

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Schwerpunkt
Gastroenterologie und Pneumologie der Medizinischen Fakultät der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. P. Michl)

**Eignet sich frei zirkulierende mSHOX2 Plasma DNA zum
Tumormonitoring bei Patienten mit fortgeschrittenem
Lungenkarzinom unter Chemo- bzw. Radiochemotherapie?**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Julia Beyer

geboren am 13.05.1990 in Rochlitz

Betreuer: PD Dr. Bernd Schmidt

Gutachter:

1. Prof. Dr. P. Michl
2. Prof. Dr. K. Lorenz
3. PD A. Bach

11.08.2017

08.01.2018

Referat

Für die Entwicklung individualisierter multimodaler Therapiekonzepte bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Lungenkarzinom sind Marker zum Tumormonitoring unter Therapie bedeutsam. Das Ansprechen bzw. Nichtansprechen einer Therapie muss frühestmöglich erkannt werden, um unwirksame Therapien zu vermeiden. Aktuell erfolgt ca. drei Monate nach Therapiebeginn eine CT zur Volumenbestimmung des Tumors, im Vergleich zum Ausgangsbefund. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass der quantitative Nachweis extrazellulärer methylierter Plasma DNA zuverlässig möglich ist. Der DNA-Methylierungsmarker mSHOX2 zeigte bereits in ersten Studien zur Unterscheidung zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung eine außerordentlich gute Performance. Insgesamt wurden in unserer Studie prospektiv 36 Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom (NSCLC und SCLC) eingeschlossen. Die Laboranalysen und Auswertungen erfolgten getrennt von der klinischen Patientenversorgung. Das Patientenkollektiv beinhaltete 31 Patienten mit First-Line-Therapie und 5 vorbehandelte Patienten mit Second-Line-Therapie. Die Menge an methylierter SHOX2 (mSHOX2) Plasma DNA wurde vor und unter der Therapie bis zum Re-staging gemessen. Als Schwellenwert für die technisch mögliche Messung an mSHOX2 DNA wurde ein PMR (percentage methylation reference) $> 1\%$ festgelegt. Nach dem Re-staging mittels CT wurden 19 Studienteilnehmer als Patienten, die nicht auf die Therapie ansprechen (Non-Responder) und 17 als Patienten, die auf eine Therapie ansprechen (Responder) identifiziert. Mittels ROC-Analysen wurde die Korrelation zwischen der Aussagekraft der gemessenen mSHOX2 Werte mit den Ergebnissen der CT-Darstellung untersucht. Bereits zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme nach Therapiebeginn beträgt der Wert der AUC 0,844. Dieser Wert steigt zum Zeitpunkt der fünften Blutentnahme nach Therapiebeginn auf 0,939 und ab der siebten Blutentnahme sogar auf 1,0 an. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie geben einen starken Hinweis auf die Eignung von mSHOX2 DNA als Parameter für das Tumormonitoring unter Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom. Das Ansprechen bzw. Nichtansprechen auf eine Therapie kann mit Hilfe dieses Methylierungsmarkers viel sensitiver und schneller im Vergleich zur CT-Untersuchung bestimmt werden und muss in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

Beyer, Julia: Eignet sich frei zirkulierende mSHOX2 Plasma DNA zum Tumormonitoring bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom unter Chemo- bzw. Radiochemotherapie? Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 61 Seiten, 2016

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.	Einleitung	1
1.1.	Das Lungenkarzinom	1
1.1.1.	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2.	Histopathologische Klassifikation	2
1.1.3.	Diagnostik und Therapie	3
1.2.	Frei zirkulierende DNA im Blut	8
1.3.	DNA Hypermethylierung	9
1.3.1.	DNA Methylierung in Tumorgewebe	10
1.3.2.	DNA Methylierung als Tumormarker	11
1.4.	SHOX 2	12
1.4.1.	Was ist SHOX 2 für ein Gen?	12
1.4.2.	DNA-Methylierungsmarker SHOX2 als Biomarker in Bronchiallavage und Plasma	14
2.	Zielstellung	15
3.	Material und Methodik	17
3.1.	Material	17
3.1.1.	Geräte	17
3.1.2.	Labormaterial	17
3.1.3.	Reagenzien	18
3.1.4.	Probenmaterial	18
3.2.	Methodik	20
3.2.1.	DNA Isolation	20
3.2.2.	Bisulfitbehandlung	21
3.2.3.	Real-Time PCR	23
3.2.4.	Primersequenzen	26
3.2.5.	Relative Quantifizierung	27

3.2.6.	Statistische Analyse	28
4.	Ergebnisse	29
4.1.	Methylierte SHOX2 DNA im Plasma als Marker zum Therapiemonitoring	38
4.2.	Überlebenskurven	39
5.	Diskussion	42
5.1.	Analysen der Patienten mit First-Line-Therapie	44
5.1.1.	Analysen der Patienten mit PMR < 1%	46
5.2.	Analysen der Patienten mit Second-Line-Therapie	46
5.3.	Patienten mit EGF-Mutation	47
5.4.	Vergleich zum derzeitigen Therapiestandard	48
5.5.	Stärken und Schwächen der Studie	49
5.6.	Ausblick für die Zukunft	50
6.	Zusammenfassung	52
7.	Literaturverzeichnis	54
8.	Thesen	61
9.	Selbstständigkeitserklärung	
10.	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
11.	Tabellarischer Lebenslauf	
12.	Danksagung	

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celcius
AUC	Area under the curve
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ct	Cycle threshold
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et altera
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
l	Liter
Log	Logarithmus
M	Mol pro Liter
Med	Median
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
N	Anzahl
NR	Non-Responder
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMR	Percentage methylation reference
R	Responder
ROC	Receiver Operating Characteristic
Tab.	Tabelle

Tris	Trimethamin-Puffer
UKH	Universitätsklinikum Halle
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Das Lungenkarzinom

1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Lungenkarzinome stellen weltweit den zweithäufigsten malignen Tumor für Männer und Frauen dar (Jemal et al., 2010). Im Jahr 2010 wurden in Deutschland 52.070 neudiagnostizierte Lungenkarzinome und 43.008 Sterbefälle gemeldet (Krebs in Deutschland 2009/2010). Die Prognose des Lungenkarzinoms ist ungünstig, weil die Mehrheit der Patienten (64 bis 69%) bereits zum Diagnosezeitpunkt ein fortgeschrittenes Tumorstadium (III/IV) aufweist (Morgensztern et al., 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland für Männer bei 14% und für Frauen bei 19% (Krebs in Deutschland 2009/2010). Das Inzidenzmaximum der Erkrankung liegt zwischen 50 und 70 Jahren. Das Durchschnittsalter der an Lungenkrebs erkrankten Menschen liegt bei Mitte 60, wobei das Erkrankungsrisiko mit zunehmendem Alter steigt (Krebs in Deutschland 2009/2010). Seit 1990 ist, nach den deutschen Krebsregisterdaten, bei Männern ein rückläufiger Trend der Neuerkrankungsrate in allen Altersklassen zu erkennen. Hingegen nimmt die Neuerkrankungsrate bei Frauen seit den 1980er Jahren in allen Altersgruppen zu (Krebs in Deutschland 2011/2012). Die gegenläufigen Tendenzen beider Geschlechter sind vorwiegend auf die sich unterschiedlich entwickelnden Rauchgewohnheiten von Männern und Frauen in den letzten Jahrzehnten zurückzuführen. Nach Aussagen des Statistischen Bundesamtes steigt das Rauchverhalten bei Frauen in den letzten Jahren (Krebs in Deutschland 2009/2010).

Inhalatives Rauchen von Tabak ist die mit Abstand häufigste Ursache für die Entwicklung von Lungenkarzinomen. Etwa 80 bis 90% der Lungenkarzinome sind mit Tabakrauch assoziiert (Bühning, 2008). Zu den karzinogenen Substanzen im Zigarettenrauch gehören polyzyklische Kohlenwasserstoffe vom Typ des Benzo-(A)-Pyren, karzinogene Metallverbindungen wie Nickelkarbonyl und Cadmiumhydroxid, N-Nitrose-Verbindungen und aromatische Amine. All diese Stoffe befinden sich vor allem in der Partikelphase einer Zigarette, die trotz Filter eingeatmet wird (Müller, 2005). Dabei steigt das Erkrankungsrisiko mit den gerauchten „Pack-Years“, dem Produkt aus der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten in Packungen und der Dauer des Rauchens in Jahren, mit der Inhalationstiefe sowie mit der Teer- und

Nikotinkonzentration (Müller, 2005). Ebenso ist das relative Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken umso höher, je niedriger das Alter ist, in dem mit regelmäßigem Nikotinabusus begonnen wird (Lee et al., 2012). Auch regelmäßiges Passivrauchen erhöht das Risiko für ein Lungenkarzinom um den Faktor 1,3-2 (Bühning, 2008). Neben dem Tabakrauch verursachen auch andere Schadstoffe in der Außenluft wie Cadmium-, Chrom- oder Arsenverbindungen Lungenkrebs. Ebenso sind eine Reihe beruflicher Expositionen, besonders die Asbestexposition, sowie ionisierende Strahlung mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines Lungenkarzinoms assoziiert.

1.1.2. Histopathologische Klassifikation

Die Lungenkarzinome werden von der World Health Organisation (WHO) nach ihrem histopathologischen Erscheinungsbild in vier Typen unterteilt:

Tabelle 1: Histopathologische Klassifikation (Beasley et al., 2005)

SCLC (small-cell-lung-cancer)	NSCLC (non-small-cell-lung-cancer)
Kleinzelliges Lungenkarzinom	Plattenepithelkarzinom
	Adenokarzinom
	Großzelliges Lungenkarzinom

Zu den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (engl. Non-small-cell lung cancer, NSCLC), die mit 80-85% den Großteil der Lungenkarzinome darstellen, zählen das Plattenepithelkarzinom, das Adenokarzinom und das großzellige Lungenkarzinom. Lungenkarzinome metastasieren vor allem in das Gehirn, die Nebennieren, die Leber und das Skelett. Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom haben im Vergleich zu Patienten mit einem Adenokarzinom eine bessere Prognose, da diese durch langsameres Wachstum und spätere Metastasierung gekennzeichnet sind. Die früh metastasierenden, großzelligen Lungenkarzinome bilden die kleinste Gruppe innerhalb der Lungenkarzinome. Sie setzen sich aus entdifferenzierten Plattenepithel- und Adenokarzinomen zusammen. Zudem existiert die Form des kleinzelligen

Lungenkarzinoms (engl. Small-cell lung cancer, SCLC). 15-20% aller Lungenkarzinome sind kleinzellige Lungenkarzinome. Es handelt sich um einen hochmalignen Tumor mit neuroendokriner Differenzierung. Der Tumor wächst häufig sehr schnell und metastasiert frühzeitig sowohl lymphogen als auch hämatogen.

Mehr als 30% der Lungenkarzinome weisen Anteile verschiedener histologischer Typen auf (Husain und Kumar, 2005). Die histologische Unterscheidung zwischen kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungentumoren ist bedeutsam für den Verlauf und die Prognose der Erkrankung und zugleich Basis für die Therapieentscheidung.

1.1.3. Diagnostik und Therapie

Lungenkrebs verursacht keine typischen Frühsymptome, daher wird die Diagnose der Lungenkarzinome meist erst in weiter fortgeschrittenen Stadien gestellt. Anhaltender Husten, Atemnot, Thoraxschmerzen, allgemeiner Kräfteverlust, Gewichtsverlust und blutiger Auswurf können unspezifische Erstsymptome sein. Bei längerem Vorhandensein sind diese karzinomverdächtig und sollten möglichst schnell abgeklärt werden. Für eine eindeutige Diagnosesicherung ist die histologische Klassifikation entscheidend. Eine ausführliche klinische Anamnese, eine körperliche Untersuchung und eine Basislabordiagnostik stellen den Beginn der Untersuchung dar. Daneben werden bildgebende Verfahren, wie beispielsweise ein Röntgenbild des Thorax in zwei Ebenen, zur Beurteilung hinzugezogen. Zur genauen Stadieneinteilung stellt eine Thorax- Computertomographie (CT) die beste Methode dar. Die bioptisch-histologische Diagnose erfolgt meist durch eine Bronchoskopie. Weitere eingesetzte Untersuchungsmethoden sind der endobronchiale Ultraschall (EBUS) und die transthorakale Nadelbiopsie. Um die Operabilität des Patienten einzuschätzen, müssen eine Lungenfunktionsprüfung sowie Lungenperusions- und Ventilationsszintigraphie durchgeführt werden.

In den letzten Jahren wurden mehrere Tumormarker zur Diagnostik des Lungenkarzinoms untersucht. Die Bestimmung der folgenden Marker erfolgte im Serum von Patienten. Es besteht die Möglichkeit bei NSCLC-Patienten den Zytokeratinmarker CYFRA 21-1 und das karzinoembryonale Antigen (CEA) und bei SCLC-Patienten die neuronenspezifische Enolase (NSE) und das Pro-Gastrin Releasing Peptide (ProGRP) zu bestimmen (Brambilla et al., 2009). Die erste Empfehlung zur Verwendung dieser Serummarker in der Lungenkrebsdiagnostik wurde von der *European Group on Tumor Markers* (EGTM) 1999 ausgesprochen.

Die empfohlenen Tumormarker nach den Tumormanualen des Tumorzentrums München sind zur Primärdiagnostik beim Lungenkarzinom weder ausreichend spezifisch noch sensitiv. Sie können bei der Differentialdiagnose unklarer Lungenrundherde sowie zur Eingrenzung des histologischen Typs hilfreich sein. Hauptindikationen für ihre Verwendung sind die postoperative Verlaufsbeobachtung, die Kontrolle der Wirksamkeit einer Radio- und/oder Chemotherapie, sowie die Erkennung eines Tumorrezidivs (Huber, 2011).

Im Krankheitsverlauf und bei Nachsorgeuntersuchungen haben Referenzbereiche der Serummarker keine Bedeutung. Entscheidend ist die Kinetik, verglichen mit den individuellen Basiswerten des einzelnen Patienten (Huber, 2011). Allerdings gibt es bisher keinen einheitlichen Marker für die verschiedenen histologischen Typen. Die Evidenz der aufgezählten Tumormarker ist noch zu gering, um im klinischen Alltag routinemäßig Verwendung zu finden.

Die Klassifikation der Lungenkarzinome erfolgt auf der Basis der TNM-Klassifikation („Tumor-Node-Metastasis“) nach C.F. Mountain (1997) und der UICC 7 Kriterien (Rami-Porta et al., 2011). Sie wird bei allen Patienten standardmäßig durchgeführt und dient der Prognose und Therapieplanung. Dabei werden die Größe und Infiltrationstiefe des Primärtumors (T), das Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen (N) und das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (M) dokumentiert.

Tabelle 2: Beschreibung der TNM Stadien nach IASLC Lung Cancer Staging Project (Rami-Porta et al., 2011)

T (Tumor)	Stadium	Beschreibung
	Tis	Carcinoma in situ
	T1	größter Durchmesser > 3 cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt
	T1a	größter Durchmesser < 2 cm
	T1b	größter Durchmesser > 2 < 3 cm
	T2	größter Durchmesser > 3 < 7 cm oder Infiltration des Hauptbronchus oder Infiltration der viszeralen Pleura oder tumorbedingt partielle Atelektase
	T2a	größter Durchmesser > 3 < 5 cm
	T2b	größter Durchmesser > 5 < 7 cm
	T3	größter Durchmesser > 7 cm oder Infiltration von Zwerchfell, N. phrenicus, mediastinaler Pleura oder parietalem Perikard Tumor im Hauptbronchus < 2 cm distal der Karina, aber ohne Beteiligung der Karina Tumor-assoziierte komplette Atelektase oder obstruktive Pneumonie zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen
	T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration von Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Karina zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen

N (Lymphknoten)

N0	keine Lymphknoten
N1	Metastase in ipsilateralen, peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und/oder intrapulmonalen Lymphknoten
N2	Metastase in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastase in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateralen tief zervikalen, supraklavikulären Lymphknoten

M (Metastase)

M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	<ul style="list-style-type: none">▪ separater Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlappen▪ Pleura mit knotigem Befall▪ maligner Pleuraerguss▪ maligner Perikarderguss
M1b	Fernmetastasen

Tabelle 3: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC 7 (Rami-Porta et al., 2011)

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
IA	T1a/b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T1a/b	N1	M0
	T2a	N1	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a/b	N2	M0
	T2a/b	N2	M0
	T3	N1/2	M0
	T4	N0/1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	jedes T	N3	M0
IV	jedes T	jedes N	M1a
	jedes T	jedes N	M1b

Die Therapie richtet sich nach der Histologie und dem Tumorstadium. Mögliche Therapieverfahren sind die operative Entfernung des Primärtumors, eine primäre Chemotherapie und eine lokale Strahlentherapie. In den meisten Fällen wird der Tumor erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, wodurch eine Resektion aufgrund der Tumorgröße oder Absiedlung von Fernmetastasen nicht mehr möglich ist. Bei fehlender Operationsmöglichkeit wird unabhängig vom Tumorstadium eine Chemo- bzw. Radiochemotherapie angewandt.

Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom wird im Stadium IA-IIA mit kurativer Absicht primär chirurgisch und anschließend teilweise mit adjuvanter Strahlen- und Chemotherapie behandelt. Adjuvante Therapien werden nur bei Lymphknotenbefall, d.h. ab Stadium II A genutzt. Inoperabilität besteht bei Fernmetastasen (Stadium IV), kontralateralen Lymphknoten- und Lungenmetastasen, bei organüberschreitendem Wachstum, sowie bei Einwachsen in den Hauptstamm der Pulmonalarterien. Bei Inoperabilität steht eine kombinierte Radiochemotherapie im Vordergrund. Im Stadium IV kann nur noch eine palliative Chemotherapie erfolgen.

Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom werden in der Regel primär mit Chemotherapie behandelt, da der Tumor eine hohe Response-Rate besitzt. Dabei wird eine Platin- und Etoposid-basierte Kombinationschemotherapie in vier bis sechs Zyklen in drei- bis vierwöchigem Abstand verabreicht. Bei lokal begrenztem Tumor wird meist eine Herdbestrahlung sowie eine prophylaktische Schädelbestrahlung angeschlossen. In seltenen Fällen ist in der Folge eine Operation möglich (Goeckenjan et al., 2010).

1.2. Frei zirkulierende DNA im Blut

Das Vorkommen zellfreier, im Plasma zirkulierender DNA wurde erstmals 1948 beschrieben (Mandel und Metais, 1948). Erst in den 70er Jahren konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der freien zirkulierenden Nukleinsäuren bei Patienten mit malignen Tumoren signifikant erhöht ist (Leon et al., 1975). Der Ursprung der zirkulierenden DNA im Blut ist noch nicht genau geklärt. Es wird vermutet, dass DNA aktiv von Tumorzellen freigesetzt werden kann und passiv von nekrotischen bzw. apoptotischen Tumorzellen in die Blutzirkulation gelangt (Stroun et al., 2001), (Jahr et al., 2001) (Abb.1), da diese frei zirkulierende DNA Tumor-assoziierte genetische und epigenetische Veränderungen enthält. Zu diesen Veränderungen zählen Mutationen, Translokationen, Mikrosatelliten-Alterationen und CpG-Insel-Hypermethylierungen (Anker et al., 1999), d.h. prinzipiell alle Veränderungen die auch intrazellulär gefunden werden.

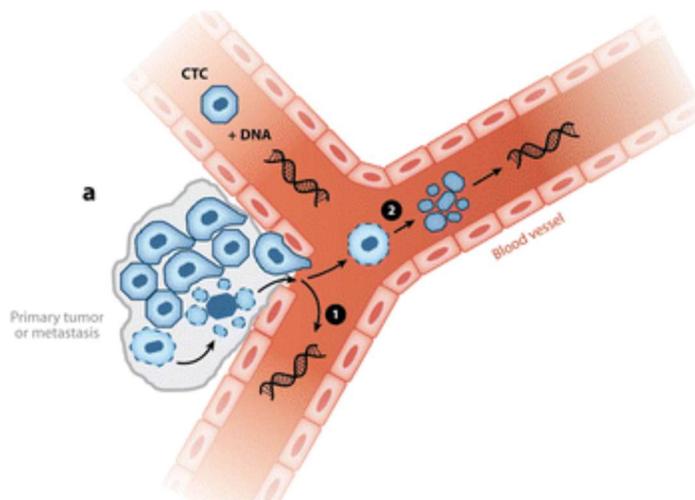


Abbildung 1: Frei zirkulierende DNA

Tumor-DNA im Blutplasma stammt aus ¹ Primärtumor bzw. Mikrometastasen oder ² apoptotisch zirkulierenden Tumorzellen (Alix-Panabières et al., 2012).

Messungen zeigen, dass Patienten mit Tumorerkrankungen ca. 4-10-fach erhöhte Mengen freier DNA im Serum/Plasma haben können (Wu et al., 2002). Diese quantitativen Unterschiede zwischen Tumorpatienten und Gesunden bzw. Patienten mit nicht-maligner Erkrankung können bestehen, sind jedoch nicht immer vorhanden und stellen kein zuverlässiges Unterscheidungsmerkmal dar. Deshalb werden diese Werte als Diskriminierungsmerkmal im klinischen Alltag nicht verwendet.

1.3. DNA Hypermethylierung

Die Methylierung der DNA ist eine enzymatisch bedingte Modifikation, bei der eine Methylgruppe an das Ringsystem der Base Cytosin in C-5-Position kovalent gebunden wird. Dabei handelt es sich um eine epigenetische Veränderung, da die DNA-Sequenz durch diese Alteration bestehen bleibt. Epigenetische Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen spielen in der Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle (Suva et al., 2013). Diese Modifikation tritt bei Säugetieren nur an CpG-Dinukleotiden auf. Das ist die Bezeichnung für eine aus zwei Nukleotiden bestehende Gensequenz, bei der die Base Guanin unmittelbar über eine Phosphodiesterbindung auf eine Cytosinbase folgt. Die Zahl der CpG-Dinukleotide ist im menschlichen Genom gering. Davon ausgenommen sind die Promotorregionen. Hier entspricht die Anzahl der CpG-Dinukleotide der zu erwartenden Häufigkeit oder übertrifft diese sogar.

Diese Bereiche werden als CpG-Inseln bezeichnet und sind charakteristischerweise meist nicht methyliert. Im Gegensatz dazu sind die CpG-Dinukleotide außerhalb der CpG-Inseln meist methyliert (Wolffe et al., 1999), (Robertson und Wolffe, 2000).

DNA-Methyltransferasen (DNMT) regulieren die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin an den Cytosinring (Abb. 2)

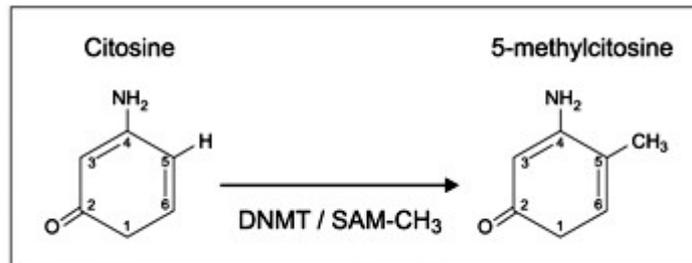


Abbildung 2: Methylierung Cytosin zu 5 Methylcytosin

Die DNA-Methyltransferase (DNMT) überträgt einen Methylrest von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf die C-5-Position einer Cytosinbase. S-Adenosyl-Methionin fungiert dabei als Methylgruppendonator (Lehrbach et al., 2003).

Die DNMT 1 fungiert als Erhaltungs-Methyltransferase und reguliert die Aufrechterhaltung bereits vorhandener Methylierungsmuster. DNMT 3a und 3b sind für die De-novo-Methylierung verantwortlich (Okano et al., 1999).

In Folge der CpG-Insel-Methylierung kann die Transkription der DNA-Sequenz verhindert werden (gene silencing). Diese Repression der Gene ist auf zwei Wegen möglich. Zum einen kann die DNA-Methylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren direkt behindern. Zum anderen können Methylcytosin-bindende Proteine, die die Chromatinstruktur verändern, an methylierte CpG-Inseln binden und zu einer transkriptionellen Repression führen (Ballestar und Wolffe, 2001; Wolffe et al., 1999).

1.3.1. DNA Methylierung in Tumorgewebe

Veränderte Methylierungsmuster sind in Tumoren zahlreich nachweisbar. Häufig kommt es zu einer globalen Hypomethylierung von CpG-Dinukleotiden außerhalb von CpG-Inseln mit gleichzeitiger regionaler Hypermethylierung (Abb. 3). Diese Hypomethylierung hat eine verminderte genetische Stabilität zur Folge und geht mit einer erhöhten Mutationsrate einher. Ebenso kann es zur Destabilisierung von

Chromosomen im perizentromeren Bereich und zur Expression von Genen, die physiologischerweise gehemmt sind, führen (Nakagawa et al., 2005).

Unkontrollierte (aberrante) De-Novo-Methylierung von CpG-Inseln in Promotorbereichen regulatorischer Genabschnitte, vermittelt durch DNA-Methyltransferasen 3a/b, sind ein Charakteristikum maligner Tumoren. Diese chemische Modifikation erfolgt oft schon früh im Rahmen der Krebsentstehung (Jones und Baylin, 2002). Dadurch kommt es häufig zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und zu einem unkontrollierten Wachstum der veränderten Zellen. Die Ursache der abweichenden CpG-Insel Hypermethylierung ist nicht bekannt.

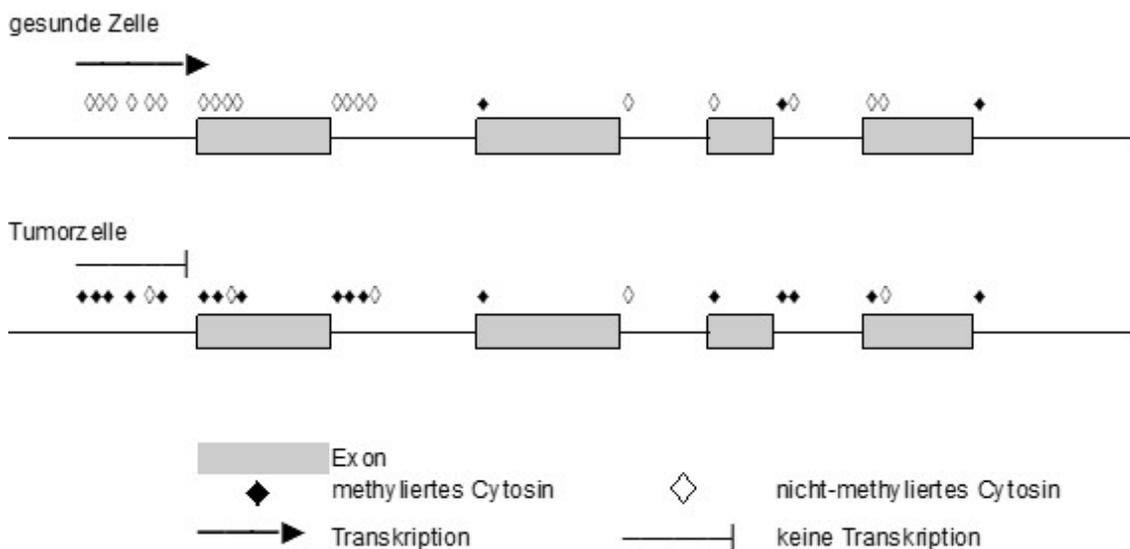


Abbildung 3: Promotorhypermethylierung in Tumorzellen

In der gesunden Zelle ist das Gen im Promotorbereich nicht methyliert und wird exprimiert. In der Tumorzelle erfolgt eine abnorme Hypermethylierung der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich. Dadurch wird die Transkription verhindert.

1.3.2. DNA Methylierung als Biomarker

Das amerikanische National Institute of Health (NIH) definiert Biomarker als eine Eigenschaft, die objektiv gemessen und evaluiert werden kann, sowie als Indikator für normale biologische oder pathologische Prozesse dient (Biomarkers Definition Working Group, 2001).

Die Analyse methylierter DNA weist vielversprechende Charakteristika zur Verwendung als Biomarker auf. Zum einen erfolgen Veränderungen der DNA-Methylierung bereits frühzeitig im Rahmen der Karzinogenese. Zum anderen ist auch

aus geringen Tumormengen eine Detektion der DNA-Methylierung möglich (Mikeska et al., 2012).

Die Untersuchung der DNA-Methylierung kann bei bereits diagnostizierten Tumoren in der weiterführenden Diagnostik und Einschätzung der Prognose hilfreich sein. Ebenso kann sie als Biomarker zur Frühdetektion von Tumoren bzw. zur Unterscheidung Tumor/ Nicht-Tumor herangezogen werden. Beispielsweise kann zum Screening für das Kolorektale Karzinom die DNA-Methylierung von Septin 9 (Sept9) verwendet werden. Die Analyse der DNA-Methylierung des Biomarkers im Blut von Patienten ermöglicht eine Vielzahl von Patienten mit kolorektalem Karzinom zu erkennen, unabhängig vom Stadium und der Lokalisation des Tumors (Warren et al, 2011).

1.4. SHOX2

1.4.1. Was ist SHOX2 für ein Gen?

Homeobox-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung der Wirbeltiere. Das SHOX2 Gen (short stature homebox 2) ist ein humanes Homeobox Gen. Es ist ungefähr 10 kbp lang und auf dem langen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert (3q25-q26.1) (Blaschke et al., 1998). Das Gen besitzt zwei verschiedene Isoformen, SHOX2a (993bp) und SHOX 2b (570bp), welche durch alternatives splicing entstehen (Blaschke et al., 1998). Innerhalb des SHOX2 Gens konnten mehrere Bereiche mit einem auffällig erhöhten Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) detektiert werden. Die Abbildung 4 zeigt die Bereiche mit einer verstärkten CG-Dichte entlang des Gens auf.

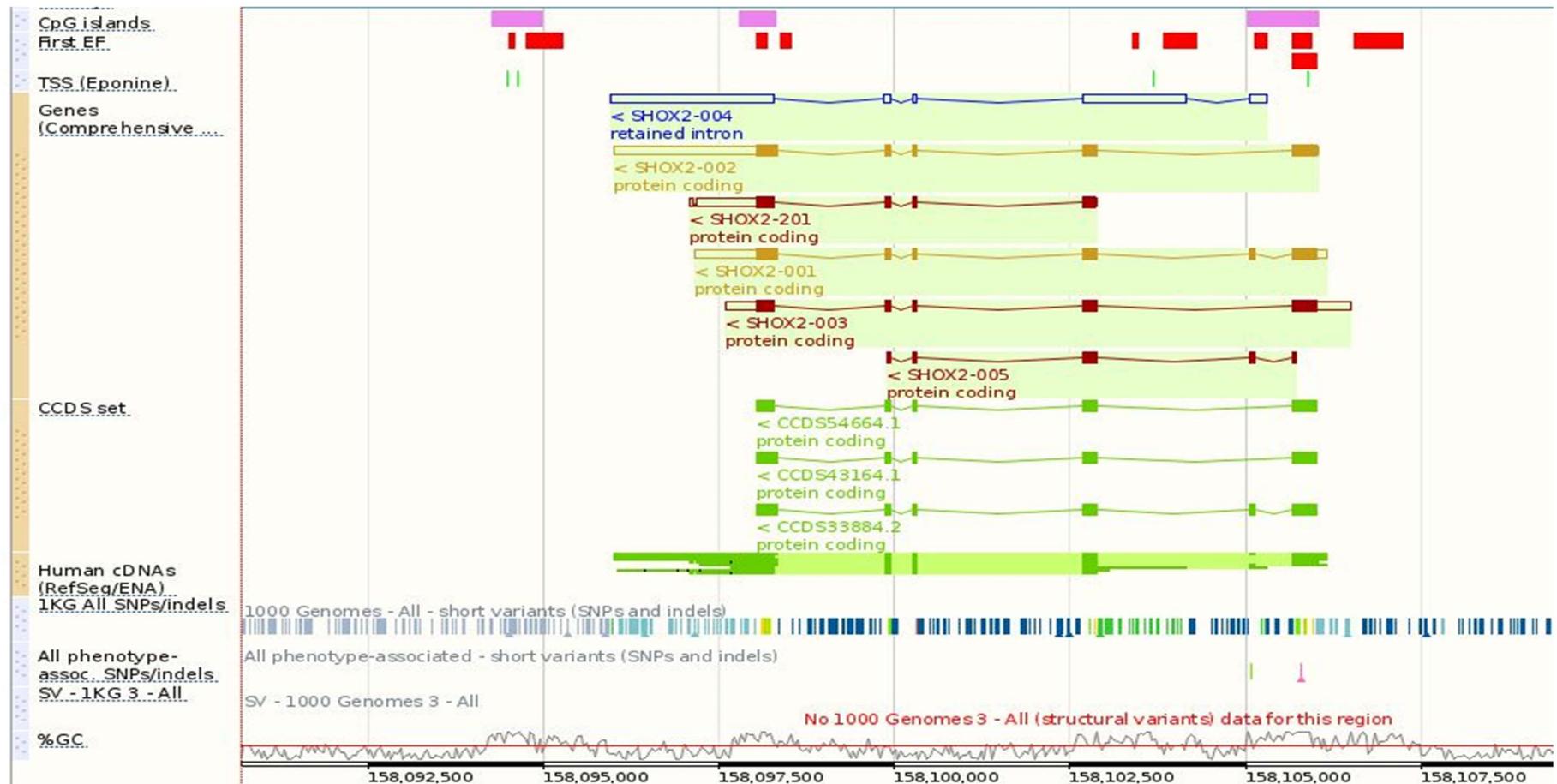


Abbildung 4: SHOX2 Gen

In der Abbildung 4 sind der Gehalt an Cytosin und Guanin, sowie die CpG Inseln, dargestellt. (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000168779;r=3:158095954-158106503 Stand: 05.12.2015)

SHOX2 ist für die Regulation von Genen, die bei der Entwicklung von Chondrozytenhypertrophie, Skelettentwicklung und embryonalen Verhaltensmustern eine Rolle spielen, bekannt (Yu et al., 2010). Außerdem ist eine regulierende Funktion des Gens für die Entwicklung des Herzens und des Nervensystems beschrieben (Blaschke et al., 1998). Homeobox-Proteine sind in Krebsgeweben oft fehlreguliert. Dabei können Unterregulation oder auch Überregulation dieser Proteine im Zusammenhang mit einer Tumorentwicklung stehen (Coletta et al., 2004).

1.4.2. DNA-Methylierungsmarker SHOX2 als Biomarker in Bronchiallavage und Plasma

In einer ersten Studie wurde der Nachweis von methylierter SHOX2 (mSHOX2) DNA als Tumormarker in der Diagnostik des Lungentumors in der Bronchiallavage untersucht (Schmidt et al., 2010). Besonders in Fällen, in denen durch Histologie oder Zytologie nach der ersten Bronchoskopie noch keine endgültige Diagnose gestellt werden kann, wäre eine ergänzende Methode zur Diagnosesicherung sehr hilfreich. Patienten mit bekannter maligner Lungenerkrankung sowie Patienten mit benigner Lungenerkrankung (z.B. Abszess, Infektion, obstruktive Lungenerkrankung, Sarkoidose) wurden in diese Studie eingeschlossen. Die Analyse der DNA Methylierung von SHOX2 in beiden Gruppen ermöglicht die Unterscheidung zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung mit einer Spezifität von 95% und Sensitivität von 68% (Schmidt et al., 2010).

Die Eignung eines diagnostischen Tests zur Untersuchung mSHOX2 in Bronchiallavage wurde 2012 von Dietrich et al. untersucht. Ziel dieser Anwendung ist es, kostenintensive und invasive Verfahren zu reduzieren und die Zeit bis zum Therapiebeginn zu verkürzen. Dieser Kit zeigte mit einer Sensitivität von 78% und Spezifität von 96% gut reproduzierbare Resultate. Er ist in der Lage, die Tumordiagnose zu bestätigen, auch wenn die Zytologie negativ oder suspekt ist.

Die Amplifikation der Chromosomenregion 3q ist eine der häufigsten und signifikantesten genomischen Veränderungen beim Lungenkarzinom (Quian und Massion, 2008). *Schneider et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression von SHOX2. DNA-Methylierung, Genkopienzahl und Expression von SHOX2 wurden jeweils im Lungentumorgewebe und im normalen Gewebe der Studienpatienten bestimmt. Es konnte in 96% der untersuchten Lungenkrebsfälle eine Hypermethylierung im SHOX2 Gen nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis korrelierte hochsignifikant ($p < 0,0001$) mit der Erhöhung der Genkopienzahl, wobei die Expression von SHOX2 keine Unterschiede zeigte (Schneider et al., 2011).

Die bisherigen Studien befassten sich mit der Untersuchung methylierter SHOX2 DNA in Bronchiallavage. Die Lavage wird mittels Bronchoskopie gewonnen. Dieses Verfahren eignet sich jedoch nicht für Screeninguntersuchungen, da dieses Verfahren zu aufwändig und kostenintensiv ist und allgemeine Risiken wie Blutungen oder Infektionen bestehen. Die Detektion von mSHOX2 in anderen Körperflüssigkeiten (Plasma, Serum) würde dafür hilfreich sein. In einer Fall-Kontroll-Studie untersuchten *Kneip et al. (2011)* die Verwendung von mSHOX2 als Biomarker zur Lungenkrebsdiagnostik im Blutplasma. Auf diese Weise konnten Lungenkrebspatienten mit einer Sensitivität von 60% und einer Spezifität von 90% entdeckt werden. Sensitivität und Spezifität sind, verglichen mit den Ergebnissen der Bronchiallavageanalysen, im Blutplasma etwas geringer. Der prozentuale Anteil methylierter SHOX2 DNA im Plasma ist bei Patienten im Stadium II-IV signifikant höher als bei Patienten im Stadium I. Insgesamt zeigten SCLC und Plattenepithelkarzinome die höchste Sensitivität im Vergleich zum Adenokarzinom (Kneip et al., 2011).

Die bisherigen Studienergebnisse zeigen die Kompetenz methylierter SHOX2 DNA als potentiellen Biomarker in der Lungenkrebsdiagnostik auf.

2. Zielsetzung

Der Großteil der Lungentumorpatienten wird in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung diagnostiziert, in dem meist nur ein palliativer Therapieansatz möglich ist. Nach Einleiten der Therapie wird das Ansprechen mit einer bildgebenden Diagnostik beurteilt. Ein Re-Staging mittels Computertomogramm (CT), ca. 3 Monate nach Therapiebeginn, ist der derzeitige Goldstandard, um die Wirksamkeit der Therapie anhand einer volumetrischen Veränderung des Tumors zu untersuchen. Das Ergebnis dieser Untersuchung entscheidet über das weitere therapeutische Vorgehen. Bei nachweisbarer Volumenreduktion des Tumors wird die Therapie beibehalten. Eine Vergrößerung des Tumors zieht einen Therapiewechsel nach sich. Eine CT Untersuchung zu einem früheren Zeitpunkt ist nicht sinnvoll, da geringe Volumenänderungen mit diesem Verfahren nicht oder nur schwer erkannt werden (Oxnard et al., 2011). Bei fehlendem Therapieerfolg können die Wochen bis zur

Therapiekontrolle einen erheblichen Zeitverlust für den Patienten darstellen. Des Weiteren sind hohe Belastungen für die Patienten durch unwirksame Therapiemaßnahmen und eine damit einhergehende Verschlechterung der Lebensqualität nicht zu unterschätzen. Hinzu kommen die hohen Kosten für unwirksame Therapieversuche, die das Gesundheitssystem belasten.

Ein Marker, der direkt nach Therapiebeginn und in kürzeren Abständen bestimmt wird und mit einer hohen Sensitivität den Erfolg bzw. Misserfolg einer Therapie detektiert, wäre von großer Bedeutung für die Lungenkarzinomtherapie. Bisher gibt es in der Lungenkarzinomtherapie keine zufriedenstellenden Biomarker, die ein verlässliches Tumormonitoring ermöglichen.

Methylierte SHOX2 DNA (mSHOX2) ist ein Biomarker, der in Lungentumoren amplifiziert wird und bereits zur Frühdetektion von Lungentumoren herangezogen werden kann. Der Nachweis von mSHOX2 im Plasma ist ohne größere invasive Belastung des Patienten möglich. Die Untersuchung dieses Markers in kurzen Abständen nach Therapiebeginn könnte frühzeitig den Erfolg bzw. Misserfolg der Therapie aufzeigen. Somit würden den Patienten unwirksame Behandlungen erspart, sowie ein Zeitgewinn ermöglicht werden.

In dieser Pilotstudie sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Verändert sich die Menge an mSHOX2 DNA im Plasma unter einer Chemo- bzw. Radiochemotherapie?
- Besteht eine Korrelation zwischen der Veränderung des mSHOX2 und dem Ansprechen/ Nichtansprechen auf eine Therapie?
- Welche sind die besten Zeitpunkte zur Untersuchung des Biomarkers?

3. Material und Methodik

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
DynaMag tm-15 Magnetständer	Invitrogen
DynaMag tm-2 Magnetständer	Invitrogen
Rotationsmischer SB 2	Stuart Scientific
Vortex-Mixer MS3	IKA Works
Thermomixer compact	Eppendorf
Referenzpipetten 0,1-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl	Eppendorf
Microfuge 16 mit Rotor für 1,5/2mL Reaktionsgefäße	Beckman Coulter
Multifuge 3 S-R	Kendro
Messzylinder 100 mL	VWR
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR	Life Technologies
Allegra X-15R Zentrifuge für Plasmaisolation	Beckman Coulter
Wasserbad	Grant

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Labormaterial	Hersteller
96-Well Optische Abdeckfolie	Life Technologies
96-Well-Reaktionsplatte	Life Technologies
Einmaltransferpipetten 15cm, 22cm	Carl Roth
Monovette EDTA/Serum	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter 0,1-10 µl, 2-20µl, 2-100µl, 20-200µl, 50-1000µl	Biozym
Reagenz- und Zentrifugenröhre 5 mL mit Übergriffstopfen	Sarstedt
Reaktionsgefäß safe lock 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen 50 mL	Greiner
Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit konischem Boden, 15mL	Greiner
Einmalpipetten 5 mL einzeln steril verpackt	Greiner
Einmalpipetten 10 mL einzeln steril verpackt	Greiner

3.1.3. Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich
SILANE Lysis/Binding Buffer	Life Technologies
Dynabeads Silane (37005 D)	Life Technologies
Bisulfitreagenz	Life Technologies
Denaturierungspuffer	Life Technologies
1M Tris, pH 8,0	Sigma-Aldrich
Water	Sigma-Aldrich

Bisulfitreagenz und Denaturierungspuffer stammen aus dem innuCONVERT All-In-One Bisulfit Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland).

3.1.4. Probenmaterial

In die Studie wurden Patienten mit einem fortgeschrittenen Lungentumor (Stadium III B/ IV) eingeschlossen, die sich zur Behandlung im UKH (Universitätsklinikum Halle) vorstellten. Einziges Ausschlusskriterium war eine nicht vorliegende bzw. nicht unterschriebene Einverständniserklärung. Der Studieneinschluss erfolgte prospektiv. Das Studienteam im Labor war gegenüber den klinischen Daten, dem klinischen Verlauf und den Re-Staging-Untersuchungen verblindet. Ein Zusammenführen der klinischen Daten und Ergebnissen der Untersuchung von mSHOX2 erfolgte erst nach Abschluss der Laboruntersuchungen. Insgesamt untersuchten wir 31 Patienten mit First-Line-Therapie und 5 vorbehandelte Patienten mit Second-Line-Therapie. 34 Patienten erhielten eine Platin-basierte Chemotherapie und zwei Patienten mit aktivierender Mutation im EGFR-Gen wurden mit einem Tyrosinkinaseinhibitor behandelt. Unter den Patienten wiesen 26 ein Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC), 6 ein Kleinzelliges (SCLC) und 4 ein undifferenziertes Lungenkarzinom auf (siehe Tabelle 7).

Die Blutentnahmen erfolgten prätherapeutisch und unter der Therapie im 7 bis 10-tägigen Rhythmus bis zum standardmäßigen Re-Staging nach ca. 3 Monaten. Nach der Entnahme wurden die Proben kühl gelagert und innerhalb von zwei Stunden aufgearbeitet. Für die Plasmaisolation wurden die Blutproben 15 min bei 500x g zentrifugiert. Das Plasma wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Probenröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde nochmals 15 min bei 2500x g mit nur ganz gering eingestellter Bremse zentrifugiert. Die zellfreien Plasmen wurden in 5 ml Tubes abgefüllt und bis zur Isolation der DNA bei -80°C gelagert.

Tabelle 4: Klinisch-pathologische Parameter des Patientenkollektives

Dargestellt sind die histologischen Typen Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), Small-Cell Lung Cancer (SCLC) und undifferenzierte Lungentumoren mit der entsprechenden Verteilung für Geschlecht, Alter und Tumorstadium.

	NSCLC	SCLC	undifferenziert
	N=26 (%)	N=6 (%)	N=4 (%)
Geschlecht			
männlich	20 (76,9)	5 (83,3)	4 (100)
weiblich	6 (23,1)	1 (16,7)	0 (0)
Alter			
Median	63	67	67,5
Minimum	37	61	60
Maximum	85	74	79
Stadium			
Ia	0		0
Ib	0		0
II	0		0
III	2		0
IV	24 (92,3)		4 (100)
limited disease		0	
extensiv disease		6 (100)	

Die Ethikkommission der Universität Halle hatte nach ausführlicher Beratung keine Einwände gegen die Durchführung dieser Studie. Alle teilnehmenden Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zu den Untersuchungen.

3.2. Methodik

3.2.1. DNA Isolation

Die Isolation der DNA erfolgte nach dem Protokoll von Dietrich et al. (2013).

Vor Beginn der DNA Isolation erfolgte die Pufferherstellung. Für die Isolation wurden Elutionspuffer (1% 1M Tris, pH 8,0, 99% Wasser), sowie Waschpuffer 1 (50% Silane Lysepuffer, 50% Ethanol) und Waschpuffer 2 (15% Wasser, 85% Ethanol) benötigt.

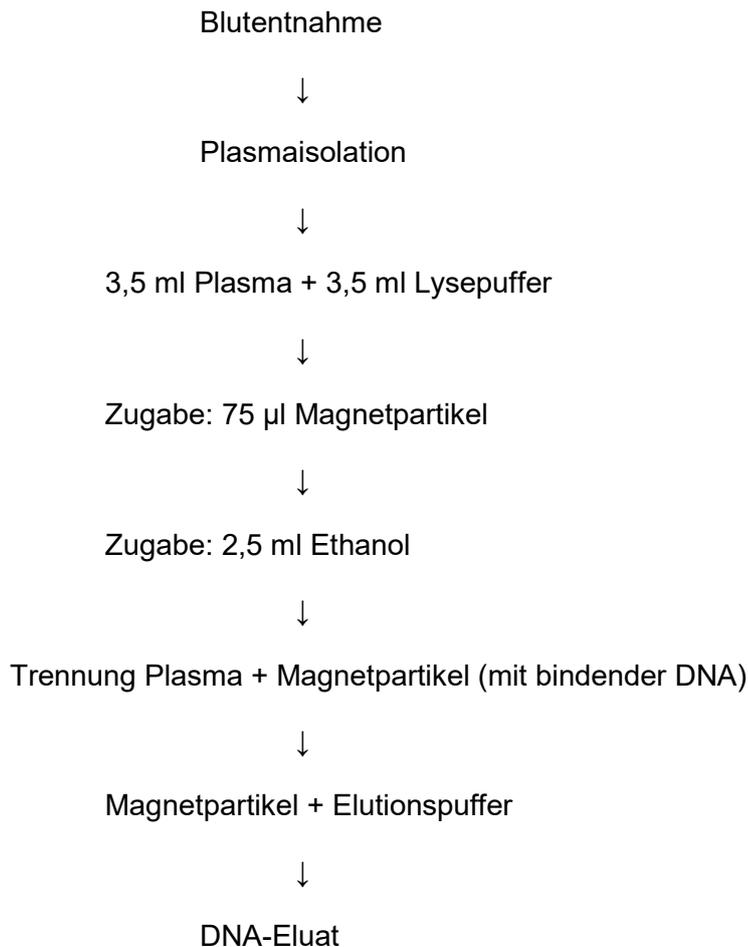


Abbildung 5: Ablaufschema der DNA Isolation

Zur Lyse wurden 3,5 ml Plasma (ggf. Probe auf 3,5 ml mit Wasser auffüllen) mit 3,5 ml Silane Lysepuffer in einem 15 ml Röhrchen versetzt und anschließend, nach Mischen auf dem Vortexmischer, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In das 15 ml Röhrchen wurden anschließend 75 µl Magnetpartikel (Dynabeads) zugegeben, welche die DNA binden. Es ist wichtig die Magnetpartikel frisch zu resuspendieren, um durch eine homogene Verteilung der beads eine gute DNA-Ausbeute zu erlangen. Zudem wurden 2,5 ml absolutes Ethanol hinzu pipettiert.

Nach mehrmaligen invertieren wurde das Röhrchen auf dem Rotationsmischer bei Raumtemperatur für 45 min bei mittlerer Geschwindigkeit (ca. 10-20 UPM) inkubiert. Nach der Inkubation wurde das 15 ml Röhrchen für 5-10 min in den DynaMag TM-15 Magnetständer gestellt. Die Magnetpartikel, mit der daran bindenden DNA, wurden somit von dem Plasma getrennt. Der Überstand wurde vorsichtig ausgegossen. Durch folgende Waschschrte mit 1,5 ml Waschpuffer 1 wurden Verunreinigungen von den Magnetpartikeln entfernt. Die gereinigte DNA wurde mit Elutionspuffer von den Magnetpartikeln abgelöst. Dazu wurden 100 µl Elutionspuffer in das Reaktionsgefäß gegeben und die Magnetpartikel durch Mischen auf dem Vortexer resuspendiert. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 min bei 1000 UPM und 80°C in einen Thermoshaker gestellt. Der Elutionspuffer ist niedermolar mit einem neutralen pH-Wert und bricht die Ionenbindung auf. Dadurch wird die DNA von den Magnetpartikeln gelöst. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß wieder in den DynaMag tm-15 Magnetständer überführt. Das komplette Eluat (100 µl DNA Lösung) wurde in ein frisches 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt (siehe Abb. 5). Die extrahierte DNA kann maximal 24 Stunden im Kühlschrank bei 6°C gelagert werden.

3.2.2. Bisulfitbehandlung

Die Bisulfitbehandlung ermöglicht die Unterscheidung von methylierter und nicht-methylierter DNA. Dabei werden nicht-methylierte Cytosine in Uracilbasen umgewandelt (siehe Abb. 6), während 5-Methyl-Cytosin unverändert bleibt. Nach nukleophiler Addition eines Sulfitions an ein Cytosin erfolgt eine Desaminierungsreaktion zu Uracilsulfonat. Bei einer anschließenden Alkali-Behandlung wird dieses Zwischenprodukt zu Uracil desulphoniert.

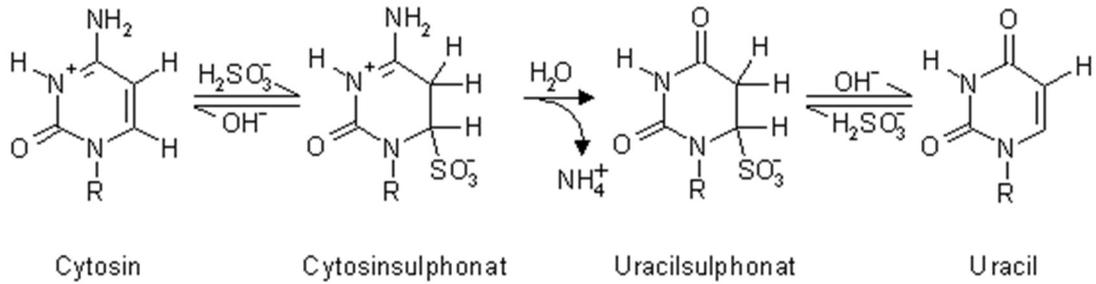


Abbildung 6: Chemie der Bisulfit-Reaktion

Sulfonierung an der C6-Position des Cytosins, irreversible hydrolytische Deaminierung an der C4-Position, wodurch ein 6-Sulfonyl-Uracil entsteht und Desulfonierung unter alkalischen Bedingungen. Methylierung an der C5-Position verhindert die Sulfonierung an der C6-Position in Schritt 1. (https://www.researchgate.net/profile/Christoph_Lahtz/publication/200445433/figure/fig1/AS:349436925497345@1460323663285/Abbildung-2-3-Chemischer-Ablauf-der-Bisulfit-Reaktion-Der-erste-Schritt-zeigt-die_big.pbm Stand: 05.05.2016)

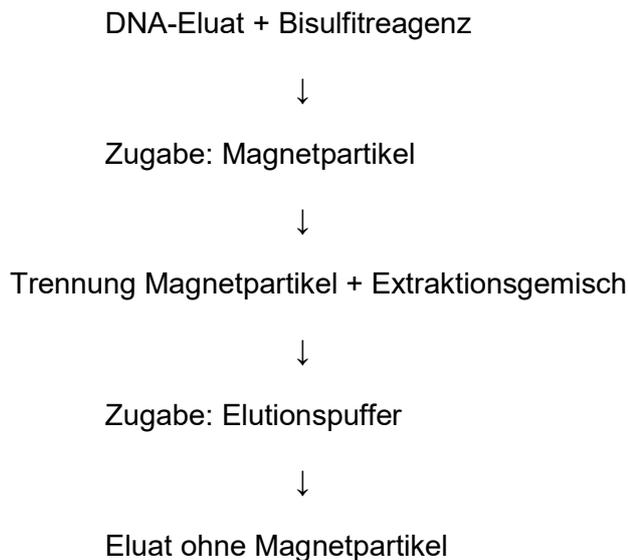


Abbildung 7: Ablaufschema der Bisulfitbehandlung

Zur Bisulfitumwandlung wurden in das Reaktionsgefäß mit der extrahierten DNA 150 µl Bisulfitreagenz und 25 µl Denaturierungspuffer zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde gut durchgemengt und für 45 min bei 85 °C im Wasserbad inkubiert. Für die DNA-Aufreinigung wurden 1000 µl Waschpuffer 1 und 15 µl Dynabeads hinzugegeben. Nach Mischen des Extraktionsgemisches im Thermomixer für 45 min bei 1000 rpm und 23°C wurden die Proben in den Magnetständer gestellt. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Nach vier Waschschritten, einer mit Waschpuffer 1 und drei

mit Waschpuffer 2, wurden die Magnetpartikel bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes für 10 min bei 60 °C getrocknet. Zur Elution der DNA von den beads wurden 68 µl Elutionspuffer auf die Magnetpartikel gegeben. Nach zehnmütiger Inkubation im Thermomixer bei 85°C und 1000 rpm wurde das Reaktionsgefäß erneut in den Magnetständer gestellt. Das Eluat wurde schließlich vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, sodass keine Magnetbeads übertragen wurden (siehe Abb. 7).

3.2.3. Real-Time PCR

Funktionsprinzip

Die klassische Polymerase Kettenreaktion (PCR) stellt, seit deren Entwicklung Mitte der 80er Jahre (Saiki et al., 1986), ein unverzichtbares Verfahren in den molekularen Laboren dar. Mit der PCR kann DNA in vitro enzymatisch vervielfältigt werden. Sie beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus, wobei die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsprodukte für die folgenden Zyklen dienen und somit eine exponentielle Vervielfältigung stattfindet. Den Ausgangspunkt der Vervielfältigung stellen kurze Oligonukleotide, deren Basensequenzen revers-komplementär zu ausgewählten Abschnitten der Ausgangs-DNA (DNA-Matrize) sind, dar. Diese Startmoleküle (Primer) binden (Annealing) sequenz-spezifisch durch Hitzedenaturierung erzeugte Einzelstränge der DNA-Matrize an. Anschließend werden sie mithilfe der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase polymerisiert (Elongation). Die Bindung der Primer an die DNA (Hybridisierung) erfolgt bei einer für die jeweilige Primer-Sequenz optimierten Temperatur von etwa 50-70°C. Die Elongation der Primer von ihrem 3'-Ende aus erfolgt bei der klassischen PCR meistens bei 72°C, dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase.

Bei der qualitativen PCR erfolgt der Nachweis der amplifizierten DNA-Sequenzen in der Regel über gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung der Amplifikate. Dieses Verfahren stellt einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand dar. Die Real-Time PCR ermöglicht Amplifikation und Visualisierung des PCR-Produktes simultan zum gleichen Zeitpunkt unter Verwendung einer fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde. Die fluoreszenzmarkierte Taqman DNA-Sonde bindet an die zu amplifizierende Sequenz. Der fluoreszierende Reporterfarbstoff ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffes wird durch einen Quencher am 3'-Ende der Sonde unterdrückt. Trifft die Taq-DNA-Polymerase während der Extensionsphase auf die

spezifisch gebundene Sonde, so hydrolysiert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde und trennt Reporter- und Quencherfarbstoff.

Der freigesetzte Reporter-Farbstoff kann nun Licht emittieren, das im PCR-Gerät messbar ist. Das Real-Time PCR-Gerät misst mit einer Kamera in jedem PCR-Zyklus die Menge freien Fluoreszenzfarbstoffes in der Reaktionslösung, die mit fortschreitender Vervielfältigung der DNA zunimmt. Aus den ermittelten Fluoreszenzwerten wird durch eine entsprechende Software eine Amplifikationsgrafik erstellt (Abb. 6). Unspezifisch gebundene Sonden werden nicht hydrolysiert und führen zu keinem Fluoreszenzsignal.

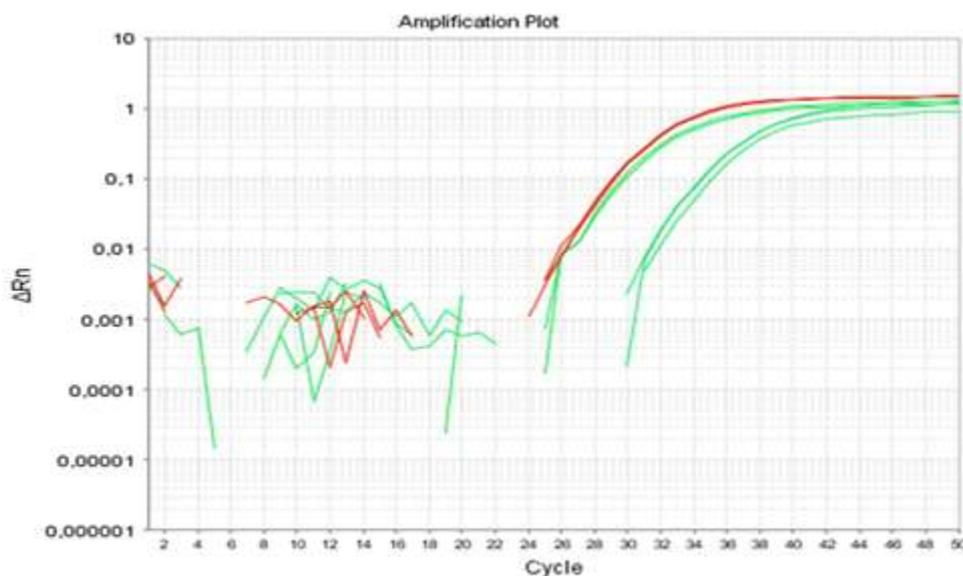


Abbildung 8: Amplifikationskurve für Actin

Dargestellt sind auf der Ordinate das Reporter-Signal (Rn), auf der Abszisse die Anzahl der Zyklen, (rot = Standard, grün = Probe).

Die gemessene Fluoreszenz wird auf der Ordinate gegen die Zyklenzahl auf der Abszisse dargestellt. In den ersten Zyklen wird anhand der Hintergrundfluoreszenz ein Schwellenwert (Threshold) berechnet. Der Ct-Wert (Cycle-threshold) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (Gibson et al., 1996). Für die Bestimmung der absoluten Menge einer Ausgangsprobe muss eine Standardkurve mit definierter Menge an template DNA etabliert werden und idealerweise bei jeder Messung mitlaufen. Aus einer Probe mit bekannter Kopienzahl wird eine Verdünnungsreihe erstellt und diese amplifiziert. Durch Auftragen der Ausgangsmenge der bekannten Probe gegen den Ct-Wert kann mit der Geradengleichung für jede unbekannte Probe die Kopienzahl bestimmt werden. Der

Ct-Wert verhält sich indirekt proportional zur vorhandenen DNA-Menge der Probe. Je höher der Ct-Wert (d.h. je höher die Zykluszahl ist, bei der die Fluoreszenzkurve den Schwellenwert überschreitet), desto weniger DNA befindet sich in der untersuchten Probe.

Durchführung

In einer Duplex-PCR wurde ein Assay für die quantitative Bestimmung der eingesetzten DNA und ein Methylierungsspezifischer Heavy-Methyl Assay für die quantitative Bestimmung von methyliertem SHOX2 zusammengefasst.

Ein Reaktionsansatz bestand aus 10 µl der vorbereiteten DNA-Proben sowie 10 µl des Mastermixes bestehend aus jeweils 6mM MgCl₂, 35mM Tris (aus 1M Tris pH 8,4), 50mM KCl, 5% Glycerol und 0,006 µl ROX. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit 0,5 µl dNTP/dUTP-Mix, 0,4 µl FastStart™ Taq Polymerase und 1,6 µl gereinigtem Wasser angesetzt.

Komponenten des PCR-Mix:

Komponenten	Inhalt/Best.-Nr.
Mastermix	6mM MgCl ₂ , 35mM Tris (aus 1M Tris pH 8,4), 50mM KCl, 5% Glycerol, 0,006 µl ROX
dNTP/dUTP-Mix	Best-Nr.: BIO-39041; Bionline USA Inc, Taunton, MA, USA (Inhalt: 10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 20mM dUTP)
FastStart™ Polymerase	Taq Best-Nr.: 4738420001; Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Wasser	Best-Nr.: W4502-6X1L; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Es wurden für jede Probe sechs Replikate angesetzt. In jedem Experiment wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mit jeweils drei Ansätzen untersucht.

Für die Kalibratorprobe wurde ebenfalls das Protokoll von Dietrich et al. herangezogen. Es wurden 80 µL methylierte DNA (100 ng/mL, CpGenome Universal Methylated DNA, Millipore, Billerica, MA) mit 80 µL Bisulfit- [65% ammonium bisulfite, pH 5.3 (TIB Chemicals, Mannheim, Germany)] und 40 µL Denaturierungsreagenz [0.07 g/mL Trolox (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in THFA (VWR International, Darmstadt,

Germany)] vermischt und anschließend für 45 min bei 85°C und 1000 rpm im Thermomixer inkubiert. Die aus der Kalibrator-DNA resultierenden ΔC_t -Werte wurden zur Kalibrierung der ΔC_t -Werte der Patientenproben verwendet.

Die PCR wurde auf einem Applied Biosystem™ 7500 Real-Time PCR System der Firma (Life Technologies™, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt das PCR-Programm für diese Versuchsreihe:

Zyklus	Zeit	Temperatur	Ramp Rate
1x	20 min	95°C	100%
50x	2s	62°C	100%
	45s	56°C	100% data coll.
	15s	95°C	75%

Im Rahmen der Bisulfitbehandlung entstand aus unmethyliertem Cytosin die Base Uracil, wohingegen methyliertes Cytosin unverändert blieb. Durch spezifische Primer ist dadurch die Amplifikation der methylierten DNA möglich. Diese Arbeit untersucht die Veränderung methylierter SHOX2 DNA während einer Chemo- bzw. Radiochemotherapie. Entsprechend der Zielsetzung wurden nur spezifische Primer für methylierte DNA eingesetzt.

Die verwendeten Primer entsprechen dem Protokoll von Dietrich et al. (2013).

3.2.4. Primersequenzen

SHOX2 (chr3:157821339-157821449):

Sequenzen 5' → 3'

Vorwärtsprimer GTTTTTTGGATAGTTAGGTAAT

Vorwärtsblocker TAATTTTTGTTTTGTTTGTGGATTGGGGTTGTATGA-
SpacerC3

Rückwärtsprimer TAACCCGACTTAAACGACGA

(MSP Primer)

Hydrolyseprobe 6-FAM-CTCGTACGACCCCGATCG-BBQ-650

ACTB (*chr7:5571731-5571859*):

Sequenzen 5' → 3'

Vorwärtsprimer GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT

Rückwärtsprimer CCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA

Hydrolyseprobe Cy5- ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-BBQ650

3.2.5. Relative Quantifizierung

Bei dieser Methode wird das Verhältnis der Nukleinsäuremenge in der zu untersuchenden Probe zu der bekannten Nukleinsäuremenge in einer Vergleichsprobe bestimmt. *ACTB* wurde in dieser Studie als methylierungsunabhängiger Wert zur Referenz verwendet.

Die Berechnung der relativen Menge an Nukleinsäure erfolgt mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Hierzu werden, wie oben beschrieben, die Ct-Werte der einzelnen Proben gemessen. Anschließend wird eine Differenz aus den Ct-Werten der methylierungsspezifischen *SHOX2* PCR und der methylierungsunspezifischen Referenz-PCR, hier *ACTB*, aus dem Duplex-Assay der gleichen Probe ermittelt.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Sample}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Calibrator}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Sample}} = \text{Ct}_{\text{SHOX}} - \text{Ct}_{\text{ACTB}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Calibrator}} = [(\text{Ct}_{\text{SHOX1}} - \text{Ct}_{\text{ACTB1}}) + (\text{Ct}_{\text{SHOX2}} - \text{Ct}_{\text{ACTB2}}) + (\text{Ct}_{\text{SHOX3}} - \text{Ct}_{\text{ACTB3}})]/3$$

Die prozentuale Methylierung der Zielsequenz (PMR = percent methylation reference) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Methylation Sample} = \text{Methylation Calibrator} \times 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Die Quantifizierung der *mSHOX2* Plasma DNA erfolgte nachdem alle prospektiv gewonnenen Plasmaproben vollständig waren.

3.2.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Version 21 (IBM, Armonk, NY) und R (R project for Statistical Computing, 2014). Unterschiede im Methylierungslevel (PMR) in den Plasmaproben der Responder und Non-Responder vor Therapiebeginn und in den Verlaufsbeobachtungen (Blutentnahme 1-8), wurden im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ermittelt. Bei diesem Test wird davon ausgegangen, dass die PMR-Werte nicht normalverteilt sind. Die p-Werte wurden Bonferroni adjustiert. Hierbei wird die Alphafehler-Kumulierung neutralisiert. Weiterhin wurde der Median der prätherapeutischen PMR's und der Median der absoluten Abweichung (MAD, median absolute deviation) bestimmt. Responder Operator Characteristic (ROC) Kurven wurden berechnet, um das Potential des mSHOX2 Markers zur Differenzierung zwischen Respondern und Non-Respondern, zu verschiedenen Zeitpunkten, zu veranschaulichen. Hierbei wurden die PMR-Werte für jede Blutentnahme bestimmt und die resultierende Sensitivität und Spezifität berechnet. Als optimaler Cut-off-Wert wurde ein Messwert festgelegt, bei dem die Summe aus Sensitivität und Spezifität - repräsentiert durch die Fläche unter der Kurve (AUC) - maximal ist. Je mehr diese gegen den Wert 1 strebt, desto höher ist die diagnostische Güte des Tests. Zur Erstellung von Überlebenskurven wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Zusätzlich wurde mit Hilfe des Cox-proportional-hazard-Modells der Einfluss des mSHOX2-Verlaufs auf das Überleben der Probanden getestet.

4. Ergebnisse

In dieser Studie wurde die Menge an extrazellulärer mSHOX2 DNA im Plasma von 36 Patienten mit Lungenkarzinom vor und unter Therapie untersucht. Die DNA-Isolation und die Berechnung der mSHOX2 Werte erfolgte nach den unter 3.2.1. bis 3.2.4. angegebenen Verfahren.

Abbildung 9 veranschaulicht den Einschluss zur Datenanalyse.

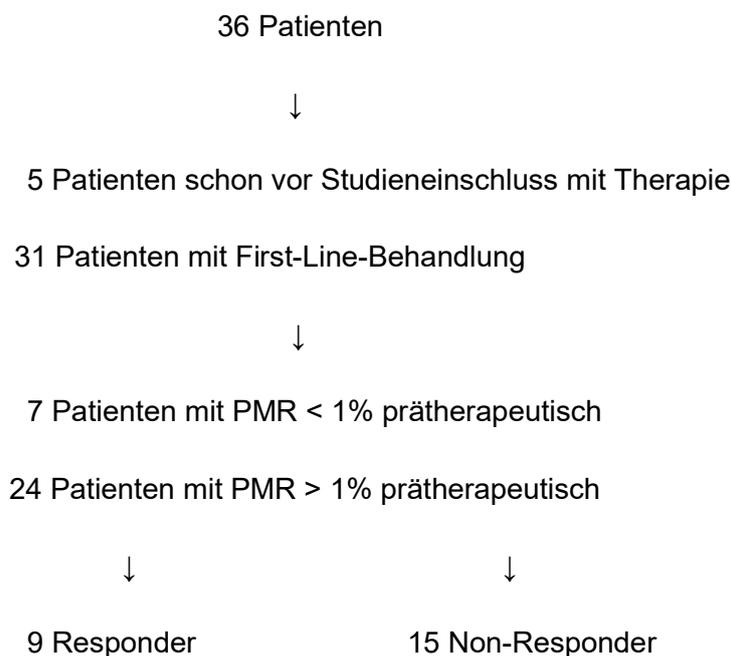


Abbildung 9: Flussdiagramm zur Datenanalyse

Von den prospektiv eingeschlossenen Studienteilnehmern haben fünf Patienten bereits vor Beginn der Studie eine Therapie erhalten (zwischen 4 Monaten und 4 Jahren vor Studieneinschluss). Die übrigen 31 Patienten erhielten mit Einschluss in diese Studie ihre erste Chemo- bzw. Radiochemotherapie. Als Schwellenwert für die möglich technische Messung an mSHOX2 DNA wurde ein PMR (percentage methylation reference) > 1% berechnet (Kneip et al., 2011) (siehe 3.2.4.). Sieben Patienten wiesen prätherapeutisch einen PMR < 1 % auf (Abb. 9). Retrospektiv erfolgte die Einteilung der Patienten in zwei Gruppen. Patienten, die auf eine Therapie ansprechen (Responder) und Patienten, die nicht auf eine Therapie ansprechen (Non-Responder). Diese Differenzierung wurde durch das Tumorboard des UKH vorgenommen und erfolgte ausschließlich anhand der Tumorveränderungen in den CT-Aufnahmen,

entsprechend der gültigen Leitlinie, komplett unabhängig von den mSHOX2 Messungen.

Tabelle 5: Einschluss der Patienten für die Datenanalyse.

Patienten	Responder	Non-Responder	Gesamtzahl
ungefiltert (alle Patienten mit First-Line-Therapie)	12	19	31
gefiltert durch Schwellenwert (PMR > 1%)	9	15	24

Die klinischen Daten aller prospektiv eingeschlossenen Patienten sind in Tabelle 6 dargestellt.

Die Patienten mit der ID UKH 010 und UKH 031 wiesen eine Mutation im Gen des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR-Mutation) auf und wurden entsprechend S3-Leitlinie (Goeckenjan et al., 2010) mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (Erlotinib) behandelt. Die anderen Patienten erhielten eine standardmäßige Chemo- bzw. Radiochemotherapie.

Tabelle 6: Klinische Daten aller prospektiv eingeschlossenen Patienten. Die Alterspanne liegt zwischen 37 und 84 Jahre, der Median beträgt 63 Jahre. Alle Patienten befinden sich in einem fortgeschrittenem Stadium (IIIB/ IV).

ID	Geschlecht	Alter	Histologie	Raucherstatus/ pack years	TNM/ Stadium (UICC/AJCC)	Responder/ Non-Responder
UKH 001	weiblich	64	Adenokarzinom	nie	T2 N0 M1a/ IV	Responder
UKH 002	männlich	57	Plattenepithelkarzinom	aktuell/ 6	T4 N3 M1b/ IV	Responder
UKH 003	weiblich	56	Adenokarzinom	nie	T2a N1 M1a/ IV	Non-Responder
UKH 005	männlich	62	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Ex-Raucher/ 35	T4 N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 007	männlich	61	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Ex-Raucher/ 35	T4 N2 M1b/ IV	Responder
UKH 009	weiblich	70	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Ex-Raucher/ 27	T1 N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 010	männlich	71	Adenokarzinom	Ex-Raucher/ 30	T4 Nx M1b/ IV	Non-Responder
UKH 011	männlich	71	Großzelliges Lungenkarzinom	aktuell/ 37	T4 N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 012	männlich	63	Kleinzelliges Lungenkarzinom	aktuell/ 42	T4 N3 M1b/ IV	Responder
UKH 014	männlich	79	Undifferenziertes Lungenkarzinom	Ex-Raucher/ 35	T4 N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 015	männlich	83	Adenokarzinom	Ex-Raucher/ 17	M1a/ IV	Responder
UKH 016	männlich	63	undifferenziertes Lungenkarzinom	Ex-Raucher/ 45	T4 N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 017	weiblich	52	Adenokarzinom	Ex-Raucher/ 6	T4 N2 M1a/ IV	Non-Responder
UKH 018	männlich	78	Plattenepithelkarzinom	Ex-Raucher/ 50	T3 N2-3 M0/ IIIB	Non-Responder
UKH 019	männlich	62	Adenokarzinom	Ex-Raucher/ 60	M1b/ IV	Non-Responder
UKH 020	männlich	74	Plattenepithelkarzinom	Ex-Raucher/ 35	T1a N0 M1a/ IV	Non-Responder
UKH 022	männlich	59	Undifferenziertes Lungenkarzinom	Ex-Raucher/ 35	T3 N3 M1b/ IV	Responder

UKH 023	männlich	75	undifferenziertes Lungenkarzinom	Ex-Raucher/ 36	T4 N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 024	männlich	70	Adenokarzinom	Ex-Raucher/ 30	T3 N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 025	männlich	73	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Ex-Raucher/ 25	T4 N3 M1b/ IV	Responder
UKH 026	männlich	62	Adenokarzinom	aktuell/ 40	T4 N3 M0/ IIIB	Responder
UKH 027	männlich	74	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Ex-Raucher/ 24	T4 N2 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 028	männlich	84	Plattenepithelkarzinom	Ex-Raucher/ 50	T2b N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 029	männlich	49	Adenokarzinom	Ex-Raucher/ 29	T2a Nx M1b/ IV	Responder
UKH 030	männlich	55	Adenokarzinom	aktuell/ 33	T3 N2 M1b/ IV	Responder
UKH 031	weiblich	55	Adenokarzinom	nie	T4 N3 M1b/ IV	Responder
UKH 033	männlich	63	Plattenepithelkarzinom	aktuell/ 23	T3N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 034	weiblich	49	Adenokarzinom	Ex-Raucher/ 15	T1a N2 M1b/ IV	Responder
UKH 035	männlich	58	Adenokarzinom	Ex-Raucher/ 27	T4 N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 036	männlich	53	Adenokarzinom	aktuell/ 30	T3 N3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 037	männlich	64	Adenokarzinom	aktuell/ 37	T4 N2 M1/ IV	Non-Responder
UKH 038	männlich	65	Adenokarzinom	aktuell/ 26	T3 N2 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 039	weiblich	62	Adenokarzinom	aktuell/ 20	T1 N2 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 040	männlich	62	Adenokarzinom	nie	T2 N1 M1b/ IV	Responder
UKH 041	männlich	37	Adenokarzinom	aktuell/ 20	T4 N2-3 M1b/ IV	Non-Responder
UKH 042	männlich	67	Plattenepithelkarzinom	Ex-Raucher/ 33	T4 N3 M1b/ IV	Responder

Tabellen 7-9 zeigen die Werte methylierter SHOX2 DNA aller Patienten.

Tabelle 7: Prozentuale Werte methylierter SHOX2 DNA der Patienten, die klinisch nicht auf eine Therapie ansprechen.

Die Darstellung wurde bis zur achten Blutentnahme nach Therapiebeginn gewählt, da diese von den meisten Patienten vorliegt. Die Blutentnahme zum Zeitpunkt 0 entspricht der Entnahme vor Therapiebeginn. In der zweiten Spalte sind die prätherapeutischen mSHOX2-Werte grau markiert dargestellt.

ID	Plasmaproben								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
UKH 003	1,97	2,40	0,00	0,56	1,47	0,92	0,93	5,82	15,99
UKH 005	362,30	187,97	39,30	164,72	28,74	13,91	417,36	233,87	
UKH 009	313,93	119,43	32,30	8,83	1,06				
UKH 011	1,07	18,87	0,09	0,47	1,55				
UKH 014	85,29	19,97	7,78	49,72	2,92	3,06	63,78	20,24	46,04
UKH 016	90,91	16,16	14,97	4,17	3,97	3,43	3,22	5,02	11,34
UKH 017	42,22	6,54	9,20	5,78	37,87	22,05	49,56	7,72	2,84
UKH 018	0,13	0,06	0,00	0,67	0,62	0,00	0,00	0,58	0,84
UKH 019	0,47	5,14	9,42	32,07	32,07				
UKH 023	36,10	68,31	40,97	38,71	38,62	27,00	42,73	65,58	27,89
UKH 024	0,45	1,93	1,38	10,02	0,00	0,00	0,53	5,06	2,23
UKH 027	219,33	44,02	83,95	61,89	39,01	35,50	21,31	13,18	13,04
UKH 028	27,45	6,25	5,24	7,96	1,33				
UKH 033	26,45	25,77	26,25	25,06	26,27	21,53	25,60	24,33	35,21
UKH 035	3,48	5,29	4,08	1,40	0,96				
UKH 036	1,58	79,17	0,00	40,99	21,61	1,05	34,95	16,90	3,39
UKH 038	0,00	0,00	0,00	0,77	0,00	0,34	0,59	0,55	2,87
UKH 039	1,08	0,28	0,18	0,21	0,12	0,20			
UKH 041	118,37	169,09	107,01	26,93	9,17	29,10	88,67	47,89	98,01

Tabelle 8: Prozentuale Werte methylierter SHOX2 DNA der Patienten, die klinisch auf eine Therapie ansprachen.

ID	Plasmaproben								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
UKH 007	26,03	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UKH 012	101,12	44,39	0,74	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29
UKH 015	7,61	5,40	3,75	1,57	2,00	1,57	1,53	1,49	1,16
UKH 022	1,17	0,32	0,23	0,00	1,24	0,81	0,00	0,00	0,74
UKH 025	321,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UKH 026	2,28	0,59	1,78	0,97	1,15	0,00	0,00	0,00	0,00
UKH 029	0,46	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UKH 030	5,84	1,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28	0,00	0,37
UKH 031	0,00	0,21	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UKH 034	0,05	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	
UKH 040	1,98	1,17	0,67	0,84	0,96	0,26	0,00	0,00	0,01
UKH 042	15,95	1,75	0,91	1,50	0,59	0,48	0,01	1,14	1,95

Tabelle 9: Prozentuale Werte methylierter SHOX2 DNA der Patienten, die bereits vor Therapieeinschluss eine Therapie erhalten haben.

ID	Plasmaproben								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
UKH 001	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
UKH 002	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UKH 010	57,00	56,32	111,84	113,68	123,28	99,55	121,23	117,11	101,79
UKH 020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99	0,48	0,00	0,37	0,00
UKH 037	0,00	0,00	0,69	1,12	0,15	0,00	1,22	0,73	0,05

Der prozentuale Wert methylierter SHOX2 DNA wird als relativer Wert, bezogen auf β -Actin als Referenzwert, berechnet. Lungentumore weisen häufig eine erhöhte Kopiezahl von SHOX2 auf (Schneider et al., 2011).

Durch die erhöhte Anzahl dieser Genkopien können Patienten mit sehr hohen Mengen frei zirkulierender Tumor - DNA Methylierungswerte der SHOX2 DNA > 100% zeigen. Alle Patienten, die klinisch auf die Therapie ansprechen, zeigen einen Abfall ihrer Konzentration an mSHOX2 DNA im Blutplasma. Dieser Abfall ist bei 10 von 12 Patienten bereits zum Zeitpunkt der 2. Blutentnahme, welcher dem 7. - 12. Tag nach Beginn der Therapie entspricht, zu sehen. Bei 2 Patienten zeigte sich der Abfall an Tag 30 bzw. 40. In 11 von 12 Fällen ist im Verlauf eine Reduktion von mSHOX2 bis unter die Nachweisgrenze (PMR < 1%) zu erkennen.

In der Gruppe der Non-Responder zeigten 10 von 19 Patienten einen Abfall der Konzentration an mSHOX2 DNA nach Therapiebeginn. Allerdings ist in dieser Gruppe kein anhaltender Abfall der Konzentration an mSHOX2 < 1 % zu sehen.

Bei den Patienten, die bereits vor Einschluss in diese Studie eine Therapie erhalten haben, zeigten 4 der 5 Studienteilnehmer kein mSHOX2 Signal in den Proben, weder zum Zeitpunkt 0 noch im Verlauf. Hingegen war bei dem Patienten UKH 010 eine hohe Menge an mSHOX2 in alle Proben nachweisbar (Tab. 9).

In Abbildung 9 ist der Verlauf der mSHOX2-Werte bis zum Zeitpunkt der CT-Diagnostik dargestellt.

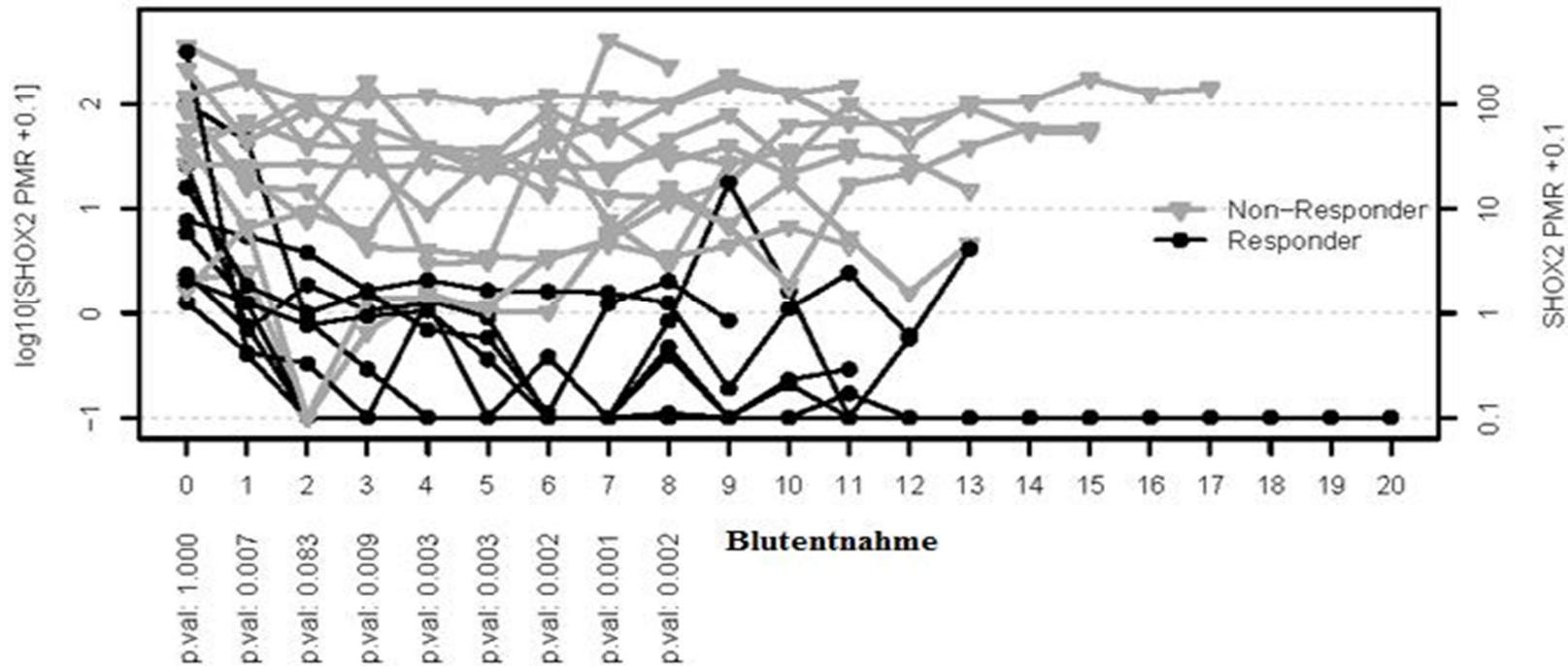


Abbildung 9: Logarithmische Darstellung SHOX2 PMR der Patienten mit einem Ausgangswert von mSHOX2 $\geq 1\%$

Graue Linien entsprechen den Non-Respondern, schwarze Linien den Respondern. Auf der Abszisse sind die Zeitpunkte der Blutentnahmen aufgetragen. X=0 entspricht der Entnahme vor Beginn der Therapie. Auf der Ordinate liegen die mSHOX2 Werte, welche zur besseren Veranschaulichung in log10 berechnet wurden. Unterhalb der x-Achse sind die p-Werte, der jeweiligen Entnahmezeitpunkte, des Zwei-Stichproben-Wilcoxon-Tests nach Bonferroni-Korrektur dargestellt.

Diese Abbildung veranschaulicht den Verlauf der mSHOX2 Werte von Beginn der Studie bis zum Zeitpunkt der CT-Diagnostik. Der Wert zum Zeitpunkt vor der ersten Therapie ist bei $x = 0$ dargestellt und entspricht dem Basiswert der Analysen. Zu diesem Entnahmezeitpunkt ist keine statistisch signifikante Differenzierung zwischen Respondern und Non-Respondern möglich ($p = 1,000$). Bereits zur zweiten Blutentnahme ist ein deutlicher Unterschied der beiden Gruppen zu sehen. Ein p-Wert von 0,007 bestätigt eine statistisch signifikante Differenzierung zu diesem Zeitpunkt.

Der PMR-Median des Ausgangswertes liegt in der Gruppe der Non-Responder bei 26,45%, in der Gruppe der Responder bei 4,06% (Tab. 10). Der p-Wert für diese Differenz liegt nach dem Wilcox-Test bei 0,465.

Tabelle 10: Parameter zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme
 Ausgeschlossen wurden die Werte der Patienten mit Second-Line-Therapie. Dargestellt sind minimale (Min) und maximale (Max) Konzentration an mSHOX2 DNA, sowie der Median.

	Anzahl	Min	Max	Median
Non-Responder	19	0	362,3	26,45
Responder	12	0	321	4,06

Tabelle 11: Anzahl (N), Minimum (Min), Maximum (Max), Median (Med) der mSHOX2-Werte der Responder (R) und Non-Responder (NR), mit einem PMR > 1%. Dargestellt sind die verschiedenen Zeitpunkten der Blutentnahme.

Blutentnahme	N (NR)	Min	Max	Med	N (R)	Min	Max	Med
0	15	1,07	362,00	36,10	9	1,20	321,00	7,61
1	15	0,28	188,00	18,90	9	0,30	44,40	1,16
2	15	0,00	107,00	9,20	9	0,00	3,80	0,67
3	15	0,21	165,00	8,00	9	0,00	1,60	0,19
4	15	0,12	39,00	2,90	9	0,00	2,00	0,59
5	11	0,20	36,00	21,50	9	0,00	1,60	0,00
6	10	0,93	89,00	23,50	9	0,00	1,50	0,00
7	10	4,52	417,00	16,70	9	0,00	1,50	0,00
8	10	2,84	234,00	21,90	9	0,00	1,90	0,29

4.1. Methylierte SHOX2 DNA im Plasma als Marker zum Tumormonitoring unter Therapie

Im Rahmen der ROC-Analysen wurde die Korrelation zwischen der Aussagekraft der mSHOX2-Werte mit den Ergebnissen beim Restaging mittels CT analysiert.

Abbildung 10 zeigt die ROC-Kurven der 24 Patienten mit First-Line-Therapie und einem PMR > 1% vom Zeitpunkt vor der Therapie bis zur 8. Blutentnahme.

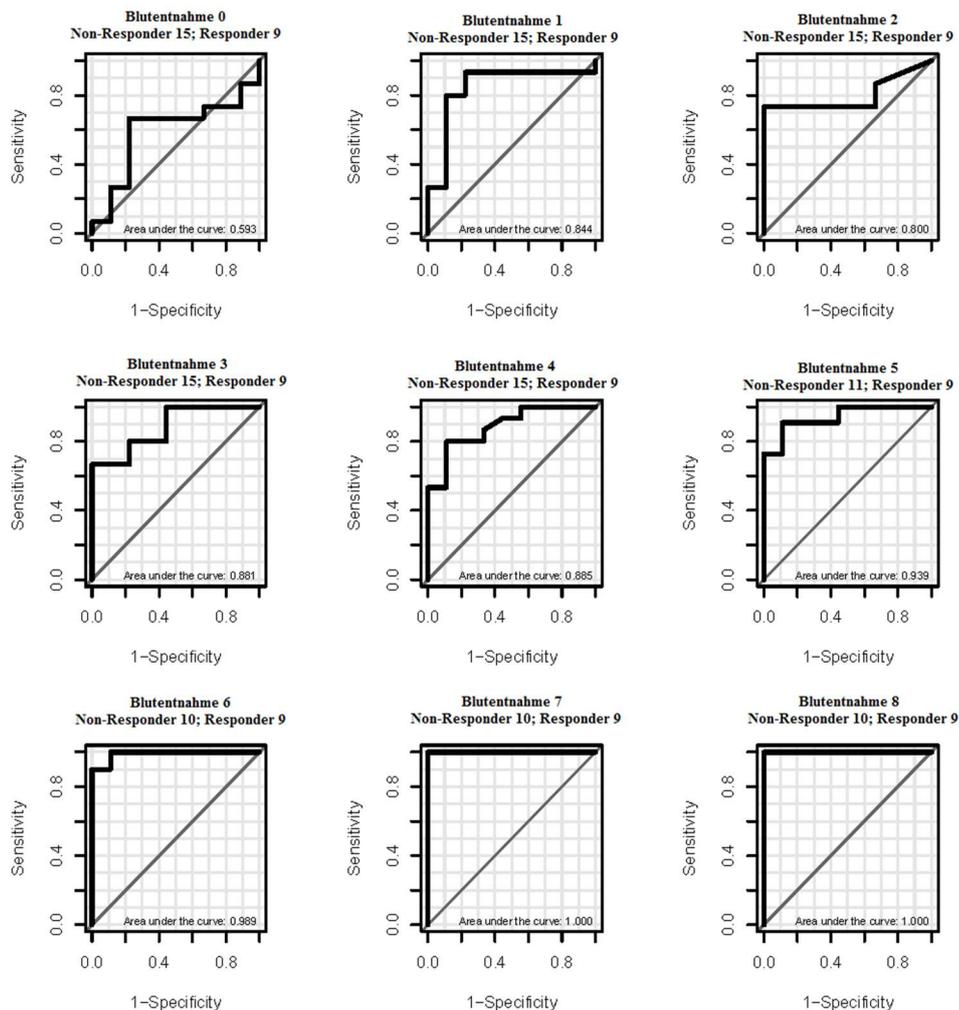


Abbildung 10: ROC-Analysen zur Unterscheidung der beiden Patientengruppen basierend auf den mSHOX Werten verglichen mit den Ergebnissen der Veränderung in den CT-Aufnahmen.

Diese Analyse veranschaulicht, dass vor der ersten Therapieanwendung keine Unterscheidung zwischen Non-Responder und Responder anhand der mSHOX2 Werte möglich ist. Der Wert der AUC (Area under the curve) liegt bei 0,593. Hingegen kann nach Beginn der Therapie eine Diskriminierung der beiden

Patientengruppen, basierend auf den mSHOX2-Werten, erfolgen. Bereits zum Zeitpunkt der ersten posttherapeutischen Blutentnahme ist diese Unterscheidung mit einer hohen Sensitivität und Spezifität möglich. Die AUC beträgt zu diesem Zeitpunkt 0,844 und steigt bis zur Analyse der 8. Blutentnahme auf 1,000 an.

4.2. Überlebenskurven

In einer Kaplan-Meier-Analyse konnte ein starker Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit der Patienten und der Einteilung dieser Patienten in Responder und Non-Responder, basierend auf den Veränderungen in den CT-Aufnahmen, erkannt werden (Abbildung 11). Die Hazard Ratio beträgt 18 und der p-Wert $\leq 0,00003$.

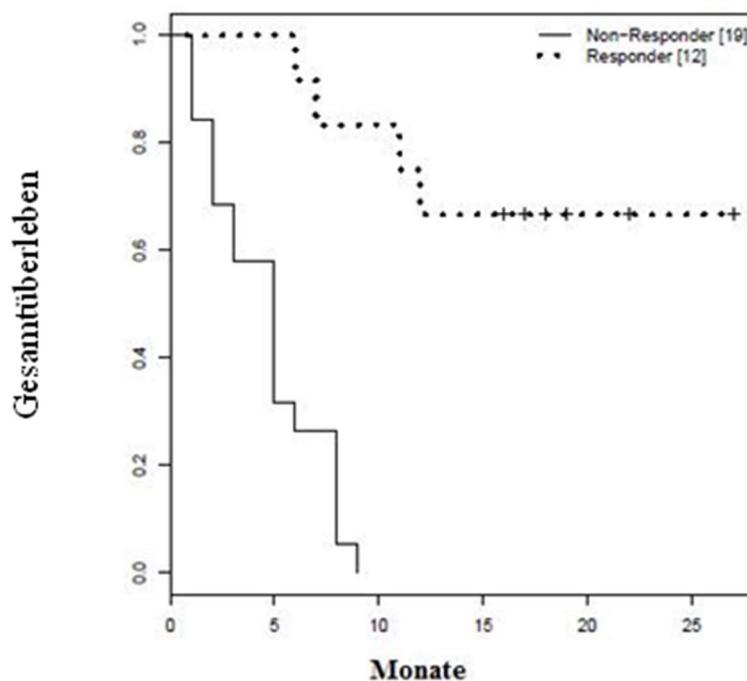


Abbildung 11: Überlebenskurve Patienten mit First-Line-Therapie

Dargestellt sind 31 Patienten mit First-Line-Therapie. Die Differenzierung zwischen Respondern und Non-Respondern erfolgte basierend auf den Veränderungen anhand der CT-Aufnahmen.

Interessanterweise ist ein ähnlich starker Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit und den PMR's von mSHOX2 zu sehen. Die mSHOX2-Werte aller 36 eingeschlossenen Patienten wurden in einer Kaplan-Meier-Analyse erfasst. Dabei wurde der Median aller Werte gebildet und die Patienten anhand dieses Wertes in zwei Gruppen eingeteilt, Patienten mit einem mSHOX2 Plasmalevel oberhalb bzw. unterhalb des Medians. Die Kurve in Abbildung 12 zeigt, dass bereits zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn, welcher der ersten Blutentnahme entspricht, eine deutliche Tendenz der beiden Gruppen zu sehen ist mit einem p-Wert von 0,037. In der Analyse der zweiten Blutentnahme wird diese Differenz noch anschaulicher. Die Unterscheidung in Responder und Non-Responder ist zu diesem Zeitpunkt statistisch signifikant ($p < 0,001$) (Abbildung 13). Dieser Marker könnte möglicherweise auch einen prädiktiven Wert in der Lungenkarzinomdiagnostik haben.

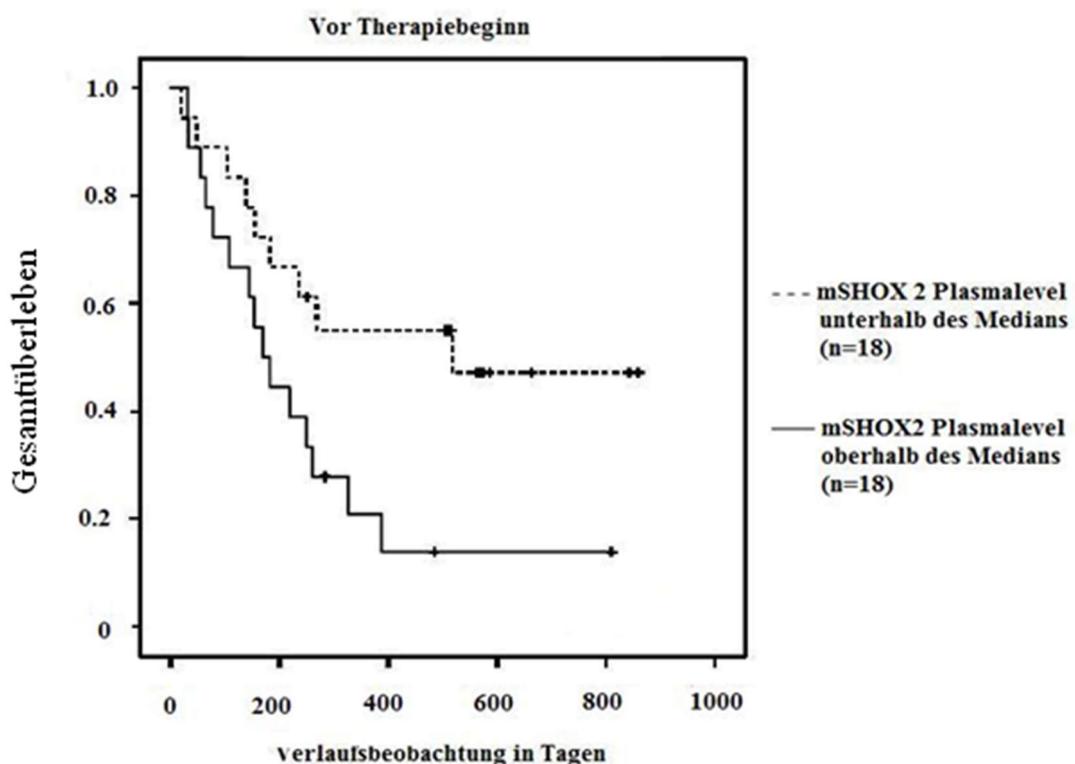


Abbildung 12: Überlebenskurve Patienten First-Line-Therapie und Second-Line-Therapie

Dargestellt sind die Werte aller 36 Patienten vor Therapiebeginn. Anhand des Medians wurde die Differenzierung in Responder und Non-Responder vorgenommen, $p = 0,037$, $HR = 2,457$.

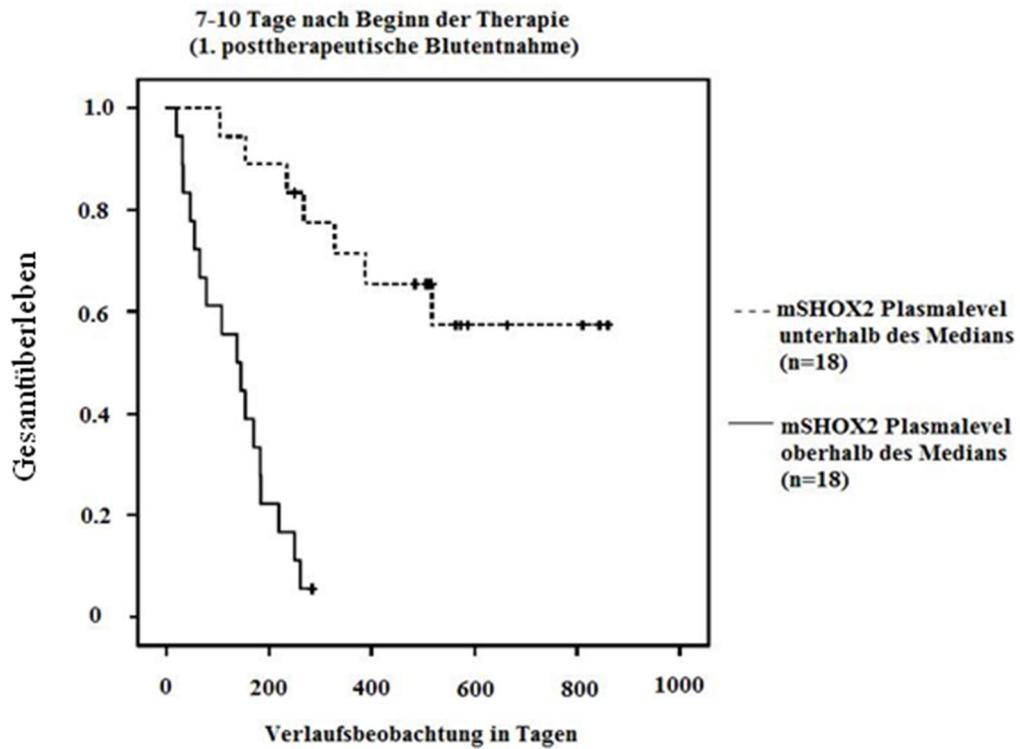


Abbildung 13: Überlebenskurve Patienten First-Line-Therapie und Second-Line-Therapie anhand des Medians

Dargestellt sind die Werte aller 36 Patienten nach der ersten Blutentnahme. Anhand des Medians wurde die Differenzierung in Responder und Non-Responder vorgenommen, $p < 0,001$.

In den beiden Abbildungen (Abb. 12 und 13) ist ein deutlicher Zuwachs der Hazard-Ratio sichtbar. Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme beträgt der Wert 2,457 und steigt bereits bei der Messung der zweiten Blutentnahme auf 11,081 an.

5. Diskussion

In unserer Studie wurden im Rahmen eines Pilotprojektes 36 Patienten mit einem Lungenkarzinom im fortgeschrittenen Stadium eingeschlossen. Der Studieneinschluss erfolgte prospektiv. Der Einschluss der Patienten erfolgte komplett unabhängig von klinischen Parametern und die Patientenversorgung wurde komplett separiert von den Laborarbeiten durchgeführt. Insgesamt untersuchten wir 31 Patienten mit First-Line-Therapie und 5 vorbehandelte Patienten mit Second-Line-Therapie. Ziel der Untersuchungen war es, anhand der Messung von mSHOX2 DNA im Plasma dieser Patienten, eine Aussage bezüglich des Therapieansprechens treffen zu können.

In den vergangenen Jahren sind durch neue Therapieansätze einige Fortschritte in der Behandlung des Lungenkarzinoms zu verzeichnen. Zu nennen ist hier eine Verbesserung des Outcomes durch eine zielgerichtete Therapie („target therapy“) bei Patientengruppen mit besonderen Veränderungen der molekularen Struktur, wie bspw. EGFR-Mutationen (Thatcher und Heighway, 2010). In diesen Fällen zeigt die Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib ein signifikant besseres Ansprechen als die Chemotherapie mit platinhaltigen Chemotherapeutika (Goeckenjan et al., 2010). Der Effekt von Erlotinib, Afatinib und Gefitinib kann durch die Entwicklung einer Resistenz, dessen häufige Ursache eine T790M Mutation ist, reduziert werden. Die Kinaseinhibitoren Osimertinib und Rociletinib zeigen gute Ergebnisse in der gezielten Behandlung von Patienten mit Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, die aufgrund einer T790M Mutation resistent gegen andere EGF-Inhibitoren geworden sind (Hirano et al., 2015). Weitere Fortschritte in der Behandlung des Lungenkarzinoms erfolgten im Bereich der Immuntherapie. Nivolumab ist ein monoklonaler Antikörper, der an dem Immun-Checkpoint-Rezeptor PD-1 auf aktivierten T-Zellen bindet. Dieser monoklonale Antikörper zeigte in einer Phase-3-Studie bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Adenokarzinom, verglichen mit dem Therapiestandard Docetaxel, eine verlängerte Überlebensrate (Brahmer et al., 2015).

Auch in der Second-Line-Therapie sind Fortschritte zu verzeichnen. Durch eine Behandlung mit Docetaxel, Pemetrexed und Erlotinib können, trotz niedriger Ansprechrate, eine Verlängerung des Überlebens und eine Verbesserung tumorbedingter Symptome erreicht werden (Goeckenjan et al., 2010). Auch im Vergleich mit Best Supportive Care Maßnahme zeigen Second-Line Behandlungen ein besseres Outcome. Neben medikamentösen weisen die

verbesserten pflegerischen Maßnahmen zusätzlich einen nicht zu unterschätzenden Effekt bei Patienten mit NSCLC im fortgeschrittenem Stadium auf (Fathi und Brahmer, 2008; Varughese et al., 2012).

Um den besten Therapiemodus zu wählen ist eine schnelle, sensitive und spezifische Methode zur Einschätzung eines Therapieansprechens von Bedeutung. Standardmäßig wird bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom nach Beginn der Therapie ein CT-Scan zur Beurteilung einer Tumorantwort durchgeführt (Goeckenjan et al., 2010). Abgesehen von den Kosten ist die Sensitivität dieses bildgebenden Verfahrens limitiert und die sichtbaren Veränderungen der Tumorgröße unter der Therapie sind nicht immer sicher zu interpretieren (Erasmus et al., 2003).

Ziel dieser Studie war es eine andere Möglichkeit zur Beurteilung des Therapieansprechens zu eruieren und zu etablieren.

In den letzten Jahren wurden einige Biomarker auf ihre Fähigkeit als Marker zum Therapiemonitoring getestet. Unter den untersuchten immunhistochemischen Biomarkern gab es keinen, der das Ansprechen auf eine Chemotherapie und die Überlebensrate vorhersagen konnte. Es war nur ein geringer Zusammenhang zwischen Markerlevel und Therapieansprechen sichtbar (Toffart et al., 2013). Neuronen spezifische Enolase (NSE) wurde zum Monitoring von SCLC Patienten genutzt. Es wurde erkannt, dass die Messungen nur bei Patienten mit erhöhtem prätherapeutischen Level des Markers sinnvoll sind (Splinter et al., 1989). Die Menge an Lactatdehydrogenase und Chromogranin A korrelierte nicht mit dem Therapieansprechen (Johnson et al., 1993). Eine Beobachtung des freien Interleukin-2-Rezeptors zeigte während des Therapieverlaufs eine Reduktion der Serumkonzentration. Dieser war aber kein Marker zur Beurteilung der Remission (Brunetti et al., 1999). Die Untersuchung der Thymidinkinase konnte keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den verschiedenen Respondergruppen der Lungenkrebspatienten erzielen (Holdenrieder et al., 2010). Allerdings zeigten sich auch einige Biomarker, die zum Therapiemonitoring bei Lungenkarzinompatienten besser geeignet sind, bspw. CYFRA 21-1 und Nucleosomen. Jedoch wird keiner von denen bisher routinemäßig in der Klinik eingesetzt (Holdenrieder et al., 2004; Holdenrieder et al., 2008; Holdenrieder et al., 2009).

Die Möglichkeit zwischen Lungentumor und Nicht-Tumor anhand des Markers mSHOX2 DNA in Bronchiallavage zu differenzieren wurde erfolgreich von *Schmidt et al., 2010* untersucht. *Dietrich et al. (2013)* berichteten über eine erfolgreiche Methode zur Extraktion von mSHOX2 DNA in Lavage von Lungentumorpatienten. Basierend auf diesem Protokoll untersuchten wir mSHOX2 im Blutplasma von 36 Patienten. Diese Analysen zeigen, dass eine quantitative Bestimmung von mSHOX2 Plasma DNA sinnvoll zur Bestimmung eines Therapieansprechens bei Patienten mit Lungenkarzinom im fortgeschrittenem Stadium erscheint. In unserer Studie haben wir die erste Blutentnahme vor Beginn der Therapie und dann im 7-10 tägigen Rhythmus bis zur CT-Untersuchung durchgeführt.

Die exakte Stadieneinteilung der Lymphknoten von Lungenkrebspatienten kann durch endobronchial gestützte (EBUS) transbronchiale Nadelaspiration (TBNA) mit hoher Zuverlässigkeit bestimmt werden (*Darwiche et al., 2013*). Wie viele Patienten nach einem negativen Testergebnis auch wirklich gesund sind gibt der negativ prädiktive Wert an. *Darwiche et al.* untersuchten, ob die Analyse von mSHOX2 DNA den negativ prädiktiven Wert des EBUS-TBNA verbessern kann. Die Studie zeigte, dass durch zusätzliche Bestimmung des Methylierungslevels von SHOX2 der negativ prädiktive Wert von 81% auf 94% gesteigert werden konnte und somit die diagnostische Sicherheit des EBUS-TBNA verbessert wird (*Darwiche et al., 2013*).

5.1. Analysen der Patienten mit First-Line-Therapie

Für einen Teil der Analysen verwendeten wir nur die Werte der Patienten mit First-Line-Therapie, um einen Einfluss der früher applizierten Chemotherapie zu vermeiden. Nach der Formel von *Kneip et al. (2011)* berechneten wir in den Proben den prozentualen Anteil von mSHOX2 DNA im Vergleich zu beta Actin als methylierungsunabhängigem Referenzwert.

In der Auswertung (siehe Abbildung 8) war ein schneller und deutlicher Abfall an mSHOX2 bei den Patienten, die auf die Therapie ansprechen, zu erkennen. Dieser Abfall ist bei zehn von zwölf Patienten bereits zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme zu sehen. Bei zwei Patienten zeigt sich der Abfall zum Zeitpunkt der 3. Blutentnahme. In zehn von zwölf Fällen ist im Verlauf ein Abfall von mSHOX2 bis unter die Nachweisgrenze ($PMR < 1\%$) zu sehen. Dieser war für

das Monitoring sowohl bei Patienten mit NSCLC als auch mit SCLC gleichermaßen zu verzeichnen.

Bei Patienten, die klinisch einen Progress aufwiesen, ist der Abfall von mSHOX2 nicht zu erkennen. Die Werte steigen im Verlauf an, sind annähernd gleich oder zeigen im Wechsel starke Schwankungen mit Abfällen und Anstiegen. Es konnte bei zehn von neunzehn Patienten eine Reduktion der Konzentration an mSHOX2 nach Therapiebeginn nachgewiesen werden. Allerdings war kein anhaltender Abfall der Menge an mSHOX2 DNA $< 1\%$ zu sehen. Auffallend war der prätherapeutisch erhöhte Median von mSHOX2 bei den Non-Respondern (26,45%) im Vergleich zu den Respondern (4,06%).

Anhand dieser Ergebnisse müssen folgende Fragen geklärt werden:

- Wann sind die besten Zeitpunkte für die Blutentnahmen?
- Gibt der Ausgangswert von mSHOX2 schon erste Hinweise auf einen progredienten Verlauf?

Unseren Resultaten zufolge sind regelmäßige Blutentnahmen im wöchentlichen Rhythmus über 12 Wochen nicht erforderlich, da bereits wenige Tage nach Therapiebeginn eine sichere Einordnung in die Gruppen Responder/ Non-Responder erfolgen kann. Entscheidend sind die Entnahmen vor Therapie, sowie in den ersten Wochen nach Therapiebeginn. Eine von uns geplante multizentrische Studie sieht insgesamt sechs Blutentnahmen vor. Die Erste erfolgt vor Beginn der Therapie, die Folgenden in den ersten 4 Wochen nach Therapiebeginn im wöchentlichen Abstand, sowie eine Entnahme zum Re-staging nach 3 Monaten.

Anhand der Resultate ist bereits zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme, d.h. ca. 7 bis 10 Tage nach Beginn des ersten Therapiezyklus, eine Differenzierung zwischen Respondern und Non-Respondern möglich ($p = 0,007$). Wenn diese Ergebnisse in einer größeren Studie verifiziert werden könnten, besteht die Möglichkeit das Therapieregime bei Nichtansprechen frühzeitig zu ändern und den Patienten von einer unwirksamen Therapie zu verschonen. Dies wäre erheblich kostengünstiger und zudem ein zeitlicher Vorteil gegenüber der CT-Untersuchung nach 2-3 Monaten.

In unserer Studie ist insgesamt ein erhöhter prätherapeutischer Median in der Gruppe der Non-Responder verglichen mit den Respondern aufgefallen.

Allerdings kann anhand dieses Wertes, aufgrund der kleinen Patientenzahl, keine Aussage bezüglich des Verlaufs getroffen werden.

5.1.1. Analyse der Patienten mit PMR < 1%

Sieben Patienten wiesen prätherapeutisch einen PMR < 1% auf. Daraufhin stellten wir uns folgende Fragen:

- Warum haben diese Patienten im Vergleich zu den anderen so einen geringen prätherapeutischen mSHOX2 Wert?
- Gibt es Gemeinsamkeiten in dieser Patientengruppe, z.B. hinsichtlich der Histologie oder des Rauchverhaltens?

Das Tumorstadium stellt einen Einflussfaktor für die Höhe an messbaren mSHOX2 dar. So zeigten *Kneip et al.*, dass im Plasma bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium (Stadium II-IV) verglichen mit sehr frühen Stadien (Stadium I) niedrigere mSHOX2-Werte detektierbar sind (Dietrich et al., 2011). Da in unserer Studie ausschließlich Patienten mit Stadium IIIB - IV eingeschlossen wurden, können wir diesen Faktor ausschließen. Von diesen 7 Patienten mit einem PMR < 1% stellten sich vier als Non-Responder und drei als Responder heraus. So dass ein prätherapeutischer PMR < 1% nicht ausschließlich einer Gruppe zugeordnet werden kann. Hinsichtlich der Tumorphistologie wiesen sechs der sieben Patienten ein Adenokarzinom auf und einer ein Plattenepithelkarzinom. Ob die Histologie eine entscheidende Einflussgröße für die Höhe der mSHOX2 DNA darstellt, muss in einer größeren Studie untersucht werden. Ebenso haben sechs der sieben Patienten eine positive Raucheranamnese. Davon hat ein Patient zum Zeitpunkt der Untersuchung geraucht, die anderen waren Ex-Raucher mit einer Anzahl von Zigarettenpackungen pro Jahr (pack years) bis zu 60. Lediglich ein Patient hatte nie geraucht. Inwiefern sich das Rauchverhalten auf die Werte an mSHOX2-DNA auswirkt, muss in einer größeren Studiengruppe untersucht werden.

5.2. Analysen bei Patienten mit Second-Line-Therapie

Unsere Untersuchungen zeigen auch Patienten mit prätherapeutischen Werten der mSHOX2 DNA von Null. Es muss geklärt werden, welche Patienten darunter

fallen. Ebenfalls muss die Anwendung dieser Methode bei Patienten mit Second-Line-Therapie hinterfragt werden.

Dadurch ergibt sich folgende Fragestellung:

- Stehen ein prätherapeutischer Wert der mSHOX2 DNA von Null und Patienten mit Second-Line-Therapie in direktem Zusammenhang?

In unsere Studie wurden 5 Patienten mit Second-Line-Therapie eingeschlossen. In 4 von 5 Fällen konnten gar keine mSHOX2 DNA Werte nachgewiesen werden. In einem Fall lag bereits vor Therapiebeginn ein hoher Wert vor, welcher im Verlauf deutlich anstieg (UKH 10). Auffällig war, dass alle Patienten mit First-Line Therapie mSHOX2-Werte größer Null aufwiesen.

- Wie wird das Therapieansprechen der Patienten mit Second-Line-Therapie im CT bewertet?
- Gibt es einen Einfluss der früher applizierten Chemotherapie auf den Nachweis von mSHOX2?

Bei den Patienten UKH 1 und UKH 2 sind in der CT-Untersuchung Verkleinerungen des Tumolvolumens zu sehen. Dies entspricht klinisch einer Remission. Der Patient UKH 10, welcher schon vor Therapiebeginn hohe mSHOX2 DNA-Werte aufwies, befindet sich klinisch im Progress. Die Patienten UKH 20 und UKH 37, bei denen keine mSHOX2-Werte messbar waren, weisen anhand der CT ebenfalls einen Progress auf. Alle 5 Patienten erhielten eine kombinierte Chemotherapie aus Carboplatin und einem Taxan (Docetaxel bzw. Paclitaxel). Mit dieser kleinen Fallzahl können wir noch keine Aussage über den Einfluss einer bereits vorher applizierten Chemotherapie treffen. Dafür ist ein größeres Patientenkollektiv notwendig.

5.3. Patienten mit EGFR-Mutation

Wir konnten in unsere Pilotstudie auch zwei Patienten mit nachgewiesener EGFR-Mutation einschließen. Diese wurden entsprechend der S3-Leitlinie mit einem Tyrosinkinaseinhibitor (Erlotinib) behandelt. Bei Patient UKH 10 sind ansteigende mSHOX2-Werte sowie ein Progress im CT sichtbar. Patient UKH 31 zeigt nach dem CT eine Remission, die mSHOX2-Werte sind im Verlauf unter der

Nachweisgrenze. Anhand dieser zwei Verläufe kann lediglich gezeigt werden, dass die Messung von mSHOX2 auch bei der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren sinnvoll ist. Eine Aussage über den Einfluss der EGFR-Mutation oder der Tyrosinkinaseinhibitoren auf den Verlauf von mSHOX2 ist bei der geringen Fallzahl nicht möglich.

5.4. Vergleich zum derzeitigen Standard im Therapiemonitoring

Die Wirksamkeit der Chemo- bzw. Radiochemotherapie bei Patienten mit Lungenkarzinom wird nach der gültigen S3-Leitlinie anhand der Volumenänderung des Tumors im CT festgestellt. Unmittelbar nach Beginn der Chemotherapie verändert sich das Tumolvolumen nur sehr langsam (Kratochwil et al., 2010). Um entsprechende Größenänderungen in der Bildgebung sehen zu können, müssen einige Wochen abgewartet werden. Daher erfolgt die Verlaufskontrolle nach den Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST-Kriterien) nach 8 – 12 Wochen. Die Ergebnisse der Bildgebung sind durch hohe Kosten und eine limitierte Sensitivität gekennzeichnet. (Kratochwil et al., 2010; William et al., 2013). *William et al.* (2013) untersuchten die Korrelation zwischen der Veränderung im CT und dem Gesamtüberleben bei Patienten mit NSCLC nach neoadjuvanter Chemotherapie und operativem Eingriff. Hierbei konnte kein Zusammenhang gezeigt werden. Als mögliches Problem wurde das Unvermögen, anhand der CT-Untersuchung durchgängig Responder identifizieren zu können, diskutiert.

Gibt es eine andere Methode, die mit einer höheren Sensitivität und Spezifität das Therapieansprechen aufzeigen kann?

Mit Hilfe von ROC-Analysen haben wir die Korrelation zwischen der Aussagekraft der gemessenen mSHOX2-Werte mit den Ergebnissen beim Restaging mittels CT untersucht. Hierfür haben wir die Werte der 24 Patienten mit First-Line-Therapie und einem PMR > 1% verwendet. Zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn beträgt die *Area under the curve* (AUC) 0,593. Anhand dieser Werte ist noch keine Differenzierung in Responder bzw. Non-Responder möglich. Bereits direkt nach Therapiebeginn steigt der Wert der AUC auf 0,844. Zum Zeitpunkt der 5. Blutentnahme ist sogar ein Anstieg auf 0,939 und ab der 7. Blutentnahme auf 1,0 zu erkennen. Diese Analyse verdeutlicht einerseits den möglichen Nutzen von mSHOX2 zum Tumormonitoring unter Therapie, andererseits kann mSHOX2 bereits zu einem deutlich früheren Zeitpunkt eine Differenzierung der beiden Gruppen ermöglichen.

In einer weiteren statistischen Untersuchung haben wir die Werte aller 36 Patienten verwendet, auch die mit einem prätherapeutischen mSHOX2-Wert von Null und die Patienten mit Second-Line-Therapie, um eine Überlebenskurve mittels Kaplan-Meier-Analyse zu erstellen. Hierbei ist ein starker Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit und den PMR's von mSHOX2 zu verzeichnen. In dieser Analyse wurden die Patienten nicht anhand der retrospektiv durchgeführten Differenzierung mittels CT in Responder und Non-Responder, sondern durch einen Median aller Werte in zwei Gruppen eingeteilt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem mSHOX2-Wert zur Baseline unterhalb des Medians eine etwas längere Überlebenszeit haben. Bereits zur ersten Blutentnahme nach Therapiebeginn ist die Differenzierung in die zwei Gruppen statistisch signifikant ($p < 0,001$) und das Gesamtüberleben der Responder deutlich länger.

5.5. Stärken und Schwächen der Studie

Die Studie wurde als Pilotprojekt mit einer kleinen Fallzahl (36 Patienten) gestartet, um eine erste Aussage bezüglich der Verwendung von mSHOX2-DNA im Plasma von Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom zum Tumormonitoring treffen zu können. Diese Fragestellung konnten wir positiv beantworten, da unsere Ergebnisse statistisch signifikant die Differenzierung der Patienten in Responder und Non-Responder ermöglichen.

Als Kriterium für den Studieneinschluss wurden Patienten in einem bereits fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung (Stadium IIIB - IV nach UICC) festgelegt. Alter, Geschlecht, Rauchverhalten, Histologie und Art der Chemotherapie waren davon komplett unabhängig. Anhand der kleinen Fallzahl ist keine Aussage über den Einfluss dieser einzelnen Faktoren auf die Veränderung von mSHOX2 möglich. Um gezielte Aussagen dazu treffen zu können, bspw. ob die Höhe an mSHOX2 mit dem histologischen Typ korreliert oder ob die applizierten Chemotherapeutika unterschiedliche Veränderungen der mSHOX2-DNA erzielen, sind größere Studien notwendig.

Es gilt auch herauszufinden, bei welchen Patienten keine mSHOX2-Werte detektierbar sind. Unsere Ergebnisse zeigen bei 4 von 5 Patienten mit Second-Line-Therapie gar kein mSHOX2-Signal, jedoch sind bei einem dieser Patienten sehr hohe Werte nachweisbar. Ob die Messung von mSHOX2 bei Patienten mit

Second-Line-Therapie sinnvoll zur Beurteilung des Therapieansprechens erscheint, kann in dieser kleinen Fallzahl nicht beantwortet werden.

In dem vorliegenden Projekt konnten optimale Organisationsabläufe erzielt werden. Die Patienten, welche sich stationär oder ambulant vorstellten, befanden sich in der Universitätsklinik Halle. Das pneumologische Forschungslabor befindet sich ebenfalls in der Universitätsklinik Halle. Insgesamt konnten auf kurzem Weg die Blutentnahmen mit der anschließenden Bearbeitung im Labor durchgeführt werden. In der Routinearbeit sind die Arbeitsabläufe zwischen Blutentnahme und Laborarbeit möglicherweise zeitlich nicht so optimal realisierbar. Es soll untersucht werden, ob die Ergebnisse in mehreren Einrichtungen unter unterschiedlichen Bedingungen so gut reproduzierbar sind wie in unserem Pilotprojekt. Für die Analyse einer großen Patientenzahl startete bereits eine multizentrische Studie, welche in mehreren Einrichtungen in Halle, Greifswald und Berlin durchgeführt wird.

5.6. Ausblick für die Zukunft

Aus unseren Ergebnissen schlussfolgern wir, dass die Messungen des Plasmalevels von mSHOX2 im klinischen Ablauf der spät diagnostizierten Lungenkarzinompatienten in ein systematisches Behandlungsverfahren aufgenommen werden kann. Diese Schlussfolgerung setzt voraus, dass sich diese Ergebnisse in der multizentrischen Studie mit mehreren 100 Patienten bestätigen lassen.

Mit dieser Analyse ist eine schnellere und sensitivere Bestimmung der Tumorantwort im Vergleich zur CT-Untersuchung möglich. Ob die Messung von mSHOX2-DNA auch einen prädiktiven Wert hat, muss in künftigen Studien ermittelt werden.

In dieser Studie haben wir ausschließlich Patienten im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung untersucht (Stadium IIIB - IV). In einer größeren Studien könnte das Verhalten von mSHOX2 in den verschiedenen Stadien untersucht werden.

Die Frage ob sich Patienten mit einem sehr niedrigen prätherapeutischen mSHOX2-Wert zu denen mit einem höheren mSHOX2-Level klinisch unterschiedlich verhalten muss in einer größeren Studie beantwortet werden.

Ebenso muss die prädiktive Bedeutung des prätherapeutischen mSHOX2-Wertes weiter untersucht werden

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Pilotstudie hatte das Ziel, die Eignung von mSHOX2 Plasma DNA zum Tumormonitoring bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom unter Chemo- bzw. Radiochemotherapie zu untersuchen. Der DNA-Methylierungsmarker mSHOX2 zeigte bereits in ersten Studien zur Unterscheidung zwischen maligner und benigner Lungenerkrankung eine außerordentlich gute Performance.

Insgesamt wurden 36 Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom (NSCLC und SCLC) in die Studie eingeschlossen. Der Einschluss erfolgte prospektiv. Das Studienteam im Labor war gegenüber den klinischen Daten, dem klinischen Verlauf und den Re-Staging-Untersuchungen verblindet. Ein Zusammenführen der klinischen Daten und Ergebnissen der Untersuchung von mSHOX2 erfolgte erst nach Abschluss der Laboruntersuchungen. Insgesamt untersuchten wir 31 Patienten mit First-Line-Therapie und 5 vorbehandelte Patienten mit Second-Line-Therapie. 34 Patienten erhielten eine Platin-basierte Chemotherapie und zwei Patienten mit aktivierender Mutation im EGFR-Gen wurden mit einem Tyrosinkinaseinhibitor behandelt. Die Menge an methylierter SHOX2 (mSHOX2) Plasma DNA wurde vor und unter der Therapie bis zum Re-staging gemessen. Als Schwellenwert für die technisch mögliche Messung an mSHOX2 DNA wurde ein PMR (percentage methylation reference) $> 1\%$ festgelegt.

Das Re-staging erfolgte in der Uniklinik Halle standardmäßig ca. 12 Wochen nach Therapiebeginn. Anhand der Größenveränderung des Tumors wird eine Einteilung in Patienten, die auf eine Therapie ansprechen (bei stable disease oder Volumenreduktion des Tumors) und Patienten, die auf die Therapie nicht ansprechen (bei Vergrößerung des Tumors) vorgenommen. In unserer Pilotstudie wurden nach dem Re-staging mittels CT 19 Patienten als Non-Responder und 17 Patienten als Responder identifiziert. In der Gruppe der Responder zeigt sich bereits frühzeitig eine Reduktion der mSHOX2 DNA. In zehn von zwölf Fällen ist sogar ein Abfall der mSHOX2 DNA bis unter die Nachweisgrenze zu sehen (PMR $< 1\%$). Hingegen sind die Werte der mSHOX2 DNA bei Patienten, die einen Progress aufweisen, im Verlauf ansteigend, annähernd gleich oder zeigen starke Schwankungen mit Anstiegen und Abfällen im Wechsel.

Mittels ROC-Analysen wurde die Korrelation zwischen der Aussagekraft der gemessenen mSHOX2-Werte mit den Ergebnissen der CT-Darstellung

untersucht. Hierfür wurden die Werte der 24 Patienten mit First-Line-Therapie und einem PMR > 1 % verwendet. Bereits zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme nach Therapiebeginn beträgt der Wert der AUC 0,844. Dieser Wert steigt zum Zeitpunkt der fünften Blutentnahme nach Therapiebeginn auf 0,939 und ab der siebten Blutentnahme sogar auf 1,0 an.

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie geben einen starken Hinweis auf die Eignung von mSHOX2 DNA als Parameter für das Tumormonitoring unter Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom. Das Ansprechen bzw. Nichtansprechen auf eine Therapie kann mit Hilfe dieses Methylierungsmarkers viel sensitiver und schneller im Vergleich zur CT-Untersuchung bestimmt werden und muss in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

7. Literaturverzeichnis

Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K (2012) Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 63: 199-215.

Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M (1999) Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 18(1): 65-73.

Biomarkers Definition Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 69:89–95.

Ballestar E, Wolffe AP (2001) Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* 268:1-6.

Beasley MB, Brambilla E, Travis WD (2005) The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 40: 90-97.

Blaschke RJ, Monaghan AP, Schiller S, Schechinger B, Rao E, Padilla-Nash H, Ried T, Rappold G (1998) SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Natl Acad Sci, USA* 95:2406-2411.

Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373(2):123-35.

Brambilla E, Lantuejoul S (2009) Pathology and immunohistochemistry of lung cancer. *Eur Resp Monogr* 44.20: 15–35.

Brunetti G, Bossi A, Baiardi P, Jedrychowska I, Pozzi U, et al. (1999) Soluble interleukin 2 receptor (sIL2R) in monitoring advanced lung cancer during chemotherapy. *Lung Cancer* 23: 1-9.

Bühning P (2008) Geschlechtsspezifische Aspekte des Rauchens: Höheres Lungenkrebsrisiko für Frauen. *Dt Ärzteblatt* 105(47): B-2129.

Coletta RD, Christensen K, Reichenberger KJ, Lamb J, Micomonaco D, Huang L, Wolf DM, Müller-Tidow C, Golub TR, Kawakami K, Ford HL (2004) The Six1 homeoprotein stimulates tumorigenesis by reactivation of cyclin A1. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(17):6478-83.

Darwiche K, Zarogoulidis P, Baehner K, Welter S, Tetzner R, Wohlschlaeger J, Theegarten D, Nakajima T, Freitag L (2013) Assessment of SHOX2 methylation in EBUS-TBNA specimen improves accuracy in lung cancer staging. *Ann Oncol*. 11:2866-70.

Dietrich D, Kneip C, Raji O, Liloglou T, Seegebarth A, Schlegel T, Flemming N, Rausch S, Distler J, Fleischhacker M, Schmidt B, Giles T, Walshaw M, Warburton C, Liebenberg V, Field JK (2012) Performance evaluation of the DNA methylation biomarker SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates. *Int J Oncol*. 40(3): 825-832.

Dietrich D, Jung M, Puetzer S, Leisse A, Holmes EE, et al. (2013) Diagnostic and Prognostic Value of SHOX2 and SEPT9 DNA Methylation and Cytology in Benign, Paramalignant and Malignant Pleural Effusions. *PLoS One* 8: e84225.

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000168779;r=3:158095954-158106503 Stand: 05.12.2015

Erasmus JJ, Gladish GW, Broemeling L, Sabloff BS, Truong MT, et al. (2003) Interobserver and intraobserver variability in measurement of non-small-cell carcinoma lung lesions: implications for assessment of tumor response. *J Clin Oncol* 21: 2574-2582.

Fathi AT, Brahmer JR (2008) Chemotherapy for advanced stage non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 20: 210-216.

Krebs in Deutschland 2009/2010. In: Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (Hrsg.): Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin, 2013, 9. Ausgabe, S. 56-59.

Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I (2003) Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arq Gastroenterol* 40: 256-261.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genom Res* 6: 1095-1101.

Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, et al. (2010) Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer. *Pneumologie* 64 Suppl 2: e1-164.

Hirano T, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Oashi A, Ishioka K, Arai D, Nukaga S, Miyawaki M, Kawada I, Naoki K, Costa DB, Kobayashi SS, Betsuyaku T, Soejima K (2015) In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 17: 6(36):38789-803.

Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, et al. (2004) Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10: 5981-5987.

Holdenrieder S, von Pawel J, Dankelmann E, Duell T, Faderl B, et al. (2008) Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring first-line chemotherapy of small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 14: 7813-7821.

Holdenrieder S, von Pawel J, Dankelmann E, Duell T, Faderl B, et al. (2009) Nucleosomes and CYFRA 21-1 indicate tumor response after one cycle of chemotherapy in recurrent non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 63: 128-135.

Holdenrieder S, von Pawel J, Duell T, Feldmann K, Raith H, et al. (2010) Clinical relevance of thymidine kinase for the diagnosis, therapy monitoring and prognosis of non-operable lung cancer. *Anticancer Res* 30: 1855-1862.

Huber RM: Empfehlungen zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge. In: Tumorzentrum München (Hrsg): Tumoren der Lunge und des Mediastinums. Zuckschwerdt Verlag, München, 2011, 9. Auflage, S. 44-52.

Husain AN, Kumar V: The Lung. In: Robbins S, Cotran R, Kumar V, Abbas AK, Fausto N (Hrsg): Pathologic Basis of Disease. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005, 7.Aufl, S. 757-764.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 61(4): 1659-1665.

Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 60:277-300.

Johnson PW, Joel SP, Love S, Butcher M, Pandian MR, et al. (1993) Tumour markers for prediction of survival and monitoring of remission in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 67: 760-766.

Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3(6): 415-428.

Kneip C, Schmidt B, Seegebarth A, Weickmann S, Fleischhacker M, Liebenberg V, Field JK, Dietrich D (2011) SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. *J Thorac Oncol.*, 6(10): 1632-1638.

Kratochwil C, Haberkorn U, Giesel FL. (2010) PET/CT for diagnostics and therapy stratification of lung cancer. *Radiologe* 50: 684-691.

Lee PN, Forey BA, Coombs KJ (2012) Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence in the 1900s relating smoking to lung cancer. *BMC Cancer* 12: 385.

Leon SA, Green A, Yaros MJ, Shapiro B (1975) Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *J.Immunol.Methods*, 9(2): 157-164.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25(4): 402-8.

Mandel P, Metais P (1948) Les acid nucleiques du plasma sanguis chez l'homme. *C.R.Acad.Sci.Paris* 142: 241-243.

Mikeska T, Bock C, Do H, Dobrovic A (2012) DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation. *Expert Rev Mol Diagn.* 12(5):473-87.

Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R (2010) Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. *J.Thorac.Oncol.* 5(1): 29-33.

Mountain CF (1997) Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. Chest 111: 1710-1717.

Mountain CF (2000). The International System for Staging Lung Cancer. Semin Surg Oncol 18: 106-15.

Müller KM: Lunge In: Böker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg): Pathologie, Urban&Fischer, München, 2005, 3. Aufl.,619-620.

Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S (2005) DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. J.Urol. 173:243-246.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell. 99(3):247-57.

Oxnard GR, Zhao B, Sima CS, Ginsberg MS, James LP, Lefkowitz RA, Guo P, Kris MG, Schwartz LH, Riely GJ (2011) Variability of lung tumor measurements on repeat computed tomography scans taken within 15 minutes. J.Clin.Oncol. 29(23): 3114-3119.

Qian J, Massion PP (2008) Role of chromosome 3q amplification in lung cancer. J Thorac Oncol. 3(3):212-5.

R project for Statistical Computing. (2014) [http://www r-project org/](http://www.r-project.org/) Available: <http://www.r-project.org/>.

Rami-Porta R, Bolejack V, Goldstraw P: The new tumor, node and metastasis staging system. Semin Respir Crit Care Med 32:44-51, 2011.

https://www.researchgate.net/profile/Christoph_Lahtz/publication/200445433/figure/fig1/AS:349436925497345@1460323663285/Abbildung-2-3-Chemischer-Ablauf-der-Bisulfit-Reaktion-Der-erste-Schritt-zeigt-die_big.pbm
Stand:05.05.2016

Robertson KD, Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat.Rev.Genet.* 1:11-19.

Saiki et al. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele specific oligonucleotide probes. *Nature* 13-19; 324 (6093):163-6.

Schmidt B, Liebenberg V, Dietrich D, Schlegel T, Kneip C, Seegebarth A, Flemming N, Seemann S, Distler J, Lewin J, Tetzner R, Weickmann S, Wille U, Liloglou T, Raji O, Walshaw M, Fleischhacker M, Witt C, Field JK (2010) SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC.Cancer*, 10: 600.

Schneider KU, Dietrich D, Fleischhacker M, Leschber G, Merk J, Schaper F, Stapert HR, Vossenaar ER, Weickmann S, Liebenberg V, Kneip C, Seegebarth A, Erdogan F, Rappold G, Schmidt B (2011) Correlation of SHOX2 gene amplification and DNA methylation in lung cancer tumors. *BMC.Cancer*, 11: 102.

Splinter TA, Carney DN, Teeling M, Peake MD, Kho GS, et al. (1989) Neuron-specific enolase can be used as the sole guide to treat small-cell lung cancer patients in common clinical practice. *J Cancer Res Clin Oncol* 115: 400-401.

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P (2001) About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin.Chim.Acta*, 313(1-2): 139-142.

Suvà ML, Riggi N, Bernstein BE (2013) Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 29;339(6127):1567-70.

Thatcher N, Heighway J (2010) Maintenance and consolidation therapy in patients with unresectable stage III/IV non-small cell lung cancer. *Oncologist* 15: 1034-1042.

Toffart AC, Timsit JF, Couraud S, Merle P, Moro-Sibilot D, et al. (2013) Immunohistochemistry evaluation of biomarker expression in non-small cell lung cancer (Pharmacogenoscan study). *Lung Cancer* 83(2):182-8.

Varughese S, Jahangir KS, Simpson CE, Boulmay BC (2012) A paradigm shift in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Am J Med Sci* 344: 147-150.

Warren JD, Xiong W, Bunker AM, Vaughn CP, Furtado LV, Roberts WL, Fang JC, Samowitz WS, Heichman KA (2011) Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med* 14;9:133.

William WN, Jr., Pataer A, Kalhor N, Correa AM, Rice DC, et al. (2013) Computed tomography RECIST assessment of histopathologic response and prediction of survival in patients with resectable non-small-cell lung cancer after neoadjuvant chemotherapy. *J Thorac Oncol* 8: 222-228.

Wolffe AP, Jones PL, Wade PA (1999) DNA demethylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96(11): 5894-5896.

Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF, Wu JT (2002) Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin.Chim.Acta*, 321(1-2): 77-87.

Yu L, Todd NW, Xing L, Xie Y, Zhang H, Liu Z, Fang H, Zhang J, Katz RL, Jiang F (2010) Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int.J.Cancer*, 127(12): 2870-2878.

8. Thesen

1. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie geben einen starken Hinweis auf die Eignung von mSHOX2 DNA als Parameter für das Tumormonitoring bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom (Stadium IIIB/ IV).
2. Das Ansprechen bzw. Nichtansprechen auf eine Therapie kann mit Hilfe dieses Methylierungsmarkers sensitiver und schneller im Vergleich zum aktuellen Standard (CT-Untersuchung nach 8 – 12 Wochen) bestimmt werden.
3. Bereits zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme, d.h. 7-10 Tage nach Therapiebeginn, ist eine Differenzierung zwischen Respondern und Non-Respondern statistisch signifikant möglich ($p = 0,007$).
4. Mittels ROC-Analysen wurde die Korrelation zwischen der Aussagekraft der gemessenen mSHOX2 DNA und den Ergebnissen beim Restaging mittels CT bestimmt. Bereits zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme beträgt der Wert der AUC 0,844).
5. In der Gruppe der Responder war in 10 von 12 Fällen war ein Abfall der Konzentration an mSHOX2 DNA bis unter die Nachweisgrenze (PMR < 1%) zu sehen.
6. Anhand des prätherapeutisch ermittelten Medians an mSHOX2 DNA im Plasma wurde eine Differenzierung in Responder und Non-Responder vorgenommen ($p = 0,037$). Daraus könnte sich die Möglichkeit eines Prognosemarkers ergeben.
7. Mögliche Einflussfaktoren auf gemessene mSHOX2 DNA Werte, bspw. Art der applizierten Chemotherapie, bereits vorbehandelte Patienten zur Second-Line-Therapie, Rauchverhalten des Patienten, müssen untersucht werden.

9. Selbstständigkeitserklärung

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

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

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

Datum

Julia Beyer

10. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Julia Beyer, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind.

Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Datum

Julia Beyer

11. Tabellarischer Lebenslauf

Name, Vorname	Beyer, Julia
Geburtsdatum	13.05.1990
Geburtsort	Rochlitz
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Adresse	Thomasiusstraße 38, 06110 Halle (Saale)
Telefon	0174/4885669
E-Mail	juliabeyer90@web.de

Akademischer Werdegang:

2000 - 2005	Sophiengymnasium Colditz
2005 - 2008	Johann-Mathesius-Gymnasium Rochlitz
10/2008 – 05/2015	Studium der Humanmedizin, Martin-Luther Universität Halle Wahlfächer: Vorklinik – <i>Medizinische Bildgebung</i> Klinik – <i>Internistische Intensivmedizin</i>
08/2010	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2015	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufserfahrung:

07/2015-12/2015	Assistenzärztin in der Klinik für Physikalische und Rehabilitative Medizin, BG Klinik Bergmannstrost Halle
seit 01/2016	Assistenzärztin in der Klinik für Orthopädie, Zentrum für Rückenmarkverletzte, BG Klinik Bergmannstrost Halle

Datum Julia Beyer

12. Danksagung

Mein Dank für die großartige Unterstützung während der gesamten Forschungsphase und beim Erstellen der Dissertationsschrift gilt zunächst Herrn PD Dr. Bernd Schmidt, der mir viel Geduld entgegenbrachte und immer wertvolle Ratschläge hatte und Herrn Dr. rer. nat. Fleischhacker, welcher zu jeder Uhrzeit für mich erreichbar war und für jede Fragestellung eine Antwort parat hatte. Vielen Dank.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Michl, der im März 2015 die Leitung der Klinik übernommen und die Rahmenbedingungen für meine Arbeit wohlwollend unterstützt hat.

Besonders danke ich Schwester Ute für die Unterstützung in der Probensammlung und Dana Reinicke. Dana, du hast einen sehr großen Teil für diese Arbeit beigetragen, dafür danke ich dir sehr.

Ich danke meiner Familie für die Geduld und die manchmal notwendigen motivierenden Gespräche. Ihr seid der wichtigste Rückzugsort für mich. Egal in welcher Situation in mich befinde, auf eure Unterstützung kann ich mich immer verlassen.

Gregor Grund danke ich von ganzem Herzen für seine unermüdliche Motivation in allen Stimmungslagen, welche wir zusammen immer überstanden haben.