mSHOX2 eine wichtige und wesentliche Voraussetzung zur Eignung als Tumormarker für ein Therapiemonitoring.

Durch die mehrfache Bestimmung von mSHOX2 im Verlauf der Diagnostik und Therapie eines Patienten erhält man ein kinetisches Profil und Abbild des Tumors zum jeweiligen Zeitpunkt.

Für diese Art der Tumoruntersuchung wurde in den letzten Jahren der Begriff der „Liquid Biopsy“ geprägt.⁶⁴ Er beschreibt die Untersuchung von genetischem Material des Tumors, welches entweder als ganze Tumorzellen (circulating tumor cells) oder in Form von extrazellulären Nukleinsäuren im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten wie Aszitis oder Urin nachweisbar sind. Im Vergleich zur herkömmlichen histologischen Biopsie bietet die „Liquid Biopsy“ entscheidende Vorteile:

So handelt es sich bei dieser Art der Probenentnahme um eine einfache Blutentnahme, welche bei minimaler Invasivität eine hohe diagnostische Aussagekraft besitzt.

Mittels eines Nachweises von genetischem Material des Tumors aus dem Blut können auch solche Tumore untersucht werden, welche einer herkömmlichen Biopsie nicht zugänglich sind. Dies betrifft vor allem schwierige Tumorlokalisationen oder Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand.

Darüber hinaus werden bei herkömmlichen Biopsien nur maximal einige wenige Lokalisationen biopsiert. Eine Analyse von circulating tumor cells (CTC) bzw. extrazellulären Nukleinsäuren repräsentiert jedoch womöglich eine Abbild aller Tumorlokalisationen bzw. erlaubt es sich ein genaueres Bild im Hinblick auf eine eventuelle genetische Heterogenität des Tumors zu verschaffen, was mit einer einzelnen herkömmlichen histologischen Biopsie nur selten gelingt.⁷⁹

Da sich die Entnahme der Proben unter Therapie oft wiederholen lässt, erhält man damit möglicherweise einen genaueren Einblick in die Kinetik der Erkrankung.

Weitere Studien müssen zeigen, ob sich damit ein Therapieerfolg oder eine mögliche Resistenzentwicklung des Tumors gegenüber der angewendeten Therapie frühzeitig feststellen lässt und der Patient damit von einer Anpassung der Therapie profitieren kann.⁸⁰

Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber der herkömmlichen Biopsie, bei der eine Re-Biopsie nach begonnener Therapie häufig nicht mehr möglich ist.

Insgesamt ist das Konzept der Liquid Biopsy aktuell Gegenstand vieler Studien und Untersuchungen und sicherlich eine der erfolgversprechendsten Innovationen der aktuellen Krebsforschung. So gibt es z.B. aktuell Arbeitsgruppen welche dieses Konzept im Zusammenhang mit Lungenkarzinomen^{81,82}, Colo-rektalen Karzinomen^{83,84}, Mammakarzinomen⁸⁵⁻⁸⁷ sowie malignem Melanom⁸⁸ untersuchen. Die Ergebnisse dieser Forschungen werden in Zukunft zunehmend Einfluss auf die Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen haben.

5.2.2 Follow-up Blutplasmawerte

Das in Abschnitt 5.1.3 angesprochene Problem der Nachverfolgung der Studienpatienten und der Gewinnung von follow-up Proben hat die Anzahl der Patienten mit follow-up Proben deutlich reduziert.

Von 7 Patienten, die sich regelmäßig zur Nachkontrolle im Studienzentrum vorstellten, ist besonders Pat. Nr. 16 interessant. Bei diesem Patienten kam es nach initialem postoperativem Abfall der Menge an extrazellulärer Plasma mSHOX2 DNA im weiteren Verlauf zu einem deutlichen Anstieg auf das 7-fache des präoperativen Wertes. Bis jetzt (Stand Mai 2015) war in den standardmäßigen radiologischen Kontrolluntersuchungen jedoch kein Rezidiv darstellbar. Hier ist eine weitere Verfolgung des Werdegangs des Patienten besonders unter dem Gesichtspunkt der frühzeitigen Rezidiverkennung durch die Bestimmung von mSHOX2 interessant.

Besonders beachtenswert ist auch der Verlauf von Pat. Nr. 17, bei dem es nach unauffälligen drei follow-up Untersuchungen in der 4. Nachuntersuchung zu einem leichten Anstieg von mSHOX2 im Plasma kam.

Beim Abgleich mit den klinischen Daten des Patienten wurde festgestellt, dass zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten ein Rezidiv in Form einer solitären Colon-Metastase des primär diagnostizierten Adenokarzinoms der Lunge diagnostiziert wurde. Nach erfolgter Resektion der Metastase war in der anschließenden 5. follow-up Untersuchung die gemessene Methylierung wieder auf 0,00% abgefallen.

Patient Nr. 14 ist ein Sonderfall: Bei ihm wurde keine operative Therapie des Primärtumors der Lunge durchgeführt, da zuerst die solitäre cerebrale Metastase entfernt wurde. Er erhielt daraufhin eine Chemotherapie sowie eine Radiatio. Die ursprünglich geplante operative Therapie des Lungenkarzinoms wurde bei zusätzlichem Auftreten von Lebermetastasen nicht mehr durchgeführt. Da der Patient jedoch initial in die Studie aufgenommen wurde, wurden weiterhin im Rahmen der Kontrolluntersuchungen Plasmaproben zur mSHOX Bestimmung abgenommen. Diese zeigten in der initialen Messung keine Methylierung des SHOX2-Gens.

In follow-up Untersuchungen stiegen die PMR-Werte jedoch unter Chemotherapie und Radiatio an. Der Patient verstarb 7 Monate nach der Erstdiagnose. Dies spricht für einen Tumorprogress trotz intensiver Chemo- und Bestrahlungstherapie.

5.2.3 Vergleich PMR-Werte im Gewebe / Bronchiallavage / Blutplasma

Da neben Lavage- und Plasmaproben bei 26/28 Patienten die dazugehörigen Gewebeproben vorhanden waren, konnten wir die Methylierungswerte von SHOX2 im Tumorgewebe, Bronchiallavage und Blutplasma der einzelnen Patienten miteinander vergleichen. Dies vor allem im Hinblick auf die Frage, welches Material sich am ehesten für Bestimmung von mSHOX2 eignet.

Beim Vergleich der medianen Methylierungswerte der unterschiedlichen Probenarten zeigten sich im Tumorgewebe mit 55,55% (SD: $\pm 83,55$) die höchsten medianen Werte. Teilweise wurden Werte von über 200% gemessen. Die Prozentzahlen $>100\%$ erklären sich dadurch, dass die PMR-Werte das Verhältnis von mSHOX2 zu Beta-Aktin darstellen, also mehr mSHOX2 DNA als Beta-Aktin DNA in diesen Proben vorhanden ist. Darüber hinaus ist der SHOX2 Genlocus bei vielen Lungentumorpatienten amplifiziert, was ebenfalls zu höheren PMR Werten führt.

Bemerkenswert ist hier, dass wir im Gegensatz zu den anderen Probenarten in allen zur Verfügung stehenden Gewebeproben mSHOX nachweisen konnten.

Im Vergleich zu den sehr hohen PMR-Werten im Gewebe (Median Gewebe PMR: 55,55%, SD: $\pm 83,55$) waren die gemessenen medianen Werte in der Bronchiallavage mit 0,42% (SD: $\pm 4,47$) und im Blutplasma mit 0,00% (SD: $\pm 5,45$) deutlich geringer.

Für diese Differenz der PMR-Werte vom Gewebe über die Lavage bis zum Plasma sehen wir verschiedene Ursachen:

So werden bei den einzelnen Proben die PMR-Werte in sehr unterschiedlich großen Kompartimenten gemessen. Das Verteilungsvolumen der Menge an mSHOX2-DNA ist in der Lavage und vor allem im Blutplasma deutlich größer als im zellreichen Tumorgewebe. Ebenso wäre es möglich, dass diejenigen Nukleinsäuren, die vom Tumor in Blut- bzw. Bronchialsystem abgegeben werden nur eine geringe Methylierung im SHOX2-Gen aufweisen. Generell ist über die Mechanismen bei der Freisetzung von Nukleinsäuren ins Blut bisher wenig bekannt.

Diaz et al. konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Höhe an neutrophilen Granulozyten und der Menge an zellfreier DNA im Blutplasma bei Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose besteht.⁷⁴ Darüber hinaus konnten andere Arbeitsgruppen nachweisen, dass erhöhte Neutrophilenwerte im Rahmen eines Tumorgeschehens von signifikanter Bedeutung sind und dort ebenfalls mit der Menge an freigesetzten zellfreien Nukleinsäuren korrelieren.^{89,90} Die in diesen Arbeiten beobachtete Korrelation konnten wir in unserem Patientenkollektiv nicht nachweisen.

Einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen hohen Methylierungswerten im Blutplasma und einer erhöhten Vaskularisierung des Tumors konnten wir ebenfalls nicht bestätigen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass für die Freisetzung extrazellulärer DNA möglicherweise mehrere Mechanismen verantwortlich sind, die wir bisher nur ungenügend kennen. Schor et al. konnten jedoch zeigen, dass Lungenkarzinome eine sehr heterogene Vaskularisierung, sowohl innerhalb eines Tumors, als auch zwischen den untersuchten Tumoren, aufweisen.⁷³ Es hängt daher sehr wahrscheinlich von den individuellen Eigenschaften des Tumors ab, ob und in welchem Umfang Nukleinsäuren bzw. Zellbestandteile an das Blutsystem abgegeben werden. Das gilt ebenso für den Zugang des Tumors zum Bronchialsystem. Es ist bisher nicht bekannt ob ein Anschluss des Tumors an das Bronchialsystem die Methylierungswerte in der Bronchiallavage beeinflusst.

Die Tatsache, dass wir bis auf eine mittelgradige Korrelation zwischen Gewebe- und Lavageproben keine weitere Korrelation unter den verschiedenen Probenarten nachweisen konnten, führen wir ebenfalls auf die individuell unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Tumore zurück.

Insgesamt scheint die Untersuchung von mSHOX2 in der Bronchiallavage bei Patienten mit frühen Tumorstadien und niedriger Tumorlast eher Erfolg versprechend zu sein als die Bestimmung im Blutplasma. Dies erklärt sich durch den höheren Verdünnungsgrad im Blutplasma.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die mSHOX2 Bestimmung in frühen Tumorstadien beim Lungenkarzinom eine Methode darstellt, die interessante Ergebnisse liefert. Allerdings konnten wir keine signifikante Korrelation zwischen der Menge an mSHOX2 im Gewebe und extrazellulärer mSHOX2 DNA nachweisen.

Dennoch zeigten sich einige vielversprechende Ansätze in Bezug auf die Verlaufsbeurteilung einer Antitumorthherapie und die Möglichkeit einer frühzeitigen Rezidiverkennung, welche jedoch im Rahmen einer multizentrischen Studie mit einer größeren Anzahl von Patienten verifiziert werden muss.

5.3 Limitationen

Die Limitation unserer Pilotstudie ergibt sich vor allem vor allem aus der geringen Fallzahl, die der Untersuchung zugrunde liegt. Diese lässt bei der Interpretation der Daten nur erste Ansätze und Tendenzen zu. Viele Ergebnisse bedürfen Bestätigung im Rahmen größerer Kontrollstudien.

Darüberhinaus zeigen die durch die Studie gewonnenen Daten, dass sich mSHOX2 bisher nur im Gewebe hinreichend sicher nachweisen lässt. Dies schränkt die Praktikabilität für einen Einsatz als Tumormarker im klinischen Alltag ein.

Die Eignung als Marker zur Tumordiagnostik bzw. als Screeningparameter ist vor dem Hintergrund der niedrigen Nachweisrate in frühen Tumorstadien eingeschränkt.

Hier könnte der Fokus in Zukunft auf dem Therapiemonitoring liegen, wo mSHOX2 bereits seine Eignung im Rahmen des Monitorings von Chemotherapien beim Lungenkarzinom bewiesen hat.⁶⁸

Der mögliche Einsatz als Rezidivmarker muss ebenfalls in größeren Follow-up Studien weiter untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Noch immer ist die 5-Jahres Überlebensrate von Patienten mit einem Lungenkarzinom mit 10 bis 15% sehr niedrig. Das liegt vor allem daran, dass viele Tumore erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden. Die rechtzeitige Diagnose und Verlaufskontrolle von Lungenkarzinomen in Verbindung mit der Entwicklung neuer Medikamente und die Verbesserung bestehender Therapieregime ist daher von zunehmender Wichtigkeit. Es ist bekannt, dass Lungentumore schon in einem frühen Stadium eine Vielzahl verschiedener genetischer sowie epigenetischer Veränderungen aufweisen. Dazu gehört u.a. die Methylierung des SHOX2-Gens, von dem bekannt ist, dass diese bereits in Stadium I der Lungenkarzinome nachweisbar ist.

Ziel unserer Untersuchungen war es, den diagnostischen Wert von mSHOX2 im Bezug auf die Verlaufsbeobachtung bei Patienten mit frühen Lungenkarzinomstadien zu evaluieren. Dies beinhaltet vor allem Therapiemonitoring und mögliche frühzeitige Rezidiverkennung.

Hierzu wurde bei 28 Patienten mit Lungenkarzinom im Stadium I-IIIa, die sich zur operativen Tumorthherapie vorstellten, der Methylierungsgrad des SHOX2-Gens bestimmt. Es wurden prä- und postoperative Plasmaproben, sowie Bronchiallavage und Tumorgewebe auf ihren Gehalt an methylierter SHOX2 DNA untersucht. Hinzu kamen, sofern möglich, follow-up Plasmaproben im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen.

Es zeigte sich, dass Patienten mit einem präoperativ erhöhten Methylierungsgrad, post-operativ einen deutlichen Abfall in der Methylierung des SHOX2-Gens aufwiesen. Aus dieser Beobachtung schlussfolgern wir, dass die extrazelluläre mSHOX2 DNA aus den Tumorzellen stammt.

Ebenso zeigten einige Patienten in den follow-up Untersuchungen nach initial unauffälligen mSHOX2 Werten im Verlauf ansteigende Werte, welche vor allem bei Pat. 17 stark mit dem klinischen Verlauf der Tumorerkrankung korrelierten. Schließlich konnte auch der Beweis erbracht werden, dass mSHOX2 sowohl in Blutplasma als auch in Lavage und vor allem im Tumorgewebe vorhanden und nachweisbar ist, jedoch die Werte im Vergleich untereinander, mit der Ausnahme von Gewebe und Bronchiallavage, nicht korrelieren.

Dies sind vielversprechende Ergebnisse, welche Grundlage und Anstoß für weitere Untersuchungen im größeren Maßstab sein sollten, insbesondere im Hinblick auf die Frühdetektion möglicher Rezidive.

7 Literaturverzeichnis

1. Jemal, A. *et al.*, (2011) Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 69–90.
2. Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T. & Matthay, R. A. , (2011) Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin. Chest Med.* **32**.
3. Allemani, C. *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet* doi:10.1016/S0140-6736(14)62038-9
4. Brower, V., (2009) Biomarker Studies Abound for Early Detection of Lung Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 11–13.
5. Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) & Office on Smoking and Health (US). , (2010), *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General.* (Centers for Disease Control and Prevention (US)).
6. Mattson, M. E., Pollack, E. S. & Cullen, J. W., (1987), What are the odds that smoking will kill you? *Am. J. Public Health* **77**, 425–431.
7. Harris, J. E., Thun, M. J., Mondul, A. M. & Calle, E. E. , (2004), Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. *BMJ* **328**, 72.
8. Loeb, L. A., Ernster, V. L., Warner, K. E., Abbotts, J. & Laszlo, J. , (1984), Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res.* **44**, 5940–5958.
9. Denson, K. W. E. Re (1999): Multicenter Case-Control Study of Exposure to Environmental Tobacco Smoke and Lung Cancer in Europe. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 803–803.
10. Goeckenjan, G. *et al.* , (2010), Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. *Pneumologie* **64**, e1–e164.
11. Spiro, S. G., Gould, M. K. & Colice, G. L., (2007), Initial evaluation of the patient with lung cancer: Symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes*: accp evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* **132**, 149S–160S.
12. Grippi, M. A. , (1990), Clinical aspects of lung cancer. *Semin. Roentgenol.* **25**, 12–24.
13. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N. Engl. J. Med.* **365**, 395–409 (2011).
14. Final Update Summary: Lung Cancer: Screening - US Preventive Services Task Force. Available at: <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/Page/Document/UpdateSummaryFinal/lung-cancer-screening>. (Accessed: 6th July 2016)
15. Henschke, C. I. *et al.*, (1999), Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *The Lancet* **354**, 99–105.
16. Hirsch, F. R., Merrick, D. T. & Franklin, W. A. , (2002), Role of biomarkers for early detection of lung cancer and chemoprevention. *Eur. Respir. J.* **19**, 1151–1158 .
17. Fuentes-Arderiu, X., (2013), What is a biomarker? It's time for a renewed definition. *Clin. Chem. Lab. Med.* **51**, 1689–1690.
18. Risch, A. & Plass, C., (2008), Lung cancer epigenetics and genetics. *Int. J. Cancer* **123**, 1–7.
19. Passlick, B. *et al.*, (2002), Mediastinal lymphadenectomy in non-small cell lung cancer: effectiveness in patients with or without nodal micrometastases — results of a preliminary study. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **21**, 520–526.

20. Abdel-Raheem, M. M. *et al.*, (2002), Late adrenal metastasis in operable non-small-cell lung carcinoma. *Am. J. Clin. Oncol.* **25**, 81–83.
21. Granone, P. *et al.*, (2001), Non-small cell lung cancer with single brain metastasis: the role of surgical treatment. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **20**, 361–366.
22. Eakin, R. L. & Saunders, M. I., (2000), Non-small cell lung cancer and CHART (continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy)--where do we stand? *Ulster Med. J.* **69**, 128–136.
23. Trakhtenberg, A. K. *et al.*, (1988), Preoperative radiotherapy in the combined treatment of lung cancer patients. *Neoplasma* **35**, 459–465.
24. Nikolaos, P. *et al.*, (2014), Therapeutic modalities for Pancoast tumors. *J. Thorac. Dis.* **6**, S180–S193.
25. Kazandjian, D. *et al.*, (2016), FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *The Oncologist* **21**, 634–642.
26. Felip, E. *et al.* (2016), 193TiP: CheckMate 171: A multicenter phase 2 trial of nivolumab (nivo) in patients (pts) with stage IIIB/IV squamous cell (SQ) NSCLC who have received ≥1 prior systemic treatment. *J. Thorac. Oncol.* **11**, S141.
27. Shu, C. A. & Rizvi, N. A. (2016) Into the Clinic With Nivolumab and Pembrolizumab. *The Oncologist* **21**, 527–528.
28. Jones, P. A. & Baylin, S. B. (2007) The Epigenomics of Cancer. *Cell* **128**, 683–692.
29. Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R. & Shilatifard, A. (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* **23**, 781–783.
30. Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 27–36.
31. Bos, J. L. (1989) ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res.* **49**, 4682–4689.
32. Razin, A. & Cedar, H. (1977) Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 2725–2728.
33. Ndlovu, 'Matladi N., Denis, H. & Fuks, F. (2011) Exposing the DNA methylome iceberg. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 381–387.
34. Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. & Song, H. (2011) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145**, 423–434.
35. Laurent, L. *et al.* (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* **20**, 320–331.
36. Laird, P. W. (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 253–266.
37. Jeltsch, A. (2006) Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **301**, 203–225.
38. Kanwal, R. & Gupta, S. (2012) Epigenetic modifications in cancer. *Clin. Genet.* **81**, 303–311.
39. Robertson, K. D. (2005) DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 597–610.
40. Qian, J. & Massion, P. P. (2008) Role of Chromosome 3q Amplification in Lung Cancer: *J. Thorac. Oncol.* **3**, 212–215.
41. Yu, L. *et al.* (2007) Shox2 is Required for Chondrocyte Proliferation and Maturation in Proximal Limb Skeleton. *Dev. Biol.* **306**, 549–559.

42. Blaschke, R. J. *et al.* (1998) SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2406–2411.
43. Clement-Jones, M. *et al.* (2000) The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 695–702.
44. Blaschke, R. J. *et al.* (2007) Targeted Mutation Reveals Essential Functions of the Homeodomain Transcription Factor Shox2 in Sinoatrial and Pacemaking Development. *Circulation* **115**, 1830–1838.
45. Hong, S. *et al.* (2014) SHOX2 Is a Direct miR-375 Target and a Novel Epithelial-to-Mesenchymal Transition Inducer in Breast Cancer Cells. *Neoplasia N. Y. N* **16**, 279–290.e5.
46. Yang, T. *et al.* (2013) Elevated SHOX2 expression is associated with tumor recurrence of hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **20 Suppl 3**, S644–649.
47. Schneider, K. U. *et al.* (2011) Correlation of SHOX2 Gene Amplification and DNA Methylation in Lung Cancer Tumors. *BMC Cancer* **11**, 102.
48. Schmidt, B. *et al.* (2010) HOX2 DNA Methylation is a Biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer* **10**, 600.
49. Kneip, C. *et al.* (2011) SHOX2 DNA Methylation Is a Biomarker for the Diagnosis of Lung Cancer in Plasma: *J. Thorac. Oncol.* **6**, 1632–1638.
50. Ilse, P., Biesterfeld, S., Pomjanski, N., Wrobel, C. & Schramm, M. (2014) Analysis of SHOX2 Methylation as an Aid to Cytology in Lung Cancer Diagnosis. *Cancer Genomics - Proteomics* **11**, 251–258.
51. Darwiche, K. *et al.* (2013) Assessment of SHOX2 methylation in EBUS-TBNA specimen improves accuracy in lung cancer staging. *Ann. Oncol.* **24**, 2866–2870.
52. Mandel, P. & Metais, P. (1948) [Not Available]. *Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil.* **142**, 241–243.
53. Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I. & Kunkel, H. G. (1966) Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **45**, 1732–1740.
54. Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C. & Maurice, P. A. (1987) Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **23**, 707–712.
55. Vasioukhin, V. *et al.* (1994) Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* **86**, 774–779.
56. Chen, X. Q. *et al.* (1996) Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat. Med.* **2**, 1033–1035.
57. Nawroz, H., Koch, W., Anker, P., Stroun, M. & Sidransky, D. (1996) Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat. Med.* **2**, 1035–1037.
58. Almoguera, C. *et al.* (1988) Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**, 549–554.
59. Mulcahy, H. E. *et al.* (2000) Plasma DNA K-ras Mutations in Patients with Gastrointestinal Malignancies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **906**, 25–28.
60. Mayall, F., Jacobson, G., Wilkins, R. & Chang, B. (1998) Mutations of p53 gene can be detected in the plasma of patients with large bowel carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **51**, 611–613.

61. Yen, L.-C. *et al.* (2009) Detection of KRAS Oncogene in Peripheral Blood as a Predictor of the Response to Cetuximab Plus Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4508–4513.
62. Yoon, K.-A., Park, S., Lee, S. H., Kim, J. H. & Lee, J. S. (2009) Comparison of Circulating Plasma DNA Levels between Lung Cancer Patients and Healthy Controls. *J. Mol. Diagn. JMD* **11**, 182–185.
63. van der Drift, M. A. *et al.* (2010) Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **68**, 283–287.
64. Haber, D. A. & Velculescu, V. E. (2014) Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Cancer Discov.* **4**, 650–661.
65. Bettegowda, C. *et al.* (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra24
66. Lo, K.-W. *et al.* (1999) Analysis of Cell-free Epstein-Barr Virus-associated RNA in the Plasma of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Clin. Chem.* **45**, 1292–1294.
67. Uyar, D. & Rader, J. (2014) Genomics of Cervical Cancer and the Role of Human Papillomavirus Pathobiology. *Clin. Chem.* **60**, 144–146.
68. Schmidt, B. *et al.* (2015) Quantification of Cell-Free mSHOX2 Plasma DNA for Therapy Monitoring in Advanced Stage Non-Small Cell (NSCLC) and Small-Cell Lung Cancer (SCLC) Patients. *PLoS ONE* **10**,
69. Diederich, S. (2010) Lung cancer staging update: the revised TNM classification. *Cancer Imaging* **10**, S134–S135.
70. Dietrich, D. *et al.* Diagnostic and Prognostic Value of SHOX2 and SEPT9 DNA Methylation and Cytology in Benign, Paramalignant and Malignant Pleural Effusions. *PLoS ONE* **8**.
71. Dietrich, D. *et al.* (2013) DNA Methylation of the Homeobox Genes PITX2 and SHOX2 Predicts Outcome in Non-small-cell Lung Cancer Patients: *Diagn. Mol. Pathol.* **21**, 93–104 (2012).
72. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408.
73. Schor, A. M. *et al.* (1998) Heterogeneity in microvascular density in lung tumours: comparison with normal bronchus. *Br. J. Cancer* **77**, 946–951.
74. Diaz, J. A. *et al.* Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis. *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.* **1**, 341–348.e1 (2013).
75. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review 1975-2011.
76. Godtfredsen, N. S., Prescott, E. & Osler, M. (2005) Effect of smoking reduction on lung cancer risk. *JAMA* **294**, 1505–1510.
77. Dietrich, D. (2011) Performance evaluation of the DNA methylation biomarker SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates. *Int. J. Oncol.* doi:10.3892/ijo.2011.1264
78. Vallée, A. *et al.* (2016) Rapid clearance of circulating tumor DNA during treatment with AZD9291 of a lung cancer patient presenting the resistance EGFR T790M mutation. *Lung Cancer* **91**, 73–74.
79. Gerlinger, M. *et al.* (2012) Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–892.

80. Warton, K., Mahon, K. & Samimi, G. (2016) Methylated circulating tumor DNA in blood: power in cancer prognosis and response. *Endocr. Relat. Cancer* ERC-15-0369. doi:10.1530/ERC-15-0369
81. Buder, A., Tomuta, C. & Filipits, M. The potential of liquid biopsies. [Review]. *Curr. Opin. Oncol.* doi:10.1097/CCO.0000000000000267
82. ZHOU, C. (2015) Blood-based Tumor Markers in Lung Cancer. *Chin. J. Lung Cancer* **18**, 770–780.
83. Lofton-Day, C. *et al.* (2008) DNA Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening. *Clin. Chem.* **54**, 414–423.
84. Yörüker, E. E., Holdenrieder, S. & Gezer, U. (2016) Blood-based biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *Clin. Chim. Acta* **455**, 26–32.
85. Bidard, F.-C., Proudhon, C. & Pierga, J.-Y. Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol. Oncol.* doi:10.1016/j.molonc.2016.01.001
86. Massihnia, D. *et al.* A headlight on liquid biopsies: a challenging tool for breast cancer management. *Tumor Biol.* 1–11 (2016). doi:10.1007/s13277-016-4856-x
87. De Mattos-Arruda, L. & Caldas, C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol. Oncol.* doi:10.1016/j.molonc.2015.12.001
88. Huang, S. K. & Hoon, D. S. B. Liquid biopsy utility for the surveillance of cutaneous malignant melanoma patients. *Mol. Oncol.* doi:10.1016/j.molonc.2015.12.008
89. Cools-Lartigue, J., Spicer, J., Najmeh, S. & Ferri, L. (2014) Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4179–4194.
90. Swystun, L. L., Mukherjee, S. & Liaw, P. C. (2011) Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 2313–2321.

8 Thesen

1. Das Lungenkarzinom ist das häufigste zum Tode führende Karzinom beim Mann und das 4. Häufigste bei der Frau.
2. Nur bei jedem 8. Patienten wird der Tumor in einem kurativ zu therapierendem Stadium diagnostiziert.
3. Bisher ist kein verlässlicher Tumormarker (für Diagnose bzw. Screening) für das Lungenkarzinom im klinischen Alltag implementiert.
4. Die Hyper-Methylierung führt in zahlreichen Tumorentitäten zur Veränderung vieler für den Zellzyklus wichtiger Gene (z.B. SHOX2).
5. Die vorliegende Arbeit soll die Eignung von mSHOX2 als Tumor- / Rezidivmarker bei Patienten mit Lungenkarzinom untersuchen, mit speziellem Augenmerk auf die Veränderung der Werte nach operativer Tumorthherapie.
6. Wir konnten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Lymphknoten bzw. Fernmetastasen und der Höhe der Methylierungswerte nachweisen.
7. mSHOX2 konnte in allen vorhandenen Gewebeproben nachgewiesen werden, während die Nachweisquote über die Lavage bis zu den Plasmaproben stark abnahm.
8. Unter Therapie (Operation) konnten wir bei 9 Patienten einen Abfall der mSHOX2 Werte im Vergleich prä- zu post-operativ im Blutplasma nachweisen.
9. Das Konzept der „Liquid Biopsy“ ermöglicht Aussagen über die Kinetik der Erkrankung, die histologische Heterogenität des Tumors sowie über das Therapieansprechen.
10. Eine Eignung des quantitativen mSHOX2 Nachweises im Plasma zur Rezidiverkennung muss in größeren Studien bestätigt werden.

9 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Datum

Unterschrift

10 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Christian Georg Fuhrmann, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind.

Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Datum

Unterschrift

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christian Georg Fuhrmann
Geboren am / in	1. November 1987 / Oldenburg
Anschrift	Isernhagener Str. 50, 30163 Hannover
Telefon	0151- 42319901
Email	christian_fuhrmann@me.com
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch

Schule und Ausbildung

1994 - 1998	Grundschule – Hermann-Ehlers-Schule, Oldenburg
1998 - 2000	Orientierungsstufe Osternburg, Oldenburg
2000 - 2007	Altes Gymnasium Oldenburg, Abschluss: Abitur
2005 - 2006	Austauschjahr am Privatinternat Culford School, Bury St. Edmunds, England
Sommer 2008	Ausbildung zum Rettungssanitäter
2008-2014	Humanmedizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
November 2014	Abschluss 2. Staatsexamen Medizin & Approbation

Beruflicher Werdegang

September 2007 – Juni 2008	Zivildienst Klinikum Oldenburg
August - September 2008	Rettungssanitäter Malteser Hilfsdienst Oldenburg
2011-2014	ADAC-Ambulance-Service Halle (parallel zum Studium)
seit August 2015	Assistenzarzt in der Klinik für Urologie und urologische Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Datum

Unterschrift

12 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. Bernd Schmidt für die Überlassung des Themas und seine Bereitschaft, mich bei der Erstellung der Arbeit zu unterstützen und zu begleiten.

In gleicher Weise gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. rer. nat. Michael Fleischhacker, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Er hat mir für die Planung, Organisation und Durchführung der Dissertation überaus hilfreiche Hinweise gegeben.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Pulmologischen Labors der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, vor allem Frau Dana Reinicke, die mich bei der Bearbeitung der Proben ebenfalls tatkräftig unterstützt hat.

Mein Dank gilt darüberhinaus Frau S. Behl aus dem Klinischen Studienzentrum der Universitätsklinik Halle für ihre Beratung in Fragen der Statistik.

Ferner möchte ich an dieser Stelle auch die Gelegenheit nutzen, mich bei den Ärzten des Krankenhauses Maria Martha in Halle-Dörlau zu bedanken. Hier in besonderer Weise bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Schütte, Frau Dr. med. Sylvia Nagel und Frau Dr. med. Katharina Reuse für die gute Kooperation beim Studieneinschluss der Patienten.

In diesem Zusammenhang gilt mein Dank ebenfalls dem Studiensekretariat der Inneren Klinik des Krankenhauses Maria Martha Halle/Dörlau, insbesondere Frau Gebauer, Frau Mertins und Frau Leysring, die mich bei der Organisation der Probenabnahmen unterstützten und bei Nachfragen jederzeit ein offenes Ohr hatten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mir stets zur Seite standen, mich immer wieder motivierten und so maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich auch den Patienten danken, ohne deren bereitwillige Teilnahme an der Studie diese wissenschaftliche Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.