

Zusammenfassung

Der solitäre Lungenrundherd ist eine röntgenologisch nachweisbare kugelförmige Verschattung, die im Durchmesser maximal 3 cm misst und allseits von Lungenparenchym umgeben ist. Die Ursache eines solitären pulmonalen Rundherdes können Bronchialkarzinom, benigner Lungentumor, Lungenmetastase und entzündlicher Lungenprozess bzw. dessen Folgen sein. In den meisten Fällen führt erst der operative Eingriff mit Resektion des Herdes zur Diagnose.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Mustern immunogener Autoantigene bei den verschiedenen Erkrankungen, deren röntgenmorphologisches Korrelat der solitäre Lungenrundherd darstellt.

Dazu wurden 1827 verschiedene cDNA-Expressionsklone als potenzielle Autoantigene auf sog. Customized High Density Protein Arrays gespottet, welche dann mit den verschiedenen Seren gescreent wurden. Es handelte sich um Seren von 64 Patienten mit Bronchialkarzinomen im TNM-Stadium pT1pN1-2, von 19 Patienten mit benignen Lungentumoren, 35 mit Lungenmetastasen extrathorakaler Primärtumoren, 30 mit entzündlichen und anderen benignen Lungenrundherden und um Seren von 48 gesunden Probanden.

Die Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1 pN0-2 vs. Seren gesunder Kontrollen ergab eine diagnostische Genauigkeit von 77,68 % (Sensitivität: 78,90 %, Spezifität: 77,08 %).

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit solitären Lungenrundherden war mittels der Seroreaktivitätsprofile keine Trennung der Gruppen möglich und insbesondere keine Trennung zwischen primären malignen Lungentumoren und Rundherden anderer Genese.

Die diagnostischen Genauigkeiten der Methode betragen für die Klassifizierung Bronchialkarzinom vs. alle Rundherde anderer Genese 56,76 %, für die Klassifizierung Bronchialkarzinom vs. benigne Tumoren der Lunge 69,88 %, für die Klassifizierung Bronchialkarzinom vs. Lungenmetastasen extrathorakaler Tumoren 55,56 % und für die Klassifizierung Bronchialkarzinom vs. entzündliche Rundherde 61,70 %.

Die Methode der Proteinmacroarray-Autoantikörperbestimmung lässt eine Trennung zwischen Patienten mit Bronchialkarzinom und gesunden Probanden zu und kann möglicherweise eine Bedeutung beim Screening erreichen. Die Methode ist in der angewandten Form und zur Zeit aber nicht in der Lage, differentialdiagnostische Aussagen in der Beurteilung des solitären Lungenrundherdes zu machen. Dies liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Inhomogenität der Gruppen.

Abstract

Large-scale autoantibody profiling in patients with solitary pulmonary nodules.

Solitary pulmonary nodules are defined as a spherical radiographic opacity that measures up to 3 cm in diameter and is completely surrounded by lung tissue. The cause of solitary pulmonary nodules ranges from lung cancer and metastases from an extrathoracic malignancy to infections and other benign lesions. In most cases histological diagnosis cannot be obtained preoperatively and the optimal management of solitary pulmonary nodules remains unclear. The treatment goals are identification of malignant nodules to permit resection and identification of benign nodules to avoid surgery.

In this study the ability of autoantibody profiling as a diagnostic test to discriminate the various types of solitary pulmonary nodules was investigated. Altogether, blood sera of 64 patients with lung cancer (T1N0-2), 35 patients with metastases of extrathoracic primary cancer, 19 patients with benign lung tumors, 30 patients with inflammatory and other benign nodules, and 48 healthy controls were screened using extended panels of arrayed antigens (1827 various cDNA expression clones). The resulting signatures were classified using linear kernel Support Vector Machines and 10-fold cross-validation.

This approach allowed for discriminating lung cancer patients (T1N0-2) from healthy controls without lung disease with an accuracy of 77.68 %, a sensitivity of 78.90 %, and a specificity of 77.09 %. The classification of lung cancer patients (T1N0-2) vs. patients with benign tumors yielded an accuracy of 69.88 %, lung cancer patients vs. patients with lung metastases 55.56 %, and lung cancer patients vs. patients with inflammatory and other benign lung processes 61.70 %.

These results provide evidence that patients with solitary pulmonary nodules caused by lung cancer (i.e. T1N0-2 tumors) can be separated from healthy controls. The method of large scale antibody profiling used in this study, however, does not allow separation between patients with T1N0-2 lung cancer and solitary pulmonary nodules of different genesis. This may be mainly due to the inhomogeneity of the particular non-lung cancer groups.

Einleitung

Der solitäre Lungenrundherd

Die medizinische Terminologie kennt für den solitären Lungenrundherd verschiedene Synonyma, u.a. isolierter oder solitärer pulmonaler Rundherd. In der angloamerikanischen Literatur wird er „Solitary Pulmonary Nodule“ oder kurz „SPN“ genannt. Die ältere Literatur benutzt noch den Terminus „Coin Lesion“. Dieser Begriff ist aber definitiv falsch, denn der solitäre pulmonale Rundherd ist keine münzenförmige Struktur, sondern eine Kugel, bzw. eine dreidimensionale Struktur, die oft kugelförmig ist.

Entsprechend lautet die Definition des solitären Lungenrundherdes: Der solitäre Rundherd der Lunge ist eine kugelförmige pulmonale Verschattung, die bis maximal 3 cm im Durchmesser groß und von Lungenparenchym umgeben ist.

Der solitäre pulmonale Rundherd ist deswegen von Bedeutung, weil er insbesondere im Zeitalter der Computertomographie ein häufiger, meist zufälliger Befund ist und weil er differentialdiagnostisch das röntgenmorphologische Korrelat verschiedener Erkrankungen sein kann. Typischerweise verursacht ein solitärer Rundherd der Lunge keine Symptome.

Der solitäre pulmonale Rundherd, dessen feingewebliche Diagnose zunächst nicht bekannt ist, wird in der Literatur deshalb manchmal Incidentalom genannt, ein Neologismus für „incidental tumor“.

Die Bedeutung und Häufigkeit des solitären pulmonalen Rundherdes wird in der Zukunft noch erheblich zunehmen, falls sich ein Bronchialkarzinom-Screening mittels Niedrigdosis-Computertomographie etablieren kann.

Ein Lungenrundherd kann die Manifestation eines Bronchialkarzinoms sein oder einer Metastase eines extrathorakalen Malignoms. Er kann aber auch Ausdruck einer benignen Erkrankung, z.B. eines gutartigen Lungentumors oder einer entzündlichen Erkrankung sein. Entsprechend gibt es unterschiedliche Strategien für das weitere Vorgehen, die von maximal konservativ bis maximal invasiv reichen.

Die optimale Vorgehensweise nach der radiologischen Diagnose ist unklar.

Den bisherigen „gold standard“, an dem sich alle Vorgehensweisen und alle diagnostischen Schritte messen lassen müssen, stellt die diagnostische Thorakotomie mit Resektion des Rundherdes dar. Dieses Vorgehen bietet eine Sensitivität und eine Spezifität von jeweils 100 %. Darüber hinaus muss man in diesem Zusammenhang prinzipiell bedenken, dass ein Teil der solitären pulmonalen Rundherde potenziell kurativ behandelbare Formen des Bronchial-

karzinoms mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 60 – 80 % nach operativer Therapie darstellt (Manser et al., 2005; The International Early Lung Cancer Action Program Investigators, 2006; Tockman, 1986; Mountain, 1997). Die primäre Resektion des solitären Lungenrundherdes ist aber gleichzeitig auch die invasivste Form der Diagnostik und durchaus mit einer operativen Letalität verbunden, insbesondere bei Patienten mit Risikofaktoren. So wird die Letalität einer Standardlobektomie auch in neuen Publikationen immer noch mit etwa 2 % angegeben (Berrisford et al., 2005; Memtsoudis et al., 2006; Wada et al., 1998).

Prävalenz der solitären Lungenrundherde

Es gibt acht große Bronchialkarzinom Screening-Studien mit annähernd 28 000 Probanden (Veronesi et al., 2006; Henschke et al., 2004; Gohagan et al., 2004; Li et al., 2004; Swensen et al., 2003; Nawa et al., 2002; Henschke et al., 2001; Diederich et al., 2000). Es sind in diesem Zusammenhang nur die Studien berücksichtigt, in denen zum Screening eine Computertomographie benutzt wurde, denn mehr als die Hälfte der solitären pulmonalen Rundherde, die auf der Röntgenübersichtsaufnahme des Thorax gesehen werden, sind falsch positive Rundherde, d.h. sie lassen sich durch eine Computertomographie nicht bestätigen (Henschke et al., 1999; Quekel et al., 1999).

In den Studien kommt zum Ausdruck, dass die Rundherde, die in Screening Studien entdeckt werden, sich deutlich von den Rundherden, die im klinischen Alltag und inzidentell entdeckt werden, unterscheiden.

In Screening Studien diagnostizierte Rundherde sind tendenziell kleiner, und auch die Prävalenz maligner Rundherde ist kleiner.

Die Prävalenz von Rundherden in den genannten acht großen Screening Studien zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Studien und liegt zwischen 8 % und 51 %, ist aber insgesamt hoch bis erstaunlich hoch. Die Unterschiede zwischen den Studien sind durch die Unterschiede der untersuchten Gruppen (z.B. Anteil der Raucher, geographische Besonderheiten), durch die Unterschiede in der Methodik (z.B. radiologische Technik) und in der Auswertung (z.B. Einschluss von Patienten mit mehr als einem Rundherd oder Einschluss von Tumoren > 3 cm im Durchmesser) und der Darstellung der Ergebnisse (z.B. Angabe der Zahl der Patienten mit einem solitären Rundherd vs. Anzahl der Gesamt-Rundherde oder Angabe der Zahl der pathologischen Befunde im Computertomogramm) mitverursacht.

Die Zahl der diagnostizierten pulmonalen Rundherde wird in der Zukunft auf Grund der Fortschritte in der radiologischen Bildgebung weiterhin ansteigen, einerseits weil die Qualität der Diagnostik steigt, andererseits weil auf Grund der abnehmenden Strahlenbelastung die Indika-

tion zur Untersuchung häufiger gestellt werden wird. Die pulmonalen Rundherde, die auf Grund der technischen Fortschritte in Zukunft zusätzlich diagnostiziert werden, sind kleine (< 1 cm Durchmesser), sogenannte Subcentimeter-Rundherde.

Wahrscheinlich kann man davon ausgehen, dass 20 % der älteren Erwachsenen einen solitären pulmonalen Rundherd haben.

Prävalenz der Malignität der solitären Lungenrundherde

In den oben aufgeführten großen Bronchialkarzinom Screening-Studien (ca. 28 000 Probanden) werden Prävalenzen der Malignität aller solitären pulmonalen Rundherde - unabhängig von Größe (bis maximal 3 cm Durchmesser) und Röntgenmorphologie - zwischen 1,1 % und 12 % angegeben. Diese Unterschiede zwischen den Studien sind wiederum durch die Unterschiede der untersuchten Gruppen, die Unterschiede in der Methodik der Auswertung und die Unterschiede in der Darstellung der Ergebnisse mitverursacht.

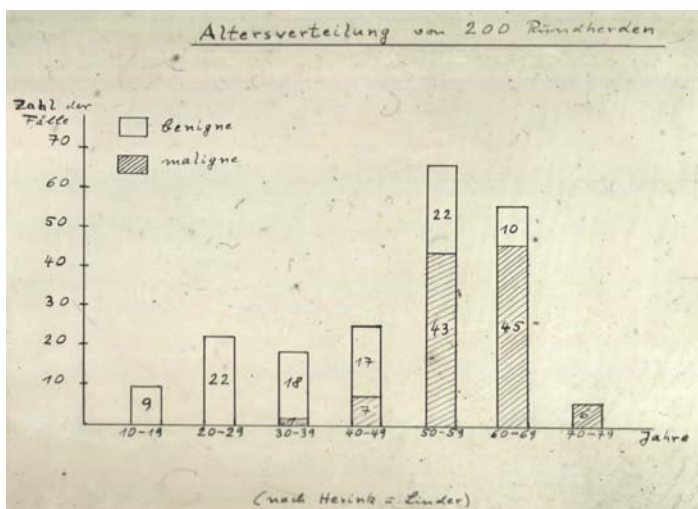


Abbildung 1: Verteilung von 200 solitären pulmonalen Rundherden nach Patientenalter und Malignität (handschriftlich von K. Stapenhorst gefertigte Folie [nach Herink und Linder, 1961])

Die Prävalenz der Malignität von solitären pulmonalen Rundherden im klinischen Alltag, speziell in einer Gruppe von Patienten, die in einer thoraxchirurgischen Abteilung vorgestellt und schließlich operiert werden, unterscheidet sich ganz erheblich von diesen Screening Studien (Herink und Linder, 1961). Abbildung 1 zeigt die Verteilung von 200 solitären pulmonalen Rundherden nach Patientenalter und Malignität (handschriftlich von K. Stapenhorst als Diapositiv gefertigte Folie [nach Herink und Linder, 1961]).

In einer Serie von 147 konsekutiven Patienten, die wegen eines solitären pulmonalen Rundherdes diagnostisch thorakotomiert und potenziell kurativ reseziert wurden (Klinik für Thoraxchirurgie, SHG-Kliniken, Völklingen, November 2006 bis November 2009), hatten 42,2 % ein Bronchialkarzinom (pT1N0-2), 23,8 % Metastasen eines extrathorakalen Malignoms, 16,3 % entzündliche oder andere nicht-tumoröse Prozesse und 13,6 % benigne Tumoren der Lunge.

Das bedeutet, dass die solitären pulmonalen Rundherde der Klinik häufiger maligne sind oder vielmehr, dass nicht alle solitären Lungenrundherde operiert werden und offensichtlich benigne Rundherde bei der Indikationsstellung herausfallen.

Einschätzung der Dignität des individuellen solitären Lungenrundherdes

Es gibt aktuell keinerlei Marker, der bei den Patienten mit einem solitären pulmonalen Rundherd eine Differenzierung zulässt. Es gibt jedoch röntgenmorphologische Kriterien, denen man bei bestimmten Konstellationen eine gewisse Sicherheit in der Zuordnung eines Lungenrundherdes zutraut.

Die Prävalenz der Malignität eines solitären pulmonalen Rundherdes steigt in erster Linie mit seiner Größe. Sie beträgt 0 %-1 % bei Rundherden < 5 mm, 6 %-28 % bei Rundherden von 5 mm bis 10 mm, 33 %-63 % bei Rundherden zwischen 11 mm und 20 mm und 64 %-82 % bei Rundherden > 20 mm (Takashima et al., 2003; Henschke et al., 1999, 2002, 2004; Zerhouni et al., 1986; Siegelman et al., 1986). In diesen Studien kommt jedoch nicht zweifelsfrei zum Ausdruck, wieviele der solitären Rundherde der Gruppe > 20 mm wirklich auch kleiner als 30 mm im Durchmesser waren und damit der Definition des Rundherdes entsprechen und wieviele in Wirklichkeit größer als 30 mm waren und damit keine Rundherde sondern Tumoren („masses“) waren.

Die auffallend niedrige Inzidenz der Malignität der solitären pulmonalen Rundherde mit einem Durchmesser kleiner als 5 mm hat zur Empfehlung der Fleischner Society for Thoracic Imaging and Diagnosis (2005) geführt, dass bei solitären pulmonalen Rundherden bis zu einem Durchmesser von 4 mm keine follow-up Untersuchungen notwendig seien, wenn bei dem Patienten kein Risikofaktor für ein Bronchialkarzinom vorliege.

Die Ergebnisse von fünf Studien über solitäre pulmonale Rundherde, die durch Screening-Untersuchungen entdeckt wurden, zeigen, dass bei solitären Rundherden, die röntgenologisch

glatt berandet erscheinen (*Abb. 4*), das Risiko der Malignität etwa 20 % bis 30 % betrug (Takishama et al., 2003; Zerhouni et al., 1986; Siegelman et al., 1986; Tozaki et al., 2005; Swensen et al., 1997).

Unregelmäßig berandete („irregular“), gelappte („lobulated“), mit Spiculae oder mit Corona radiata oder Pleurafinger versehene solitäre Rundherde deuten auf eine höhere Wahrscheinlichkeit der Malignität hin (*Abb. 5*). Sie liegt nach 6 Studien (mit insgesamt 2021 solitären Rundherden) zwischen 33 % und 100% (Tozaki et al., 2005; Takashima et al., 2003; Swensen et al., 1995,1997; Siegelman et al., 1986; Zerhouni et al., 1986).

Zur Beschreibung der Lungenrundherde auf der Basis von Dünnschicht-CT Bildern benutzt man die Klassifizierung „solide“, „partiell solide“ und „Milchglas“. Ein solider Herd verdeckt das Lungenparenchym komplett, er hat Bindegewebsdichte. Eine Milchglasverdichtung („ground glass opacity“) repräsentiert einen Rundherd mit nicht-soliden Komponenten, so dass das Lungenparenchym und Gefäße auch im Rundherd wahrgenommen werden können. Ein partiell solider Lungenrundherd hat Milchglas- und solide Anteile.

Es gibt zwei Studien, die zeigen, dass reine Milchglasverdichtungen in hohem Maße, speziell in 59 % bzw. 73 %, Ausdruck eines malignen Tumors sind (Takashima et al., 2003; Li et al., 2004). Eine andere Studie zeigt, dass partiell solide solitäre Rundherde mit höherer Wahrscheinlichkeit (63 %) maligne sind als Milchglas-Rundherde (18 %) (Diederich et al., 2000). Wenn man solide und partiell solide Rundherde zusammenfasst, ergibt sich eine Prävalenz der Malignität von 32 % (Asamura et al., 2003). Die Wahrscheinlichkeit der Malignität bei soliden Lungenrundherden allein erwies sich dabei als deutlich geringer (7 %-9 %) (Asamura et al., 2003).

Mehrere Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen radiologischem Erscheinungsbild und Histologie der Rundherde. Dabei zeigte sich, dass reine Milchglasverdichtungen in 70 %-100 % histologisch bronchioloalveolären Karzinomen entsprachen (Hasegawa et al., 2000; Suzuki et al., 2002; Takashima et al., 2003; Kishi et al., 2004; Nakamura et al., 2004).

Der Nachweis von Fett in einem glatt berandeten oder lobulierten pulmonalen Rundherd spricht für dessen benigne Natur. Es handelt sich dann mit relativ hoher Sicherheit um Hamartome. Auch Lymphknoten können zentral verfetten. Der Nachweis des Fettes erfolgt über die Dichtewertbestimmung (-40 bis -120 Hounsfield Einheiten) (Siegelman et al.,1986).

Dichtewerte von 0 Hounsfield Einheiten entsprechen der Dichte von Wasser. Entsprechend sind Rundherde mit dieser Dichte Zysten.

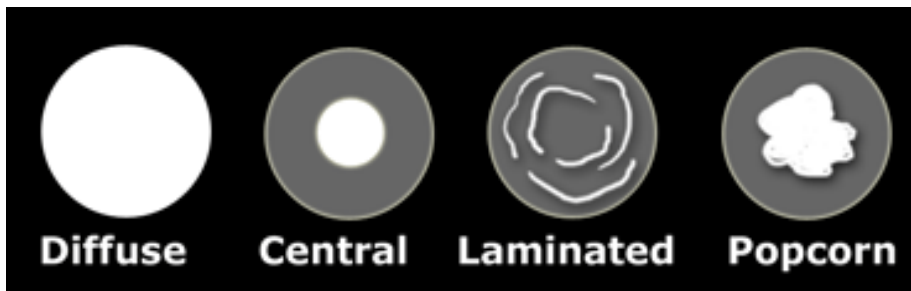


Abbildung 2: „benigne“ Verkalkungsmuster pulmonaler Rundherde

Der Nachweis von kalkdichten Strukturen kann Hinweise auf die Dignität des Lungenrundherdes geben (Abb. 2). Vollständige Verkalkung des Rundherdes, kalkdichtes Zentrum, konzentrischer Kalkring, geschichtete Verkalkung und Popcorn-Morphologie des Kalkherdes (scharf begrenzt und unregelmäßig gelappt) sprechen für eine benigne Ursache (Abb. 2, 3). Exzentrische, punktförmige und tüpfelförmige Verkalkungen lassen sich eher in malignen Rundherden nachweisen (Shaffer, 1999).

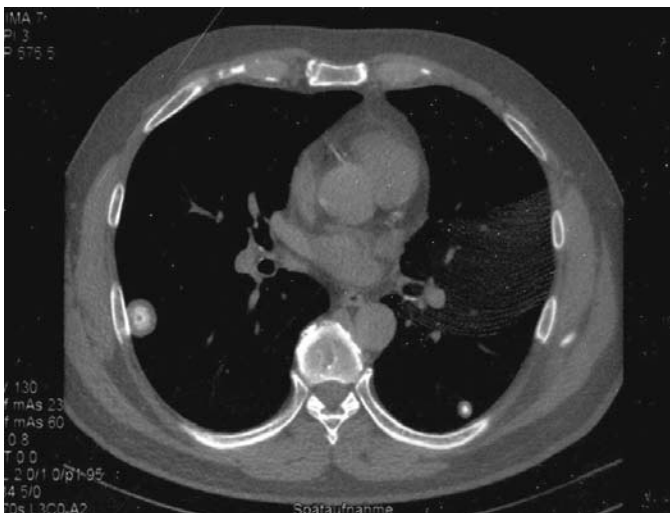


Abbildung 3: Axialer CT-Schnitt eines Thorax-CT ohne Kontrastmittelgabe. Man sieht beidseits jeweils einen Lungenrundherd. Die Rundherde sind glatt berandet, in der Ebene nahezu kreisrund und konzentrisch bzw. zentral verkalkt. Histologisch handelt es sich um Herde einer *Coccidioidomykose* (endemisch im Südwesten der USA).

Zusammengefasst scheinen nach Auswertung der vorliegenden Studien die röntgenmorphologischen Charakteristika und die Beschaffenheit der Berandungen der solitären pulmonalen Rundherde wenig verlässlich im Voraussagen der Dignität der Rundherde zu sein. Es zeichnet sich aber ab, dass glatte Berandung des Rundherdes und Bindegewebsdichte (solider pulmonaler Rundherd) auf eine niedrigere Wahrscheinlichkeit der Malignität hinweisen.

Eine andere radiologische Dignitätsbestimmung von solitären pulmonalen Rundherden benutzt den Umstand, dass maligne Tumoren zur Erhöhung ihrer Perfusion über humorale Mechanismen eine Vaskulogenese und Angiogenese induzieren können. Die Erhöhung der Perfusion lässt sich als Anreicherung von Kontrastmittel („Enhancement“) und damit als Dichteanstieg im Herd nachweisen. Allerdings ist nicht klar, welche Dichteanhebung nach Kontrastmittelgabe eine signifikante Aussage über die potenzielle Malignität erlaubt.

Von Swensen et al. (2000) wurde ein empirischer Schwellenwert von 15 Hounsfield-Einheiten ermittelt, mit dem er eine Sensitivität von 98 %, eine Spezifität von 58 % und eine Genauigkeit von 77 % bei der Beurteilung von pulmonalen Rundherden beschrieb. Die Prävalenz der Malignität in seiner untersuchten Population war dabei mit 48 % relativ hoch.

Insgesamt erscheint die Beurteilung eines Lungenrundherdes mittels Spiral - Computertomographie und intravenöser Kontrastmittelgabe die nicht-invasive Methode mit den besten Ergebnissen zu sein (*Abb.4, 5*). In mehreren Studien finden sich Sensitivitäten zwischen 98 % und 100 % und Spezifitäten von 54 % bis 93 % (Yamashita et al., 1995; Potente et al., 1997; Swensen et al., 2000; Yi et al., 2004). Im klinischen Alltag hat sich die Methode auf Grund des höheren Aufwandes, der zusätzlichen Strahlenbelastung und der Notwendigkeit der Kontrastmittelgabe wenig durchgesetzt (Prosch und Mostbeck, 2009).

Die Magnetresonanztomographie der Lunge ist kein Standardverfahren in der Diagnostik pulmonaler Rundherde und gilt auch in neuen Leitlinien, z.B des American College of Chest Physicians (ACCP), als nichtindizierte Methode (Gould MK et al., 2007). Eine neuere Metaanalyse ergibt jedoch bei der Beurteilung von solitären Rundherden eine Sensitivität von 94 % und eine Spezifität von 79 % (Cronin et al., 2008). Insgesamt ist die Methode noch zu wenig standardisiert (Gould et al., 2007).



Abbildung 4: Axialer CT-Schnitt eines Thorax-CT nach iv-Kontrastmittelgabe. Man sieht rechts einen solitären Rundherd mit glatter Berandung und ohne wesentliche Kontrastmittelanreicherung. Histologisch handelt es sich um ein Chondrohamartom.

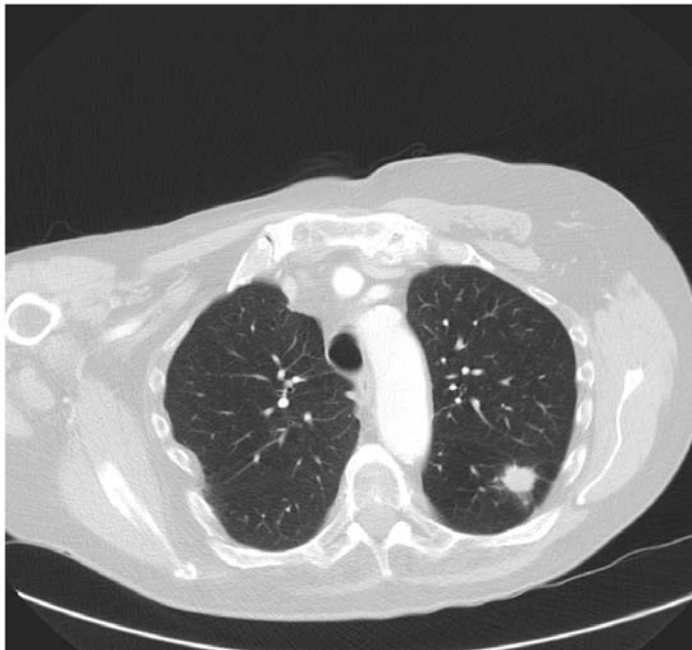


Abbildung 5: Axialer CT-Schnitt eines Thorax-CT nach iv-Kontrastmittelgabe. Man sieht links einen solitären Rundherd mit Spiculae, Pleurafinger und deutlicher Kontrastmittelanreicherung. Histologisch handelt es sich um ein Adenokarzinom der Lunge.

Ein neueres bildgebendes nuklearmedizinisches Verfahren, das in der Differenzialdiagnostik des Lungenrundherdes eingesetzt werden kann, ist die Positronenemissionstomographie (PET). Dabei wird als Tracer meist F-18-Fluorodesoxyglucose (FDG) eingesetzt. Durch die höhere FDG-Aufnahme maligner Tumoren (aber auch entzündlicher Prozesse) erlaubt die PET-Untersuchung oft eine Differenzierung zwischen malignen und benignen Prozessen. Dabei ist aber eine Mindestgröße des pulmonalen Rundherdes erforderlich. Bei Rundherden über 2 cm im Durchmesser erreicht das Verfahren im Erkennen maligner Läsionen eine Sensitivität von 90 % (Hagberg et al., 1997). Bei Rundherden, die kleiner als 1 cm im Durchmesser sind und bei niedriger metabolischer Aktivität eines malignen Herdes (z.B. bei bronchioloalveolären Karzinomen und Karzinoiden) ist PET oft falsch negativ (Bastarrika et al., 2005).

Es gibt zu der Anwendung von PET zur Erkennung maligner Lungentumoren viele Studien, die fast alle positive Ergebnisse berichten. Sie geben eine Sensitivität der Untersuchung bei solitären pulmonalen Rundherden von 80 %-100 % (Median: 87 %) und eine Spezifität von 40 %-100% an (Median: 83 %) (Gupta et al., 1998; Lowe et al., 1998; Orino et al., 1998; Prauer et al., 1998; Croft et al., 2002; Matthies et al., 2002; Herder et al., 2004). Insgesamt scheint die Positronenemissionstomographie relativ sensitiv zu sein, d.h. maligne Lungenrundherde werden in hohem Maße erkannt. Die Spezifität der Methode ist unterschiedlich und wird in manchen Untersuchungen als mäßig bis schlecht beurteilt.

Während die Bronchoskopie für die Diagnostik zentraler Atemwegsprozesse, mediastinaler Lymphknoten und der Lungentumoren (>3 cm) hervorragend geeignet ist und sehr gute Ergebnisse zeitigt, ist der diagnostische Erfolg der Bronchoskopie selbst mit Hilfe der Durchleuchtung bei peripheren solitären Rundherden, die kleiner als 2 cm im Durchmesser sind, gering und liegt bei malignen Rundherden dieser Größenordnung in der Spanne von 10 % bis 50 %. Die Wahrscheinlichkeit, bei benignen solitären pulmonalen Rundherden die korrekte Diagnose stellen zu können, ist noch geringer (Cortese und McDougall, 1979; Reichenberger et al., 1999; Baaklini et al., 2000). Aus diesem Grund wird z.B. bei einem Patienten mit solitärem Rundherd die präoperative Routinebronchoskopie nicht empfohlen, da sie nur selten Informationen liefert, die dazu führen, dass das weitere Vorgehen wesentlich modifiziert wird (Torrington und Kern, 1993).

Die transthorakale Feinnadelpunktion und –aspiration erfolgt heutzutage meist CT-gesteuert. Die Sensitivität der Methode bei der Diagnostik von solitären Lungenrundherden ist abhängig

von der Größe des Herdes, der Größe der Nadel, der Anzahl der Treffer des Herdes und der Erfahrung des Pathologen. In 4 % bis 41 % (Median: 21 %) konnte keine richtungsweisende Diagnose erreicht werden. Dabei ist auffällig, dass Biopsien ohne Diagnose in 44 % der benignen Läsionen, dagegen nur in 8 % der malignen erzielt wurden (Levine et al., 1988; Gould et al., 2007).

Als Komplikationen der Methode werden in erster Linie Pneumothoraces (25 %) beschrieben (Cox et al., 1999; Tan et al., 2003). Die schwerwiegendste, kasuistisch beschriebene Komplikation der perkutanen Biopsie ist das Auftreten einer Luftembolie mit Todesfolge (Winer-Muram, 2006).

Ursachen des solitären Lungenrundherdes

Die Ursachen des benignen solitären pulmonalen Rundherdes sind vielfältig und geographisch unterschiedlich. Während verheilte oder aktive unspezifische granulomatöse Erkrankungen wie Histoplasmose, Coccidioidomycose und Cryptococcose in Amerika etwa 20 % bis 30 % der benignen Lungenrundherde ausmachen, ist diese Ursache in Europa nahezu bedeutungslos. Dafür zeigt die Tuberkulose wieder eine steigende Tendenz. Andere Ursachen benigner solitärer pulmonaler Rundherde sind unspezifische Entzündung und Fibrose (*Abb. 6*), Lungenabszess, Rundpneumonie und Rundatelektase (*Abb. 7*), bronchogene Zyste, verheilte Lungeninfarkt, Aspergillom, lokale Lungenblutung, arteriovenöse Fistel und Hämangiom. Die Chondrohamartome bilden eine Gruppe von etwa 10 % der benignen Rundherde (*Abb. 4*).

Die Hauptursachen der malignen solitären pulmonalen Rundherde sind nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (80 %), kleinzellige Bronchialkarzinome (5 %) und solitäre Lungenmetastasen extrapulmonaler Malignome (10 %). Selten sind Lymphome, adenoidzystische Karzinome, Mucoepidermoidkarzinome, maligne Paragangliome u.a. (Duhaylongsod et al., 1995; Lowe et al., 1998; Prauer et al., 1998; Gould et al., 2007).

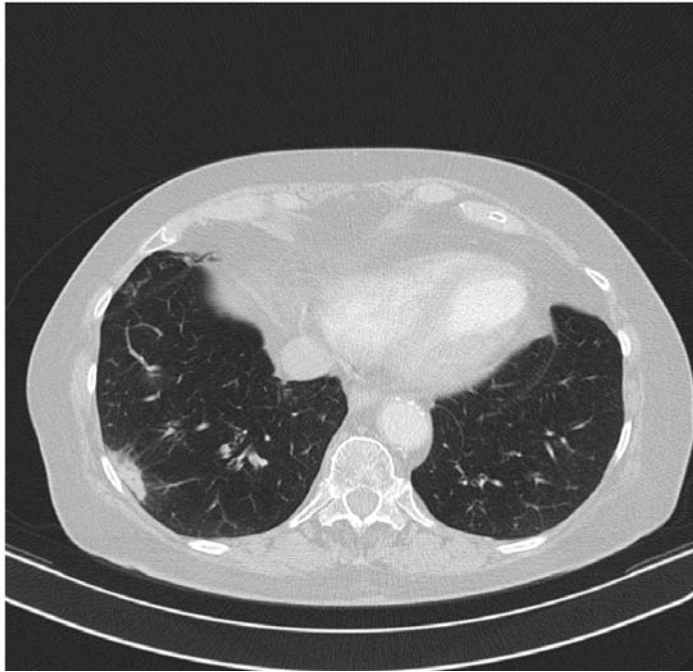


Abbildung 6: Axialer CT-Schnitt eines Thorax-CT nach iv-Kontrastmittelgabe. Man sieht rechts einen solitären Rundherd mit Spiculae, der der Pleura breitbasig aufsitzt. Histologisch entspricht der Herd einem entzündlichen Prozess.



Abbildung 7: Axialer CT-Schnitt eines Thorax-CT nach iv-Kontrastmittelgabe. Man sieht rechts einen pleuranahen Herd, der unregelmäßig berandet ist und inhomogen Kontrastmittel aufnimmt. Histologisch handelt es sich um einen entzündlichen Prozess.

Vorgehen nach Diagnose eines solitären Lungenrundherdes

Vortest-Wahrscheinlichkeit der Malignität und nicht-invasive Diagnostik

Bevor mehr oder weniger invasive Untersuchungen wegen eines solitären pulmonalen Rundherdes angestrengt werden, ist es sinnvoll und wird empfohlen, eine individuelle Vortest-Wahrscheinlichkeit für die Malignität des jeweiligen Rundherdes abzuschätzen. Neben klinischen Erfahrungswerten für die Malignität eines solitären pulmonalen Rundherdes gibt es quantitative Modelle, die verschiedene unabhängige Prädiktoren für Malignität einsetzen. Zu diesen Prädiktoren gehören höheres Alter, Rauchen, extrathorakale Tumoren in der Anamnese, Rundherddurchmesser, unregelmäßige und gezackte Berandung (*spiculae*) des Rundherdes und Lokalisation des Rundherdes in den Oberlappen (Swensen et al., 1999; Herder et al., 2005). Die Genauigkeit in der Vorhersage der Dignität speziell des oben genannten Mayo-Modells entspricht der Genauigkeit des Expertenurteils (Swensen et al., 1999).

Der zweite Schritt nach Diagnose eines solitären pulmonalen Rundherdes ist die Kontrolle früherer Röntgenbilder bzw. CT-Bilder nach diesem Rundherd. Wenn der Rundherd nur mittels Thoraxröntgenaufnahme diagnostiziert wurde, wird ein Thorax-CT mit Kontrastmittel angefertigt. Der Grund für den Versuch des Rückverfolgens des solitären Rundherdes auf Röntgenbild bzw. Computertomogramm ist, dass die Tumorverdopplungszeit eines malignen Rundherdes nur sehr selten länger als 300 Tage ist (außer in Screening Studien mit Subcentimeter-Rundherden), d.h. wenn ein Rundherd in der Thoraxübersichtsaufnahme zu sehen ist und über zwei Jahre stabil geblieben ist, d.h. kein oder kein erkennbares Wachstum zeigt, ist dies ein deutlicher Hinweis auf die benigne Natur des Rundherdes. In diesem Fall wird keine weitere Diagnostik oder Therapie empfohlen (Gould et al., 2007). Eine Ausnahme von dieser Regel bilden Milchglasverdichtungen, die ein langsam wachsendes bronchioloalveoläres Karzinom repräsentieren können und wesentlich längere Tumorverdopplungszeiten (813 ± 375 Tage) haben können (Yankelevitz und Henschke, 1997; Hasegawa et al., 2000; Henschke et al., 2002).

Ein Lungenrundherd, der ein Muster von Verkalkungen hat, das charakteristisch für benigne Rundherde ist (*Abb. 2,3*) (z.B. zentral kreisförmig, Popcorn-Muster u.a.) (*Abb. 3*), bedarf ebenfalls keiner weiteren Diagnostik und/oder Therapie (Siegelman et al., 1986). Diese Empfehlung entspringt der großen Erfahrung, die man in den USA auf Grund der endemischen granulomatösen Lungenerkrankungen hat (s.o.), wird aber in Mitteleuropa oft nicht umgesetzt.

Der nächste Schritt in der nicht invasiven Diagnostik ist die Entscheidung, ob im aktuell vorliegenden Fall eine Positronenemissionstomographie (FDG-PET) sinnvoll ist. Diese ist sicher nicht sinnvoll bei Rundherden, die im Durchmesser unter 8 – 10 mm liegen (Herder et al., 2004; Gould et al., 2007). Wenn bei größeren solitären pulmonalen Rundherden die Vortest-Wahrscheinlichkeit >60 % für ein Malignom spricht, wird auch ein negatives PET das weitere Vorgehen, i.e. invasive Diagnostik und operative Maßnahmen, nicht beeinflussen, so dass der Einsatz des PET auch in diesem Fall nicht sinnvoll ist (Gould et al., 2007).

Der PET-Einsatz kann dann sinnvoll und auch kosteneffektiv sein, wenn die klinische Vortest-Wahrscheinlichkeit eines malignen Prozesses relativ niedrig ist (5 %-60 %), und es sich um einen eher uncharakteristischen solitären Rundherd (d.h. kein deutlich benignes Aussehen im CT) handelt. In diesem Fall vermeidet man, wenn das PET negativ ist, invasive Maßnahmen, sollte aber für zwei Jahre eine radiologische Kontrolle folgen lassen.

Nach Ausschöpfung der nicht-invasiven diagnostischen Maßnahmen verbleiben für das weitere Vorgehen mehrere Alternativen: Operation, Biopsie des Herdes, Abwarten und Kontrolle („watchful waiting“). Das chirurgische Vorgehen ist der Goldstandard der Diagnostik des solitären pulmonalen Rundherdes und der Goldstandard der definitiven Behandlung des malignen solitären pulmonalen Rundherdes, sollte aber wegen der Risiken des jeweiligen Eingriffes vermieden werden, wenn benigne solitäre Rundherde vorliegen. Die Biopsie ist zwar prinzipiell in der Lage, die Dignität des Rundherdes zu klären, ist aber invasiv, potenziell riskant und führt oft nicht zur Diagnose. Abwarten mit regelmäßiger Kontrolle vermeidet die unnötige Operation bei Patienten mit benignem solitären Rundherd, verzögert aber im Falle der Malignität des Rundherdes Diagnose und Therapie und geht außerdem mit einer gewissen Strahlenbelastung auf Grund der Kontrolluntersuchungen einher.

In den Diagnosis and Management of Lung Cancer - ACCP Guidelines von 2007 wird als Lösung dieser Problematik folgendes Vorgehen vorgeschlagen: „Watchful waiting“ wird empfohlen, wenn die Wahrscheinlichkeit der Malignität des solitären Rundherdes kleiner als 3 % ist, die Operation ohne weitere Diagnostik wird empfohlen, wenn die Wahrscheinlichkeit der Malignität des Rundherdes größer als 68 % ist, und die Biopsie des Herdes wird empfohlen, wenn die Wahrscheinlichkeit der Malignität des Rundherdes zwischen 3 % und 68 % liegt (Gould et al., 2007).

Wenn man jedoch die Kriterien, die man zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit der Malignität benutzen kann, auf ihre Aussagekraft überprüft, so erkennt man aus den oben genannten Studien, die eine enorme Streubreite der Ergebnisse zeigen, dass die Abschätzung der Malig-

nität mit einem hohen bis sehr hohen Unsicherheitsfaktor belastet ist, der sicher eine Tendenz zur Mitte, vielleicht auch zu invasiverem Vorgehen generiert.

Zwei weitere Faktoren, die die Entscheidung zum Vorgehen beeinflussen, sind die Komorbiditäten des Patienten und als wichtigster und endgültig bestimmender Faktor der Wunsch des Patienten.

Watchful Waiting

Generell ist eine zwei Jahre anhaltende Stabilität ohne radiologische Zeichen des Wachstums im CT ein deutliches Zeichen der benignen Natur eines solitären Lungenrundherdes. Das optimale Zeitintervall zwischen den Kontrollen ist nicht klar, es ist jedoch gängige klinische Praxis, die follow-up CT-Untersuchungen nach Diagnose eines vermeintlich benignen Rundherdes nach 3, 6, 12 und 24 Monaten zu machen. Häufigere Kontrollen müssen bei einer größeren Unsicherheit in der Beurteilung der Benignität gemacht werden, weniger häufige können beim Subcentimeter-Rundherd erwogen werden. Es ist wichtig, immer im Auge zu behalten, dass die geschätzte Vortest-Wahrscheinlichkeit zusammen mit den radiologischen Untersuchungen nie ein Malignom ausschließen können.

Invasive Diagnostik

Wie schon beschrieben liegt der diagnostische Erfolg der Bronchoskopie bei peripheren malignen solitären pulmonalen Rundherden, die kleiner als 2 cm im Durchmesser sind, bei etwa 10 % bis 50 %. Die Wahrscheinlichkeit, bei benignen solitären Rundherden die korrekte Diagnose stellen zu können, ist noch geringer (Cortese und McDougall, 1979; Reichenberger et al., 1999; Baaklini et al., 2000). Ob bei den Patienten mit Raumforderungen von weniger als 2 cm Durchmesser routinemäßig eine Bronchoskopie erfolgen sollte, ist unklar; es gibt dafür keine ausreichenden Evidenzen.

Die Fehlerquote bei der CT-gestützten transthorakalen Punktion liegt zwischen 4 % bis 41 % (Median: 21 %), jedoch bestehen bei dieser Methode höhere Sensitivitäten als bei der Bronchoskopie (Ohno et al., 2003).

Insgesamt ist es schwer, den Stellenwert dieser beiden diagnostischen Maßnahmen beim solitären pulmonalen Rundherd zu beschreiben. In den ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition, 2007) kommt er folgendermaßen zum Ausdruck:

Bei Patienten, die einen unbestimmten solitären pulmonalen Rundherd mit einem Durchmesser von mindestens 8-10 mm haben und die Kandidaten für eine chirurgische Therapie sind, ist unter folgenden Umständen eine Diagnostik mit Bronchoskopie oder transthorakaler Punktion angezeigt:

- (1) wenn Vortest-Wahrscheinlichkeit und radiologische Zeichen sich widersprechen, z.B. wenn die Vortest-Wahrscheinlichkeit der Malignität hoch und der Rundherd im FDG-PET nicht leuchtet, d.h. nicht hypermetabol ist,
- (2) wenn die Diagnose eines benignen solitären Herdes wahrscheinlich ist, und im Falle der Korrektheit der Diagnose eine spezifische medikamentöse Behandlung notwendig wäre,
- (3) wenn ein voll informierter Patient den Beweis der Diagnose „maligner Rundherd“ vor der operativen Therapie wünscht und insbesondere dann, wenn das operative Risiko bei diesem speziellen Patient hoch ist. (Der Grad dieser Empfehlungen ist allerdings 2C, d.h. „uncertain“.)

Operative Diagnostik und Therapie

Das chirurgische Vorgehen ist wie oben schon erwähnt der Goldstandard der Diagnostik. Wenn der solitäre pulmonale Rundherd sich nach atypischer Resektion dann in der Schnellschnittuntersuchung als primäres Bronchialkarzinom erweist, ist die folgende Lobektomie die definitive und potenziell kurative Behandlung.

Jedoch auch die Schnellschnittuntersuchung hat Limitationen. Bei Rundherden, die kleiner als 1,1 cm im Durchmesser waren, konnten maligne Tumoren nur mit einer Sensitivität von 86,9 % identifiziert werden und bei Rundherden mit einem Durchmesser von 1,1 bis 1,5 cm mit einer Sensitivität von 94,1 %. Die Spezifität betrug in beiden Gruppen 100% (Marchevsky et al., 2004). Bei Patienten mit eingeschränkter kardialer und/oder pulmonaler Reserve sind atypische Resektion oder Segmentresektion beim malignen solitären Lungenrundherd akzeptable Behandlungsmodi, obwohl sie mit einer höheren Rezidivrate einhergehen (Warren und Faber, 1994; Ginsberg und Rubinstein, 1995).

Die Empfehlungen in den Leitlinien (insbes. des ACCP) gehen dahin, dass bei Patienten mit ausreichender kardiopulmonaler Reserve und mit einem unbestimmten solitären Rundherd, der mindestens 8-10 mm im Durchmesser groß ist, in den meisten Fällen eine chirurgische Diagnose anzustreben ist und dass bei Bestätigung der Malignität des Rundherdes in der gleichen Narkose eine Lobektomie mit mediastinaler Lymphknotendissektion folgen sollte.

Der Sonderfall des solitären Subcentimeter-Lungenrundherdes

Wie oben erwähnt ist die Wahrscheinlichkeit der Malignität eines solitären Lungenrundherdes sehr stark abhängig von seiner Größe. So beträgt die Wahrscheinlichkeit der Malignität bei einem solitären Rundherd, der kleiner als 5 mm im Durchmesser ist, weniger als 1 % und bei einem solitären Rundherd, dessen Durchmesser zwischen 5 mm und 9 mm liegt, 2,3-6 % (Gohagan et al., 2004; Henschke et al., 2004). Aktuell gibt es keinen Beweis, dass die frühe Diagnose eines malignen solitären Subcentimeter-Lungenrundherdes die Mortalität senkt.

Ausdruck randomisierter Studien dazu (The National Lung Screening Trial, The NELSON Trial) ist das ACCP Statement, dass ein Niedrigdosis-CT screening für das Bronchialkarzinom generell nicht zu empfehlen ist, es sei denn in Studien.

Über den Umgang mit solitären Subcentimeter-Lungenrundherden gibt es zwar differenzierte ACCP-Empfehlungen, diese sind aber mit dem niedrigsten Empfehlungsgrad 2C – uncertain – versehen.

So sollen Patienten ohne Vortest-Wahrscheinlichkeit für Malignität und mit einem solitären Lungenrundherd <4 mm im Durchmesser nicht nachuntersucht werden, jedoch Patienten mit einem solitären Lungenrundherd >4 bis 6 mm im Durchmesser nach 12 Monaten und mit einem solitären Lungenrundherd >6 bis 8 mm im Durchmesser nach 6 bis 12 Monaten mittels Computertomographie kontrolliert werden. Patienten mit solitären Subcentimeter-Lungenrundherden und Risikofaktoren für ein Bronchialkarzinom sollen dagegen auch dann kontrolliert werden, wenn der Rundherd einen Durchmesser von weniger als 4 mm hat.

Genetische Aberrationen, Tumormarker, Autoantikörperprofile

Computertomographische Untersuchungen zum Screening von Patienten mit hohem Risiko für ein Bronchialkarzinom führen, wie beschrieben, zur Entdeckung von solitären pulmonalen Rundherden, deren Prävalenz in der Bevölkerung zwischen 8 % und 51 % liegt, während die Prävalenz maligner SPNs mit 1,1 % bis 12 % angegeben wird (Veronesi et al., 2006; Henschke et al., 2004; Gohagan et al., 2004; Li et al., 2004; Swensen et al., 2003; Nawa et al., 2002; Henschke et al., 2001; Diederich et al., 2000).

Mittels Computertomographie lassen sich damit Bronchialkarzinome in einem frühen Stadium entdecken, und aus der konsekutiven, potenziell kurativen Resektionsbehandlung resultiert eine gute Prognose mit 5-Jahresüberlebensraten von 60 % bis 80 % (Tockman, 1986; Mountain, 1997; Manser et al., 2005; The International Early Lung Cancer Action Program Investigators, 2006).

Die Prävalenz der Gesamtheit der solitären pulmonalen Rundherde ist deutlich höher als die Prävalenz der solitären malignen Rundherde und die Differentialdiagnose schwierig. Es resultiert eine große Zahl falsch positiver maligner Rundherde, so dass schließlich Patienten mit benignen Rundherden operiert werden, ohne dass in Wirklichkeit die Notwendigkeit dazu besteht. Daraus ergibt sich eine Erhöhung der Gesamtzahl der operationsbedingten Todesfälle und Komplikationen (Artinian und Kvale, 2005; Marshall, 2008; Reich, 2008). Dies ist neben

anderen Gründen ein Grund zur Aussage des ACCP und anderer medizinischer Gesellschaften, dass ein CT Screening für das Bronchialkarzinom aktuell nicht angebracht sei.

In Bronchialkarzinomzellen gibt es multiple genetische Aberrationen. Diese betreffen alle Lungentumoren, und sie sind unabhängig vom histologischen Subtyp des Karzinoms. Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen treten dabei am häufigsten auf. So zeigen etwa 50 % der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome und mehr als 70 % aller kleinzelligen Bronchialkarzinome Mutationen im p53-Gen (Pfeifer et al., 2002). Weitere häufige Auffälligkeiten sind Störungen im Retinoblastom-Signalweg und der Verlust der Heterozygotie des kurzen Arms von Chromosom 3. Bei etwa 90 % der hochmalignen neuroendokrinen Bronchialkarzinome wurde eine fehlende Rb-Expression beschrieben (Beasley et al., 2003), und in mehr als 80 % der Bronchialkarzinome ließen sich ein Verlust eines oder mehrerer Allele, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 lokalisiert sind, nachweisen. Darüber hinaus wird auch die Überexpression von Genen, z.B. auf dem langen Arm von Chromosom 3 beschrieben (Comtesse et al., 2007). Eine weitere Studie ergab eine erhöhte Frequenz von Chromosomenbrüchen in diesem Bereich bei aktiven Rauchern (Stein et al., 2002).

Die Analysen der pathologischen genetischen Besonderheiten im Tumorgewebe sind wichtig zum Verständnis des Tumorgeschehens, sie bringen aber keine Fortschritte in der nicht-invasiven Frühdiagnostik. Eine frühe Diagnose eines Tumors könnte im Idealfall durch sogenannte Tumormarker gestellt werden, das sind Proteine, Peptide oder andere chemische Verbindungen in Blut und anderen Körperflüssigkeiten, deren erhöhte Konzentration auf einen bestimmten Tumor oder ein Rezidiv eines bestimmten Tumors schließen lässt, wie z.B. α -1-Fetoprotein bei Keimzelltumoren und NSE (Neuronenspezifische Enolase) beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom sind die Marker 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 das C-reaktive Protein (CRP) bisher untersucht und zum Einsatz gekommen (Molina et al., 2003; Greenberg und Lee, 2007). Auf Grund ihrer geringen Spezifität sind alle Tumormarker (mit Ausnahme von α -1-Fetoprotein und β -HCG bei Keimzelltumoren) jedoch nur zur Verlaufskontrolle und nicht zu primärer Diagnostik und Differenzialdiagnostik geeignet.

Der ideale Tumormarker für den diagnostischen Einsatz sollte sensitiv und spezifisch sein, er sollte früh und beim asymptomatischen Patienten auftreten und eine lange Halbwertszeit aufweisen.

Tumor induzierte Autoantikörper erfüllen einige dieser Kriterien. Das Immunsystem reagiert auf eine maligne Erkrankung und kann durch den Tumor veränderte Proteine und vom Tumor in das Blut sezernierte Proteine erkennen und entsprechend Antikörper gegen diese Tumor assoziierten Proteine bilden (Sahin et al., 1995). Die am häufigsten nachgewiesenen Antikörper gehören zur Immunglobulin G –Klasse (Blaes et al., 2000; Preuss et al., 2002). Ig G Antikörper haben eine lange Halbwertszeit von etwa 23 Tagen (Lobo et al., 2004), sie liegen im Serum in einer relativ hohen Konzentration von 9,5-12,5 mg/ml vor, und ihr Nachweis ist wenig aufwendig und relativ kostengünstig. Darüber hinaus konnten Tumor spezifische Antikörper bis zu 5 Jahre vor einer symptomatischen Tumorerkrankung nachgewiesen werden (Chapman et al., 2008).

Die Mechanismen, die dazu führen, dass Tumorproteine immunogen werden, werden noch nicht vollständig verstanden. Es gibt z.B. Antigene, die nur in Tumorgewebe und in Testisgewebe („cancer-testis antigens“) exprimiert werden. Sogenannte Differenzierungsantigene werden in Tumorgewebe und Normalgewebe exprimiert (Schmits et al., 2002).

Darüber hinaus sind die Produkte viraler, mutierter, überexprimierter und amplifizierter Gene potenziell immunogen (Scanlan et al., 1998; Herve et al., 2002; Comtesse et al., 2007). Auch Spleißvarianten und Proteine mit veränderter posttranslationaler Modifizierung können immunogen werden (Sahin et al., 1999).

Bei Patienten mit Hirntumoren konnte eine humorale Immunantwort nachgewiesen werden, die zu einer frühen Diagnose des Tumors geeignet war (Comtesse et al., 2005).

Die Untersuchung einzelner Autoantigene beim Bronchialkarzinom zeigte aber auch, dass hier niedrige Sensitivität und Spezifität den Einsatz in der Diagnostik und Differenzialdiagnostik limitieren (Yamaguchi et al., 2000; Türeci et al., 2006; He et al., 2007).

Studien bei Hirntumoren (Comtesse et al., 2005), bei Prostatakarzinomen (Wang et al., 2005) und bei Mammakarzinomen (Pavoni et al., 2004) versuchten diese Schwäche dadurch auszugleichen, dass für jede Tumorentität individuelle, eigens zusammengestellte Sets von verschiedenen immunogenen Antigenen eingesetzt wurden. Vergleiche von kleineren Gruppen von Markern (bekannte Antigene, Tumor assoziierte Proteine, andere Serumproteine wie z.B. p53, HER2, CEA, GAGE7, alpha 1-antitrypsin) bei Patienten mit Bronchialkarzinomen und gesunden Probanden erbrachten Hinweise darauf, dass diese Methode ein höheres Potenzial in der Diagnostik eines Bronchialkarzinoms als die Untersuchung singulärer Marker hat (Zhong et al., 2004; 2005; 2006; Patz et al., 2007; Chapman et al., 2008).

Unter Verwendung von 82 Antigenen, die zuvor mittels SEREX –Screening (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) als immunogen identifiziert worden waren, wurden die Seren von 39 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge und die Seren 40 gesunder Probanden mittels serologischer Spotassays untersucht. Die Seren der Patienten mit Plattenepithelkarzinom konnten von den Seren der Gesunden mit einer Sensitivität von 92,9 %, einer Spezifität von 93,1 % und einer Genauigkeit von 93,0 % getrennt werden (Leidinger et al., 2008).

Mit der gleichen Methode konnten ähnlich hohe Sensitivitäten und Spezifitäten auch bei anderen Tumorentitäten im Vergleich mit gesunden Probanden und Patienten mit benignen, in erster Linie entzündlichen Erkrankungen gefunden werden (Keller et al., 2009).

Die gleiche Autorengruppe untersuchte weiterhin 47 Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom, 80 Kontrollseren und 26 Seren von Patienten mit nicht-malignen Lungenerkrankungen. In einem Primärscreening mittels Proteinmacroarrays wurden 38016 *E. coli* exprimierte Proteine einer „fetal brain“ cDNA Expressionsbibliothek eingesetzt. Davon erwiesen sich 1827 Peptidklone als reaktiv, die dann auf „customized macroarrays“ mit den zu untersuchenden Seren gescreent wurden. Dabei wurden eine Sensitivität von 97,9 %, eine Spezifität von 97,0 % und eine Genauigkeit von 97,6 % erreicht (Leidinger et al., 2010).

Es hat sich damit gezeigt, dass mit Hilfe einer Vielzahl von Autoantikörpern im Serum des zu Untersuchenden die Unterscheidung Patient mit Bronchialkarzinom – gesunder Patient möglich ist. Darüber hinaus ist es auch gelungen, mit dieser Methode entzündliche Krankheitsbilder und Malignome zu trennen.

Von den führenden nationalen und internationalen Fachgesellschaften sind in den letzten Jahren Leitlinien zur Abklärung eines solitären Lungenrundherdes veröffentlicht worden. Die aktuellsten und am meisten beachteten Leitlinien stammen von der Fleischner Society (Macmahon et al., 2005) und vom American College of Chest Physicians (Gould et al., 2007). Die Diagnostik basiert dabei immer auf radiologischen, ggfs. nuklearmedizinischen Methoden. Nach wie vor bleibt der solitäre Lungenrundherd aber ein diagnostisches Problem, und selbst wenn die Malignität eines individuellen solitären Herdes als wenig wahrscheinlich angesehen wird, führt die verbleibende Unsicherheit zumindest zu wiederholten Kontrolluntersuchungen, die den Patienten einer Strahlenbelastung unterwerfen, so dass diese Leitlinien wiederum für „jüngere“ Patienten keine Gültigkeit besitzen.

Darüber hinaus sind viele solitäre Lungenrundherde die frühen Formen von Bronchialkarzinomen, die dann, wenn eine T1N0-Erkrankung vorliegt, chirurgisch potenziell kurativ therapierbar sind, so dass eine gute Prognose resultieren kann. Diese Tumoren rechtzeitig zu diagnostizieren, ist das Ziel von Screening Untersuchungen. Aktuell ist der Focus dabei in erster Linie auf radiologische Methoden gerichtet. Es besteht aber zur Zeit Übereinstimmung in den Leitlinien der nationalen und internationalen Gesellschaften, dass ein Niedrigdosis-CT Screening nur in Studien empfohlen wird (Bach et al., 2007; Midthun und Jett, 2009).

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob durch Seroreaktivitätsprofile (Autoantikörperprofile) ein Beitrag zur Diagnostik und Differenzialdiagnostik des solitären Lungenrundherdes und damit auch zum Bronchialkarzinom Screening geleistet werden kann.

Material und Methoden

Patientenseren

Patienten, bei denen wegen eines Bronchialkarzinoms oder wegen des Verdachtes auf ein Bronchialkarzinom eine Thorakotomie bzw. eine diagnostische Thorakotomie, jeweils mit Resektionsbehandlung, erfolgte, wurde vor der Operation, und zwar unmittelbar nach Einleitung der Narkose, eine Blutprobe entnommen. Die Patienten hatten dazu nach erfolgter Aufklärung ihre Einwilligung erteilt. Für die Studien „Neue potenzielle Marker für Diagnose und Prognose nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome“ und nachfolgend für „Seroreaktivitätsmuster (Autoantikörperprofile) zur minimal invasiven Diagnostik von Bronchialkarzinomen“ liegen positive Voten der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes vor.

Das Serum wurde aus den Blutproben isoliert und in aliquoten Teilen bei minus 70° C tiefgefroren.

Unter den Patienten, von denen präoperative Serumproben vorliegen (n=673), konnte eine Subgruppe von Patienten, die wegen eines solitären Lungenrundherdes operiert wurden, identifiziert werden. Diese Subgruppe ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Sie besteht aus insgesamt 148 Patienten bzw. deren Seren.

Der Zeitraum der Akquisition des Hauptanteils (n=143) der Seren liegt zwischen November 2005 und November 2009. Fünf Seren stammen von einer früheren Patientengruppe aus den Jahren 1999 bis 2001.

Die Gemeinsamkeit der 148 Patienten dieser Subgruppe ist der solitäre pulmonale Rundherd, der endobronchial nicht nachweisbar war und von dem präoperativ keine histologische Diagnose vorlag. Die histologische Diagnose des jeweiligen Befundes, der präoperativ als Rundherd imponierte, erfolgte vorläufig und intraoperativ am Kryoschnitt und schließlich endgültig und postoperativ am Paraffinschnitt und nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung, unter Umständen nach zusätzlichen und speziellen immunhistochemischen Untersuchungen. Die Diagnosen und die Tumorstadien sind somit alle histopathologisch gesichert, d.h. bei den Bronchialkarzinomen sind die Tumorstadien alle formal pT1 pN0-2 cM0 (UICC, 6. Auflage, 2002).

Die Patientenseren stammten von 51 Patienten mit Bronchialkarzinom im Stadium T1N0, von 9 Patienten im Stadium T1N1 und von 4 Patienten im Stadium T1N2. Weitere 19 Seren stammten von Patienten mit benignen Lungentumoren, 35 Seren von Patienten mit Metasta-

sen von Tumoren extrathorakaler Organe und 30 Seren von Patienten mit entzündlich bedingten und anderen nicht-tumorösen pulmonalen Rundherden (Tabellen 1-6).

Als Kontrollgruppe dienten 48 Seren von gesunden Blutspendern. Bei keinem der Blutspender war nach Anamnese, klinischer Untersuchung und nach der Akte des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin eine vorbestehende Erkrankung bekannt.

Tabellen der Rohwerte

Tabelle 1: Patienten mit Bronchialkarzinom im Tumorstadium pT1 pN0 cM0 (UICC, 2002) (PEC: Plattenepithelkarzinom; sclc: kleinzelliges Karzinom; Adeno-Ca: Adenokarzinom; BAC: bronchioloalveoläres Karzinom; A-squa. Ca: Adenosquamöses Carcinom; großz. Ca: großzelliges Karzinom (WHO, 2001))

Nr.	Archiv-Nr.	Alter	Geschlecht	Op.-datum	Resektionsverfahren	Histologische Diagnose	TNM (UICC 2002)
1.	10	74	m	30.12.98	Res. re. OL	PEC	T1N0
2.	63	78	m	15.06.00	ML Resektion	PEC	T1N0
3.	290	57	m	27.02.06	Res. re. OL	sclc	T1N0
4.	295	79	f	13.03.06	Res. re. OL	Adeno-Ca	T1N0
5.	304	54	f	03.04.06	Res. re. OL	Adeno-Ca	T1N0
6.	318	82	m	22.05.06	ML Resektion	PEC	T1N0
7.	321	81	m	12.06.06	Res. re. UL	Adeno-Ca	T1N0 Adeno-Ca
8.	336	51	m	24.07.06	ML Resektion	Adeno-Ca	T1N0
9.	337	72	f	24.07.06	Res. S2 re.	PEC	T1N0
10.	349	69	m	04.09.06	Res. li. OL	PEC	T1N0
11.	358	84	m	02.10.06	Res. re. UL	PEC	T1N0
12.	363	59	m	16.10.06	Res. li. OL	PEC	T1N0
13.	367	67	m	23.10.06	Res. re. OL	PEC	T1N0
14.	369	78	m	30.10.06	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N0
15.	371	78	m	13.11.06	Res. li. UL	PEC	T1N0
16.	397	69	m	12.02.07	Res. li. UL	Adeno-Ca	T1N0

17.	415	73	m	02.04.07	Res. re. UL	Adeno-Ca	T1N0
18.	416	78	m	02.04.07	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N0
19.	426	73	f	30.04.07	Res. re. OL	PEC	T1N0
20.	429	69	f	30.04.07	Res. re. OL	PEC	T1N0
21.	431	75	m	07.05.07	inf. Bilobektomie	PEC	T1N0
22.	448	64	f	11.06.07	ML Resektion	Karzinoid	T1N0
23.	453	62	m	18.06.07	Res. re. OL	BAC	T1N0
24.	464	71	m	16.07.07	Res. re. UL	PEC	T1N0
25.	469	70	f	23.07.07	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N0
26.	475	74	m	07.01.08	Res. re. OL	PEC	T1N0
27.	485	53	f	03.03.08	atyp. Res. li. OL	Karzinoid	T1N0
28.	503	64	m	01.04.08	Res. re. OL	Adeno-Ca	T1N0
29.	534	66	f	20.05.08	Res. S1 li.	PEC	T1N0
30.	548	54	f	25.06.08	ML Resektion	BAC	T1N0
31.	551	57	m	30.06.08	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N0
32.	553	72	f	30.06.08	Res. re. OL	Adeno-Ca	T1N0
33.	563	64	f	28.08.08	Res. li. UL	BAC	T1N0
34.	564	71	m	01.09.08	atyp. Res. re. OL	PEC	T1N0
35.	566	53	m	08.09.08	Res. re. OL	PEC	T1N0
36.	567	62	f	08.09.08	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N0
37.	585	62	m	27.10.08	Res. re. OL	Adeno-Ca	T1N0
38.	592	47	m	10.11.08	Res. re. OL	PEC	T1N0
39.	602	58	f	05.01.09	Res. li. OL	A-squa Ca	T1N0
40.	617	55	f	09.03.09	Res. re. OL	Adeno-Ca	T1N0
41.	618	60	m	16.03.09	Res. re. OL	Adeno-Ca	T1N0
42.	621	70	m	23.03.09	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N0
43.	625	76	m	06.04.09	Res. li. OL	PEC	T1N0
44.	630	66	f	04.05.09	Res. re. OL	Adeno-Ca	T1N0
45.	632	60	f	11.05.09	Res. li. OL	PEC	T1N0
46.	634	54	m	18.05.09	Res. li. OL	PEC	T1N0
47.	637	67	m	25.05.09	atyp. Res. re. UL	PEC	T1N0

48.	638	71	m	25.05.09	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N0
49.	645	62	m	13.07.09	inf. Bilobektomie	PEC	T1N0
50.	648	61	m	27.07.09	Res. li. OL	Karzinoid	T1N0
51.	664	55	f	28.09.09	Res. li. UL	Adeno-Ca	T1N0

Tabelle 2: Patienten mit Bronchialkarzinom im Tumorstadium pT1pN1cM0

Nr.	Archiv- Nr.	Alter	Geschlecht	Op.-datum	Resektionsverfahren	Histologie	TNM (UICC 2002)
1.	27	60	m	19.05.99	Res. li. OL	größz. Ca	T1N1
2.	44	67	m	20.10.99	Res. re. OL	PEC	T1N1
3.	78	51	m	25.09.00	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N1
4.	308	56	m	10.04.06	Res. re. OL	Adeno-Ca	T1N1
5.	343	83	f	21.08.06	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N1
6.	353	81	m	18.09.06	Res. li. OL	PEC	T1N1
7.	492	57	f	28.06. 99	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N1
8.	493	68	m	17.03. 08	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N1
9.	578	64	f	16.10. 08	Res. li. UL	Adeno-Ca	T1N1

Tabelle 3: Patienten mit Bronchialkarzinom im Tumorstadium pT1pN2cM0

Nr.	Archiv Nr.	Alter	Geschlecht	Op.-datum	Resektionsverfahren	Histologie	TNM (UICC 2002)
1.	326	78	f	26.06.06	Res re. OL	Adeno-Ca	T1N2
2.	419	66	m	03.04.07	Res. li. OL	PEC	T1N2
3.	481	49	f	25.02.08	Res. re. UL	Adeno-Ca	T1N2
4.	504	70	f	02.04.08	Res. li. OL	Adeno-Ca	T1N2

Tabelle 4: Patienten mit solitären Lungenmetastasen extrathorakaler Malignome

Nr.	Archiv-Nr.	Alter	Geschlecht	Op.-datum	Resektionsverfahren	Histologie des Primärtumors
1.	255	67	m	07.11.05	atyp. Res. re. UL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
2.	258	67	f	14.11.05	Res. re. UL	Hypernephrom
3.	259	68	f	14.11.05	Res. re. UL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
4.	260	60	m	21.11.05	atyp. Res. re. OL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
5.	266	69	m	29.11.05	Res. li. UL	Urothelkarzinom
6.	271	65	f	12.12.05	atyp. Res. re. OL	Mamma-Ca
7.	278	67	f	02.01.06	atyp. Res. + Thoraxwand- resektion	Mamma-Ca
8.	294	54	f	13.03.06	atyp. Res. + Thoraxwand- resektion, Pleurektomie	Mamma-Ca
9.	309	76	f	08.05.06	atyp. Res. + Thoraxwand- resektion	Mamma-Ca
10.	322	72	F	12.06.06	atyp. Res. S6 re.	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
11.	323	79	f	12.06.06	atyp. Res. re. OL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
12.	327	80	f	03.07.06	atyp. Res. re. UL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
13.	328	57	m	03.07.06	atyp. Res. re. OL	Hypernephrom
14.	350	61	f	11.09.06	Res. li. OL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
15.	375	62	f	20.11.06	Res. li. OL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
16.	382	70	m	11.12.06	atyp. Res. Lingula	Mamma-Ca
17.	395	42	m	05.02.07	ML Resektion	Chorion-Ca
18.	404	69	m	05.03.07	Res. li. UL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
19.	409	66	f	19.03.07	Res. der basalen Segmente li. UL	Histiozytom
20.	411	69	f	19.03.07	Res. der basalen Segmente li. UL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
21.	434	63	f	11.05.07	Res. re. UL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
22.	437	71	m	21.05.07	atyp. Res. li. OL	Urothel-Ca
23.	442	68	F	01.06.07	atyp. Res. + Pleurektomie	Mamma-Ca
24.	447	69	f	08.06.07	atyp. Res. + Pleurektomie	Mamma-Ca
25.	467	70	m	23.07.07	atyp. Res. li. UL	Adeno-Ca v. colorectalen Typ
26.	468	78	f	23.07.07	Res. re. UL	Adeno-Ca

27.	502	72	m	31.03.08	atyp. Res. re. OL	v. colorectalen Typ Urothelkarzinom
28.	541	20	f	06.06.08	atyp. Res. li. OL	Plasmozytom
29.	546	54	m	16.06.08	Res. re. OL	Fibrosarkom
30.	570	65	f	17.09.08	atyp. Res. aus S8 li.	follikuläres Schilddrüsen-Ca
31.	573	64	f	25.09.08	atyp. Res. li. OL	Adeno-Ca
32.	577	73	m	13.10.08	Bilobektomie	v. colorectalen Typ Adeno-Ca
33.	600	64	f	11.05.09	atyp. Res. + Thoraxwand- resektion	v. colorectalen Typ Rippenmetastase eines Ade- nocarzinoms
34.	639	74	m	08.06.09	atyp. Res. re. OL	Adeno-Ca
35.	643	72	f	06.07.09	Res. li. OL	v. colorectalen Typ Mamma-Ca

Tabelle 5: Patienten mit entzündlichen und anderen nicht-tumorösen Rundherden

Nr.	Archiv-Nr.	Alter	Geschlecht	Op.-datum	Resektionsverfahren	Histologische Diagnose
1.	251	82	f	31.10.05	ML Resektion	Nekrose
2.	247	55	m	19.12.05	Res. li. OL	Kaverne, Aktinomykose
3.	277	46	m	20.12.05	atyp. Res. re. OL	Anthrakosilikose
4.	283	46	f	16.01.06	atyp. Res. S1 + 8	Anthrakose
5.	298	58	f	20.03.06	Res. S1	Rundatelektase
6.	311	59	m	08.05.06	Res. re. UL	Pneumonie
7.	341	73	m	21.08.06	Res. S2 re.	Rundatelektase
8.	345	58	f	28.08.06	atyp. Res. li. OL	Lungeninfarkt
9.	348	62	f	04.09.06	atyp. Res. li. UL	Pneumonie
10.	354	57	f	18.09.06	Res. re. UL	Echinococcus
11.	362	54	m	09.10.06	atyp. Res. re. UL	Pneumonie
12.	372	63	f	13.11.06	atyp. Res. li. OL	chron. Pneumonie
13.	374	77	m	20.11.06	Res. S1 li.	Rundatelektase
14.	377	69	m	27.11.06	atyp. Res. re. OL	Lungeninfarkt
15.	387	74	m	18.12.06	atyp. Res. li. OL	Pneumonie
16.	398	63	m	12.02.07	atyp. Res. re. UL	chron. karnifizierende Pneumonie
17.	420	69	m	16.04.07	Res. S9 re.	chron. Pneumonie

18.	424	68	f	23.04.07	atyp. Res. li. UL	Lungeninfarkt
19.	443	68	m	04.06.07	atyp. Res. S3 re.	Rundatelektase
20.	463	69	m	09.07.07	atyp. Res. OL + ML	Silikose
21.	500	54	m	31.03.08	atyp. Res. li. OL	Kokzidioidomykose
22.	507	79	m	07.04.08	atyp. Res. re. UL	Lungeninfarkt
23.	520	56	m	22.04.08	atyp. Res. re. OL	chron. Pneumonie
24.	529	34	f	05.05.08	atyp. Res. li. UL	Kokzidioidomykose
25.	542	69	f	09.06.08	atyp. Res. re. UL	chron. Peumonie
26.	565	48	f	01.09.08	atyp. Res. aus S10 li.	Nekrose (Infarkt)
27.	579	60	m	20.10.08	atyp. Res. re. OL	Nekrose
28.	605	62	m	19.01.09	atyp. Res. re. OL	chron. Pneumonie
29.	655	76	f	24.08.09	atyp. Res. re. OL	chron. Pneumonie
30.	656	63	m	31.08.09	atyp. Res. li. UL	chron. Pneumonie

Tabelle 6: Patienten mit benignen Tumoren

Nr.	Archiv-Nr.	Alter	Geschlecht	Op.-datum	Resektionsverfahren	Histologische Diagnose
1.	310	71	m	08.05.06	atyp. Res. re. OL	fibröser Pleuratumor
2.	317	72	f	22.05.06	atyp. Res. li. OL	Chondrohamartom
3.	342	53	f	21.08.06	Res. S2 li.	Chondrohamartom
4.	366	54	m	23.10.06	ML Resektion	Chondrohamartom
5.	393	58	f	05.02.07	Res. li. UL	Paragangliom
6.	466	41	m	16.07.07	atyp. Res. re. OL	Chondrohamartom,
7.	490	53	m	10.03.08	Res. S5	Chondrohamartom
8.	495	49	f	25.03.08	atyp. Res. li. UL	Chondrohamartom
9.	530	55	f	05.05.08	Resektion	fibröser Pleuratumor
10.	539	67	m	30.05.08	Res. S6 li.	Chondrohamartom

11.	558	56	f	28.07.08	atyp. Res. li. UL	Leiomyom
12.	568	60	f	15.09.08	atyp. Res. S 3 re.	Chondrohamartom
13.	584	72	m	24.10.08	Zwerchfelltumores.	Fibrom
14.	646	61	f	20.07.09	Res. S6 li.	Chondro-hamartom
15.	647	51	m	27.07.09	Res. re. OL	Lipom
16.	650	43	m	10.08.09	atyp. Res. li. OL	Chondrohamartom
17.	665	71	f	28.09.09	atyp. Res. re. OL	Chondrohamartom
18.	669	52	m	02.11.09	atyp. Res. re. OL	Chondrohamartom
19.	670	54	m	02.11.09	atyp. Res. re. UL	Chondrohamartom

Protein basiertes Macroarray Screening

Primäres Screening

Das Prinzip der Protein basierten Macroarrays besteht darin, dass rekombinant exprimierte Proteine auf einer Membran fixiert werden, welche anschließend mit Serum gescreent werden können (Lopez u. Pluskal, 2003).

Die Herstellung der Proteinmacroarrays und das primäre Screening erfolgten durch das Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) in Heidelberg.

Ausgehend von der mRNA aus fötalem Hirngewebe wurde cDNA synthetisiert. Für die Erstellung der cDNA-Expressions-Bibliothek wurde die cDNA in den *E. coli* Expressionsvektor pQE30NST kloniert. Dazu wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen NotI und Sall geschnitten, danach die cDNA mit den Schnittstellen ligiert. Bei dem Vektor pQE30NST handelt es sich um ein pQE30-Derivat. Er enthält einen IPTG-induzierbaren Promotor und die Sequenz für das RGSHis6-Epitop, so dass die Proteine als RGSHis6-Fusionsproteine exprimiert werden.

Superkompetente *E. coli* SCS1-Bakterien (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) wurden mit einem Helferplasmid pSE111, das u.a. die Sequenz für den lacQ-Repressor, ein Kanamycin-Resistenzgen und das argU-Gen für eine Arginin-tRNA enthält, sowie den rekombinanten pQE-30NST-Vektoren transfiziert (Büssow et al., 2005).

Insgesamt umfasst die fertige cDNA-Expressionsbibliothek (hex 1) 38016 verschiedene bakterielle Expressionsklone (Büssow et al., 2000).

Nach der Transfektion der cDNA-Bank wurden die Klone mit Hilfe eines Picking-Roboters zunächst in mit Flüssigkeit gefüllte Mikrotiterplatten überführt. Zur Herstellung von hochdichten Proteinfiltren der cDNA-Bank wurden die gepickten Klone auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen gespottet, wobei jede Platte auf zwei verschiedenen Koordinaten gespottet wurde, so dass später jeder Klon durch zwei Spots identifiziert werden konnte. Zum Wachsen der Kolonien wurden die Filter auf Agarplatten platziert und schließlich auf Agarplatten mit Induktionsmedium (IPTG) transferiert und zur Proteinexpression inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterienkolonien auf der Membran denaturiert und die Proteine an die Membran fixiert.

Das Primärscreening der Proteinmacroarrays erfolgte mit 38 Pools aus je 5 Seren von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen, von Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen und von gesunden Probanden und einer scvf-Antikörperbank (single-chain variable fragments, GE Healthcare) aus Morbus Crohn-Gewebe. Als Negativkontrollen wurden Macroarrays mit Sekundäranantikörpern (rabbit anti-human IgG, IgM, IgA (H+L)-Cy5, Dianova) hybridisiert.

Vor dem Serumscreening wurden die Proteinmacroarrays mit 96 % Ethanol befeuchtet und anschließend zweimal mit H₂O gespült. Nach Inkubation in Tris gepufferter NaCl-Lösung mit Tween 20 und Triton X 100 (TBST-T) wurden die Kolonien von der Membran abgestreift und zweimal in TBST-T und anschließend viermal in Tris gepuffertem NaCl (TBS) gewaschen. Die Filter wurden mit 3 % (w/v) Magermilchpulver in TBST für 2 h bei Raumtemperatur geblockt und anschließend mit den Seren ü.N. bei 4°C inkubiert (Serum 1:1000 in blocking-Lösung).

Danach wurden die Membranen 3 mal 10 min in Tris gepufferter NaCl-Lösung mit Tween 20 (TBST) gewaschen und über 2 h mit dem an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundäranantikörper (1:1000 in blocking-Lösung, rabbit anti-human IgG, IgM, IgA (H+L)-HRP, Dianova) inkubiert. Nach vier Waschschritten mit TBST und zwei Waschschritten mit TBS von jeweils 10 min erfolgte die Detektion mit ECF Substrat (GE Healthcare). Mit Ausnahme der Seruminkubation bei 4°C erfolgten alle Schritte unter ständigem Schütteln und bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Macroarrays mit einem Flächenscanner (Fuji FLA-3000) bei 473 nm gescannt.

Das primäre Screening erfolgte durch das Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) in Heidelberg, ebenso die Auswertung der Scans der Proteinmacroarrays. Mit Hilfe einer spezi-

ellen Software (AIDA, version 4.15) wurden die Filter visuell ausgewertet. Proteinspots, an die Serumantikörper gebunden haben, d.h. positive Spots, heben sich in ihrer Signalintensität deutlich von den Spots ab, an die keine Antikörper gebunden haben.

Sekundäres Screening

Das Sekundärscreening der Seren der Patienten mit pulmonalen Rundherden und der gesunden Probanden erfolgte im Institut für Humangenetik in Homburg.

Im Primärscreening mit allen 38 Serumpools und der Morbus Crohn-Antikörperbank wurden insgesamt 1827 verschiedene cDNA-Expressionsklone als potenzielle Autoantigene identifiziert. Diese wurden analog zu den beschriebenen Protein basierten Macroarrays doppelt auf sogenannte Customized High Density Protein Arrays (7 x 11 cm, Immobilon P, Millipore, Billerica, MA, USA) zum Sekundärscreening gespottet.

Die Macroarrays wurden zweimal mit TBSTT und viermal mit TBS gewaschen, danach mit 3 % (w/v) Magermilchpulver in TBST für 2 h bei Raumtemperatur geblockt und anschließend mit den Seren ü.N. bei 4°C inkubiert (Serum 1:1000 in blocking-Lösung). Nach drei Waschschritten mit TBST wurden die Membranen bei 70°C mit Stripping-Lösung inkubiert. Dabei werden alle gebundenen Antikörper von der Membran gelöst. Durch diesen Vorinkubationsschritt werden Serumantikörper, die gegen bakterielle Proteine gerichtet sind, aus dem Serum herausgefiltert. Die Filter wurden dazu 3 mal 10 min in TBST bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend 30 min mit 70°C warmer Stripping-Lösung inkubiert.

Danach erfolgte mit demselben Serum - nach zweimaliger TBST-, viermaliger TBS-Waschung und Inkubation mit blocking-Lösung – eine erneute ü.N. Inkubation bei 4°C. Dann wurden die Macroarrays dreimal in TBST gewaschen und mit dem Cyanine 5-markierten sekundären Antikörper (1:1000 in blocking-Lösung, rabbit anti-human IgG, IgA, IgM-Cy5, (H+L)) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen viermal mit TBST und zweimal mit TBS gewaschen, danach mit dem Typhoon 9410 – Flächenscanner (PMT: 300, Pixel Size: 50 microns, Emission Filter: 670 BP 30 Cy5) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) gescannt. Die Auswertung der gescannten Proteinmacroarrays erfolgte mittels einer speziellen Software (AIDA, version 4.15; raytest, Straubenhardt, Deutschland) und einer dazu neu entwickelten Computer gestützten Analysenprozedur.

Computergestützte Bildanalyse der Proteinmacroarrays

In der Kooperation des Humangenetischen Instituts der Universität des Saarlandes in Homburg mit dem Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes in Saarbrücken wurde ein Computer gestütztes automatisches Erfassungs- und Auswertungssystem entwickelt, um eine standardisierte und objektive Auswertung der Proteinmacroarrays zu gewährleisten. In einem ersten Schritt („preprocessing“) wurden die gescannten Bilder der Arrays standardisiert, d.h. Verschiebungen der Bilder wurden korrigiert, und die Bilder virtuell richtig zugeschnitten. Im zweiten Schritt („gridding“) wurden die Arrays in 384 Subarrays eingeteilt. Jedes Subarray enthält 25 Felder („clustering“), wovon der mittlere Spot immer ein Orientierungspot aus Tinte ist. In jedem Subarray können also theoretisch 12 Klone jeweils zweimal gespottet sein. Wenn ein Spot deutlich größer als die anderen war und über sein Feld hinausragte, erfolgte eine Nachkorrektur („grid refinement“).

Im zweiten Schritt wurde mittels 3-means Clusteranalyse jedes der 25 Felder in Vordergrundpixel und in Hintergrundpixel getrennt. Die drei Cluster entsprechen den Hintergrundpixeln, den hellen Vordergrundpixeln und den dunklen Vordergrundpixeln. Um die dunklen Vordergrundspots von dem hellen Hintergrund zu trennen, wurde die sog. black top-hat Transformation angewandt (Soille, 2003).

Die vollständig automatisierte Computeranalyse konstruierte für jeden Proteinmacroarray ein Autoantikörperreaktivitätsmuster, das aus 1827 Intensitätswerten bestand, deren einzelne Werte von 0 bis 255 reichten. Als Wert für eine Serumprobe wurden die Mittelwerte für die gespotteten Duplikate eingesetzt. Um die Proteinmacroarrays direkt vergleichbar zu machen und die Schwankungen in der Helligkeit, wie sie z.B. während des Scannens entstehen, auszuschalten, erfolgte eine quantile Normalisierung der Intensitätswerte der 1827 Proteine (Bolstad et al., 2003).

Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Arrays erwies sich die Berechnung der „area under the Receiver Operator Characteristics curve“ (AUC) mit anschließender Anwendung der statistischen Lernmethode „Support Vector Machine“ (SVM) als am besten geeignet (Vapnik, 2000).

Die Berechnung der AUC-Werte wurde folgendermaßen durchgeführt: Die normalisierten Intensitätswerte aller Seren (Kontrollen und alle Rundherde) wurden als Schwellenwerte benutzt. Beim Vergleich einer zu untersuchenden Gruppe (z.B. Patienten mit Tumor) mit einer Vergleichsgruppe oder der Kontrollgruppe (z.B. gesunde Kontrollen) wurden Seren der zu untersuchenden Gruppe, die über dem Schwellenwert lagen, als richtig positiv (true positive)

bezeichnet, alle Seren der zu untersuchenden Gruppe, die unter dem Schwellenwert lagen als falsch negativ (false negative). Seren der Vergleichsgruppe, deren Werte über dem Schwellenwert lagen, sind falsch positiv (false positive) und bei Werten unter dem Schwellenwert richtig negativ (true negative).

(Wenn eine stärkere Immunantwort im Serum einer Vergleichsgruppe oder der Kontrollgruppe vorlag, sind natürlich Seren der zu untersuchenden Gruppe, die unterhalb des Schwellenwertes liegen richtig positiv und Seren oberhalb des Schwellenwertes falsch negativ.)

Danach wurden für jeden Schwellenwert Sensitivität ($TP/(TP+FN)$) und Spezifität ($TN/(TN+FP)$) berechnet. Aus der Sensitivität und der Spezifität kann die „Receiver Operator Characteristic (ROC) curve“ konstruiert werden. Die ROC Kurve zeigt die Sensitivität (= richtig positiv) als eine Funktion von $1 -$ Spezifität (= falsch positiv). Die Areale unter der ROC Kurve (AUC Werte) reichen von 0 bis 1.

Klone mit einer AUC von 0,5 sind wertlos, denn sie können nicht trennen. Klone mit einer AUC von 0 oder 1 sind ideal, denn sie zeigen eine komplette Trennung der Gruppen an. Je mehr also ein AUC von dem Wert 0,5 abweicht, desto besser eignet sich der zugehörige Klon zur Trennung zwischen den Gruppen.

Die AUC Werte für jeden immunogenen Klon wurden errechnet, um die Aussagefähigkeit in Bezug auf die Trennung zweier Gruppen zu erkennen.

Die Trennung der zu untersuchenden Gruppe von einer Vergleichsgruppe oder der Kontrollgruppe erfolgte mittels Support Vector Machines.

Für die Klassifizierung mit Support Vector Machine wurde die Kreuzvalidierung eingesetzt. Bei der angewandten 10fachen Kreuzvalidierung zerlegt man den Datensatz zufällig in 10 Teile; einen Teil (10 %) behält man als Validierungssatz, 9 Teile (90 %) werden kombiniert, um den Trainingssatz zu formen. Für jede Klassifizierung wurden insgesamt 100 Kreuzvalidierungsläufe berechnet, zu denen jeweils Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit ermittelt wurden. Aus diesen wurde das arithmetische Mittel bestimmt.

Zusätzlich zu AUC-Berechnung und SVM wurde die Häufigkeit berechnet, mit der jeder einzelne Klon in einer Serumgruppe immunogen war. Im Durchschnitt liegen die Intensitätswerte aller Spots zwischen 30 und 70, und der Intensitätswert von 50 wurde als Schwellenwert gewählt, ab dem ein Spot als positiv angesehen wird. Bei der Häufigkeitsberechnung wurden die Intensitätswerte jedes einzelnen Spots in Ja/Nein Aussagen umgewandelt.

Ergebnisse

Primärscreening

Im Primärscreening (Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) in Heidelberg) wurden Proteinmacroarrays, die aus cDNA der fötalen Hirngewebsbank hex1 mit mehr als 38 000 verschiedenen Peptidklonen generiert wurden, mit Seren von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten und entzündlichen Erkrankungen gescreent. Dabei konnten 1827 verschiedene cDNA Expressionsklone als potenzielle Autoantigene identifiziert werden, mit denen dann – ebenfalls mittels Proteinmacroarray – das Sekundärscreening erfolgte.

Untersuchte Gruppen

Zum Sekundärscreening wurden Patientenserum von 51 Patienten mit Bronchialkarzinom im Stadium T1N0, von 9 Patienten im Stadium T1N1 und von 4 Patienten im Stadium T1N2 eingesetzt (Tumorstadien nach UICC, 6. Auflage, 2002). Weitere 19 Seren stammten von Patienten mit benignen Lungentumoren, 35 Seren von Patienten mit Lungenmetastasen von Tumoren extrathorakaler Organe und 30 Seren von Patienten mit nicht-tumorösen entzündlichen Lungenerkrankungen.

Das mittlere Lebensalter zum Zeitpunkt der Operation betrug in der Gruppe der Patienten mit T1N0-Tumor $66,3 \pm 9,0$, mit T1N1-Tumor $65,2 \pm 11,0$, mit T1N2-Tumor $66,6 \pm 10,8$ Jahre, in der Gruppe der Patienten mit benignen Lungentumoren $57,9 \pm 9,0$, mit Lungenmetastasen von Tumoren extrathorakaler Organe $65,6 \pm 10,9$ und mit nicht-tumorösen entzündlichen Lungenerkrankungen $62,3 \pm 10,7$ Jahre. Es liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen in der Altersverteilung vor.

Das Gemeinsame der Patienten war, dass bei allen präoperativ im Thoraxröntgenbild u./o. im Computertomogramm des Thorax ein Rundherd diagnostiziert worden war, dessen Dignität, auch mit invasiven diagnostischen Maßnahmen, nicht geklärt werden konnte, so dass eine diagnostische Thorakotomie zu Diagnose und gleichzeitiger Therapie – nach Schnellschnittuntersuchung durch den Pathologen - erforderlich war.

Die pretest-Wahrscheinlichkeiten, dass es sich dabei um eine bestimmte Erkrankung handelte, waren von Patient zu Patient verschieden.

Sekundärscreening

Die 1827 Antigen tragenden Klone wurden auf „customized“ Proteinmacroarrays gespottet und mit den Seren der zu untersuchenden Patienten und der Kontrollgruppe gescreent. Die Auswertung erfolgte am Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes in Saarbrücken.

Wie bei cDNA-Bibliotheken zu erwarten, wurde nur ein Teil der DNA-Inserts (509, i.e. 28 %) „in frame“ inkloniert, während der Großteil (72 %) „out of frame“ inkloniert wurde. In frame bedeutet, dass die inklonierte cDNA-Sequenz in der richtigen Orientierung in den Vektor inkloniert ist und damit im gleichen Leseraster abgelesen wird wie in humanen Zellen, so dass das resultierende Protein dem Protein humaner Zellen entspricht. Bei den out of frame-Klonen ist die inklonierte cDNA-Sequenz nicht im gleichen Leseraster wie in der menschlichen Zelle. Daher entspricht das von diesem Klon gebildete Protein nicht dem, das die menschliche Zelle herstellt. Proteine dieser out of frame-Klone können aber dennoch eine Immunreaktion auslösen. In einem solchen Fall spricht man von einem Mimotop, d.h. das von dem out of frame-Klon generierte „falsche“ Protein ähnelt in seiner Aminosäuresequenz und/oder seiner räumlichen Faltung einem anderen Protein, so dass es ein Kreuzantigen darstellt.

Für die statistische Klassifikation ist es irrelevant, ob ein Klon in frame oder out of frame kloniert ist, für die biologische Interpretation der Autoantikörperantwort des Patienten sind in frame Klone von Bedeutung.

Die Detektion der Antigene, die eine Immunantwort hervorrufen, geschieht beim Proteinmacroarray durch einen Fluoreszenzfarbstoff markierten sekundären Antikörper gegen humane Antikörper IgA, IgG und IgM. Für die Auswertung der Proteinmacroarrays wurde eigens vom Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes in Saarbrücken ein Auswertesystem entwickelt, das jedem Proteinspot nach der Hybridisierung mit dem Serum einen Signalintensitätswert zuordnet und damit über die Signalintensität eine Quantifizierung der Immunantwort erlaubt. Die ermittelten Intensitätswerte wurden dann – ebenfalls vom Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes – statistisch ausgewertet.

Klone, die auf mindestens 10 der hybridisierten Filter nicht auswertbar waren, wurden ausgeschlossen.

Klassifizierung der Seren mittels der Seroreaktivitätsprofile

Es erfolgten insgesamt 6 Klassifizierungen unter Benutzung der Autoantikörperprofile gegenüber den immunogenen Klonen:

1. Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. Kontrollgruppe aus gesunden Probanden;
2. Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. alle Rundherde (benigne Tumoren, Metastasen extrathorakaler Tumoren, entzündliche und andere nicht-tumoröse Rundherde);
3. Bronchialkarzinom im TNM-Stadium pT1pN0 vs. alle Rundherde (benigne Tumoren, Metastasen extrathorakaler Tumoren, entzündliche und andere nicht-tumoröse Rundherde);
4. Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. benigne Rundherde (benigne Tumoren);
5. Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. Metastasen extrathorakaler Tumoren;
6. Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. entzündliche und andere nicht-tumoröse Rundherde;

In diesem Zusammenhang wurde, wie beschrieben, die resampling Methode (Kreuzvalidierung) eingesetzt, und zu jeder Klassifizierung wurden 100 Kreuzvalidierungsläufe berechnet, aus denen jeweils Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit ermittelt wurden. Daraus wurde dann Mittelwerte errechnet.

ad 1. Die Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN1-2 vs. Seren von gesunden Kontrollen ergab eine Sensitivität von 78,90 % und eine Spezifität von 77,08 %. Das bedeutet, dass 78,90 % der Tumorseren und dass 77,08 % der Seren der gesunden Kontrollen korrekt erkannt werden. Daraus ergibt sich eine diagnostische Genauigkeit von 77,68 %.

Das 95 %-Konfidenzintervall wurde zur Charakterisierung der Stabilität des statistischen Modells eingesetzt. Es beschreibt das Intervall, in dem sich 95 % der Werte für Sensitivität, Spe-

zifität und Genauigkeit bewegen. Bei der Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN1-2 versus Seren von gesunden Kontrollen liegt das 95 % Konfidenzintervall bei der Sensitivität zwischen 77,86 % und 80,11 %, bei der Spezifität zwischen 74,40 % und 77,68 % und bei der Genauigkeit zwischen 76,66 % und 78,79 %. Damit ist derjenige Bereich, in dem der wahre Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % liegt, ausreichend klein, so dass man von einem stabilen statistischen Modell sprechen kann. Eine weitere Kontrolle der Daten erfolgte mittels Permutation. Hierzu wurden die Werte der beiden jeweiligen Klassifizierungsgruppen zufällig aufgeteilt (Randomisationstest). Insgesamt wurden für jede Klassifizierung 100 Permutationen durchgeführt und für jede Permutation wurden Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit berechnet. Die medianen Werte für die Sensitivität betragen 60,94 % (CI: 59,07-64,84 %), für die Spezifität 43,75 % (CI: 40,48-54,35 %) und für die Genauigkeit 54,91 % (CI: 51,53-55,96 %), d.h. alle liegen im statistisch zufälligen Bereich um 50 %.

ad 2. Die Klassifizierung der Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. Seren der Patienten mit Rundherden anderer Genese (benigne Tumoren, Metastasen extrathorakaler Tumoren, entzündliche und nicht-tumoröse Rundherde) ergab eine Sensitivität von 53,12 % (CI: 52,34-54,22 %), eine Spezifität von 59,52 % (CI: 57,37-60,74 %) und eine Genauigkeit von 56,76 % (CI: 55,40-57,84 %).

Im Permutationstest wurden mediane Werte von 40,62 % (CI: 37,70-41,99 %) für die Sensitivität, 59,52 % (CI: 56,10-60,92 %) für die Spezifität und 50,0 % (CI: 48,49-52,39 %) für die Genauigkeit errechnet.

ad 3. Die Klassifizierung der Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom im TNM-Stadium pT1pN0 vs. Seren der Patienten mit Rundherden anderer Genese (benigne Tumoren, Metastasen extrathorakaler Tumoren, entzündliche und nicht-tumoröse Rundherde) ergab eine Sensitivität von 46,08 % (CI: 44,74-47,61 %), eine Spezifität von 66,67 % (CI: 65,01-67,72 %) und eine Genauigkeit von 59,26 % (CI: 57,80-59,68 %).

Nach der Randomisierung der Werte wurden für die Sensitivität 32,35 % (CI: 31,92-37,68 %), für die Spezifität 67,26 % (CI: 62,95-68,12 %) und für die Genauigkeit 54,44 % (CI: 51,53-56,32 %) errechnet.

ad 4. Die Klassifizierung der Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. Seren der Patienten mit benignen Rundherden (benigne Tumo-

ren) ergab eine Sensitivität von 87,50 % (CI: 86,64-88,36 %), eine Spezifität von 12,37 % (CI: 10,82-13,92 %) und eine Genauigkeit von 69,88 % (CI: 69,47-71,13 %).

Der Permutationstest ergab Werte von 84,38 % für die Sensitivität (CI: 83,01-86,68 %), von 21,5 % für die Spezifität (CI: 14,9-24,03 %) und 70,48 für die Genauigkeit (CI: 67,93-71,82 %).

ad 5. Die Klassifizierung der Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. Seren von Patienten mit Lungenmetastasen extrathorakaler Tumoren zeigte eine Sensitivität von 67,19 % (CI: 66,35-668,65 %), eine Spezifität von 34,29 % (CI: 30,43-334,43 %) und eine Genauigkeit von 55,56 % (CI: 53,95-556,26 %).

Der Permutationstest ergab Werte von 71,88 % für Sensitivität (CI: 68,74-72,82 %), von 30,00 % für die Spezifität (28,67-35,90 %) und von 57,08 % für die Genauigkeit (55,15-59,20 %).

ad 6. Die Klassifizierung der Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. Seren von Patienten mit entzündlichen und nicht-tumorösen Rundherden ergab eine Sensitivität von 78,12 % (CI: 76,33-78,82 %), eine Spezifität von 28,34 % (CI: 26,41-30,59 %) und eine Genauigkeit von 61,70 % (CI: 60,78-63,05 %).

Der Permutationstest ergab Werte von 73,44 % für die Sensitivität (CI: 72,13-776,78 %), von 26,67 % für die Spezifität (225,39-331,27 %) und von 59,57 % für die Genauigkeit (57,57-61,90 %).

Tabelle 7: Klassifizierung der Seren mittels der Seroreaktivitätsprofile. (CI: 95% - Konfidenzintervall)

Klassifikation	Klassifikation			
	Accuracy	Sensitivity	Specificity	
Bronchialkarzinome pT1 pN0-2 cM0 vs. gesunde Kontrollen	0.777	0.789	0.760	Mittelwert
	0.776	0.789	0.770	Median
	0.024	0.025	0.037	Standardabweichung
	0.766	0.778	0.744	Untergrenze CI
	0.787	0.801	0.776	Obergrenze CI
Bronchialkarzinome pT1 pN0-2 cM0 vs. andere Rundherde	0.566	0.532	0.591	Mittelwert
	0.567	0.531	0.595	Median
	0.027	0.021	0.040	Standardabweichung
	0.553	0.523	0.573	Untergrenze CI
	0.578	0.542	0.609	Obergrenze CI
Bronchialkarzinome pT1 pN0 cM0 vs. andere Rundherde	0.587	0.461	0.663	Mittelwert
	0.592	0.460	0.666	Median
	0.021	0.032	0.030	Standardabweichung
	0.577	0.447	0.650	Untergrenze CI
	0.596	0.476	0.677	Obergrenze CI
Bronchialkarzinome pT1 pN0-2 cM0 vs. benigne Tumoren	0.703	0.874	0.123	Mittelwert
	0.698	0.875	0.105	Median
	0.018	0.019	0.035	Standardabweichung
	0.694	0.866	0.108	Untergrenze CI
	0.711	0.883	0.139	Obergrenze CI
Bronchialkarzinome pT1 pN0-2 cM0 vs. Metastasen extrathorakaler Tumoren	0.551	0.675	0.324	Mittelwert
	0.555	0.671	0.342	Median
	0.026	0.026	0.045	Standardabweichung
	0.539	0.663	0.304	Untergrenze CI
	0.562	0.686	0.344	Obergrenze CI
Bronchialkarzinome pT1 pN0-2 cM0 vs. Rundherde entzündl. u. nicht-tumoröser Genese	0.619	0.775	0.284	Mittelwert
	0.617	0.781	0.283	Median
	0.025	0.028	0.047	Standardabweichung
	0.607	0.763	0.264	Untergrenze CI
	0.630	0.788	0.305	Obergrenze CI

AUC-Auswertung der Autoantigene und Frequenz der Autoantikörperreaktion

Die gescreenten Proteine stellen unterschiedlich potente Antigene für die Seren der verschiedenen zu klassifizierenden Gruppen dar, was in den Spot-Intensitäten zum Ausdruck kommt. Aus den Spot-Intensitäten wurde für jedes Antigen und jede Serumgruppe die „Area under the Receiver Operator Characteristics Curve“ (AUC) berechnet. Diese kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen.

Bei der Differenzierung zwischen den zu untersuchenden Gruppen bedeutet ein AUC Wert eines Klons von 1, dass die Spot-Intensitäten dieses Klons in den Seren der Patienten mit T1-Bronchialkarzinom alle unterhalb dem definierten Schwellenwert liegen, während die Spotintensitäten des Klons in den Seren der Kontrollgruppen alle über diesem Schwellenwert liegen. Im Gegensatz dazu bedeutet ein AUC Wert von 0, dass die Spotintensitäten dieses Klons in den Seren der Patienten mit T1-Bronchialkarzinom alle oberhalb des definierten Schwellenwertes liegen, während die Spotintensitäten des Klons in den Seren der Kontrollgruppen alle diese Schwelle nicht erreichen. In beiden Fällen (AUC Wert 0 oder 1) ist eine Differenzierung zwischen den zu untersuchenden Gruppen mit Hilfe dieses Klons möglich und zwar mit einer Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit von jeweils 100 %. Antigene mit einer AUC von 0,5 haben für eine Klassifizierung keine Aussagekraft, Antigene mit einer AUC unter 0,3 und über 0,7 sind informativ.

Bei der Klassifizierung **Bronchialkarzinome (T1N0-2) versus gesunde Probanden** wurden 14 Klone mit AUC Werten unter 0,3 und 3 Klone mit AUC Werten über 0,7 gefunden. Hier von waren 4 (Nr. 496, 524, 653, 743) bzw. 1 Klon (Nr. 1203) „in frame“ und 10 (Nr. 40, 65, 234, 248, 390, 500, 503, 908, 1243, 1318) bzw. 2 Klone (Nr.1234, 1368) „out of frame“. Der am besten diskriminierende Klon (Nr. 1203) hatte eine AUC von 0,75, war jedoch „out of frame“.

14 der diskriminierenden Klone reagieren damit stärker mit den Seren der Patienten mit Bronchialkarzinomen und nur 3 der diskriminierenden Klone reagieren stärker mit den Seren der gesunden Probanden.

180 von 1827 getesteten Proteinen waren nicht auswertbar und wurden ausgeschlossen.

„In frame“, AUC unter 0,3:

Nr. 496: MPMGp 800`E07535 (rab3 GTPase-activating protein non-catalytic);

Nr. 524: MPMGp 800`E12541 (Ubiquitin);

Nr. 653: MPMGp 800`F11531(Exostosin 2);

Nr.743: MPMGp 800`G04544 (RNA binding motif protein 26),

„In frame“, AUC über 0,7:

Nr. 1203: MPMGp 800`K07551

„Out of frame“, AUC unter 0,3:

Nr. 40: MPMGp 800`A07579 (T-cell lymphoma breakpoint-associated target 1)
Nr. 65: MPMGp 800`A13519 (G protein-coupled receptor 108 isoform 2)
Nr. 234: MPMGp 800`C02537 (C1q and tumor necrosis factor related protein 5)
Nr. 248: MPMGp 800`C03601 (RAB3A member RAS oncogene family)
Nr. 390 : MPMGp 800`D10549 (PR domain containing 8)
Nr. 500 : MPMGp 800`E08523
Nr. 503 : MPMGp 800`E08525 (interleukin 9 receptor isoform 1 precursor)
Nr. 908: MPMGp 800`H17558 (ephrin receptor EphA5 isoform a)
Nr. 1243: MPMGp 800`K14599
Nr. 1318: MPMGp 800`L09581 (tubulin beta)

„Out of frame“, AUC über 0,7:

Nr. 1234 : MPMGp 800`K13545 (PR domain zinc finger protein 8)
Nr. 1368: MPMGp 800`L21545 (nuclease sensitive element binding protein 1)

Die Klassifizierung **Bronchialkarzinome (T1N0-2) versus alle Gruppen der anderen Rundherde zusammen (benigne Lungentumoren bzw. entzündliche und andere nicht-tumoröse Rundherde bzw. Lungenmetastasen extrathorakaler Malignome)** lieferte keine informativen Klone mit AUC-Werten unter 0,3 bzw. über 0,7.

180 von 1827 getesteten Proteinen waren nicht auswertbar und wurden ausgeschlossen.

Die Klassifizierungen **Bronchialkarzinom im Stadium T1N0 versus alle Rundherde (benigne Lungentumoren, entzündliche Rundherde, Lungenmetastasen extrathorakaler Malignome)** lieferte keine informativen Klone mit AUC-Werten unter 0,3 bzw. über 0,7.

180 der getesteten 1827 Proteine waren nicht auswertbar und wurden ausgeschlossen.

Bei der Klassifizierung **Bronchialkarzinome (T1N0-2) versus benigne Lungentumoren** waren insgesamt 9 Klone mit einer AUC unter 0,3 und 6 Klone mit einer AUC über 0,7 zu finden und damit informativ. Hiervon waren 1 Klon mit einer AUC unter 0,3 „in frame“ (Nr. 153) und 8 Klone mit einer AUC unter 0,3 „out of frame“ einkloniert (Nr. 132, 284, 490, 965, 1571, 1624, 1701, 1720). 3 Klone mit einer AUC über 0,7 waren „in frame“ (Nr. 707, 1260,

1601), und 3 Klone „out of frame“ (Nr. 593, 596, 896). Der am besten diskriminierende Klon (Nr. 1701) hatte eine AUC von 0,26, war jedoch „out of frame“.

9 der diskriminierenden Klone reagieren damit stärker mit den Seren der Patienten mit Bronchialkarzinomen und 6 der diskriminierenden Klone reagieren stärker mit den Seren der Patienten mit benignen Lungentumoren.

180 der getesteten 1827 Proteine waren nicht auswertbar und wurden ausgeschlossen.

„In frame“, AUC unter 0,3:

Nr. 153: MPMGp 800`B10544 (RAS dexamethasone-induced 1)

„In frame“, AUC über 0,7:

Nr. 707: MPMGp 800`F22530 (superiorcervical ganglia neural specific 10)

Nr. 1260: MPMGp 800`K19586 (Transcription initiation factor IIB)

Nr. 1601: MPMGp 800`N23532 (nuclear receptor co-repressor 1)

„Out of frame“, AUC unter 0,3:

Nr. 132: MPMGp 800`B04536

Nr. 284: MPMGp 800`C10534 (brain creatine CKB)

Nr. 490: MPMGp 800`E05603

Nr. 965: MPMGp 800`I03598 (surfeit 6)

Nr. 1571: MPMGp 800`N16597 (hypothetical protein LOC755)

Nr. 1624: MPMGp 800`O02575

Nr. 1701: MPMGp 800`O21577 (olfactomedin)

Nr. 1720: MPMGp 800`P01541 (coenzyme Q4 homolog)

„Out of frame“, AUC über 0,7:

Nr. 593: MPMGp 800`E22586 (placental growth factor vascular endothelial)

Nr. 596: MPMGp 800`E23545 (chaperonin)

Nr. 896: MPMGp 800`H15566 (zinc finger protein 91)

Bei der Klassifizierung **Bronchialkarzinome (T1N0-2) versus Lungenmetastasen extrathorakaler Malignome** hatte 1 Klon (Nr. 136) einen AUC Wert über 0,7 und war somit informativ. Er war „in frame“ kloniert.

180 der getesteten 1827 Proteine waren nicht auswertbar und wurden ausgeschlossen.

„In frame“, AUC über 0,7:

Nr. 136: MPMGp 800`B05597

Bei der Klassifizierung **Bronchialkarzinome (T1N0-2) versus Rundherde entzündlicher und anderer nicht-tumoröser Genese** wurden keine informativen Klone mit AUC-Werten unter 0,3 oder über 0,7 gefunden.

180 der getesteten 1827 Proteine waren nicht auswertbar und wurden ausgeschlossen.

Frequenz der Antikörper-Autoantigen-Reaktionen bedeutet die Häufigkeit, mit der Autoantikörper mit den individuellen Proteinklonen reagierten. Sie wurde für jedes der Proteine und für jedes untersuchte Serum bestimmt. Die Schwelle der Intensität, oberhalb der eine Immunantwort als positiv gerechnet wurde, wurde mit 50 festgelegt. (Insgesamt kann die detektierbare Intensität Werte zwischen 0 und 255 annehmen.)

Tabelle 8: Ergebnisse der AUC- und Frequenzberechnung der informativen Klone in der Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinomen der Stadien pT1N0-2 versus Seren gesunder Probanden

ID (MPMGp800`)	Frequenz T1N0-2	Frequenz Normal	AUC T1N0-2 vs. Normal
A07579	0,5469	0,1875	0,2786
A13519	0,6825	0,3333	0,2955
C02537	0,9063	0,6875	0,2664
C03601	0,8281	0,5625	0,2972
D10549	0,6250	0,2979	0,2999
E07535	0,4375	0,1042	0,2839
E08523	0,2813	0,0851	0,2886
E08552	0,8906	0,6250	0,2949
E12541	0,2656	0,0625	0,2961
F11513	0,5469	0,2500	0,2881
G04544	0,8438	0,5833	0,2992
H17558	0,4688	0,2500	0,2871
K07551	0,3906	0,6667	0,7015
K13545	0,4219	0,7500	0,7513
K14599	0,8906	0,7917	0,2822
L08581	0,2969	0,0625	0,2962
L21545	0,7969	0,9792	0,7103

Tabelle 9: Ergebnisse der AUC- und Frequenzberechnung der informativen Klone in der Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinomen der Stadien pT1N0-2 versus Seren der Patienten mit benignen Lungentumoren

ID (MPMGp800`)	Frequenz T1N0-2	Frequenz Benigne Lungen- tumoren	AUC T1N0-2 vs. benigne Lungentumoren
B04536	0,4211	0,2656	0,2845
B10544	0,9443	0,8413	0,2998
C10534	0,6110	0,3809	0,2712
E05603	0,4737	0,1875	0,2894
E22586	0,2105	0,4375	0,7007
E23545	0,1053	0,2656	0,7414
F22530	0,4211	0,6719	0,7048
H15566	0,1053	0,2344	0,7220
I03598	0,7778	0,4355	0,2867
K19586	0	0,1719	0,7245
N16597	0,8332	0,6667	0,2910
N23532	0,5263	0,7869	0,7092
O02575	0,8947	0,6034	0,2904
O21577	1,0000	0,8095	0,2648
P01541	0,9474	0,7586	0,2904

Tabelle10: Frequenzen der Autoantikörper-Antigen Reaktionen der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinomen T1N0-2, der Seren gesunder Probanden, der Seren von Patienten mit benignen Lungentumoren, mit Lungenmetastasen extrathorakaler Malignome und mit entzündlichen solitären Lungenrundherden

(Die Prozentzahlen der ersten Spalte geben an, wie häufig bei einem Protein eine Antikörperreaktion zu verzeichnen ist. Die Zahlen unter den Vergleichsgruppen repräsentieren die Anzahl der Proteine mit bestimmter Immunantwort durch das untersuchte Serum. Z.B.: In der Gruppe T1N0-2 gibt es 15 Proteine (das sind 0,9 % der insgesamt eingesetzten Klone), gegen die 0-10 % der untersuchten Seren eine Immunreaktion zeigen.)

Anzahl der Immunreaktionen gegen das einzelne Protein	T1N0-2	Gesunde Probanden	Benigne Tumoren	Metastasen	Entzündliche Rundherde
0-10 %	15 (0,9%)	57 (3,1 %)	19 (1,0 %)	13 (0,7 %)	20 (1,1 %)
10-20 %	83 (4,5%)	130 (7,1 %)	91 (5,0 %)	52 (2,8 %)	81 (4,4 %)
20-30 %	171 (9,3%)	176 (9,6 %)	164 (8,9 %)	156 (8,5 %)	173 (9,5 %)
30-40 %	191 (10,4%)	173 (9,5 %)	187 (10,2 %)	171 (9,3 %)	187 (10,2 %)
40-50 %	265 (14,5 %)	156 (8,5 %)	234 (12,8 %)	282 (15,4 %)	234 (12,8 %)
50-60 %	228(12,5 %)	226 (12,4 %)	252 (13,8 %)	294 (16,1 %)	252 (13,8 %)
60-70 %	293 (16,0 %)	239 (13,1 %)	297 (16,2 %)	331 (18,1 %)	297 (16,2 %)
70-80 %	287 (15,7 %)	276 (15,1 %)	290 (15,9 %)	256 (14,0 %)	290 (15,9 %)
80-90 %	209 (11,4 %)	213 (11,6 %)	200 (10,9 %)	179 (9,8 %)	200 (10,9 %)
90-100 %	92 (5,0 %)	179 (9,9 %)	91 (5,0 %)	91 (5,0 %)	90 (4,9 %)

Diese Methode der Beschreibung der Häufigkeit von Immunreaktionen gegen die eingesetzten Proteine zeigt lediglich, dass in den Seren aller untersuchten Gruppen in etwa der gleichen Verteilung Antikörper gegen die eingesetzten Proteinklone vorliegen.

Da die Methode eine Binärisierung der Ergebnisse einsetzt, geht viel an Information verloren.

Die AUC-Berechnung erfolgt nicht binär und ist damit weit aussagekräftiger.

Diskussion

Bronchialkarzinomscreening und solitärer pulmonaler Rundherd

Durch Bronchialkarzinome sterben jährlich weltweit mehr Patienten als durch jeden anderen einzelnen Tumor (Parkin et al., 2005) und durch Mamma-, Colon- und Prostatakarzinom zusammen (Jemal et al., 2008). Insgesamt sind 26 % aller Krebstodesfälle bei Männern und 10 % aller Krebstodesfälle bei Frauen auf ein Bronchialkarzinom zurückzuführen (Statistisches Bundesamt, 2007).

Die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom beträgt 15 % bei Männern und 18 % bei Frauen und liegt damit ganz erheblich unter den 5-Jahresüberlebensraten der Patienten mit Mammakarzinom (88 %), Colonkarzinom (65 %) und Prostatakarzinom (100 %) (GEKID, 2006; Jemal et al., 2008).

Für das Bronchialkarzinom existiert keine effektive Screening Methode (wie z.B. für Colonkarzinom und für Mammakarzinom), so dass die Diagnose meist erst beim symptomatischen Patienten gestellt wird, der zu diesem Zeitpunkt aber meist schon inoperabel ist.

Es besteht weitgehende Übereinstimmung darüber, dass die frühzeitige Diagnose eines Bronchialkarzinoms und die entsprechend frühzeitige Therapie die Prognose des Patienten wesentlich verbessern können. So beträgt beispielsweise die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom im Stadium IA (International Association for the Study of Lung Cancer, IASLC), i.e. T1a/b N0 M0, 73 %, im Stadium IB (IASLC), i.e. T2a N0 M0, 58 % (Rami-Porta et al., 2007; Rusch et al., 2007; Detterbeck et al., 2009). Tumoren dieser Stadien stellen sich röntgenmorphologisch als solitäre Lungenrundherde dar.

Prinzipiell kann ein suffizientes Screening damit Leben retten.

Es gibt große Studien und Übersichtsarbeiten über Screeningmethoden, und alle Arbeiten und Leitlinien zeigen insofern Übereinstimmung, dass Röntgenübersichtsaufnahme des Thorax und Sputumzytologie zum Bronchialkarzinomscreening ungeeignet sind (Flehinger et al., 1984; Melamed et al., 1984; Tockman, 1986; Wilde, 1989; Bach et al., 2003, 2007; Humphrey et al., 2004; Artinian und Kvale, 2005).

Die Thoraxröntgenaufnahme ist ein akzeptiertes diagnostisches Mittel, schnell und leicht durchzuführen und ohne wesentliches Risiko, sie ist aber nicht sehr sensitiv. Ausgehend von den Resultaten der drei großen Screening Studien des National Cancer Institutes in den USA (John Hopkins, Baltimore; Memorial Sloan-Kettering, New York; Mayo Clinic, Rochester) schätzten Flehinger und Melamed (1994), dass die Wahrscheinlichkeit, mittels

Thoraxröntgenaufnahme ein Bronchialkarzinom im Stadium I (UICC) zu entdecken, nur etwa 16 % beträgt.

Die sensitivste bildgebende Methode zur Diagnostik von pulmonalen Rundherden ist die Computertomographie. Die konventionelle Computertomographie des Thorax erfordert Strahlendosen und Untersuchungszeiten, die die Methode zum Screening ungeeignet erscheinen lassen. Die Entwicklung der dosisreduzierten helikalen (Spiral-) Computertomographie reduziert Strahlenbelastung und Untersuchungszeit und bietet damit Voraussetzungen zum Screening.

Diese Niedrigdosis-CT Untersuchung des Thorax hat eine Sensitivität und Spezifität in der pulmonalen Rundherddiagnostik wie das konventionelle CT, und beide sind prinzipiell geeignet, ein frühes Bronchialkarzinom zu entdecken (Midthun und Jett, 2009). Mittels moderner CT-Technik kann man Lungenrundherde ab 2-3 mm Durchmesser entdecken. Die mittleren Durchmesser der in Screening Studien mittels CT entdeckten malignen pulmonalen Rundherde waren 9-13 mm (The International Early Lung Cancer Action Program Investigators, (I-ELCAP), 2006; Swensen et al., 2005).

Während außerhalb von Screening Studien nur etwa 20 % der Bronchialkarzinome im Stadium I entdeckt werden, werden in CT-Screening Studien 58 % bis 93 % der Tumoren im Stadium I diagnostiziert (Kaneko et al., 1996; Sone et al., 1998; Henschke et al.: Early Lung Cancer Action Project, (ELCAP), (1999); The International Early Lung Cancer Action Program Investigators, (I-ELCAP), 2006; Roberts et al., 2007; Wilson et al., 2008). Die größte Studie (n=31 567) kombiniert die Ergebnisse von ELCAP und I-ELCAP. Von 484 durch Screening gefundenen Bronchialkarzinomen waren 412 (85 %) im klinischen Stadium I (UICC).

Computertomographische Untersuchungen zum Screening von Patienten mit hohem Risiko für ein Bronchialkarzinom führen damit zur Entdeckung von solitären pulmonalen Rundherden, deren Prävalenz in der systematisch untersuchten Bevölkerung generell zwischen 8 % und 51 % liegt. Die Prävalenz maligner solitärer Lungenrundherde in der Population mit solitären Rundherden liegt zwischen 1,1 % und 12 %. In der jeweils ersten Untersuchung in Screening Studien (Prävalenzuntersuchung) asymptomatischer Individuen fanden sich bei 0,7-2,7 % der Personen nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, in den Kontrolluntersuchungen (Inzidenzuntersuchungen) wurden bei 0,3-1,5 % der Probanden nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome diagnostiziert (Veronesi et al., 2006; Henschke et al., 2004; Gohagan et al., 2004;

Li et al., 2004; Swensen et al., 2003; Nawa et al., 2002; Henschke et al., 2001; Diederich et al., 2000).

Aus der Differenz der Prävalenz der Rundherde und der Prävalenz der malignen Rundherde ergibt sich eine große Zahl benigner solitärer Rundherde, die möglicherweise operiert werden, ohne dass in Wirklichkeit die Notwendigkeit dazu besteht, denn die Diagnostik des solitären pulmonalen Rundherdes ist schwierig, und man muss davon ausgehen, dass in einem hohen Prozentsatz präoperativ eine histologische oder zytologische Artdiagnose nicht gelingt.

Daraus würde eine Erhöhung der Gesamtzahl der operationsbedingten Todesfälle und Komplikationen resultieren (Artinian und Kvale, 2005; Marshall, 2008; Reich, 2008).

In der vorliegenden Untersuchung wurden 33 % (n=49) der Patienten letztendlich wegen eines benignen Tumors bzw. eines entzündlichen Rundherdes operiert, was die Schwierigkeit der Differentialdiagnose der solitären Lungenrundherde unterstreicht, aber in diesem Fall keine Wertung eines Screenings zulässt, da die Rundherde der vorliegenden Studie inzidentell entdeckt wurden.

In einer Screening Studie von Crestanello et al (2004) erwiesen sich 18 % der im CT entdeckten, vermeintlich malignen und schließlich resezierten solitären Lungenrundherde als benigne. In einer anderen Screening Studie waren 20 % der operativ therapierten solitären Rundherde benigne (Diederich et al., 2002). Bach et al. (2007) konnten mittels CT Screening drei mal mehr Bronchialkarzinome als statistisch erwartet finden. Daraus resultierte aber eine zehnfach erhöhte Anzahl an operativen Eingriffen als Folge des Screenings.

Dies ist u.a. ein Grund für die Empfehlung des American College of Chest Physicians (ACCP), der American Cancer Society (ACS) und anderer Gesellschaften, dass ein CT Screening für das Bronchialkarzinom aktuell nicht angebracht sei (Smith et al., 2008).

Um die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse zu reduzieren, wurden in einer aktuellen Screening Studie bei der ersten CT-Untersuchung solide Rundherde mit einem Volumen von weniger als 50 mm^3 als negativ, d.h. nicht maligne, angesehen. Rundherde mit einem Volumen von $50\text{-}500 \text{ mm}^3$, die bei der ersten Kontrolle nach drei Monaten kein Wachstum zeigten, wurden ebenfalls als negativ eingestuft. In gleicher Weise wurden Rundherde, die Wachstum zeigten, aber eine Volumenverdoppelungszeit von mehr als 400 Tagen hatten, als nicht maligne interpretiert. Damit konnte bei der Erstuntersuchung eine Spezifität von 98,3 % und bei der Zweituntersuchung eine Spezifität von 99,0 % erreicht werden (van Klaveren et al., 2009).

Andererseits zeigten sich in einer anderen Screening Studie, dass 27 % der entdeckten malignen Rundherde langsam wachsende Bronchialkarzinome mit Volumenverdopplungszeiten über 400 Tage waren (Lindell et al., 2007).

Es gibt darüber hinaus Screening-inhärente systematische Fehler, z.B. „lead-time bias, length-time bias, overdiagnosis bias“ u.a. (Midthun und Jett, 2009), auf die aber im Zusammenhang mit der vorliegenden Untersuchung nicht eingegangen werden muss und die nur durch den Nachweis einer Senkung der Screening bedingten Mortalität und nicht durch den Nachweis einer Überlebensverlängerung ausgeräumt werden können und randomisierte Studien erfordern (Strauss, 1999).

Die National Lung Screening Studie (NLST) hat bis einschließlich 2004 etwa 53 000 Teilnehmer (Raucher und ehemalige Raucher >30 pack-years im Alter von 55 bis 74 Jahren) in die Gruppen Niedrigdosis Spiral-CT und Thoraxröntgenaufnahme, jeweils als Basis- und follow-up Untersuchung, randomisiert. Man erwartet, dass in dieser Untersuchung eine Reduktion der Mortalität durch CT-Screening nachgewiesen werden kann (Hillman, 2003). Die endgültigen Ergebnisse der NLST und anderer randomisierter Screening Studien (DANTE, Depiscan, NELSON) sind erst in einigen Jahren zu erwarten (Xu et al., 2006; Blanchon et al., 2007; Infante et al., 2008).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ein Screening mit Niedrigdosis-Computertomographie in der Lage ist, deutlich mehr Bronchialkarzinome zu entdecken, mehr Bronchialkarzinome in einem frühen Stadium zu entdecken und das Überleben zu verlängern. Keine Studie konnte jedoch bisher eine Senkung der Mortalität, d.h. gerettete Leben, nachweisen. Bis zur Vorlage anderer Ergebnisse werden Früherkennungsmaßnahmen mittels Computertomographie nur innerhalb von Studien empfohlen (Aberle et al., 2001).

Solitäre pulmonale Rundherde werden auch außerhalb von Screeninguntersuchungen mittels CT gefunden und zwar als „incidental tumors“, wenn im Rahmen pulmonaler, kardialer, thorakaler, abdominaler, vertebraer Symptome die Indikation zu einer CT-Untersuchung gestellt wird, die dann die Lunge oder Teile der Lunge mit abbildet.

Da ein solitärer pulmonaler Rundherd auf Grund seiner geringen Größe eigentlich nie Symptome verursacht, wird er auch nicht zur Indikationsstellung einer computertomographischen Untersuchung führen, es sei denn, der solitäre Rundherd ist bekannt, ist als vermeintlich benigne eingestuft und wird im Verlauf kontrolliert.

Das Vorhandensein eines solitären Lungenrundherdes lässt fast immer den Verdacht auf einen malignen Tumor der Lunge aufkommen. Die Untersuchungen, die zur Identifizierung eines malignen Lungenrundherdes am meisten leisten, sind CT mit Kontrastmittel, PET und CT-gesteuerte transthorakale Punktion.

CT mit Kontrastmittel hat bei der Identifizierung maligner Lungenrundherde eine Sensitivität von 98-100 %, jedoch eine Spezifität von nur 54-93 % (Wahidi et al., 2007).

Die Sensitivität der Positronenemissionstomographie (PET) in der Diagnostik maligner Rundherde beträgt 80-100 %, die Spezifität ist mit 40-100 % niedriger und unterscheidet sich deutlich zwischen den einzelnen Studien (Wahidi et al., 2007). Bei Rundherden, die kleiner als 1 cm im Durchmesser sind und bei niedriger metabolischer Aktivität eines malignen Herdes ist PET oft falsch negativ (Bastarrika et al., 2005).

Die Studien mit CT-gesteuerter Punktion zeigen, wenn die zytologische Untersuchung ein spezifisches benignes oder malignes Ergebnis zeitigt, eine hohe Sensitivität (82-100 %), jedoch mindestens 20 % der Punktionsresultate erwiesen sich in den Studien als unspezifisch und nicht richtungsweisend (Wahidi et al., 2007).

Tumormarker

Unter Tumormarkern versteht man Proteine, Peptide oder andere chemische Verbindungen im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten (z.B. Bronchialsekret, bronchoalveoläre Lavage, Urin u.a.) deren erhöhte oder erniedrigte Konzentration oder Mutation auf einen bestimmten Tumor oder ein Rezidiv eines bestimmten Tumors schließen lässt. Ihr Nachweis stellt die eleganteste und darüber hinaus eine minimal invasive Methode in der Tumordiagnostik dar.

Leider hat sich jedoch gezeigt, dass die einzelnen und in der Diagnostik des Bronchialkarzinoms geprüften Tumormarker nur wenig spezifisch sind (Yamamoto et al., 1996; Yamaguchi et al., 2000; Brichory et al., 2001; He et al., 2007; Türeci et al., 2006). Die gleichzeitigen Untersuchungen von kleineren Gruppen von Markern (bekannte Antigene, Tumor assoziierte Proteine, andere Serumproteine wie z.B. p53, HER2, CEA, GAGE7, alpha 1-antitrypsin) bei Patienten mit Bronchialkarzinomen und gesunden Probanden erbrachten Hinweise darauf, dass die Kombination mehrerer Marker ein höheres diagnostisches Potenzial hat als der einzelne Marker (Zhong et al., 2004; 2005; 2006; Chapman et al., 2008).

Autoantikörper

Tumoren können Autoantikörper induzieren, die sehr spezifische Marker darstellen und die auch prognostische Aussagen zulassen (Blaes et al., 2000) und sehr früh im Verlauf der Erkrankung auftreten können (Chapman et al., 2008).

Prinzipiell kann das erworbene antigenspezifische Immunsystem einen Tumor erkennen (Sahin et al., 1995), aber in den allerwenigsten Fällen mit seinen Effektorzellen, den Lymphozyten, den Tumor zerstören. Es gibt aber eine erste prospektive randomisierte Phase-III-Studie, die belegt, dass Patienten mit fortgeschrittenem Malignen Melanom nach einer tumorspezifischen aktiven Impfung signifikant länger leben (Schwartzentruber und Hwu, 2009).

Bei Patienten mit Hirntumoren konnte eine humorale Immunantwort nachgewiesen werden, die zu einer frühen Diagnose des Tumors geeignet war (Comtesse et al., 2005).

Die Untersuchung einzelner Autoantigene beim Bronchialkarzinom zeigte aber, dass auch hier wie bei allen anderen untersuchten Tumormarkern insbesondere die niedrige Spezifität den Einsatz in der Diagnostik und Differentialdiagnostik limitiert (Yamaguchi et al., 2000; Türeci et al., 2006; He et al., 2007).

Studien über Hirntumoren (Comtesse et al., 2005) und Prostatakarzinome (Wang et al., 2005) versuchten diesen Nachteil auszugleichen, indem für jede Tumorentität individuelle Gruppen verschiedener immunogener Antigene eingesetzt wurden.

Leidinger et al. (2008) untersuchten bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge 82 Autoantigene und konnten mit ihrer Hilfe diese Patienten (n=39) mit einer Sensitivität von 92,9 %, einer Spezifität von 93,1 % und einer Genauigkeit von 93,0 % von gesunden Probanden (n=40) trennen und auch von Patienten mit COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) und Pneumonie unterscheiden.

Mit der gleichen Methode konnten ähnlich hohe Sensitivitäten und Spezifitäten auch bei anderen Tumorentitäten im Vergleich mit gesunden Probanden und Patienten mit benignen, in erster Linie entzündlichen Erkrankungen, gefunden werden (Keller et al., 2009).

Die gleiche Autorengruppe untersuchte weiterhin 47 Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom, 26 Seren mit nicht-tumorösen Lungenerkrankungen (Pneumonie, COPD) und 80 Kontrollseren. In einem Primärscreening mittels Proteinmacroarrays erwiesen sich 1827 Peptidklone als reaktiv, die dann mit den zu untersuchenden Seren gescreent wurden. Dabei wurden in der Trennung der Gruppen „Bronchialkarzinom – gesunde Probanden“ eine Sensitivität von 97,9 %, eine Spezifität von 97,0 % und eine Genauigkeit von 97,6 % erreicht (Leidinger et al., 2010). Daraus resultiert eine Falschpositivrate von 3 % (2 der 80 Kontrollseren wurden falsch als Seren von Tumorpatienten klassifiziert) und eine Falschnegativrate von 2,1 % (1 der 47 Seren von Tumorpatienten wurde falsch als Serum eines gesunden Patienten

der Kontrollgruppe klassifiziert). Zusammengefasst wurden 3 von 127 Seren falsch, d.h. 124 richtig klassifiziert. Eine Unterscheidung zwischen nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom (n=29) und kleinzelligem Bronchialkarzinom (n=18) war nur schlecht möglich (Sensitivität 76,7 %, Spezifität 52,2 %, Genauigkeit 67,3 %).

Mit einer Genauigkeit von 88,5 % konnte zwischen Seren von Bronchialkarzinompatienten und Seren von Patienten mit einer nichttumorösen Lungenerkrankung (COPD/Emphysem, Pneumonie) unterschieden werden.

Es ließ sich damit zeigen, dass Seroreaktivitätsprofile, d.h. Autoantikörpermuster in der Diagnostik des Bronchialkarzinoms hilfreich sein können.

Seroreaktivitätsprofile der Patienten mit solitären pulmonalen Rundherden

Den nächsten Schritt in der Beurteilung der Methode, allein mittels Seroreaktivitätsprofilen unterschiedliche Erkrankungen der Lungen unterscheiden zu können, macht die vorliegende Studie, indem sie Blut von Patientengruppen mit röntgenmorphologisch ähnlichen und gleichzeitig kleinen Lungenrundherden, die jedoch histopathologisch verschiedene Ursachen haben, untersucht.

Bronchialkarzinome, die sich in der Computertomographie als solitäre Rundherde darstellen, sind T1-Tumoren, d.h. sie sind dann, wenn zusätzlich eine N0-Situation vorliegt, Frühformen, die nach potenziell kurativer operativer Therapie eine gute Prognose haben und die man nur durch ein Screening oder inzidentell entdecken kann, da sie keine Symptome verursachen.

Die Größe ist aber nicht immer Ausdruck der biologischen Aggressivität oder Differenzierung eines Tumors. In der ELCAP Studie sind solitäre Subzentimeterrundherde beschrieben, die letztlich Bronchialkarzinome in höheren Tumorstadien (IIIA, IIIB; UICC) waren (Henschke et al., 2001). Auch dies schränkt die Computertomographie als Screening Methode ein.

In zwei Studien wurde der Nachweis mehrerer (5 bis 7) Tumor assoziierter Antigene benutzt, um Bronchialkarzinome zu detektieren (Zhang et al., 2003; Chapman et al., 2008), und es wurden Sensitivitäten von 68 bzw. 76 % und Spezifitäten von 92 bzw. 91 % in der Trennung von Seren der Bronchialkarzinompatienten von Seren gesunder Probanden erreicht. Keine dieser Studien unterscheidet aber zwischen Tumoren in frühen und späten Tumorstadien.

Zhong et al. (2006) untersuchten mit 5 immunogenen Proteinen als Marker die Seroreaktivitätsprofile von Seren aus der Mayo Clinic CT Screening Studie. Sie konnten damit Seren von Tumorpatienten mit T1-Erkrankung von Seren gesunder Probanden mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 91,3 % trennen. 32 von 40 „Tumorseren“ zeigten be-

reits 1 bis 5 Jahre vor der computertomographischen Entdeckung des Tumors ein Antikörperprofil wie manifest an einem Tumor Erkrankte.

Von Leidinger et al. (2009, 2010) wurden Patienten des Tumorstadiums I (i.e. pT1-2 pN0 cM0; UICC, 6. Auflage, 2002) untersucht. Auch in diesen frühen Stadien war eine Trennung zwischen Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom von Seren gesunder Probanden mit einer Sensitivität von 75,9 % und einer Spezifität von 97,6 % möglich.

In der vorliegenden Untersuchung wurden Seren von 51 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom im Stadium T1N0, von 9 Patienten im Stadium T1N1 und von 4 Patienten im Stadium T1N2, 19 Seren von Patienten mit benignen Lungentumoren, 35 Seren von Patienten mit Lungenmetastasen von Tumoren extrathorakaler Organe, 30 Seren von Patienten mit nicht-tumorösen entzündlichen Lungenrundherden und 48 Seren gesunder Blutspender untersucht.

Die Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1 pN0-2 vs. Seren gesunder Kontrollen ergab eine diagnostische Genauigkeit von 77,68 % (Sensitivität: 78,90 %, Spezifität: 77,08 %). Das bedeutet, dass die Trennung von Patienten mit Bronchialkarzinomen, die röntgenmorphologisch als Rundherd auftreten, und gesunden Probanden möglich ist. Bei dieser Klassifizierung gibt es 17 informative Klone mit AUC-Werten, die kleiner als 0,3 bzw. größer als 0,7 sind.

Bei der Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. Seren von Patienten mit benignen Lungentumoren wird eine Trenngenauigkeit von 69,88 % erreicht. Die Sensitivität (Erkennen der Bronchialkarzinome) beträgt 87,50 %, während die Spezifität nur 12,37 % beträgt. Die niedrige Spezifität ist auf die wesentlich kleinere Zahl der Serumproben von Patienten mit benignen Lungentumoren (19 vs. 64) zurückzuführen. Auch in dieser Vergleichskonstellation gibt es ausreichend informative, d.h. trennende Klone (n = 15) mit AUC-Werten, die kleiner als 0,3 bzw. größer als 0,7 sind.

Die Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. Seren von Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen, die sich lediglich als solitärer pulmonaler Rundherd manifestieren, ergab eine Trenngenauigkeit von 61,70 %, eine Sensitivität (Erkennen der Bronchialkarzinome) von 78,12 % und eine Spezifität von 28,34 %. Es fanden sich keine informativen Klone mit AUC-Werten kleiner 0,3 bzw. größer

0,7. Die niedrige Spezifität ist in erster Linie auf die ungleiche Anzahl der Proben (30 vs. 64) zurückzuführen.

Die Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 vs. Seren von Patienten mit solitärer Lungenmetastase extrathorakaler Tumoren ergab eine Trenngenauigkeit von 55,56 %, eine Sensitivität (Erkennen der Bronchialkarzinome) von 67,19 % und eine Spezifität von 34,29 %. Es fand sich ein informativer Klon mit einem AUC-Wert größer 0,7. Die niedrige Spezifität ist in erster Linie auf die ungleiche Anzahl der Proben (30 vs. 64) zurückzuführen.

Die Klassifizierung der Seren der Patienten mit Bronchialkarzinom der TNM-Stadien pT1pN0-2 (maligne solitäre Lungenrundherde) vs. Seren von Patienten mit mit solitären Lungenrundherden anderer Genese (benigne Lungentumoren, entzündliche und nicht-tumoröse Rundherde, Metastasen extrapulmonaler Tumoren) lässt keinerlei Trennung zwischen den beiden großen Gruppen zu. Die Genauigkeit beträgt 56,76 %, die Sensitivität 53,12 % und die Spezifität 59,52 %, d.h. die Zuordnung ist zufällig. Informative Klone mit AUC-Werten größer 0,7 oder kleiner 0,3 konnten nicht gefunden werden.

Die Methode der Proteinmacroarray-Autoantikörperbestimmung lässt somit eine Trennung von Patienten mit Bronchialkarzinom in einem frühen Stadium (pT1pN0-2) und gesunden Probanden zu und kann dadurch eine Bedeutung beim Screening erreichen.

Die Methode ist in der angewandten Form und möglicherweise durch die getroffene Auswahl der Antigene und zur Zeit aber nicht in der Lage, differentialdiagnostische Aussagen in der Beurteilung des solitären Lungenrundherdes zu machen, die über die Aussagen auf der Basis klinischer und insbesondere röntgenmorphologischer Kriterien hinausgehen.

In der Zukunft sollte es aber möglich sein, mit einem kleineren Antigenpool gereinigter und in ganzer Länge kompletter Proteine bessere Ergebnisse zu erreichen (Leidinger et al., 2010).

Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass die Gruppe der Erkrankungen, die sich als Rundherd der Lunge manifestieren, sehr heterogen ist. Bei den Metastasen extrathorakaler Tumoren der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um Karzinommetastasen aus mehreren Organen (Colon, Niere, Mamma, Uterus, Schilddrüse), darüberhinaus um Sarkommetastasen (Fibrosarkom, Histiozytom) und um Plasmozytomherde. Unter den benignen Tumoren sind Chondrohamartome, Fibrome und Lipome und unter den entzündlichen und anderen nicht-tumorösen Rundherden sind Nekrosen, Atelektasen,

anthrakotische und silikotische Herde, Aktinomykose, Echinokokkose und Kokzidioidomykose.

Unter den benignen Lungentumoren sind andererseits 13 von 19 Tumoren Chondrohamartome, was gegenüber den Rundherdgruppen „Lungenmetastasen“ und „entzündliche und andere nicht-tumoröse Herde“ eine größere Homogenität bedeutet. Entsprechend finden sich in der Klassifizierung Bronchialkarzinome vs. benigne Lungentumoren eine Trennungsgenauigkeit von 69,88 % und immerhin 15 Klone mit einer AUC unter 0,3 bzw. über 0,7, die prinzipiell eine Differenzierung der Gruppen zulassen.

Literaturverzeichnis

1. Aberle DR, Gamsu G, Henschke CI, Naidich DP, Swensen SJ (2001) A consensus statement of the Society of Thoracic Radiology: screening for lung cancer with helical computed tomography. *J Thorac Imaging* 16:65-68
2. Artinian V, Kvale PA (2005) Update in screening of lung cancer. *Respirology* 10:558-566
3. Asamura H, Suzuki K, Watanabe S, Matsuno Y, Maeshima A, Tsuchiya R (2003) A clinicopathological study of resected subcentimeter lung cancers: a favorable prognosis for ground glass opacity. *Ann Thorac Surg* 76:1016-1022
4. Baaklini WA, Reinoso MA, Gorin AB, Sharafkaneh A, Manian P (2000) Diagnostic yield of fiberoptic bronchoscopy in evaluating solitary pulmonary nodules. *Chest* 117:1049-1054
5. Bach PB, Kelley MJ, Tate RC, McCrory DC (2003) Screening for lung cancer: a review of the current literature. *Chest* 123:72S-82S
6. Bach PB, Jett JR, Pastorino U, Tockman MS, Swensen SJ, Begg CB (2007) Computed tomography screening and lung cancer outcomes. *JAMA* 297:953-961
7. Bach PB, Silvestri GA, Hanger M, Jett JR (2007) Screening for lung cancer. ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 132:69S-77S
8. Bastarrika G, Garcia-Velloso MJ, Lozano MD, Montes U, Torre W, Spiteri N, Campo A, Seijo L, Alcaide AB, Pueyo J, Cano D, Vivas I, Cosin O, Dominguez P, Serra P, Richter JA, Montuenga L, Zulueta JJ (2005) Early lung cancer detection using spiral computed tomography and positron emission tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1378-1383

9. Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S, Chu WS, Hasleton PS, Travis WD, Brambilla E (2003) The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Hum Pathol* 34:136-142
10. Berrisford R, Brunelli A, Rocco G, Treasure T, Utley M (2005) Audit and guidelines committee of the European Society of Thoracic Surgeons; European Association of Cardiothoracic Surgeons. The European Thoracic Surgery Database project: modelling the risk of in-hospital death following lung resection. *Eur J Cardiothorac Surg* 28:306-311
11. Blaes F, Klotz M, Huwer H, Straub U, Kalweit G, Schimrigk K, Schäfers HJ (2000) Anti-neural and antinuclear autoantibodies are of prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 69:254-258
12. Blanchon T, Brechot JM, Grenier PA, Ferretti GR, Lemarie E, Milleron B, Chague D, Laurent F, Martinet Y, Beigelman-Aubry C, Blanchon F, Revel MP, Friard S, Remy-Jardin M, Vasile M, Santelmo N, Lecalier A, Lefebure P, Moro-Sibilot D, Breton JL, Carette MF, Brambilla C, Fournel F, Kieffer A, Fria G, Flahault A (2007) Baseline results of the Depiscan study: a French randomized pilot trial of lung cancer screening comparing low dose CT scan (LDCT) and chest X-ray (CXR). *Lung Cancer* 58:50-58
13. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics* 19:185-193
14. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, B, Shimosato Y (2001) The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18: 1059-1068
15. Brichory F, Beer D, Le Naour F, Giordano T, Hanash S (2001) Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res* 61:7908-7912
16. Brichory FM, Misek DE, Yim AM, Krause MC, Giordano TJ, Beer DG, Hanash SM (2001) 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* 98:9824-9829

17. Büssow K, Nordhoff E, Lübbert C, Lehrach H, Walter G (2000) A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* 65:1-8

18. Büssow K, Scheich C, Sievert V, Harttig U, Schultz J, Simon B, Bork P, Lehrach H, Heinemann U (2005) Structural genomics of human proteins – target selection and generation of a public catalogue of expression clones. *Microbial Cell Factories* 4:21

19. Chapman CJ, Murray A, McElveen JE, Sahin U, Luxemburger U, Türeci O, Wiewrodt R, Barnes AC, Robertson JF (2008) Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax* 63:228-233

20. Comtesse N, Keller A, Diesinger I, Bauer C, Kayser K, Huwer H, Lenhof HP, Meese E (2007) Frequent overexpression of the genes FXR1, CLAPM1 and EIF4G located on amplicon 3q26-27 in squamous cell carcinoma of the lung. *Int J Cancer* 120:2538-2544

21. Comtesse N, Zippel A, Walle S, Monz D, Backes C, Fischer U, Mayer J, Ludwig N, Hildebrandt A, Keller A, Steudel WI, Lenhof HP, Meese E (2005) Complex humoral immune response against a benign tumor: frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9601-9606

22. Cortese DA, McDougall JC (1979) Biopsy and brushing of peripheral lung cancer with fluoroscopic guidance. *Chest* 75:141-145

23. Cox JE, Chiles C, McManus CM, Aquino SL, Choplin RH (1999) Thoracic needle aspiration biopsy variables that affect risk of pneumothorax. *Radiology* 212:165-168

24. Crestanello JA, Allen MS, Jett JR, Cassivi SD, Nichols FC 3rd, Swensen SJ, Deschamps C, Pairolero PC (2004) Thoracic surgical operations in patients enrolled in a computed tomographic screening trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 128:254-259

25. Croft DR, Trapp J, Kernstine K, Kirchner P, Mullan B, Galvin J, Peterson MW, Gross T, McLennan G, Kern JA (2002) FDG-PET imaging and the diagnosis of non-small cell lung cancer in a region of high histoplasmosis prevalence. *Lung Cancer* 36:297-301
26. Cronin P, Dwamena BA, Kelly AM, Carlos RC (2008) Solitary pulmonary nodules: meta-analytic comparison of cross-sectional imaging modalities for diagnosis of malignancy. *Radiology* 246:772-782
27. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT (2009) The new lung cancer staging system. *Chest* 136:260-271
28. Diederich S, Wormanns D, Lenzen H, Semik M, Thomas M, Peters PE (2000) Screening for asymptomatic early bronchogenic carcinoma with low dose CT of the chest. *Cancer* 89:2483S-2484S
29. Diederich S, Wormanns D, Semik M, Thomas M, Lenzen H, Roos N, Heindel W (2002) Screening for early lung cancer with low-dose spiral CT: prevalence in 817 asymptomatic smokers. *Radiology* 222:773-781
30. Duhaylonsod FG, Lowe VJ, Patz EF Jr, Vaughn AL, Coleman RE, Wolfe WG (1995) Detection of primary and recurrent lung cancer by means of F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110:130-140
31. Flehinger BJ, Melamed MR, Zaman MB, Heelan RT, Perchick WB, Martini N (1984) Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Memorial Sloan-Kettering study. *Am Rev Respir Dis* 130:555-560
32. Flehinger BJ, Melamed MR (1994) Current status of screening for lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* 4:1-15
33. GEKID Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut. (2006) Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 6th ed. Saarbrücken.

34. Ginsberg RJ, Rubinstein LV (1995) Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1N0 non-small cell lung cancer: Lung Cancer Study Group. *Ann Thorac Surg* 60:615-623
35. Gohagan J, Marcus P, Fagerstrom R, Pinsky P, Kramer B, Prorok P; Writing Committee, Lung Screening Study Research Group (2004) Baseline findings of a randomized feasibility trial of lung cancer screening with spiral CT scan vs chest radiograph: the Lung Screening Study of the National Cancer Institute. *Chest* 126:114-121
36. Gould MK, Fletcher J, Iannettoni MD, Lynch WR, Midthun DE, Naidich DP, Ost DE (2007) Evaluation of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer? *Chest* 132:108S-130S
37. Greenberg AK, Lee MS (2007) Biomarker for lung cancer: clinical uses. *Curr Opin Pulm Med* 13:249-255
38. Gupta N, Gill H, Graeber G, Bishop H, Hurst J, Stephens T (1998) Dynamic positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose imaging in differentiation of benign from malignant lung/mediastinal lesions. *Chest* 114:1105-1111
39. Hagberg RC, Segall GM, Stark P, Burdon TA, Pompili MF (1997) Characterization of pulmonary nodules and mediastinal staging of bronchogenic carcinoma with F-18 fluorodesoxyglucose positron emission tomography. *Eur J Cardiothoracic Surg* 12:92-97
40. Hasegawa M, Sone S, Takashima S, Li F, Yang ZG, Maruyama Y, Watanabe T (2000) Growth rate of small lung cancers detected on mass CT screening. *Br J Radiol* 73:1252-1259
41. He P, Naka T, Serada S, Fujimoto M, Tanaka T, Hashimoto S, Shima Y, Yamadori T, Suzuki H, Hirashima T, Matsui K, Shiono H, Okumura M, Nishida T, Tachibana I, Norioka N, Norioka S, Kawase I (2007) Proteomics-based identification of alpha-enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer. *Cancer Sci* 98:1234-1240

42. Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, Libby DM, Pasmantier MW, Koizumi J, Altorki NK, Smith JP (1999) Early Lung Cancer Action Project: Overall design and findings from baseline screening. *Lancet* 354:99-105
43. Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM, McCauley DI, Pasmantier MW, Altorki NK, Smith JP, Miettinen OS (2001) Early lung cancer action project: annual screening using single-slice helical CT. *Ann N Y Acad Sci* 952:124-134
44. Henschke CI, Naidich DP, Yankelevitz DF, McGuinness G, McCauley DI, Smith JP, Libby D, Pasmantier M, Vazquez M, Koizumi J, Flieder D, Altorki N, Miettinen OS (2001) Early lung cancer action project: initial findings on repeat screenings. *Cancer* 92:153-159
45. Henschke CI, Yankelevitz DF, Mirtcheva R, McGuinness G, McCauley D, Miettinen OS, ELCAP Group (2002) CT screening for lung cancer: frequency and significance of part-solid and nonsolid nodules. *AJR Am J Roentgenol* 178:1053-1057
46. Henschke CI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McCauley DI, McGuinness G, Libby DM, Smith JP, Pasmantier MW, Miettinen OS (2004) CT screening for lung cancer: suspiciousness of nodules according to size on baseline scans. *Radiology* 231:164-168
47. Herder GJ, Golding RP, Hoekstra OS, Comans EF, Teule GJ, Postmus PE, Smit EF (2004) The performance of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in small solitary pulmonary nodules. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31:1231-1236
48. Herder GJ, van Tinteren H, Golding RP, Kostense PJ, Comans EF, Smit EF, Hoekstra OS (2005) Clinical prediction model to characterize pulmonary nodules: validation and added value of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Chest* 128:2490-2496
49. Herink M, Linder F (1961) On the diagnosis and prognosis of malignant round foci of the lung. *Dtsch Med Wochenschr* 86:576-579
50. Herve CA, Lugli EB, Brand A, Griffiths DJ, Venables PJ (2002) Autoantibodies to human endogenous retrovirus-K are frequently detected in health and disease and react with multiple epitopes. *Clin Exp Immunol* 128:75-82

51. Hillman BJ (2003) Economic, legal, and ethical rationales for the ACRIN National Lung Screening Trial of CT screening for lung cancer. *Acad Radiol* 10:349-350
52. Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M (2004) 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* 140:740-753
53. Infante M, Lutman FR, Cavuto S, Brambilla G, Chiesa G, Passera E, Angeli E, Chiarenza M, Aranzulla G, Cariboni U, Alloisio M, Incarbone M, Testori A, Destro A, Cappuzzo F, Roncalli M, Santoro A, Ravasi G (2008) Lg cancer screening with spiral CT: baseline results of the randomized DANTE trial. *Lung Cancer* 59:355-363
54. International Early Lung Cancer Action Program Investigators, Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM, Pasmantier MW, Smith JP, Miettinen OS (2006) Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med* 355:1763-1771
55. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics 2008. *CA Cancer J Clin* 58:71-96
56. Kaneko M, Eguchi K, Ohmatsu H, Kakinuma R, Naruke T, Suemasu K, Moriyama N (1996) Peripheral lung cancer: screening and detection with low-dose spiral CT versus radiography. *Radiology* 201:798-802
57. Keller A, Ludwig N, Heisel S, Leidinger P, Andres C, Steudel WI, Huwer H, Burgeth B, Hein M, Weickert J, Meese E, Lenhof HP (2009) Large-scale antibody profiling of human blood sera: the future of molecular diagnosis. *Informatik-Spektrum* 32:332-338
58. Kishi K, Homma S, Kurosaki A, Motoi N, Kohno T, Nakata K, Yoshimura K (2004) Small lung tumors with the size of 1 cm or less in diameter: clinical, radiological, and histopathological characteristics. *Lung Cancer* 44:43-51
59. van Klaveren RJ, Oudkerk M, Prokop M, Scholten ET, Nackaerts K, Vernhout R, van Iersel C, van den Bergh K, van't Westeinde S, van der Aalst C, Thunnissen E, Xu DM, Wang

Y, Zhao Y, Gietema HA, de Hoop BJ, Groen HJM, de Bock GH, van Ooijen P, Weenink C, Verschakelen J, Lammers JW, Timens W, Willebrand D, Vink A, Mali W, de Koning HJ (2009) Management of lung nodules detected by volume CT scanning. *N Engl J Med* 361:2221-2229

60. Leidinger P, Keller A, Ludwig N, Rheinheimer S, Hamacher J, Huwer H, Stehle I, Lenhof HP, Meese E (2008) Toward an early diagnosis of lung cancer: an autoantibody signature for squamous cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 123:1631-1636

61. Leidinger P, Keller A, Heisel S, Ludwig N, Rheinheimer S, Klein V, Andres C, Staratschek-Jox A, Wolf J, Stoelben E, Stephan B, Stehle I, Hamacher J, Huwer H, Lenhof HP, Meese E (2010) Identification of lung cancer with high sensitivity and specificity by blood testing. *Respiratory Research* 11:18

62. Levine MS, Weiss JM, Harrall JH, Cameron TJ, Moser KM (1988) Transthoracic needle aspiration biopsy following negative fiberoptic bronchoscopy in solitary pulmonary nodules. *Chest* 93:1152-1155

63. Li F, Sone S, Abe H, MacMahon A, Doi K (2004) Malignant versus benign nodules at CT screening for lung cancer: comparison of thin-section CT findings. *Radiology* 233:793-798

64. Lindell RM, Hartman TE, Swensen SJ, Jett JR, Midthun DE, Tazelaar HD, Mandrekar JN (2007) Five-year lung cancer screening experience: CT appearance, growth rate, location, and histologic features of 61 lung cancers. *Radiology* 242:555-562

65. Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP (2004) Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 93:2645-2668

66. Lopez MF, Pluskal MG (2003) Protein micro- and macroarrays: digitizing the proteome. *J Chromatogr* 787:19-27

67. Lowe VJ, Fletcher JW, Gobar L, Lawson M, Kirchner P, Valk P, Karis J, Hubner K, Delbeke D, Heiberg EV, Patz EF, Coleman RE (1998) Prospective investigation of positron emission tomography in lung nodules. *J Clin Oncol* 16:1075-1084

68. MacMahon H, Austin JH, Gamsu G, Herold CJ, Jett JR, Naidich DP, Patz EF Jr, Swensen SJ; Fleischner Society (2005) Guidelines for management of small pulmonary nodules detected on CT scans: a statement from the Fleischner Society. *Radiology* 237:395-400
69. Manser R, Wright G, Hart D, Byrnes G, Campbell DA (2005) Surgery for early stage non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD004699
70. Marchevsky AM, Changsri C, Gupta I, Fuller C, Houck W, McKenna RJ Jr (2004) Frozen section diagnoses of small pulmonary nodules: accuracy and clinical implications. *Ann Thorac Surg* 78:1755-1759
71. Marshall E (2008) A bruising battle over lung scans. *Science* 320:600-603
72. Matthies A, Hickeson M, Cuchiara A, Alavi A (2002) Dual time point 18F-FDG PET for the evaluation of pulmonary nodules. *J Nucl Med* 43:871-875
73. Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB, Heelan RT, Perchick WA, Martini N (1984) Screening for early lung cancer. Results of the Memorial Sloan-Kettering study in New York. *Chest* 86:44-53
74. Memtsoudis SG, Besculides MC, Zellos L, Patil N, Rogers SO (2006) Trends in lung surgery: United States 1988 to 2002. *Chest* 130:1462-1470
75. Midthun DE, Jett JR (2009) Screening for lung cancer. *Eur Respir Mon* 44:57-70
76. Midthun DE, Jett JR (2009) Screening for lung cancer. *Eur Respir Mon* 44:57-70
77. Mountain CF (1997) Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 111:1710-1717
78. Molina R, Filella X, Auge JM, Fuentes R, Bover I, Rifa J, Moreno V, Canals E, Vinolas N, Marquez A, Barreiro E, Borrás J, Viladiu P (2003) Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological

diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors. *Tumour Biol* 24:209-218

79. Nakamura H, Saji H, Ogata A, Saijo T, Okada S, Kato H (2004) Lung cancer patients showing pure ground-glass opacity on computed tomography are good candidates for wedge resection. *Lung Cancer* 44:61-68

80. Nawa T, Nakagawa T, Kusano S, Kawasaki Y, Sugawara Y, Nakata H (2002) Lung cancer screening using low-dose spiral CT: results of baseline and 1-year follow-up studies. *Chest* 122:15-20

81. Ohno Y, Hatabu H, Takenaka D, Higashino T, Watanabe H, Ohbayashi C, Sugimura K (2003) CT-guided transthoracic needle aspiration biopsy of small (< or = 20 mm) solitary pulmonary nodules. *Am J Roentgenol* 180:1665-1669

82. Orino K, Kawamura M, Hatazawa J, Suzuki I, Sazawa Y (1998) Efficacy of F-18 Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) scans in diagnosis of pulmonary nodules. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 46:1267-1274

83. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108

84. Patz EF Jr., Campa MJ, Gottlin EB, Kusmartseva I, Guan XR, Herndon JE (2007) Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer. *J Clin Oncol* 25:5578-5583

85. Pavoni E, Vaccaro P, Pucci A, Monteriu G, Beghetto E, Barca S, Dupuis ML, de Pasquale Ceratti A, Lugini A, Cianfriglia M, Cortesi E, Felici F, Minenkova O (2004) Identification of a panel of tumor-associated antigens from breast carcinoma cell lines, solid tumors and testis cDNA libraries displayed on lambda phage. *BMC Cancer* 4:78

86. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P (2002) Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21:7435-7451

87. Potente G, Iacari V, Caimi M (1997) The challenge of solitary pulmonary nodules: HRCT evaluation. *Comput Med Imaging Graph* 21:39-46
88. Präuer HW, Weber WA, Römer W, Treumann T, Ziegler SI, Schwaiger M (1998) Controlled prospective study of positron emission tomography using the glucose analogue [18F] fluorodeoxyglucose in the evaluation of pulmonary nodules. *Br J Surg* 85:1506-1511
89. Preuss KD, Zwick C, Bormann C, Neumann F, Pfreundschuh M (2002) Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev* 188:43-50
90. Prosch H, Mostbeck G (2009) Radiologische Abklärung pulmonaler Rundherde. *Pneumologie* 6:415-426
91. Quekel LG, Kessels AG, Goei R, van Engelshoven JM (1999) Miss rate of lung cancer on the chest radiograph in clinical practice. *Chest* 115:720-724
92. Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, Tsuboi M, Vallieres E, Goldstraw P; International Staging Committee; Cancer Research and Biostatistics; Observers to the Committee; Participating Institutions (2007) The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2:593-602
93. Reich JM (2008) A critical appraisal of overdiagnosis: estimates of its magnitude and implications for lung cancer screening. *Thorax* 63:377-383
94. Reichenberger F, Weber J, Tamm M, Bolliger CT, Dalquen P, Perruchoud AP, Soler M (1999) The value of transbronchial needle aspiration in the diagnosis of peripheral pulmonary lesions. *Chest* 116:704-708
95. Roberts HC, Patsios D, Paul NS, McGregor M, Weisbrod G, Chung T, Herman S, Boerner S, Waddell T, Keshavjee S, Darling G, Pereira A, Kale A, Bayanati H, Sitartchouk I, Tsao M, Sheperd FA (2007) Lung cancer screening with low-dose computed tomography: Canadian experience. *Can Assoc Radiol J* 58:225-235

96. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P; Members of IASLC Staging Committee (2009) The IASLC Lung Cancer Staging Project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 4:568-577
97. Sahin U, Türeci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schober I, Pfreundschuh M (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11810-11813
98. Sahin U, Türeci O, Pfreundschuh M (1999) Vom Immunsystem erkennbare Antigene auf menschlichen Malignomen. *Der Onkologe* 5:659-667
99. Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, Gure AO, Stockert E, Gordan JD, Türeci O, Sahin U, Pfreundschuh M, Old LJ (1998) Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer* 76:652-658
100. Schmits R, Cochlovius B, Treitz G, Regitz E, Ketter R, Preuss KD, Romeike BF, Pfreundschuh M (2002) Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int J Cancer* 98:73-77
101. Schwartzentruber DJ, Lawson D, Richards J, Conry RM, Miller D, Triesman J, Gailani F, Riley LB, Vena D, Hwu P (2009) A phase III multi-institutional randomized study of immunization with the gp100:209-217 (210M) peptide followed by high-dose IL-2 compared with high-dose IL-2 alone in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 27:18s (suppl; abstr CRA9011)
102. Shaffer K (1999) Role of radiology for imaging and biopsy of solitary pulmonary nodule. *Chest* 116:519-522
103. Siegelman SS, Khoury NF, Leo FP, Fishman EK, Braverman RM, Zerhouni EA (1986) Solitary pulmonary nodules: CT assessment. *Radiology* 160:307-312
104. Siegelman SS, Khoury NF, Scott WW Jr, Leo FP, Hamper UM, Fishman EK, Zerhouni EA (1986) Pulmonary hamartoma: CT findings. *Radiology* 160:313-317

105. Siegelman SS, Khouri NF, Scott WW Jr, Leo FP, Hamper UM, Fishman EK, Zerhouni EA (1986) Pulmonary hamartoma: CT findings. *Radiology* 160:313-317
106. Smith RA, Cokkinides V, Brawley OW (2008) Cancer screening in the United States, 2008: a review of current American Cancer Society guidelines and cancer screening issues. *CA Cancer J Clin* 58:161-179
107. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. UICC (2009) TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Wiley Blackwell
108. Soille P (2003) Morphological image analysis. Springer, Berlin New York.
109. Sone S, Takashima S, Li F, Yang Z, Honda T, Maruyama Y, Hasegawa M, Yamanda T, Kubo K, Hanamura K, Asakura K (1998) Mass screening for lung cancer with mobile spiral computed tomography scanner. *Lancet* 351:1242-1245
110. Statistisches Bundesamt (2007) Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland. Wiesbaden.
111. Stein CK, Glover TW, Palmer JL, Glisson BS (2002) Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Genes Chromosomes Cancer* 34:333-340
112. Strauss GM (1999) Screening for lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 8:747-774
113. Suzuki K, Asamura H, Kusumoto M, Kondo H, Tsuchiya R (2002) “Early” peripheral lung cancer: prognostic significance of ground glass opacity on thin-section computed tomographic scan. *Ann Thorac Surg* 74:1635-1639
114. Swensen SJ, Brown LR, Colby TV, Weaver AL (1995) Pulmonary nodules: CT evaluation of enhancement with iodinated contrast material. *Radiology* 194:393-398

115. Swensen SJ, Silverstein MD, Ilstrup DM, Schleck CD, Edell ES (1997) The probability of malignancy in solitary pulmonary nodules: application to small radiologically indeterminate nodules. *Arch Intern Med* 157:849-855
116. Swensen SJ, Silverstein MD, Edell ES, Trastek VF, Aughenbaugh GL, Ilstrup DM, Schleck CD (1999) Solitary pulmonary nodules: clinical prediction model versus physicians. *Mayo Clin Proc* 74:319-329
117. Swensen SJ, Viggiano RW, Midthun DE, Müller NL, Sherrick A, Yamashita K, Naidich DP, Patz EF, Hartman TE, Muhm JR, Weaver AL (2000) Lung nodule enhancement at CT: multicenter study. *Radiology* 214:73-80
118. Swensen SJ, Jett JR, Hartman TE, Midthun DE, Sloan JA, Sykes AM, Aughenbaugh GL, Clemens MA (2003) Lung cancer screening with CT: Mayo Clinic experience. *Radiology* 226:756-761
119. Swensen SJ, Jett JR, Hartman TE, Midthun DE, Mandrekar SJ, Hillman SL, Slykes AM, Aughenbaugh GL, Bungum AO, Allen KL (2005) CT screening for lung cancer: five-year prospective experience. *Radiology* 235:259-265
120. Takashima S, Sone S, Li F, Maruyama Y, Hasegawa M, Kadoya M (2003) Indeterminate solitary pulmonary nodules revealed at population-based CT screening of the lung: using first follow-up diagnostic CT to differentiate benign and malignant lesions. *AJR Am J Roentgenol* 180:1255-1263
121. Tan BB, Flaherty KR, Kazerooni EA, Iannettoni MD; American College of Chest Physicians (2003) The solitary pulmonary nodule. *Chest* 123:89S-96S
122. The International Early Lung Cancer Action Program Investigators (2006) Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med* 355:1763-1771
123. Tockman MS (1986) Survival and mortality from lung cancer in a screened population: The Johns Hopkins Study. *Chest* 89:324S-326S

124. Torrington KG, Kern JD (1993) The utility of fiberoptic bronchoscopy in the evaluation of the solitary pulmonary nodule. *Chest* 104:1021-1024
125. Tozaki M, Ichiba N, Fukuda K (2005) Dynamic magnetic resonance imaging of solitary pulmonary nodules: utility of kinetic patterns in differential diagnosis. *J Comput Assist Tomogr* 29:13-19
126. Türeci O, Mack U, Luxemburger U, Heinen H, Krummenauer F, Sester M, Sester U, Sybrecht GW, Sahin U (2006) Humoral immune responses of lung cancer patients against tumor antigen NY-ESO-1. *Cancer Lett* 236:64-71
127. Union Internationale Contre le Cancer (2002) TNM classification of malignant tumors. 6th ed. New York, NY: Wiley-Liss, 272
128. Vapnik V (2000) The nature of statistical learning theory. Springer
129. Veronesi G, Bellomi M, Mulshine JL, Pelosi G, Scanagatta P, Paganelli G, Maisonneuve P, Preda L, Leo F, Bertolotti R, Solli P, Spaggiari L (2008) Lung cancer screening with low-dose computed tomography: a non-invasive diagnostic protocol for baseline lung nodules. *Lung Cancer* 62:202-214
130. Wada H, Nakamura T, Nakamoto K, Maeda M, Watanabe Y (1998) Thirty-day operative mortality for thoracotomy in lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115:70-73
131. Wahidi MM, Govert JA, Goudar RK, Gould MK, McCrory DC (2007) Evidence for the treatment of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer? ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition) *Chest* 132:94S-107S
132. Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, Mehra R, Montie JE, Pienta KJ, Sanda MG, Kantoff PW, Rubin MA, Wei JT, Ghosh D, Chinnaiyan AM (2005) Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med* 353:1224-1235

133. Warren WH, Faber LP (1994) Segmentectomy versus lobectomy in patients with stage I pulmonary carcinoma: five-year survival and patterns of intrathoracic recurrence. *J Thorac Cardiovasc Surg* 107:1087-1094
134. Wilde J (1989) A 10 year follow-up of semi-annual screening for early detection of lung cancer in the Erfurt County, GDR. *Eur Respir J* 2:656-662
135. Wilson DO, Weissfeld JL, Fuhrman CR, Fisher SN, Balogh P, Landreneau RJ, Luketich JD, Siegfried JM (2008) The Pittsburgh Lung Screening Study (PluSS): outcomes within 3 years of a first computed tomography scan. *Am J Respir Crit Care Med* 178:956-961
136. Winer-Muram HT (2006) The solitary pulmonary nodule. *Radiology* 239:34-49
137. Xu DM, Gietema H, de Koning H, Vernhout R, Nackaerts K, Prokop M, Weenink C, Lammers JW, Groen H, Oudkerk M, van Klaveren R (2006) Nodule management protocol of the NELSON randomised lung cancer screening trial. *Lung Cancer* 54:177-184
138. Ymaguchi K, Patturajan M, Trink B, Usadel H, Koch W, Jen J, Sidransky D (2000) Circulating antibodies to p40(AIS) in the sera of respiratory tract cancer patients. *Int J Cancer* 89:524-528
139. Yamamoto A, Shimizu E, Ogura T, Sone S (1996) D of auto-antibodies against L-myc oncogene products in sera from lung cancer patients. *Int J Cancer* 69:283-289
140. Yamashita K, Matsunobe S, Tsuda T, Nemoto T, Matsumoto K, Miki H, Konishi J (1995) Solitary pulmonary nodule: preliminary study of evaluation with incremental dynamic CT. *Radiology* 194:399-405
141. Yankelevitz DF, Henschke CI (1997) Does 2-year stability imply that pulmonary nodules are benign? *AJR Am J Roentgenol* 168:325-328
142. Yi CA, Lee KS, Kim EA, Han J, Kim H, Kwon OJ, Jeong YJ, Kim S (2004) Solitary pulmonary nodules: dynamic enhanced multi-detector row CT study and comparison with vascular endothelial growth factor and microvessel density. *Radiology* 233:191-199

143. Zerhouni EA, Stitik FP, Siegelman SS, Naidich DP, Sagel SS, Proto AV, Muhm JR, Walsh JW, Martinez CR, Heelan RT (1986) CT of the pulmonary nodule: a cooperative study. *Radiology* 160:319-327
144. Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Koziol JA, Chan EK, Tan EM (2003) Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:136-143
145. Zhong L, Peng X, Hidalgo GE, Doherty DE, Stromberg AJ, Hirschowitz EA (2004) Identification of circulating antibodies to tumor-associated proteins for combined use as markers of non-small cell lung cancer. *Proteomics* 4:1216-1225
146. Zhong L, Hidalgo GE, Stromberg AJ, Khattar NH, Jett JR, Hirschowitz EA (2005) Using protein microarray as a diagnostic assay for non-small cell lung cancer. *AM J Respir Crit Care Med* 172:1308-1314
147. Zhong L, Coe SP, Stromberg AJ, Khattar NH, Jett JR, Hirschowitz EA (2006) Profiling tumor-associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 1:513-519

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. H. Huwer für das Überlassen des Themas und die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. Meese für die Bereitstellung des Laborplatzes im Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes in Homburg und Frau Dr. rer. nat. P. Leidinger für die Unterstützung bei der Laborarbeit und das Überlassen von Ergebnissen aus ihrer früheren wissenschaftlichen Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. A. Keller für die Bildanalyse der Macroarrays und die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Name	Hewa Mustafa
Geburtsdatum und -ort	21.03.1974, Erbil / Irak
Familienstand	ledig
Religion	Muslim
Staatsangehörigkeit	deutsch
Wohnort	Birkenweg 51, 66127 Saarbrücken-Klarenthal

Schulbildung:

Okt. 1980 - Juli 1986	Grundschule in Erbil / Irak
Okt. 1986 - Juli 1993	Gymnasium in Erbil

Schulabschluss Irakische Reifeprüfung

Studium :

Okt. 1993 - Juli 1999	Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Universität Erbil
-----------------------	--

Studienabschluss Bachelor – Grad der Medizin und Chirurgie
M.B.ch.B

Beruflicher Werdegang

04.09.1999 - 01.07.2000	Assistenzarzt an der Universitätsklinik Rizgarie in Erbil .
01.07.2000 - 01.12.2000	Assistenzarzt der Klinik für Allgemein Chirurgie und Orthopädie in Jemhurie /Erbil
01.12.2000 - 01.03.2001	Assistenzarzt in der Klinik für Pädiatrie in Jemhurie/Erbil
01.03.2001 - 01.07.2001	Assistenzarzt in der Orthopädischen Abteilung der Klinik für Allgemein Chirurgie und Orthopädie in Jemhurie /Erbil
01.07.2001- 01.07.2002	Allgemeinärztliche Praxistätigkeit in Daratu/Erbil
01.03.2003 - 01.05.2007	Stipendiatsarzt in der Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie der SHG-Kliniken in Völklingen
seit 01.05.2007	Assistenzarzt in der Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie der SHG-Kliniken in Völklingen
10.05.2006	Erwerb der Anerkennung der Gleichwertigkeit des Kenntnisstandes für Ärzte
18.01.2010	Erwerb der Facharztanerkennung für Thoraxchirurgie

Fremdsprachenkenntnisse - Kurdisch (Muttersprache) .
 - Fließend Deutsch, Englisch und Arabisch.