

Molekulare Signaturen im Blut von Patienten mit Bronchialkarzinomen

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes**

vorgelegt von

Petra Leidinger

Saarbrücken, 2009

Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes,
Universitätsklinikum Homburg/Saar

Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Chemie-, Pharmazie-, Bio- und
Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes

Tag des Kolloquiums: 28.10.2009

Amtierender Dekan: Univ.-Professor Dr.-Ing. Stefan Diebels

Mitglieder des Prüfungsausschusses:

Erstgutachter:	Prof. Dr. Eckart Meese
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Hans-Peter Lenhof
Vorsitzender:	Prof. Dr. Elmar Heinzle
promovierte akademische Mitarbeiterin:	Dr. Britta Diesel

IM LAUFE DER PROMOTION ENTSTANDENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Leidinger P, Keller A, Heisel S, Ludwig N, Rheinheimer S, Klein V, Andres C, Hamacher J, Huwer H, Stephan B, Stehle I, Lenhof HP, Meese E. Novel autoantigens immunogenic in COPD patients. *Respir Res.* 2009 Mar 12;10:20.

Leidinger P, Keller A, Ludwig N, Rheinheimer S, Hamacher J, Huwer H, Stehle I, Lenhof HP, Meese E. Toward an early diagnosis of lung cancer: an autoantibody signature for squamous cell lung carcinoma. *Int J Cancer.* 2008 Oct 1;123(7):1631-6.

Fischer U, Keller A, Leidinger P, Deutscher S, Heisel S, Urbschat S, Lenhof HP, Meese E. A different view on DNA amplifications indicates frequent, highly complex, and stable amplicons on 12q13-21 in glioma. *Mol Cancer Res.* 2008 Apr;6(4):576-84.

Meese E, Keller A, Leidinger P, Ludwig N, Heisel S, Andres C, Burgeth B, Weickert J, Klein V, Rheinheimer S, Huwer H, Stephan B, Steudel WI, Wullich B, Stöckle M, Hein M, Lenhof HP. A biotech approach for the simultaneous testing of different human diseases.
eingereicht bei Nature Biotechnology

Keller A, Leidinger P, Borries A, Wucherpfennig F, Scheffler M, Huwer H, Lenhof HP, Meese E. microRNAs in lung cancer –Studying complex fingerprints in patient’s blood by microarray experiments.
eingereicht bei Clinical Cancer Research

Stempfer R, Syed P, Pichler R, Meese E, Leidinger P, Ludwig N, Kriegner A, Vierlinger K, Noehammer C, Weinhaeusel A. Establishment of Protein Microarrays for Auto-Antibody Screening.
eingereicht bei Clinical Chemistry

Fischer U, Leidinger P, Keller A, Ketter R, Lenhof HP, Meese E. Amplicons on chromosome 12q13-21 in glioblastoma recurrences.
eingereicht bei International Journal of Cancer

Leidinger P, Keller A, Heisel S, Ludwig N, Rheinheimer S, Klein V, Andres C, Hamacher J, Huwer H, Burgeth B, Weickert J, Hein M, Staratschek-Jox A, Stephan B, Stehle I, Lenhof HP, Meese E. Identification of lung cancer with 99.91% sensitivity and 96.5% specificity by blood testing.

Manuskript zur Veröffentlichung fertig gestellt

Ludwig N, Keller A, Heisel S, Leidinger P, Klein V, Rheinheimer S, Andres C, Stephan B, Steudel WI, Burgeth B, Weickert J, Lenhof HP, Meese E. Serum based diagnostic for glioma patients: Potential and limitations.

Manuskript zur Veröffentlichung fertiggestellt

Ludwig N, Keller A, Heisel S, Leidinger P, Klein V, Rheinheimer S, Andres C, Stephan B, Steudel WI, Burgeth B, Weickert J, Lenhof HP, Meese E. Novel immunogenic antigens increase classification accuracy in meningioma to 93.84%.

Manuskript zur Veröffentlichung fertiggestellt

DANKSAGUNG

Bei Prof. Dr. Eckart Meese möchte ich mich sehr für die Themenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Hans-Peter Lenhof, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, diese Arbeit zu begutachten.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich sehr für die freundliche Aufnahme, das nette Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank gilt Sabrina Heisel, Stefanie Rheinheimer, Nicole Ludwig und Veronika Klein für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei einigen Versuchen, sowie Dr. U. Fischer für die Durchsicht dieser Arbeit und ihre Hilfe und Ratschläge bei der Durchführung der Versuche.

Dr. Andreas Keller, Claudia Andres und Prof. Dr. Hans-Peter Lenhof danke ich für die gute Kooperation.

Bei PD Dr. med. Hanno Huwer, PD Dr. med. Jürg Hamacher, Dr. med. Ingo Stehle, Dr. med. Bernhard Stephan, PD Dr. med. Andrea Staratschek-Jox bedanke ich mich für die Bereitstellung der Seren.

Bei Prof. Dr. med. Ludwig Gortner und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die Bereitstellung des Taqman und die Hilfe bei den Messungen bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

*Für
meine Familie*

	Seite
INHALTSVERZEICHNIS	i
TABELLENVERZEICHNIS	iv
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	v
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	vi
1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 IMMUNOSCREENING.....	17
2.1.1 Immunoscreening mittels serologischer Spotassays.....	17
2.1.1.1 <i>In vivo Excision</i>	18
2.1.1.2 <i>Isolation der Phagemid-DNA</i>	21
2.1.1.3 <i>Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleisäuren</i>	22
2.1.1.4 <i>DNA-Sequenzierung nach Sanger</i>	23
- <i>Sequenzierung der pBK-CMV-Plasmide</i>	24
- <i>Präzipitation und Aufreinigung der Proben nach der Sequenzierreaktion</i>	25
2.1.1.5 <i>Amplifikation der Bakteriophagen</i>	25
2.1.1.6 <i>Titerbestimmung der Bakteriophagen</i>	27
2.1.1.7 <i>Präabsorption der Seren</i>	27
2.1.1.8 <i>Durchführung der serologischen Spotassays</i>	30
2.1.1.9 <i>Auswertung der serologischen Spotassays</i>	32
2.1.1 „high density“ Proteinmacroarray-Screening.....	35
2.1.2.1 <i>Durchführung und Auswertung des Primärscreenings</i>	35
- <i>Auswertung des Primärscreenings</i>	38
2.1.2.1 <i>Durchführung und Auswertung des Sekundärscreenings</i>	38
- <i>Auswertung des Sekundärscreenings</i>	40
2.2 ANALYSE DER MICRORNA-EXPRESSION.....	45
2.2.1 Blutentnahme mittels PAXgene™ blood RNA System	45
2.2.2 Isolation von Total-RNA inklusive miRNA.....	45
2.2.3 Qualitätsüberprüfung der Total-RNA mittels Agarosegelelektrophorese.....	46
2.2.4 Anfertigung der miRNA-Microarrays.....	48
2.2.5 Grundlagen der quantitativen Real-Time PCR.....	49
2.2.5.1 <i>Reverse Transkription mit miRNA-spezifischen stem loop-Primern</i>	52

2.2.5.2	<i>Quantitative Real-Time PCR mit TaqMan[®] microRNA Assays</i>	53
2.2.5.2	<i>Relative Quantifizierung der miRNA-Expression</i>	54
3	ERGEBNISSE	56
3.1	ANALYSE DER SEROREAKTIVITÄTSPROFILE MITTELS IMMUNOSCREENING UNTER VERWENDUNG VON SEROLOGISCHEN SPOTASSAYS UND PROTEINMACROARRAYS.....	56
3.1.1	Serologischer Spotassay.....	57
3.1.1.1	<i>Frequenz der Autoantikörperantwort in den untersuchten Seren</i>	58
	- <i>Berechnung der durchschnittlichen Antigen-Antikörperreaktionen pro Serumgruppe</i>	58
	- <i>Berechnung der durchschnittlichen Reaktivität aller 82 Einzelantigene für jede Serumgruppe</i>	60
	- <i>Vergleich der durchschnittlichen Reaktivitäten der 82 Einzelantigene in den drei betrachteten Serumgruppen</i>	61
3.1.1.2	<i>Klassifikation der verschiedenen Serumgruppen anhand der Seroreaktivitätsprofile</i>	63
3.1.2	Immuoscreening von „high density“ Proteinmacroarrays.....	66
3.1.2.1	<i>Klassifikation der verschiedenen Serumgruppen anhand der Seroreaktivitätsprofile</i>	68
3.1.2.2	<i>AUC-Auswertung informativer Antigene</i>	71
3.1.2.3	<i>Frequenz der Autoantikörperantwort in den untersuchten Seren</i>	74
3.1.2.4	<i>Überprüfung der Stabilität der Seroreaktivitätsprofile</i>	79
3.2	ANALYSE DER miRNA-EXPRESSION IN PERIPHEREM BLUT UNTER VERWENDUNG VON miRNA-MICROARRAYS UND QUANTITATIVER REAL-TIME PCR.....	86
3.2.1	Analyse der miRNA-Expression mittels Microarray.....	87
3.2.1.1	<i>Identifizierung signifikant deregulierter miRNAs</i>	88
3.2.1.2	<i>Klassifikation mittels miRNA-Expressionsprofil</i>	90
3.2.1.3	<i>Untersuchung des Einflusses von Alter und Geschlecht auf das miRNA-Expressionsprofil</i>	91
3.2.2	Analyse der miRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR.....	92
4	DISKUSSION	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	113

	SUMMARY.....	114
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	115
7	ANHANG.....	124
8	Lebenslauf.....	131

TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
Tabelle 1: Stadiengruppierung nach C.F. Mountain.....	3
Tabelle 2: Im Primärscreening verwendete Serumpools.....	38
Tabelle 3: Im Spotassay untersuchte Seren mit dazugehörigen Patientendaten.....	57
Tabelle 4: Absolutwerte der durchschnittlichen Frequenz der Autoantikörperantworten.....	59
Tabelle 5: Antigene mit mindestens doppelt so hoher Seroreaktivitätsfrequenz in Plattenepithelkarzinomseren im Vergleich zu Normalseren bzw. Seren von Patienten mit Bronchialerkrankungen.....	62
Tabelle 6: Ergebnisse aller berechneten Klassifikationsszenarios.....	66
Tabelle 7: Mittels Proteinmacroarray untersuchte Seren mit dazugehörigen Patientendaten.....	68
Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Klassifikationen.....	71
Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der AUC-Berechnung für verschiedene Klassifikationsszenarios.....	73
Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Frequenzberechnung der verschiedenen Serumgruppen.....	75
Tabelle 11: Zusammenfassung der Antigene, die mit mehr als 60% der Seren von Patienten mit Lungentumor, COPD oder mit Normalseren reagierten.....	76
Fortsetzung Tabelle 11	77
Tabelle 12: Ergebnisse der AUC- und Frequenzberechnung für 13 ausgewählte Antigene und die Klassifikation Lungentumorseren versus Normalseren.....	78
Tabelle 13: Ergebnisse der AUC- und Frequenzberechnung für 10 ausgewählte Antigene und die Klassifikation Lungentumorseren versus COPD-Seren.....	79
Tabelle 14: Patientendaten zu den Lungentumorpatienten, deren Seren zur Überprüfung der Stabilität der Seroreaktivitätsprofile herangezogen wurden.....	79
Tabelle 15: Korrelation der Seroreaktivitätsprofile der verschiedenen Seren untereinander.....	81
Tabelle 16: Detaillierte Informationen zu den Lungentumorpatienten und gesunden Blutspendern, die zur miRNA-Expressionsanalyse herangezogen wurden.....	87
Tabelle 17: Zusammenfassung der 27 signifikant deregulierten miRNAs.....	88
Tabelle 18: Ergebnisse der qRT-PCR im Vergleich zu den Ergebnissen der Microarrays.....	92
Tabelle A1: Frequenz der Autoantikörperantworten für jedes einzelne Serum.....	124
Tabelle A2: Frequenz der Autoantikörperantworten für jedes einzelne Serum.....	127

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: europäische Krebsstatistik 2006..... 1

Abbildung 2: miRNA-Biogenese.....14

Abbildung 3: Vektorkarte des pBK-CMV-Vektors mit zugehöriger Sequenz der Multiple Cloning Site..... 19

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Durchführung der serologischen Spotassays.....32

Abbildung 5: Vektorkarten der verwendeten Vektoren.....36

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Durchführung des Proteinmacroarray-Sekundärscreenings..... 40

Abbildung 7: Bildauswertesystem zur automatischen standardisierten Analyse der Proteinmacroarrays.....41

Abbildung 8: Die Trennung der Intensitätswerte zweier Serumgruppen beispielhaft gezeigt für ein
fiktives Antigen.....43

Abbildung 9: Schematische Darstellung der miRNA-Microarrayanalyse.....49

Abbildung 10: Prinzip der Oligonukleotidsonden der TaqMan® microRNA Assay.....51

Abbildung 11: Ablauf der Zweischnitt-RT-PCR..... 52

Abbildung 12: Bestimmung des C_T-Wertes.....54

Abbildung 13: Durchschnittliche Reaktivität der Phagen-Klone mit den einzelnen Serumgruppen, gezeigt
für elf ausgewählte Klone.....61

Abbildung 14: Klassifikation Plattenepithelkarzinomseren versus Normalseren.....64

Abbildung 15: Klassifikation Plattenepithelkarzinomseren versus alle Kontrollseren.....65

Abbildung 16: Antigene mit der besten AUC für vier verschiedene Klassifikationsszenarien.....74

Abbildung 17: Streudiagramme der Seroreaktivität für beide Serumproben eines Patienten.....82

Abbildung 18: Korrelationsmatrix für alle 14 Serumproben der sieben Lungentumorpatienten.....83

Abbildung 19: Clusteranalyse der 49 Antigene mit der höchsten Varianz in ihren Intensitätswerten in
allen 14 untersuchten Seren.....84

Abbildung 20: Clusteranalyse der 49 Antigene mit der höchsten Varianz in ihren Intensitätswerten in
allen 14 untersuchten Seren mit binarisierten Daten.....85

Abbildung 21: Mittelwert der Intensitätswerte der 27 miRNAs mit der signifikantesten Deregulation.....89

Abbildung 22: Graphische Darstellung der Verteilung der Intensitätswerte der beiden miRNAs
hsa-miR-126 und hsa-miR-98.....90

Abbildung 23: Ergebnisse der Klassifikation und der Permutationstests der Lungentumorpatienten und
der Gesunden anhand der Analyse der miRNA-Expression in Blutzellen mittels Microarrays...91

Abbildung 24: Korrelation der Ergebnisse der qRT-PCR und der miRNA-Microarrays.....93

Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Lungentumorentwicklung in Abhängigkeit der Tumorverdopplungszeit..97

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AUC	Area under the Receiver Operator Characteristics Curve
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cDNA	complementary DNA (Komplementäre DNA)
CEA	carcinoembryonic antigen
CI	Confidence Interval (Konfidenzintervall)
cm	Zentimeter
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CRP	C-reactive protein
CYFRA 21-1	cytokeratin 19 fragment 21-1
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	double stranded DNA (Doppelstrang-DNA)
ε	Epsilon
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTM	European Group on Tumor Markers
et al.	et alii (und andere)
FDG-PET	Fluor-Deoxyglykose-Positronen-Emission-Tomographie
FSS	Feature Subset Selection
fzNs	frei zirkulierende Nukleinsäuren

g	Gramm oder Gravitation
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ID	Identifikationsnummer
IgG, IgA, IgM	Immunglobulin der Klasse G, A, M
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
λ	Wellenlänge
LB	Luria Bertani-Broth (Nährmedium)
LOH	loss of heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
m	milli- oder Meter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
μ	molar
MI	Mutual Information
min	Minute(n)
miRNA	micro-RNA
mRNA	messenger-RNA
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitro Tetrazolium BLue Chloride
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NSCLC	non-small cell lung cancer (nicht-kleinzellige Lungenkarzinome)
NSE	neuron-specific enolase
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
p	pico-
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PEC	Plattenepithelkarzinom
pfu	plaque forming units

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
%	Prozent
ProGRP	progastrin-releasing peptide
qRT-PCR	quantitative Real Time-PCR
rev	reverse (rückwärts)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROC	Receiver Operator Characteristics Curve
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription; Real-Time
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SCC antigen	squamous cell carcinoma antigen
SCLC	small cell lung cancer (kleinzellige Lungenkarzinome)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEREX	serological identification of antigens by recombinant expression cloning
SePACS	Seroreactivity Pattern Classification Service
SVM	Support Vector Machine
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
Tumor M2-PK	tumor M2-pyruvate kinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
u.U.	unter Umständen
∞	unendlich
ü.N.	über Nacht
UTR	Untranslated Region (untranslatierte Region)
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
VSN	Variance Stabilizing Normalization
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

Krebs als natürliche Todesursache steht nach Herz-Kreislaufkrankungen an zweiter Stelle der deutschen Todesursachenstatistik. Laut einer gemeinsamen Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [1] sind Prostata, Darm und Lunge die häufigsten Krebslokalisationen bei Männern. Bei Frauen sind die häufigsten Krebslokalisationen Brust, Darm und Lunge. Im Jahre 2004 standen Lungentumoren mit einer jährlichen Inzidenz von 32850 Neuerkrankungen bei Männern (14,3% aller Krebserkrankungen) und 13190 Neuerkrankungen bei Frauen (6,4% aller Krebserkrankungen) in Deutschland an dritter Stelle aller Krebserkrankungen. Die Mortalität der Lungentumoren belief sich im selben Jahr auf 28820 Sterbefälle bei Männern (26% aller krebsbedingten Sterbefälle) und 11026 Sterbefälle bei Frauen (11,2% aller krebsbedingten Sterbefälle). Somit war Lungenkrebs 2004 in Deutschland bei Männern die häufigste und bei Frauen die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache. Europaweit stand in der Statistik des Jahres 2006 die Inzidenz von Lungenkrebs an dritter Stelle (386300, 12,1%) und die Mortalität an erster Stelle (334800, 19,7%) [2]. Auch weltweit ist Lungenkrebs die häufigste krebsbedingte Todesursache. In Abbildung 1 sind die Krebsneuerkrankungen und krebsbedingten Sterbefälle in Europa für verschiedene Krebslokalisationen dargestellt [2].

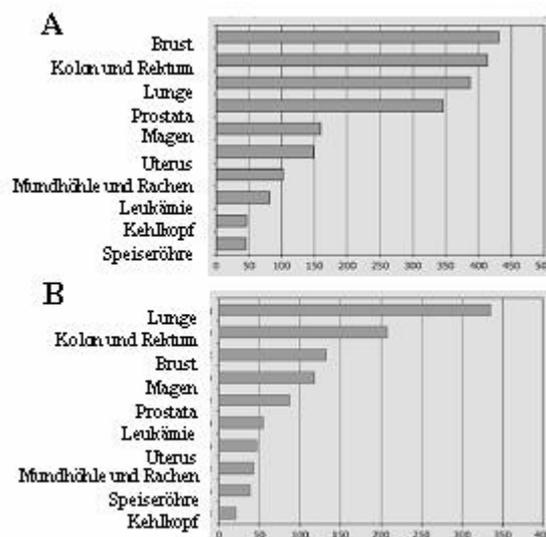


Abbildung 1: europäische Krebsstatistik 2006 (Anzahl der Personen *1000) Abbildung modifiziert nach [2]

A: Anzahl der Krebsneuerkrankungen bei Männern und Frauen in Europa im Jahre 2006 bei verschiedenen Krebslokalisationen.

B: Anzahl der krebsbedingten Sterbefälle bei Männern und Frauen in Europa im Jahre 2006 bei verschiedenen Krebslokalisationen.

Haupttrisikofaktor für die Entstehung eines Lungentumors stellt der Tabakkonsum dar. Rund 90% aller Lungentumoren bei Männern und ca. 60% aller Lungentumoren bei Frauen sind auf aktives Rauchen zurückzuführen. Das Erkrankungsrisiko steigt mit Zunahme der „packyears“ (dem Produkt aus der Anzahl der verbrauchten Zigarettenpackungen (20 Zigaretten) pro Tag und der Dauer des Rauchens in Jahren), der Teerkonzentration, sowie der Inhalationstiefe. Aber auch das Passivrauchen hat nachweislich eine stark karzinogene Wirkung. Weitere Karzinogene, die die Entstehung von Lungenkrebs begünstigen sind u.a. Stoffe wie Asbest, Cadmium, polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Radon, Nickelstaub und Quarz. Schadstoffe in der Luft tragen ebenfalls zur Lungentumorentstehung bei. Bei chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen erhöht sich das Risiko zur Lungenkarzinomentstehung um mehr als das zehnfache, wobei neben den chronisch-entzündlichen Prozessen auch eine beeinträchtigte Clearance inhalierter Karzinogene eine Rolle spielt.

Eine Einteilung der Bronchialkarzinome erfolgt aufgrund ihrer Entstehung und ihrer biologischen Eigenschaften in zwei histologisch unterschiedliche Klassen. Hierbei handelt es sich um die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome („non-small cell lung cancer“, NSCLC), die mit ca. 85-90% Inzidenz die häufigste Lungentumorentität darstellen und die kleinzelligen Bronchialkarzinome („small cell lung cancer“, SCLC), die mit einer Inzidenz von rund 10-15% weniger häufig auftreten. In der Gruppe der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome werden u.a. die Plattenepithelkarzinome, die Adenokarzinome und die großzelligen Bronchialkarzinome zusammengefasst. Die Plattenepithelkarzinome gehen von den Epithel tragenden Schleimhäuten der Bronchien aus und machen ca. 25-30% aller Bronchialkarzinome aus. Ungefähr 40% der Bronchialkarzinome sind Adenokarzinome, welche von den Schleim bildenden Drüsenzellen der Bronchien ausgehen. Die Plattenepithelkarzinome zeigen gegenwärtig eine abnehmende Inzidenz, wohingegen die Inzidenz der Adenokarzinome zunimmt. Die großzelligen Karzinome (ca. 10-15% der Bronchialkarzinome) umfassen bronchogene Karzinome, die nicht eindeutig als Plattenepithel- oder Adenokarzinom klassifiziert werden können [3].

Die Stadieneinteilung der Lungenkarzinome berücksichtigt die Größe des Primärtumors (T), sowie das Vorhandensein von Metastasen in regionären Lymphknoten (N) und Fernmetastasen (M). Im Stadium Tx ist ein Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar, ein Nachweis maligner Zellen wurde aber über Sputumanalysen oder Bronchialspülungen erbracht. Mit Tis wird ein *carcinoma in situ*, d.h. ein epithelialer Tumor

im Frühstadium ohne invasives Tumorwachstum bezeichnet. Die Stadien T1 bis T4 bezeichnen die steigende räumliche Ausdehnung des Primärtumors, sowie das Ausmaß der Infiltration von Tumorzellen in umliegende Gewebe. Das Vorhandensein regionärer Lymphknotenmetastasen bzw. die Ausdehnung der Metastasen, ausgehend von der Lokalisation des Primärtumors, wird mit N0 bis N3 angegeben. Fernmetastasen werden durch M1 angezeigt. Liegen keine Fernmetastasen vor, wird dies durch M0 angegeben. Die verschiedenen TNM-Stadien werden zusätzlich nach Mountain [4] in die klinischen Stadien 0-IV gruppiert. In den verschiedenen Stadien werden jeweils Tumoren gleicher Prognose und Therapie zusammengefasst (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Stadiengruppierung nach C.F. Mountain

Stadium	TNM
0	<i>Carcinoma in situ</i>
I A	T1N0M0
I B	T2N0M0
II A	T1N1M0
II B	T2N1M0 T3N0M0
III A	T3N1M0 T1N2M0 T2N2M0 T3N2M0
III B	jedes T N3M0 T4 jedes N M0
IV	jedes T jedes N M1

Beim kleinzelligen Lungenkarzinom wird Stadium I als „very Limited Disease“ bezeichnet, Stadium II-III werden zu „Limited Disease“ zusammengefasst und Stadium IV als „Extensive Disease“ bezeichnet.

Die histopathologische Unterscheidung in NSCLC und SCLC ist entscheidend für die Prognose und Therapie. NSCLC zeichnen sich im Gegensatz zu den SCLC durch eine langsamere Proliferationsrate, eine niedrigere Tumorverdopplungszeit, eine spätere Metastasierungstendenz und eine mäßigere Chemosensibilität aus. Die Prognose für Patienten mit Bronchialkarzinomen ist insgesamt schlecht, da Frühsymptome sowohl beim NSCLC als auch beim SCLC fehlen. Mehr als zwei Drittel der Patienten befinden sich zum Zeitpunkt der

Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Die Überlebensrate ist aber stark korreliert mit dem Zeitpunkt der Diagnose, der Tumorausdehnung, sowie mit dem histologischen Typ. Während Patienten mit NSCLC im Stadium I A und I B Fünf-Jahres-Überlebensraten von 60-80% zeigen, ist die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit NSCLC im Stadium II A und II B auf 40-50% reduziert. Patienten mit einem Bronchialkarzinom im Stadium III A bzw. III B haben nur noch eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 3-13%, im Stadium IV beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate nur noch maximal 1% [4, 5]. Derzeit gibt es keine Methode zur Früherkennung von Lungentumoren. Eine frühe Diagnose erfolgt in den meisten Fällen durch einen Zufallsbefund. Bei Verdacht auf Lungentumor werden zunächst die Anamnese und Basislaboruntersuchungen durchgeführt. Im nächsten Schritt werden vor allem bildgebende Verfahren, wie Thoraxröntgenaufnahme und Thorax-Computertomographie (Thorax-CT), eingesetzt. Bei positivem Befund wird mit Hilfe einer Bronchoskopie Gewebematerial aus dem Tumor bzw. dem zuführenden Bronchus entnommen und histologisch bzw. zytologisch untersucht. Bei gesicherter Diagnose erfolgen die nicht-invasiven und u.U. invasiven Staging-Untersuchungen zur Festlegung des Tumorstadiums und daraufhin wird der Patient therapiert. Bei fehlender histologischer und zytologischer Sicherung muss u.U. eine diagnostische Thorakotomie erfolgen.

Die Therapieansätze unterscheiden sich je nach Tumorstadium bei Diagnosestellung und nach histologischem Typ. Bei NSCLC im Stadium I und II ist die potentiell kurative Resektionsbehandlung in ihrer Prognose allen anderen Behandlungen, wie Bestrahlung und Chemotherapie, überlegen. Daran kann sich (z.B. bei N1-Erkrankung) eine adjuvante Chemotherapie anschließen. Bei Tumoren in den Stadien III A und III B hat sich eine Kombination aus Chemotherapie und Bestrahlung bewährt. Eine multimodale Therapie im Sinne einer neoadjuvanten Chemotherapie gefolgt von Resektionsbehandlung und anschließender Bestrahlung oder eine kombinierte Radiochemotherapie gefolgt von Resektion sind Alternativtherapieschemata, deren Wertigkeit noch nicht abschließend geklärt sind. Im Stadium IV ist eine palliative Chemotherapie indiziert. Das SCLC ist sehr chemosensibel, daher ist hier die Chemotherapie die bevorzugte Behandlungsmethode. Bei „Limited Disease“-Tumoren erfolgt eine Chemotherapie in kurativer Absicht und wird kombiniert mit der Bestrahlung des Tumors zur Rezidivprophylaxe. Bei peripher gelegenen SCLC ohne Lymphknotenmetastasen und ohne Fernmetastasierung („very Limited Disease“) wird häufig

eine initiale Resektion mit adjuvanter Chemotherapie kombiniert. Bei „Extensive Disease“-Tumoren erfolgt eine palliative Chemotherapie.

Zur konventionellen Chemotherapie werden vor allem Zytostatika (z.B. Cisplatin, Docetaxel, Gemcitabin, Irinotecan, Etoposid), Mitosehemmer (z.B. Vinblastin) oder zytotoxische Antibiotika (z.B. Mitomycin) eingesetzt. Neuere Therapieansätze, die sogenannten zielgerichteten Therapien („targeted therapies“), zielen darauf ab, nebenwirkungärmer ausschließlich Krebszellen anzugreifen. Es handelt sich um Wirkstoffe, die beispielsweise die Blutversorgung des Tumors unterbinden (z.B. Angiogenesehemmer Bevacizumab) oder die Signalübertragung zwischen Tumorzellen verhindern (z.B. Tyrosinkinasehemmer Gefitinib oder Erlotinib bzw. monoklonale Antikörper (gegen EGF- oder VEGF-Rezeptor) Cetuximab oder Bevacuzimab). Zielgerichtete Therapien kommen derzeit ausschließlich bei fortgeschrittenen NSCLC zur Anwendung.

Bronchialkarzinome stellen, wenn sie nicht kurativ behandelt werden können, eine der schnellsten zum Tode führenden Tumorerkrankung dar. Eine Verbesserung des allgemeinen Verständnisses für die Vielzahl an genetischen oder molekularen Aberrationen, die die Umwandlung von Normalgewebe zu neoplastischem Gewebe einleiten, könnte zur Reduktion der Tumormortalität beitragen. Untersuchungen von genetischen Aberrationen erfolgen in den meisten Fällen an Tumorgewebe, was eine vorangehende Isolation durch Biopsie oder Tumorsektion voraussetzt. Aberrationen, die in praktisch allen Lungentumoren unabhängig ihres histologischen Subtyps zu finden sind, betreffen Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens, Störungen im Retinoblastom-Signalweg und den Verlust der Heterozygotie des kurzen Arms von Chromosom 3 (loss of heterozygosity (LOH) 3p).

Mutationen im p53-Gen, das für ein Protein kodiert, dem eine Schlüsselrolle im Zellzyklus zukommt, treten am häufigsten auf. Bei annähernd 50% aller NSCLC und über 70% aller SCLC sind Mutationen im p53-Gen nachweisbar [6].

Der Retinoblastom-Signalweg ist in gesunden Zellen für die G1-S-Phase-Transition verantwortlich. Störungen im Retinoblastom-Signalweg treten v.a. in Folge von LOH, Überexpression und Promotor-Hypermethylierung der Proteine p16, Cyclin D1 und Rb auf. Das Rb-Protein ist in hypophosphoryliertem Zustand als Zellzyklus-Regulator für den G1/S-Arrest zuständig. Im ersten Abschnitt von G1 ist das hypophosphorylierte Rb-Protein an den Transkriptionsfaktor E2F gebunden, wodurch die Expression wichtiger S-Phase-Proteine blockiert wird. Nach Phosphorylierung von Rb durch einen Komplex aus Cdk4,6-Cyclin D1, 2, 3 wird E2F freigesetzt und der Übergang in die S-Phase ermöglicht. Durch Überexpression von Cyclin D1 gelangen die Zellen zu früh in die S-Phase. Bei verminderter Cyclin D1-

Expression kommt der Zellzyklus vor der S-Phase zum Erliegen. Das Protein p16 ist ein Inhibitor des Cdk4,6-Cyclin D1, 2, 3-Komplexes. Es bindet spezifisch an Cdk4 und Cdk6, wodurch die Phosphorylierung von Rb unterbunden und die S-Phase nicht gestartet wird. Allerdings kann p16 die Proliferation nicht unterbinden, wenn den Zellen Rb fehlt. Zwischen dem Verlust des Rb-Proteins, der LOH von INK4A (codierend für p16) und der Überexpression von CCDN1 (codierend für Cyclin D1) besteht eine inverse Korrelation. Sowohl die Überexpression von CCDN1, als auch der Verlust des p16-Proteins führen zu einer persistierenden Hyperphosphorylierung des Rb-Proteins und somit zum Verlust des G1/S-Zellzykluskontrollpunktes. Studien zeigten bei 92% aller untersuchten hochmalignen neuroendokrinen Lungentumoren eine fehlende Rb-Expression, was mit einer verkürzten Überlebenszeit einherging [7]. In einer anderen Studie an NSCLC trat die fehlende Rb-Expression seltener auf (15%), dagegen kam die LOH von INK4A hier häufiger vor (70%) [8].

Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 liegen verschiedene putative Tumorsuppressorgene, wie z.B. FHIT, RASSF1A und SEMA3B. Der Verlust eines oder mehrerer Allele dieses chromosomalen Abschnitts, also der Verlust der Heterozygotie, liegt in mehr als 80% aller Lungentumoren vor. Eine Studie an Rauchern und Nichtrauchern ergab zudem eine erhöhte Frequenz an Chromosomenbrüchen in FRA3B bei aktiven Rauchern [9]. Das Gen FHIT (fragile histidine triad) liegt im „fragile site“-Lokus FRA3B. Eine „fragile site“ ist eine Stelle innerhalb eines Chromosoms, an der aufgrund ihrer speziellen Basenzusammensetzung gehäuft Chromosomenbrüche auftreten. Das FHIT-Protein interagiert mit Proteinen, die u.a. an der DNA-Replikation beteiligt sind [10]. Für FHIT wird außerdem eine Rolle in der Apoptose und in der Wachstums-Inhibierung von Tumorzellen postuliert [11]. Das RASSF1A-Gen ist in vielen Tumoren epigenetisch inaktiviert. Die Induktion der RASSF1A-Expression in Lungentumorzellen führte zu einem Wachstumsarrest, nicht aber zu Apoptose. Die RASSF1A-Expression korrelierte mit der Inhibierung der Cyclin D1 Akkumulation und somit der Regulation des Zellzyklus über die Retinoblastom-Signalkaskade [12]. Mit *in vivo*-Experimenten an einer humanen NSCLC-Zelllinie wurde die Interaktion von RASSF1 mit E4F1, einem ebenfalls an der Zellzyklus-Progression beteiligten Phosphoprotein, nachgewiesen [13]. Eine 2008 erschienene Studie hat gezeigt, dass die Hypermethylierung des RASSF1A-Promotors bei NSCLC, unabhängig von Stadium und histologischen Charakteristika des Tumors, bzw. Alter, Geschlecht, Rasse und Raucherstatus des Patienten, mit einer Rekurrenz ist [14].

Die Rolle von SEMA3B bei der Lungentumorentstehung ist noch weitestgehend unklar. Da es aber ebenfalls im chromosomalen Bereich 3p liegt, wird es als potentielles Tumorsuppressorgen diskutiert [15]. Untersuchungen an Mausmodellen ergaben, dass SEMA3B-exprimierende Ovarialkarzinomzellen eine verminderte Tumorigenität aufweisen [16].

Analysen zu genetisch-pathologischen Aberrationen in Tumorgewebe tragen zwar sehr zum allgemeinen Verständnis der Tumorentstehung bei, eignen sich jedoch keinesfalls zur Früherkennung eines Tumors, da sie an zuvor isoliertem Tumorgewebe erfolgen. Der Nachweis genetischer Veränderungen kann aber bei der Therapieauswahl, zur Erstellung einer Prognose oder zur Bestimmung des Metastasierungsrisikos von Bedeutung sein.

Eine Diagnose des Bronchialkarzinoms erfolgt, wie bereits oben erwähnt, heutzutage meist durch Zufallsbefund bei Thoraxröntgenaufnahmen bzw. -CT. Allerdings werden auch mit diesen Methoden nicht alle Tumoren erfasst. Beispielsweise ergab eine von Sone et al. durchgeführte retrospektive Untersuchung von 44 mittels CT gesicherten Lungentumoren, dass 79% der Tumoren mit einer Ausdehnung von bis zu 20 mm durch Röntgenaufnahmen nicht detektiert wurden, so dass die Thoraxröntgenaufnahme als Screeningmethode ausscheidet [17]. In dieser Studie betrug die Korrekturklassifizierungsrate 61%, die Sensitivität 23% und die Spezifität 96% [18]. Die zufällige Erkennung von Lungenkrebs im Frühstadium (klinisches Stadium I) im Röntgenbild ist, wie oben gezeigt, schwierig, so dass Rundherde zwischen 5-10 mm leicht übersehen werden können. Es hat sich gezeigt, dass durch Thorax-CT deutlich kleinere Rundherde (5-20 mm) erfasst werden als es mit einer Thoraxröntgenaufnahme möglich ist [19]. Die Sensitivität eines CT beträgt durchschnittlich 67% [20]. Diese vergleichsweise hohe Sensitivität wird jedoch überschattet von einer hohen Rate falsch-positiver Scans (20%), die schlimmstenfalls unnötige chirurgische Interventionen nach sich ziehen [21-24]. Aufgrund der Strahlenbelastungen und hoher Falsch-Positiv-Rate kann man schlussfolgern, dass CTs als Screeningmaßnahme einer asymptomatischen Risikopopulation wahrscheinlich nicht geeignet sind [25, 26]. Eine weitere Möglichkeit der Tumordiagnostik stellt die Fluor-Deoxyglykose-Positronen-Emission-Tomographie (FDG-PET) dar. Die FDG-PET erlaubt die bildliche Darstellung von Stoffwechsellvorgängen. Dem Patienten wird ein Radiopharmakon, meist ^{18}F -FDG, injiziert, das von den Körperzellen wie normale Glukose aufgenommen, jedoch nicht weiter verstoffwechselt wird und sich daher in den Zellen anreichert. Dieses Anreicherungsprinzip hat man sich in der Tumordiagnostik zu Nutze gemacht, da Tumorzellen eine erhöhte Stoffwechselrate und somit erhöhten Glukose-

Umsatz aufweisen, dementsprechend auch mehr FDG anreichern, die mit PET sichtbar gemacht werden kann. Die Sensitivität der PET liegt zwischen 84–87%, die Spezifität liegt zwischen 88–93% und die Korrekturklassifizierungsrate liegt durchschnittlich zwischen 87–90% [20]. Ein enormer Nachteil der FDG-PET liegt aber darin, dass FDG auch in Entzündungsherden angereichert wird und diese somit mit PET zu einem falsch positiven Tumorbefund führen könnten [27]. Ein weiterer Nachteil sind die enormen Kosten einer PET-Untersuchung. Eine PET ist daher nur bei nachgewiesenem Nutzen indiziert und eignet sich eher für ein Monitoring während oder nach Therapie bzw. zur Untersuchung eventueller Rezidive oder Metastasen.

Als neuere Methoden zur Tumordiagnostik bieten sich für Lungentumoren beispielsweise auch Untersuchungen an Atemexhalat oder an bronchoalveolärer Lavage (BAL) an. Das Atemexhalat besteht aus einer gasförmigen und einer flüssigen Phase, d.h. es können entweder gasförmige oder in aerosolisierte Tröpfchen (Atemkondensat) eingeschlossene Substanzen gemessen werden. Bei der nicht-invasiven Gewinnung des Atemexhalates atmet der Patient in Ruhe über 10-15 Minuten in ein Mundstück durch ein Nichtrückstromventil, in dem Ein- und Ausatemluft separiert werden. Die Ausatemluft kann durch ein Kühlsystem geleitet und das entstehende Kondensat gesammelt werden. Im Kondensat können auch größere Moleküle, wie Proteine und DNA, enthalten sein [28-32]. Zur Gewinnung der BAL muß eine Bronchoskopie durchgeführt werden. Hierbei wird über einen Katheter das zu untersuchende Lungensegment mittels isotonischer Kochsalzlösung gespült. Die bronchoalveoläre Spüllösung wird über selbigen Katheter wieder aspiriert. Die Diagnose von Lungentumoren mittels Untersuchungen an BAL ist nachweislich möglich [33]. Da die Gewinnung der BAL aber invasiv über eine Bronchoskopie erfolgt, ist die BAL-Untersuchung als Screeningmaßnahme für asymptomatische Risikopatienten ungeeignet. Die Bronchoskopie ist nur bei bestehendem Verdacht auf einen Lungentumor indiziert. Die Tumorzellen können dabei mittels BAL oder aber auch mittels Biopsie nachgewiesen werden. Eine Untersuchung der BAL führt in 40- 65% der Fälle zur Diagnose. Die Treffsicherheit der Bronchoskopie allein liegt bei bronchoskopisch sichtbaren Tumoren zwar bei 80-85%, bei kleineren nicht sichtbaren Tumoren dagegen nur bei ca. 30-55% [33, 34].

Im Allgemeinen müssen ideale Tumormarker verschiedene Kriterien erfüllen: sie müssen spezifisch und sensitiv sein, zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorgenese nachweisbar sein und eine lange Halbwertszeit aufweisen. Um diese Biomarker für ein Screening von

Risikogruppen anwenden zu können, sollten die Nachweismethoden im Speziellen auch minimal-invasiv und mit geringem Kostenaufwand verbunden sein. Auf der Untersuchung von Blut basierende Methoden bieten sich hier an. Hierbei könnte die Diagnostik sowohl auf der Analyse von Serumbestandteilen als auch auf der Analyse der zellulären Bestandteile des Blutes aufbauen. Im Serum sind neben Proteinen (wie z.B. Antikörper) auch frei zirkulierende Nukleinsäuren (fzNs) zu finden. Die zellulären Bestandteile des Blutes setzen sich v.a. aus den myeloiden und den lymphatischen Zellen zusammen. Bei Vorliegen eines Tumors findet man aber auch zirkulierende Tumorzellen im Blut [35, 36]. Untersuchungen an den zellulären Bestandteilen des Blutes können ebenfalls auf Proteinen oder Nukleinsäuren basieren. Die Analyse von Blutbestandteilen ist in zunehmendem Maße Gegenstand vieler aktueller Studien zur Diagnose, Prognose oder Kontrolle des Therapie- bzw. Krankheitsverlaufes von Tumoren [37-42]. Da Lungentumoren im häufigsten Fall erst in fortgeschrittenen Stadien erkannt werden, wenn es für eine kurative Therapie meist zu spät ist, ist hier die Identifizierung von Früherkennungsmerkmalen besonders wichtig. Im Jahre 1997 wurde deshalb die „European Group on Tumor Markers“ (EGTM, <http://egtm.eu/>) gegründet, deren Ziel die Zusammenstellung von Informationen über Protein-Biomarker und die Erstellung von Richtlinien für den klinischen Einsatz dieser Biomarker ist. Zu den Serum-Biomarkern, die bisher bei Lungentumoren klinisch zum Einsatz kommen, gehören die Proteine carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin 19 fragment 21-1 (CYFRA 21-1), squamous cell carcinoma antigen (SCC antigen), neuron-specific enolase (NSE), progastrin-releasing peptide (ProGRP), tumor M2-pyruvate kinase (Tumor M2-PK) und C-reactive protein (CRP) [43]. Grundsätzlich ist allerdings zu beachten, dass die allermeisten Tumormarker nicht spezifisch für eine bestimmte Krebserkrankung sind und deshalb deren Einsatz für diagnostische Zwecke ungeeignet ist. Zur Prognose, dem Monitoring oder der Rezidivüberwachung sind sie dagegen eher geeignet [44]. Laut Deutschem Krebsforschungszentrum (DKFZ) ist CEA beispielsweise Tumormarker u.a. bei Dickdarm-, Magen-, Brust- und Lungenkrebs. Der Marker SCC findet bei allen Tumorarten Anwendung, die von Plattenepithelzellen ausgehen, d.h. Karzinome von Gebärmutterhals, Hals-Nasen-Ohren-Trakt, Speiseröhre, Enddarm und Lunge. Oben genannte Biomarker können aber zum einen bei verschiedenen Krebsarten, zum anderen aber auch bei einer Reihe gutartiger Erkrankungen erhöhte Werte aufweisen. Der SCC-Spiegel kann neben den Plattenepithelkarzinomen auch bei gutartigen Erkrankungen wie z.B. Niereninsuffizienz, gynäkologischen Erkrankungen, Hautkrankheiten (Schuppenflechte, Ekzem), gutartigen Hals-Nasen-Ohren-Tumoren, Leberzirrhose, Pankreatitis (Bauchspeicheldrüsenentzündung) sowie

Lungenerkrankungen erhöht sein. NSE kann ebenfalls bei gutartigen Lungenerkrankungen, aber auch bei Blutkörperchen- oder Blutplättchenzerfall erhöhte Werte aufweisen. Aus diesen Gründen lässt der alleinige Nachweis eines Markers im Blut auch keinen eindeutigen Rückschluss auf das Vorliegen eines Tumors zu. Zur Frühdiagnose von Lungenkrebs, aber auch von anderen Krebserkrankungen, etwa im Rahmen von Reihenuntersuchungen gesunder, beschwerdefreier Personen, sind die bisher bekannten Tumormarker aufgrund zu niedriger Sensitivität und Spezifität deshalb nicht geeignet [45]. Wie oben erwähnt können sie alternativ für die Prognose und eine Verlaufsbeurteilung, zur Erfassung der Therapieeffizienz oder als Rezidivkontrolle herangezogen werden.

Derzeit gibt es für Lungentumoren keine Biomarker, die für ein Screening von Risikopatienten angewendet werden könnten. Wie bereits erwähnt sollten solche Biomarker v.a. frühzeitig nachweisbar und v.a. einfach zugänglich sein. Autoantikörper erfüllen viele der Kriterien, die ein idealer Tumormarker mit sich bringen sollte. Die am häufigsten nachgewiesenen Autoantikörper, die gegen Tumor-assoziierte Antigene gerichtet sind, gehören zum Immunglobulin Typ G [46]. Diese haben eine lange Halbwertszeit von 23 Tagen, kommen in einer relativ hohen Konzentration im Blut vor (9,5-12,5 mg/ml) und sind relativ einfach und kostengünstig nachweisbar und das sogar bis zu fünf Jahre vor dem Auftreten erster Symptome [47-49]. Aber auch hier gilt, dass der Nachweis einzelner Antigene wenig spezifisch und sensitiv ist. Dies wurde im Fall des Bronchialkarzinoms durch verschiedene Studien deutlich, die sich mit dem Nachweis einzelner Tumor-assoziiertes Antigene auseinandersetzten [50-55]. Jüngst erschienene Studien zu Hirntumoren oder Prostatakarzinomen versuchten dieser Problematik durch die Verwendung eigens zusammengestellter Sets, bestehend aus verschiedenen immunogenen Antigenen, entgegen zu wirken [56, 57]. Auch bei Bronchialkarzinompatienten lieferte der Vergleich von Seroreaktivitätsprofilen mit gesunden Probanden in diesem Zusammenhang erste Hinweise darauf, dass es möglich sein könnte, anhand eines Seroreaktivitätsprofils Lungenkrebs zu diagnostizieren [58-61].

Mit vorliegender Arbeit soll ein Beitrag zum Verständnis Tumor-assoziiertes Immunantworten geleistet werden. Im Speziellen soll untersucht werden, ob es möglich ist, anhand von Seroreaktivitätsprofilen Unterschiede zwischen Lungentumorpatienten und gesunden Blutspendern, bzw. Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen, festzustellen. Hier sollen u.a. Antworten auf folgende Fragen gefunden werden: Unterscheiden sich die durchschnittlichen Frequenzen der Autoantikörperantworten zwischen Patienten mit

Lungentumoren, Patienten mit Bronchialerkrankungen und gesunden Blutspendern? Ist ein Seroreaktivitätsprofil dazu geeignet, maligne von benignen Lungenerkrankungen zu trennen? Wie hoch sind die Korrektklassifizierungsrate (im Folgenden als Genauigkeit bezeichnet), die Spezifität und die Sensitivität? Gibt es Klone, die besonders gut zu bestimmten Klassifizierungen beitragen? Verändern sich Seroreaktivitätsprofile nach Tumorresektion oder bleiben sie über einen längeren Rezidiv-freien Zeitraum stabil?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden zwei verschiedene Plattformen gewählt. Zum einen wurden in einer „proof-of-principle“-Studie mit Hilfe von serologischen Spotassays Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge mit Seren von Patienten mit Bronchialerkrankungen (COPD/Emphysem, Pneumonie) und Seren gesunder Blutspender verglichen. Die serologischen Spotassays beruhen auf der Untersuchung rekombinanter Phagen. Diese Phagen-Klone wurden in vorangegangenen Arbeiten mit Hilfe des SEREX-Verfahrens (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) isoliert und identifiziert [56, 62-67]. Insgesamt wurden 82 Klone untersucht.

In einem zweiten Versuchsansatz mittels Proteinmacroarrays sollte die Zahl der potentiellen Tumormarker durch die Analyse einer größeren Anzahl von Antigenen unter Verwendung von Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom unterschiedlicher histologischer Typen (NSCLC (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, großzelliges Bronchialkarzinom) und SCLC) signifikant erhöht werden. In einem Primärscreening wurden zuvor mehr als 38000 rekombinant exprimierte Proteine aus einer cDNA-Bank aus fötalem Hirngewebe mit Serumpools von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen, Nicht-Tumorerkrankungen und von gesunden Probanden gescreent und ein speziell angefertigter Macroarray mit den daraus resultierenden insgesamt 1827 positiven Klonen zusammengestellt. Mit diesen Proteinmacroarrays wurden dann Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom unterschiedlicher histologischer Typen, sowie Seren von Patienten mit verschiedenen Bronchialerkrankungen und Seren gesunder Blutspender auf ihr Seroreaktivitätsprofil untersucht. Außerdem wurden die Seren von sieben Lungentumorpatienten analysiert, deren präoperative Blutentnahme zwischen 1998 und 2000 stattfand und die bis heute Rezidiv-frei überlebt haben. Diesen Patienten wurde 2008 erneut Blut entnommen. Nach der Hybridisierung der Proteinmacroarrays sollen nun jeweils die Seroreaktivitätsprofile beider Blutproben jedes Patienten, aber auch die Profile aller Patienten bzw. Blutproben untereinander verglichen werden.

Untersuchungen an Nukleinsäuren gewinnen ebenfalls immer mehr an Bedeutung in der Tumorforschung. Hierbei gibt es die Möglichkeit Nukleinsäuren aus Gewebe oder Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blut, zu isolieren. Die Analyse der Nukleinsäuren im Blut von Tumorkranken eröffnet neue Möglichkeiten zur minimal-invasiven Biomarkeridentifizierung. In der DNA können beispielsweise, ohne die Notwendigkeit einer Biopsie, Tumor-spezifische genetische Aberrationen, wie z.B. LOH, Punktmutationen, Integration viraler Genome in die DNA und epigenetische Veränderungen an freier DNA, nachgewiesen werden [39]. RNA ist im Vergleich zu DNA sehr instabil und wird daher relativ schnell durch Ribonukleasen (RNasen) degradiert. Ein großer Vorteil RNA-basierter Assays im Vergleich zu DNA-basierten Assays besteht aber darin, dass die RNA-Expression meist Tumor- und/oder Gewebe-spezifisch ist [38, 68].

Im Jahre 1948 wurde erstmals die Existenz frei zirkulierender Nukleinsäuren (fzNs) im Serum/Plasma gesunder Spender beschrieben [37]. Diese frei zirkulierenden Nukleinsäuren stammen von Körperzellen, die beispielsweise im Zuge von natürlichen Alterungsprozessen der Apoptose unterliegen [69]. Im Jahre 1977 wurden von Leon et al. erstmals fzNs im Serum/Plasma von Tumorkranken nachgewiesen [70]. Im Serum/Plasma von Tumorkranken ist die Konzentration der fzNs im Vergleich zu gesunden Blutspendern vier- bis zehnfach erhöht [71, 72]. Man geht einerseits davon aus, dass vom Tumor abgelöste Zellen in den Blutstrom einfließen. Diese haben aber oft kein ausreichendes metastasierendes Potential, weshalb sie dann in den programmierten Zelltod übergehen [36]. Dabei wird die zelluläre DNA bzw. RNA ins Serum/Plasma freigesetzt. Andererseits kommt es innerhalb des Tumors durch zentralen Sauerstoffmangel oder andere pathologische Vorgänge zu Nekrosen, wobei die Nukleinsäuren der hierbei absterbenden Tumorzellen ebenfalls ins Serum/Plasma gelangen [39]. Von Schmidt et al. wird die Kombination von fzNs mit verschiedenen anderen Biomarkern als neuer, viel versprechender Ansatz zur Früherkennung von Lungentumoren diskutiert [73]. Auch für Lungentumoren gibt es diverse Studien zu fzNs im Serum/Plasma. Beispielsweise konnten Kopreski et al. im Serum von 43% der untersuchten Lungentumorkranken erfolgreich die mRNA nachweisen, die für ein Zielprotein einer Lungentumor-spezifischen Therapie kodiert. Im Vergleich dazu wurde diese mRNA nur bei 12% der gesunden Probanden gefunden [74]. Außerdem gelang in einer anderen Studie der Nachweis der mRNA des Gens „Human telomerase reverse transcriptase (hTERT)“ ausschließlich im Serum von 12% der Lungentumorkranken, nicht jedoch bei gesunden Blutspendern. Für dieses Gen ist bereits bekannt, dass es in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert wird [75]. Desweiteren schrieben Camps et al. der Detektion von K-ras-

Punktmutationen in frei zirkulierender Serum-mRNA eine mögliche Signifikanz für diagnostische oder prognostische Zwecke zu [76]. Neben den frei im Serum oder Plasma zirkulierenden Nukleinsäuren werden sowohl von normalen Körperzellen, als auch von Tumorzellen Nukleinsäuren (v.a. RNA) in Mikrovesikeln, den sogenannten Exosomen, in den Blutstrom ausgeschleust [77, 78]. Bisher ist die Funktion nicht eindeutig geklärt. Es wird einerseits vermutet, dass sie lediglich der Müllentsorgung dienen, andererseits werden ihnen auch „kommunikative“ Funktionen zugeschrieben. Baj-Krzyworzeka et al. konnten bereits zeigen, dass die Exosomen dem Informationstransfer von den Tumorzellen zu den Blutzellen dienen und so beispielsweise Angiogenese-Prozesse steuern [79, 80]. Nukleinsäuren können außerdem auch aus den zellulären Bestandteilen des Blutes gewonnen werden. Wie oben bereits erwähnt, „kommunizieren“ die Tumorzellen u.a. über Exosomen mit den Blutzellen und führen somit zu einer Tumor-induzierten Änderung in der Transkription der Blutzellen. Das Transkriptom, also die Gesamtheit der RNA, bietet daher eine auf vielerlei Art und Weise leicht zugängliche Quelle zur Identifizierung neuer Tumor-spezifischer Biomarker. Einige RNA-Spezies, wie z.B. Micro-RNAs (miRNA), zeichnen sich zusätzlich dadurch aus, dass sie aufgrund noch unbekannter Mechanismen relativ unempfindlich für einen Abbau durch RNasen sind. Bei miRNAs handelt es sich um eine natürlich vorkommende, hoch konservierte Familie Nicht-Protein kodierender, einzelsträngiger RNAs einer Länge von 17-25 Nukleotiden, die sowohl bei Tieren als auch in Pflanzen und Viren vorkommen. Reife miRNAs entstehen aus doppelsträngigen Vorläufer-RNAs mit einer Länge von 500-3000 Nukleotiden, den sogenannten pri-miRNAs, die von den miRNA-Genen codiert werden. Diese pri-miRNAs enthalten eine oder mehrere Stem-loop-Strukturen, die noch im Zellkern von einem Multiproteinkomplex mit den Kernkomponenten Drosha und DGCR8/Pasha entfernt werden. Hierbei entsteht die pre-miRNA, eine kürzere hairpin-Vorläufer-miRNA von ca. 70-100 Nukleotiden. Nach dem Kernexport wird die immer noch doppelsträngige pre-miRNA durch die Ribonuklease Dicer weiter prozessiert, wobei zwei kurze Einzelstränge entstehen. Ein Einzelstrang wird zur reifen miRNA, der andere Einzelstrang (miRNA star) wird normalerweise schnell degradiert [81]. Reife miRNAs regulieren die Proteinexpression durch direkte Komplementarität ihrer 5'-Region, genannt „seed-Sequenz“ mit der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) ihrer Ziel-mRNA. Die Regulation der Genexpression erfolgt durch Interaktion der miRNA mit dem Chromatin [82]. Ungefähr 3% aller menschlichen Gene codieren für miRNAs, die jeweils mehrere hundert verschiedene mRNAs binden und regulieren können, weshalb vermutet wird, dass etwa ein Drittel aller humanen Protein-codierenden Gene durch miRNAs reguliert werden [82-84]. Ihre physiologischen

Aufgaben liegen in der Beteiligung an der Regulation fast aller zellulären Prozesse, wie der Zellentwicklung, der Zelldifferenzierung, der Zellkommunikation, der Zellproliferation, dem Zellmetabolismus, dem Zelltod und der Hämatopoese. Die Biogenese der miRNA und die Regulationsmechanismen, über die die miRNAs die Genexpression beeinflussen, sind in Abbildung 2 dargestellt.

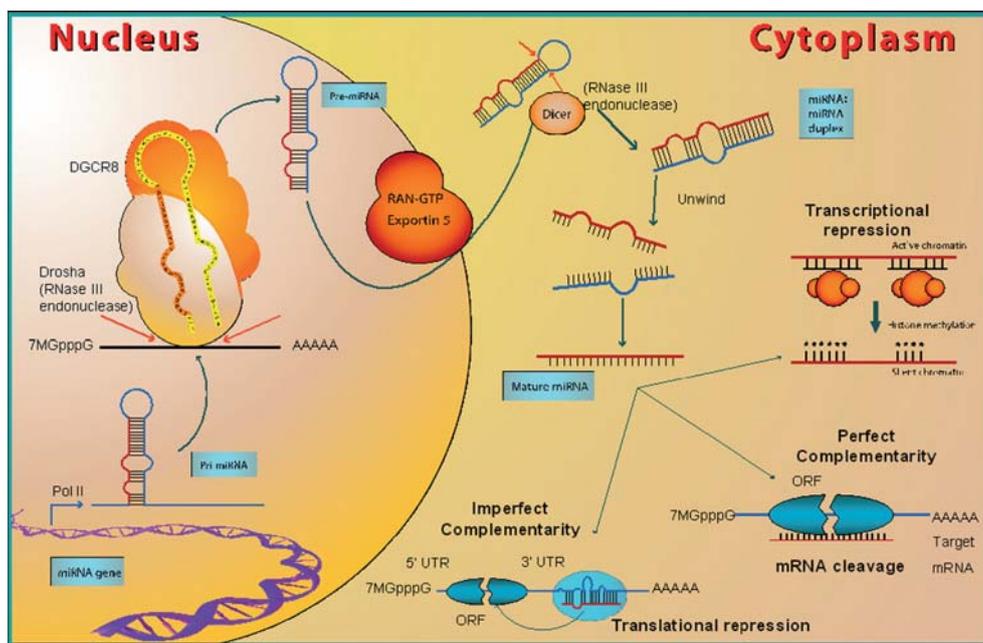


Abbildung 2: miRNA-Biogenese (Bagnyokova et al exp oncol 2006 [82])

Die erste miRNA wurde 1993 bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt [85]. Seither sind mehr als 8600 weitere miRNAs in verschiedensten Organismen gefunden und in der Datenbank miRBase niedergelegt worden (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>, [86]). Insgesamt 695 humane miRNAs sind zur Zeit bekannt. Das Expressionsprofil der miRNAs ist bei verschiedenen Krankheiten nachweislich verändert. Vor ca. sechs Jahren wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen der miRNA-Expression und Krebs hergestellt [87]. Die gleiche Arbeitsgruppe hat zwei Jahre später außerdem gezeigt, dass miRNA-Gene häufig in fragile sites oder Stellen im Genom liegen, die in Tumoren häufig deletiert oder amplifiziert sind [88]. In verschiedenen Studien zur miRNA-Expression in Tumorgewebe wurde seither nachgewiesen, dass die miRNA-Expression im Tumor im Vergleich zu Normalgewebe dereguliert ist [89-91]. Ob diese deregulierte miRNA-Expression eine Folge oder der Auslöser der malignen Transformation darstellt, ist aber bisher ungeklärt [84]. Bis heute sind drei Ursachen beschrieben, die zu einer deregulierten miRNA-Expression führen können. Zum einen sind mehr als die Hälfte aller miRNAs in Tumor-assoziierten genomischen Bereichen lokalisiert. Hierzu gehören genomische Bereiche, die Tumorsuppressorgene

enthalten und häufig deletiert sind (z.B. LOH), Bereiche die häufig amplifiziert sind und Onkogene beinhalten oder fragile Stellen im Genom, die häufig von Translokationen, Deletionen oder Schwester-Chromatid-Austausch betroffen sind. Auch epigenetische Mechanismen wie Hyper- oder Hypomethylierung und Histon-Modifikationen können zu einer veränderten miRNA-Expression führen [89]. Als dritte Ursache werden Anomalien in der miRNA-Prozessierung diskutiert. Die Protein-Maschinerie, die in die Biogenese der miRNA involviert ist, ist komplex. Änderungen dieser Proteine können dramatische Auswirkungen auf die miRNA-Prozessierung haben [89, 92]. Beispielsweise zeigten Kumar et al., dass ein Knockdown der Proteine Drosha und Dicer die Tumorigenese fördert [93]. Dies wurde auch im Speziellen für Lungentumoren gezeigt, bei denen eine reduzierte Dicer-Expression mit einer schlechteren Prognose einherging [94]. Die miRNA-Expression wurde bisher in verschiedensten Tumorarten untersucht. Hierzu zählen u.a. Brustkrebs, Hirntumoren, Leberkarzinome und chronisch lymphatische Leukämie [95-98]. Auch für Lungentumoren ist bekannt, dass häufig eine deregulierte miRNA-Expression vorliegt [99]. Derzeit gibt es aber nur wenige Studien, die sich mit der miRNA-Expression in Lungentumoren befassen [99-103]. Diese beruhen v.a. auf der Untersuchung von miRNA-Signaturen in Lungentumorgewebe. Dies setzt invasive Methoden wie eine Tumorsektion oder eine Biopsie mittels Bronchoskopie voraus und kann deshalb auch nur bei Vorliegen einer Verdachtsdiagnose durchgeführt werden. Jüngste Studien haben aber gezeigt, dass miRNAs auch im Blutserum von Tumorpatienten, entweder frei zirkulierend oder in Exosomen verpackt, sehr gut nachweisbar sind [77, 104-108]. Bisher sind aber nur zwei Studien erschienen, die die miRNA-Expression im Blut von Lungentumorpatienten untersucht haben [104, 106]. Auch hier gab es, wie bei den Untersuchungen an Gewebe, deutliche Unterschiede zwischen dem Profil von Lungentumorpatienten und dem von gesunden Blutspendern. Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften (Resistenz gegenüber RNasen, Nachweisbarkeit im Blut) besitzen miRNAs ein großes Potential für die Entwicklung zukünftiger diagnostischer Tests.

In vorliegender Arbeit soll mittels Microarrays die Expression aller in der miRBase niedergelegten humanen miRNAs im Blut von Lungentumorpatienten untersucht und mit der miRNA-Expression im Blut gesunder Spender verglichen werden. Hiermit soll ein Beitrag zur Identifizierung einfach zugänglicher Biomarker geleistet werden. Im Speziellen sollen Antworten auf folgende Fragen gefunden werden: Gibt es Unterschiede in der miRNA-Expression im Blut von Lungentumorpatienten und gesunden Probanden? Wie sehen diese

Unterschiede aus? Ist es möglich, anhand eines miRNA-Expressionsprofils Lungentumorpatienten von Gesunden zu trennen?

Für Lungentumoren als häufigste Tumor-bedingte Todesursache könnte die Kombination verschiedenster Biomarker für eine verbesserte Diagnose, Therapie und Prognose von größtem Nutzen sein [101]. Die in vorliegender Arbeit erstellten Seroreaktivitäts- und miRNA-Expressionsprofile sollen einen Beitrag zur Realisierung dieser Ziele leisten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Immunoscreening

Das Immunoscreening dient zur Identifizierung von körpereigenen Antigenen (Autoantigenen), gegen die im Serum des Patienten Antikörper nachgewiesen werden können. Hierzu wird Poly(A)-mRNA aus Gewebe isoliert und daraus eine cDNA-Expressionsbibliothek hergestellt. Diese Expressionsbibliothek kodiert für eine Vielzahl von Proteinen, unter denen sich auch potentielle Autoantigene befinden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Systeme des Immunoscreenings angewendet. Sie unterscheiden sich in der Art der Antigen-Expression. Zum einen wurde ein Bakterien/Virus-Expressionssystem (serologische Spotassays) und zum anderen ein rein bakterielles Expressionssystem (Proteinmacroarray Screening) eingesetzt.

2.1.1 Immunoscreening mittels serologischer Spotassays

Mittels serologischer Spotassays ist es möglich, eine Vielzahl von cDNA-Klonen, die in vorangegangenen SEREX-Screenings (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) bereits als immunogen identifiziert wurden, mit verschiedenen Seren zu screenen. Zur Durchführung des SEREX wird Poly(A)-mRNA aus Gewebe isoliert, um eine cDNA-Expressionsbibliothek in ZAP Express Vektor-Armen von Lambda-Phagen (Stratagene) herzustellen. Mit dieser Phagenbibliothek werden *E.coli* XL1-Blue MRF⁻-Bakterienzellen (Stratagene) infiziert, auf einer NZCYM-Agarplatte ausplattiert und mittels IPTG (AppliChem) die Proteinexpression induziert. Diese Proteine werden an eine Nitrozellulosemembran (Duralose-UV Membran, Stratagene) gebunden und mit Serum hybridisiert. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen Phagen-kodierte Proteine kann mittels alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-human IgG-Antikörpern (Dianova) in einer anschließenden Farbreaktion mit NBT/BCIP (AppliChem) nachgewiesen werden. Positive Phagen-Klone können von der Agarplatte isoliert und im Anschluss nach einer *in vivo*-Exzision, bei der der Phagen-Vektor in ein Plasmid umgewandelt wird, sequenziert werden.

Es wurden cDNA-Expressionsbibliotheken aus drei verschiedenen Plattenepithelkarzinomen der Lunge hergestellt: L10 (T2N0M0), L102 (T1N1M0), PEC6 (T2N2M0) [66, 67]. Die Identifizierung von Autoantigenen mit autologen und heterologen Patientenserum wurde wie folgt durchgeführt: von der Bank L10 wurden $8 \cdot 10^5$ cDNA-Klone, von der L102-Bank

2,26*10⁶ Klone und von der PEC6-Bank 8,3*10⁵ Klone gescreent. Hierbei wurden insgesamt 58 Klone (L10: 35 Klone, L102: 7 Klone, PEC6: 16 Klone) isoliert, die Sequenzen von 33 unterschiedlichen Genen repräsentieren. Vor der weiteren Verwendung im Spotassay wurden alle Klone noch einmal sequenziert und letztlich 27 verschiedene Klone ausgewählt. Dieses Set wurde durch 55 Klone erweitert, die bereits in Spotassay-Screenings mit benignen und malignen Hirntumoren als immunogen nachgewiesen wurden. Diese Klone wurden ursprünglich aus verschiedenen Hirntumor-cDNA-Bibliotheken bzw. aus einer fötalen Hirn-cDNA-Bibliothek isoliert [56, 62-65]. Insgesamt wurde also ein Set von 82 unterschiedlichen Phagenklonen zusammengestellt und mittels Spotassay das Seroreaktivitätsprofil von Seren verschiedener Lungentumorpatienten bzw. von Patienten mit Bronchialerkrankungen und gesunden Probanden untersucht.

2.1.1.1 *In vivo*-Exzision

Die Isolation von DNA aus Lambda-Phagen ist technisch sehr aufwendig und die Ausbeute eher schlecht. Daher ist es sinnvoll zuerst die Lambda ZAP-Vektoren der isolierten Phagen in Phagemide umzuwandeln. Im Lambda ZAP-Vektor sind Teile des filamentösen Phagen bzw. der gesamte darauf beruhende Plasmidvektor pBK-CMV enthalten. Es ist somit möglich, Phagen-Inserts durch *in vivo*-Exzision in ein Phagemid umzuwandeln [109]. Die Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-Blue MRF⁻ (Stratagene) enthalten ein F⁻-Plasmid, welches sie zur Aufnahme von filamentösen Phagen befähigt. Die *in vivo* Exzision der Phagemide setzt die Ko-Infektion mit einem filamentösen Phagen (ExAssist, Stratagene), der als Helferphage dient, und die Infektion mit dem umzuklonierenden Lambda-Phagen voraus. Der Helferphage gelangt dabei über die F⁻-Pili in die Bakterienzelle, die Lambda-Phagen gelangen über Maltoserezeptoren in die Zelle. Der ExAssist Helferphage beinhaltet eine amber-Mutation (UAG), welche durch die amber suppressor tRNA (*supE44*) der *E. coli* XL1-Blue MRF⁻-Bakterien supprimiert wird. Bei einer Ko-Infektion von Lambda-Phagen mit einzelsträngigen filamentösen Phagen (ExAssist Helferphage) erkennen Proteine des Helferphagen die Initiatorsequenzen auf dem Lambda-Phagen-Vektor, schneiden die DNA (Einzelstrangbruch) und der ungeschnittene Strang wird als Matrize für die DNA-Synthese verwendet, bis die Terminationssequenz erreicht wird. Der neu synthetisierte DNA-Strang wird zirkularisiert, in Phagenpartikel verpackt (ebenfalls auf der DNA des Helferphagen codiert) und sekretiert (Lyse). Nach Hitzeinaktivierung der Bakterien und Lambda-Phagen und abzentrifugieren der Zelltrümmer befinden sich die eingesetzten Helferphagen, aber auch das neu entstandene, wie

ein filamentöser Phage vorliegende Insert des Lambda-Phagen, im Überstand. Das resultierende Gemisch (Überstand) der Doppelinfektion wird nun dazu verwendet, *E. coli* XLOLR-Bakterienzellen (Stratagene) zu infizieren. Im nichtsuppressor-Bakterienstamm *E. coli* XLOLR (*sup⁻*) wird die Replikation der Helferphagen verhindert und nur das exziierte Phagemid repliziert und aus dem einzelsträngigen Plasmid ein doppelsträngiges Plasmid gebildet. Außerdem sind die XLOLR-Zellen nicht befähigt, Lambda-Phagen aufzunehmen, wodurch eventuelle Kontaminationen vermieden werden. Mit Hilfe von Wirtsenzymen wird der vom Helferphagen verpackte Einzelstrang in die doppelsträngige replikative Form überführt. Dieses Phagemid ist im Fall des exziierten Lambda-ZAP das Plasmid pBK-CMV, das zur autonomen Replikation befähigt ist (origin of replication, ori) und Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin vermittelt. Aus den resistenten Kolonien kann das Phagemid (mit dem ursprünglichen Lambda-Insert) durch eine herkömmliche Plasmid-Isolation gewonnen werden. In Abbildung 3 ist der pBK-CMV-Vektor dargestellt.

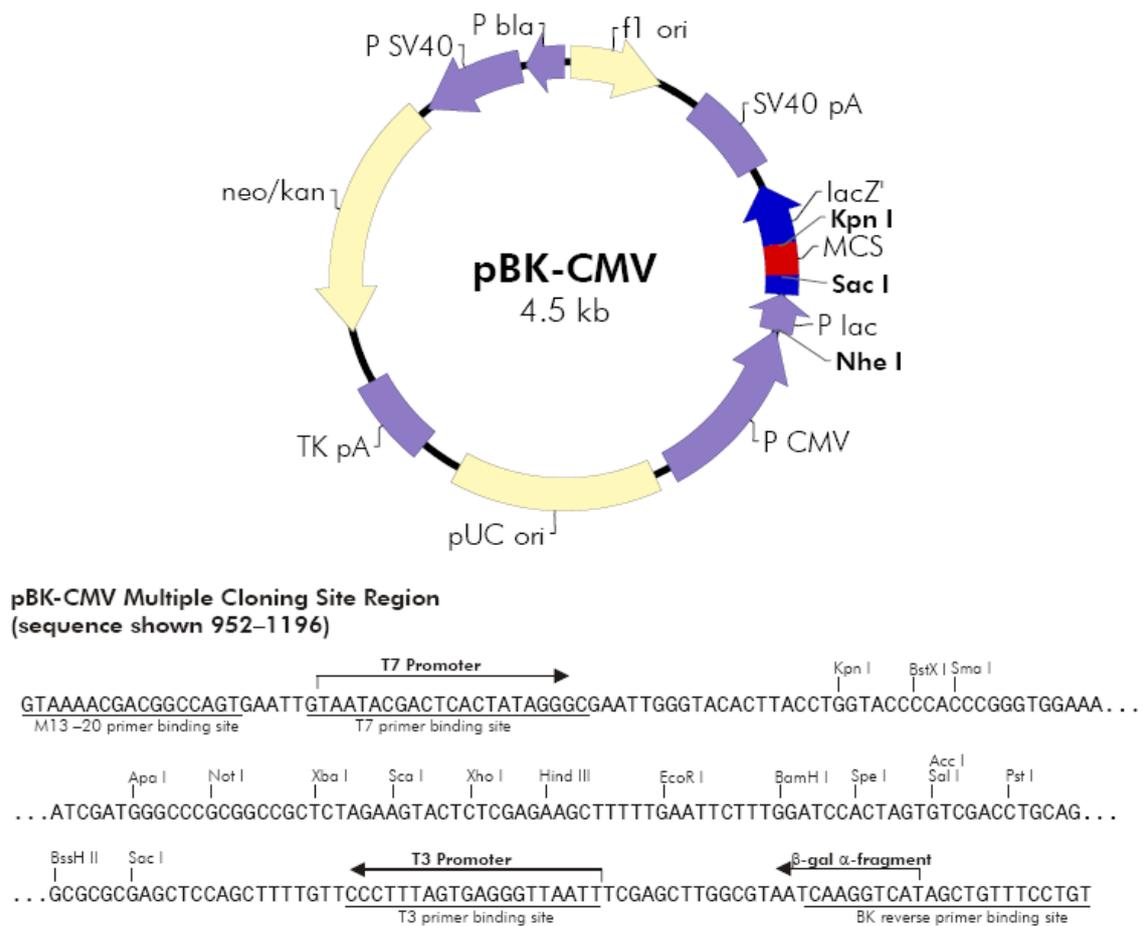


Abbildung 3: Vektorkarte des pBK-CMV-Vektors mit zugehöriger Sequenz der Multiple Cloning Site (Abbildung nach Stratagene, <http://www.stratagene.com/vectors/maps/pdf/pbk-cmv.pdf>)

Die *in vivo*-Exzision wurde nach folgendem Protokoll mit folgenden Medien durchgeführt:

Bakterienflüssigkultur-Medium (25 ml)

250 µl 20 % Maltose

250 µl 1M MgSO₄

ad 25 ml mit LB-Medium

Endkonzentration Tetracyclin 0,0125 mg/ml für *E. coli* XL1-Blue MRF`

Endkonzentration Kanamycin 0,05 mg/ml für *E. coli* XLOLR

LB-Medium (1 l)

10 g Bactotrypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1l mit H₂O_{dd}

autoklavieren

LB-Kanamycin-Agarplatten (1 l)

10 g Bactotrypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

15 g Agar

ad 1 l mit H₂O_{dd}

autoklavieren

Endkonzentration Kanamycin 0,05 mg/ml

NZCYM-Medium (1 l)

23 g NZCYM

ad 1 l mit H₂O_{dd}

autoklavieren

Zur Herstellung einer Bakterienflüssigkultur wurde ein mit Maltose und MgSO₄, sowie dem entsprechenden Antibiotikum komplettiertes LB-Medium mit einer Kolonie *E. coli* XL1-Blue MRF` bzw. *E. coli* XLOLR angeimpft und ü.N. bei 37°C und 225 rpm wachsen lassen. Diese 25 ml ü.N.-Kultur wurde für 15 min bei 2000 rpm pelletiert und mit 10 mM MgSO₄-Lösung

auf eine OD_{600} von 1,0 eingestellt. Für die *in vivo*-Exzision wurde zunächst *E. coli* XL1-Blue MRF`-Kultur mit dem betreffenden Phagenklon und dem ExAssist-Helferphagen versetzt.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Menge (μ l)
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF`-Kultur, $OD_{600}=1,0$	200
Phagen-Stock (1 Phagen-Plaue in 500 μ l SM-Puffer und 20 μ l Chloroform (ca. 1×10^5 Phagen-Partikel))	250
ExAssist-Helferphage ($>1 \times 10^{10}$ pfu/ml)	1

Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurden 3 ml NZCYM-Medium zugefügt und der Ansatz für 3 h bei 225 rpm und 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien und die Lambda-Phagen durch 20-minütiges Erhitzen bei 65°C lysiert und die Zelltrümmer für 20 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Die Phagemide pBK-CMV befanden sich nun im Überstand.

Anschließend wurden 200 μ l einer ü.N.-Kultur *E.coli* XL0LR ($OD_{600}=1,0$) mit 10 μ l des Phagemid-Überstandes versetzt. Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurden 300 μ l NZCYM-Medium zugesetzt und für 45 min bei 37°C, 225 rpm geschüttelt. Von dieser Kultur wurden 200 μ l auf LB-Kanamycin-Agarplatten (0,05 mg/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Je Platte wurde eine Kolonie ausgestochen und in ein Medium aus 5 ml LB-Medium mit 0,05 mg/ml Kanamycin überführt und bei 37°C, 225 rpm ü.N. geschüttelt. Diese ü.N.-Kultur wurde dann für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zur Plasmidisolation eingesetzt.

2.1.1.2 Isolation der Phagemid-DNA

Die Plasmidisolation erfolgte mittels E.Z.N.A.®Plasmid Miniprep I Isolierungs-Kit der Firma PEQLAB.

Zur Lyse der Bakterien wurde das Pellet zuerst durch sorgfältiges Mischen in 250 μ l Lösung I/RNase A resuspendiert. Das vollständige Resuspendieren der pelletierten Bakterien ist für gute Plasmiderträge von entscheidender Bedeutung. Durch die in Lösung I enthaltene RNase wird bei der Lyse frei werdende RNA zerschnitten. Diesem Gemisch wurden 250 μ l Lösung II zugegeben und durch vier- bis sechsmaliges Invertieren des 1,5 ml Reaktionsgefäßes gemischt, bis die Bakterien lysiert waren, was an der Konsistenz der Lösung zu erkennen war. Zur Neutralisierung wurde das Lysat mit 350 μ l Lösung III versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt, bis sich ein weißes, flockiges Präzipitat bildete, welches aus Kalium und SDS besteht. Das Reaktionsgefäß wurde danach für 10 min bei

13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde eine HiBind[®]-Miniprep-Zentrifugensäule in ein 2 ml Sammelgefäß gesteckt und der klare Überstand vorsichtig in die Säule gefüllt, ohne dabei Teile des Debrispellets (Kalium-SDS) zu übertragen. Es wurde für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, bis das Lysat vollständig die Silika-Membran passiert hatte. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Es folgten 3 Waschschrte mit 500 µl HB-Puffer und zweimal mit 750 µl DNA-Waschpuffer (komplettiert mit 100% Ethanol). Das Waschen der an der HiBind[®]-Silikamatrix gebundenen Plasmid-DNA mit HB-Puffer ermöglicht eine besonders effiziente Entfernung von Proteinkontaminationen. Durch das im DNA-Waschpuffer enthaltene Ethanol wird die DNA gefällt. Zum Trocknen des Pellets wurde die Zentrifugensäule 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und die Plasmid-DNA mit 50 µl sterilem Wasser eluiert.

2.1.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren wird die Absorptionsspektroskopie angewandt. Unter Absorption von Licht versteht man die Eigenschaften einer Substanz, bei einer bestimmten Wellenlänge Lichtquanten aufzunehmen (absorbieren). Mit einem Photometer untersucht man die Absorptionseigenschaften von Substanzen in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts. Die vom Photometer angezeigte dimensionslose Größe Absorption (A) ist als Logarithmus des Verhältnisses der Intensitäten von einfallendem (I₀) und austretendem (I) Licht definiert:

$$A = \log I_0/I$$

Bei konstanter Schichtdicke d ist die Absorption proportional zur Konzentration der Lösung. Dieses Gesetz, man nennt es das Lambert-Beersche Gesetz, gilt allerdings nur für verdünnte Lösungen. Es gestattet die Bestimmung von Konzentrationen.

$$A = \epsilon * c * d$$

(Lambert-Beersches Gesetz)

Die Proportionalitätskonstante ϵ wird als molarer Extinktionskoeffizient einer Substanz bezeichnet. Er hat die Einheit $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ und gibt den Absorptionswert an, den eine 1 molare Lösung der Substanz bei 1 cm Schichtdicke (d) hätte. Der molare Extinktionskoeffizient bezieht sich immer auf eine bestimmte Wellenlänge des Lichts und ist für jede Substanz und jede Wellenlänge eine charakteristische Größe.

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird durch photometrische Bestimmung der Absorption einer Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Nukleinsäuren haben aufgrund der Spektraleigenschaften der Basen ein Absorptionsmaximum im ultravioletten Licht bei 260 nm. Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von 50 $\mu g/ml$ doppelsträngiger DNA und 40 $\mu g/ml$ RNA. Für einzelsträngige DNA entspricht dieser Wert 37 $\mu g/ml$, für kurzkettige Oligonukleotide dagegen 30 $\mu g/ml$. Einzelsträngige DNA absorbiert das Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm 1,4-mal mehr als doppelsträngige DNA (Hyperchromizitätseffekt).

Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

$\begin{aligned} \text{DNA-Konzentration} &= 50 \cdot \text{gemessene Absorption} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} (\mu g/ml) \\ \text{RNA-Konzentration} &= 40 \cdot \text{gemessene Absorption} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} (\mu g/ml) \end{aligned}$
--

Die Messung bei 280 nm dient der Kontrolle des Reinheitsgrades, denn hier haben Proteine ihr Absorptionsmaximum, was auf dem Gehalt an aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan beruht. Durch die Bestimmung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} kann man dann den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren bestimmen. Bei Werten von 1,8 bis 1,95 hat man sehr reine DNA vorliegen. Ist der Quotient bei der DNA-Messung größer als 2,0, so enthält die Lösung wahrscheinlich denaturierte DNA oder ist mit RNA verunreinigt. Saubere RNA-Lösungen haben einen Wert zwischen 1,9 und 2,0. Geringere Werte zeigen eine Verschmutzung mit Proteinen oder Phenol an.

Die Messungen wurden mit dem Eppendorf Biophotometer durchgeführt

2.1.1.4 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Durch die DNA-Sequenzierung kann die Basenfolge eines DNA-Moleküls bestimmt werden. Die DNA-Sequenzierung mittels Didesoxymethode nach Sanger [110] beruht auf der enzymatischen Synthese von DNA-Strängen, die an einem modifizierten Nukleotid abbricht. Auf diese Weise entstehen basenspezifisch terminierte DNA-Fragmente unterschiedlicher

Länge, die elektrophoretisch in einer Kapillare mit Hilfe einer Matrix, hier einem synthetischen Polymer (POP6), aufgetrennt werden. Die Sequenzierreaktion erfolgt in einem Ansatz. Dieser enthält das zu analysierende DNA-Template, den Sequenzierprimer, eine DNA-Polymerase und das Nukleotidgemisch. Das Nukleotidgemisch enthält alle vier Desoxynukleotide (dNTPs) und alle vier Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP), die sogenannten Terminatoren, welche farblich mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Wird ein Terminator in eine Kette eingebaut, so kommt es zum Abbruch der Elongationsreaktion. Eine weitere Strangverlängerung ist nicht mehr möglich, da keine freie 3'-Hydroxylgruppe vorhanden ist. Die ddNTPs blockieren so die fortlaufende enzymatische Synthese nach einem statistischen Prinzip an einer zufälligen Stelle. In einem Reaktionsansatz entstehen Produkte, die am Ende unterschiedlich markierte Basen enthalten. Je nach Base wird das selbe Fluorophor detektiert. Vor der Auftrennung der Proben über die Matrix müssen diese alkoholisch gefällt werden.

Für die Sequenzierreaktionen wurde der BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte mit dem ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) und die Sequenzanalyse mit der Software CodonCode Aligner. Die erhaltenen Sequenzen werden zusätzlich einem BLAST-Datenbankabgleich (NCBI, National Center for Biotechnology Information (USA), <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) unterzogen.

Sequenzierung der pBK-CMV-Plasmide

Zur Sequenzierung der pBK-CMV-Plasmide wurde jeweils der Primer M13 uni oder M13 rev verwendet:

Primer	Sequenz
M13 uni	5'- TGTAACGACGGCCAGT - 3'
M13 rev	5'- CAGGAAACAGCTATGACC - 3'

Der Ansatz zur PCR für die Sequenzierreaktion wurde wie folgt hergestellt:

Komponente	Menge (µl)
Plasmid-DNA pBK-CMV	x (300 ng)
Reaktionsmix	2
Primer 0,8 pmol/µl M13 uni oder M13 rev (Endkonzentration 3,2 pmol)	4
HPLC-H ₂ O	x
Total	20

Die PCR für die Sequenzierreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Schritt	PCR			
	Zyklen (25x)			
	Denaturierung	Annealing	Extension	
Zeit	30 sec	45 sec	4 min	∞
Temperatur	96°C	50°C*	60°C	4°C

* die Annealing-Temperatur richtete sich nach der Länge der Primer:

bis 20 bp 50°C

bis 23 bp 55°C

über 23 bp 60°C

Die Sequenzierreaktion wurde in einem Thermocycler (PTC-100; MyResearch. Inc) durchgeführt.

Präzipitation und Aufreinigung der Proben nach der Sequenzierreaktion

Nach der PCR müssen die Proben gefällt und aufgereinigt werden, damit die in dem PCR-Ansatz enthaltenen Salze und Primer die Sequenzierung nicht behindern. Dazu wurde der 20 µl Sequenzieransatz mit gleichem Volumen HPLC- H₂O, 4 µl 3 M Natriumacetat (ph 4,6) und 100 µl 96% Ethanol vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde das Pellet in 250 µl 70% Ethanol resuspendiert. Nach weiteren 5 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde das getrocknete Pellet in 20 µl Hi-Di™ (Highly deionized formamide) gelöst und sofort sequenziert.

2.1.1.5 Amplifikation der Bakteriophagen

NZCYM-Tetracyclin-Agarplatten (1 l)

23 g NZCYM

15 g Agar

ad 1 l mit H₂O_{dd}

autoklavieren

Endkonzentration Tetracyclin 0,0125 mg/ml

Top-Agar (100 ml)

2,3 g NZCYM

0,75 g Agar

ad 100 ml mit H₂O_{dd}

autoklavieren

SM-Puffer

100 mM NaCl

10 mM MgSO₄

50 mM Tris

ph 7,5

autoklavieren

0,01 % (w/v) Gelatine

Um die Bakteriophagen zu vermehren, plattiert man sie auf NZCYM-Tetracyclin-Agarplatten (0,0125 mg/ml) aus. Dazu wurde eine ü.N.-Kultur *E. coli* XL1-Blue MRF` mit 10 mM MgSO₄-Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Von dieser Bakterienkultur wurden 200 µl mit 6 µl des jeweiligen Bakteriophagen-Stocks (1 Phagen-Plaques in 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform) versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 2,5 ml Top-Agar dazu gegeben und der Ansatz auf der NZCYM-Tetracyclin-Platte (Durchmesser 85 mm) verteilt. Diese wurde ü.N. bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Platten mit 3 ml SM-Puffer überschichtet. Nach 2 h leichtem Schütteln bei RT wurde der Puffer mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde mit einem abgeflamten Spatel der gesamte Top-Agar abgeschabt und ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Agarplatte wurde mit 2 ml SM-Puffer nachgespült. Der SM-Puffer wurde wieder abgenommen und auch in das 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Bakterien abzutöten wurden 0,5 ml Chloroform dazu gegeben und geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch bei 3500 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Von dem Überstand wurde die ungefähre Menge bestimmt und die Phagen mit 10% Polyethylenglycol (PEG 6000) und 1 M NaCl gefällt. Im Überstand befindliche Bakteriophagen binden an Polyethylenglycol. Nachdem sich durch Schütteln das Polyethylenglycol und das NaCl gelöst haben, wurde der Ansatz ü.N. bei 4°C aufbewahrt. Am darauf folgenden Tag wurde die Lösung 15 min bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet aus

Polyethylenglycol mit daran haftenden Bakteriophagen wurde in 1 ml SM-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um eventuell noch im Pellet befindliche lebende Bakterien abzutöten wurden 40 µl Chloroform dazu pipettiert. Dieser Ansatz wurde über den Tag verteilt mehrmals gründlich gemischt, danach bei 13000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die amplifizierten Bakteriophagen, welche in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurden.

2.1.1.6 Titerbestimmung der Bakteriophagen

Bei der Phagentiterbestimmung wird die Anzahl an Phagen ermittelt, die Bakterienzellen infizieren können und letztendlich im Bakterienrasen für die Ausbildung der „Plaques“ verantwortlich sind, also die sogenannten „plaque forming units“ (pfu).

Dazu wurde von den amplifizierten Bakteriophagen eine Verdünnungsreihe von 1:100, 1:1000 und 1:10000 erstellt und ausplattiert. Hierzu wurde je 1 µl der jeweiligen Phagen-Verdünnungsstufe zu 200 µl Bakterienflüssigkultur (*E. coli* XL1-Blue MRF⁺, OD₆₀₀=0,5, Herstellung siehe oben) pipettiert und der Ansatz für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 ml Top-Agar wurde der Ansatz auf einer NZCYM-Tetracyclin-Agarplatte (Durchmesser 85 mm) ausplattiert. Nachdem die Platten ü.N. bei 37°C inkubiert wurden, konnten die gebildeten Phagen-Plaques ausgezählt und mit Hilfe der Verdünnungsfaktoren die pfu/ml berechnet werden.

2.1.1.7 Präabsorption der Seren

NZCYM-Tetracyclin-Agarplatten (1 l)

23 g NZCYM

15 g Agar

ad 1 l mit H₂O_{dd}

autoklavieren

Endkonzentration Tetracyclin 0,0125 mg/ml

TBS-Puffer

150 mM NaCl

20 mM Tris

ph 7,5

TBS-T-Puffer

150 mM NaCl

20 mM Tris

ph 7,5

0,5 % (w/v) Tween 20

Blocking-Lösung

5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer

CDS-Puffer

10 mM Tris

5 mM MgCl₂*6H₂O

100 mM NaCl

ph 9,5

NBT

240 mg in 10 ml 70% DMF

BCIP

120 mg in 10 ml 100% DMF

Detektionslösung

CDS

0,025 mg/ml BCIP (gelöst in 70% DMF)

0,05 mg/m NBT (gelöst in 100% DMF)

Da die Autoantigene in einem Bakterien-/Phagensystem exprimiert werden, müssen die Seren vor ihrem Einsatz im Spotassay präabsorbiert werden. Bei der Präabsorption werden Antikörper aus dem Serum entfernt, die gegen diese bakteriellen oder viralen Proteine gerichtet sind. Hierdurch werden unspezifische Hintergrundsignale reduziert.

Für die Präabsorption wurden 600 µl Bakterienflüssigkultur (*E. coli* XL1-Blue MRF⁺, OD₆₀₀=0,5) mit 10000 pfu einer fötalen Hirn-cDNA-Bank versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 7,5 ml Top-Agar zugegeben und der Ansatz auf einer Tetracyclin-Agarplatte (Durchmesser 145 mm) ausplattiert. Es folgte eine vierstündige

Inkubation der Agarplatten bei 42°C, danach wurden in 10 mM IPTG-Lösung getränkte Nitrozellulosemembranen (Protran BA 85, Schleicher & Schüll) aufgelegt. Durch das IPTG wurde der lacZ-Promotor induziert, und somit die Expression der Phagen-Inserts der fötalen Hirn-cDNA-Bank eingeleitet. Die Protein-Expression wurde für 4 Stunden bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss wurden die Agarplatten mit den aufgelegten Membranen ü.N. bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen abgezogen und 3x10 min in TBS-T gewaschen. Nach einstündigem Blocken in Blocking-Lösung wurden die Membranen 3x10 min in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Serum-Inkubation ü.N. bei 4°C. Zur Herstellung der Serum-Lösung wurde das Serum 1:100 in TBS / 0,5% Magermilchpulver / 0,01% Thimerosal verdünnt. Durch den Zusatz des Konservierungstoffes Thimerosal wird ein Bewachsen der Serum-Lösung mit Bakterien und Pilzen verhindert. Nach der Serum-Inkubation wurden die Membranen 3x10 min in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die 45-minütige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (alkaline phosphatase-conjugated AffiniPure goat anti-human, IgG, FC γ fragment specific, Dianova; 1:10000 in TBS / 0,5% Magermilchpulver). Nach weiterem 3x10 min Waschen in TBS, erfolgte die Inkubation mit Detektionslösung für maximal 20 min. In der Detektionslösung sind die Substrate NBT und BCIP enthalten, die von der alkalischen Phosphatase des Sekundär-Antikörpers zu einem violetten Präzipitat umgesetzt werden.

Für jedes Serum wurden 50 ml Serum-Lösung hergestellt, die mit je 4 Nitrozellulosemembranen präabsorbiert wurde.

2.1.1.8 Durchführung der serologischen Spotassays

NZCYM-Tetracyclin-Agaroseplatten (1 l)

23 g NZCYM

7 g Agarose

ad 1 l mit H₂O_{dd}

autoklavieren

Endkonzentration Tetracyclin 0,0125 mg/ml

Top-Agarose (100 ml)

2,7 g NZCYM

0,7 g Agarose

ad 100 ml mit H₂O_{dd}

autoklavieren

Das Spotassay-Verfahren ist eine schnelle und einfache Möglichkeit, Seren auf Antikörper, welche gegen ein ausgewähltes Set endogener Proteinen gerichtet sind, zu untersuchen. Hierzu werden zunächst *E. coli* XL1-Blue MRF⁻-Bakterien mit rekombinanten Bakteriophagen infiziert und auf eine mit Nährmedium überschichtete Membran aufgespottet. Bakteriophagen sind nicht zur autonomen Reproduktion befähigt, da sie keinen eigenen Stoffwechsel haben und benötigen daher zur Vermehrung einen Wirt. Die bakteriellen Proteine übernehmen die Transkription des Virusgenoms, die Translation der viralen mRNA, sowie den Zusammenbau neuer Viruspartikel aus den gebildeten Proteinen. Diese Eigenschaft macht man sich zu Nutze, um rekombinante Proteine in großer Menge bilden zu können. Durch Induktion des lacZ-Promotors, unter dessen Kontrolle das Phagen-Insert steht, wird auch das entsprechende rekombinante Protein gebildet. Nach Lyse der Bakterien durch die Phagen werden die gebildeten rekombinanten Proteine freigesetzt und an die Nitrozellulosemembran gebunden. Diese kann nun mit präabsorbierten Seren inkubiert und mittels einer Farbreaktion das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen die rekombinanten Proteine nachgewiesen werden.

Nach der Sequenzierung der cDNA-Klone aus dem Screening der drei Plattenepithelkarzinom-cDNA-Banken wurden 27 verschiedene Klone für die Durchführung der Spotassays ausgewählt. Um das Set an potentiellen Autoantigenen zu erweitern wurden auch Klone hinzugezogen, die bereits mit cDNA-Expressionsbibliotheken aus anderen Geweben (fötalem Hirn, Glioblastom-Gewebe, Gewebe eines pilozytischen Astrozytoms, der Glioblastom-Zelllinie TX3868 und Meningeom-Gewebe) als immunogen identifiziert wurden [62-65].

Beim Spotassay mit einer 96 Well-Microtiterplatte können 45 verschiedene Phagenklone und drei Mal die fötale Hirn-cDNA-Bank als Negativkontrolle in Duplikaten untersucht werden. Zwei auf der kurzen Seite der Mikrotiterplatte nebeneinander liegende Wells enthalten jeweils

die gleichen Ansätze und sollten daher auch auf den entwickelten Membranen die gleiche Färbung aufweisen.

In jedes Well der 96 Well-Mikrotiterplatte (Nunc) wurden je 40 µl Phagen (5000 pfu/µl) mit 40 µl *E. coli* XL1-Blue MRF⁻-Bakterienflüssigkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 (Herstellung siehe oben) gemischt. Dieser Ansatz wurde für 20 min bei 37°C inkubiert.

Währenddessen wurde auf eine NZCYM-Tetracyclin-Agaroseplatten (Omnitray single well, Nunc) eine Nitrozellulosemembran (Protran 85, Schleicher & Schüll) aufgelegt und die Platte für ca. 10 min bei 42°C erwärmt. Die Membran wurde gleichmäßig mit 3,5 ml Top-Agarose / 2,5 mM IPTG, welche auf 65°C erwärmt wurde, überschichtet. Nachdem die Top-Agarose abgekühlt und fest war, wurden die mit Phagen infizierten Bakterien aus der 96 Well-Mikrotiterplatte mit einem speziellen Stempel (Omnitray, TSP-Stempel, Nunc) auf die Top-Agarose-Schicht aufgespottet. Die Platten wurden ü.N. bei 37°C inkubiert, wodurch es zu einer gleichzeitigen Vermehrung der Bakterien und der Phagen, mit welchen die Bakterien infiziert sind, kam. Die in den Phagen-Vektor einklonierte Sequenz steht unter Kontrolle des lacZ-Promotors. Durch das in der Top-Agarose enthaltene IPTG wird den bakteriellen Enzymen die Expression des entsprechenden rekombinanten Proteins ermöglicht.

Am folgenden Tag wurde die Membran abgezogen und über mehrere Stunden in TBS-T geschüttelt. Danach wurde die Top-Agarose vorsichtig von der Membran abgestreift. Darauf folgten 3 Waschschrte in TBS-T zu jeweils 10 min. Anschließend wurde die Membran für 1 h in Blocking-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu vermeiden. Zum Abwaschen dieser Blocking-Lösung folgten 3 weitere 10-minütige Waschschrte in TBS. Die Inkubation der Membran mit präabsorbiertem Serum erfolgte ü.N. unter leichtem Schütteln bei 4°C. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3x10 min mit TBS gewaschen und anschließend mit Sekundär-Antikörper (alkaline phosphatase-conjugated AffiniPure goat anti-human, IgG, FC_γ fragment specific, Dianova, 1:10000 in TBS / 0,5% Magermilchpulver) für 45 min inkubiert. Auch hierauf folgten wieder 3 Waschschrte zu jeweils 10 min in TBS. Die Detektion erfolgte mit Detektionslösung aus BCIP und NBT in CDS für maximal 20 min. Haben Antikörper aus dem untersuchten Serum an Proteine auf der Membran gebunden, so lassen sich diese mit Hilfe des sekundären Antikörpers und der anschließenden Farbreaktion als violette Präzipitate nachweisen. Besaß ein erhaltenes Signal eine dunklere Färbung als die fötale Hirn-cDNA-Bank (Negativkontrolle), so wurde es als positiv gewertet, d.h. der spezifische Antikörper der gegen das Genprodukt des in den Phagen-Vektor einklonierten Inserts gerichtet ist, war in dem Serum enthalten. Das

Spotassay-Screening wurde für jedes Serum mindestens zwei Mal durchgeführt. Der Ablauf des serologischen Spotassays ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

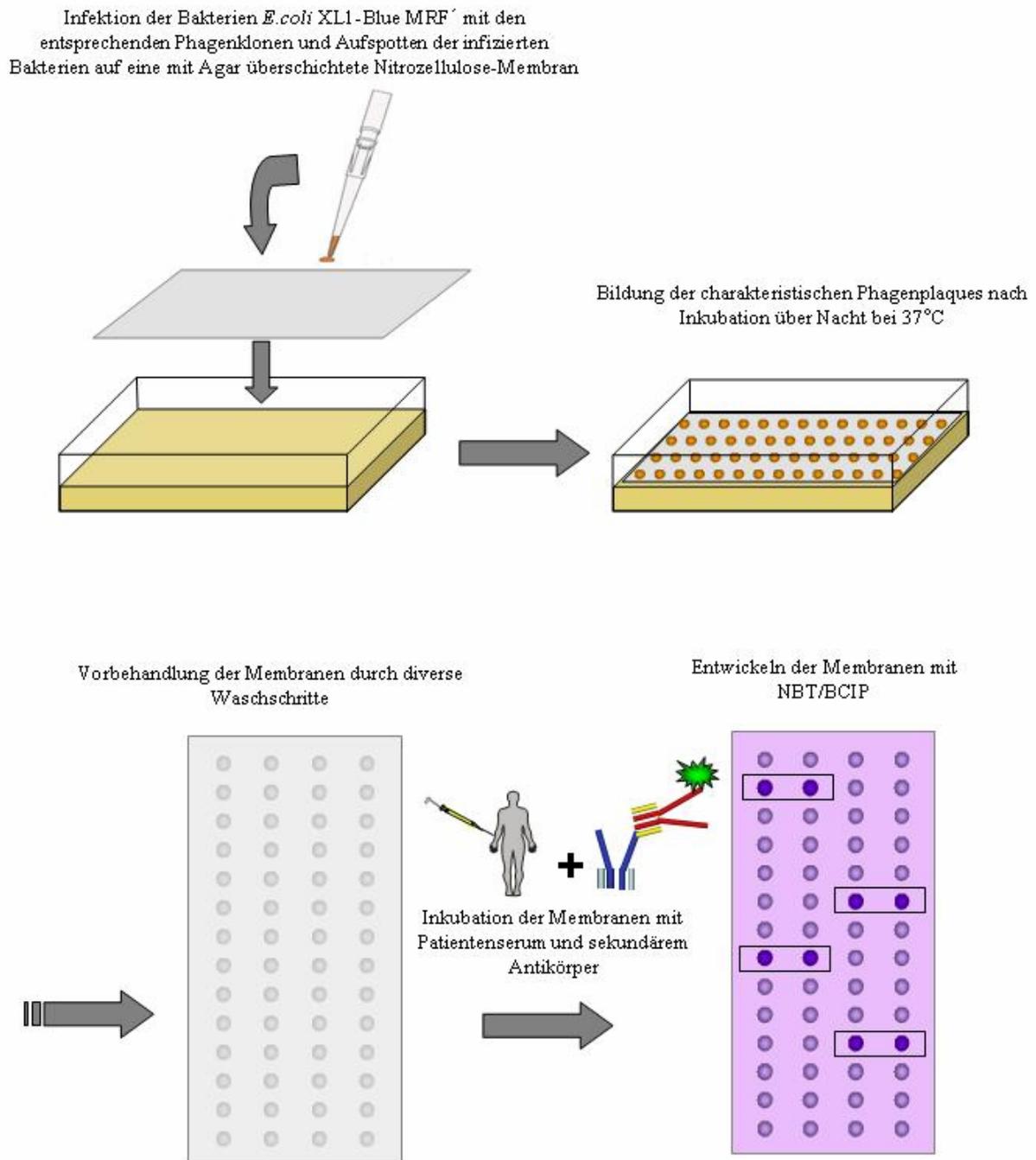


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Durchführung der serologischen Spotassays

2.1.1.9 Auswertung der serologischen Spotassays

Die Auswertung der Spotassays erfolgte qualitativ, d.h. die Membranen wurden visuell ausgewertet. Als positiv wurde ein Spot dann bewertet, wenn seine Färbung dunkler war als die der Negativkontrolle. Das aus der qualitativen Auswertung resultierende Seroreaktivitäts-

Profil wurde vom Zentrum für Bioinformatik unter der Leitung von Prof. Lenhof (Universität des Saarlandes, Saarbrücken) ausgewertet. Hier wurden die Naïve Bayes Klassifikations-Methode und eine „Feature Subset Selection“ (FSS) Methode basierend auf der „Mutual Information“ (MI oder auch Transinformation) angewendet und die Ergebnisse durch 10-fach Kreuzvalidierung evaluiert. Die MI ist eine Größe aus der Informationstheorie, die die Stärke des statistischen Zusammenhangs zweier Zufallsgrößen X und Y angibt. In unserem Falle wird mit einer Größe beschrieben, mit welchem Serum ein bestimmtes Antigen detektiert wurde oder nicht, wohingegen die zweite Größe den Status des Patienten, gesund oder krank, beschreibt. Für jedes Antigen wurde die MI zwischen Antigen und Patienten-Status berechnet. Je höher die MI eines Antigens, desto besser ist dieses Antigen für die Trennung der Seren von gesunden und kranken Probanden geeignet. Die MI gibt demnach den Informationsgehalt an, den ein bestimmtes Antigen für das betrachtete Klassifikationsszenario hat. Für den Fall der kompletten Abhängigkeit der zwei Zufallsvariablen X und Y nimmt die MI den maximalen Wert an. In diesem Fall kann allein durch das Wissen des Wertes von X der Wert für Y vorhergesagt werden. Liegt völlige Unabhängigkeit vor, so bringt das Wissen über X keinerlei Information über Y. In unserem Fall kann die Variable X den Status 'normal' ($X = 0$) oder 'krank' ($X = 1$) annehmen. Bei der Berechnung der MI für ein Antigen s kann die Variable Y den Status 's nicht detektiert' ($Y = 0$) oder 's detektiert' ($Y = 1$) annehmen.

Bei der FSS-Methode wird nur eine Teilmenge der verfügbaren „Features“ für einen Lernalgorithmus verwendet. In vorliegender Arbeit wurde die FSS-Methode angewendet, um Antigene mit geringem Informationsgehalt, also niedriger MI, zu eliminieren, damit durch sie nicht die Genauigkeit der Klassifikationsberechnung negativ beeinflusst wird. Es wurden also nur die Antigene mit den höchsten MI-Werten in die Berechnung einbezogen. Um herauszufinden, welches Subset für eine bestimmte Klassifikation am besten geeignet ist, wurden alle Antigen-Subsets 1-82 getestet. Für jedes Subset wurde eine 10-fach Kreuz-Validierung durchgeführt. Das bedeutet, alle verwendeten Seren werden in zwei Gruppen (Test- und Trainingsset) eingeteilt, wobei das Testset aus 10% der Seren besteht und das Trainingsset aus 90% der Seren. Mit Hilfe des Trainingssets wird für jedes Antigen 1-82 berechnet, mit welcher Wahrscheinlichkeit es sich bei dem untersuchten Serum um ein Normal- oder Tumorseum handelt. Mit dem Testset wird dann für alle Seren anhand der Einzelwahrscheinlichkeiten jedes Antigens die Gesamtwahrscheinlichkeit für das komplexe Seroreaktivitätsprofil (A) des Einzelerums berechnet, mit der es sich bei dem untersuchten Serum um ein Normal- oder Tumorseum handelt. Hierfür wird der Quotient $Q(A) = \frac{P(L|A)}{P(N|A)}$ der bedingten Wahrscheinlichkeiten berechnet. Wobei $P(L|A)$ die

Wahrscheinlichkeit angibt, mit der es sich bei dem getesteten Serum um ein Plattenepithelkarzinomserum handelt und $P(N | A)$ die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der es sich bei dem getesteten Serum um ein Normalserum handelt. Ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein Normalserum handelt größer als die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein Tumorsersum handelt, ist der Quotient kleiner als 1. Wenn die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein Tumorsersum handelt größer ist, als die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein Normalserum handelt, ist der Quotient größer als 1. Um Artefakte auszuschließen, die bei der Aufteilung in Test- und Trainingsset entstehen können, wurde die 10-fach Kreuzvalidierung 100 Mal wiederholt und die Mittelwerte, sowie die 95% Konfidenzintervalle (CI) berechnet. Zum Schluss wurde ermittelt, ob die berechneten Wahrscheinlichkeiten mit der Wirklichkeit übereinstimmen und daraus die Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit und die „Area under the Receiver Operator Characteristics Curve (AUC)“ ermittelt. Bei der „Receiver Operator Characteristics Curve (ROC)“ handelt es sich um die graphische Darstellung des Zusammenhanges der Falschnegativrate (1-Spezifität) und der Richtigpositivrate (Sensitivität). Eine AUC von 1 repräsentiert einen perfekten Test, ein Test mit einer AUC von 0,5 ist dagegen wertlos. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des in Kooperation mit dem Zentrum für Bioinformatik entwickelten Webtools „Seroreactivity Pattern Classification Service“ SePaCS (<http://www.bioinf.uni-sb.de/sepacs>, [111]) durchgeführt.

2.1.2 „high-density“ Proteinmacroarray Screening

Als zweite Quelle zur Identifizierung potentieller Lungentumor-assoziiierter Autoantigene wurde ein Screening von sogenannten „high-density“ Proteinmacroarrays durchgeführt.

Das Prinzip der Proteinmacroarrays ähnelt dem der Spotassays. Auch hier werden rekombinant exprimierte Proteine auf einer Membran fixiert, welche anschließend mit Serum gescreent werden können. Im Unterschied zu den Spotassays werden hier jedoch keine Bakteriophagen benötigt, da das cDNA-Insert direkt in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert wurde. Es handelt sich somit um ein rein bakterielles Expressionssystem.

2.1.2.1 Durchführung und Auswertung des Primärscreenings

TBST-T

500 mM NaCl

20 mM Tris

0,05% (v/v) Tween 20

0,5% (v/v) Triton X-100

pH 7,5

TBST

500 mM NaCl

20 mM Tris

0,05% (v/v) Tween 20

pH 7,5

TBS

150 mM NaCl

10 mM Tris

pH 7,5

Blocking-Lösung

3% (w/v) Magermilchpulver in TBST

Zur Herstellung der Proteinmacroarrays wurden diese 38016 Klone in Duplikaten auf eine PVDF-Membran (22x22 cm, Immobilon P, Millipore) aufgespottet und mittels IPTG die Proteinexpression induziert. Nach Inkubation ü.N. wurden die Bakterienkolonien auf der Membran denaturiert und die Proteine an die Membran fixiert.

Vor dem Serumscreening wurden die Macroarrays mit 96% Ethanol befeuchtet und im Anschluss zweimal mit H₂O gespült. Nach kurzer Inkubation in TBST-T wurden die Kolonien vorsichtig von der Membran abgestreift. Es folgten zwei 10-minütige Waschschrte mit TBST-T. Um Tween 20- und Triton X-100-Reste zu entfernen wurde die Membran zweimal mit TBS gespült und anschließend 2x10 min mit TBS gewaschen. Nach 2 h Inkubation in Blocking-Lösung (3% (w/v) Magermilchpulver in TBST), folgte die Serum-Inkubation (Serum 1:1000 in Blocking-Lösung) ü.N. bei 4°C. Die Serum-Lösung wurde nach der Inkubation bei 4°C aufbewahrt, bis die Membranen ausgewertet waren. Nachdem 3x10 min in TBST gewaschen wurde, wurden die Membranen 2 h mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörper (1:1000 in Blocking-Lösung, rabbit anti-human IgG, IgM, IgA (H+L)-HRP, Dianova) inkubiert. Nach vier 10-minütigen Waschschrten mit TBST und 2x10 min Waschen mit TBS erfolgte die Detektion mit ECF (GE Healthcare). Anschließend wurden die Macroarrays mit einem Flächenscanner (Fuji FLA-3000) bei 473 nm gescannt und visuell mit einer speziellen Software (AIDA) ausgewertet. Mit Ausnahme der Seruminkubation bei 4°C erfolgten alle Schritte unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur.

Da die Seren nicht, wie beim Spotassay-Verfahren, präabsorbiert wurden kann es vorkommen, dass manche Membranen aufgrund zu starker Hintergrundsignale nicht auswertbar sind. Diese wurden gestrippt und anschließend erneut mit der bereits im ersten Durchlauf eingesetzten Serum-Lösung inkubiert. Zum Strippen der Membranen wurde Stripping-Lösung auf 70°C erhitzt und die Membran 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Arrays 2x20 min mit TBST gewaschen. Die erneute Hybridisierung erfolgte analog oben aufgeführtem Protokoll ab dem ersten TBS-Waschschritt.

Das Primärscreening der Proteinmacroarrays wurde mit 38 Pools aus je 5 Seren (siehe Tabelle 2) und einer scvf-Antikörperbank (single chain variable fragments, GE Healthcare) aus Morbus Crohn-Gewebe durchgeführt.

Tabelle 2: Im Primärscreening verwendete Serumpools

Serumtyp	Anzahl Serumpools
Plattenepithelkarzinom	1
Adenokarzinom	1
großzelliges Lungenkarzinom	1
kleinzelliges Lungenkarzinom	1
Prostatakarzinom	2
Benigne Prostata Hyperplasie (BPH)	1
Gliom	6
Meningeom	6
Morbus Crohn	3
Colitis Ulzerosa	3
Wilms Tumor	5
Neuroblastom	4
Schlaganfall	3
Normal	1

Als Negativkontrollen wurden, im Falle der Serumpools, mehrere Macroarrays nur mit Sekundär-Antikörper (rabbit anti-human IgG, IgA, IgM (H+L)-Cy5, Dianova) hybridisiert. Für die Morbus Crohn-Antikörperbank wurde ein anti E-Tag-Antikörper (GE Healthcare), der hier gleichzeitig auch als Sekundär-Antikörper diente, verwendet.

Auswertung des Primärscreenings

Die Auswertung der Proteinmacroarrays erfolgte durch das RZPD. Mit Hilfe einer speziellen Software (AIDA) wurden die Membranen visuell ausgewertet. Bei positiven Spots, also Proteinspots, an die Serum-Antikörper gebunden haben, hebt sich die Signalintensität des entsprechenden Spots deutlich von den Spots ab, an die keine Antikörper gebunden haben.

2.1.2.2 Durchführung und Auswertung des Sekundärscreenings

Im Primärscreening mit allen 38 Serumpools und der Morbus Crohn-Antikörperbank wurden insgesamt 1827 verschiedene cDNA-Expressionsklone als potentielle Autoantigene identifiziert. Diese wurden analog zu den oben beschriebenen „high-density“ Proteinmacroarrays in Duplikaten auf sogenannte „customized“ Proteinmacroarrays (7x11 cm, Immobilon P, Millipore) gespottet.

Gegenstand dieser Arbeit ist das Sekundärscreening der 1827 potentiellen Autoantigene mit Seren von Patienten mit Lungentumoren und Patienten mit verschiedenen anderen nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen, sowie mit Seren von gesunden Probanden.

Das Sekundärscreening wurde im Gegensatz zum Primärscreening am Institut für Humangenetik durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mit geringen Abweichungen analog o.g. Protokoll.

Nach der Serum-Inkubation bei 4°C ü.N. wurden alle gebundenen Antikörper von der Membran mit Stripping-Lösung entfernt und mit selber Serum-Lösung erneut bei 4°C ü.N. inkubiert. Durch diesen „Vorinkubationsschritt“ werden Serum-Antikörper, die gegen bakterielle Proteine gerichtet sind, aus dem Serum herausgefiltert. Hierzu wurde die Membran zunächst 3x10 min in TBST bei RT gewaschen, anschließend 30 min mit 70°C warmer Stripping-Lösung inkubiert, worauf zwei 20-minütige TBST-Waschschritte folgten. Nach zweimaligem Spülen der Membranen in TBS, wurde die Membran 2x10 min in TBS gewaschen. Vor der erneuten Serum-Inkubation ü.N. wurde die Membran 2 h in Blocking-Lösung inkubiert. Als Sekundär-Antikörper wurde im Sekundärscreening Cyanine 5-markierter Antikörper verwendet (1:1000 in Blocking-Lösung, rabbit anti-human IgG, IgA, IgM (H+L)-Cy5, Dianova). Die „customized“ Macroarrays wurden mit einem Fläschenscanner (Typhoon 9410) gescannt (PMT:300, Pixel Size: 50 microns, Emission Filter: 670 BP 30 Cy5). Der Ablauf des Sekundärscreenings ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

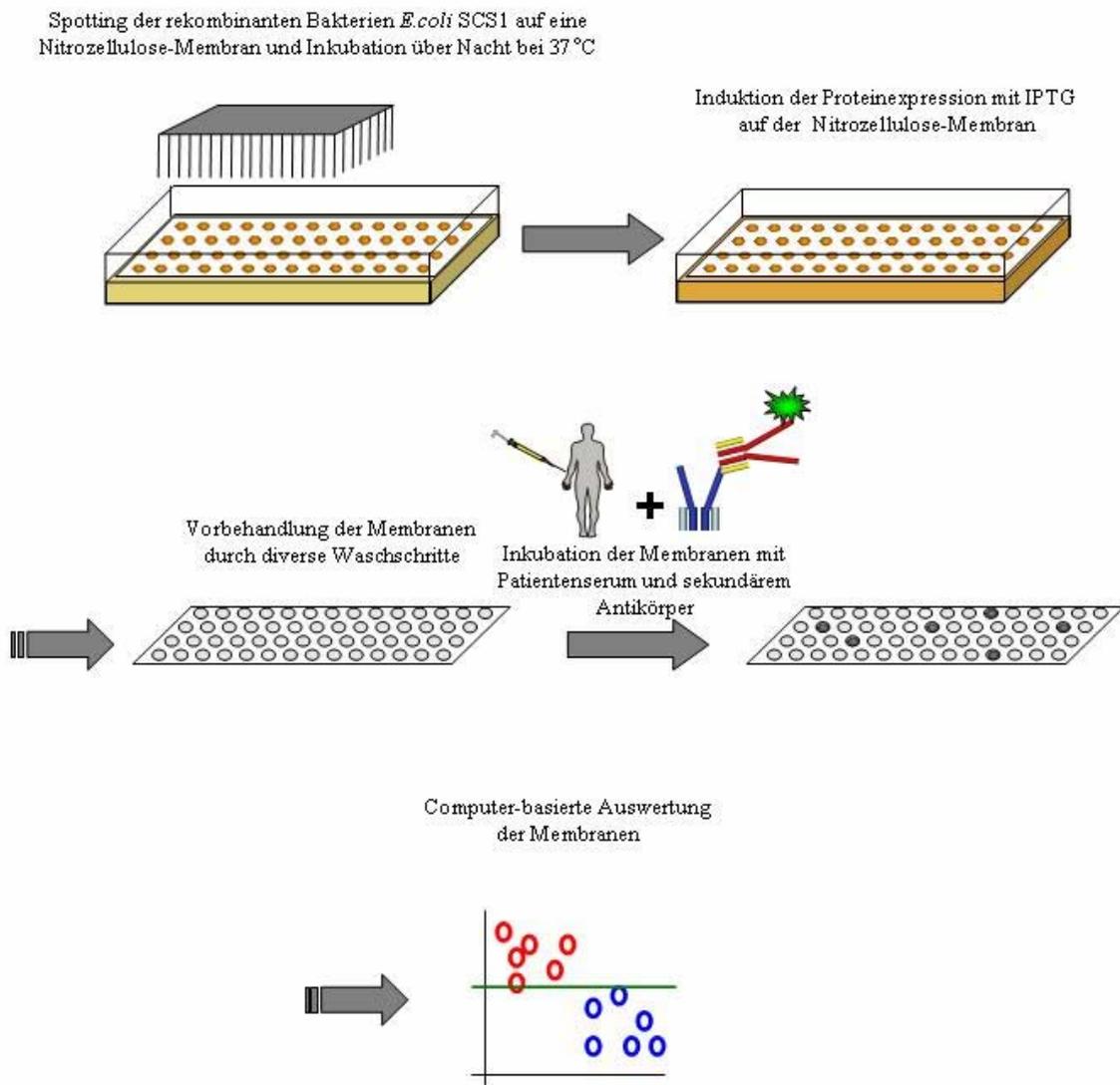


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Durchführung des Proteinmacroarray-Sekundärscreenings

Auswertung des Sekundärscreenings

Aufgrund der Menge untersuchter Seren und Antigene ist es kaum zu bewältigen, die Auswertung der Proteinmacroarrays manuell durchzuführen. Deshalb wurde in Kooperation mit dem Zentrum für Bioinformatik ein automatisches Bildauswertesystem entwickelt. Dies bietet außerdem den Vorteil, dass keine subjektiven Unterschiede in der Auswertung durch verschiedene Experimentatoren entstehen können, die Auswertung somit objektiv ist. Das entwickelte Programm geht bei der Bildauswertung in mehreren Schritten vor. Zuerst erfolgt eine Präprozessierung (pre-processing) der Arrays. Hierbei wurden die gescannten Bilder der Arrays standardisiert, d.h. sie wurden richtig ausgerichtet und zugeschnitten. In einem zweiten

Schritt wurden die Arrays in sogenannte Spot-Areale eingeteilt (gridding). Das bedeutet, jeder Array wurde in 384 Subarrays eingeteilt. In jedem Subarray könnten theoretisch mit einem 5x5 Spotting-Muster 25 Spots sein, wobei der mittlere Spot immer ein Orientierungsspot aus Tinte ist. Deshalb wurde jeder Subarray in 25 Felder aufgeteilt (clustering). Es könnten also 12 Klone in Duplikaten gespottet werden. In unserem Fall wurde diese theoretisch mögliche Anzahl an Spots jedoch nicht ausgeschöpft. Es wurden maximal sechs Klone in Duplikaten gespottet, die restlichen Felder blieben frei. Da es sich hier um gespottete Bakterien handelt, kann es sein, dass ein Spot, je nach Bakterienwachstum, größer ist als der andere und somit evtl. über ein Feld hinausragt. In diesem speziellen Fall wurde dann eine Korrektur vorgenommen (grid refinement). Im nächsten Schritt wurden die Pixel jedes der 25 Felder in Vordergrundpixel (Pixel der Spots) und in Hintergrundpixel getrennt und die eigentlichen Spot-Intensitäten berechnet (value extraction). Den Feldern, in denen keine Spots enthalten sind, wurde kein Wert zugeordnet, sondern das Kürzel „na“ für „not available“. Ein Überblick über die einzelnen Schritte der automatischen Bildauswertung ist in Abbildung 7 dargestellt.

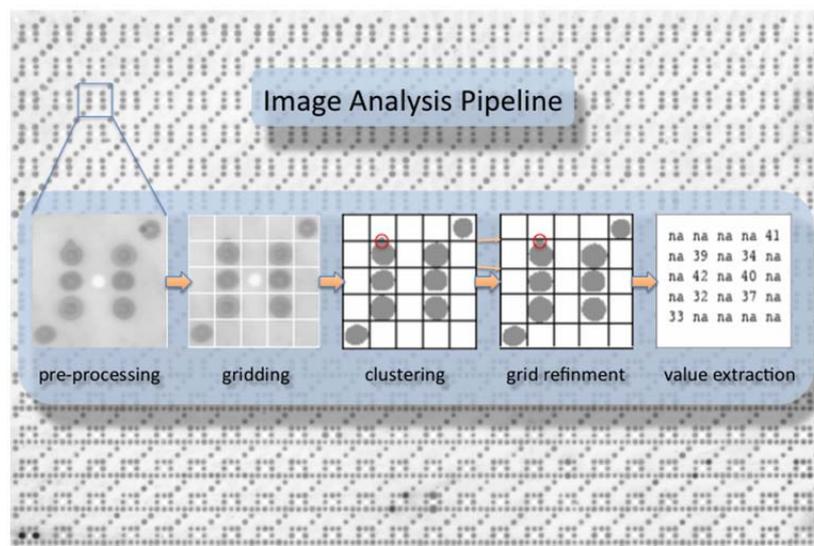


Abbildung 7: Bildauswertesystem zur automatisierten standardisierten Analyse der Proteinmacroarrays.

Im „pre-processing“ werden die gescannten Bilder der Arrays standardisiert. Im „gridding“ werden die Arrays in Spot-Areale eingeteilt. Durch das „clustering“ werden die Pixel in Vordergrund- und Hintergrundpixel separiert. Ragt ein Spot über das Spot-Areal hinaus, wird eine Korrektur vorgenommen (grid refinement). Im letzten Schritt werden die Spot-Intensitäten berechnet und die Werte extrahiert (value extraction).

Nach der Bildauswertung wurde zunächst der Mittelwert aller Duplikate berechnet, so dass eine Liste mit 1827 Werten entstand. Da es Schwankungen in der Helligkeit der Bilder gibt, die aufgrund der Serum-Beschaffenheit oder während des Scan-Vorgangs entstehen, muss als nächstes eine Normalisierung erfolgen. An die Normalisierung schloss sich die statistische Auswertung der Arrays an. Als die hierfür am Besten geeignete Methode stellte sich die

Berechnung der "Area under the Receiver Operator Characteristics curve (AUC)" mit anschließender Anwendung der statistischen Lernmethode „Support Vector Machine (SVM)“ heraus. Die Berechnung der AUC-Werte wurde wie folgt durchgeführt: Alle normalisierten Intensitätswerte wurden als Threshold benutzt. Bei dem Vergleich Tumorseren vs. Kontrollseren wurden Tumorseren, die über dem Threshold liegen, als richtig positiv (true positives, TP), alle unter dem Threshold liegenden Kontrollseren als richtig negativ (true negatives, TN) bezeichnet. Kontrollseren über dem Threshold wurden als falsch positiv (false positives, FP) und Tumorseren unter dem Threshold als falsch negativ (false negatives, FN) bezeichnet. Danach wurde ebenfalls für jeden Threshold die Spezifität ($TN/(TN+FP)$) und Sensitivität ($TP/(TP+FN)$) berechnet. Hier ist zu beachten, dass in einigen Fällen die Klassifikation umgekehrt werden muß. Dann sind Tumorseren mit Intensitätswerten unter dem Threshold als richtig positiv (TP) anzusehen. Dies ist im Beispiel Tumorseren vs. Kontrollseren für all die Klone der Fall, die eine stärkere Immunogenität in Kontrollseren als in den Tumorseren aufweisen. Aus der Spezifität und der Sensitivität kann dann die „Receiver Operator Characteristics (ROC) curve“ erstellt werden. In der ROC-Kurve ist die Spezifität als Funktion von 1-Sensitivität aufgetragen. Die berechneten AUC-Werte reichen hier von 0 bis 1. Klone mit einer AUC von 0,5 sind wertlos für eine betrachtete Klassifikation. Klone mit einer AUC von 0 bzw. 1 sind dagegen optimal für die Trennung zweier Gruppen geeignet. Das bedeutet, je mehr der AUC-Wert eines Klons von 0,5 abweicht, desto besser eignet sich dieser Klon für die Trennungsaufgabe. Hat ein Klon eine AUC von 0, bedeutet dies beispielsweise im Vergleich Lungentumor versus Normal, dass er in allen Lungentumorseren stärker immunogen war als in den Normalseren. Umgekehrt waren Klone mit einer AUC von 1 stärker immunogen in den Normalseren. In Abbildung 8 ist die Klassifikation zweier Serumgruppen für ein fiktives Beispiel gezeigt.

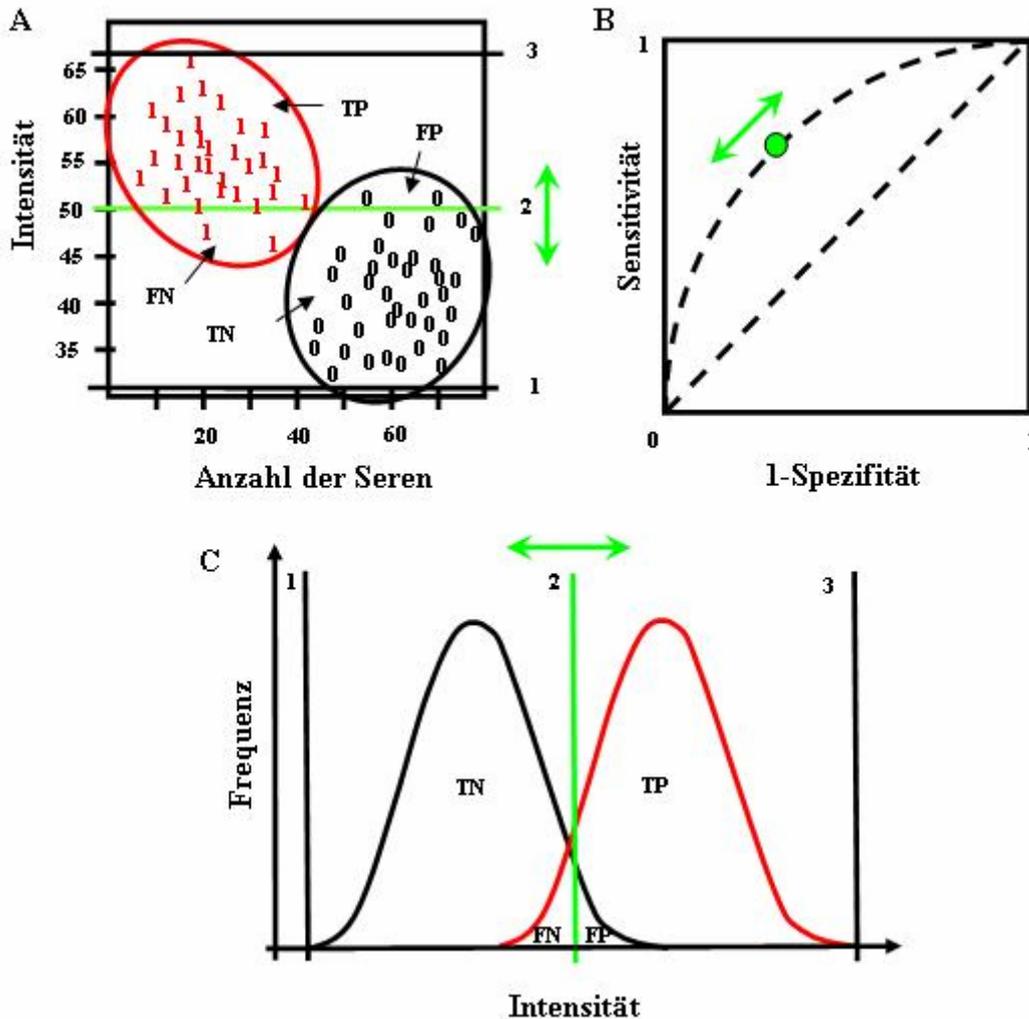


Abbildung 8: Die Trennung der Intensitätswerte zweier Serumgruppen beispielhaft gezeigt für ein fiktives Antigen.

A: Intensitätswerte für das Antigen x für jedes einzelne Serum der beiden Gruppen 0 und 1.

Die Position des Schwellenwertes (vertikale grüne Linie (2)) gibt die Anzahl der richtig Positiven (true positives, TP), der richtig Negativen (true negatives, TN), der falsch Positiven (false positives, FP) und der falsch Negativen (false negatives, FN) an. Die vertikalen Linien 1 und 2 geben den minimalen und maximalen Schwellenwert an.

B: Die Spezifität ($TN/(TN+FP)$) und Sensitivität ($TP/(TP+FN)$) eines Tests wird durch die „Receiver Operator Characteristics (ROC) curve“ visualisiert. Die Funktionalität eines Tests kann durch die „Area under the ROC curve (AUC)“ dargestellt werden. Hier wird der Schwellenwert durch den grünen Punkt angegeben. Die Werte für Sensitivität und Spezifität können durch Bewegung des Schwellenwertes modifiziert werden.

C: Die beiden Kurven repräsentieren die Verteilung der Intensitätswerte zweier Serumgruppen für ein Antigen x (rote Kurve = Patientenserum, schwarze Kurve = Kontrollserum).

Für die Klassifikationsberechnungen mittels SVM wurde wie bei den serologischen Spotassays (siehe 2.1.1.9) die sogenannte resampling-Methode verwendet, die als Kreuzvalidierung bekannt ist. Die verwendete 10-fach Kreuzvalidierung teilt den Datensatz in

90% Trainings- und 10% Testdaten auf, wobei jedes Sample genau einmal in einem Testdatensatz gewesen sein muss. Um die statistische Schwankung bei verschiedenen Aufteilungen zu berücksichtigen, wurden für jede der Klassifikationen insgesamt 100 Kreuzvalidierungsläufe berechnet. Zu jedem Kreuzvalidierungslauf wurde die Sensitivität, die Spezifität und die Genauigkeit ermittelt und daraus das arithmetische Mittel (Mean Value) bestimmt.

Zusätzlich zur o.g. Auswertung basierend auf AUC-Berechnung und SVM wurde die Frequenz berechnet, mit der jeder einzelne Klon in einer bestimmten Serumgruppe immunogen war. Hierzu muss zunächst festgelegt werden, ab welcher Spot-Intensität ein Spot als positiv bezeichnet wird. Im Durchschnitt liegen die Intensitätswerte für alle Spots zwischen 30 und 70. Ab einer Intensität von 50 hoben sich die Spots von den anderen Spots niedrigerer Intensität ab. Das bedeutet, diese Spots hätte man auch bei der manuellen Auswertung mittels AIDA-Software als positiv gewertet. Der Intensitätswert von 50 wurde also als der Schwellenwert gewählt, ab dem ein Spot als positiv gilt. Bei der Frequenzberechnung werden die Informationen über die Intensitätswerte jedes einzelnen Spots in binäre Ja-/Nein-Antworten umgewandelt, wodurch ein großes Maß an Information verloren geht. Deshalb muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass Klone mit hoher Frequenz nicht zwangsläufig gute AUC-Werte für eine bestimmte Klassifikationsaufgabe haben müssen.

2.2 Analyse der microRNA-Expression

2.2.1 Blutentnahme mittels PAXgene™ blood RNA System

Es ist bekannt, dass sich die Genexpression in peripherem Blut postphlebotomisch, d.h. nach der Blutentnahme, innerhalb weniger Minuten durch Transkriptinduktion und -degradation verändert [113, 114]. Um diesem Problem entgegenzuwirken wurde das PAXgene™ blood RNA System entwickelt. Die PAXgene™-Blutentnahmeröhrchen enthalten eine Lösung, die die RNA stabilisiert. Dadurch wird die *ex vivo*-Veränderung des Expressionsprofils verhindert. Die RNA wird in den PAXgene™-Blutentnahmeröhrchen für drei Tage bei 18-25°C, fünf Tage bei 2-8°C oder über einen längeren Zeitraum (mindestens 6 Monate) bei -20°C bis -70°C stabilisiert. Die PAXgene™-Blutentnahmeröhrchen enthalten 6,9 ml der RNA-stabilisierenden Lösung und sind zur Entnahme von je 2,5 ml Blut pro Röhrchen ausgelegt. Pro Patient oder gesundem Blutspender wurden 2 Röhrchen, also 5 ml, Blut entnommen. Nach 8-10-maligem Invertieren wurden die Röhrchen über Nacht bei 4°C gelagert. Für eine längere Lagerung über mehrere Tage wurden sie bei -20°C eingefroren. Vor der RNA-Isolation wurde das Blut mindestens 2 h bei RT inkubiert.

2.2.2 Isolation der Total-RNA inklusive miRNA

RNase-freies Wasser

H₂O_{dd}

0,1 % DEPC

Der Inhalt aus beiden Blutröhrchen jedes Patienten oder gesunden Blutspenders wurde gepoolt und 10 min bei 5000 g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ca. 10 ml RNase-freiem Wasser durch vortexen resuspendiert und wieder 10 min bei 5000 g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde die Total-RNA inklusive der miRNA mittels miRNeasy-Kit (Qiagen GmbH, Hilden) isoliert. Hierzu wurde das Pellet in 700 µl QIAzol Lysis-Reagenz resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde 140 µl Chloroform hinzu gegeben, 15 sec gevortext und 2-3 min bei RT inkubiert. Hieran schloss sich eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und 4°C an. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1,5 Volumen 100 % Ethanol versetzt. Von diesem Gemisch wurden jeweils 700 µl auf eine Säule gegeben und 15 sec bei 13000 rpm und RT zentrifugiert.

Nachdem das gesamte Gemisch die Säule passiert hatte, wurden 700 µl Puffer RWT auf die Säule gegeben und 15 sec bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl Puffer RPL auf die Säule gegeben und 15 sec bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Danach wurde noch einmal 500 µl Puffer RPL auf die Säule gegeben und 2 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Die Säule wurde dann zum Trocknen 1 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Elution mit 40 µl RNase-freiem Wasser durch 1 min zentrifugieren bei 13000 rpm und RT. Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde wie unter 2.1.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Lagerung der eluierten RNA erfolgte bei -70°C.

2.2.3 Qualitätsüberprüfung der Total-RNA mittels Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgt in Agarosegelen im elektrischen Feld. Die Auftrennung von linearen Nukleinsäuren beruht auf der Tatsache, dass die negativ geladene Nukleinsäure in einem elektrischen Feld zur Anode wandert. Die elektrophoretische Beweglichkeit der Nukleinsäuren ist dabei antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Meyers et al., 1976). Nach Färbung mit Ethidiumbromid, das in GC-Paare der DNA oder RNA interkaliert, kann die Nukleinsäure unter UV-Licht (302 nm) auf Grund der Abgabe von Fluoreszenzlicht detektiert werden.

Der Agarose-Gehalt eines Gels ist abhängig von der Größe der zu trennenden Nukleinsäurefragmente. Die Poren im Gel, deren Größe durch den Gehalt an Agarose bestimmt wird, wirken als Sieb, durch das die Moleküle wandern. Größere Fragmente wandern mit geringerer Geschwindigkeit als kleine. Hierdurch findet eine Auftrennung nach ihrer Größe (Molekulargewicht) statt.

RNA ist im Gegensatz zu DNA einzelsträngig. Einzelsträngige Polynukleotidketten neigen dazu, sich durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu falten. Soll RNA dem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden, müssen doppelsträngige Bereiche durch Denaturierung voneinander getrennt werden. Desweiteren verwendet man denaturierende Agarosegele. Als Denaturierungsmittel wird meist Formaldehyd verwendet. Die Aldehydgruppen des Formaldehyds bilden mit den Aminogruppen der Nukleotidbasen Schiff'sche Basen. Diese Aminogruppen stehen dann nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Verfügung und die RNA bleibt linear.

10xMOPS-Puffer

0,2 M MOPS

0,05 M NaCl

0,01 M EDTA

0,1% DEPC

ph 5,5-7,0

ü.N. bei 37°C inkubieren

RNA-Ladepuffer

720 µl deionisiertes Formamid

160 µl 10xMOPS-Puffer

100 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

80 µl Glycerin

80 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung

160 µl RNase-freies Wasser

Zur Herstellung des Formaldehyd-Agarosegels wurde 0,5 g Agarose (Invitrogen) in 47,3 ml 1xMOPS-Puffer aufgelöst und bei 55°C für 30 min inkubiert. Außerdem wurden 2,7 ml 37% Formaldehyd 30 min bei 55°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Formaldehyd zur Gellösung zugegeben und in eine entsprechende Gelkammer gegossen. Die zu untersuchende RNA wurde mit RNA-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend für mindestens 1 h bei 80 Volt im Formaldehydgel aufgetrennt. Der Ladepuffer hat die Funktionen, einerseits enzymatische Reaktionen durch das enthaltene EDTA zu unterbinden, andererseits mittels des Glycerins die Probe zu beschweren und effizient in das Gel einsinken zu lassen. Weiterhin erzeugt Bromphenolblau eine gut sichtbare Lauffront im Gel, die es ermöglicht, den Probenlauf zu verfolgen (Bromphenolblau wandert mit einer Laufgeschwindigkeit, die Nukleinsäurefragmenten von 10 bis 100 bp entspricht, durch das Gel.). Intakte RNA weist im Gel unter UV-Licht die drei charakteristischen Banden bei 5,1 kb (28S rRNA), 1,9 kb (18S rRNA) und bei 0,1 bis 0,3 kb (5.8S rRNA, 5S rRNA, tRNA, miRNA) auf.

2.2.4 Anfertigung der miRNA-Microarrays

Die Analyse der miRNA-Expression mittels Biochip wurde von der Firma febit holding GmbH, Heidelberg, mittels Geniom Realtime Analyzer und dem Geniom[®] Biochip miRNA homo sapiens durchgeführt. Jeder Biochip enthält die komplementären Sequenzen zu allen 866 in der Sanger miRBase 12.0 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) niedergelegten miRNAs und mature star-Sequenzen. Von jeder dieser 866 Sequenzen werden sieben Replikate in zufälliger Verteilung auf den Biochip gespottet. Zusätzlich enthält der Biochip verschiedene Kontrollsequenzen (synthetisch hergestellte Oligonukleotide).

Zur Durchführung der Biochip-Analyse wurde 1 µg Total-RNA mit Hilfe des *mirVANA*[™] miRNA labeling Kit (Ambion) markiert. Hierbei wurden der RNA durch die *E. coli* Poly(A)-Polymerase und einer Mischung aus unmodifizierten und Amin-modifizierten Nukleotiden an das 3'-Ende 20-50 Nukleotide angehängt. An die Amin-modifizierten RNAs wurden dann Fluoreszenz-markierte Amin-reaktive Reste gekoppelt. Der Vorteil dieser Markierungsmethode liegt darin, dass jede miRNA mehrere Fluoreszenz-markierte Moleküle trägt. Da der Anteil der miRNA in der Total-RNA nur etwa 10^{-6} beträgt, ist eine starke Fluoreszenzmarkierung wichtig für gute miRNA-Microarray Resultate. Die markierte miRNA wurde 16 Stunden bei 42°C mit dem Biochip hybridisiert. Anschließende Waschschrte und eine Signalverstärkung liefen im Geniom Realtime Analyzer automatisch ab. Die resultierenden Detektionsbilder wurden mittels Geniom Wizard Software analysiert. Für jeden Array wurden die Rohwerte der Spotintensitäten extrahiert. Nach einer Hintergrundkorrektur wurde der Median der Intensitätswerte für die sieben Replikate jeder miRNA berechnet. Um die Ergebnisse verschiedener Arrays zu normalisieren, wurde die Methode Variance Stabilizing Normalization (VSN) angewendet. Für alle weiteren Analysen wurden die VSN-normalisierten Intensitätswerte herangezogen. In Abbildung 9 sind die Arbeitsschritte der miRNA-Microarrayanalyse schematisch dargestellt.

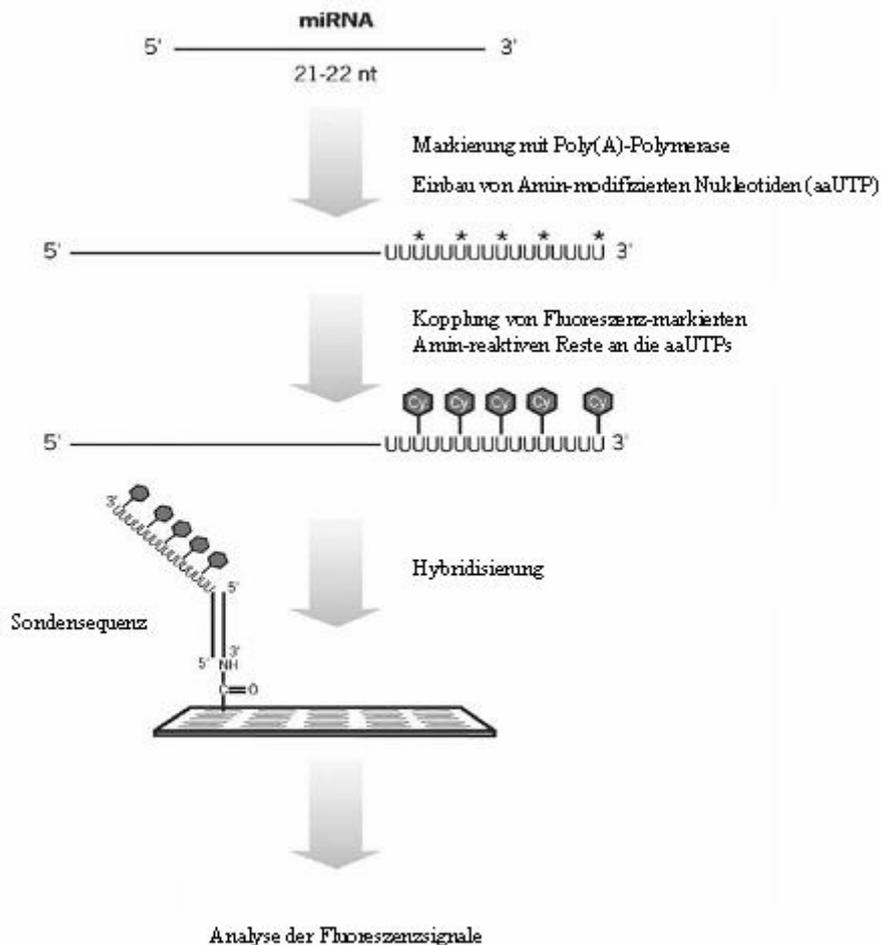


Abbildung 9: Schematische Darstellung der miRNA-Microarrayanalyse (modifiziert nach Shingara et al., [115])

2.2.5 Grundlagen der quantitativen Real-Time PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, die mittels bakterieller hitzestabiler DNA-Polymerase eine *in vitro*-Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte ermöglicht. Eingeführt wurde die PCR 1986 durch K. Mullis [116]. Eine spezifische Amplifikation wird dadurch erreicht, dass Oligonukleotide als Primer gewählt werden, die jeweils komplementär zu einer Region vor und einer Region hinter der gewünschten Zielsequenz sind. Dadurch, dass jeder Primer an nur einen der DNA-Stränge bindet, können beide Stränge als Vorlage (Template) dienen, wodurch sich theoretisch pro Zyklus eine Verdoppelung der Zielsequenz erreichen lässt. Da in exponentiellen Systemen auch kleinste Abweichungen spürbare Veränderungen der Ergebnisse bewirken können, lässt sich die vollständige Verdopplung der DNA-Menge in der Praxis nur annähernd erreichen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten: Zuerst erfolgt die Denaturierung der dsDNA, danach die Anlagerung der Primer (Annealing)

und schließlich die Synthese des jeweiligen Komplementärstrangs (Extension). Durch mehrfache Wiederholung dieser Zyklen wird eine nahezu exponentielle Amplifikation der ursprünglichen Nukleinsäuresequenz erreicht.

Durch die Methode der Echtzeit- oder Real-Time PCR (qRT-PCR) gibt es die Möglichkeit, Amplifikation und Nachweis der Produkte simultan im gleichen Reaktionsgefäß durchzuführen. Dabei wird der Reaktion eine fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde oder ein für DNA-Nachweise geeigneter Fluoreszenzfarbstoff beigegeben. Bei beiden Verfahren kann nach jedem Zyklus die steigende Konzentration des PCR-Produkts anhand der stärker werdenden Fluoreszenz festgestellt werden. In vorliegender Arbeit wurde die qRT-PCR mit speziellen Oligonukleotidsonden (TaqMan[®] microRNA Assay, Applied Biosystems) durchgeführt. Diese Sonden wurden entwickelt, um reife miRNAs zu detektieren und zu quantifizieren. An das 5'-Ende der Sonden ist der Fluoreszenzfarbstoff FAM[™] (Reporter), an das 3'-Ende ein „minor groove binder“ (MGB) und ein nicht-fluoreszierender Quencher (NFQ) gekoppelt. Während der PCR bindet die Sonde spezifisch zwischen dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer an die cDNA, die zuvor mittels reverser Transkription aus RNA hergestellt wurde. Ist die Sonde intakt, wird durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher eine Fluoreszenz unterdrückt. Während der Extension baut die DNA-Polymerase gebundene Sonden ab. Durch den Abbau werden Reporter und Quencher getrennt, was zu einem Fluoreszenzsignal des Reporters führt. Das oben beschriebene Verfahren ist in Abbildung 10 dargestellt.

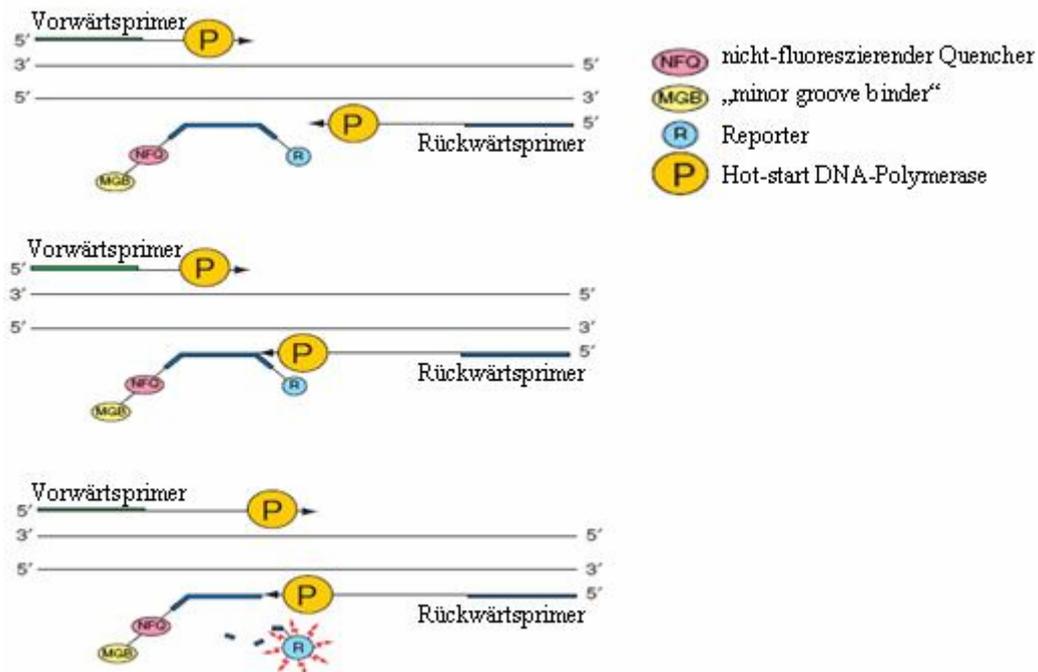


Abbildung 10: Prinzip der Oligonukleotidsonden der TaqMan® microRNA Assays

(Abbildung modifiziert nach Applied Biosystems).

Die Sonden binden spezifisch zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer an die miRNA. Durch die räumliche Nähe des Reporters und des Quenchers wird eine Fluoreszenz unterdrückt. Die DNA-Polymerase baut während der Extension die Sonde ab. Dabei entfernen sich Reporter und Quencher voneinander und der Reporter fluoresziert.

Die Quantifizierung der miRNA mittels TaqMan® microRNA Assay erfolgt in einer Zweischnitt-RT-PCR. Im ersten Schritt wird die cDNA aus der Total-RNA mittels miRNA-spezifischen Primern revers transkribiert. Im zweiten Schritt werden die PCR-Produkte ausgehend von der cDNA amplifiziert (Real-Time PCR). Der Ablauf der Zweischnitt-RT-PCR ist in Abbildung 11 dargestellt.

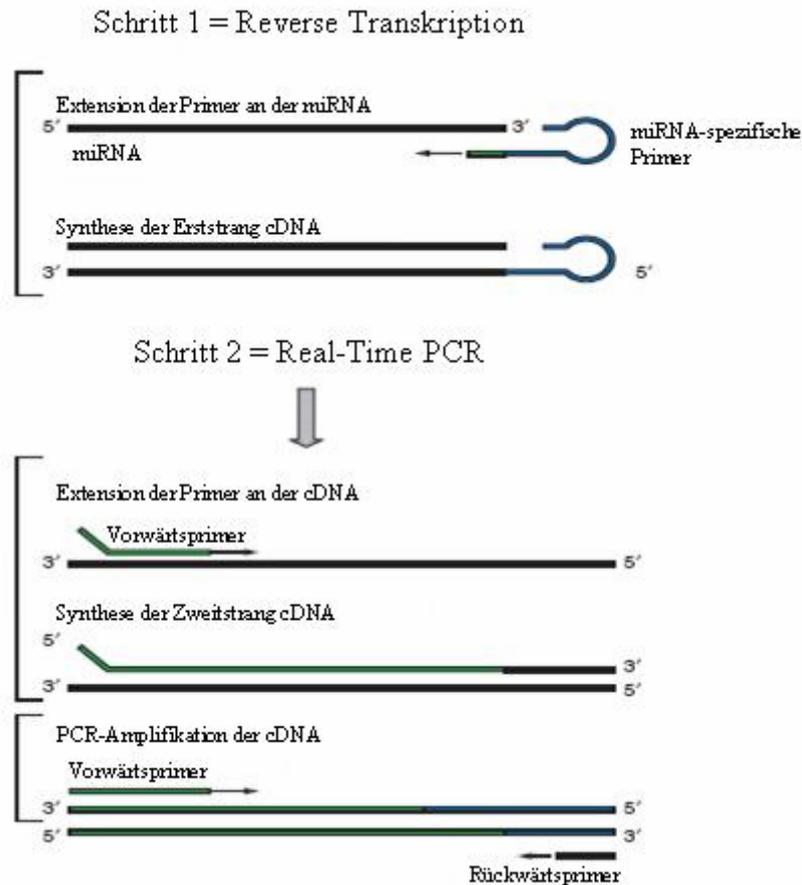


Abbildung 11: Ablauf der Zweischritt-RT-PCR (Abbildung modifiziert nach Applied Biosystems)

2.2.5.1 Reverse Transkription mit miRNA-spezifischen stem loop-Primern

Zur Umschreibung einzelner miRNAs in cDNA wurden die spezifischen stem loop-Primer aus den Taqman[®] MicroRNA Assays verwendet. Von der mittels miRNeasy-Kit (Qiagen) aufgereinigten Total-RNA wurden 10 ng zur reversen Transkription (RT) eingesetzt. Die RT wurde mit dem Taqman[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) durchgeführt.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Menge (µl)
100 mM dNTP	0,15
MultiScribe [™] Reverse Transkriptase, 50 U/µl	1
10xRT-Puffer	1,5
RNase-Inhibitor	0,19

Als Kontrollen wurde für jede Total-RNA und jede RT-Reaktion eine RT(-)-Kontrolle (Reaktionsansatz ohne Reverse Transkriptase) und für jeden stem loop-Primer eine no-template-Kontrolle (Reaktionsansatz ohne RNA) durchgeführt.

Die RT-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (PTC100) mit folgendem Protokoll :

Zeit	Temperatur
30 min	16°C
30 min	42°C
5 min	85°C
∞	4°C

2.2.5.2 Quantitative Real-Time PCR mit TaqMan[®] microRNA Assays

Die qRT-PCR wurde im Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System unter Verwendung der miRNA-spezifischen TaqMan[®] microRNA Assays durchgeführt.

Der Reaktionsansatz für die qRT-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Menge (µl)
Taqman [®] 2x Universal PCR Master Mix, no AmpErase [®] (UNG)	10
Nuklease-freies Wasser	6
20xTaqman [®] MicroRNA Assay	1
RT-Produkt 1:30	3
Total	20

Jede RT(+)-PCR wurde in Triplikaten angefertigt. Als Kontrolle diente neben der RT(-)- und der no-template-Kontrolle eine Wasser-Kontrolle (PCR-Ansatz ohne cDNA).

Die qRT-PCR wurde nach folgendem PCR-Protokoll durchgeführt:

Schritt	AmpliTaQ Gold [®] Enzym Aktivierung	PCR	
		Zyklen (40x)	
		Denaturierung	Annealing/Extension
Zeit	10 min	10 min	60 sec
Temperatur	95°C	95°C	60°C

2.2.5.3 Relative Quantifizierung der miRNA-Expression

Die Quantifizierung der Expression kann absolut oder relativ erfolgen. Bei der absoluten Quantifizierung wird die genaue Kopienzahl oder Konzentration einer cDNA bestimmt, indem man das PCR-Fluoreszenzsignal mit einer Standardkurve vergleicht. In vorliegender Arbeit wurde aber die relative Quantifizierung angewendet. Bei der relativen Quantifizierung werden die Fluoreszenzsignale des Zielgens in den zu untersuchenden RNA-Proben und die Signale des Zielgens einer Kontrollprobe (Calibrator) mit den Fluoreszenzsignalen eines endogenen Kontrollgens normalisiert und im Anschluß das Verhältnis des Zielgens in der zu untersuchenden Probe zum Calibrator bestimmt. Hierzu wird die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Delta-Delta- C_T) Methode angewendet. Der C_T -Wert (Threshold Cycle) ist definiert als der PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal der Amplifikate das Hintergrundsignal übersteigt (siehe Abbildung 12).

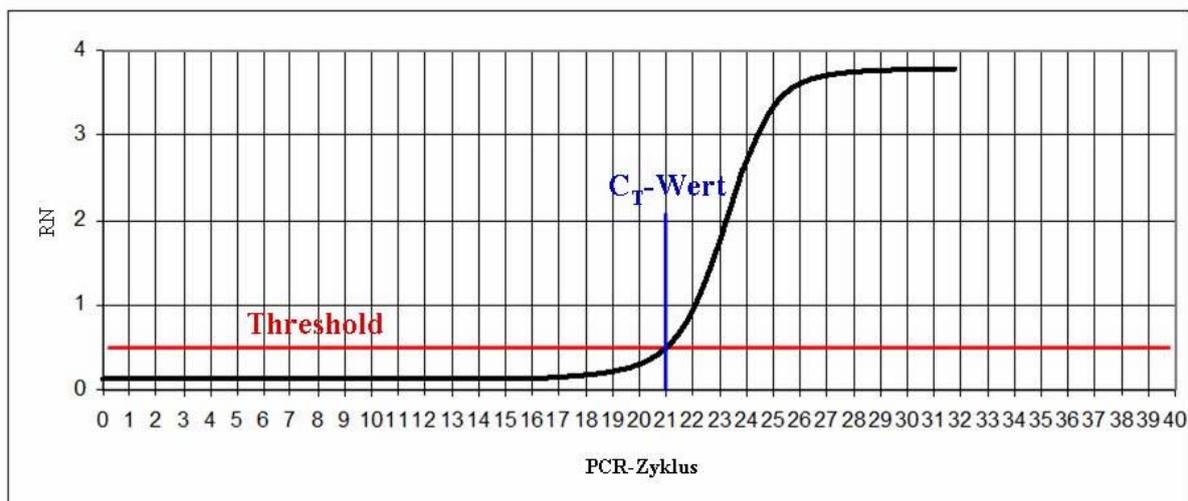


Abbildung 12: Bestimmung des C_T -Wertes.

Der C_T -Wert (Threshold Cycle) ist der PCR-Zyklus, bei dem die Kurve der Fluoreszenzsignale der Amplifikate den Threshold (Hintergrundsignal) schneidet.

R_n = normalisiertes Reportersignal (Referenzfluoreszenz (ROX)/FAM-Signal)

Zur Berechnung des ΔC_T -Wertes wird der C_T -Wert des endogenen Kontrollgens von dem C_T -Wert des Zielgens der zu untersuchenden Proben subtrahiert:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{endogene Kontrolle})$$

Die gleiche Berechnung wird auch für das Zielgen in der Calibratorprobe durchgeführt:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Calibrator}) - C_T (\text{endogene Kontrolle})$$

Im Anschluß wird der C_T -Wert des Zielgens der zu untersuchenden Probe mit dem C_T -Wert des Zielgens in der Calibratorprobe normalisiert:

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T (\text{Zielgen}) - \Delta C_T (\text{Calibrator})$$

Dieser $\Delta \Delta C_T$ -Wert wird in unten stehende Formel eingesetzt:

$$2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Das hieraus resultierende Ergebnis gibt den mit dem endogenen Kontrollgen normalisierten Expressionsstatus des Zielgens in der zu untersuchenden Probe im Verhältnis zu der Expression des Zielgens in der Calibratorprobe an.

Als Calibrator wurde in vorliegender Arbeit ein cDNA-Pool von fünf verschiedenen gesunden Probanden benutzt. Zuvor wurde für jede zu untersuchende miRNA und jede cDNA einzeln getestet, ob die C_T -Werte, d.h. die Expression der einzelnen miRNAs in den Blutzellen der fünf Probanden ungefähr übereinstimmen. Als endogene Kontrolle diente die nicht-kodierende RNA U6 snRNA, eine häufig verwendete Kontroll-RNA bei miRNA-Studien [99, 101, 117]. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von sechs miRNAs (hsa-miR-106b, hsa-miR-126, hsa-miR-98, hsa-let-7d, hsa-miR-22 und hsa-miR-140-3p) in Blutzellen von acht verschiedenen Lungentumorpatienten mit der Expression in Blutzellen von fünf gesunden Probanden (Calibrator Pool) verglichen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Analyse der Seroreaktivitätsprofile mittels Immunoscreening unter Verwendung von serologischen Spotassays und Proteinmacroarrays

Das Immunoscreening wurde auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt. Zuerst wurden mittels serologischem Spotassay Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge (im Folgenden auch als Plattenepithelkarzinomseren, oder kurz als PEC-Seren bezeichnet), Seren von Patienten mit Bronchialerkrankungen (COPD, Emphysem und Pneumonie), sowie Seren von Probanden ohne bekannte Vorerkrankungen (im Folgenden auch als Normalseren bezeichnet) auf spezifische Seroreaktivitätsprofile untersucht. Dieses Screening diente dazu festzustellen, ob es möglich ist, anhand eines Seroreaktivitätsprofils Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom von Normalseren oder Seren von Patienten mit Bronchialerkrankungen zu unterscheiden. Auf das Screening mittels serologischen Spotassays folgte das Proteinmacroarray-Screening. Die „high-density“ Proteinmacroarrays ermöglichen, im Vergleich zu den Spotassays, eine effizientere Untersuchung einer Vielzahl von Antigenen und Seren. Neben Seren von Plattenepithelkarzinompatienten wurden hierbei auch Seren von Patienten mit anderen Lungentumorarten, wie z.B. Adenokarzinom, großzelligem Lungenkarzinom und kleinzelligem Lungenkarzinom untersucht. Ebenfalls wurden Seren von Patienten mit Bronchialerkrankungen und Seren von gesunden Probanden auf ihr Autoantikörperprofil analysiert. Mit den Proteinmacroarrays wurde außerdem überprüft, ob eine Tumor-assoziierte Autoimmunreaktion auch über einen längeren Zeitraum, insbesondere nach Tumorresektion, stabil bleibt. Dazu wurde sieben Lungentumorpatienten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten Blut entnommen und das Serum analysiert. Die erste Blutentnahme erfolgte präoperativ, die zweite Blutentnahme 8-10 Jahre nach der Tumorresektion.

Sowohl zur Untersuchung von Seren mittels serologischen Spotassays, als auch zur Untersuchung von Seren mittels Proteinmacroarrays werden cDNA-Banken verwendet. Bei der Arbeit mit cDNA-Banken ist prinzipiell zu beachten, dass bei der Herstellung dieser Banken oft nicht alle cDNA-Inserts im richtigen Leserahmen (im Folgenden als „in frame“ bezeichnet) in den entsprechenden Vektor kloniert werden, so dass es zu einer Verschiebung des Leserahmens kommt. Klone, die nicht im richtigen Leserahmen(im Folgenden als „out of frame“ bezeichnet) sind, können aber dennoch eine Immunreaktion auslösen. Eine mögliche

Erklärung hierfür ist, dass es sich hierbei um sogenannte Mimotope handelt. Als Mimotope werden Peptide bezeichnet, die die Struktur eines Epitops nachahmen. Aufgrund dieser Eigenschaft können Mimotope Immunantworten hervorrufen, die ursprünglich gegen das Epitop gerichtet waren, die das Mimotop imitiert [57].

3.1.1 Serologischer Spotassay

Für die serologischen Spotassays wurde ein Set aus 82 cDNA-Klonen zusammengestellt. Dieses Set setzt sich zusammen aus 27 Klonen, die bei vorangegangenen SEREX-Untersuchungen mit drei verschiedenen Lungentumor-cDNA-Bibliotheken als immunogen identifiziert wurden und 55 cDNA-Klonen, die in SEREX-Untersuchungen von verschiedenen Hirntumor-Banken, bzw. einer fötalen Hirn-cDNA-Bank als immunogen identifiziert wurden (siehe 2.1.1) [56, 62-65]. Einzelne Antigene können in verschiedenen Tumorarten immunogen sein. Dennoch können diese Antigene zur Trennung von Tumorseren von Kontrollseren beitragen, wenn man komplexe, spezifische Seroreaktivitätsprofile betrachtet.

Mit den o.g. 82 in vorangehenden SEREX-Untersuchungen identifizierten immunogenen cDNA-Klonen unterschiedlicher Herkunft wurden 39 Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge, 29 Patienten mit häufig auftretenden Bronchialerkrankungen (COPD, Emphysem und Pneumonie) und 40 gesunden Probanden in einem Spotassay-Screening auf spezifische Seroreaktivitätsprofile untersucht. Alle untersuchten Seren sowie die dazugehörigen Patientendaten sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Im Spotassay untersuchte Seren mit dazugehörigen Patientendaten

Serumgruppe	klinisches Stadium / Erkrankung	Anzahl Seren	Durchschnittsalter	Männer / Frauen
Plattenepithelkarzinom	I A / I B	18	67,2	17 / 1
	II A / II B	12	65,9	12 / 0
	III A / III B	6	63,5	6 / 0
	IV	1	62	0 / 1
	Rezidive	2	70	2 / 0
nicht-tumoröse Bronchialerkrankungen	COPD/Emphysem	22	59,7	6 / 16
	Pneumonie	7	51	4 / 3
Normal		40	35	23 / 17

Im Speziellen sollten mit Hilfe des Spotassay-Immunoscreening u.a folgende Fragen beantwortet werden: Gibt es Unterschiede in der Frequenz der Autoantikörperantwort zwischen den unterschiedlichen Serumgruppen, d.h. den Plattenepithelkarzinomseren, den Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen oder den Normalseren? Kann man mit Hilfe spezifischer Seroreaktivitätsprofile Seren von Patienten mit malignen Lungentumoren von Seren von Patienten mit benignen Bronchialerkrankungen bzw. von gesunden Probanden unterscheiden? Mit welchen Spezifitäten und Sensitivitäten können diese Trennungen erzielt werden? Welche cDNA-Klone eignen sich am besten für solche Trennungen? Welche cDNA-Klone reagieren nur mit Lungentumor-Seren und könnten somit für potentielle Therapieansätze herangezogen werden?

3.1.1.1 Frequenz der Autoantikörperantwort in den untersuchten Seren

Die Spotassay-Membranen wurden visuell ausgewertet und so ermittelt, welche Antigene mit Antikörpern in welchem Serum reagierten. Basierend auf diesen Daten wurden auf unterschiedliche Arten Frequenzberechnungen durchführen. Zuerst wurde berechnet, gegen wie viele Antigene die Antikörper jedes einzelnen Serums eine Immunreaktion auslösten. Daraus wurde dann berechnet, wieviele Antigen-Antikörperreaktionen es durchschnittlich pro Serumgruppe (also Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom, Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen oder Seren gesunder Probanden) gab. Danach wurde berechnet, mit wievielen Seren einer Serumgruppe jedes einzelne Antigen eine Immunreaktion auslöste, d.h. die durchschnittliche Reaktivität jedes einzelnen Antigens pro Serumgruppe wurde ermittelt. Außerdem wurden für jedes Antigen die durchschnittlichen Reaktivitäten in den drei betrachteten Serumgruppen untereinander verglichen.

Berechnung der durchschnittlichen Antigen-Antikörperreaktionen pro Serumgruppe

Für jede Serumgruppe wurde die durchschnittliche Frequenz der Autoantikörperantworten zum einen für das komplette Set mit 82 cDNA-Klonen und zum anderen mit den 27 cDNA-Klonen, die mit den Lungentumor-Banken identifiziert wurden, näher betrachtet.

Bei der Betrachtung des kompletten Antigensets aus 82 cDNA-Klonen wurden mit den Antikörpern in den Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom durchschnittlich 6,4 Antigene detektiert. Mit den Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen wurden im Durchschnitt 4,4 Antigene und mit den Normalseren 7,8 Antigene detektiert. Der

Unterschied zwischen den Frequenzen der Seren der Plattenepithelkarzinompatienten und der Seren der gesunden Probanden war mit einem p-Wert von 0,0157 (two-tailed unpaired Wilcoxon Mann-Whitney test) statistisch signifikant. Ebenso war die Differenz zwischen den Seren der Plattenepithelkarzinompatienten und Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen, als auch die Differenz zwischen den Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen und den Normalseren statistisch signifikant (p-Werte: 0,0047 und 0,00001).

Von den 27 cDNA-Klonen, die in vorangegangenen SEREX-Untersuchungen mit Plattenepithelkarzinom-Banken identifiziert wurden, wurden mit den hier untersuchten Seren der Plattenepithelkarzinompatienten durchschnittlich 3,4 Antigene, mit den Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen 1,7 Antigene und mit den Normalseren nur 0,6 Antigene detektiert. Hier war ebenfalls die Differenz zwischen den Seren der Plattenepithelkarzinompatienten und der Seren der gesunden Probanden, sowie den Seren der Plattenepithelkarzinompatienten und den Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen statistisch signifikant (p-Werte 10^{-9} und 0,0015).

Betrachtet man die Berechnungen für das gesamte Set der 82 cDNA-Klone sieht man, dass die Seren der Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Vergleich zu den Normalseren eine etwas geringere Frequenz in der Autoantikörper-Antwort aufweisen. Betrachtet man dagegen das Set der 27 Plattenepithelkarzinom-Klone, weisen die Seren der Plattenepithelkarzinome eine deutlich höhere Frequenz auf als die Kontrollseren.

Die Ergebnisse der Frequenz-Berechnung sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Frequenzen jedes Einzelerums sind im Anhang in Tabelle A1 aufgeführt.

Tabelle 4: Absolutwerte der durchschnittlichen Frequenz der Autoantikörperantworten.
(in Klammern ist die tatsächliche Anzahl der Klone angegeben, die jede Serumgruppe detektierte)

Serumgruppe	alle 82 cDNA - Klone	27 PEC- cDNA -Klone *	55 andere cDNA -Klone **
Normalseren	7,8 (3-14)	0,6 (0-3)	7,2 (1-13)
Plattenepithelkarzinomseren	6,4 (2-13)	3,4 (0-9)	3 (0-9)
Bronchialerkrankungen-Seren	4,4 (1-12)	1,7 (0-7)	2,7 (0-10)

*Klone identifiziert im SEREX-Screening der drei cDNA-Banken aus PEC-Gewebe

** Klone identifiziert im SEREX-Screening der cDNA-Banken aus fötalem Hirn- und Hirntumor-Gewebe

Berechnung der durchschnittlichen Reaktivität aller 82 Einzelantigene für jede Serumgruppe

Neben den oben genannten durchschnittlichen Frequenzen der Antigen-Antikörperantworten für jedes Einzelerum bzw. jede Serumgruppe wurde auch die durchschnittliche Reaktivität aller 82 Einzelantigene für jede Serumgruppe berechnet. Insgesamt 28 Antigene lösten durchschnittlich mit mehr als 10% aller Plattenepithelkarzinomseren eine Immunreaktion aus. Von diesen 28 Antigenen reagierten 15 Antigene mit 10-20%, fünf Antigene mit 20-30% und ein Antigen mit mehr als 40% aller untersuchten Plattenepithelkarzinomseren. Bei letzterem handelte es sich um ein Antigen mit Sequenzhomologie zu BRAP, welches aber auch mit Antikörpern in 42,5% der Normalseren und 17,2% der Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen reagierte. Bei insgesamt 15 Antigenen wurde keine Antigen-Antikörperreaktion mit den Plattenepithelkarzinomseren festgestellt. Die restlichen 39 Antigene lösten Immunreaktionen mit weniger als 10% der Plattenepithelkarzinomseren aus. Bei der Gruppe der Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen reagierten 33 Antigene mit keinem der untersuchten Seren, 34 Antigene zeigten Reaktionen in 1-10%, elf Antigene in 10-20%, zwei Antigene reagierten in 20,7% und je ein Antigen mit 34,5% bzw. 48,3% der Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen. Das Antigen KIAA0555, das mit 34,5% der Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen reagierte, löste auch eine Immunreaktion mit 5,1% der Plattenepithelkarzinomseren und 10% der Normalseren aus. Bei dem Antigen EIF2AK4, das mit 48,3% der Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen reagierte, wurde ebenfalls eine Immunreaktion mit Antikörpern in 25,6% der Plattenepithelkarzinomseren und 27,5% der Normalseren detektiert. Bei den Normalseren zeigten 28 Antigene keine Immunreaktion, 26 Antigene wurden mit Antikörpern in 1-10% aller Normalseren detektiert, 15 Antigene zeigten Seroreaktivität bei 10-20% der Normalseren, jeweils fünf Antigene reagierten mit 20-30% bzw. 30-40% der Normalseren, zwei Antigene lösten mit 42,5% der Normalseren eine Immunreaktion aus. In 77,5% der Normalseren waren Antikörper gegen ein Antigen mit Sequenzhomologie zu U2AF1L1 enthalten. Gegen dieses Antigen enthielten aber nur 2,6% der Plattenepithelkarzinomseren und 3,4% der Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen Antikörper.

Im Folgenden werden die 14 Antigene näher betrachtet, die mit Antikörpern in mehr als 15% aller Plattenepithelkarzinomseren eine Immunreaktion auslösten. In Abbildung 14 ist die durchschnittliche Reaktivität in den unterschiedlichen Serumgruppen für elf dieser 14 Antigene gezeigt. Die Antigene mit Sequenzhomologie zu TACC2, C14ORF145 und

ARFGAP3 reagierten mit Antikörpern in Plattenepithelkarzinomseren und in Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen. Antigene mit Sequenzhomologie zu C14ORF11, DNAJA1, NIT2, MGEA5s und RBPSUH(1) reagierten mit Plattenepithelkarzinom- und Normalseren. Die Antigene mit Sequenzhomologie zu ROCK1, PRKCB1 und KIAA0376 zeigten nur in Plattenepithelkarzinomseren eine Immunreaktion. Somit tragen diese drei Antigene am besten zur Trennung der Plattenepithelkarzinomseren von den Kontrollseren bei. Die verbleibenden Antigene mit Homologie zu BRAP, EIF2AK4 und KIAA1217 (nicht in Abbildung 13 gezeigt) reagierten zwar mit mehr als 15% der Plattenepithelkarzinomseren, aber auch mit Normalseren und Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen und sind somit für die Trennung der Plattenepithelkarzinomseren von den Kontrollseren weniger von Bedeutung.

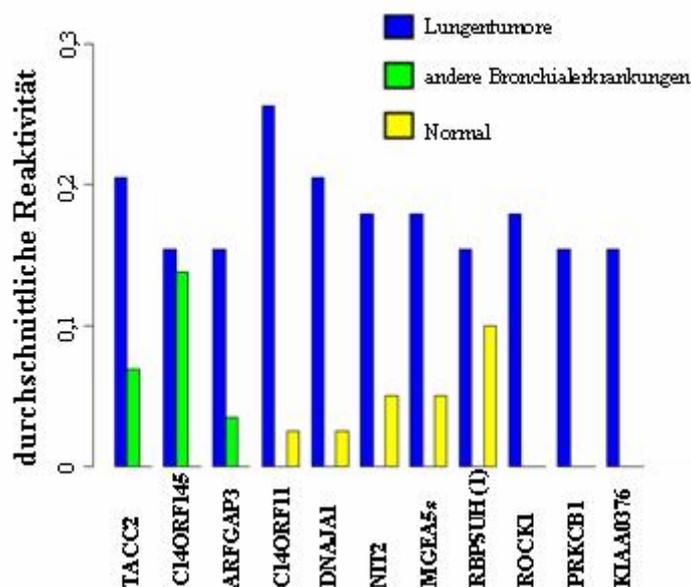


Abbildung 13: Durchschnittliche Reaktivität der cDNA-Klone mit den einzelnen Serumgruppen, gezeigt für elf ausgewählte Klone

Vergleich der durchschnittlichen Reaktivitäten der 82 Einzelantigene in den drei betrachteten Serumgruppen

Hierzu wurden die Ergebnisse der Berechnung der durchschnittlichen Reaktivität aller 82 Einzelantigene für jede Serumgruppe herangezogen und miteinander verglichen. Insgesamt 36 Antigene reagierten mit mehr als doppelt so hohen Frequenzen, also doppelt so häufig, mit Plattenepithelkarzinomseren als mit den Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen. Im Vergleich zu den Normalseren reagierten ebenfalls 36 Antigene

mehr als doppelt so häufig mit den Plattenepithelkarzinomseren. Es gab insgesamt einen Überlapp von 23 Antigenen, die beim Vergleich der Seroreaktivitätsfrequenzen der Plattenepithelkarzinomseren mit den Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen bzw. beim Vergleich der Seroreaktivitätsfrequenzen der Plattenepithelkarzinomseren mit den Normalseren doppelt so häufig mit den Plattenepithelkarzinomseren reagierten. Von diesen 23 Antigenen wurden 16 Antigene in den vorangegangenen SEREX-Untersuchungen mit den drei cDNA-Banken aus Plattenepithelkarzinomgewebe identifiziert (siehe fettgedruckte Antigene in Tabelle 5) und sieben Antigene stammen aus den vorangegangenen SEREX-Untersuchungen mit den cDNA-Banken aus Hirn-Gewebe.

Tabelle 5: Antigene mit mindestens doppelt so hoher Seroreaktivitätsfrequenz in Plattenepithelkarzinomseren im Vergleich zu Normalseren bzw. Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen (Antigene, die in den vorangegangenen SEREX-Untersuchungen mit den drei cDNA-Banken aus Plattenepithelkarzinomgewebe identifiziert wurden, sind fettgedruckt)

Antigene	Plattenepithelkarzinome %	Normale %	andere Bronchialerkrankungen %
C14Orf11	25,6	2,5	0
TACC2	20,5	0	6,9
ROCK1	17,9	0	0
DNAJA1	20,5	2,5	0
KIAA1217	20,5	2,5	6,9
PRKCB1	15,4	0	0
ARFGAP3	15,4	0	3,4
MRPS15	12,8	0	0
D21S2056E	12,8	0	3,4
EIF4G1	10,3	0	0
NOL8	10,3	0	3,4
LAMC1	10,3	0	3,4
COL1A1	10,3	0	3,4
LOC400986	7,7	0	3,4
TP53BP2	7,7	0	3,4
GCC2	12,8	5	0
NSEP1	2,6	0	0
KIAA0376	15,4	0	0
NIT2	17,9	5	0
MGEA5s	17,9	5	0
USP37	7,7	0	0
PAFAH1B1	7,7	0	0
SOX2	5,1	0	0

Im Anhang in Tabelle A2 sind neben detaillierten Informationen, wie Sequenzbereich des Inserts, Leserahmen, 5'untranslatierte Sequenzen, die durchschnittlichen Reaktivitäten aller Einzelantigene für jede Serumgruppe aufgelistet.

3.1.1.2 Klassifikation der verschiedenen Serumgruppen anhand der Seroreaktivitätsprofile

Zur Auswertung der Spotassays wurde das statistische Lernverfahren Naïve Bayes angewendet. Wie in Material und Methoden (siehe 2.1.1.9) beschrieben, wurde eine auf der „Mutual Information (MI)“ basierende „Feature Subset Selection (FSS)“ durchgeführt, um solche Klone zu eliminieren, die die Genauigkeit der Klassifikationsberechnungen negativ beeinflussen würden. Die MI ist ein Maß für die gegenseitige Abhängigkeit zweier Variablen X und Y. In unserem Fall kann die eine Variable den Status 'normal' ($X = 0$) oder 'krank' ($X = 1$), die zweite Variable den Status 's nicht detektiert' ($Y = 0$) oder 's detektiert' ($Y = 1$) annehmen. Je höher die MI eines Antigens für ein Klassifikationsszenario, desto besser eignet sich dieses Antigen für diese Klassifikation. Es wurden nur Klone mit der höchsten MI, d.h. Klone, die die beste Spezifität (Anteil der korrekt klassifizierten Gesunden, Richtignegativrate) und Sensitivität (Anteil der korrekt klassifizierten Kranken, Richtigpositivrate) ergaben, in die Berechnungen einbezogen. Mit einem Subset von 20 cDNA-Klonen konnten die Seren von Plattenepithelkarzinompatienten und Seren von gesunden Probanden mit einer Spezifität von 93,1%, einer Sensitivität von 92,9% und einer Genauigkeit von 93% (95% Konfidenzintervall (CI): 92,7%-93,3%) getrennt werden. Das bedeutet, 93,1% aller untersuchten Normalseren wurden auch richtigerweise als solche identifiziert. Außerdem wurden 92,9% aller Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom korrekt klassifiziert. Die Genauigkeit gibt den Anteil aller korrekt klassifizierten Seren an. Zusätzlich wurde der Wert für die „Area under the Receiver Operator Characteristics Curve (AUC)“ berechnet. Die „Receiver Operator Characteristics Curve (ROC)“ ist die graphische Darstellung des Zusammenhangs der Falschnegativrate (1-Spezifität) und der Richtigpositivrate (Sensitivität). Eine AUC von 1 repräsentiert einen perfekten Test, wogegen ein Test mit einer AUC von 0,5 keine Aussage hat. Im Fall der Klassifikation der Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom versus Normalseren betrug die AUC 0,978. Die Ergebnisse dieser Klassifikation sind in Abbildung 14 graphisch dargestellt. In Abbildung 12A ist auf der y-Achse der Logarithmus des Quotienten $Q(A) = \frac{P(L | A)}{P(N | A)}$ der bedingten Wahrscheinlichkeiten für die betrachteten Seren (x-Achse) aufgetragen. Die Variable $P(L | A)$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der es sich bei dem getesteten Serum um ein Plattenepithelkarzinomserum handelt und $P(N | A)$ die Wahrscheinlichkeit, mit der es sich bei dem getesteten Serum um ein Normalserum handelt. Ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein Normalserum handelt größer als die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein

Tumors serum handelt, ist der Quotient kleiner als 1, und damit ist der Logarithmus kleiner 0. Umgekehrt ist der Logarithmus größer 0, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein Tumors serum handelt, größer ist, als die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein Normalserum handelt (Quotient >1).

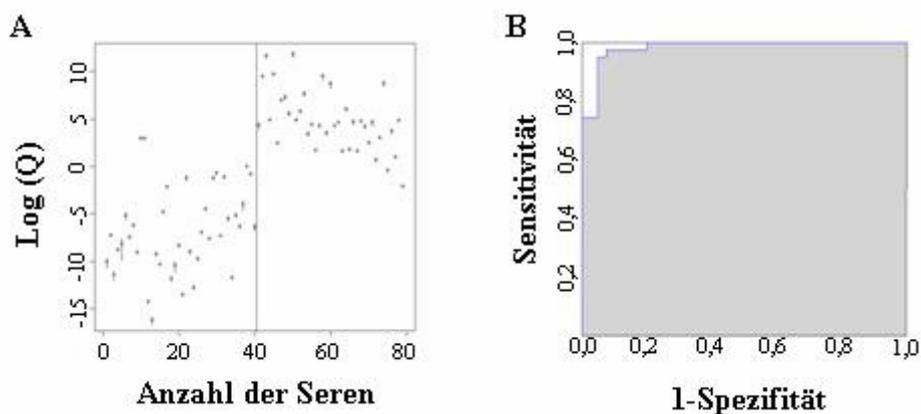


Abbildung 14: Klassifikation Plattenepithelkarzinomseren versus Normalseren

A: Jeder Kreis repräsentiert ein Serum, die vertikalen Linien geben die 95% CI von 100 Klassifikationswiederholungen an. Für jedes Serum wurde der Logarithmus des Quotienten Q der bedingten Wahrscheinlichkeiten berechnet. Die Normalseren (links) zeigen im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomseren (rechts) deutlich niedrigere Quotienten. Die kleinen Konfidenzintervalle bestätigen die Stabilität der Klassifikation..

B: ROC- Kurve der Vorhersageergebnisse aus Abbildung A. Die AUC beträgt hier 0,978.

Mit einem Subset von 69 Klonen wurde für die Trennung der Seren der Plattenepithelkarzinompatienten und der Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen eine Spezifität von 93,5%, eine Sensitivität von 75,2%, eine Genauigkeit von 83% (95% CI: 82,7%-83,3%) und eine AUC von 0,892 erreicht. Eine Trennung der Seren der Plattenepithelkarzinompatienten und Seren aller Kontrollen, also Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen und gesunde Probanden, wurde mit 62 Klonen erreicht. Hier betrug die Spezifität 93,9%, die Sensitivität 83,4%, die Genauigkeit 90,1% (95% CI: 89,8%-90,4%) und die AUC 0,945. Die Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Klassifikation Plattenepithelkarzinomseren versus alle Kontrollseren, also Normalseren und Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen.

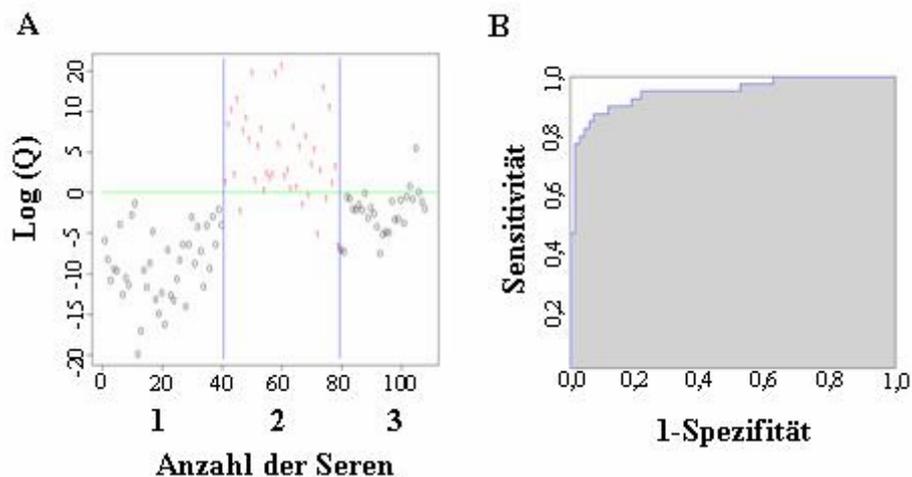


Abbildung 15: Klassifikation Plattenepithelkarzinomseren versus alle Kontrollseren

A: Jedes Plattenepithelkarzinomserum ist als 1 gekennzeichnet, jedes der Kontrollseren als 0. Für jedes Serum wurde der Logarithmus des Quotienten Q der bedingten Wahrscheinlichkeiten berechnet (Spalte 1 = Normalserum, Spalte 2 = Plattenepithelkarzinomserum, Spalte 3 = Serum andere Bronchialerkrankungen).

B: ROC- Kurve der Vorhersageergebnisse aus Abbildung A. Die AUC beträgt hier 0,945.

Da etwa zwei Drittel aller Lungentumore erst in späten Stadien (klinische Stadien II-IV) erkannt werden, könnte eine frühere Diagnose neue Möglichkeiten für wirksame Eingriffe eröffnen. Wichtigste Grundvoraussetzung hierfür ist, dass sich Seren von Patienten mit niedrig-gradigen Plattenepithelkarzinomen (klinisches Stadium I) von Normalseren trennen lassen. Diese Trennung konnte mit einer Spezifität von 99,2%, einer Sensitivität von 79,0%, einer Genauigkeit von 92,9% (CI: 92,6-93,2) und einer AUC von 0,998 erreicht werden. Hierfür wurde ein Subset von 80 Klonen benötigt. Die Ergebnisse aller Klassifikationsszenarien sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Table 6: Ergebnisse aller berechneten Klassifikationsszenarien
(in Klammern sind die 95% CI angegeben)

Klassifikation	Anzahl Antigene	Genauigkeit %	Spezifität %	Sensitivität %	AUC %
PEC-Seren vs. Normalseren	20	93,0 (92,7-93,3)	93,1 (92,7-93,5)	92,9 (92,5-93,3)	0,978 (0,977-0,978)
PEC-Seren vs. Bronchialerkrankungen-Seren	69	83,0 (82,7-83,3)	93,5 (92,9-94)	75,2 (74,8-75,5)	0,892 (0,890-0,894)
PEC-Seren vs. alle Kontrollseren	62	90,1 (89,8-90,4)	93,9 (93,6-94,2)	83,4 (82,9-83,9)	0,945 (0,944-0,946)
niedrig-gradige PEC-Seren vs. Normalseren	80	92,9 (92,6-93,2)	99,2 (99,0-99,4)	79,0 (78,2-79,8)	0,998 (0,998-0,998)

Wie bereits in Material und Methoden (siehe 2.1.1.9) erläutert, sind verschiedene Antigene für verschiedene Klassifikationsszenarien aufgrund ihrer unterschiedlichen MI-Werte unterschiedlich gut geeignet. Dies wird auch an den unterschiedlich großen Antigensets deutlich, die für die verschiedenen Klassifikationen benötigt werden. Im Anhang in Tabelle A2 sind die MI-Werte für alle untersuchten Antigene und verschiedene Klassifikationen aufgelistet.

3.1.2 Immunoscreening von „high-density“ Proteinmacroarrays

Mit den serologischen Spotassays konnte schon bewiesen werden, dass es möglich ist, anhand eines Seroreaktivitätsprofils Plattenepithelkarzinompatienten von Gesunden und Patienten mit anderen nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen mit hoher Genauigkeit zu unterscheiden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung des Reaktivitätsprofils der Seren von Patienten mit niedrig-gradigen Plattenepithelkarzinomen von dem Profil der Seren gesunder Probanden mit hoher Genauigkeit möglich ist. Die Spotassay-Methode birgt aber einige Nachteile. Zum einen erfolgte die Auswertung visuell, woraus nur eine binäre Ja-/Nein-Antwort resultiert. Desweiteren ist die Anfertigung der Spotassays sehr aufwendig und erlaubt daher nur die Untersuchung einer begrenzten Anzahl von Antigenen und Seren. Um aber das bestmögliche Set Tumor-spezifischer Autoantigene identifizieren zu können, ist es unerlässlich, ein größtmögliches Repertoire an potentiellen Autoantigenen auf ihre Reaktivität zu testen. Um die Menge an potentiellen Tumor-assoziierten Antigenen zu erhöhen, wurde deshalb zusätzlich zu den serologischen Spotassays ein Screening von „high-density“

Proteinmacroarrays durchgeführt. Die „high-density“ Proteinmacroarrays erlauben, im Gegensatz zu den serologischen Spotassays, ein Hochdurchsatz-Screening eines großen Antigen-Repertoires mit einer großen Anzahl an Seren. In einem ersten sogenannten Primärscreening wurden Macroarrays mit 38016 unterschiedlichen Klonen aus der fötalen Hirn-cDNA-Bibliothek hex1 [112] mit 38 Serumpools von insgesamt 190 Patienten mit verschiedenen Tumor- und Nicht-Tumorerkrankungen und von gesunden Probanden hybridisiert (siehe 2.1.2.1). Hierbei wurden insgesamt 1827 verschiedene Antigene identifiziert. Mit diesen Antigenen, in Duplikaten gespottet, wurden die sogenannten „customized“ Proteinmacroarrays erstellt, mit denen das Sekundärscreening durchgeführt wurde. Bei der hex1-Bank handelt es sich, wie bei den SEREX-Banken, ebenfalls um eine cDNA-Bibliothek. Von den 1827 auf den „customized“ Arrays enthaltenen Klonen ist daher, wie bei cDNA-Bibliotheken zu erwarten, nur ein geringer Anteil der DNA-Inserts (28%, 509 Klone) im korrekten Leserahmen, also „in frame“ einkloniert, die verbleibenden 72% (1318 Klone) sind dagegen „out of frame“ einkloniert und stellen somit Mimotope dar (siehe auch 3.1). Das Screening ist in der Durchführung ähnlich aufgebaut wie die Durchführung der serologischen Spotassays. Die Detektion der immunogenen Antigene erfolgte hier aber mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper, der gegen die schwere und leichte Kette der humanen Immunglobuline G, A und M gerichtet ist. Die Fluoreszenzsignale wurden durch Einscannen der Membranen auf einem Flächenscanner sichtbar gemacht. Wie bereits erwähnt, lieferte die visuelle Auswertung der Spotassays nur binäre Informationen in Form einer Ja-/Nein-Antwort. Das für die Auswertung der Proteinmacroarrays in Kooperation mit dem Zentrum für Bioinformatik entwickelte Bildauswertesystem hat den Vorteil, dass jedem Proteinspot nach der Hybridisierung mit einem Serum ein Signalintensitätswert zugeordnet werden kann. Für alle der in Duplikaten gespotteten Antigene wurden damit die Intensitätswerte bestimmt und die Mittelwerte der Duplikate berechnet. Die gemittelten Intensitätswerte wurden normalisiert und statistisch ausgewertet.

Mit Hilfe der Proteinmacroarray-Untersuchungen sollte herausgefunden werden, ob sich die Seroreaktivitätsprofile der verschiedenen Lungentumorarten von denen der häufig auftretenden Bronchialerkrankungen COPD, Emphysem und Pneumonie bzw. von denen gesunder Probanden unterscheiden. Außerdem wurde untersucht, ob es Unterschiede im Seroreaktivitätsprofil je nach Tumor-Differenzierungsgrad gibt und ob sich die Profile von NSCLC und SCLC unterscheiden. Insgesamt wurden 29 Seren von Patienten mit NSCLC (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, großzelligem Lungenkarzinom), 18 Seren von

Patienten mit SCLC, 23 Seren von Patienten mit anderen nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen (COPD bzw. Emphysem und Pneumonie) und 60 Seren gesunder Probanden untersucht. Alle untersuchten Seren, sowie die dazugehörigen Patientendaten, sind in Tabelle 7 aufgeführt. Klone, die auf mindestens 10 der hybridisierten Membranen nicht auswertbar waren, wurden nicht weiter berücksichtigt. Daraus ergibt sich, dass 406 Antigene aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. Von den verbleibenden 1421 Klonen waren 391 Klone „in frame“ und 1030 Klone „out of frame“.

Tabelle 7: Mittels Proteinmacroarray untersuchte Seren mit dazugehörigen Patientendaten
(die Anzahl ist immer in Absolutzahlen und in % (in Klammern) angegeben)

	NSCLC	SCLC	nicht-tumoröse Bronchialerkrankungen	Normal
Anzahl (%)	29 (22,3)	18 (13,8)	23 (17,7)	60 (46,2)
Adenokarzinom (%)	11 (37,9)			
großzelliges Karzinom (%)	9 (31,0)			
Plattenepithelkarzinom (%)	9 (31,0)			
Durchschnittsalter	64	60,44	60,3	38,7
Männer (%)	16 (55,2)	9 (50)	9 (39,1)	41 (68,3)
Frauen (%)	13 (44,8)	9 (50)	14 (60,9)	19 (31,7)
klinische Stadien (%)				
I	21 (72,4)	1 (5,6)		
II	2 (6,9)	0 (0)		
III	5 (17,2)	13 (72,2)		
IV	0 (0)	2 (11,1)		
unbekannt	1 (3,4)	2 (11,1)		

3.1.2.1 Klassifikation der verschiedenen Serumgruppen anhand der Seroreaktivitätsprofile

Es wurden verschiedene Klassifikationen durchgeführt. Dazu wurde die sogenannte resampling-Methode verwendet, die als Kreuzvalidierung bekannt ist. Die verwendete 10-fach Kreuzvalidierung teilt den Datensatz in 90% Trainings- und 10% Testdaten auf, wobei jedes Sample genau einmal in einem Testdatensatz gewesen sein muss. Um die statistische Schwankung bei verschiedenen Aufteilungen zu berücksichtigen, wurden für jede der Klassifikationen insgesamt 100 Kreuzvalidierungsläufe berechnet. Zu jedem Kreuzvalidierungslauf wurde die Sensitivität, die Spezifität und die Genauigkeit ermittelt und daraus das arithmetische Mittel (Mean Value) bestimmt (siehe 2.1.2.2). Die Klassifikation

Lungentumorseren versus Normalseren ergab eine Sensitivität von 99,91%, eine Spezifität von 96,50% und eine Genauigkeit von 98%. Die Standardabweichung der Genauigkeit war hier mit 0,66% sehr gering, was für eine große Stabilität der Klassifikationsergebnisse spricht. Um Fehler in der Klassifikation auszuschließen wurde, wie auch für alle anderen Klassifikationsszenarien, eine weitere Kontrolle der Daten durchgeführt (Kontrollpermutation). Hierzu wurden alle 47 untersuchten Lungentumorseren und 60 untersuchten Normalseren zufällig auf zwei Gruppen derselben Größe wie die Ausgangsgruppen aufgeteilt. Es wurden also zwei Gruppen bestehend aus 47 und 60 Seren durch zufällige Aufteilung aller hier untersuchten Lungentumor- und Normalseren gebildet. Insgesamt wurden 100 Permutationen dieser Art durchgeführt und für jede Permutation die Genauigkeit berechnet. Die Genauigkeit betrug hier im Mittel 51,24%, was man bei Permutationstests dieser Art statistisch erwarten würde.

Neben der oben erwähnten Klassifikation wurden noch folgende weitere Klassifikationen durchgeführt: Lungentumoren klinisches Stadium I versus Normal, Lungentumoren klinisches Stadium II, III, IV versus Normal, Lungentumoren klinisches Stadium I versus Lungentumoren klinisches Stadium II, III, IV, NSCLC versus SCLC, NSCLC versus Normal, SCLC versus Normal, Lungentumoren versus alle nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen, Lungentumoren versus COPD, alle nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen versus Normal und COPD versus Normal.

Wie bereits erwähnt werden bei mehr als zwei Drittel der Patienten Lungentumoren erst spät erkannt, d.h. der Tumor befindet sich zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen klinischen Stadium. Eine frühere Diagnose könnte Möglichkeiten für wirksame Eingriffe eröffnen. Vor diesem Hintergrund wurde die Klassifikation der Lungentumoren im klinischen Stadium I A und I B versus Normal durchgeführt. Hier wurden eine Sensitivität von 80,41%, eine Spezifität von 98,18% und eine Genauigkeit von 93,41% erreicht. Tumoren im klinischen Stadium I konnten allerdings nicht von Tumoren im klinischen Stadium II, III und IV getrennt werden. Wohingegen die Trennung Lungentumor Stadium II, III, IV versus Normal wiederum gute Ergebnisse lieferte. Eine Trennung der NSCLC von den SCLC könnte von Vorteil sein, da sich die Therapien dieser beiden Gruppen grundlegend unterscheiden. Die Klassifikation mit den 28 getesteten Seren der Patienten mit NSCLC und den 18 Seren von Patienten mit SCLC erreichte eine Genauigkeit von 67,00% bei einer Sensitivität von 72,93% und einer Spezifität von 57,45%. Dagegen konnten Seren von Patienten mit NSCLC von Normalseren mit einer Sensitivität von 90,83%, einer Spezifität von 97,63% und einer Genauigkeit von 95,42% getrennt werden. Die Trennung der

Seren von Patienten mit SCLC von Normalseren gelang mit einer Sensitivität von 88,00%, einer Spezifität von 99,93% und einer Genauigkeit von 97,18%. Da viele Lungentumorpatienten auch an weiteren Komorbiditäten, insbesondere anderen Bronchialerkrankungen wie COPD, Emphysem und Pneumonie leiden, ist es wichtig zu überprüfen, ob diese zusätzlichen Erkrankungen das Seroreaktivitätsprofil der Tumorpatienten beeinflussen. Hierzu wurden insgesamt 23 Seren von Patienten mit den häufigsten nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen (COPD, Emphysem, Pneumonie) untersucht und folgende Klassifikationsszenarien mit den verschiedenen untersuchten Serumgruppen berechnet: Lungentumor versus alle nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen, Lungentumore versus COPD/Emphysem, alle nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen versus Normal und COPD/Emphysem versus Normal. Bei der Trennung Lungentumorseren versus Seren aller Patienten mit nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen wurde eine Genauigkeit von 72,01% bei einer Sensitivität von 87,57% und einer relativ niedrigen Spezifität von 40,22% erreicht. Die Klassifikation Lungentumorseren versus Seren von Patienten mit COPD/Emphysem erreichte eine Sensitivität von 92,08%, eine Spezifität von 34,35% und eine Genauigkeit von 76,75%. Dieses Ergebnis zeigt, dass zwar nur 7,92% der Lungentumorseren nicht richtig klassifiziert wurden, aber 65,65% der COPD-Patienten fälschlicherweise als Tumorpatienten eingestuft wurden. Der Vergleich der Seren von Patienten mit COPD/Emphysem und den Normalseren zeigte dagegen ein sehr gutes Ergebnis. Hier wurden eine Sensitivität von 89,59%, eine Spezifität von 99,88% und eine Genauigkeit von 97,60% erreicht. Auch der Vergleich Lungentumorseren versus alle Kontrollseren (Seren von Patienten mit nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen und Normalseren) zeigte relativ gute Ergebnisse. Hier wurden eine Sensitivität von 75,45%, eine Spezifität 84,08% von und eine Genauigkeit von 80,96% erzielt. Alle Klassifikationsresultate sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

*Table 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Klassifikationen
(in Klammern sind die 95% CI angegeben)*

Klassifikation	Genauigkeit %	Sensitivität %	Spezifität %
Lungentumoren vs. Normal	98,00 (97,87-98,13)	99,91 (99,83-100)	96,50 (96,28-96,72)
Kontrollpermutation	51,24 (50,13-52,36)	43,17 (41,67-44,67)	57,57 (56,43-58,71)
Lungentumoren Stadium I vs. Normal	93,41 (93,12-93,71)	80,41 (79,70-81,11)	98,18 (97,91-98,46)
Kontrollpermutation	49,48 (47,74-51,21)	49,82 (47,65-51,99)	49,14 (47,17-51,10)
Lungentumoren Stadium I vs. Lungentumoren Stadium II,III,IV	43,68 (42,70-44,66)	43,45 (42,38-44,52)	43,91 (42,70-45,55)
Kontrollpermutation	49,48 (47,74-51,21)	49,82 (47,65-51,9)	49,14 (47,17-51,11)
Lungentumoren Stadium II,III,IV vs. Normal	96,89 (96,74-97,03)	90,46 (90,16-90,75)	99,25 (99,08-99,42)
Kontrollpermutation	62,38 (61,28-63,48)	19,00 (17,10-20,90)	78,28 (77,25-79,31)
NSCLC vs. SCLC	67,00 (66,03-67,97)	72,93 (71,76-74,10)	57,45 (56,22-58,67)
Kontrollpermutation	52,04 (50,49-53,59)	64,79 (63,33-66,60)	31,22 (28,98-33,47)
NSCLC vs. Normal	95,42 (95,13-95,71)	90,83 (90,24-91,42)	97,63 (97,32-97,95)
Kontrollpermutation	56,83 (55,77-57,90)	26,07 (24,52-27,62)	71,70 (70,55-72,85)
SCLC vs. Normal	97,18 (97,03-97,33)	88,00 (87,43-88,57)	99,93 (99,87-100)
Kontrollpermutation	68,96 (68,10-9,82)	16,89 (15,22-18,56)	84,58 (83,76-85,41)
Lungentumoren vs. alle Bronchialerkrankungen	72,01 (71,48-72,55)	87,57 (87,01-88,14)	40,22 (39,09-41,35)
Kontrollpermutationen	56,14 (54,85-57,43)	70,77 (69,49-72,04)	26,26 (24,33-28,19)
Lungentumoren vs. COPD/Emphysem	76,75 (76,15-77,34)	92,08 (91,53-92,64)	34,35 (32,77-35,94)
Kontrollpermutationen	64,38 (63,26-65,50)	80,32 (79,20-81,44)	20,29 (18,29-22,30)
Lungentumoren vs. alle Kontrollen (Normal und Bronchialerkrankungen)	80,96 (80,59-81,34)	75,45 (74,68-76,21)	84,08 (83,74-84,43)
Kontrollpermutation	53,90 (53,00-54,80)	32,47 (31,14-33,79)	66,04 (65,04-67,03)
COPD/Emphysem vs. Normal	97,60 (97,34-97,87)	89,59 (88,41-90,77)	99,88 (99,79-99,98)
Kontrollpermutation	69,21 (68,28-70,14)	11,88 (10,19-13,57)	85,45 (84,49-86,41)

3.1.2.2 AUC-Auswertung informativer Antigene

Einzelne Antigene tragen unterschiedlich stark zu bestimmten Klassifikationsaufgaben bei. Um den Wert jedes einzelnen Antigens an einer bestimmten Klassifikationsaufgabe ermitteln zu können wurde aus den Spot-Intensitäten für jedes Antigen und jede Serumgruppe die „Area under the Receiver Operator Characteristics curve (AUC)“ berechnet, die Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Da Antigene mit einer AUC von 0,5 für eine betrachtete Klassifikation keine Aussagekraft besitzen, wurden im Folgenden nur Antigene als „informativ“ erachtet, die eine AUC über 0,7 bzw. unter 0,3 haben. Für ein fiktives Klassifikationsszenario Gruppe X versus Gruppe Y bedeutet dies, dass Antigene mit einer AUC kleiner 0,3 in Gruppe X stärker immunogen waren als in Gruppe Y. Für Antigene mit AUC-Werten größer 0,7 gilt umgekehrt, dass diese stärker immunogen in Gruppe Y waren als in Gruppe X. Bei der Klassifikation Lungentumor versus Normal hatten insgesamt 17 Antigene eine AUC über 0,7, davon waren 4 Antigene „in frame“. Insgesamt 18 Antigene

hatten AUC-Werte unter 0,3, darunter acht „in frame“ Antigene. Das Antigen mit der besten AUC (0,78) war „out of frame“ (MPMGp800G17600). Die Lungentumoren werden nach ihrem TNM-Status in verschiedene klinische Stadien eingeteilt (siehe Einleitung). Um zu sehen, ob es Unterschiede im Seroreaktivitätsprofil in Abhängigkeit vom Tumorstadium gibt, wurde die Klassifikation Lungentumor Stadium I versus Lungentumor Stadium II, III, IV durchgeführt. Bei diesem Klassifikationsszenario wurden insgesamt 39 (23 Antigene mit AUC kleiner 0,3 und 16 Antigene mit AUC größer 0,7) „informative“ Antigene gefunden. Davon waren insgesamt 14 Antigene „in frame“ und 25 Antigene „out of frame“. Desweiteren wurden die Lungentumoren im Stadium I getrennt betrachtet und die Klassifikation Lungentumoren Stadium I versus Normal berechnet. Hierbei waren 86 Antigene „informativ“, davon 40 Antigene mit einer AUC unter 0,3 (17 „in frame“) und 46 Antigene mit einer AUC über 0,7 (13 „in frame“). Das Antigen MPMGp800H20594 hatte die beste AUC (0,84).

Die Lungentumoren werden aufgrund ihrer histologischen Eigenschaften in NSCLC und SCLC eingeteilt. Entsprechend wurde hierzu die Klassifikation Seren von Patienten mit NSCLC versus Seren von Patienten mit SCLC durchgeführt. Das beste Antigen war hier CFL1 („in frame“) mit einer AUC von 0,84. Insgesamt hatten 45 Antigene eine AUC größer 0,7 und 34 Antigene eine AUC unter 0,3, mit acht bzw. 13 Antigenen „in frame“. Die Klassifikation Lungentumor versus COPD ergab 26 Antigene mit AUC-Werten über 0,7 und 17 Antigene mit AUC-Werten unter 0,3. Hier waren fünf bzw. drei Antigene „in frame“. Das Antigen MPMGp800B13601 mit der besten AUC (0,22) war allerdings „out of frame“. Für die Klassifikation COPD versus Normal wurden 157 „informative“ Antigene gefunden. Hier hatten 56 Antigene AUC-Werte über 0,7 (14 Klone „in frame“) und 101 Antigene eine AUC unter 0,3 (35 Antigene „in frame“). Das „in frame“- Antigen MCM3 war hier mit einer AUC von 0,13 das beste Antigen. Insgesamt war bei allen betrachteten Klassifikationsszenarien deutlich zu sehen, dass die Anzahl der „informativen“ Antigene nur einen geringen Bruchteil der Gesamtanzahl der untersuchten Antigene ausmachen. In Tabelle 9 sind die AUC-Werte für alle 1421 auswertbaren Antigene und die oben genannten Klassifikationsszenarien zusammengefasst. In Abbildung 16 sind, jeweils für das Antigen mit der besten AUC verschiedener Klassifikationen, die Intensitätswerte aller untersuchten Seren dargestellt.

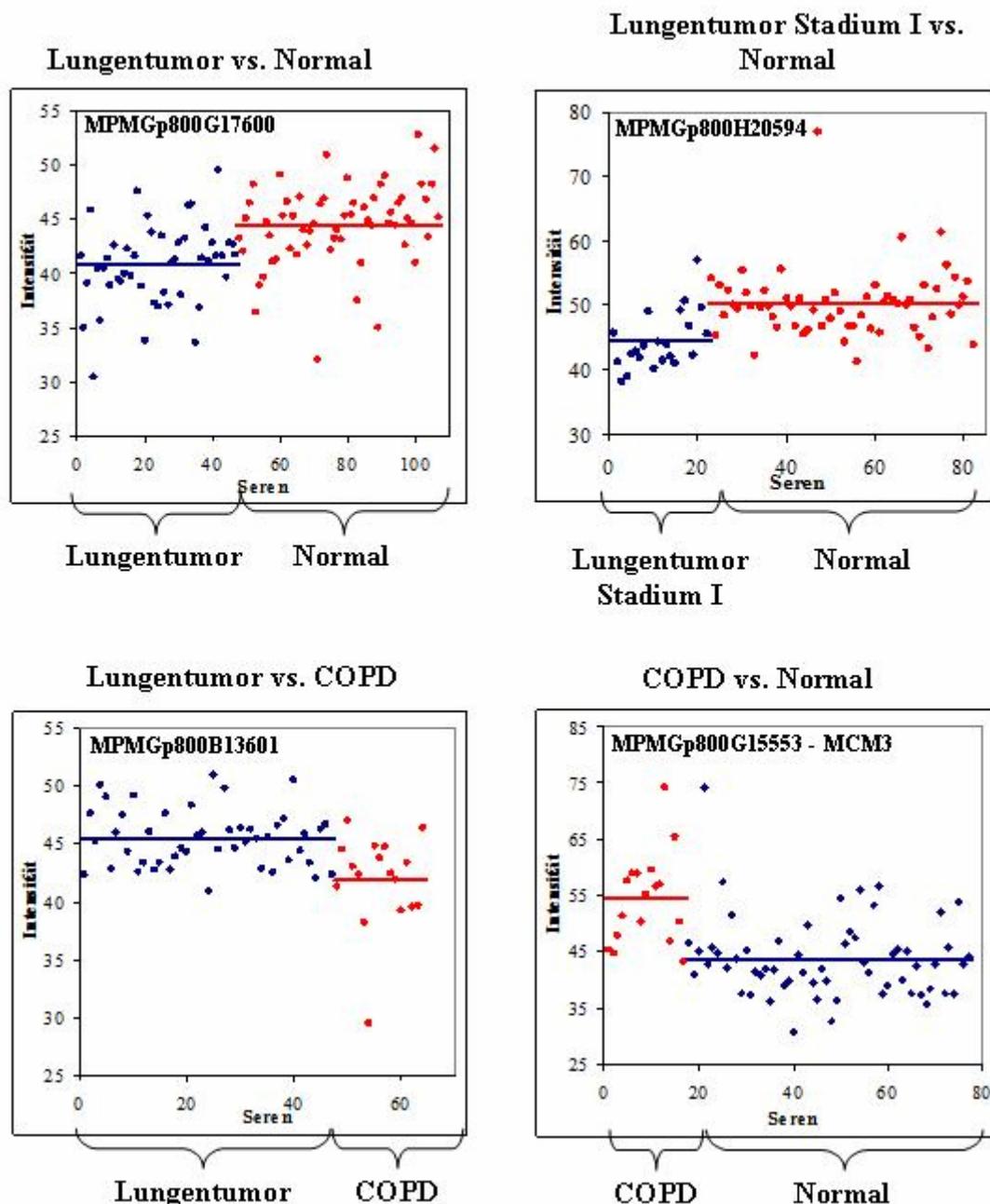


Abbildung 16: Antigene mit der besten AUC für vier verschiedene Klassifikationsszenarien.

3.1.2.3 Frequenz der Autoantikörperantwort in den untersuchten Seren

Für jedes der 1421 auswertbaren Antigene wurde ermittelt, mit welcher Frequenz, also mit welcher Häufigkeit, es mit Antikörpern in den Seren der einzelnen Serumgruppen (Lungentumore, andere Bronchialerkrankungen und Normale) reagierte. Die Proteinmacroarrays wurden mit einem automatischen Bildauswertesystem ausgewertet, wobei jedem Antigen ein Intensitätswert zugeteilt wurde. Um eine Ja-/Nein-Antwort, also positive Antigenreaktion oder negative Antigenreaktion, definieren zu können, muss ein

Intensitätsschwellenwert bestimmt werden, ab dem die Reaktion als positiv gewertet wird. Insgesamt kann die Intensität Werte zwischen 0 und 255 annehmen, was den möglichen Standard-Grauwerten in einer Schwarz-Weiß-Abbildung entspricht. Als Schwellenwert wurde eine Intensität von 50 gewählt, da hier auch visuell eine Antigen-Antikörper-Reaktion feststellbar war. Insgesamt wurden bei 160 Antigenen in allen untersuchten Seren der Lungentumorpatienten Intensitätswerte unter 50 gemessen, d.h. diese Antigene wurden als seronegativ eingestuft. Bei den Seren der Patienten mit COPD hatten 414 Antigene eine Intensität unter 50. Bei den Gesunden waren 180 Antigene aufgrund ihrer niedrigen Intensitätswerte seronegativ. In allen drei Gruppen zeigte sich, dass die Anzahl der immunogenen Antigene mit steigender Frequenz abnimmt. Wurden beispielsweise von 0-10% der Lungentumorseren 562 Antigene detektiert, reagierten nur 25 Antigene mit mehr als 60% der Lungentumorseren und nur sieben Antigene mit über 80% der Lungentumorseren. Mit mehr als 60% der Normalseren reagierten 43 Antigene. Fünf dieser Antigene zeigten Seroreaktivität bei mehr als 80% der Normalseren. Bei den COPD-Seren wurden 41 Antigene gefunden, die mit mehr als 60% der Seren reagierten und davon 12 Antigene, die in über 80% der COPD-Seren positiv waren. Betrachtet man nur die „in frame“-Antigene, so reagierten bei den Lungentumorseren zwei Antigene und bei den COPD-Seren vier Antigene mit mehr als 80%. Insgesamt 70-80% der Normalseren detektierten vier „in frame“- Antigene, jedoch wurde kein „in frame“- Antigen mit mehr als 80% der Normalseren detektiert. Die hier dargestellten Ergebnisse der Frequenzberechnung sind in Tabelle 10 noch einmal zusammengefasst. In Tabelle 11 sind alle Antigene aufgelistet, die mit mehr als 60% der Seren von Patienten mit Lungentumor, COPD oder Normalseren reagierten.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Frequenzberechnung der verschiedenen Serumgruppen

Frequenz %	Lungentumor				Normal			COPD				
	alle Antigene		nur „in frame“ Antigene		alle Antigene		nur „in frame“ Antigene	alle Antigene		nur „in frame“ Antigene		
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	
0	160	11,26	53	13,55	180	0,13	64	16,37	414	29,13	134	34,27
0-10	562	39,55	174	44,5	565	0,4	168	42,97	265	18,65	88	22,51
10-20	369	25,97	91	23,27	306	0,22	80	20,46	335	23,57	80	20,46
20-30	160	11,26	43	11	157	0,11	35	8,95	194	13,65	41	10,49
30-40	71	5	16	4,09	91	0,06	21	5,37	66	4,64	13	3,32
40-50	53	3,73	9	2,3	51	0,04	8	2,05	68	4,79	19	4,86
50-60	21	1,48	0	0	28	0,02	8	2,05	38	2,67	7	1,79
60-70	9	0,63	1	0,26	27	0,02	5	1,28	14	0,99	1	0,26
70-80	9	0,63	2	0,51	11	0,01	2	0,51	15	1,06	5	1,28
80-90	5	0,35	2	0,51	4	0	0	0	8	0,56	3	0,77
90-100	2	0,14	0	0	1	0	0	0	4	0,28	0	0

Table 11: Zusammenfassung der Antigene, die mit mehr als 60% der Seren von Patienten mit Lungentumor, COPD oder mit Normalseren reagierten (Frequenzen über 60% sind fettgedruckt, Antigene mit weiteren Annotationen sind „in frame“, Antigene ohne Annotation sind „out of frame“)

Antigen-ID (MPMGp800#)	Ensembl ID	NM_Nummer	Gene	Frequenz Lungentumor	Frequenz Normal	Frequenz COPD
H06528				0,94	0,92	0,94
H11583				0,91	0,86	0,94
J10529				0,89	0,85	1
A02550	ENSG00000143222	NM_016406.2	UFC1	0,89	0,77	0,88
N13574				0,89	0,78	0,82
N07513				0,81	0,82	0,88
G07549	ENSG00000186185	NM_001080443.1	KIF18B	0,81	0,77	0,88
C18590	ENSG00000143222	NM_016406.2	UFC1	0,79	0,63	0,88
I01538	ENSG00000141441	NM_022751.1	FAM59A	0,77	0,4	0,76
M15507				0,77	0,65	0,71
N04593				0,74	0,53	0,88
L04581				0,74	0,67	0,76
J08578				0,74	0,52	0,65
C20556				0,72	0,83	0,94
K10577				0,72	0,73	0,88
I09570				0,7	0,75	0,76
I22516				0,68	0,65	0,65
P03507				0,68	0,47	0,35
K01530				0,66	0,43	0,65
P20554				0,64	0,7	0,76
E12566				0,64	0,62	0,65
N12603				0,62	0,65	0,71
H13598				0,62	0,6	0,53
O02517	ENSG00000205581	NM_004965	HMG14	0,62	0,55	0,53
N17532				0,62	0,47	0,35
K09566				0,6	0,67	0,59
L23526				0,57	0,72	0,71
M08551				0,57	0,63	0,65
B18601				0,57	0,62	0,53
N01518				0,55	0,68	0,71
L04549				0,55	0,62	0,53
H07541				0,55	0,72	0,47
B16536				0,53	0,68	0,65
A05530				0,53	0,67	0,65
C22515				0,53	0,68	0,59
L09518				0,52	0,47	0,65
I14602				0,51	0,63	0,82
M22529				0,51	0,72	0,65
N06528				0,49	0,62	0,71
L15532				0,49	0,72	0,65
D24528				0,47	0,65	0,35
M08549				0,45	0,63	0,71
P11540				0,45	0,6	0,59
C12577	ENSG00000076604	NM_004295.3	TRAF4	0,43	0,32	0,71
H12565				0,43	0,75	0,65
N11541				0,43	0,3	0,65
J10578	ENSG00000141441	NM_022751.1	FAM59A	0,43	0,17	0,65

Fortsetzung Tabelle 11: Zusammenfassung der Antigene, die mit mehr als 60% der Seren von Patienten mit Lungentumor, COPD oder mit Normalseren reagierten (Frequenzen über 60% sind fettgedruckt, Antigene mit weiteren Annotationen sind „in frame“, Antigene ohne Annotation sind „out of frame“)

ID (MPMGp800#)	Ensembl ID	NM_Nummer	Gene	Frequenz Lungentumor	Frequenz Normal	Frequenz COPD
L07541				0,43	0,63	0,47
K01579				0,4	0,37	0,71
J02545	ENSG00000119866	NM_138559.1	BCL11A	0,38	0,6	0,71
M18568	ENSG00000103495	NM_001042539.1	MAZ	0,38	0,68	0,41
L19532				0,38	0,65	0,35
N22556				0,36	0,6	0,53
M18529	ENSG00000015592	NM_030795.2	STMN4	0,34	0,6	0,47
E19526	ENSG00000175224	NM_014741.2	KIAA0652	0,32	0,3	0,71
G15553	ENSG00000112118	NM_002388.3	MCM3	0,23	0,15	0,71
C11538	ENSG00000173812	NM_005801.3	EIF1	0,23	0,63	0,35
G15586				0,15	0,13	0,65

Wie bei den serologischen Spotassays (siehe 3.1.1.2), wurden die Seroreaktivitätsfrequenzen der einzelnen Antigene mit den unterschiedlichen Serumgruppen verglichen. Insgesamt reagierten 313 Antigene mit Seren der Lungentumorpatienten in einer mindestens doppelt so hohen Frequenz, also doppelt so häufig, wie mit den Normalseren. Von den 313 Antigenen reagierten mit Lungentumorseren vier Antigene mit einer Frequenz über 40%, acht Antigene mit einer Frequenz zwischen 30% und 40% und 29 Antigene mit Frequenzen von 20%-30%. Insgesamt 272 Antigene reagierten nur mit Frequenzen unter 20%. Von den 313 Antigenen waren die Sequenz-Inserts bei 206 Antigenen „out of frame“ und bei 107 Antigenen „in frame“ kloniert.

Bei der Frequenzberechnung wurde, wie bereits erwähnt, jedem Antigen mit einem Intensitätswert über 50 der Status „positiv“ und jedem Antigen mit einem Intensitätswert unter 50 der Status „negativ“ zugeordnet. Mathematisch betrachtet geht dadurch sehr viel Information verloren. Die AUC-Berechnung (siehe 3.1.2.2) erfolgt ohne Berücksichtigung eines Schwellenwertes und daher nicht binär. Hierbei werden die Unterschiede in den Spot-Intensitäten jedes Antigens für verschiedene Serumgruppen verglichen und dadurch der Beitrag des betrachteten Antigens zur Klassifikation dieser Gruppen in Form der AUC berechnet. Verbindet man nun diese AUC-Ergebnisse mit den Frequenzergebnissen, ist zu erkennen, dass beispielsweise Antigene mit mindestens doppelt so hoher Frequenz in den Lungentumorseren im Vergleich zu den Normalseren nicht zwangsläufig eine gute AUC haben müssen. Tatsächlich hatten nur elf Antigene mit doppelter Frequenz in Lungentumorseren versus Normalseren AUC-Werte unter 0,3. Darunter befanden sich die

fünf „in frame“- Antigene SORBS2, MBTPS1, RPS27A, RPL35 und LOC388720 similar to ubiquitin. Die elf o.g. Antigene sind in Tabelle 12 mit den entsprechenden Frequenzen und AUC-Werten aufgelistet.

Tabelle 12: Ergebnisse der AUC- und Frequenzberechnung für elf ausgewählte Antigene der Klassifikation Lungentumoreren versus Normalseren

ID (MPMGp800#)	Ensembl ID	NM_Nummer	Gen	Frequenz Lungentumor	Frequenz Normal	AUC Lungentumor vs Normal
I10538				27,66	6,67	0.2528
K07577				27,66	10,00	0.2986
I06520	ENSG00000154556	NM_021069.3	SORBS2	23,40	6,67	0.2613
K02553				19,15	3,33	0.2943
J05581				17,02	3,33	0.2816
H03558				14,89	3,33	0.2277
F05589				10,64	1,67	0.2656
P10554	ENSG00000140943	NM_003791	MBTPS1	10,64	1,67	0.2883
D14506	ENSG00000198708	NM_002954.3	RPS27A	8,51	1,67	0.2482
G05591	ENSG00000136942	NM_007209	RPL35	8,51	0	0.2585
E19574	ENSG00000198708	XM_371330.6	LOC388720 similar to ubiquitin	6,38	0	0.2479

Beim Vergleich der Frequenzen der Antigene nach Hybridisierung mit Lungentumoreren und COPD-Seren reagierten insgesamt 380 Antigene mit den Lungentumoreren mit einer mindestens doppelt so hohen Frequenz. Hiervon waren 116 Antigene „in frame“ und 264 Antigene „out of frame“. Von den 380 Antigenen reagierte mit den Lungentumoreren ein Antigen mit einer Frequenz von 50%, zwei Antigene reagierten mit einer Frequenz über 40%, acht Antigene mit einer Frequenz zwischen 30% und 40% und 31 Antigene mit Frequenzen von 20% bis 30%. Insgesamt 338 Antigene reagierten nur mit Frequenzen unter 20%.

Die Analyse der AUC-Werte der Klassifikation Lungentumoreren versus COPD-Seren ergab, dass nur zehn der 380 Antigene eine AUC unter 0,3 aufwiesen, d.h. stärker mit Lungentumoreren reagierten als mit COPD-Seren. Unter diesen zehn Antigenen befand sich nur ein Antigen, das „in frame“ kloniert war (ATXN7L3). Bei acht der zehn Antigene wurden mit den COPD-Seren nur Intensitäten kleiner 50 gemessen, d.h. diese Antigene waren bei der Frequenzberechnung bei den COPD-Seren negativ. Die zehn o.g. Antigene sind in Tabelle 13 mit den entsprechenden Frequenzen und AUC-Werten aufgelistet.

Tabelle 13: Ergebnisse der AUC- und Frequenzberechnung für zehn ausgewählte Antigene der Klassifikation Lungentumorseren versus COPD-Seren

ID (MPMGp800#)	Ensembl ID	NM_Nummer	Gen	Frequenz Lungentumore	Frequenz COPD	AUC Lungentumor vs. COPD
N18585				44,68	17,65	0,2804
B17559				23,4	5,88	0,2753
N17549	ENSG00000087152	NM_020218	ATXN7L3	14,89	0	0,2653
F05589				10,64	0	0,2566
D11585				10,64	0	0,2691
A06590				8,51	0	0,2804
N02601				8,51	0	0,2954
B13601				6,38	0	0,2203
A14529				6,38	0	0,2466
C08528				4,26	0	0,2816

3.1.2.4 Überprüfung der Stabilität der Seroreaktivitätsprofile

Um zu überprüfen, ob eine Tumor-assoziierte Autoimmunreaktion über einen längeren Zeitraum stabil bleibt, wurden Seren von 7 Patienten untersucht, die sich zwischen 1998 und 2000 einer Lungentumorresektion unterzogen haben und bis 2008 Rezidiv-frei überlebten. Die erste Blutentnahme erfolgte also zwischen 1998-2000 präoperativ. Denselben Patienten wurde dann 2008 erneut Blut abgenommen. Die Patientendaten sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Patientendaten zu den Lungentumorpatienten, deren Seren zur Überprüfung der Stabilität der Seroreaktivitätsprofile herangezogen wurden

Nr.	Alter bei Blutentnahme	Geschlecht	Histologie	TNM
1	59	w	adeno-squamöses Bronchialkarzinom	T2N1
8	68			
2	67	w	Adenokarzinom	T2N1
9	77			
3	43	w	Adenokarzinom	T2N0M1(pulm)
10	52			
4	57	w	Adenokarzinom	T1N1
11	66			
5	62	w	Plattenepithelkarzinom	T2N0M1(pulm)
12	71			
6	73	m	Plattenepithelkarzinom	T2N0
13	82			
7	60	m	Plattenepithelkarzinom	T3N0
14	68			

Die Seroreaktivitätsprofile aller 14 Serumproben wurden untereinander verglichen. Zunächst wurden die Seren in die zwei Gruppen A (alle sieben Seren der ersten Blutentnahme 1998-2000) und B (alle sieben Seren der zweiten Blutentnahme 2008) eingeteilt und Streudiagramme aus den Intensitätswerten aller Antigene erstellt und die Korrelation berechnet (Pearson-Korrelation). Es wurden insgesamt 14^2 solcher Streudiagramme für alle möglichen Serumkombinationen angefertigt, wobei die Seren X und X+7 immer von derselben Person (von den beiden Blutentnahme-Zeitpunkten) stammten (siehe auch Tabelle 14). Die Korrelation ist ein dimensionsloses Maß für den linearen Zusammenhang zweier Merkmale. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Bei einem Wert von $+1$ (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Bei einem Wert von 0 liegt keine lineare Abhängigkeit der beiden Merkmale vor. Die Ergebnisse der Korrelationsberechnungen sind in Tabelle 15 aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Seren, die vom selben Patienten stammten, deutlich miteinander korrelierten. Die Serumpaare 3-10, 4-11, 5-12 und 6-13 erreichten untereinander die höchsten Korrelationswerte im Vergleich mit allen anderen Seren mit Werten zwischen $0,539$ und $0,805$ (rote Felder Tabelle 15). Die Serumpaare 1-8, 2-9 und 7-14 korrelierten zwar ebenfalls sehr stark miteinander (orangene Felder Tabelle 15), allerdings lagen die Werte bei den nicht vom selben Patienten stammenden Paaren 1-3, 2-8 und 7-12 geringfügig höher. Die Korrelation der Seren aus den Gruppen A (gelbe Felder Tabelle 15) bzw. B (grüne Felder Tabelle 15) war weniger stark ausgeprägt.

Tabelle 15: Korrelation der Seroreaktivitätsprofile der verschiedenen Seren untereinander

Die Korrelation von Seren aus Gruppe A mit Gruppe B war am stärksten ausgeprägt (rote Felder = Serumpaare mit höchster Korrelation, orange Felder = Serumpaare mit weniger starker Korrelation). Die Korrelation der Seren aus den Gruppen A (gelbes Feld) bzw. B (grünes Feld) untereinander war weniger stark ausgeprägt.

		Serumgruppe A							Serumgruppe B						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Serumgruppe A	1		0,256	0,321	0,115	0,199	0,205	0,026	0,295	0,25	0,333	0,248	0,157	0,311	0,083
	2			0,421	0,298	0,33	0,317	0,174	0,492	0,489	0,308	0,332	0,242	0,329	0,207
	3				0,076	0,465	0,38	0,35	0,24	0,194	0,708	0,166	0,513	0,436	0,39
	4					0,063	0,162	0,224	0,362	0,224	0,196	0,673	0,095	0,142	0,101
	5						0,337	0,544	0,315	0,364	0,295	0,14	0,805	0,354	0,431
	6							0,21	0,199	0,354	0,365	0,111	0,343	0,539	0,21
	7								0,241	0,094	0,353	0,012	0,601	0,37	0,558
Serumgruppe B	8									0,291	0,184	0,434	0,268	0,259	0,196
	9										0,118	0,311	0,194	0,122	0,185
	10											0,167	0,387	0,448	0,294
	11												0,091	0,084	0,125
	12													0,457	0,475
	13														0,318
	14														

Die Streudiagramme der Seroreaktivität für beide Serumproben eines Patienten sind in Abbildung 17 dargestellt. Je näher die Punktwolke im Streudiagramm an der Diagonalen liegt, desto höher ist die Korrelation. In Abbildung 18 ist die zugehörige Korrelationsmatrix graphisch dargestellt.

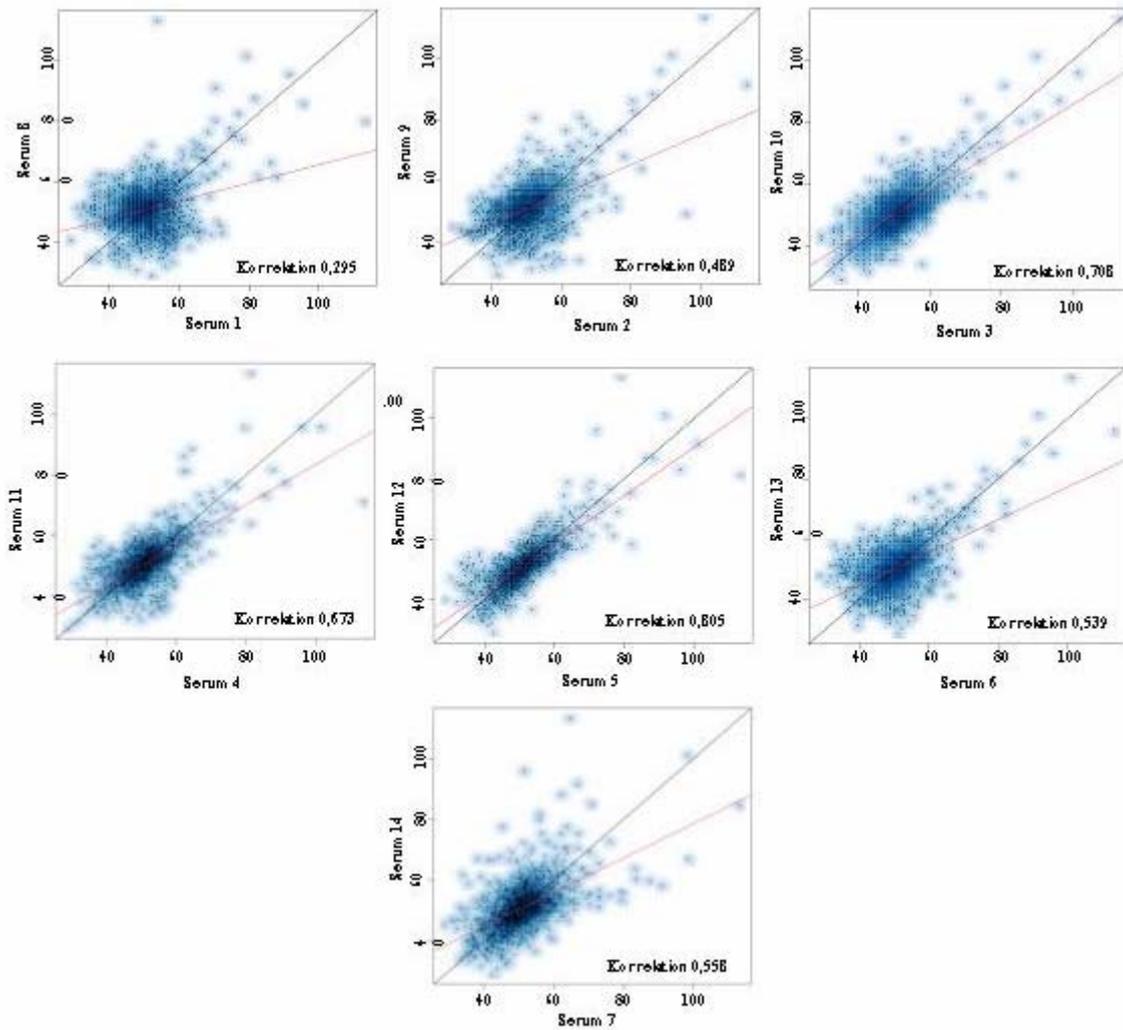


Abbildung 17: Streudiagramme der Seroreaktivität für beide Serumproben eines Patienten. Je näher die Punktwolke im Streudiagramm an der Diagonalen liegt, desto höher ist die Korrelation. Die rote Linie ist die Regressionsgerade, die blaue Schattierung dient der Dichteabschätzung der Verteilung.

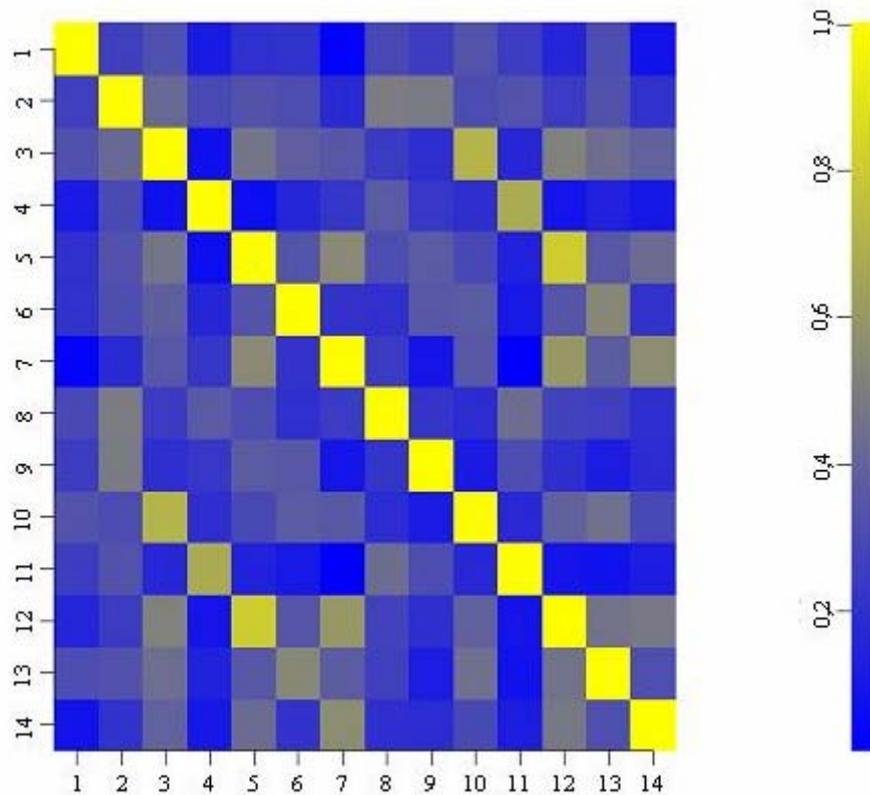


Abbildung 18: Korrelationsmatrix für alle 14 Serumproben der sieben Lungentumorpatienten

In einem nächsten Schritt wurde eine Clusteranalyse mit den Antigenen durchgeführt, die in allen 14 untersuchten Seren die größte Varianz in ihren Intensitätswerten untereinander aufwiesen (insgesamt 49 Antigene). Ein Clustering wird durchgeführt, um Gruppen (Cluster) von Objekten zu identifizieren, die bestimmte Ähnlichkeiten aufweisen. Das Ergebnis der Clusteranalyse ist in Abbildung 19 graphisch dargestellt.

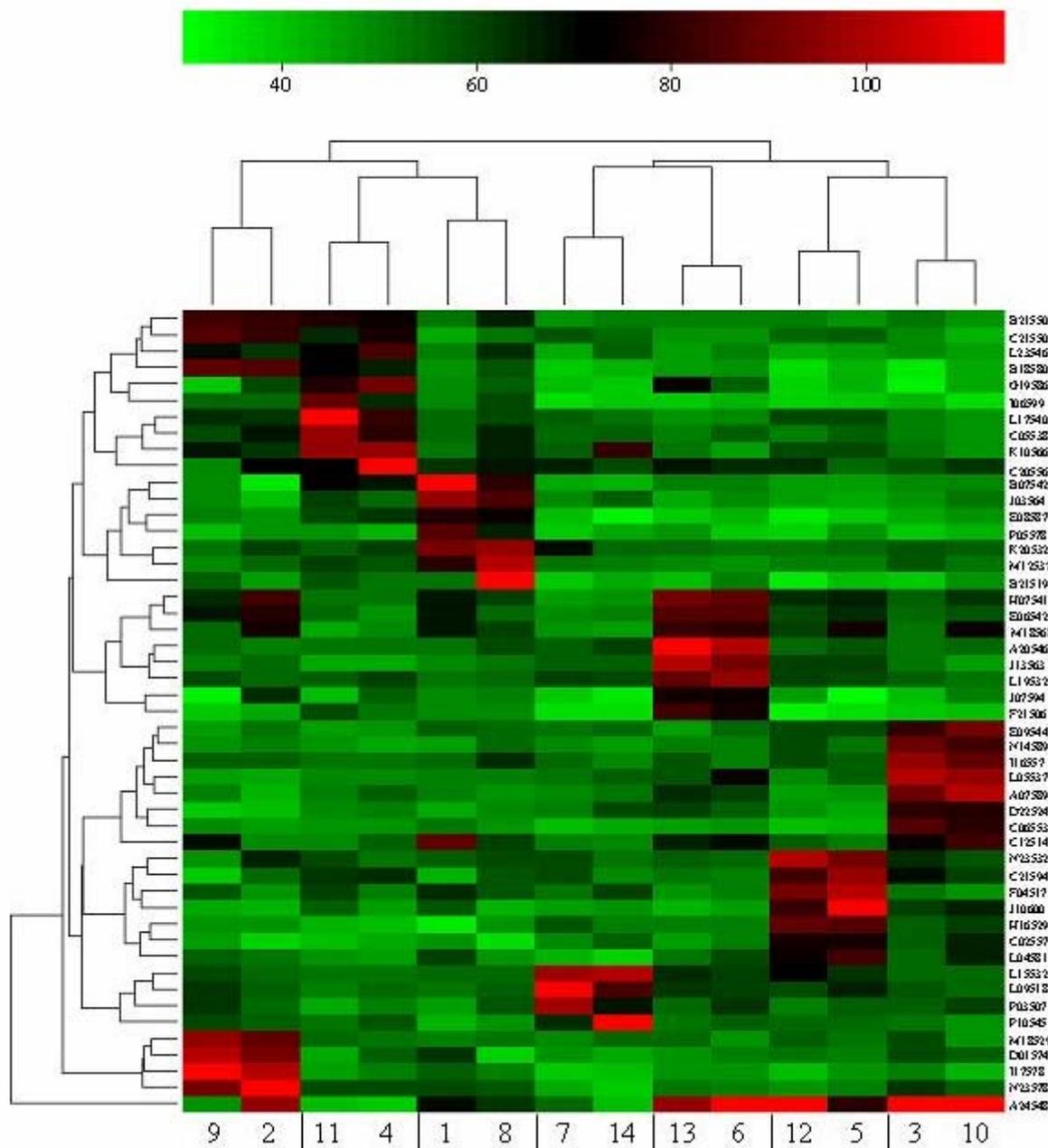


Abbildung 19: Clusteranalyse der 49 Antigene mit der höchsten Varianz in ihren Intensitätswerten in allen 14 untersuchten Seren

Auffällig ist, dass die Seren desselben Patienten immer zusammen clusterten, d.h. dass sich diese beiden Seren in den Intensitätswerten der 49 Antigene mit der höchsten Varianz am ähnlichsten waren. Beim Betrachten der Abbildung 17 fallen einige rote Bereiche auf, die Antigene mit hohen Intensitätswerten darstellen. Die Verteilung dieser besonders reaktiven Antigene beschränkt sich überwiegend auf die Seren desselben Patienten. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Klassifikation Lungentumorseren versus Normalseren ergab keine Überlappungen der hier untersuchten Klone mit der höchsten Varianz mit den informativen Klonen aus der AUC-Auswertung (siehe 3.1.2.2), d.h. keiner der 49 Klone mit höchster

Varianz hatte bei der Klassifikation Lungentumorseren versus Normalseren einen AUC-Wert unter 0,3 oder über 0,7. Die Ergebnisse der Korrelationsberechnung und der Clusteranalyse haben gezeigt, dass eine Binarisierung der Daten sinnvoll ist. In Abhängigkeit der Intensitätswerte kann eine binäre Ja-/Nein-Antwort, d.h. positive Antigenreaktion oder negative Antigenreaktion, generiert werden. Hierzu muss ein Intensitätsschwellenwert bestimmt werden, ab dem die Reaktion als positiv gewertet wird (siehe auch 3.1.2.3). Die Ergebnisse dieser 14 Proteinmacroarrays wurden völlig unabhängig von den vorangegangenen Arrays, die für die Klassifikation angefertigt wurden, betrachtet und ausgewertet. Deshalb kann auch der Schwellenwert variieren, ab dem man eine Antigen-Antikörperreaktion visuell als positiv bezeichnen würde. In vorliegendem Fall wurde als Schwellenwert eine Intensität von 75 gewählt. Das Ergebnis der Binarisierung ist in Abbildung 20 dargestellt und bestätigt die Aussage aus Abbildung 19.

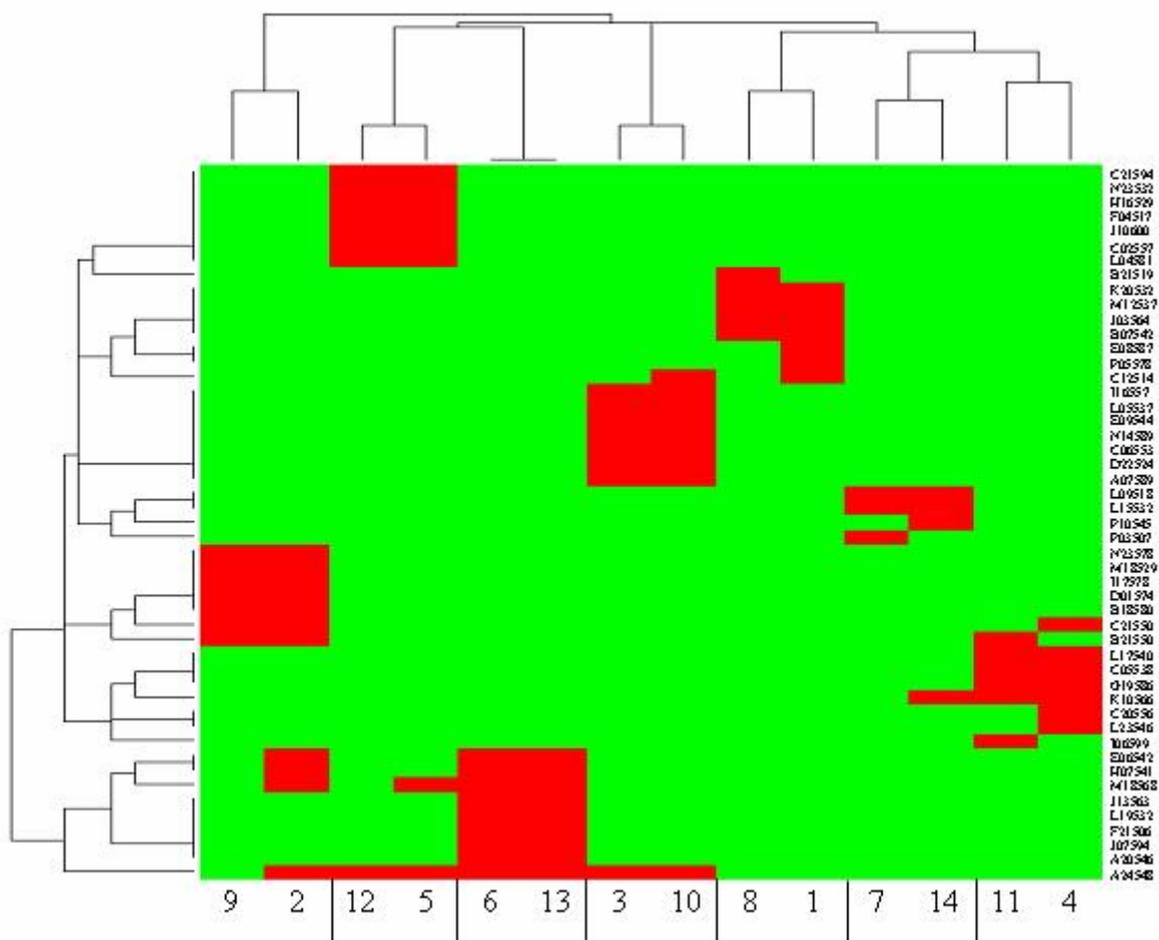


Abbildung 20: Clusteranalyse der 49 Antigene mit der höchsten Varianz in ihren Intensitätswerten in allen 14 untersuchten Seren mit binarisierten Daten (grün = seronegativ, rot = seropositiv)

3.2 Analyse der miRNA-Expression in peripherem Blut unter Verwendung von miRNA-Microarrays und quantitativer Real-Time PCR

Einige Studien haben bereits gezeigt, dass sich die miRNA-Expressionsprofile in Gewebe von Tumorpatienten und Gesunden unterscheiden [89-91]. Auch bei Lungentumorgewebe ist im Vergleich zu Gewebe eines gesunden Patienten eine, deregulierte miRNA-Expression bereits in frühesten Entwicklungsstadien zu erkennen [102]. Die Ergebnisse der Studie von Mascaux et al., sowie aller anderen Studien, die sich mit der miRNA-Expressionsanalyse in Gewebe befassen, eignen sich jedoch nicht zur Früherkennung eines Tumors, da sie die Verfügbarkeit von Gewebe voraussetzen. Eine Gewebeentnahme mittels Biopsie erfolgt aber nur aufgrund einer bereits bestehenden Verdachtsdiagnose. Die Analyse der miRNA in Körperflüssigkeiten, wie z.B. peripherem Blut, ist minimal-invasiv und könnte neue Möglichkeiten der Tumor-Früherkennung eröffnen. Die ersten Publikationen über Untersuchungen zur miRNA-Expression in Serum erschienen im Jahre 2008 [104-106, 108, 118, 119]. Mit der Analyse der miRNA-Expression in Blutzellen von Lungentumorpatienten hat sich bisher allerdings nur eine Studie befasst [104]. In vorliegender Arbeit wurde Total-RNA aus Blutzellen aus peripherem Vollblut von 17 Lungentumorpatienten (NSCLC) und 19 Gesunden isoliert und die miRNA-Expression mittels Microarray verglichen. Um eine Änderung der Genexpression postphlebotomisch, also nach der Blutentnahme *ex vivo*, zu verhindern und die RNA zu stabilisieren erfolgte die Blutentnahme in PAXgene™-Blutentnahmeröhrchen (siehe Material und Methoden 2.2.1). Die Microarray-Ergebnisse wurden für einzelne miRNAs mittels quantitativer Real-Time PCR überprüft. Nähere Informationen zu den Blutspendern sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Detaillierte Informationen zu den Lungentumorpatienten und gesunden Blutspendern, die zur miRNA-Expressionsanalyse herangezogen wurden

Blutspender	männlich	weiblich
Lungentumorpatienten		
Anzahl	9	8
Durchschnittsalter	67,4	60,6
Plattenepithelkarzinom	3	4
Adenokarzinom	6	1
adeno-squamöses Karzinom	0	1
broncholaveoläres Karzinom	0	1
typisches Karzinoid	0	1
gesunde Probanden		
Anzahl	7	12
Durchschnittsalter	43,3	36,7

3.2.1 Analyse der miRNA-Expression mittels Microarrays

Zur miRNA-Expressionsanalyse wurde der Geniom[®] Biochip miRNA homo sapiens verwendet (siehe 2.2.4). Jeder Biochip enthält die komplementären Sequenzen zu allen 866 in der Sanger miRBase 12.0 niedergelegten miRNAs und mature star-Sequenzen (im Folgenden mit * gekennzeichnet). Mature star-Sequenzen sind die zur reifen miRNA komplementären Sequenzen (siehe Einleitung). Von jeder dieser 866 Sequenzen sind sieben Replikate in zufälliger Verteilung auf dem Biochip gespottet, der mit Fluoreszenz-markierter Total-RNA hybridisiert wurde. Die Prozessierung der Microarrays erfolgte vollautomatisch mit dem Geniom Realtime Analyzer. Nach der Hybridisierung wurden die Intensitätswerte aller Spots extrahiert, eine Hintergrundkorrektur durchgeführt und für jede miRNA der Mittelwert der sieben Replikate ermittelt. Um die Daten aus unterschiedlichen Arrays zu normalisieren wurde eine quantile Normalisierung durchgeführt. Bei der quantilen Normalisierung der Arrays geht man davon aus, dass die Verteilung der Genexpression bei allen Wiederholungen ungefähr dieselbe ist. Ziel der quantilen Normalisierung ist daher, dass die Meßwerte auf allen Arrays ebenfalls dieselbe Verteilung haben [120]. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Arrays wurden biologische und technische Replikate angefertigt und die Korrelation berechnet. Die biologischen Replikate zeigten eine Korrelation von 0,87 und die technischen Replikate eine Korrelation von 0,97. Somit liegt eine hohe Reproduzierbarkeit der verwendeten Microarrays vor.

3.2.1.1 Identifizierung signifikant deregulierter miRNAs

Zur Identifizierung signifikant deregulierter miRNAs in den Blutzellen von Lungentumorpatienten verglichen mit den Blutzellen von Gesunden wurde für jede miRNA ein Student's t-Test (two-tailed unpaired) durchgeführt. Die dazugehörigen p-Werte wurden nach Benjamini-Hochberg adjustiert. Der p-Wert ist ein Wahrscheinlichkeitswert. Es wird im Voraus festgelegt, wie viele falsch-positive man unter den abgelehnten Hypothesen akzeptiert. Legt man beispielsweise die Grenze für den p-Wert bei 5%, so kann bei p-Werten $<0,05$ (5%) die Nullhypothese (z.B. zwei Gruppen unterscheiden sich nicht) abgelehnt und die Alternativhypothese (z.B. zwei Gruppen unterscheiden sich) angenommen werden. Hierbei wurden 27 signifikant deregulierte miRNAs detektiert. Diese miRNAs sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17: Zusammenfassung der 27 signifikant deregulierten miRNAs

miRNA	Mittelwert Lungentumor	Mittelwert Normal	Quotient Mittelwert Tumor/Normal	p-Wert
hsa-miR-126	962,18954	3383,05263	0,28441	3,43E-05
hsa-miR-423-5p	6696,13031	4321,26791	1,54958	0,000978034
hsa-let-7d	6134,77533	13545,29240	0,45291	0,002715951
hsa-let-7i	3337,10703	6991,26791	0,47733	0,002715951
hsa-miR-15a	3709,69077	6113,38085	0,60681	0,008784487
hsa-miR-22	8079,65359	4929,02851	1,63920	0,008784487
hsa-miR-98	302,65074	1389,64693	0,21779	0,008784487
hsa-miR-19a	517,33170	188,82346	2,73976	0,015204977
hsa-miR-20b	1187,97345	3059,63176	0,38827	0,015204977
hsa-miR-324-3p	1306,51552	577,35015	2,26295	0,015204977
hsa-miR-574-5p	105,29412	44,24269	2,37992	0,015204977
hsa-miR-195	2150,04493	4515,45029	0,47615	0,018313065
hsa-miR-25	11985,70098	8000,44664	1,49813	0,018313065
hsa-let-7e	1303,83129	3209,85819	0,40620	0,019691385
hsa-let-7c	5136,13562	8494,49708	0,60464	0,019946719
hsa-let-7f	4586,80147	9466,19518	0,48455	0,019992878
hsa-let-7a	6658,47467	11975,63670	0,55600	0,022999135
hsa-let-7g	2912,12623	6004,75439	0,48497	0,023591848
hsa-miR-140-3p	9204,65033	4902,14364	1,87768	0,024644601
hsa-miR-339-5p	368,85621	90,62573	4,07010	0,025550318
hsa-miR-361-5p	522,20507	170,67909	3,05957	0,030845953
hsa-miR-1283	6,48366	37,93567	0,17091	0,03712987
hsa-miR-18a*	834,25817	296,80738	2,81077	0,04393972
hsa-miR-26b	915,34150	2390,86659	0,38285	0,044122011
hsa-miR-604	240,62092	114,04678	2,10984	0,048017973
hsa-miR-423-3p	1555,83374	587,37244	2,64880	0,049450868
hsa-miR-93*	477,20384	113,12939	4,21821	0,049450868

Für jede miRNA wurde der Mittelwert aller 17 untersuchten Lungentumorproben und aller 19 untersuchten Normalproben berechnet. Der Quotient beider Mittelwerte gibt die Regulation der Expression an. Verglichen mit der Expression in Blutzellen von gesunden Blutspendern war die Expression bei 14 dieser 27 miRNAs in Blutzellen der Lungentumorpatienten herunter reguliert, wogegen die Expression bei 13 miRNAs hochreguliert war. Die miRNA hsa-mir-126 war mit einem p-Wert von $3,43 \cdot 10^{-5}$ am signifikantesten dereguliert. Die miRNA hsa-miR-1283 (5,9-fach, Quotient = 0,17091) war am stärksten herunterreguliert in Blutzellen von Lungentumorpatienten (p-Wert 0,037). Am stärksten hochreguliert war dagegen hsa-miR-93* (4,2-fach) in Blutzellen von Lungentumorpatienten (p-Wert 0,049). Unter den 27 am signifikantesten deregulierten miRNAs befanden sich auch die Mitglieder der let-7-Familie hsa-let-7a, hsa-let-7c, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7f, hsa-let-7g, hsa-let-7i und hsa-miR-98 (ein Homolog von hsa-let-7), die alle in den Blutzellen der Lungentumorpatienten herunterreguliert waren. Die Expression der miRNA hsa-let-7b war ebenfalls herunterreguliert in den Blutzellen von Lungentumorpatienten, allerdings mit einem p-Wert von 0,171 und daher nicht signifikant. Die Mittelwerte der Intensitätswerte der 27 signifikant deregulierten miRNAs sind in Abbildung 21 dargestellt. In Abbildung 22 ist beispielhaft die Verteilung der Intensitätswerte der beiden miRNAs hsa-miR-126 und hsa-miR-98 graphisch dargestellt.

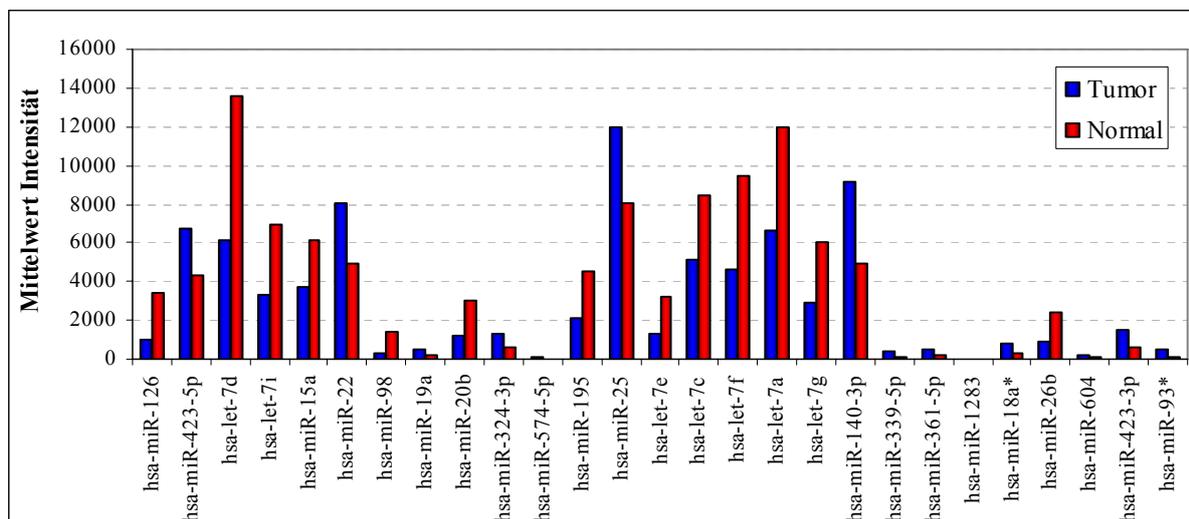


Abbildung 21: Mittelwert der Intensitätswerte der 27 miRNAs mit der signifikantesten Deregulation.

Die blauen Balken zeigen den Mittelwert der Intensitätswerte aller untersuchten Lungentumoren, die roten Balken zeigen den Mittelwert der Intensitätswerte aller untersuchten Gesunden.

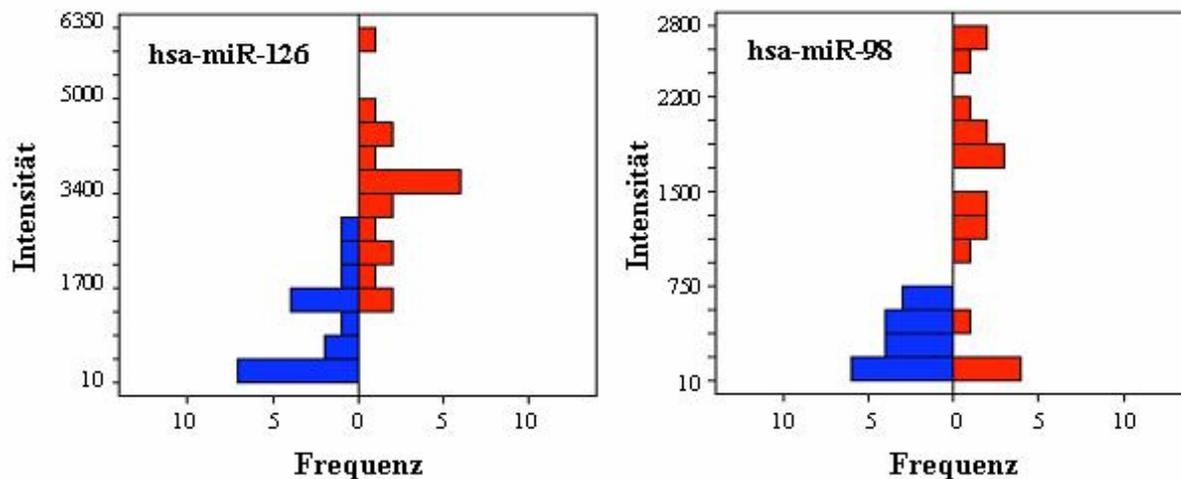


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Verteilung der Intensitätswerte der beiden miRNAs hsa-miR-126 und hsa-miR-98. (rote Balken = Normalprobe, blaue Balken = Lungentumorprobe, die Frequenz ist in Absolutzahlen angegeben)

3.2.1.2 Klassifikation mittels miRNA-Expressionsprofil

Einzelne miRNAs sind für eine Klassifikation der Lungentumorpatienten und Gesunden nicht spezifisch und sensitiv genug. Die am stärksten signifikant deregulierte miRNA hsa-miR-126 erlaubt beispielsweise eine Trennung der Lungentumorpatienten von den Gesunden mit einer Spezifität von nur 68%. Das bedeutet, dass 32% der Gesunden fälschlicherweise als Tumorpatienten klassifiziert werden. Um die Vorhersagegenauigkeit zu verbessern ist daher die Analyse mehrerer miRNAs nötig. Dazu wurde die statistische Lernmethode Support Vector Machines mit einer auf dem t-Test beruhenden Feature Subset Selection Methode angewendet. Insgesamt wurden 100 Wiederholungen einer 10-fach Kreuzvalidierung berechnet. Ebenso wurden 100 Permutationstest berechnet. Die besten Resultate wurden mit einem Subset aus 24 miRNAs erzielt. Mit Hilfe dieser miRNAs konnten die Lungentumorpatienten von Gesunden mit einer Genauigkeit von 95,4% (95% CI: 94,9%-95,9%), einer Spezifität von 98,1% (95% CI: 97,3%-98,8%) und einer Sensitivität von 92,5% (95% CI: 91,8%-92,5%) getrennt werden. Die Permutationstests zeigten mit einer Genauigkeit von 49,2% (95% CI: 47,2%-51,3%), einer Spezifität von 56,9% (95% CI: 54,5%-59,3%) und einer Sensitivität von 40,6% (95% CI: 37,9%-43,4%) deutlich niedrigere Werte. Die Genauigkeit von annähernd 50% bei den Permutationstests zeigt, dass die erhaltenen Klassifikationsergebnisse reell sind. In Abbildung 23 sind die Klassifikationsergebnisse in einem Boxplot-Diagramm dargestellt.

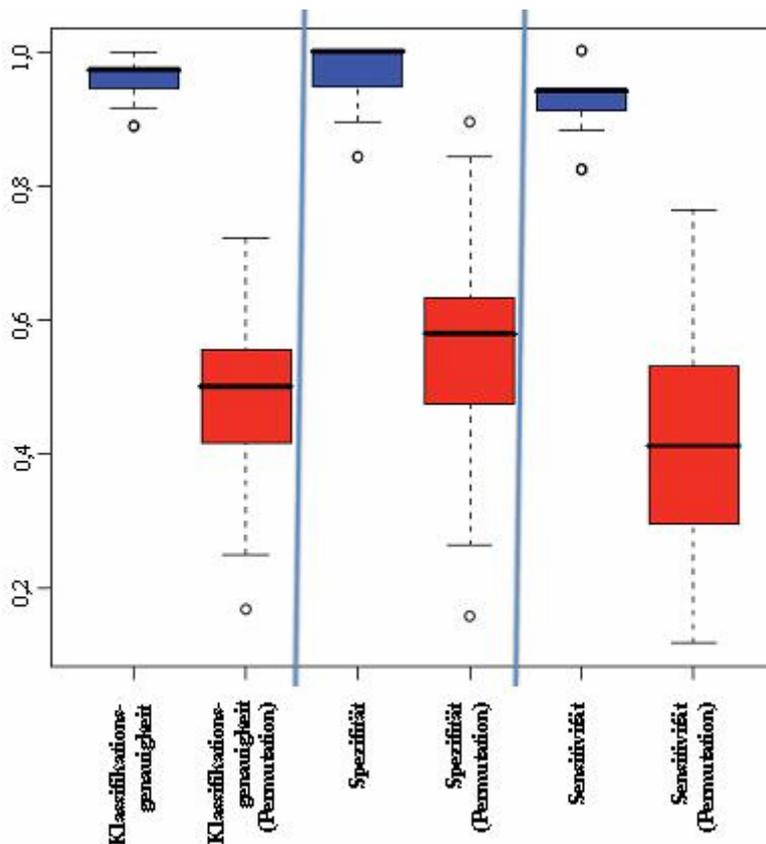


Abbildung 23: Ergebnisse der Klassifikation und der Permutationstests der Lungentumorpatienten und der Gesunden anhand der Analyse der miRNA-Expression in Blutzellen mittels Microarrays

3.2.1.3 Untersuchung des Einflusses von Alter und Geschlecht auf das miRNA-Expressionsprofil

Um zu überprüfen, ob Alter und Geschlecht einen Einfluß auf die miRNA-Expressionsanalyse haben, wurde für die miRNA-Arrays der Gesunden ein t-Test durchgeführt. Beim Vergleich der gesunden Männer mit den gesunden Frauen wurden keine signifikant deregulierten miRNAs gefunden. Die am signifikantesten deregulierte miRNA war hier hsa-miR-423 mit einem p-Wert von 0,78. Ebenso wurde der Einfluß des Alters mit einer t-Test-Berechnung überprüft. Hierzu wurden die Gesunden nach ihrem Alter in zwei gleichgroße Gruppen eingeteilt. Der Vergleich der 50% ältesten mit den 50% jüngsten Gesunden ergab ebenfalls keine signifikant deregulierten miRNAs. Die am signifikantesten deregulierte miRNA war hier hsa-miR-890 mit einem p-Wert von 0,87. Somit wurde gezeigt, dass Alter und Geschlecht keinen Einfluss auf die miRNA-Expressionsanalyse ausüben.

3.2.2 Analyse der miRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR

Um die Microarray-Ergebnisse zu verifizieren wurde die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) mit ausgewählten miRNAs durchgeführt. Insgesamt wurde die Expression in Blutzellen von acht Tumorpatienten für die sechs miRNAs hsa-miR-106b, hsa-miR-126, hsa-miR-98, hsa-let-7d, hsa-miR-22 und hsa-miR-140-3p mittels qRT-PCR untersucht. Als endogene Kontrolle diente die nicht-kodierende RNA U6 snRNA, eine häufig verwendete Kontroll-RNA bei miRNA-Expressionsstudien [99, 101, 117]. Als Calibratorprobe wurde ein Pool aus RNA von fünf verschiedenen Gesunden verwendet. Die Ergebnisse der qRT-PCR sind im Vergleich zu den Ergebnissen der Microarrays in Tabelle 18 aufgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Array-Ergebnisse ebenfalls für die mittels qRT-PCR untersuchten acht Tumorpatienten und fünf Gesunden berechnet. Die Korrelation der Ergebnisse der qRT-PCR mit den Ergebnissen der miRNA-Microarrays lag bei 0,994. Damit wurden die mittels miRNA-Microarray erhaltenen Ergebnisse durch die qRT-PCR-Ergebnisse für diese sechs miRNAs bestätigt. In Abbildung 24 ist die Korrelation der Ergebnisse beider Methoden graphisch dargestellt.

Tabelle 18: Ergebnisse der qRT-PCR im Vergleich zu den Ergebnissen der Microarrays

miRNA	8 Tumore und 5 Normale		alle Microarrays
	qRT-PCR Mittelwert $2^{-\Delta\Delta C_T}$	Microarray Quotient Mittelwert Tumor/Normal	Microarray Quotient Mittelwert Tumor/Normal
hsa-let-7d	0,391	0,440	0,453
hsa-miR-106b	0,393	0,577	0,899
hsa-miR-126	0,098	0,175	0,284
hsa-miR-140-3p	1,476	1,799	1,878
hsa-miR-22	0,982	1,272	1,639
hsa-miR-98	0,191	0,238	0,218

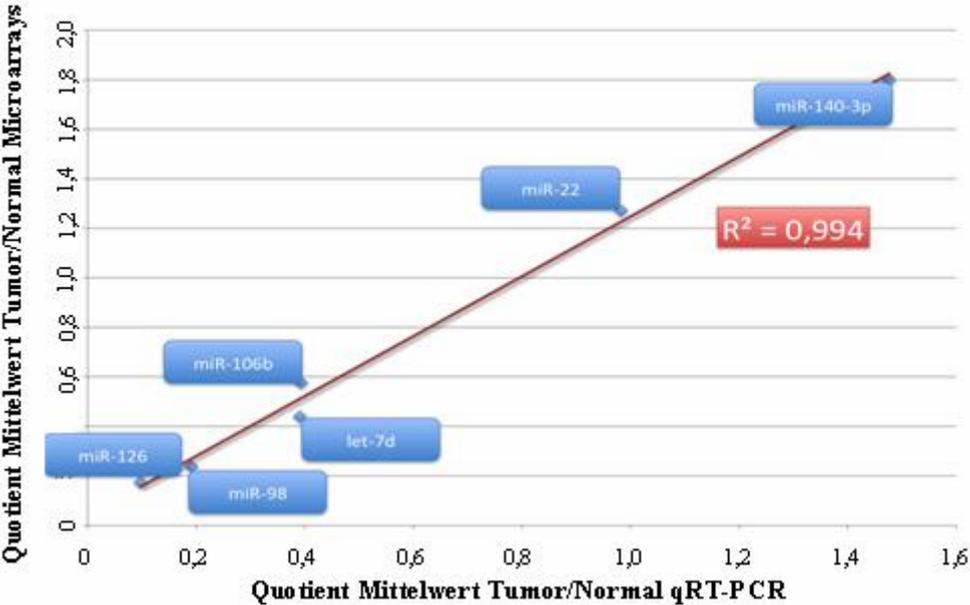


Abbildung 24: Korrelation der Ergebnisse der qRT-PCR und der miRNA-Microarrays

4. DISKUSSION

Das Bronchialkarzinom ist weltweit die häufigste zum Tode führende Tumorerkrankung. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit Bronchialkarzinom fällt mit steigendem Tumorstadium stark ab. Patienten mit einem Lungentumor im klinischen Stadium I haben noch eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 60 bis 80%. Bei Patienten mit Lungentumor im Stadium II ist die Fünf-Jahres-Überlebensrate bereits um 20 bis 30% niedriger [5]. Die Entstehung des Bronchialkarzinoms verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch. Beim Auftreten erster Symptome befindet sich der Tumor häufig schon in einem fortgeschrittenen Stadium, in dem eine kurative Therapie meist nicht mehr möglich ist [121]. Die Entwicklung einer zuverlässigen Früherkennungsmethode, die geeignet ist, eine Risikogruppe auf das Vorhandensein eines Bronchialkarzinoms zu screenen, könnte zu einer Steigerung der Überlebensrate führen. Eine typische Risikogruppe beim Bronchialkarzinom wären gegenwärtige oder ehemalige Raucher über 50 Jahre, da Rauchen der Hauptrisikofaktor ist und das Erkrankungsalter bei ca. 50 bis 70 Jahren liegt (Saarländisches Krebsregister, <http://www.krebsregister.saarland.de>). Generell eignen sich aber nur solche Tumormarker für ein Screening einer Risikogruppe, die eine ausreichende Vorhersagegenauigkeit, also eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzen und sich schnell und einfach, im besten Fall nicht-invasiv und risikofrei, untersuchen lassen.

Für verschiedene Tumoren, wie z.B. Brustkrebs, Kolon- und Zervixkarzinom, haben sich CT-Screenings bewährt, da sie die Mortalität verringern können [122-124]. Für Bronchialkarzinome konnte aber bisher der Nutzen des CT-Screenings nicht ausreichend belegt werden. Zwar ist es möglich, durch CT-Scans sehr kleine Tumoren zu finden, diese Eigenschaft wird aber durch eine hohe Rate falsch-positiver Scans überschattet. Dies wird deutlich durch die Studie von Bach et al. an asymptomatischen gegenwärtigen und ehemaligen Rauchern. Hier wurde gezeigt, dass CT-Screenings dreimal so viele Lungentumore detektierten als man eigentlich rein rechnerisch anhand des durch Rauchen bedingten relativen Risikos von 3,2 erwarten würde. Das Screening führte aber aufgrund vieler falsch-positiver Befunde auch zehnmal häufiger zu einer Operation. Eine Reduzierung der Anzahl der Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom oder eine Reduzierung der Mortalität wurde hierbei jedoch nicht beobachtet [125]. Bisher konnte durch keine Studie ausreichend belegt werden, dass CT-Scans der Lunge zu einer Frühdiagnose und somit zur Verringerung der Mortalität eines Bronchialkarzinoms beitragen. Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass ein CT-Screening eine gewisse Strahlenbelastung mit sich bringt.

Obwohl zwar eine einzelne Niedrig-Dosis-CT-Untersuchung nur eine Strahlenbelastung von ca. 2,5 bis 9 mGy bedeutet, ist das Risiko, durch jährliche CT-Scans an einem Lungentumor zu erkranken, nicht zu vernachlässigen. Das Risiko für ein durch Strahlung induziertes Bronchialkarzinom ist für Personen über 55 Jahre am höchsten. Außerdem interagieren beim Bronchiakarzinom die durch Strahlung induzierten und die durch das Rauchen induzierten Schäden synergistisch miteinander [126, 127]. Eine einzelne CT-Untersuchung birgt ein niedriges Risiko (0,06 %), das Risiko ist i.a. aber höher für einen Raucher als für einen Nichtraucher und starke Raucher haben das höchste Risiko an einem durch Strahlung induzierten Lungentumor zu erkranken. Beispielsweise erhöht ein jährliches Screening das Risiko einer 50-jährigen weiblichen Raucherin um 0,85% zusätzlich zu dem durch Alter und Rauchverhalten bedingten Risiko von 16,9% (also ein um 5% erhöhtes Risiko) und eines 50-jährigen männlichen Rauchers um 0,23% zusätzlich zum vorhandenen Risiko von 15,8% (also ein um 1,5% erhöhtes Risiko). Das CT-Screening müsste also einen Mortalitäts-Benefit über 5% erbringen, um das Strahlungsrisiko zu kompensieren [128]. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sich CT-Scans als Screeningmaßnahme beim Bronchialkarzinom bisher nicht bewährt haben [26]. Aus diesem Grund fokussiert sich die Suche nach neuen spezifischen Biomarkern für das Bronchialkarzinom immer mehr auf die molekulare Ebene [45]. Hierbei gibt es u.a. die Möglichkeiten Proteine oder Nukleinsäuren zu untersuchen. Zu den meist untersuchten Protein-Biomarkern beim Bronchialkarzinom zählen die im Serum nachweisbaren Proteine carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin 19 fragment 21-1 (CYFRA 21-1), squamous cell carcinoma antigen (SCC antigen), neuron-specific enolase (NSE), progastrin-releasing peptide (ProGRP), tumor M2-pyruvate kinase (Tumor M2-PK) und C-reactive protein (CRP) [43]. Die oben genannten Serum-Biomarker sind einzeln zur Identifizierung eines Bronchialkarzinoms nicht spezifisch und sensitiv genug und haben sich bisher auch nicht in Kombination zur Frühdiagnose bewährt [50-55]. Zur Prognose, dem Monitoring oder der Rezidivüberwachung könnten sie sich dagegen besser eignen [44]. Als neue Quelle potentieller Biomarker zur Früherkennung des Bronchialkarzinoms gewinnt das Immunom immer mehr an Interesse. Es wird vermutet, dass das Immunsystem bereits Proteine eines Tumors *in situ*, d.h. in seinem frühesten Entwicklungsstadium, erkennt. Die Mechanismen, die dazu führen, dass bestimmte Tumorproteine oder Teile von ihnen vom körpereigenen Immunsystem beispielsweise als Antigene detektiert werden und zu einer Antikörperantwort führen, sind noch nicht abschließend geklärt. Viele verschiedene Möglichkeiten bzw. Eigenschaften der Antigene werden hierzu diskutiert [46]. Die am häufigsten diskutierten Mechanismen und Eigenschaften sind im Folgenden aufgeführt:

Beispielsweise gibt es Antigene, die sogenannten „shared tumor antigens“, die in verschiedenen Tumoren (ca. 10-70% aller Tumore) eine Immunreaktion auslösen. Interessanterweise werden diese Antigene nur in Tumoren, nicht aber in Normalgewebe, mit Ausnahme von Testisgewebe, exprimiert. Aus diesem Grund werden sie auch als „Cancer-Testis-Antigene (CT-Antigene)“ bezeichnet [129]. Zu den bekanntesten CT-Antigenen zählen Mitglieder der Genfamilien MAGE (Melanoma-Associated Antigen), GAGE (G Antigen) oder BAGE (B-Melanoma Antigen) [130, 131]. Differenzierungsantigene stellen eine zweite Klasse der Autoantigene dar. Sie werden sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe exprimiert. Hierzu zählt z.B. GFAP, das sowohl in Melanomen und Gliomen immunogen ist, aber auch in Melanozyten und Hirnzellen exprimiert wird, wo es jedoch keine Immunreaktion auslöst [129]. Ebenfalls stellen die Produkte mutierter, viraler, überexprimierter und amplifizierter Gene eine weitere mögliche Ursache für die Entwicklung einer Autoimmunreaktion im Tumorpatienten dar [66, 132-134]. Auch Splice-Varianten oder Proteine mit veränderter posttranslationaler Modifikation, einer Veränderung der Prozessierung oder Präsentation im Tumor können eine Autoimmunreaktion hervorrufen. Obwohl das Immunsystem nicht effizient genug ist, einen Lungentumor zu zerstören, kann es aber das Vorhandensein von Tumorzellen, durch die Entwicklung einer gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion, anzeigen. Deshalb schreibt man dem Immunsystem als potentielle Quelle spezifischer Biomarker in Form von Tumor-spezifischen Autoantikörpern eine große Bedeutung zu. Dabei erfüllen Autoantikörper viele der Kriterien, die einen idealen Biomarker ausmachen. Autoantikörper, die gegen Tumor-assoziierte Antigene gerichtet sind, können bereits fünf Jahre vor dem Auftreten erster Symptome nachgewiesen werden [47, 49, 59, 135, 136]. Betrachtet man sich den typischen Verlauf der Tumorentwicklung (siehe Abbildung 25), so hat ein Tumor, je nach Verdopplungszeit, erst frühestens 2 Jahre vor dem Auftreten erster Symptome eine Größe erreicht, ab der er im CT sichtbar wird [137]. Autoantikörper vom IgG-Typ haben außerdem eine relativ lange Halbwertszeit von 28 Tagen und bleiben somit recht lange nachweisbar [48]. Desweiteren lassen sich Autoantikörper minimal-invasiv, durch die Entnahme geringster Mengen Blut, sehr einfach und kosteneffizient nachweisen.

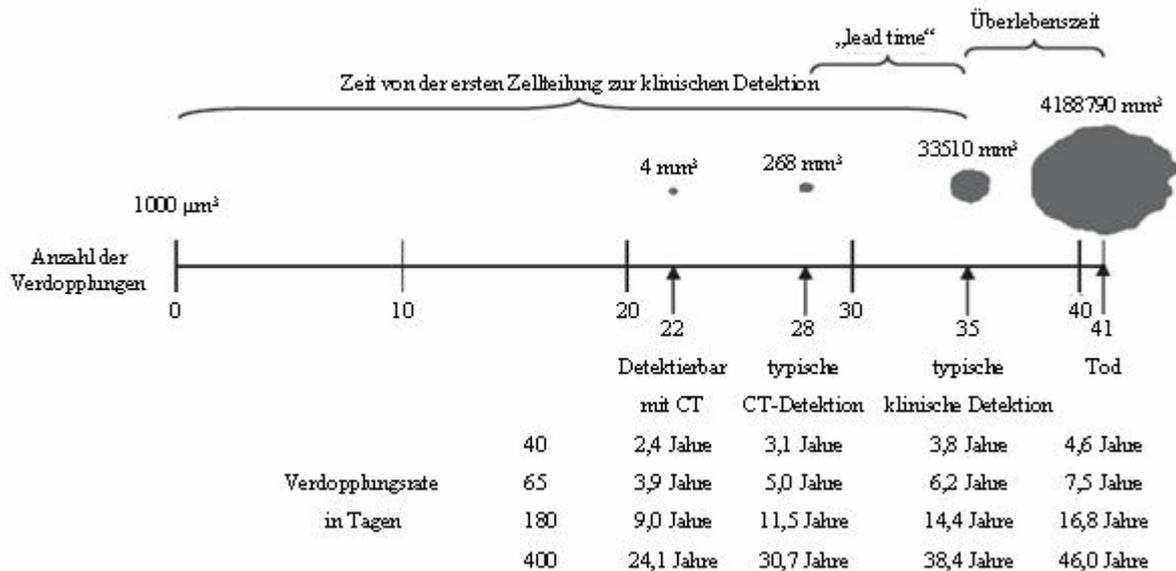


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Lungentumorentwicklung in Abhängigkeit der Tumorverdopplungszeit (Abbildung modifiziert nach [137])

Aber auch der Nachweis einzelner Autoantikörperreaktionen ist mit einer geringen Sensitivität und Spezifität verbunden. Die Kombination mehrerer Tumor-assoziiertes Antigene zur Analyse eines komplexen Seroreaktivitätsprofils ist dagegen vielversprechend [41]. Hinweise hierauf wurden bereits für verschiedene Tumorerkrankungen geliefert [56, 57, 138-140]. Auch beim Bronchialkarzinom lieferten verschiedene Studien bereits erste Hinweise dazu, dass durch die Kombination bestimmter Tumor-assoziiertes Antigene Lungentumorpatienten von Gesunden getrennt werden können [47, 59, 60, 141]. Ein weiterer Faktor, der für die Verwendung eines umfangreichen Antigen-Sets spricht, ist die Heterogenität der Lungentumoren [45]. Lungentumoren zeigen i.a. komplexe zelluläre Anomalien, z.B. verschiedene genetische Veränderungen, wie u.a. DNA-Mutationen, Kopienzahlveränderungen und Änderungen in der DNA-Methylierung, die zur Entwicklung einer Autoimmunreaktion beitragen können [66, 142-146]. Die „Cancer Immunome Database“ (CIDB, www2.licr.org/CancerImmunomeDB/) enthält derzeit 2316 immunogene cDNA-Klone, sowie nähere Informationen zu den cDNA-Banken und den Seren, mit denen diese Klone als immunogen nachgewiesen wurden und stellt somit eine umfangreiche Sammlung von Autoantigenen dar. Sie wird von den Mitgliedern des Ludwig Institute for Cancer Research (LICR), verwaltet und erweitert. Die in der CIDB niedergelegten Tumor-assoziiertes Antigene stammen daher überwiegend aus den Studien der Mitglieder des LICR. Sie enthält somit nur einen Bruchteil aller bisher identifizierten immunogenen Tumor-assoziiertes Antigene. Die Gesamtzahl aller bisher gefundenen immunogenen Tumor-

assoziierten Antigene ist daher um ein Vielfaches umfangreicher. Die Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Tumor-assoziierten Antigene bestätigt die Theorie, dass alle Neoplasien immunogen sind, d.h. eine spezifische Immunreaktion generieren. Um die Vielfalt des Tumor-Immunoms abdecken zu können ist daher ein möglichst umfangreiches Set an potentiellen Antigenen erforderlich. Dies kann nur mit Hilfe komplexer cDNA-Expressionsbibliotheken bewältigt werden.

In vorliegender Arbeit wurde durch zwei unabhängig voneinander durchgeführte retrospektive Studien gezeigt, dass es möglich ist, anhand Lungentumor-spezifischer Seroreaktivitätsprofile, die untersuchten Lungentumorpatienten (im Speziellen auch Patienten mit niedrig-gradigen Lungentumoren) von den Gesunden bzw. von Patienten mit häufig vorkommenden nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen zu trennen. Für die „proof-of-principle“-Studie wurde der serologische Spotassay verwendet [56, 147]. Hierbei wurden 82 Antigene, die zuvor mittels SEREX identifiziert wurden, zu einem Set zusammengefasst und mit Seren von 39 Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge und 40 Seren von gesunden Blutspendern analysiert. Die Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom konnten von den Seren Gesunder mit einer Genauigkeit von 93% (93,1% Spezifität, 92,9% Sensitivität) getrennt werden. Derzeit gibt es nur die drei Studien von Chapman et al., Zhong et al. und Zhang et al., die ebenfalls die Sensitivität und Spezifität ihrer Klassifikationen angeben und somit mit vorliegender Studie vergleichbar sind [47, 59, 140]. Zu diesen drei Studien gibt es allerdings keinen Überlapp mit den 82 untersuchten Antigenen in vorliegender Arbeit. In ELISA-Untersuchungen von sieben verschiedenen Antigenen (CAGE, GBU 4–5, HER2, p53, c-myc, NY-ES0-1, MUC1) konnten Chapman et al. Seren von 104 Lungentumorpatienten von 50 Kontrollprobanden mit einer Sensitivität von 76% und einer Spezifität von 92% trennen [47]. In der Phage-Display-Studie von Zhong et al. wurde eine Sensitivität und eine Spezifität von jeweils 91,3% erreicht. In dieser Studie wurde die Vorhersagegenauigkeit von fünf Antigenen (paxillin, SEC15L2, BAC clone RP11-499F19, XRCC5, MALAT1) mit Seren von sechs Lungentumorpatienten, 40 Patienten, denen 1-5 Jahre vor Tumorentstehung Blut entnommen wurde und 56 Kontrollpersonen getestet [59]. Die älteste dieser drei Studien stammt aus dem Jahre 2003 von Zhang et al., die ebenfalls mit sieben Tumor-assoziierten Antigenen (c-myc, p53, Cyclin B1, p62, Koc, IMP1, Survivin) und 56 untersuchten Seren von Lungentumorpatienten ein zur Studie von Chapman et al. vergleichbares Ergebnis erzielten (Sensitivität 68%, Spezifität 89-90%), wobei beide Gruppen auch zwei Übereinstimmungen bei der Antigen-Auswahl hatten (p53 und c-myc) [47, 140].

In keiner der drei oben erwähnten Studien wurden Tumore in frühen Entwicklungsstadien (z.B. klinisches Stadium I) getrennt betrachtet. Da ein Drittel aller Bronchialkarzinome aber erst in weit fortgeschrittenen klinischen Stadien diagnostiziert werden, eine frühest mögliche Diagnose jedoch entscheidend für eine gute Prognose ist, ist es wichtig, dass man einen Test entwickelt, der eine frühere Diagnose des Bronchialkarzinoms ermöglicht. Vor diesem Hintergrund wurde die Genauigkeit der Trennung der Seren von Patienten mit niedrig-gradigen Plattenepithelkarzinomen versus Seren von Gesunden berechnet. Hierbei betrug die Genauigkeit 92,9% (99,2% Spezifität, 79% Sensitivität).

Viele Lungentumorpatienten leiden zusätzlich unter anderen nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen. Dieser Aspekt wurde ebenfalls in den drei o.g. Studien vernachlässigt. Um falsch positive Befunde aber ausschließen zu können, muß zuvor überprüft werden, ob und inwieweit das Seroreaktivitätsprofil durch häufig auftretende Komorbiditäten beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden in vorliegender Studie als zusätzliche Kontrolle 29 Seren von Patienten mit COPD bzw. Emphysem und Pneumonie untersucht. Beim Vergleich der Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom und der Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen (COPD bzw. Emphysem und Pneumonie) wurde eine Genauigkeit von 83% erreicht (93,5% Spezifität, 75,2% Sensitivität). Die Trennung der Plattenepithelkarzinomseren von allen Kontrollseren (Normalseren und Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen) konnte mit einer Genauigkeit von 90,1% (93,9% Spezifität, 83,4% Sensitivität) durchgeführt werden. Mit vorliegender Arbeit wurde also erstmals der Beweis erbracht, dass sich die Seroreaktivitätsprofile von Lungentumorpatienten und Patienten mit den häufig auftretenden Bronchialerkrankungen COPD/Emphysem und Pneumonie unterscheiden und man die beiden Patientengruppen mittels Immunoscreening trennen kann.

Beim serologischen Spotassay wurde außerdem die Frequenz der Immunreaktionen berechnet. Zuerst wurde ermittelt, wie viele Antigene durchschnittlich von einzelnen Serumgruppen detektiert werden. Beim Betrachten aller 82 Antigene detektierten Plattenepithelkarzinomseren durchschnittlich 6,4 Antigene, Normalseren 7,8 Antigene und Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen 4,4 Antigene. Theoretisch würde man erwarten, dass die Plattenepithelkarzinomseren mehr Antigene detektieren als die Normalseren. Diese Diskrepanz kann aber dadurch erklärt werden, dass zur Erweiterung des Antigen-Sets auch Antigene hinzugezogen wurden, die ursprünglich nicht aus Lungentumorgewebe, sondern aus Hirngewebe, u.a. fötalem Hirngewebe, isoliert wurden. Betrachtet man dagegen nur die Antigene, die aus SEREX-Screenings mit Lungentumor-

cDNA-Banken stammten, so detektierten die Seren der Plattenepithelkarzinompatienten 3,4 Antigene im Durchschnitt und dadurch mehr als die Normalseren bzw. die Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen. Durch Normalseren wurden nur 0,6 Antigene erkannt und Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen detektierten 1,7 Antigene.

Außerdem wurde berechnet, mit welcher Frequenz die einzelnen Antigene eine Immunreaktion in den Serumgruppen auslösen. Insgesamt 28 der untersuchten Antigene reagierten mit mehr als 10% der Plattenepithelkarzinomseren. Darunter wurden die fünf Antigene ROCK1, PRKCB1, KIAA0376, MRPS15 und EIF4G1 gefunden, die nur mit Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom reagierten, d.h. in Normalseren und Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen nicht immunogen waren. Insgesamt drei dieser fünf Antigene (ROCK1, PRKCB1, KIAA0376) wurden sogar in mehr als 15% der untersuchten Plattenepithelkarzinomseren detektiert. Die vier Antigene USP3, PAFH1B1, SOX2 und YBX1 reagierten ebenfalls ausschließlich mit den Seren der Patienten mit Plattenepithelkarzinom. Hier wurden allerdings nur Frequenzen unter 10% erreicht. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Zhang et al. überein, in deren Studie die Tumor-assoziierten Antigene selten mit Frequenzen über 15-20% reagierten [140]. Das führt wiederum zu dem Schluss, dass einzelne Biomarker, wie in vorliegendem Fall einzelne Tumor-assoziierte Antigene, nicht als diagnostisches Mittel geeignet sind. Die Kombination mehrerer Marker liefert oft jedoch bessere Resultate. Beispielsweise konnten Zhang et al. durch Kombination ihrer sieben untersuchten Tumor-assoziierten Antigene die Anzahl ihrer positiven Immunreaktionen in Seren von Lungentumorpatienten auf 67,9% steigern. Von den insgesamt neun Antigenen, die unter allen 82 untersuchten Antigenen ausschließlich mit Seren von Plattenepithelkarzinompatienten detektiert wurden, wurden die fünf Antigene KIAA037, PRKCB1, YBX1, ROCK1 und SOX2 bereits in anderen Tumoren oder Autoimmunerkrankungen als immunogen beschrieben und in der CIDB niedergelegt. Insgesamt zehn verschiedene KIAA0376-Klone wurden mit Seren von Patienten mit Brustkrebs, Melanom, Kolonkarzinom, Magenkrebs, Prostatakrebs und Nierenkrebs detektiert. Ein PRKCB1-Klon wurde mit einem nicht näher spezifizierten Serum detektiert. Acht YBX1-Klone wurden u.a. mit Seren von Patienten mit Rheumatoider Arthritis und Brustkrebs und dem Screening einer cDNA-Bank aus Gewebe eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches identifiziert. Insgesamt sieben ROCK1-Klone konnten mit Seren von Patienten mit Lungentumor, Kolonkarzinom, Brustkrebs, Nierenkrebs, Fibrosarkom und Gliom gefunden werden. SOX2 wurde ausschließlich durch zwei Lungentumor-Seren als

Antigen identifiziert. Der Abgleich der CIDB mit allen anderen in unserer Studie verwendeten Klonen ergab, dass die Antigene BRAP, PARP1, RBPSUH und RTN4 in der CIDB bereits in Adenokarzinomen der Lunge als immunogen beschrieben wurden. Von diesen vier Antigenen war in vorliegender Studie RTN4 nicht immunogen in Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinom. Die restlichen drei Antigene zeigten zwar eine Reaktion mit Plattenepithelkarzinomseren, sie reagierten teilweise aber auch mit den Normalseren und mit den Seren der Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen. Es könnte sich bei RTN4 also um ein Antigen handeln, das spezifisch nur mit Seren von Patienten mit Lungentumoren eines bestimmten histologischen Typs, in diesem Fall mit Adenokarzinomen, reagiert. Dies kann aber nur vermutet werden, da keine weiteren Informationen zu Kontrollexperimenten zur Verfügung stehen. Hierdurch wird ein großer Nachteil der CIDB deutlich. Zwar sind hier immunogene Antigene in einer hohen Anzahl aufgeführt, es gibt jedoch selten Informationen darüber, ob die einzelnen Antigene auch in Kontrollseren immunogen waren. Alle restlichen in dieser Arbeit untersuchten Antigene wurden bisher in der CIDB noch nicht als immunogen beschrieben.

Da, wie eingangs erwähnt, die CIDB nicht alle bisher detektierten Tumor-assoziierten Antigene enthält, wurde zusätzlich in einem nächsten Schritt eine Literaturrecherche aller Studien durchgeführt, die immunogene Antigene in Plattenepithelkarzinomen der Lunge und anderen Organen beschreiben. Diese ergab, dass BRAP, YBX1, PRC1 und DNAJA1 bereits als immunogen bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches beschrieben wurden [148]. Von diesen vier Antigenen wurde in vorliegender Arbeit für PRC1 keine Immunreaktion in Seren von Plattenepithelkarzinompatienten gefunden. BRAP reagierte neben 48,7% der Plattenepithelkarzinomseren auch mit 42,5% der Normalseren und 17,2% der Seren von Patienten mit Bronchialerkrankungen. YBX1 zeigte nur eine schwache Immunreaktion in 2,6% der Plattenepithelkarzinomseren und DNAJA1 reagierte mit 20,5% der Plattenepithelkarzinomseren und mit 2,5% der Normalseren.

Wie bereits erwähnt besitzen Einzelantigene in der Regel nur eine geringe Aussagekraft. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Fokus vor allem auf komplexe Seroreaktivitätsmuster und nicht auf Einzelantigene gerichtet. Mit den serologischen Spotassays wurden viele Immunreaktionen mit Antigenen detektiert, die auch in der CIDB oder der Literatur als immunogen in Seren von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen beschrieben wurden. Trotz dieser Überlappungen ist anzumerken, dass einige Antigene dennoch gut geeignet sein können, um eine gute Trennung zwischen Lungentumorpatienten und Kontrollen zu gewährleisten, was auch durch die guten Klassifikationsresultate bestätigt wird.

Mit den voran diskutierten serologischen Spotassays wurde gezeigt, dass es möglich ist, anhand eines Seroreaktivitätsprofils Plattenepithelkarzinompatienten von gesunden Blutspendern bzw. Patienten mit nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen mit hoher Genauigkeit zu unterscheiden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Differenzierung des Reaktivitätsprofils der Seren von Patienten mit niedrig-gradigen Plattenepithelkarzinomen von dem Profil der Seren gesunder Blutspender mit hoher Genauigkeit möglich ist. Da die Durchführung des serologischen Spotassays relativ aufwendig ist und daher kein Hochdurchsatz-Screening erlaubt, wurde als zweiter Versuchsansatz eine andere Methode gewählt, die die Untersuchung einer großen Zahl von Antigenen und Seren vereinfacht. Um das bestmögliche Set an Tumor-spezifischen immunogenen Antigenen zu identifizieren, wurde deshalb das Repertoire an potentiellen Antigenen durch die Verwendung einer komplexen, mehr als 38000 Klone umfassenden cDNA-Bibliothek um ein Vielfaches erweitert. Durch die Durchführung eines primären Screenings konnten vorab 36189 dieser mehr als 38000 Klone ausgeschlossen werden, da diese mit verschiedenen, im Primärscreening getesteten Seren keine Immunogenität aufwiesen. Die restlichen 1827 Klone wurden auf speziell für uns zusammengestellte Proteinmacroarrays in Duplikaten gespottet. Diese umfangreichen Proteinmacroarrays wurden zudem mit einer neu entwickelten automatischen Bildauswertesoftware ausgewertet, die eine objektive Auswertung der Proteinmacroarrays ermöglicht. Außerdem erhält man durch diese Auswerte-Methode nicht mehr nur binäre Daten, d.h. positive oder negative Antigenreaktion, sondern man erhält Intensitätswerte für jedes Antigen mit denen man verschiedenste Berechnungen durchführen kann. Das Screening der serologischen Spotassays beschränkte sich auf die Untersuchung von Seren von Plattenepithelkarzinompatienten. Mit den Proteinmacroarrays wurden dagegen 29 Seren von Patienten mit NSCLC (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, großzelligem Lungenkarzinom) und 18 Seren von Patienten mit SCLC untersucht. Zusätzlich dienten als Kontrollen 60 Seren gesunder Probanden und 23 Seren von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen (COPD bzw. Emphysem und Pneumonie). Insgesamt wurden elf verschiedene Klassifikationsszenarien berechnet, von denen im Folgenden nur eine Auswahl der wichtigsten Klassifikationen diskutiert wird. Das beste Klassifikationsresultat wurde, wie auch bei den Spotassays, mit dem allgemeinen Vergleich Lungentumorseren versus Normalseren erreicht. Die Sensitivität betrug hier 99,91%, die Spezifität 96,50% und die Genauigkeit 98%. Hier konnte im Vergleich zu den Spotassays durch die Verwendung eines größeren Antigenrepertoires eine deutliche Steigerung der Sensitivität und Spezifität erzielt

werden. Auch zu den bereits erwähnten Studien von Chapman et al., Zhong et al. und Zhang et al. wurde hier ein deutlich besseres Klassifikationsresultat erreicht [47, 59, 140]. Auch die Klassifikation der Seren von Patienten mit Lungentumoren im klinischen Stadium I A und I B versus Normalseren erreichte mit einer Genauigkeit von 93,41% (98,18% Spezifität, 80,41% Sensitivität) ein besseres Ergebnis, als es mit den serologischen Spotassays möglich war. Tumoren im klinischen Stadium I konnten allerdings nicht von Tumoren im klinischen Stadium II, III und IV getrennt werden. Im Gegensatz dazu lieferte die Trennung Lungentumor Stadium II, III, IV versus Normal wiederum gute Ergebnisse, d.h. eine Genauigkeit von 96,89% (99,25% Spezifität, 90,46% Sensitivität). Das bedeutet, dass mit der hier verwendeten Methode keine Stadientrennung möglich ist, sie jedoch gut geeignet ist, um niedrig-gradige Lungentumoren zu detektieren. Eine Trennung der NSCLC von den SCLC wäre für diverse Therapieansätze von Vorteil, da sich die Therapien dieser beiden Gruppen grundlegend unterscheiden. Die Klassifikation mit den 29 getesteten Seren der Patienten mit NSCLC und den 18 Seren von Patienten mit SCLC erreichte allerdings nur eine Genauigkeit von 67,00% bei einer Sensitivität von 57,45% und einer Spezifität von 72,93%. Die Trennungen der NSCLC bzw. SCLC von Gesunden erzielte hingegen bessere Ergebnisse mit Genauigkeiten über 95%. Wie bereits erwähnt ist es wichtig als zusätzliche Kontrollen zu den Normalseren, auch Seren von Patienten zu untersuchen, die an nicht-tumorösen Bronchialerkrankungen leiden. Dadurch kann ermittelt werden, ob das Seroreaktivitätsprofil durch evtl. vorhandene Komorbiditäten beim Lungentumorpatienten beeinflusst wird. Insgesamt wurden 23 Seren von Patienten mit den häufigsten Bronchialerkrankungen (COPD bzw. Emphysem und Pneumonie) in folgenden Klassifikationsszenarien untersucht: Lungentumore versus alle Bronchialerkrankungen, Lungentumore versus COPD/Emphysem, alle Bronchialerkrankungen versus Normal und COPD/Emphysem versus Normal. Bei der Trennung Lungentumore versus alle Bronchialerkrankungen wurde eine Genauigkeit von 72,01% (40,22% Spezifität, 87,57% Sensitivität) errechnet. Da COPD eine der häufigsten Lungenerkrankungen ist, an der die meisten Lungentumorpatienten auch zusätzlich leiden, wurde die Klassifikation Lungentumore versus COPD/Emphysem durchgeführt und dabei eine Genauigkeit von 76,75% bei einer Spezifität von 34,35% und einer Sensitivität von 92,08% erreicht. Das bedeutet, dass 65,65% der Tumoren nicht als solche erkannt wurden, wenngleich auch nur 7,92% der COPD-Patienten fälschlicherweise als Tumorpatienten eingestuft wurden. Die Genauigkeit der Klassifikation ist somit etwas schlechter als bei den serologischen Spotassays. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch bestimmte Lungenerkrankungen das Seroreaktivitätsprofil beeinflusst wird. Der Vergleich COPD/Emphysem versus Normal

ergab mit einer Genauigkeit der Vorhersage von 97,60% (99,88% Spezifität, 89,59% Sensitivität) ein sehr gutes Ergebnis. Verglichen mit allen Kontrollseren (COPD/Emphysem, Pneumonie und Normal) konnten die Lungentumorseren mit einer relativ guten Genauigkeit von 80,96% klassifiziert werden (84,08% Spezifität, 75,45% Sensitivität).

Weil jedes Antigen einen anderen Anteil an der Trennungsschärfe hat, d.h. ein Antigen „informativer“ ist als ein anderes, wurde die AUC für jedes Antigen und jede betrachtete Trennungsaufgabe ermittelt. Die AUC ist ein Maß für die Wertigkeit eines Antigens für eine bestimmte Klassifikation. Da die AUC Werte von 0-1 annehmen kann und Antigene mit einer AUC von 0,5 wertlos für eine Trennung sind, ist ein Antigen „informativer“, je mehr seine AUC von 0,5 abweicht. Insgesamt wurden bei dem Vergleich Lungentumor versus Normal 18 Antigene mit einer AUC kleiner 0,3 und 17 Antigene mit einer AUC größer 0,7 gefunden. Bei der Klassifikation Lungentumor versus COPD hatten insgesamt 17 Antigene eine AUC unter 0,3 und 26 Antigene eine AUC über 0,7. In beiden Klassifikationen gab es bei den „informativen“ Antigenen nur eine Überlappung von einem „out of frame“-Klon (MPMGp800F05589), der in beiden Klassifikationen eine AUC von 0,27 erreichte. Bei der Klassifikation Lungentumor Stadium I versus Normal wurden insgesamt 86 „informativ“ Antigene gefunden, davon 40 Antigene mit einer AUC unter 0,3 und 46 Antigene mit einer AUC über 0,7. Eine Überlappung der Klassifikationen Lungentumor versus Normal und Lungentumor Stadium I versus Normal wurde bei 27 Klonen gefunden. Zur Klassifikation Lungentumor versus COPD wurde nur eine Überlappung bei dem Klon (MPMGp800F05589), der auch bei Lungentumor versus Normal „informativ“ war, gefunden. Für die „informativen“ „in frame“-Antigene einzelner Klassifikationen wurde mittels Datenbankanalyse untersucht, welche Antigene in Tumoren oder Autoimmunerkrankungen bereits als immunogen beschrieben wurden. Von den 35 „informativen“ Antigenen der Klassifikation Lungentumor versus Normal waren zwölf Antigene „in frame“. Die Datenbankanalyse ergab, dass drei dieser zwölf Antigene bereits als immunogen beschrieben wurden. Zu diesen drei Antigenen zählen MAZ, CENPB und MBTPS1. Für das Antigen MAZ (MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)) wurden bereits fünf Klone, u.a. mit Seren von Patienten mit Kolonkarzinom, identifiziert und in der CIDB niedergelegt. Außerdem fand man dieses Antigen bei SEREX-Analysen einer Bank aus Gewebe eines Plattenepithelkarzinoms der Zunge. Es wird vermutet, dass MAZ als Transkriptionsfaktor fungiert, der für die Tumor-spezifische Expression des Proteins PPARgamma1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1), das in Brusttumoren überexprimiert wird, verantwortlich ist [149]. In der Literatur wurde MAZ als immunogen in

chronisch-lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL) beschrieben und wird auch in 90-100% der Patienten exprimiert [150]. Daneben wurde MAZ auch als Antigen in Morbus Hodgkin und paraneoplastischer zerebraler Dysfunktion, sowie akuter myeloider Leukämie beschrieben [151, 152]. CENPB ist ein DNA-bindendes Protein, das eine bestimmte Sequenz (CENP-B box) in der Alpha-Satelliten-DNA der Zentromere erkennt und bindet. Für CENPB sind fünf Klone in der CIDB niedergelegt, die alle mit Seren von Melanompatienten gefunden wurden. Außerdem wurde CENPB auch in SCLC als immunogen beschrieben [153]. Bei Patienten mit Anti-Zentromer-Antikörpern, wie z.B. Patienten mit der Autoimmunerkrankung Sklerodermie (CREST-Syndrom), ist CENPB das Hauptziel [154]. Das Gen MBTPS1 (membrane bound transcription factor protease, site 1) kodiert für eine Serinprotease, die im Cholesterinhaushalt eine Rolle spielt. Für MBTPS1 wurde bisher nur ein immunogener Klon in der CIDB niedergelegt. Dieser wurde in einem SEREX-Screening einer cDNA-Bank aus Magenkrebsgewebe mit dem autologen Serum gefunden. Von den 43 „informativen“ Antigenen, die bei der Klassifikation Lungentumor versus COPD gefunden wurden, waren nur acht Antigene „in frame“. Drei dieser Antigene wurden bereits in der CIDB niedergelegt. Dabei handelt es sich um RPS2, MCM3 und ATXN3. Für RPS2 sind bisher zwei Klone mit Seren von Patienten mit Prostatakarzinom und Non-Hodgkin-Lymphom identifiziert worden. Eine erhöhte Expression des ribosomalen Proteins RPS2 korreliert mit einer erhöhten Zellproliferation [155]. Für MCM3 wurden bisher drei verschiedene Klone mit Seren von Patienten mit Kolon- und Prostatakarzinom gefunden und in der CIDB niedergelegt. Außerdem wird vermutet, dass MCM3 ein Gliom-assoziiertes Antigen mit großem prognostischen und therapeutischen Potential ist [156]. MCM3 wird in verschiedenen Tumorarten, wie z.B. Leukämie, Lymphom, Cervixkarzinom, Kolonkarzinom, Magenkrebs, Nierenkrebs, Brustkrebs, malignen Melanomen aber auch Bronchialkarzinomen überexprimiert [157]. Zudem wird MCM3 als potentieller Marker diskutiert, um benigne von malignen melanozytischen Läsionen zu unterscheiden [158]. Für ATXN3 wurde bislang nur ein Klon mit Serum eines Patienten mit Nierenkrebs gefunden. ATXN3 wird durch Caspasen gespalten, wodurch verkürzte Polyglutamin-enhaltende Proteine entstehen. Dadurch wird ihm in neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle zugeschrieben [159]. Bei Autoimmunreaktionen oder Krebs wird eine deregulierte Spaltung von Proteinen durch Caspasen ebenfalls als mögliche Ursache diskutiert [160, 161].

Wie beim serologischen Spotassay wurden auch beim Proteinmacroarray-Screening die Frequenzen der einzelnen Antigene in den verschiedenen Serumgruppen berechnet. Dabei wird ebenfalls deutlich, dass mit steigender Frequenz die Anzahl der detektierten Antigene

abnimmt. Beispielsweise detektierten 10-20% der Lungentumorseren 369 Antigene, aber nur insgesamt sieben Antigene wurden von mehr als 80% der Lungentumorseren detektiert. Hierzu zählen die beiden „in frame“-Antigene UFC1 und KIF18B. Für beide Antigene ist bisher noch keine genaue Funktion beschrieben. Die verbleibenden fünf Antigene waren „out of frame“. Ähnlich verhält es sich auch bei allen anderen Serumgruppen. Fünf „out of frame“-Antigene wurden von mehr als 80% der Normalseren detektiert und zwölf Klone von mehr als 80% der COPD-Seren. Von den zwölf COPD-Klonen waren nur drei „in frame“, wobei es sich bei den cDNA-Inserts von zwei Klonen um Sequenzen desselben Gens (UFC1) handelt, die zu 97% identisch sind. Der dritte Klon enthält eine Sequenz des Gens KIF18B. Die „in frame“-Antigene KIF18B und UFC1 reagierten also sowohl mit mehr als 80% der Lungentumorseren als auch mit mehr als 80% der COPD-Seren. Desweiteren gab es einen Überlapp bei vier „out of frame“-Antigenen. Diese vier Antigene reagierten jeweils mit mehr als 80% der Lungentumorseren, der Normalseren und der COPD-Seren. Die o.g. Antigene haben deshalb auch keinen hohen Informationsgehalt. Dies wird auch an den schlechten AUC-Werten deutlich, die bei der Klassifikation Lungentumor versus COPD für alle o.g. Antigene um 0,5 liegen. Antigene, die in so hohen Frequenzen mit verschiedenen Serumgruppen reagieren, sind als einzelne Biomarker wegen ihrer geringen Spezifität also eher unbrauchbar. Keiner der o.g. „in frame“-Antigene wurde bisher in der CIDB niedergelegt.

Mit den Proteinmacroarrays wurde ebenfalls überprüft, ob eine Tumor-assoziierte Autoimmunreaktion auch über einen längeren Zeitraum, insbesondere nach der Tumorsektion, stabil bleibt. Dazu wurden Seren von 7 Patienten untersucht, die sich zwischen 1998 und 2000 einer Lungentumorsektion unterzogen haben und bis 2008 Rezidiv-frei überlebten. Bei allen Patienten wurde der Tumor potentiell kurativ entfernt und es erfolgte keine Radio- oder Chemotherapie, die evtl. Einfluss auf das Seroreaktivitätsprofil gehabt haben könnte. Die erste Blutentnahme erfolgte zwischen 1998-2000 präoperativ, also vor der Tumorsektion. Den selben Patienten wurde dann 2008 erneut Blut entnommen. Das Seroreaktivitätsprofil jedes Patienten wurde dann mit Hilfe der Proteinmacroarrays analysiert. Zunächst wurde die Korrelation aller 14^2 möglichen Serumkombinationen für alle Antigene berechnet. Dabei wurde deutlich, dass die Seren derselben Person (X (erste Blutentnahme, Serumgruppe A) und X+7 (zweite Blutentnahme, Serumgruppe B)) oftmals am besten korrelierten. Beispielsweise war die Korrelation beider Proben eines Plattenepithelkarzinompatienten (Serum 5 und 12, Tabelle 15) mit 0,805 am höchsten. Die Korrelationskoeffizienten zweier Adenokarzinompatienten lagen bei 0,708 (Serum 10,

Tabelle 15) und bei 0,673 (Serum 4 und 11, Tabelle 15). Bei den Patienten mit adenosquamösem Karzinom (Serum 1 und 8, Tabelle 15), Adenokarzinom (Serum 2 und 9, Tabelle 15) und Plattenepithelkarzinom (Serum 7 und 14, Tabelle 15) war die Korrelation niedriger und lag bei 0,295, 0,489 und 0,558. Einzelne Seren dieser drei letztgenannten Patienten korrelierten teilweise stärker mit Seren anderer Patienten. Beispielsweise war die Korrelation von Serum 1 (erste Blutentnahme, adenosquamöses Karzinom) mit Serum 10 (zweite Blutentnahme, Adenokarzinom) am höchsten (0,333). Serum 8 (zweite Blutentnahme, adenosquamöses Karzinom) zeigte dagegen mit Serum 4 (erste Blutentnahme, Adenokarzinom) eine bessere Korrelation (0,362). Bei Serum 2 (erste Blutentnahme, Adenokarzinom) war der Korrelationskoeffizient von 0,492 mit Serum 8 (zweite Blutentnahme, adenosquamöses Karzinom) am höchsten. Für Serum 9 (zweite Blutentnahme, Adenokarzinom) gab es keine bessere Korrelation als mit Serum 2 (erste Blutentnahme, Adenokarzinom). Serum 7 (erste Blutentnahme, Plattenepithelkarzinom) korrelierte am stärksten mit Serum 12 (B5) (zweite Blutentnahme, Plattenepithelkarzinom). Serum 14 (zweite Blutentnahme, Plattenepithelkarzinom) zeigte die stärkste Korrelation mit Serum 7 (erste Blutentnahme, Plattenepithelkarzinom). Deutlich wird hierbei, dass die Korrelationen zwischen den sieben präoperativ gewonnenen Seren oder den sieben postoperativ gewonnenen Seren untereinander nicht sehr hoch sind, sondern die Korrelation für Seren aus Gruppe A mit Seren aus Gruppe B meist höher ist.

Darauf aufbauend wurde eine Clusteranalyse der 49 Antigene, die in ihren Intensitätswerten unter allen analysierten Serumproben 1 bis 14 am stärksten variierten, durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Seren zusammen clusterten, die vom selben Patienten stammen. Das bedeutet, dass sich die gegen diese 49 untersuchten Antigene gemessene Immunantwort in den beiden Seren eines Patienten ähnlicher ist als unter verschiedenen Patienten. Derzeit gibt es nur wenige Studien, die den Verlauf einer Immunreaktion bei Tumorpatienten über einen längeren Zeitraum untersuchen. Beispielsweise wurde der Verlauf der Immunreaktion gegen p53 bei Patienten mit Mesotheliomen beobachtet [162]. Die durchschnittliche Überlebenszeit eines Mesotheliompatienten liegt nach Diagnosestellung bei nur 9 Monaten. Die Immunreaktion gegen p53 wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten bis 2,5 Jahren beobachtet und stellte sich dabei als relativ stabil heraus. Eine Korrelation zwischen Antikörpertiter und Überlebenszeit wurde aber nicht festgestellt. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde eine Verlaufsstudie durchgeführt, bei der der Antikörpertiter gegen das Autoantigen GLEA2 bei Gliompatienten vor Tumorresektion, nach Resektion, sowie vor, während und nach Radiotherapie untersucht wurde [163]. Autoantikörper gegen GLEA2

waren während des gesamten Verlaufs meßbar, wobei nach der Radiotherapie ein leichter Anstieg im Antikörper-Titer zu verzeichnen war. In den beiden oben genannten Studien wurde allerdings nur die Immunantwort gegen Tumor-assoziierte Antigene untersucht. In vorliegender Studie wurden aber die Antigene ausgewählt, die die höchste Varianz in ihrer Seroreaktivität aufwiesen. Es handelt sich hierbei also um eine rein mathematische Auswahl der Antigene, die zudem keinerlei Nutzen für die Klassifikation Lungentumor versus Normal zeigten, da alle diese Antigene hier einen geringen Informationsgehalt mit AUC-Werten um 0,5 hatten. Diese Untersuchung hat unabhängig von der Tumorrelevanz der Antigene gezeigt, dass die intraindividuellen Schwankungen im Seroreaktivitätsprofil im Vergleich zu den interindividuellen Schwankungen sehr gering sind. Die Immunreaktionen blieben selbst nach 8-10 Jahren noch meßbar, so dass es theoretisch möglich wäre, den unterschiedlichen Personen ihr persönliches Seroreaktivitätsprofil zuzuordnen. In folgenden Studien muss nun gezeigt werden, ob Tumor-spezifische Unterschiede in der Immunreaktion über einen längeren Zeitraum festzustellen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei voneinander völlig unabhängigen Methoden (serologische Spotassays und Proteinmacroarrays) gezeigt, dass spezifische Seroreaktivitätsmuster sehr gut geeignet sind, um Lungentumorpatienten von Gesunden, aber auch von Patienten mit häufig auftretenden anderen Bronchialerkrankungen (wie z.B. COPD, Pneumonie), zu trennen. Im Speziellen die Trennung der niedrig-gradigen Tumoren von den gesunden Blutspendern bestätigt, dass selbst Tumoren in frühesten Stadien eine Immunreaktion auslösen, bzw. die Bildung von Autoantikörpern hervorrufen. Außerdem wurde gezeigt, dass sich durch die Erhöhung der Anzahl potentieller Antigene und die Etablierung einer Computer-basierten Auswertemethode die Vorhersagegenauigkeiten zusätzlich steigern lassen. Desweiteren wurde erstmals an einer Gruppe von sieben Lungentumorpatienten gezeigt, dass das Seroreaktivitätsprofil selbst 8-10 Jahre nach einer kurativen Tumorresektion noch meßbar bleibt. Speziell zusammengestellte Sets von Tumor-assoziierten Autoantigenen erfüllen somit nachweislich alle Eigenschaften, die ein idealer Biomarker mit sich bringen muss.

Ein weiterer molekularbiologischer Ansatzpunkt zur Identifizierung neuer potentieller Biomarker zur Früherkennung von Tumoren stellt neben dem Proteom bzw. Immunom das Genom dar. Die Untersuchungen erfolgen entweder an zellulären oder an frei im Blut zirkulierenden Nukleinsäuren. Expressionsanalysen auf RNA-Ebene stellen hierbei eine häufige molekularbiologische Untersuchungsmethode in der Tumorforschung dar. Hier

gewinnen immer mehr Untersuchungen zur Expression von miRNAs an Bedeutung, da sich die miRNAs im Vergleich zur mRNA durch eine hohe Stabilität gegenüber RNA-abbauenden Enzymen (RNAsen) auszeichnen. Die miRNAs sind eine hoch konservierte Familie nicht transkribierter RNAs, einer Länge von 17-25 Nukleotiden, die auf verschiedene Art und Weise als physiologische Regulatoren der Genexpression fungieren. Störungen dieser regulatorischen Funktionen, z.B. durch Über- oder Unterexpression der miRNA-Gene, können bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen [84, 89, 92, 164]. Diese Eigenschaften machen die miRNAs zu einem interessanten Untersuchungsobjekt zur Identifizierung neuer Tumor-spezifischer Biomarker [165-167]. Vor ca. sieben Jahren wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen der miRNA-Expression und der Tumorigenese hergestellt [87]. Seither sind zahlreiche miRNA-Expressionsstudien zu verschiedenen Tumorarten erschienen [89, 91, 165, 168-170]. In verschiedenen Studien konnten sogar anhand des miRNA-Expressionsprofils metastatische Tumore unbekannter Herkunft klassifiziert werden [91, 165]. Auch in Bronchialkarzinomen wurde die miRNA-Expression bereits mehrfach untersucht [83, 99-101, 103, 171]. Hierbei wurde in Lungentumorgewebe beispielsweise ein Set von fünf miRNAs identifiziert, das eine Vorhersage über die Überlebenszeit oder mögliche Rezidivbildung erlaubt [101]. Oben erwähnte Studien beruhen alle auf der Analyse der mRNA-Expression in Gewebe. Bisher zeigten aber nur wenige Studien, dass sich im Blut von Tumorpatienten und Gesunden ebenfalls Unterschiede im miRNA-Expressionsprofil nachweisen lassen [104, 107, 108, 119, 167, 172]. Nur eine dieser Studien untersuchte die miRNA-Expression im Blut von Bronchialkarzinompatienten [104]. Oben genannte Studien legten ihren Schwerpunkt dabei auf die Analyse der frei im Serum zirkulierenden miRNA [105, 119], bzw. auf die miRNA, die von den Körperzellen in Mikrovesikeln verpackt ins Blut abgegeben wurde [106, 108]. Die Isolation ausreichender Mengen miRNA aus Serum bzw. aus Mikrovesikeln erfordert aber die Entnahme größerer Mengen Blut oder eine Amplifikation der miRNA. Eine Amplifikation der miRNA stellt wiederum eine Quelle für mögliche Fehler dar. Die Isolation der miRNA in den zellulären Blutbestandteilen, d.h. den Leukozyten und Thrombozyten, liefert dagegen bei geringen Mengen Blut, für verschiedene Applikationen ausreichende Mengen miRNA. Bisher wurde aber nur in der von Chen et al. [104] durchgeführten Studie miRNA in den zellulären Bestandteilen des Blutes untersucht. Schwerpunkt dieser Studie war aber die Identifikation von miRNAs in Serum mittels Solexa-Sequenzierung und der Vergleich mit den in Blutzellen detektierten miRNAs. In vorliegender Studie wurde eine umfangreichere Microarrayanalyse aller bisher bekannten 866 humanen miRNAs und miRNA*-Sequenzen (Sanger miRBase, Version 12.0) durchgeführt. Dabei

wurden die miRNA-Expressionsprofile in Blutzellen von Lungentumorpatienten und Gesunden verglichen. Insgesamt 27 miRNAs zeigten eine signifikante Deregulation in den Blutzellen der Tumorpatienten, verglichen mit den gesunden Blutspendern. Von diesen 27 deregulierten miRNAs waren 51,8% der miRNAs in Blutzellen von Lungentumorpatienten herunterreguliert. Die am signifikantesten deregulierte miRNA war die in den Blutzellen der Lungentumorpatienten herunterregulierte miRNA hsa-miR-126 (p-Wert $3,43 \cdot 10^{-5}$). Eine Herunterregulation wurde für hsa-miR-126 bereits in Lungentumorgewebe beobachtet [99]. Funktionelle Studien zu hsa-miR126 identifizierten diese miRNA als Regulator der endothelialen Expression des Proteins vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), welches ein interzelluläres Adhäsionsmolekül ist, das von Endothelzellen exprimiert wird [173]. Da hsa-miR-126 außerdem nachweislich als Inhibitor des invasiven Wachstums einer NSCLC Zelllinie fungiert, könnte die Herunterregulation ein Mechanismus sein, durch den die Tumorzelle versucht, dieser Inhibierung zu entgehen [100]. Weitere signifikant deregulierte miRNAs waren hsa-let-7d (p-Wert 0,0027), hsa-let-7i (p-Wert 0,0027) und hsa-miR-98 (p-Wert 0,0087). Aber auch andere Mitglieder der let-7-Familie (hsa-let-7c, hsa-let-7e, hsa-let-7f, hsa-let-7g und hsa-let-7a) waren signifikant dereguliert. Alle oben genannten let-7 miRNAs waren in den Blutzellen der untersuchten Lungentumorpatienten herunterreguliert. Die Mitglieder der let-7-Familie waren die ersten miRNAs, die als dereguliert in Lungentumoren beschrieben wurden [174]. Diese Beobachtungen wurden von mehreren darauf folgenden Studien belegt [175-179]. Auch in der Studie von Chen et al. [104] waren die let-7 Familienmitglieder has-let-7a, has-let-7d, has-let-7f, has-let-7g, and has-let-7i in Blutzellen der Lungentumorpatienten herunterreguliert. Takamizawa et al. zeigten eine starke Korrelation zwischen der Herunterregulation der let-7 miRNAs in Lungentumoren und einer schlechten Prognose [175]. Dies könnte u.a. auch daran liegen, dass die Mitglieder der let-7 Familie normalerweise das Onkogen RAS negativ regulieren, bei verminderter Expression ihrer regulatorischen Funktion aber u.U. nicht mehr in ausreichendem Maße nachkommen können [174].

Eine weitere signifikant deregulierte miRNA war hsa-miR-22 (p-Wert 0,0087). Diese miRNA war in den Blutzellen der Lungentumorpatienten im Vergleich zu den Gesunden hochreguliert. Auch Chen et al. machten dieselben Beobachtungen in ihrer Solexa-Studie [104]. Die miRNA hsa-miR-19a zeigte in vorliegender Studie eine stärkere Expression in Blutzellen von Lungentumorpatienten und wurde zuvor auch schon als überexprimiert in Lungentumorgewebe beschrieben [180, 181]. Die miRNA hsa-miR-20a war dagegen in vorliegender Arbeit herunterreguliert in Blutzellen von Lungentumorpatienten. In einer

vorangegangenen Studie wurde aber gezeigt, dass hsa-miR-20a in Lungentumorgewebe überexprimiert wird [180, 181]. Diese Überexpression wurde allerdings bei einer SCLC-Zelllinie nachgewiesen. Bei den in vorliegender Arbeit untersuchten Lungentumoren handelte es sich aber ausnahmslos um NSCLC. Zusammenfassend betrachtet liegt zwischen den vorangegangenen Studien zur miRNA-Expression in Lungentumoren und unsere miRNA-Expressionsstudie in Blutzellen von Lungentumorpatienten im Großen und Ganzen eine hohe Übereinstimmung vor [91, 99, 175-182]. Auch verglichen mit Studien zur miRNA-Expression in Tumoren anderer Organe konnten Übereinstimmungen gefunden werden. Beispielsweise wurden für einige in Blutzellen von Lungentumorpatienten deregulierte miRNAs auch eine deregulierte Expression in verschiedenen anderen Tumorgeweben detektiert, wie z.B. hsa-miR-346 in Magenkrebs, hsa-miR-145 in Blasenkrebs und hsa-miR-19a in Nierenkrebs und B-cell Leukämie [183-187]. Daneben wurden aber auch miRNAs als dereguliert identifiziert, die bisher noch mit keiner anderen Tumorart oder sonstigen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden. Hierbei sind beispielhaft die miRNAs hsa-miR-423-5p (p-Wert 0,00097), hsa-miR-140-3p (p-Wert 0,0246) oder hsa-miR-339-5p (p-Wert 0,0256) zu nennen, die alle in den Blutzellen der Lungentumorpatienten signifikant hochreguliert waren. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse mittels Microarray wurden für einige ausgewählte miRNAs zusätzlich durch die quantitative Real-Time PCR überprüft und bestätigt.

Neben den Einzelbetrachtungen verschiedener miRNAs wurde auch das gesamte miRNA-Expressionsprofil verglichen. In der Arbeit von Chen et al. konnte bereits gezeigt werden, dass sich die miRNA-Expressionsprofile in Serum von Lungentumorpatienten und Gesunden stark unterscheiden (Korrelationskoeffizient 0,2429). Das miRNA-Expressionsprofil von Serum und Blutzellen beim gesunden Blutspender korrelierte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9205 dagegen stark. Die Korrelation zwischen dem miRNA-Expressionsprofil in Serum und Blutzellen bei Lungentumorpatienten fiel dagegen deutlich niedriger aus (Korrelationskoeffizient 0,4492) [104]. Die Korrelation zwischen der miRNA-Expression in Blutzellen von Lungentumorpatienten und Gesunden wurde in der Studie von Chen et al. jedoch nicht berechnet. Dennoch deuten o.g. Ergebnisse darauf hin, dass es deutliche Unterschiede auch in der miRNA-Expression in Blutzellen geben muss. In vorliegender Arbeit war es durch die Analyse der miRNA-Expression in Blutzellen mittels Microarrays möglich, diese Unterschiede zu zeigen. Außerdem konnten die Lungentumorpatienten von den Gesunden mit einer hohen Genauigkeit (95,4%) unterschieden werden. Hierbei wurden eine Sensitivität von 92% und eine Spezifität von 87% erreicht. Somit konnte erstmals ein Beweis für das diagnostische Potential der Analyse der miRNA-

Expressionsprofile in Blutzellen von Lungentumorpatienten erbracht werden. Natürlich muss diese hohe Vorhersagegenauigkeit noch an größeren Patientenkollektiven in prospektiven Studien überprüft werden, um die Analyse der miRNA-Expressionsprofile in Blutzellen von Lungentumorpatienten als potentiellen, minimal-invasiven diagnostischen Test zu bestätigen.

Für das Bronchialkarzinom als weltweit häufigste krebsbedingte Todesursache gibt es derzeit keine geeigneten Screeningtests, die eine Frühdiagnose erlauben. Die bisher durchgeführten Studien zu CT-Screenings bei Hochrisikopatienten erbrachten keinen Überlebensbenefit für die Patienten. Außerdem wurde gezeigt, dass eine große Anzahl falsch-positiver CT-Scans zu unnötigen Biopsien führte [19, 125]. Desweiteren sollte die Strahlenbelastung, die durch ein jährliches CT entsteht nicht außer Acht gelassen werden. Vorliegende Studie befasste sich daher mit der Identifizierung minimal-invasiv detektierbarer Biomarker für das Bronchialkarzinom. Fasst man die hier erbrachten Ergebnisse zusammen, so wurde mit zwei unterschiedlichen molekularbiologischen Ansatzpunkten, basierend auf der Untersuchung verschiedener Blutbestandteile (Antikörper im Serum und miRNA in den zellulären Bestandteilen des Blutes), eine hohe Genauigkeit bei der Trennung der Lungentumorpatienten von den gesunden Kontrollprobanden erreicht. Mittels Immunoscreening wurden nicht nur die Bronchialkarzinompatienten von den Gesunden mit einer Genauigkeit von über 90% getrennt, sondern auch eine Trennung der Lungentumorpatienten von Patienten mit anderen Bronchialerkrankungen mit hoher Genauigkeit erreicht. Vor allem aber die Trennung der niedrig-gradigen Tumoren von den Gesunden zeigt, dass die Analyse der Seroreaktivitätsprofile ein hohes diagnostisches Potential birgt. Auch die Klassifikation der Lungentumorpatienten und der Gesunden, beruhend auf der Analyse der miRNA-Expressionsprofile mit einer hochreproduzierbaren Microarray-Plattform, erzielte eine hohe Genauigkeit von 95,4%. Da die hier durchgeführten Analysen allerdings nur an Patienten mit bereits diagnostiziertem Lungentumor durchgeführt wurden, müssen diese Ergebnisse nun in einem nächsten Schritt in prospektiven Studien überprüft werden. Dennoch zeichnet sich ab, dass Blut einen hohen Informationsgehalt birgt, der für die Diagnose, Prognose oder die Therapieüberwachung verschiedenster Krankheiten neue Wege öffnen könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Etablierung komplexer Autoantikörper- und miRNA-Expressionsprofile in peripherem Blut.

Mit Hilfe der Analyse von über 1800 Autoantigenen wurde die Genauigkeit für verschiedene vergleichende Klassifikationen bestimmt. Lungentumorpatienten konnten von gesunden Probanden mit einer Genauigkeit von 98% getrennt werden. Patienten mit niedrig-gradigen Lungentumoren wurden mit einer Genauigkeit von 93,41% von Gesunden getrennt. Eine Trennung von Patienten mit NSCLC bzw. SCLC von Gesunden erzielte Genauigkeiten über 95%. Die Trennung der Lungentumorpatienten von Patienten mit COPD erreichte eine Genauigkeit von 76,75%. COPD-Patienten wurden von Gesunden mit 97,60% Genauigkeit getrennt. Entsprechende Unterscheidungen bei diesen Erkrankungen waren mit anderen Biomarkern bisher nicht mit vergleichbaren Ergebnissen möglich.

Durch die Expressionsanalyse von über 800 miRNAs konnten Lungentumorpatienten mit einer Genauigkeit von 95,4% von Gesunden unterschieden werden. Insgesamt wurden in Blutzellen von Lungentumorpatienten 27 signifikant deregulierte miRNAs identifiziert. Mit vorliegender Studie konnten erstmals solide Tumoren anhand eines miRNA-Expressionsprofils in Blutzellen klassifiziert werden.

In vorliegender Arbeit konnten komplexe Autoantikörper- und miRNA-Expressionsprofile in peripherem Blut von Lungentumorpatienten etabliert werden. Mit diesen Profilen wurden vergleichende Klassifikationen mit hoher Genauigkeit erreicht.

5. SUMMARY

The presented study aimed at the establishment of complex autoantibody and miRNA expression profiles in peripheral blood.

With the analysis of more than 1800 autoantigens, the accuracy of several classification tasks was determined. Lung cancer patients were differentiated from healthy subjects with an accuracy of 98%. Patients with low-grade lung cancer were differentiated from healthy subjects with an accuracy of 93.41%. The differentiation of patients with NSCLC or SCLC from healthy subjects reached an accuracy of more than 95%. The differentiation of lung cancer patients from patients with COPD reached an accuracy of 76.75%. COPD patients were differentiated from healthy subjects with an accuracy of 97.60%.

Until now, corresponding classifications with these diseases were not possible with comparable results with other biomarkers.

With the expression analysis of more than 800 miRNAs lung cancer patients were differentiated from healthy subjects with an accuracy of 95.4%. A total of 27 significantly deregulated miRNAs were identified. With the presented study, it was possible for the first time to classify solid cancer based on the miRNA expression analysis in blood cells.

In the presented work, we were able to establish complex autoantibody and miRNA expression profiles in peripheral blood of lung cancer patients. Using these profiles we were able to perform several classifications with high accuracy.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. GEKID, G.d.e.K.i.D.e.V., *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends 2008*.
2. Ferlay, J., et al., *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. *Ann Oncol*, 2007. **18**(3): p. 581-92.
3. ACS, A.C.S. 2006; Available from: <http://www.cancer.org/downloads/CRI/6976.00.pdf>.
4. Mountain, C.F., *Revisions in the International System for Staging Lung Cancer*. *Chest*, 1997. **111**(6): p. 1710-7.
5. Scott, W.J., et al., *Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)*. *Chest*, 2007. **132**(3 Suppl): p. 234S-242S.
6. Pfeifer, G.P., et al., *Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers*. *Oncogene*, 2002. **21**(48): p. 7435-51.
7. Beasley, M.B., et al., *The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung*. *Hum Pathol*, 2003. **34**(2): p. 136-42.
8. Brambilla, E., et al., *Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance*. *J Pathol*, 1999. **188**(4): p. 351-60.
9. Stein, C.K., et al., *Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002. **34**(3): p. 333-40.
10. Barnes, L.D., et al., *Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5''-P1,P3-triphosphate hydrolase*. *Biochemistry*, 1996. **35**(36): p. 11529-35.
11. Pekarsky, Y., et al., *Fhit is a physiological target of the protein kinase Src*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(11): p. 3775-9.
12. Shivakumar, L., et al., *The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(12): p. 4309-18.
13. Fenton, S.L., et al., *Identification of the E1A-regulated transcription factor p120 E4F as an interacting partner of the RASSF1A candidate tumor suppressor gene*. *Cancer Res*, 2004. **64**(1): p. 102-7.
14. Brock, M.V., et al., *DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(11): p. 1118-28.
15. Lerman, M.I. and J.D. Minna, *The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium*. *Cancer Res*, 2000. **60**(21): p. 6116-33.
16. Tse, C., et al., *Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line*. *Cancer Res*, 2002. **62**(2): p. 542-6.
17. Hunt, I., et al., *Does lung cancer screening with chest X-ray improve disease-free survival?* *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2006. **5**(4): p. 483-7.
18. Sone, S., et al., *Characteristics of small lung cancers invisible on conventional chest radiography and detected by population based screening using spiral CT*. *Br J Radiol*, 2000. **73**(866): p. 137-45.
19. Sone, S., et al., *Results of three-year mass screening programme for lung cancer using mobile low-dose spiral computed tomography scanner*. *Br J Cancer*, 2001. **84**(1): p. 25-32.
20. Gambhir, S.S., et al., *A tabulated summary of the FDG PET literature*. *J Nucl Med*, 2001. **42**(5 Suppl): p. 1S-93S.

21. Artinian, V. and P.A. Kvale, *Update in screening of lung cancer*. *Respirology*, 2005. **10**(5): p. 558-66.
22. Cassidy, A., et al., *Lung cancer risk prediction: a tool for early detection*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(1): p. 1-6.
23. Hirsch, F.R., et al., *Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(1): p. 5-22.
24. Reich, J.M., *A critical appraisal of overdiagnosis: estimates of its magnitude and implications for lung cancer screening*. *Thorax*, 2008. **63**(4): p. 377-83.
25. Humphrey, L.L., S. Teutsch, and M. Johnson, *Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force*. *Ann Intern Med*, 2004. **140**(9): p. 740-53.
26. Hunt, I., et al., *Does lung cancer screening with low-dose computerised tomography (LDCT) improve disease-free survival?* *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2006. **5**(5): p. 612-5.
27. Carr, J.A. and J.M. Silver, *The false assumption of lung cancer based upon a positive positron emission tomographic scan*. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2006. **5**(4): p. 446-7.
28. Chan, H.P., C. Lewis, and P.S. Thomas, *Exhaled breath analysis: Novel approach for early detection of lung cancer*. *Lung Cancer*, 2009. **63**(2): p. 164-8.
29. Gessner, C., *[Detection of mutations of the K-ras gene in condensed breath of patients with non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) as a possible noninvasive screening method]*. *Pneumologie*, 1998. **52**(7): p. 426-7.
30. Gessner, C., et al., *Factors influencing breath condensate volume*. *Pneumologie*, 2001. **55**(9): p. 414-9.
31. Gessner, C., et al., *Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients*. *Lung Cancer*, 2004. **43**(2): p. 215-22.
32. McCafferty, J.B., et al., *Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations*. *Thorax*, 2004. **59**(8): p. 694-8.
33. Liam, C.K., Y.K. Pang, and S. Poosparajah, *Diagnostic yield of flexible bronchoscopic procedures in lung cancer patients according to tumour location*. *Singapore Med J*, 2007. **48**(7): p. 625-31.
34. Schreiber, G. and D.C. McCrory, *Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence*. *Chest*, 2003. **123**(1 Suppl): p. 115S-128S.
35. Nagrath, S., et al., *Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology*. *Nature*, 2007. **450**(7173): p. 1235-9.
36. Uhr, J.W., *Cancer diagnostics: one-stop shop*. *Nature*, 2007. **450**(7173): p. 1168-9.
37. Swarup, V. and M.R. Rajeswari, *Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(5): p. 795-9.
38. Tong, Y.K. and Y.M. Lo, *Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids*. *Clin Chim Acta*, 2006. **363**(1-2): p. 187-96.
39. Tsang, J.C. and Y.M. Lo, *Circulating nucleic acids in plasma/serum*. *Pathology*, 2007. **39**(2): p. 197-207.
40. Molina, R., et al., *Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations*. *Tumour Biol*, 2005. **26**(6): p. 281-93.
41. Lu, H., V. Goodell, and M.L. Disis, *Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of cancer*. *J Proteome Res*, 2008. **7**(4): p. 1388-94.

42. Zitt, M., et al., *Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative chemoradiation: a potential diagnostic tool for therapy monitoring*. Dis Markers, 2008. **25**(3): p. 159-65.
43. Molina, R., et al., *Prospective evaluation of squamous cell carcinoma and carcinoembryonic antigen as prognostic factors in patients with cervical cancer*. Tumour Biol, 2003. **24**(3): p. 156-64.
44. Lamerz, R. and P. Stieber, [Tumour markers]. Dtsch Med Wochenschr, 2004. **129**(50): p. 2722-30.
45. Greenberg, A.K. and M.S. Lee, *Biomarkers for lung cancer: clinical uses*. Curr Opin Pulm Med, 2007. **13**(4): p. 249-55.
46. Preuss, K.D., et al., *Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms*. Immunol Rev, 2002. **188**: p. 43-50.
47. Chapman, C.J., et al., *Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure*. Thorax, 2008. **63**(3): p. 228-33.
48. Lobo, E.D., R.J. Hansen, and J.P. Balthasar, *Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics*. J Pharm Sci, 2004. **93**(11): p. 2645-68.
49. Qiu, J., et al., *Occurrence of autoantibodies to annexin I, 14-3-3 theta and LAMR1 in prediagnostic lung cancer sera*. J Clin Oncol, 2008. **26**(31): p. 5060-6.
50. Brichory, F., et al., *Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(21): p. 7908-12.
51. Brichory, F.M., et al., *An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9824-9.
52. He, P., et al., *Proteomics-based identification of alpha-enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer*. Cancer Sci, 2007. **98**(8): p. 1234-40.
53. Tureci, O., et al., *Humoral immune responses of lung cancer patients against tumor antigen NY-ESO-1*. Cancer Lett, 2006. **236**(1): p. 64-71.
54. Yamaguchi, K., et al., *Circulating antibodies to p40(AIS) in the sera of respiratory tract cancer patients*. Int J Cancer, 2000. **89**(6): p. 524-8.
55. Yamamoto, A., et al., *Detection of auto-antibodies against L-myc oncogene products in sera from lung cancer patients*. Int J Cancer, 1996. **69**(4): p. 283-9.
56. Comtesse, N., et al., *Complex humoral immune response against a benign tumor: frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9601-6.
57. Wang, X., et al., *Autoantibody signatures in prostate cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1224-35.
58. Patz, E.F., Jr., et al., *Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(35): p. 5578-83.
59. Zhong, L., et al., *Profiling tumor-associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2006. **1**(6): p. 513-9.
60. Zhong, L., et al., *Using protein microarray as a diagnostic assay for non-small cell lung cancer*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(10): p. 1308-14.
61. Zhong, L., et al., *Identification of circulating antibodies to tumor-associated proteins for combined use as markers of non-small cell lung cancer*. Proteomics, 2004. **4**(4): p. 1216-25.
62. Fischer, U., et al., *Cloning of a novel transcription factor-like gene amplified in human glioma including astrocytoma grade I*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(11): p. 1817-22.

63. Fischer, U., A. Michel, and E.U. Meese, *Expression of the gene for hematopoietic cell specific protein is not restricted to cells of hematopoietic origin*. *Int J Mol Med*, 2005. **15**(4): p. 611-5.
64. Heckel, D., et al., *cDNA cloning and chromosomal mapping of a predicted coiled-coil proline-rich protein immunogenic in meningioma patients*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(12): p. 2031-41.
65. Struss, A.K., et al., *PHF3-specific antibody responses in over 60% of patients with glioblastoma multiforme*. *Oncogene*, 2001. **20**(31): p. 4107-14.
66. Brass, N., et al., *Role of amplified genes in the production of autoantibodies*. *Blood*, 1999. **93**(7): p. 2158-66.
67. Diesinger, I., et al., *Toward a more complete recognition of immunoreactive antigens in squamous cell lung carcinoma*. *Int J Cancer*, 2002. **102**(4): p. 372-8.
68. Goebel, G., M. Zitt, and H.M. Muller, *Circulating nucleic acids in plasma or serum (CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias*. *Dis Markers*, 2005. **21**(3): p. 105-20.
69. Holdenrieder, S., et al., *Circulating nucleosomes in serum*. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **945**: p. 93-102.
70. Leon, S.A., et al., *Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy*. *Cancer Res*, 1977. **37**(3): p. 646-50.
71. Wu, T.L., et al., *Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range*. *Clin Chim Acta*, 2002. **321**(1-2): p. 77-87.
72. Fournie, G.J., et al., *Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours*. *Cancer Lett*, 1995. **91**(2): p. 221-7.
73. Schmidt, B., et al., *Quantification of free RNA in serum and bronchial lavage: a new diagnostic tool in lung cancer detection?* *Lung Cancer*, 2005. **48**(1): p. 145-7.
74. Kopreski, M.S., F.A. Benko, and C.D. Gocke, *Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum*. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **945**: p. 172-8.
75. Pelosi, G., et al., *Detecting cell-free circulating hTERT mRNA in the plasma may identify a subset of nonsmall cell lung cancer patients*. *Virchows Arch*, 2006. **448**(1): p. 7-15.
76. Camps, C., et al., *Is there a prognostic role of K-ras point mutations in the serum of patients with advanced non-small cell lung cancer?* *Lung Cancer*, 2005. **50**(3): p. 339-46.
77. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
78. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(6): p. 654-9.
79. Baj-Krzyworzeka, M., et al., *Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. **55**(7): p. 808-18.
80. Baj-Krzyworzeka, M., et al., *Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes*. *Immunol Lett*, 2007. **113**(2): p. 76-82.
81. Bushati, N. and S.M. Cohen, *microRNA functions*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 175-205.
82. Bagnyukova, T.V., I.P. Pogribny, and V.F. Chekhun, *MicroRNAs in normal and cancer cells: a new class of gene expression regulators*. *Exp Oncol*, 2006. **28**(4): p. 263-9.

83. Nana-Sinkam, S.P., et al., *Integrating the MicroRNome into the study of lung disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(1): p. 4-10.
84. Sassen, S., E.A. Miska, and C. Caldas, *MicroRNA: implications for cancer*. Virchows Arch, 2008. **452**(1): p. 1-10.
85. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
86. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: tools for microRNA genomics*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D154-8.
87. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
88. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
89. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
90. Gaur, A., et al., *Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines*. Cancer Res, 2007. **67**(6): p. 2456-68.
91. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
92. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
93. Kumar, M.S., et al., *Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis*. Nat Genet, 2007. **39**(5): p. 673-7.
94. Karube, Y., et al., *Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients*. Cancer Sci, 2005. **96**(2): p. 111-5.
95. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer*. Eur J Cancer, 2008. **44**(18): p. 2753-9.
96. Ciafre, S.A., et al., *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(4): p. 1351-8.
97. Murakami, Y., et al., *Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues*. Oncogene, 2006. **25**(17): p. 2537-45.
98. Nicoloso, M.S., et al., *MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2007. **139**(5): p. 709-16.
99. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 189-98.
100. Crawford, M., et al., *MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **373**(4): p. 607-12.
101. Yu, S.L., et al., *MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 48-57.
102. Mascaux, C., et al., *Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis*. Eur Respir J, 2009. **33**(2): p. 352-9.
103. Hu, Z., et al., *Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2600-8.
104. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
105. Gilad, S., et al., *Serum microRNAs are promising novel biomarkers*. PLoS ONE, 2008. **3**(9): p. e3148.

106. Hunter, M.P., et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. PLoS ONE, 2008. **3**(11): p. e3694.
107. Rabinowits, G., et al., *Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer*. Clin Lung Cancer, 2009. **10**(1): p. 42-6.
108. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **110**(1): p. 13-21.
109. Short, J.M., et al., *Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(15): p. 7583-600.
110. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. J Mol Biol, 1975. **94**(3): p. 441-8.
111. Keller, A., et al., *SePaCS--a web-based application for classification of seroreactivity profiles*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W683-7.
112. Bussow, K., et al., *A human cDNA library for high-throughput protein expression screening*. Genomics, 2000. **65**(1): p. 1-8.
113. Rainen, L., et al., *Stabilization of mRNA expression in whole blood samples*. Clin Chem, 2002. **48**(11): p. 1883-90.
114. Kruhoffer, M., et al., *Isolation of microarray-grade total RNA, microRNA, and DNA from a single PAXgene blood RNA tube*. J Mol Diagn, 2007. **9**(4): p. 452-8.
115. Shingara, J., et al., *An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling*. RNA, 2005. **11**(9): p. 1461-70.
116. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
117. Jiang, J., et al., *Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(17): p. 5394-403.
118. Fan, A.C., et al., *A quantitative PCR method to detect blood microRNAs associated with tumorigenesis in transgenic mice*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 74.
119. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
120. Bolstad, B.M., et al., *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics, 2003. **19**(2): p. 185-93.
121. Henschke, C.I. and D.F. Yankelevitz, *CT screening for lung cancer: update 2007*. Oncologist, 2008. **13**(1): p. 65-78.
122. Brooks, M., *Breast cancer screening and biomarkers*. Methods Mol Biol, 2009. **472**: p. 307-21.
123. Hassan, C., et al., *Colon cancer prevention in Italy: cost-effectiveness analysis with CT colonography and endoscopy*. Dig Liver Dis, 2007. **39**(3): p. 242-50.
124. Dai, J.R., et al., *[Value of CT scanning in the diagnosis of early cervical carcinoma]*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2006. **28**(2): p. 151-4.
125. Bach, P.B., et al., *Computed tomography screening and lung cancer outcomes*. JAMA, 2007. **297**(9): p. 953-61.
126. Neugut, A.I., et al., *Increased risk of lung cancer after breast cancer radiation therapy in cigarette smokers*. Cancer, 1994. **73**(6): p. 1615-20.
127. Tokarskaya, Z.B., et al., *Interaction of radiation and smoking in lung cancer induction among workers at the Mayak nuclear enterprise*. Health Phys, 2002. **83**(6): p. 833-46.
128. Brenner, D.J., *Radiation risks potentially associated with low-dose CT screening of adult smokers for lung cancer*. Radiology, 2004. **231**(2): p. 440-5.
129. Schmits, R., et al., *Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas*. Int J Cancer, 2002. **98**(1): p. 73-7.
130. Simpson, A.J., et al., *Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 615-25.

131. Scanlan, M.J., et al., *Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy*. Immunol Rev, 2002. **188**: p. 22-32.
132. Herve, C.A., et al., *Autoantibodies to human endogenous retrovirus-K are frequently detected in health and disease and react with multiple epitopes*. Clin Exp Immunol, 2002. **128**(1): p. 75-82.
133. Scanlan, M.J., et al., *Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies*. Int J Cancer, 1998. **76**(5): p. 652-8.
134. Comtesse, N., et al., *Frequent overexpression of the genes FXR1, CLAPM1 and EIF4G located on amplicon 3q26-27 in squamous cell carcinoma of the lung*. Int J Cancer, 2007. **120**(12): p. 2538-44.
135. Trivers, G.E., et al., *Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(10): p. 1767-75.
136. Li, Y., et al., *p53 autoantibodies predict subsequent development of cancer*. Int J Cancer, 2005. **114**(1): p. 157-60.
137. Bach, P.B., et al., *Screening for lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)*. Chest, 2007. **132**(3 Suppl): p. 69S-77S.
138. Casiano, C.A., M. Mediavilla-Varela, and E.M. Tan, *Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(10): p. 1745-59.
139. Comtesse, N., et al., *Probing the human natural autoantibody repertoire using an immunoscreening approach*. Clin Exp Immunol, 2000. **121**(3): p. 430-6.
140. Zhang, J.Y., et al., *Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(2): p. 136-43.
141. Qiu, J., et al., *Development of natural protein microarrays for diagnosing cancer based on an antibody response to tumor antigens*. J Proteome Res, 2004. **3**(2): p. 261-7.
142. Brass, N., et al., *Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(1): p. 33-9.
143. Brass, N., et al., *Amplification of the genes BCHE and SLC2A2 in 40% of squamous cell carcinoma of the lung*. Cancer Res, 1997. **57**(11): p. 2290-4.
144. Brass, N., et al., *DNA amplification on chromosome 3q26.1-q26.3 in squamous cell carcinoma of the lung detected by reverse chromosome painting*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(7): p. 1205-8.
145. Ogiwara, H., et al., *Unbalanced translocation, a major chromosome alteration causing loss of heterozygosity in human lung cancer*. Oncogene, 2008. **27**(35): p. 4788-97.
146. Weir, B.A., et al., *Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 893-8.
147. Leidinger, P., et al., *Toward an early diagnosis of lung cancer: an autoantibody signature for squamous cell lung carcinoma*. Int J Cancer, 2008. **123**(7): p. 1631-6.
148. Vaughan, H.A., et al., *The humoral immune response to head and neck cancer antigens as defined by the serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning*. Cancer Immun, 2004. **4**: p. 5.
149. Wang, X., et al., *MAZ drives tumor-specific expression of PPAR gamma 1 in breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **111**(1): p. 103-11.
150. Giannopoulos, K., et al., *Expression of RHAMM/CD168 and other tumor-associated antigens in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Int J Oncol, 2006. **29**(1): p. 95-103.

151. Bataller, L., et al., *The MAZ protein is an autoantigen of Hodgkin's disease and paraneoplastic cerebellar dysfunction*. Ann Neurol, 2003. **53**(1): p. 123-7.
152. Greiner, J., et al., *Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia*. Exp Hematol, 2000. **28**(12): p. 1413-22.
153. Briasoulis, E., et al., *CENP-B specific anti-centromere autoantibodies heralding small-cell lung cancer. A case study and review of the literature*. Lung Cancer, 2008. **60**(2): p. 302-6.
154. Servettaz, A., et al., *Anti-endothelial cell antibodies from patients with limited cutaneous systemic sclerosis bind to centromeric protein B (CENP-B)*. Clin Immunol, 2006. **120**(2): p. 212-9.
155. Kowalczyk, P., M. Woszczynski, and J. Ostrowski, *Increased expression of ribosomal protein S2 in liver tumors, posthepactomized livers, and proliferating hepatocytes in vitro*. Acta Biochim Pol, 2002. **49**(3): p. 615-24.
156. Soling, A., et al., *Minichromosome maintenance protein 3 elicits a cancer-restricted immune response in patients with brain malignancies and is a strong independent predictor of survival in patients with anaplastic astrocytoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(1): p. 249-58.
157. Ha, S.A., et al., *Cancer-associated expression of minichromosome maintenance 3 gene in several human cancers and its involvement in tumorigenesis*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8386-95.
158. Gambichler, T., et al., *Minichromosome maintenance proteins are useful adjuncts to differentiate between benign and malignant melanocytic skin lesions*. J Am Acad Dermatol, 2009. **60**(5): p. 808-13.
159. Wellington, C.L., et al., *Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9158-67.
160. Chang, H.Y. and X. Yang, *Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 821-46.
161. O'Reilly, L.A. and A. Strasser, *Apoptosis and autoimmune disease*. Inflamm Res, 1999. **48**(1): p. 5-21.
162. Creaney, J., et al., *p53 autoantibodies in patients with malignant mesothelioma: stability through disease progression*. Br J Cancer, 2001. **84**(1): p. 52-6.
163. Heisel, S.M., et al., *Increased seroreactivity to glioma-expressed antigen 2 in brain tumor patients under radiation*. PLoS ONE, 2008. **3**(5): p. e2164.
164. Barbarotto, E., T.D. Schmittgen, and G.A. Calin, *MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile*. Int J Cancer, 2008. **122**(5): p. 969-77.
165. Rosenfeld, N., et al., *MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 462-9.
166. Jeffrey, S.S., *Cancer biomarker profiling with microRNAs*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 400-1.
167. Chin, L.J. and F.J. Slack, *A truth serum for cancer--microRNAs have major potential as cancer biomarkers*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 983-4.
168. Nicoloso, M.S. and G.A. Calin, *MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside*. Brain Pathol, 2008. **18**(1): p. 122-9.
169. Blenkiron, C., et al., *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. Genome Biol, 2007. **8**(10): p. R214.
170. Faber, C., T. Kirchner, and F. Hlubek, *The impact of microRNAs on colorectal cancer*. Virchows Arch, 2009.
171. Ortholan, C., et al., *MicroRNAs and Lung Cancer: New Oncogenes and Tumor Suppressors, New Prognostic Factors and Potential Therapeutic Targets*. Curr Med Chem, 2009. **16**(9): p. 1047-61.

172. Resnick, K.E., et al., *The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform*. Gynecol Oncol, 2009. **112**(1): p. 55-9.
173. Harris, T.A., et al., *MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1516-21.
174. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
175. Takamizawa, J., et al., *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3753-6.
176. Tong, A.W., *Small RNAs and non-small cell lung cancer*. Curr Mol Med, 2006. **6**(3): p. 339-49.
177. Stahlhut Espinosa, C.E. and F.J. Slack, *The role of microRNAs in cancer*. Yale J Biol Med, 2006. **79**(3-4): p. 131-40.
178. Williams, A.E., *Functional aspects of animal microRNAs*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(4): p. 545-62.
179. Zhang, B., Q. Wang, and X. Pan, *MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants*. J Cell Physiol, 2007. **210**(2): p. 279-89.
180. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7390-4.
181. Hayashita, Y., et al., *A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation*. Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 9628-32.
182. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
183. Guo, L., et al., *Differential Expression Profiles of microRNAs in NIH3T3 Cells in Response to UVB Irradiation*. Photochem Photobiol, 2008.
184. Ichimi, T., et al., *Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer*. Int J Cancer, 2009.
185. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
186. Alvarez-Garcia, I. and E.A. Miska, *MicroRNA functions in animal development and human disease*. Development, 2005. **132**(21): p. 4653-62.
187. Feitelson, M.A. and J. Lee, *Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis*. Cancer Lett, 2007. **252**(2): p. 157-70.

7. ANHANG

Tabelle A1: Frequenz der Autoantikörperantworten für jedes einzelne Serum
 *Klone identifiziert im SEREX-Screening der drei cDNA-Banken aus PEC-Gewebe
 **Klone identifiziert im SEREX-Screening der drei cDNA-Banken aus Hirn-Gewebe

Serum	alle 82 cDNA-Klone		27 PEC-cDNA-Klone *		55 andere cDNA-Klone **	
	Anzahl positive Klone	%	Anzahl positive Klone	%	Anzahl positive Klone	%
	1	8	20,51	6	15,38	2
2	5	12,82	3	7,69	2	5,13
3	7	17,95	6	15,38	1	2,56
4	5	12,82	2	5,13	3	7,69
5	10	25,64	7	17,95	3	7,69
6	7	17,95	2	5,13	5	12,82
7	8	20,51	6	15,38	2	5,13
8	8	20,51	6	15,38	2	5,13
9	9	23,08	6	15,38	3	7,69
10	10	25,64	6	15,38	4	10,26
11	3	7,69	2	5,13	1	2,56
12	3	7,69	3	7,69	0	0,00
13	7	17,95	7	17,95	0	0,00
14	2	5,13	1	2,56	1	2,56
15	4	10,26	4	10,26	0	0,00
16	8	20,51	4	10,26	4	10,26
17	4	10,26	4	10,26	0	0,00
18	10	25,64	9	23,08	1	2,56
19	9	23,08	4	10,26	5	12,82
20	10	25,64	7	17,95	3	7,69
21	5	12,82	1	2,56	4	10,26
22	2	5,13	1	2,56	1	2,56
23	6	15,38	1	2,56	5	12,82
24	6	15,38	2	5,13	4	10,26
25	6	15,38	0	0,00	6	15,38
26	5	12,82	3	7,69	2	5,13
27	5	12,82	2	5,13	3	7,69
28	5	12,82	2	5,13	3	7,69
29	8	20,51	3	7,69	5	12,82
30	4	10,26	2	5,13	2	5,13
31	6	15,38	3	7,69	3	7,69
32	6	15,38	2	5,13	4	10,26
33	8	20,51	2	5,13	6	15,38
34	13	33,33	5	12,82	8	20,51
35	3	7,69	0	0,00	3	7,69
36	11	28,21	2	5,13	9	23,08
37	6	15,38	3	7,69	3	7,69
38	2	5,13	2	5,13	0	0,00
39	4	10,26	0	0,00	4	10,26

Fortsetzung Tabelle A1: Frequenz der Autoantikörperantworten für jedes einzelne Serum

*Klone identifiziert im SEREX-Screening der drei cDNA-Banken aus PEC-Gewebe

**Klone identifiziert im SEREX-Screening der drei cDNA-Banken aus Hirn-Gewebe

	Serum	alle 82 cDNA-Klone		27 PEC-cDNA-Klone *		55 andere cDNA-Klone **	
		Anzahl positive Klone	%	Anzahl positive Klone	%	Anzahl positive Klone	%
Normalseren	1	11	27,50	1	2,50	10	25,00
	2	8	20,00	1	2,50	7	17,50
	3	9	22,50	1	2,50	8	20,00
	4	10	25,00	2	5,00	8	20,00
	5	9	22,50	0	0,00	9	22,50
	6	9	22,50	1	2,50	8	20,00
	7	7	17,50	0	0,00	7	17,50
	8	6	15,00	1	2,50	5	12,50
	9	8	20,00	0	0,00	8	20,00
	10	3	7,50	0	0,00	3	7,50
	11	3	7,50	2	5,00	1	2,50
	12	14	35,00	1	2,50	13	32,50
	13	13	32,50	0	0,00	13	32,50
	14	8	20,00	0	0,00	8	20,00
	15	9	22,50	0	0,00	9	22,50
	16	9	22,50	0	0,00	9	22,50
	17	6	15,00	0	0,00	6	15,00
	18	9	22,50	1	2,50	8	20,00
	19	11	27,50	0	0,00	11	27,50
	20	8	20,00	0	0,00	8	20,00
	21	11	27,50	0	0,00	11	27,50
	22	6	15,00	0	0,00	6	15,00
	23	8	20,00	0	0,00	8	20,00
	24	8	20,00	0	0,00	8	20,00
	25	8	20,00	0	0,00	8	20,00
	26	10	25,00	1	2,50	9	22,50
	27	8	20,00	0	0,00	8	20,00
	28	9	22,50	0	0,00	9	22,50
	29	5	12,50	0	0,00	5	12,50
	30	9	22,50	2	5,00	7	17,50
	31	6	15,00	1	2,50	5	12,50
	32	4	10,00	0	0,00	4	10,00
	33	6	15,00	1	2,50	5	12,50
	34	5	12,50	0	0,00	5	12,50
	35	9	22,50	3	7,50	6	15,00
	36	7	17,50	1	2,50	6	15,00
	37	7	17,50	2	5,00	5	12,50
	38	4	10,00	0	0,00	4	10,00
	39	5	12,50	1	2,50	4	10,00
	40	7	17,50	0	0,00	7	17,50

Fortsetzung Tabelle A1: Frequenz der Autoantikörperantworten für jedes einzelne Serum

*Klone identifiziert im SEREX-Screening der drei cDNA-Banken aus PEC-Gewebe

**Klone identifiziert im SEREX-Screening der drei cDNA-Banken aus Hirn-Gewebe

	Serum	alle 82 cDNA-Klone		27 PEC-cDNA-Klone *		55 andere cDNA-Klone **	
		Anzahl positive Klone	%	Anzahl positive Klone	%	Anzahl positive Klone	%
Seren nicht-tumoröse Bronchialerkrankungen	1	4	13,79	0	0,00	4	13,79
	2	7	24,14	3	10,34	4	13,79
	3	2	6,90	0	0,00	2	6,90
	4	1	3,45	0	0,00	1	3,45
	5	3	10,34	2	6,90	1	3,45
	6	1	3,45	0	0,00	1	3,45
	7	1	3,45	1	3,45	0	0,00
	8	1	3,45	0	0,00	1	3,45
	9	2	6,90	2	6,90	0	0,00
	10	9	31,03	3	10,34	6	20,69
	11	2	6,90	2	6,90	0	0,00
	12	4	13,79	2	6,90	2	6,90
	13	5	17,24	1	3,45	4	13,79
	14	12	41,38	2	6,90	10	34,48
	15	3	10,34	0	0,00	3	10,34
	16	2	6,90	0	0,00	2	6,90
	17	9	31,03	4	13,79	5	17,24
	18	3	10,34	1	3,45	2	6,90
	19	8	27,59	1	3,45	7	24,14
	20	2	6,90	1	3,45	1	3,45
	21	4	13,79	0	0,00	4	13,79
	22	3	10,34	0	0,00	3	10,34
	23	4	13,79	1	3,45	3	10,34
	24	7	24,14	5	17,24	2	6,90
	25	8	27,59	5	17,24	3	10,34
	26	9	31,03	7	24,14	2	6,90
	27	5	17,24	2	6,90	3	10,34
	28	5	17,24	3	10,34	2	6,90
	29	3	10,34	2	6,90	1	3,45

Tabelle A2: Detaillierte Informationen zu allen Phagen-Klonen, wie Sequenzbereich des Inserts, Leserahmen, 5' untranslatierte Sequenzen, mittlere Reaktivität und Mutual Information zu den einzelnen Klassifikationen

eDNA-Klon	Gen	Gen-ID	Transkript-nummer	Leserahmen	5' UTR	Sequenz (bp Start- bp Ende)	durchschnittliche Reaktivität			Mutual Information		
							PEC	nicht-tumorige Bronchialer- krankungen	Normal	PEC vs.alle Kontrollen	PEC vs. nicht-tumorige Bronchialerkrankungen	PEC vs. Normal
12-3-1	EIF4G1	1981	NM_004953	out of frame	nein	1982-5025	0,103	0	0	0,025	0,049	0,054
35-2-2	DNAJA1	3301	NM_001539	in frame	ja	80- unbekannt	0,205	0	0,025	0,022	0,103	0,065
39-1-2	RBPSUH	3516	NM_203284	in frame	ja	102-2051	0,154	0	0,1	0	0,075	0,005
37-1-1	D21S2056E	713435	NM_003683	in frame	nein	655-1791	0,128	0,034	0	0,038	0,021	0,068
26-4-1	LRRFIP1	9208	NM_004735	in frame	nein	195-3648	0,026	0,034	0	0,013	0	0,013
24-2-1	GCC2	9648	NM_181453	out of frame	ja	94-3629	0,128	0	0,05	0,002	0,062	0,014
25-3-1	ROCK1	6093	NM_005406	out of frame	nein	2184-3045	0,179	0	0	0,045	0,089	0,097
31-1-2	NFATC1	4772	NM_172390	in frame	nein	1132-4604	0,026	0,172	0	0,038	0,049	0,013
54-1-1	TACC2	10579	NM_206862	in frame	nein	7856-9691	0,205	0,069	0	0,066	0,028	0,112
61-2-1	MIRPS15	64960	NM_031280	in frame	ja	47-881	0,128	0	0	0,032	0,062	0,068
9-1-1	C14orf145	145508	NM_152446	in frame	ja	1-4454	0,154	0,138	0	0,066	0	0,082
11-2-1	C14orf11	55837	NM_018453	in frame	ja	42-1253	0,256	0	0,025	0,033	0,131	0,091
54-2-1	ALG5	29880	AF102850	unknown	unbekannt	unbekannt	0,026	0,069	0	0,019	0,008	0,013
61-3-1	ARFGAP3	26286	NM_014570	in frame	nein	801-2722	0,154	0,034	0	0,045	0,031	0,082
129-1-3	AKAP13	11214	NM_006738	out of frame	nein	7053-8534	0,077	0,069	0,025	0,008	0	0,011
97-2-3	RPS18	6222	NM_022551	out of frame	nein	28-542	0,051	0,069	0	0,025	0,001	0,026
212-2-2	KIAA1217 / PRKCB1	56243 / 5579	NM_019590 / NM_002738	Chimäre	unbekannt	unbekannt	0,154	0	0	0,038	0,075	0,082
222-1-1	TRAP1	10131	NM_016292	out of frame	ja	1-2206	0,077	0,069	0	0,032	0	0,04
190-1-3	KIAA1217	56243	NM_019590	out of frame	nein	3184-6022	0,205	0,069	0,025	0,033	0,028	0,065
173-1-2	ANKD36 / LOC400986	375248 / 400986	NM_198555 / NM_001010914	Chimäre	unbekannt	unbekannt	0,077	0,034	0	0,025	0,006	0,04
213-1-1-3	NOL8	55035	NM_017948	in frame	ja	248-3174	0,103	0,034	0	0,032	0,013	0,054
22-3-3	EIF2AK4	440275	NM_001013703	in frame	nein	94-588	0,256	0,483	0,275	0,005	0,04	0
76-1-1	TP53BP2	7159	NM_005426	out of frame	nein	647-4534	0,077	0,034	0	0,025	0,006	0,04
73-1-1	LAMC1	3915	NM_002293	in frame	nein	3481-5318	0,103	0,034	0	0,032	0,013	0,054

Fortsetzung Tabelle A2: Detaillierte Informationen zu allen Phagen-Klonen, wie Sequenzbereich des Inserts, Leserahmen, 5' untranslatierte Sequenzen, mittlere Reaktivität und Mutual Information zu den einzelnen Klassifikationen

cDNA-Klon	Gen	Gen-ID	Transkript-nummer	Leserahmen	5' UTR	Sequenz (bp Start- bp Ende)	durchschnittliche Reaktivität			Mutual Information		
							PEC	nicht-tumöröse Bronchialer- krankungen	Normal	PEC vs. alle Kontrollen	PEC vs. nicht-tumöröse Bronchialerkrankungen	PEC vs. Normal
29-2-1	EMCN/ COL1A1	51705 / 1277	NM_016242/ NM_000088	Chimäre	unbekannt	unbekannt	0,103	0,034	0	0,032	0,013	0,054
24-1-3	TRIP11	56288	NM_004239	out of frame	nein	1046-1435	0,128	0,069	0,05	0,007	0,007	0,014
68-1-3	PARD3	9321	NM_019619	in frame	nein	1385-3085	0,077	0,172	0	0,052	0,015	0,04
1-19	NKTR	4820	NM_005385	in frame	nein	3596-7296	0,026	0,034	0	0,013	0	0,013
1-50 II	SOX2	6657	NM_003106	in frame	nein	542-1516	0,051	0	0	0,013	0,024	0,026
1-75 II	TBC1D4	9882	NM_014832	in frame	nein	2713-5932	0,077	0,069	0,075	0	0	0
3-3	USP37	57695	NM_020935	out of frame	ja	78-4969	0,077	0	0	0,019	0,036	0,04
1-34 II	NIN	51199	NM_020921	in frame	ja	57-2547	0,051	0,069	0,075	0,001	0,001	0,002
2-14	YBX1	4904	NM_004559	in frame	ja	1-1487	0,026	0	0	0,006	0,012	0,013
3-11	SC65	10609	NM_006455	in frame	nein	301-2277	0,026	0,034	0,075	0,008	0	0,01
1-90 III	C13orf24	10464	NM_006346	out of frame	ja	74-2804	0,026	0,069	0	0,019	0,008	0,013
1-51	NIT2	56954	NM_020202	out of frame	ja	62- unbekannt	0,179	0	0,05	0,007	0,089	0,031
H4 11-9	IGFBP5	3488	NM_000599	out of frame	nein	2046-6020	0	0	0,025	0,013	0	0,013
H4 33-20	MGEA5s	10724	AF307332.1	in frame	ja	1-245_293- 3313	0,179	0	0,05	0,007	0,089	0,031
2-36 (I)	FLJ10747	55219	NM_018202	out of frame	ja	2-unbekannt	0,051	0	0,175	0,046	0,024	0,029
1-29	PAFAH1B1	5048	NM_000430	unknown	unbekannt	unbekannt	0,077	0	0	0,019	0,036	0,04
2-21	TPM3	7170	NM_153649	in frame	ja	9-707	0	0	0,05	0,027	0	0,025
3-6	HNRP1	3178	NM_002136	out of frame	ja	80-1759	0	0	0,35	0,21	0	0,201
2-11	BRAP	8315	NM_006768	in frame	nein	1019-?	0,487	0,172	0,425	0,004	0,081	0,003
H4 2-2	MOC51	4337	NM_005942	unknown	unbekannt	unbekannt	0,103	0,034	0,1	0,002	0,013	0
2-5	IQWD1	55827	NM_001017977	in frame	nein	1449-3243	0,103	0	0,175	0,024	0,049	0,008
H4 8-6	MGEA6	4253	NM_005930	out of frame	ja	267-3656	0,103	0,069	0,1	0	0,003	0
1-40	LMO3	55885	NM_001001395	out of frame	nein	369-1615	0,026	0	0,025	0,001	0,012	0
3-9	KIAA0555	9832	NM_014790	out of frame	nein	1009- unbekannt	0,051	0,345	0,1	0,008	0,109	0,006

Fortsetzung Tabelle A2: Detaillierte Informationen zu allen Phagen-Klonen, wie Sequenzbereich des Inserts, Leserahmen, 5' untranslatierte Sequenzen, mittlere Reaktivität und Mutual Information zu den einzelnen Klassifikationen

eDNA-Klon	Gen	Gen-ID	Transkript-nummer	Leserahmen	5'UTR	Sequenz (bp Start- bp Ende)	durchschnittliche Reaktivität			Mutual Information		
							PEC	nichte-tumoröse Bronchialer- krankungen	Normal	PEC vs.alle Kontrollen	PEC vs. nicht-tumoröse Bronchialerkrankungen	PEC vs. Normal
1-56	SASH1	23328	NM_015278	in frame	nein	1583-4743	0,051	0,034	0,1	0,008	0,001	0,006
1-121	ZBTB5	9925	NM_014872	in frame	nein	673-4631	0	0	0,025	0,013	0	0,013
Primär 2	KIAA0999	23387	NM_025164	unknown	unbekannt	unbekannt	0	0,069	0,05	0,002	0,037	0,025
1-33 III	DLD	1738	NM_000108	in frame	ja	36-2098	0,026	0,069	0,025	0,002	0,008	0
1-17 (0)II	INA	9118	NM_032727	in frame	ja	324- unbekannt	0,051	0,207	0,175	0,005	0,042	0,029
1-42 III	SFRS11	9295	NM_004768	in frame	ja	107- unbekannt	0,026	0,138	0,125	0,005	0,033	0,028
3-2	TRA1	7184	NM_003299	in frame	ja	7-2758	0,077	0,034	0,15	0,016	0,006	0,01
H4 10-8	CTGF	1490	NM_001901	out of frame	ja	17-2295	0,026	0	0,05	0,007	0,012	0,003
1-64 II	CCDC2	80173	NM_025103	out of frame	nein	744-1985	0	0	0,025	0,013	0	0,013
H4 22-14	MGEA14	4253	NM_005930.2	out of frame	ja	377-3110	0,026	0,207	0,1	0	0,066	0,018
1-24	NCOA7	135112	NM_181782	in frame	nein	875-5537	0,026	0,103	0,275	0,064	0,019	0,1
1-43 II	APLP1	333	NM_005166	unknown	unbekannt	unbekannt	0	0,034	0,075	0,017	0,018	0,038
H46 1-2	HSPCB	3326	NM_007355	in frame	ja	16-2220	0	0	0,025	0,013	0	0,013
1-7	TNKS2	80351	NM_025235.2	in frame	ja	232-6156	0,128	0	0,425	0,126	0,062	0,083
1-27 II	RBPSUH	3516	NM_005349	in frame	nein	294-1781	0,077	0,034	0,35	0,101	0,006	0,085
1-11 II	CDH12	1010	NM_004061	in frame	nein	1985-3515	0,026	0,069	0	0,019	0,008	0,013
H15 3-5	SART1	9092	NM_005146	in frame	nein	336-3512	0,051	0,103	0	0,032	0,007	0,026
3-14	MLL14	4301	NM_005936	in frame	nein	unbekannt	0	0	0,15	0,084	0	0,079
1-45	RTN4	57142	NM_020532	in frame	nein	1389- unbekannt	0	0,034	0,25	0,105	0,018	0,137
H4 13-10	SNRK	54861	NM_017719	in frame	ja	3-5118	0,026	0	0,35	0,166	0,012	0,143
1-8 II	PARP1	142	NM_001618	in frame	ja	75-3660	0,128	0	0,25	0,042	0,062	0,018
H15 1-1	SWAP70	23075	NM_015055	out of frame	ja	1-2233	0,051	0,034	0,175	0,033	0,001	0,029
2-2	C6orf60	79632	NM_024581	out of frame	ja	1-4057	0,051	0,138	0,325	0,063	0,016	0,097
1-48 II	C9orf112	92715	NM_138778	unknown	unbekannt	unbekannt	0,128	0	0,075	0	0,062	0,006

Fortsetzung Tabelle A2: Detaillierte Informationen zu allen Phagen-Klonen, wie Sequenzbereich des Inserts, Leserahmen, 5'untranslatierte Sequenzen, mittlere Reaktivität und Mutual Information zu den einzelnen Klassifikationen

cDNA-Klon	Gen	Gen-ID	Transkript-nummer	Leserahmen	5'UTR	Sequenz (bp Start- bp Ende)	durchschnittliche Reaktivität			Mutual Information		
							PEC	nicht-tumöröse Bronchialer- krankungen	Normal	PEC vs.alle Kontrollen	PEC vs. nicht-tumöröse Bronchialerkrankungen	PEC vs. Normal
2-3	PRC1	9055	NM_003981	out of frame	ja	55- unbekannt	0	0,034	0,325	0,15	0,018	0,184
1-23	TBC1D2	55357	NM_018421	in frame	ja	1-unbekannt	0,077	0,172	0,275	0,028	0,015	0,051
GB 6-17	ACTN4	81	NM_004924	in frame	nein	1144-3453	0,026	0,034	0,025	0	0	0
GB4-17	ING4	51147	NM_016162	out of frame	nein	45-1387	0	0	0,025	0,013	0	0,013
37-3-3	RTN4	57142	NM_020532	in frame	nein	1671-4221	0	0,103	0,05	0	0,056	0,025
35-3-3	CYNL2	7461	NM_032421	in frame	nein	1691-5449	0,026	0,138	0,175	0,017	0,033	0,049
35-2-3	HCLS1	3059	NM_005335	in frame	ja	9-1958	0	0	0,075	0,041	0	0,038
GB 6-C	U2AF1L1 / HNRPK	7310 / 3190	NM_005089 / NM_002140	Chimäre	unbekannt	unbekannt	0,026	0,034	0,775	0,483	0	0,499
GB 4-2-2	HSPH1	10808	NM_006644	in frame	ja	72-3027	0	0	0,1	0,055	0	0,052
58-4	KIAA0376	23384	NM_015330	in frame	ja	1-86, 191- 2571	0,154	0	0	0,038	0,075	0,082

8. LEBENSLAUF

Vor- und Nachname: Petra Leidinger
Adresse: Zum Franzenkreuz 17
66687 Wadern-Nunkirchen
Telefon: 06874/172212
Geburtsdatum und -ort: 10. September 1980 in Saarbrücken

SCHULE

1987 - 1991 Grundschule Wadern-Nunkirchen
1991 - 2000 Hochwaldgymnasium Wadern mit Abitur

STUDIUM

10/2000 - 10/2005 Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie

Abschluss des Diplom - Studiengangs Biologie

Prüfung und Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes, Homburg
Thema: „Array-basierende Analyse der Auswirkung von Hypoxie auf Glioblastom-Zellkulturen“

PROMOTION

11/2005 – jetzt Promotion am Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes, Homburg
Thema: „Molekulare Signaturen im Blut von Patienten mit Bronchialkarzinomen“