

Aus dem Arbeitsbereich Pulmologie mit Schwerpunkt Pneumologische
Onkologie und Lungentransplantation, Campus Charité Mitte,
der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Nachweis von tumorassoziierter mRNA in Serum und
zellfreier Bronchiallavage von Patienten mit benigner und
maligner Lungenerkrankung**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eileen Corinna Engel

aus Potsdam

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Ch. Witt
2. Prof. Dr. med. A. Gillissen
3. Prof. Dr. med. R. Schindler

Datum der Promotion: 19.11.2010

Meiner Mutter Corinna Engel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Lungenkarzinom.....	7
1.1.1	Epidemiologie des Lungenkarzinoms	7
1.1.2	Ätiologie.....	8
1.1.3	Metastasierung	9
1.2	Extrazelluläre Nukleinsäuren	9
1.2.1	Herkunft extrazellulärer Nukleinsäuren und Quantifizierung extrazellulärer RNA	9
1.2.2	Schutz der extrazellulären Nukleinsäuren.....	10
1.2.3	Haben extrazelluläre Nukleinsäuren eine biologische Bedeutung?.....	11
1.2.4	Detektion tumorassoziierter extrazellulärer mRNA.....	12
1.2.5	Methodische Voraussetzungen für die Untersuchung extrazellulärer mRNA.....	14
1.3	Referenzgene.....	14
1.4	Tumorassozierte Gene.....	16
1.4.1	HER2/neu (c-erbB-2)	16
1.4.2	hnRNP-B1 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein B1)	17
1.4.3	Melanomantigen 2 (MAGE-2, MAGE-A2)	17
1.4.4	Proteingenprodukt 9.5 (PGP 9.5)	18
1.4.5	Thyroid transcription factor-1 (TTF-1), Synonyme: NKX2-1, NKX2A	19
1.4.6	Telomerase (Telomer-spezifische Transferase, humane Telomerase Reverse Transkriptase).....	19
1.4.7	Zentrosomenassoziierte Proteine.....	22
1.5	Forschungsprojekt und Aufgabenstellung.....	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.1	Geräte (bis auf Zentrifugen).....	25
2.1.2	Zentrifugen	25
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	25
2.2	Reagenzien	26
2.2.1	Reagenzien	26
2.2.2	PCR-Primer	27
2.2.3	Random Primers (Invitrogen™ Life Technologies)	27
2.2.4	Tumorzelllinien	28
2.2.5	pUC Mix Marker 8, ready-to-use (MBI Fermentas)	28
2.2.6	Ladepuffer (MBI Fermentas)	28
2.2.7	Herstellung ausgewählter Lösungen und Puffer	28
2.3	Patienten	29
2.3.1	Patienteneinschluss.....	29
2.3.2	Vorbereitung.....	30
2.3.3	Tumorpatienten	30
2.3.4	Nichttumorpatienten.....	32
2.4	Bronchoskopie, Probenaufbereitung und –lagerung	32
2.4.1	Bronchoskopie, Materialgewinnung und Dokumentation	32
2.4.2	Untersuchungsmaterial	33
2.5	RNA-Isolation, DNase-Behandlung und cDNA-Synthese	34
2.5.1	RNA-Isolation	34
2.5.1.1	RNA-Isolation aus Serum und BL mit heißem wassergesättigtem Phenol.....	34
2.5.1.2	RNA-Isolation aus Serum und BL mit dem QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit	35
2.5.1.3	Single-Step-Methode nach Chomczynski & Sacchi 1987	35

2.5.2 DNase-Behandlung	36
2.5.3 cDNA-Synthese.....	36
2.6 PCR	37
2.6.1 Primer-Etablierung und Sequenzierung	37
2.6.2 Template.....	38
2.6.3 Qualitative PCR.....	38
2.6.3.1 Tumorzelllinien	38
2.6.3.2 Amplifikationsbedingungen	38
2.6.3.3 Post-PCR-Processing	39
2.6.4 Real-Time PCR (Quantitative PCR)	39
2.6.4.1 Amplifikationsbedingungen	39
2.6.4.2 Absolute Quantifizierung von GAPDH	41
2.6.4.3 Relative Quantifizierung	42
2.6.4.4 Auswertung	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Qualitative PCR.....	43
3.1.1 Tumorzelllinien	43
3.1.2 Ergebnisse der Tumorpatienten der Gruppe A.....	43
3.1.2.1 Expression von hnRNP-A2	44
3.1.3 Ergebnisse der Untersuchungen der mit dem QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit isolierten RNA	44
3.1.3.1 Genexpression in Serum und BL	44
3.1.3.2 Splicevarianten	46
3.1.4 Expression von PGP 9.5, Pericentrin und Aurora in Serum, BL und BL-Zellen.....	49
3.2 Real-Time PCR	50
3.2.1 Absolute Quantifizierung von GAPDH-mRNA aus zellfreiem Serum und BL	50
3.2.1.1 Tumorpatienten der Gruppe A	50
3.2.1.2 Tumorpatienten der Gruppe B und Nichttumorpatienten	51
3.2.2 Relative Quantifizierung tumorassoziierter mRNA.....	57
3.2.2.1 hnRNP-B1	57
3.2.2.2 MAGE-2.....	61
3.2.2.3 hTR.....	65
3.3 Methodenvergleich.....	65
3.3.1 Qualitative PCR.....	65
3.3.2 Absolute GAPDH-mRNA-Quantifizierung bei Tumorpatienten der Gruppen A und B	66
4 Diskussion	68
4.1 Nachweis tumorassoziierter mRNA in zellfreier BL, Serum und BL-Zellen	68
4.1.1 Expression tumorassoziierter mRNA bei Nichttumorpatienten.....	78
4.1.2 Quantifizierung von hnRNP-B1 und MAGE-2.....	78
4.2 Referenzgene für die Quantifizierung tumorassoziierter mRNA.....	79
4.3 Eignung der einzelnen Gene zur Untersuchung der verschiedenen Materialien nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse.....	81
4.4 Existenz extrazellulärer mRNA in zellfreier BL trotz RNasen?	82
4.5 Fehlerbetrachtung Methodik	83
4.5.1 Patientenanzahl.....	83
4.5.2 Materialmangel und mRNA-Isolation.....	83
4.5.3 Relative Quantifizierung	84
5 Zusammenfassung	85
6 Literaturverzeichnis.....	86

6.1 Artikel.....	86
6.2 Arbeitsanleitungen	103
6.3 Internet	103
7 Abkürzungen	104
8 Danksagung.....	106
9 Erklärung über die Selbständigkeit bei der Anfertigung der Arbeit	107
10 Lebenslauf	108
11 Publikationsliste	109

1 Einleitung

1.1 Lungenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Lungenkarzinoms

Lungenkarzinome zählen zu den häufigsten malignen Tumoren. Im Jahr 2004 wurden in Deutschland mehr als 46000 neudiagnostizierte Lungenkarzinome und knapp 40000 Sterbefälle aufgrund von Lungenkarzinomen gemeldet (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., ↗ Tabellen 1-1a, 1-1b). Die 5-Jahres-Überlebensrate für Männer und Frauen liegt in Deutschland bei 15 bzw. 18 % (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.). Patienten mit lokal begrenzten Karzinomen der Lunge haben eine signifikant höhere Überlebensrate als Patienten mit metastasierten Karzinomen. Häufig liegt zum Diagnosezeitpunkt ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor. Diese Zusammenhänge bestätigen u. a. die Daten des SEER-Programms (Surveillance, Epidemiology, and End Results) der USA, welches maligne Tumoren von ca. 26% der US-amerikanischen Bevölkerung seit 1975 erfasst. Die erfassten Daten zeigen außerdem, dass die frühzeitig metastasierenden kleinzelligen Lungenkarzinome eine schlechtere Prognose als nichtkleinzellige Karzinome aufweisen (Ries et al. 2007, ↗ Tabelle 1-2). Für Gesamtdeutschland finden sich keine vergleichbaren Statistiken, allerdings bestätigen regionale Tumorregister wie z. B. das Münchener Tumorregister die Abhängigkeit der Überlebensrate vom Diagnosezeitpunkt (<http://www.tumorregister-muenchen.de>).

Männer (n=230500)		Frauen (n=206000)	
Prostata	25,4 %	Mamma	27,8 %
Darm	16,2 %	Darm	17,5 %
Lunge	14,3 %	Lunge	6,4 %

Tabelle 1-1a Neuerkrankungen

Männer (n=110745)		Frauen (n=98079)	
Lunge	26,0 %	Mamma	17,9 %
Darm	12,4 %	Darm	14,3 %
Prostata	10,1 %	Lunge	11,2 %

Tabelle 1-1b Sterbefälle

Anteil der Lungenkarzinome an der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen (Tabelle 1-1a) und Krebssterbefälle (Tabelle 1-1b) in Deutschland 2004 (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.)

	NSCLC & SCLC (n=144196)		NSCLC (n=122900)		SCLC (n=21296)	
	Tumorstadium [%]	5-Jahres-Überlebensraten [%]	Tumorstadium [%]	5-Jahres-Überlebensraten [%]	Tumorstadium [%]	5-Jahres-Überlebensraten [%]
alle Stadien	100	15,3	100	17	100	5,8
lokal begrenzt, nicht metastasiert	16	49,9	18	51,7	6	19,2
Ausbreitung in benachbarte Gewebe, regionäre Lymphknotenmetastasen	37	15,5	38	16,7	34	9,9
Fernmetastasen	39	2,0	36	2,0	55	1,8
ohne Angabe	8	7,7	9	7,9	5	6,3

Tabelle 1-2 SEER-Programm (Surveillance, Epidemiology, and End Results) der USA - Lungenkarzinome: Tumorstadien zum Diagnosezeitpunkt und relative 5-Jahres-Überlebensraten der kaukasischen Bevölkerung 1996-2002 (Ries et al. 2007)

1.1.2 Ätiologie

Etwa 80 bis 90 % der Lungenkarzinome sind mit Tabakrauch assoziiert, der zahlreiche kanzerogene Verbindungen enthält, u. a. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, N-Nitrosamine und aromatische Amine. Da nur etwa 10 bis 15 % der Raucher an einem Lungenkarzinom erkranken (Mattson et al. 1987), wird eine individuell unterschiedliche, genetisch bedingte Suszeptibilität angenommen. Auf der Suche nach den entsprechenden Genen wurden u. a. Polymorphismen von Enzymen der Biotransformation untersucht, welche die oben genannten kanzerogenen Verbindungen des Tabakrauches metabolisieren, v. a. das Phase-I-Enzym CYP1A1 (Genotypen Ile462Val und MspI) und das Phase-II-Enzym Glutathion-S-Transferase (GSTM1-null-Genotyp). Die kombinierte Betrachtung von Polymorphismen verschiedener Gene erscheint hier vielversprechend. Chronische Entzündungen stellen ebenfalls einen Risikofaktor für das spätere Entstehen eines Lungenkarzinoms dar. Zu den entzündungsassoziierten Genen gehört beispielsweise das IL-1 β -Gen, in dessen Promotorregion in ersten Untersuchungen für zwei Polymorphismen, T-31C und C-511T, ein erhöhtes Lungenkarzinomrisiko festgestellt wurde (Schwartz et al. 2007). Ein Dinukleotidpolymorphismus des Tyrosinkinase-Rezeptors EGFR mit einer unterschiedlichen Anzahl CA-Repeats in Intron 1 hat Einfluss auf die Transkriptionsaktivität des Gens, wobei längere Allele mit einer niedrigeren Transkriptionsrate assoziiert sind (Araújo et al. 2007).

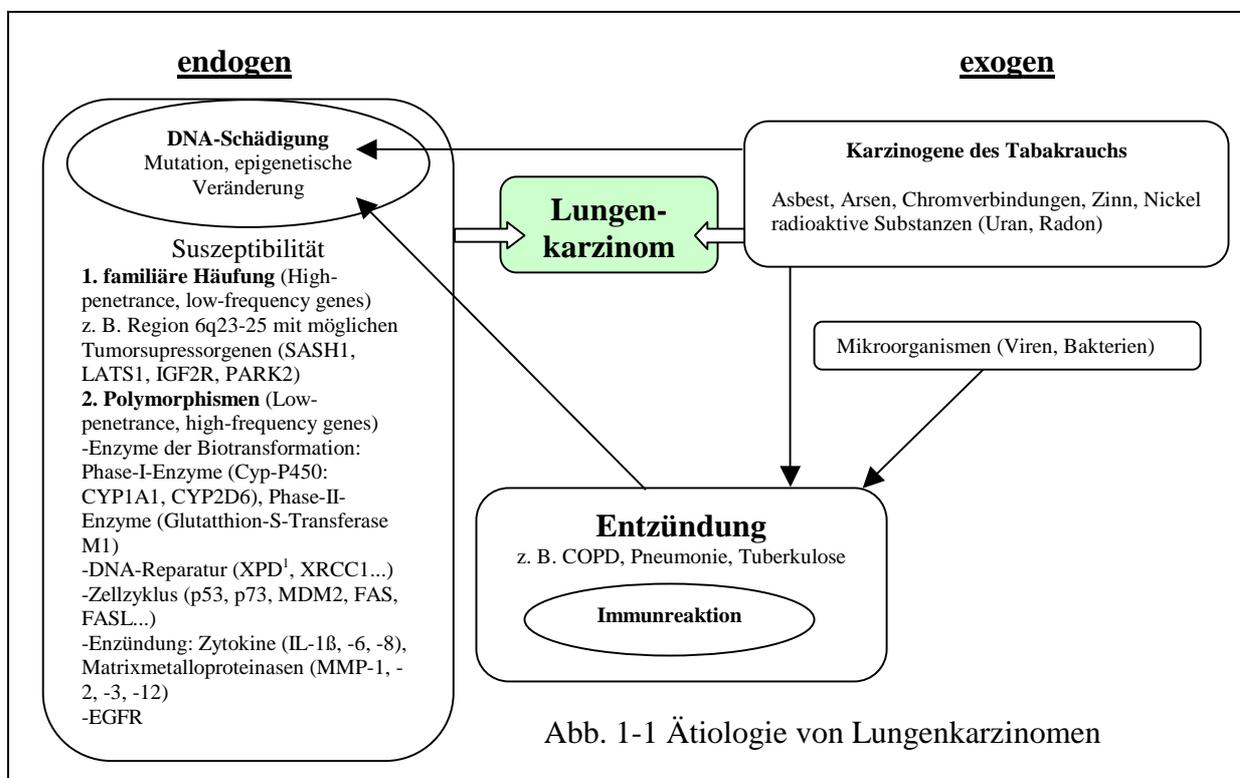


Abb. 1-1 Ätiologie von Lungenkarzinomen

Die sehr seltene familiäre Häufung von Lungenkarzinomen betrifft ca. 1 % der Patienten. Unter Annahme autosomal-dominanter Erbgänge mit Genen hoher Penetranz (10 % bei Allelträgern, 1% bei negativen) wurden parametrische Kopplungsanalysen durchgeführt. Eine Studie identifizierte die Region 6q23-25 als einen wahrscheinlichen Genombereich. Bei rauchenden Allelträgern war hier das Lungenkarzinomrisiko dreifach erhöht (Bailey-Wilson et al. 2004, ↗ Abbildung 1-1).

1.1.3 Metastasierung

Die Metastasierung von Karzinomen erfolgt durch die Dissemination von Tumorzellen des Primärtumors über Lymph- und Blutgefäße. Die Detektion dieser Zellen oder deren tumorassoziierter mRNA ist Gegenstand molekularbiologischer Untersuchungen, um Aussagen über Prognose und Therapieerfolg von Karzinomen treffen zu können. Disseminierte zirkulierende Tumorzellen in peripherem Blut wurden über die Expression von Cytokeratin-19-mRNA bei 12/15 (80%) NSCLC-Patienten vor und 8/15 (53%) NSCLC-Patienten nach Radiotherapie nachgewiesen (Ge et al. 2005). Bei 5/17 (29%) Patienten, welchen zuvor TNM-Stadium I bzw. II zugeordnet wurde, und 12/26 (46%) Patienten (zuvor Stadium III) detektierten Cote et al. NSCLC-Knochenmarkmikrometastasen. Der Nachweis von Mikrometastasen war signifikant assoziiert mit einem schnelleren Wiederauftreten von Karzinomen (Cote et al. 1995). Eine weitere Arbeit detektierte MAGE-A2 in 8/50 (16%) Knochenmarkaspiraten von NSCLC-Patienten, wobei eine mRNA-Expression verschiedener MAGE-A-Subtypen signifikant mit guter Differenzierung assoziiert war (Sienel et al. 2007).

1.2 Extrazelluläre Nukleinsäuren

1.2.1 Herkunft extrazellulärer Nukleinsäuren und Quantifizierung extrazellulärer RNA

Nukleinsäuren werden intrazellulär synthetisiert, sind aber auch extrazellulär in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Sekreten nachweisbar. Nukleinsäuren können durch Zellnekrose, Apoptose und aktive Freisetzung aus den Zellen in den extrazellulären Raum gelangen (Rainer et al. 2004, Wieczorek et al. 1987, Stroun et al. 1978, Jahr et al. 2001, ↗ Abb 1-2).

Mandel und Metais beschrieben bereits 1948 das Vorkommen extrazellulärer Nukleinsäuren in menschlichem Blutplasma und quantifizierten diese, wobei der Anteil der RNA am gesamten extrazellulären Nukleinsäuregehalt mit 90 % bestimmt wurde (Mandel & Metais 1948). Tabelle 1-3 gibt einen Überblick über bisherige Arbeiten zur Quantifizierung extrazellulärer Gesamt-RNA. Es fällt auf, dass die ermittelten RNA-Konzentrationen in Serum und Plasma in den frühen Studien bis 1975 signifikant höher sind als in späteren Arbeiten. Dies lässt sich durch die

Anwendung unterschiedlicher Quantifizierungsmethoden erklären. Die beiden Arbeitsgruppen um Laktionov und Sueoka zeigten im Plasma von Patienten mit Lungenkarzinom eine im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Gesamt-RNA-Konzentration (Laktionov et al. 2004, Sueoka et al. 2005).

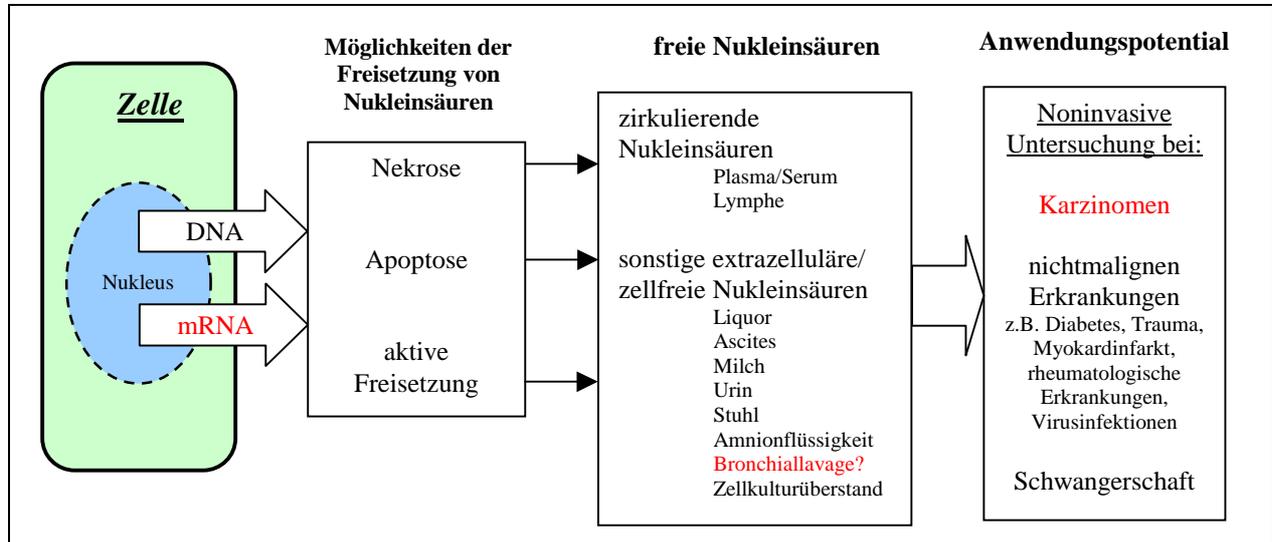


Abb. 1-2 Vorkommen und Mechanismen der Freisetzung extrazellulärer Nucleinsäuren (Abb. modifiziert nach Fleischhacker & Schmidt 2007)

Population	RNA-Konzentration	Material	Methode	Referenz
gesunde Probanden (n=10)	31500 - 46800 ng/ml (entspricht Anteil von 90 % am gesamten Nucleinsäuregehalt)	Plasma	Schmidt-Thannhauser-Verfahren	Mandel & Metais 1948
gesunde Probanden (n=30)	59700 ± 15000 ng/ml	Serum	Spektrofotometrie	Shutack et al. 1968
gesunde Probanden (n=186)	142000 ± 22000 ng/ml	Plasma	Fluorometrie	Kamm & Smith 1972
gesunde Probanden (n=51)	144000 ng/ml	Plasma	Fluorometrie	Guin et al. 1975
gesunde Probanden (n=9)	250 ng/ml (6x nicht detektierbar)	Plasma	2-Schritt-Fluoreszenzassay	Laktionov et al. 2004
benigne Lungenerkrankungen (n=16)	694 ng/ml (1x nicht detektierbar)			
Lungenkarzinom (n=10)	1197 ng/ml			
Mammakarzinom (n=11)	keine RNA detektierbar			
Trauma				
	multiple Frakturen (n=4)	988 ng/ml		
	Einzelfraktur (n=4)	136 ng/ml		
	Weichgewebstrauma (n=6)	43,5 ng/ml		
n=4	20000 - 70000 ng/ml (RNA überwiegend ≤100 bp)	Milch	Spektrofotometrie, PAGE	Semenov et al. 2004
primäre Lungenkarzinome (n=44)	860 ng/ml	Plasma	Spektrofotometrie	Sueoka et al. 2005
solide Tumoren (n=7)	660 ng/ml			
benigne Lungenerkrankungen(n=24)	780 ng/ml			
gesunde Probanden (n=25)	710 ng/ml			

Tabelle 1-3 Arbeiten zur Quantifizierung zellfreier Gesamt-RNA

1.2.2 Schutz der extrazellulären Nucleinsäuren

Die Existenz extrazellulärer RNA in einer RNase-haltigen Umgebung wie Serum und Plasma wirft die Frage nach dem Schutz der RNA vor Hydrolyse durch Ribonukleasen auf (Reddi & Holland 1976). Untersuchungen zeigten, dass bei Raumtemperatur nach Zugabe aufgereinigter, d. h. nackter RNA in Plasma bereits nach 15 Sekunden nur noch 1% der anfänglichen GAPDH-mRNA-Konzentration detektierbar ist (Tsui et al. 2002). In verschiedenen Untersuchungen wurden extrazelluläre Komplexe aus RNA und Lipoproteinen, Nucleoproteinen oder

Apoptosekörperchen beschrieben (Wieczorek et al. 1985, Wieczorek et al. 1987, Stroun et al. 1978, Hasselmann et al. 2001). Halicka et al. wiesen RNA und DNA jeweils in separaten Apoptosekörperchen nach und schlossen daraus auf eine Spezialisierung der Phagosomen für die Degradierung entweder von RNA oder DNA (Halicka et al. 2000). Ng et al. detektierten nach Filtration und Ultrazentrifugation signifikant geringere GAPDH-mRNA-Konzentrationen als in unbehandeltem Plasma und bewiesen auf diese Weise die Partikelassoziation eines großen Anteils der RNA in Plasma (Ng et al. 2002). Larrabee et al. zeigten mittels Filtration die RNA-Partikelassoziation in Amnionflüssigkeit (Larrabee et al. 2005).

1.2.3 Haben extrazelluläre Nukleinsäuren eine biologische Bedeutung?

Der Nachweis intakter extrazellulärer RNA und DNA führte zur Überlegung, ob diese Moleküle im extrazellulären Raum Funktionen haben. Die Arbeitsgruppe um García-Olmo entwickelte nach eigenen Experimenten und den Ergebnissen anderer Gruppen die Hypothese der Genometastasen. Diese besagt, dass hämatogene (Fern-)Metastasen durch die Transfektion von gesunden Zellen mit im Plasma zirkulierender Tumor-DNA entstehen können. Diese dominanten Onkogene stammen aus Zellen des Primärtumors (García-Olmo & García-Olmo 2001). In Säugetierzellen wurde *in vitro* die Phagozytose von Apoptosekörperchen mit tumorspezifischer DNA beobachtet. Die DNA der Apoptosekörperchen stammte aus Tumorzelllinien bzw. aus mit Tumor-DNA transfektionierten Zellen. Eine Replikation dieser phagozytierten DNA war jedoch nur in p53- oder p21-negativen Zellen feststellbar. Dies führte zu der Annahme, dass p53 über die Aktivierung durch p21 in normalen Zellen die Replikation phagozytierter, tumorassoziierter DNA inhibiert (Bergsmedh et al. 2001, Bergsmedh et al. 2002). Guadalajara et al. quantifizierten extrazelluläre DNA aus dem Plasma von Patienten mit primärem kolorektalem Karzinom und fanden eine signifikante Korrelation zwischen der DNA-Konzentration und dem Vorkommen von Metastasen (Guadalajara et al. 2008).

Benner stellte die Hypothese der extrazellulären „communicator RNA“ auf. Die Ergebnisse einiger Arbeiten deuten darauf hin, dass die Kombination von RNasen, RNaseinhibitoren und extrazellulärer RNA als Substrat der RNasen die Entwicklung von Geweben höherer Organismen beeinflusst und auch Anteil an der für die Tumorigenese wichtige Angiogenese hat (Benner 1988). In Exosomen verschiedener Zelllinien wurden *in vitro* mRNAs von nahezu 1300 Genen und microRNAs nachgewiesen, von denen viele im Zytoplasma der Donorzelle nicht detektierbar waren. Diese RNA wurde nach Aufnahme in andere Zellen *in vitro* translatiert. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Exosomen-RNA zur Zellkommunikation beiträgt und die Proteinexpression von Zielzellen modulieren kann (Valadi et al. 2007).

1.2.4 Detektion tumorassoziierter extrazellulärer mRNA

Seitdem tumorassoziierte mRNA in Serum und Plasma bei verschiedenen malignen Tumoren nachgewiesen wurde, existiert die Idee, diese Untersuchungsmethode zur Diagnose, Prognose und Therapieverlaufskontrolle bei Tumoren zu nutzen. Die bisherigen Untersuchungen extrazellulärer mRNA aus Serum oder Plasma von Patienten mit Lungenkarzinom sind in Tabelle 1-4 aufgeführt. Bisher existieren keine Arbeiten zum Nachweis von extrazellulärer mRNA in zellfreier Bronchiallavage. Tabelle 1-5 gibt einen Überblick über Arbeiten zu extrazellulärer mRNA bei verschiedenen Karzinomen, welche die Expression der in der vorliegenden Dissertation verwendeten Gene untersuchen.

Gen	Material	Referenz
HER2/neu	Serum	Fleischhacker et al. 2001
hnRNP-B1	Serum Plasma	Fleischhacker et al. 2001 Sueoka et al. 2005
MAGE-2	Serum	Fleischhacker et al. 2001
PGP 9.5	Serum	Fleischhacker et al. 2001
TTF-1	Serum	Fleischhacker et al. 2001
hTERT	Serum Plasma	Miura et al. 2006 Pelosi et al. 2006

Tabelle 1-4 Bisherige Untersuchungen zellfreier Materialien der in dieser Arbeit untersuchten Gene bei Patienten mit Lungenkarzinomen (bisher nicht untersucht: hTR, Pericentrin, Aurora)

Karzinom	mRNA-Expression	Material	Methode	Referenz	
Mammakarzinom (n=18) benigne Mammaerkrankungen (n=2) gesunde Probanden (n=21)	-Tumorpatienten: hTR 5/18 (28%), hTERT 4/16 (25%), Serum von Patienten mit benignen Mammaerkrankungen & gesunden Probanden negativ für beide Gene	Serum	qualitative RT-PCR	Chen et al. 2000	
follikuläres Lymphom (n=9) kolorektales Karzinom (n=9) gesunde Probanden (n=10)	hTERT detektierbar in allen Gruppen, höhere Expression in Tumorproben als bei gesunden Probanden, aber keine signifikanten Unterschiede	Plasma	quantitative Real-Time RT-PCR	Dasi et al. 2001	
Mammakarzinom (n=5)	5T4	Serum	seminested qualitative RT-PCR	Kopreski et al. 2001*	
Lungenkarzinom (n=14)					2/5 (40%)
gesunde Probanden (n=46)					6/14 (43%) 3/25 (12%)
Lungenkarzinom (n=18) gesunde Probanden (n=12)	HER2/neu 8/18 (44%), hnRNP-B1 14/18 (78%), PGP 9.5 1/18 (6%), TTF-1 & MAGE-2 negativ 1 Patient mit Pneumonie leicht positiv für hnRNP-B1	Serum	qualitative RT-PCR	Fleischhacker et al. 2001	
hepatozelluläres Karzinom (n=78) Leberzirrhose (n=10) chronische Hepatitis (n=12)	hTERT	Serum	qualitative RT-PCR	Miura et al. 2003	
Mammakarzinom (n=25)	70/78 (90%)				
malignes Melanom (n=29) Schilddrüsenkarzinom (n=4) gesunde Probanden (n=7)	7/10 (70%) 5/12 (42%)				
hepatozelluläres Karzinom (n=64) Leberzirrhose (n=20) chronische Hepatitis (n=20) gesunde Probanden (n=50)	hTR 23/25 (92%), hTERT 12/25 (48%) hTR 24/29 (83%), hTERT 17/29 (59%) hTR 4/4 (100%), hTERT 4/4 (100%) hTR 3/7 (43%), hTERT 0/7 (0%)	Plasma	seminested qualitative RT-PCR	Novakovic et al. 2004	
kolorektales Karzinom (n=50) gesunde Probanden (n=50)	hTERT: Genexpression signifikant ($p < 0,001$) höher bei kolrektalem Karzinom (Median 11,62 ng) als bei gesunden Probanden (0,29 ng)	Plasma	quantitative Real-Time RT-PCR	Lledó et al. 2004	
hepatozelluläres Karzinom (n=64) Leberzirrhose (n=20) chronische Hepatitis (n=20) gesunde Probanden (n=50)	hTERT bei HCC mRNA-Expression signifikant höher als bei Leberzirrhose & chronischer Hepatitis, Korrelation mit Differenzierungsgrad der Karzinome ($p < 0,001$)	Serum	quantitative Real-Time RT-PCR	Miura et al. 2005, Miura et al. 2007b	
Lungenkarzinom (n=44) Plattenepithelkarzinom (n=14) Adenokarzinom (n=19) großzelliges Karzinom (n=4) kleinzelliges Karzinom (n=7) andere Karzinome (Lymphome, metastatische Lungenkarzinome u.a. [n=7]) benigne Lungenerkrankungen (n=24) gesunde Probanden (n=25)	hnRNP-B1	Plasma	quantitative Real-Time RT-PCR	Sueoka et al. 2005	
	0,99 ± 0,26 pg/µg RNA				
	0,99 ± 0,33 pg/µg RNA				
	0,85 ± 0,42 pg/µg RNA				
	0,67 ± 0,07 pg/µg RNA				
	1,51 ± 1,04 pg/µg RNA				
	1,09 ± 0,43 pg/µg RNA				
	0,30 ± 0,11 pg/µg RNA 0,23 ± 0,07 pg/µg RNA				
Lungentumor (n=112, NSCLC: 98, SCLC: 5, LCLC: 1, benigne Tumoren:8) gesunde Probanden (n=80)	unabhängige Korrelation der hTERT-mRNA-Kopien mit Tumorgröße und -anzahl, Metastasen und Raucherstatus (alle $p < 0,05$); signifikante Abnahme der hTERT-mRNA-Kopienanzahl nach chirurgischer Behandlung	Serum	quantitative Real-Time RT-PCR	Miura et al. 2006	
Lungenkarzinom NSCLC Stadium I-IIIb (n=34: 21 AdenoCa, 13 PE-Ca) gesunde Probanden (n=10)	hTERT-mRNA-Expression im Plasma 4/34 (12%) Tumorpatienten, kein Nachweis bei gesunden Kontrollen	Plasma	quantitative Real-Time RT-PCR	Pelosi et al. 2006	
Patienten mit erhöhten Werten für PSA (prostataspezifisches Antigen) (n=68: Prostatakarzinom PCa [n=26], Prostatitis [n=35], andere nichtmaligne Prostataerkrankungen [n=7]) gesunde Probanden (n=44)	Medianwerte für hTERT-Genexpression bei PCa-Patienten (0,72 ng [range 0,01-12,86]) signifikant höher ($p < 0,001$) als bei Kontrollgruppe (0,13 ng [0,02-0,35]) und Patienten mit Prostatitis (0,29 ng [0,01-66,07])	Plasma	quantitative Real-Time RT-PCR	Dasi et al. 2006	
Cholangiokarzinom (n=33) benigne Erkrankungen der Gallenwege (n=41) gesunde Probanden (n=10)	hTERT-mRNA detektierbar bei 28/33 (85%) der Cholangiokarzinompatienten & 9/41 (22%) der Patienten mit benignen Erkrankungen, keine Korrelation hTERT-mRNA-Werten & pathologischem Staging der Karzinome.	Serum	quantitative Real-Time RT-PCR	Leelawat et al. 2006	
maligne, gynäkologische Tumoren (n=112: 47 Ovar, 63 Uterus, 2 mit anderen malignen gynäkologischen Läsionen) benigne Läsionen (n=62) gesunde Probanden (n=20)	hTERT mRNA höhere Werte bei Patienten mit Tumoren als bei benignen Erkrankungen und gesunden Probanden	Serum	quantitative Real-Time RT-PCR	Miura et al. 2007a	
Magenkarzinom (n=52; 40 präoperativ/12 postoperativ) gesunde Probanden (n=20)	hTERT 3/40 präoperativ, 2/12 postoperativ, kein Nachweis bei gesunden Probanden	Plasma	quantitative Real-Time RT-PCR	Tani et al. 2007	

Tabelle 1-5 Auswahl von Arbeiten zu tumorassoziierter, zellfreier mRNA bei verschiedenen Karzinomen (*erste Untersuchung zellfreier mRNA bei Patienten mit Lungenkarzinom, RT = reverse Transkriptase)

1.2.5 Methodische Voraussetzungen für die Untersuchung extrazellulärer mRNA

RNA ist aufgrund einer Hydroxylgruppe an C₂ des Ribosemoleküls und ihres einzelsträngigen Vorkommens instabiler und hydrolysegefährdeter als DNA. Die enzymatisch katalysierte Hydrolyse erfolgt durch die extrem stabilen, ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen (RNasen), die selbst nach dem Autoklavieren wieder renaturieren können. Es gibt verschiedene Methoden, RNasen zu hemmen und die RNA zu schützen. Beispielsweise werden die RNasen A, B und C durch RNasin (Promega[®]) nicht-kompetitiv gehemmt (Blackburn et al. 1977, Shapiro & Vallee 1987, Shultz et al. 2001). Diethylpyrocarbonat inaktiviert RNasen über die Carboxymethylierung von Adenylresten (Sambrook & Russell 2001).

Die Entwicklung der PCR als Methode zur *In-vitro*-Amplifizierung von DNA und cDNA mit der hitzestabilen DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* war eine wesentliche Voraussetzung für den Nachweis geringster Nukleinsäuremengen, wie es u. a. bei der Untersuchung extrazellulärer Nukleinsäuren der Fall ist (Mullis et al. 1986, Saiki et al. 1988). Die Real-Time PCR mit dem Prinzip des in der vorliegenden Arbeit angewandten TaqMan-Assays nutzt die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase (Holland et al. 1991).

1.3 Referenzgene

In der Molekularbiologie werden β -Aktin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) häufig als Amplifikationskontrolle nach der RNA-Isolation und cDNA-Synthese sowie als Referenzgene für die Real-Time PCR verwendet. Suzuki et al. analysierten 452 Studien bezüglich der gewählten Referenzgene. GAPDH wurde in 33 % der Studien verwendet, β -Aktin in 32 % (Suzuki et al. 2000).

β -Aktin

Aktine sind Zytoskelettproteine, die für Motilität, Kontraktion, Adhäsion und Form von Zellen Bedeutung haben. Bei Vertebraten unterscheidet man α -Aktine (drei Isoformen), β -Aktin (eine Isoform) und γ -Aktine (zwei Isoformen). β -Aktin kommt im Zytoplasma von Nichtmuskelzellen vor (Garrels & Gibson 1976, Vandekerckhove & Weber 1978).

GAPDH

GAPDH wurde in den letzten Jahren als multifunktionales Protein mit sehr unterschiedlichen Wirkungsbereichen identifiziert. Das Enzym ist neben seiner Funktion als Glykolyseenzym an zahlreichen nichtglykolytischen Prozessen in der Zelle beteiligt: bei der Endozytose, der DNA-

Replikation, dem nukleären tRNA-Export, der DNA-Reparation, der Mikrotubuliaggregation, der Histongenexpression, der nukleären Membranfunktion, der Telomerenstruktur und als Phosphotransferase. Eine GAPDH-Überexpression verhindert u. a. die Telomerenverkürzung und induziert die Apoptose. *In vitro* wurde eine Hemmung des DNA-Reparaturenzyms Uracil-DNA-Glykosylase gezeigt. Entsprechend der jeweiligen Funktion bildet GAPDH mit verschiedenen Proteinen Komplexe und hat unterschiedliche Lokalisationen: im Nukleus, im Zytosol oder membranassoziiert (Sirover 1999, Sirover 2005).

Tabelle 1-6 gibt einen Überblick über Arbeiten, welche die mRNA-Expression von β -Aktin und GAPDH in normalem Lungengewebe und im Gewebe verschiedener Karzinome untersuchten.

Material	Ergebnisse	Methode	Referenz
<i>GAPDH</i>			
normales Lungengewebe, Gewebe von NSCLC- (n=6) & SCLC-Zelllinien (n=2)	GAPDH-mRNA-Expression in Zelllinien signifikant höher als in normalem Lungengewebe	Northern Blot	Tokunaga et al. 1987
Rattenprostatakarzinomzelllinien (hohes [n=3], niedriges metastatisches Potential [n=7])	signifikant höhere GAPDH-Expression in Zelllinien mit hohem als Zelllinien mit niedrigem metastatischem Potential	Northern Blot	Epner et al. 1993
normales & zirrhotisches Lebergewebe hepatozelluläres Karzinom (HCC)	GAPDH-mRNA in Karzinomgewebe 14-16x höher als in zirrhotischem & normalem Lebergewebe exprimiert	Northern Blot	Gong et al. 1996
verschiedene adulte & fetale Gewebe, u.a. Lungengewebe	fetale Gewebe relativ höhere GAPDH-mRNA-Expression als adulte Gewebe	Northern Blot	Rondinelli et al. 1997
Prostatakarzinom (n=24)	Gewebe aus Stadium B niedrigere GAPDH-mRNA-Expression als fortgeschrittene Stadien C & D		
zellfreies Plasma: HCC (n=16), gesunde Probanden (n=27)	Plasma-GAPDH-Konzentration in HCC-Patienten signifikant höher als in gesunden Probanden, unabhängig von Filtration des Plasmas	quantitative Real-Time RT-PCR	Ng et al. 2002
normales Lungengewebe (n=10)	-GAPDH in Zelllinien signifikant höher exprimiert -von 7 Referenzgenen GAPDH geringste Varianz der mRNA-Expression zwischen normalem & Tumorgewebe → GAPDH besonders geeignet als interne qualitative & quantitative Kontrolle für Untersuchung von NSCLC-Proben	quantitative Real-Time RT-PCR	Liu et al. 2005
NSCLC-Gewebe (n=18)			
NSCLC-Zelllinien (n=6)			
Pool aus Lungentumor- und normalem Gewebe (n=28)			
<i>β-Aktin & GAPDH</i>			
Prostatakarzinom (n=2)	β -Aktin-mRNA in neoplastischem & benignen Geweben nahezu gleich hoch exprimiert, Expression von GAPDH-mRNA in Karzinomgewebe höher als in normalem Prostatagewebe	Northern Blot	Sharief et al. 1994
N1S1-Rattenhepatom-Modell	signifikant höhere Expression von GAPDH- & β -Aktin-mRNA in Karzinomgewebe als in angrenzendem Lebergewebe	Northern Blot	Chang et al. 1998
Neuroblastom-Zelllinien (n=43), RNA aus gepoolten normalen humanen Geweben, u.a. Lunge, Leukozyten (n=13), Knochenmark (n=9)	-Untersuchung 10 verschiedener Referenzgene, u. a. β -Aktin & GAPDH →Referenzgene nicht konstant exprimiert	quantitative Real-Time RT-PCR	Vandescompele et al. 2002
Expression von 13 Referenzgenen & IL-2 16 verschiedene Gewebe, u.a. Lunge	-GAPDH in Lungengewebe nach L13 höchste Expression aller Referenzgene, Expression von β -Aktin & GAPDH durch mitogene Stimulation beeinflusst	quantitative Real-Time RT-PCR	Radonić et al. 2004
normales Lebergewebe, präneoplastische Stadien (Zirrhose, Dysplasie), HCV-induziertes HCC	keine konstante RNA-Expression in präneoplastischem & Karzinomgewebe, β -Aktin & GAPDH ungeeignet als Referenz bei Expressionsuntersuchungen an HCC-Gewebe	Microarray, quantitative Real-Time RT-PCR	Waxman & Wurmbach 2007

Tabelle 1-6 Ausgewählte Untersuchungen zur mRNA-Expression von GAPDH und β -Aktin im Gewebe verschiedener Karzinome und der Lunge

1.4 Tumorassoziierte Gene

Die in dieser Arbeit untersuchten tumorassoziierten Gene, die Funktion der entsprechenden Genprodukte und bisherige Untersuchungen von Lungenkarzinomen werden in diesem Abschnitt vorgestellt.

1.4.1 HER2/neu (c-erbB-2)

Das Onkogen HER2/neu liegt auf Chromosom 17q21 und codiert für den Tyrosinkinase-Rezeptor p185^{neu}, ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 185000 (Schechter et al. 1984, Coussens et al. 1985). Neben HER2 gehören EGFR (HER1, erbB-1), HER3 (erbB-3) und HER4 (erbB-4) zur Familie der EGFR-Rezeptor-Tyrosinkinasen. HER2 bildet mit den anderen Mitgliedern der ErbB-Familie Heterodimere. Die Liganden binden extrazellulär an den Partnerrezeptor und aktivieren dadurch die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne von HER2. Bisher wurden keine direkten Liganden für den HER2-Rezeptor gefunden, so dass HER2 die Rolle eines Co-Rezeptors zugeschrieben wird (Araújo et al. 2007). Über die Heterodimerisierung werden intrazelluläre Signalwege amplifiziert und diversifiziert. Die Überexpression des HER2-Rezeptors führt zur Transformation von Zellen (Di Fiore et al. 1987).

In Tabelle 1-7 sind bisherige Arbeiten zur HER2/neu-mRNA-Expression in Tumorzelllinien, normalem Lungengewebe und Tumorgewebe von Patienten mit Lungenkarzinom aufgeführt. Die Untersuchungen extrazellulärer Materialien finden sich in den Tabellen 1-4 und 1-5.

Material	Ergebnisse	Methode	Referenz
SCLC-Zelllinien (n=4) NSCLC-Zelllinien (n=7, 1 LCC, 2 PeCa, 4 AdenoCa)	HER2-mRNA-Expression in NSCLC-Zelllinien 4 - 32fach höher als in SCLC-Zelllinien, höchste Expressionslevel in Adenokarzinom-Zelllinien	RNA Dot-Blot-Analyse	Schneider et al. 1989
normale fetale & adulte Gewebe (u.a. Respirationstrakt)	-niedrige HER2/neu-mRNA-Expression in normalen epithelialen adulten und fetalen Geweben (u.a. Respirationstrakt) detektierbar -Expressionslevel vergleichbar mit niedrig exprimierenden Mammakarzinomzelllinien ohne Genamplifikation	Northern Blot	Press et al. 1990
NSCLC-Zelllinien (n=14)	Überexpression von HER2-mRNA in 7/14 NSCLC-Zelllinien	Northern Blot	Kern et al. 1992
NSCLC-Zelllinien (n=20) von unbehandelten Patienten	-in allen Zelllinien signifikante Korrelation zwischen IC50-Werten von allen 6 angewendeten Medikamenten (u. a. Cisplatin) & Höhe der HER2/neu-mRNA-Expression (alle p<0,005) → Eignung der HER2/neu-Überexpression als Marker für intrinsische Multiple Drug Resistance von NSCLC-Zelllinien	Northern Blot	Tsai et al. 1993
NSCLC-Patienten (n=83): normales Lungengewebe & Tumorgewebe	-HER2/neu- & EGFR-mRNA-Expression in allen Proben detektierbar -29/83 (34,9%) erhöhte HER2-mRNA-Expression, signifikante Korrelation mit niedrigerer Überlebensrate, Verschlechterung der Prognose bei gleichzeitiger EGFR-Überexpression	quantitative Real-Time RT-PCR, interne Referenz β-Aktin	Brabender et al. 2001
NSCLC-Gewebe (n=115) normales Lungengewebe (n=22)	-HER2/neu-mRNA-Expression in 100% der NSCLC- & Lungengewebe -54/115 (47%) NSCLC-Patienten höhere HER2/neu-mRNA-Expression als normales Lungengewebe	quantitative Real-Time RT-PCR	Pellegrini et al. 2003
NSCLC-Gewebe (n=90)	-hohe HER2/neu Expression in 62/90 (68,9%) Patienten, niedrige HER2/neu Genexpression bei 28/90 (31,1%) Patienten -bei Frauen signifikante Assoziation zwischen hoher HER2/neu-mRNA-Expression & niedrigerer Überlebensrate	quantitative Real-Time RT-PCR, interne Referenz β-Aktin	Vallböhmer et al. 2006

Tabelle 1-7 Arbeiten zur HER2/neu-mRNA-Expression in Zelllinien, normalem Lungengewebe und Tumorgewebe von Patienten mit Lungenkarzinom

1.4.2 hnRNP-B1 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein B1)

Tockman et al. beschrieben 1988 den Nachweis von Tumorzellen im Sputum von Patienten früher klinischer NSCLC-Stadien mit dem monoklonalen Antikörper 703D4 (Tockman et al. 1988). Das Antigen wurde später als das RNA-bindende heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A2/B1 identifiziert, welches im Nukleus von Säugetierzellen eine Hauptkomponente des hnRNP-Komplexes darstellt (Zhou et al. 1996). hnRNP A2/B1 ist am mRNA-Splicing und am mRNA-Transport vom Nukleus ins Cytoplasma beteiligt. Weiterhin ist eine Bindung von hnRNP A2/B1 an humane Telomeren-DNA nachgewiesen, so dass hier weitere Funktionen vermutet werden (Ishikawa et al. 1993, Ford et al 2002). hnRNP-B1 bindet u. a. an die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), die DNA-Doppelstrangbrüche repariert und hnRNP-Proteine phosphoryliert. Iwanaga et al. untersuchten die Funktion von hnRNP-B1 in der Lungenkarzinomzelllinie A549: Nach Bindung von hnRNP-B1 an die DNA-PK war die Funktion des Enzyms gehemmt. Eine Hemmung der hnRNP-B1-Überexpression durch siRNA führte bei normalen Bronchialepithelzellen zu einer schnelleren Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach radioaktiver Bestrahlung (Iwanaga et al. 2005).

hnRNP-B1 wurde als Tumormarker zur frühen Detektion von Lungenkarzinomen beschrieben, nachdem eine Überexpression von hnRNP-B1-spezifischer mRNA in Lungenkarzinomgewebe im Vergleich zu normalen Lungengewebe festgestellt wurde (Sueoka et al. 1999). In Tabelle 1-8 sind bisherige Arbeiten zur mRNA-Expression von hnRNP-B1 in Zelllinien, Tumorgewebe von NSCLC-Patienten und normalem Lungengewebe aufgeführt. Die Untersuchungen extrazellulärer Materialien finden sich in den Tabellen 1-4 und 1-5.

Material	Ergebnisse	Methode	Referenz
NSCLC-Patienten (n=6): normales Gewebe & Tumorgewebe	hnRNP-B1-mRNA in Tumor- & Nichttumorgewebe exprimiert, höhere Expression in Tumorgewebe	qualitative RT-PCR	Sueoka et al. 1999
NSCLC-Zelllinien (n=8) SCLC-Zelllinien (n=8) NSCLC-Gewebe (n=30)	mRNA-Expression diverser hnRNP-Gene → hnRNP-B1 in allen Zelllinien exprimiert, Expression in SCLC-Zellen überwiegend höher als in NSCLC-Zellen	quantitative Real-Time RT-PCR	Pino et al. 2003
humane Alveolarzellen (HSAE) Zervixkarzinomzelllinie (HeLa) Lungenkarzinomzelllinie (TKB-13)	hnRNP-B1-mRNA in HSAE 87 % Expression im Vergleich zu HeLa (100 % Expression) & TKB-13 (239 % Expression)	Northern Blot, quantitative Real-Time RT-PCR	Satoh et al. 2004
NSCLC (n=69): Vollblut & Gewebe gesunde Probanden (n=100): Vollblut	hnRNP-B1-mRNA 17,4% Sensitivität & 93 % Spezifität → ungeeignet als diagnostischer Marker	semiquantitative RT-PCR	Sheu et al. 2006

Tabelle 1-8 Untersuchung der Expression von hnRNP-B1-spezifischer mRNA in verschiedenen Geweben

1.4.3 Melanomantigen 2 (MAGE-2, MAGE-A2)

Die mRNA-Expression der Melanomantigene wurde zuerst in Melanomzelllinien untersucht (MAGE-1, van der Bruggen et al. 1991). MAGE-2 zählt zur Subfamilie A der MAGE-Gene, die in Region q28 auf Chromosom X lokalisiert wurde (De Plaen et al. 1994, De Smet et al. 1994). Die Genprodukte der MAGE-A-Familie sind Antigene. Peptide des MAGE-2-Genprodukts

werden von verschiedenen HLA-Klasse-I-Molekülen, darunter das sehr verbreitete HLA-A24, auf Tumorzellen präsentiert und von zytotoxischen T-Zellen erkannt (Tahara et al. 1999). Diese Erkenntnisse werden für die Entwicklung von Immuntherapien für Karzinome genutzt (Groeper et al. 2008). De Smet et al. detektierten MAGE-2-spezifische mRNA im Gewebe verschiedener Tumoren, z. B. Mamma-, Kolon- und Lungenkarzinomen, in normalem adultem Gewebe allerdings lediglich in Testisgewebe (De Smet et al. 1994). Für einige MAGE-Angehörige, darunter die Subfamilie D, wurde eine ubiquitäre RNA-Expression auch in normalen Zellen nachgewiesen (Chomez et al. 2001).

Tabelle 1-9 gibt einen Überblick über Studien zur MAGE-2-Expression in Lungenkarzinomen. Die Untersuchungen extrazellulärer Materialien finden sich in den Tabellen 1-4 und 1-5.

untersuchte MAGE-Gene	Material	MAGE-2-mRNA-Expression		Methode	Referenz
		Tumorpatienten	Kontrollen		
MAGE-1, -2	fetales & adultes Lungengewebe, Lungentumorgewebe	9/19 (47,4%)	fetales & normales adultes Lungengewebe negativ	qualitative RT-PCR	De Smet et al. 1994
MAGE-1, -2, -3	NSCLC-Patienten: normales & Tumorgewebe	Tumorgewebe: 16/46 (35%) Lungengewebe: 0/8	nicht untersucht	qualitative RT-PCR	Weynants et al. 1994
MAGE-1, -2, -3	NSCLC-Gewebe	2/5 (40%)	nicht untersucht	qualitative RT-PCR	Ferlazzo et al. 1996
MAGE-1, -2, -3	Lungentumorgewebe	13/43 (30,2%)	nicht untersucht	qualitative RT-PCR	Yoshimatsu et al. 1998
MAGE-A1, -A2, -A3/6, -A4, -A12	Knochenmark	4/33 (12%)	0/30	nested-Multimarker-RT-PCR	Kufer et al. 2002
MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A12	mRNA aus Sputum & BAL, nicht zellfrei	Sputum: 1/15 (6,7%) BAL: 11/23 (47,8%)	BAL: 2x positiv bei Aktinomykose (MAGE-2) & Bronchitis (MAGE-1)	nested-Multimarker-RT-PCR	Mecklenburg et al. 2004
32 MAGE-Gene, u. a. MAGE-2	NSCLC-Gewebe	46/52 (88,5%): AdenoCa 34/38 (89,5%), PE-Ca 12/14 (85,7%)	nicht untersucht	Membranarray	Tsai et al. 2007
MAGE-A1, -A2, MAGE-A3/6, A4, -A12	Knochenmark von NSCLC-Patienten	8/50 (16%)	0/30	nested-Multimarker-RT-PCR	Sienel et al. 2007
MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A10, -A12	Lungentumorgewebe	9/33 (27,3%) (4/17 SCC, 3/12 AC, 2/4 LCC)	nicht untersucht	quantitative nested-Real-Time PCR	Groeper et al. 2007

Tabelle 1-9 Untersuchung der Expression von MAGE-2-spezifischer mRNA in verschiedenen Geweben von Patienten mit Lungenkarzinom

1.4.4 Proteingeprodukt 9.5 (PGP 9.5)

Die Ubiquitin-Carboxyl-terminale Hydrolase PGP 9.5 wurde zunächst als spezifisches Peptid im Zytoplasma von Neuronen und neuroendokrinen Zellen beschrieben (Doran et al. 1983, Day et al. 1987, Thompson et al. 1983). Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen spalten die Peptidbindung am C-terminalen Glycin des Ubiquitins ubiquitiniertes Proteine und verhindern auf diese Weise deren Proteolyse in den Proteasomen (Wilkinson et al. 1989). Der Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg beeinflusst die Regulation von Zellzyklus und Genexpression (Spataro et al. 1998). Die Überexpression von PGP 9.5 auf Proteinebene wurde erst in neuroendokrinen (Rode et al. 1985), später auch in mesenchymalen Tumoren (Campbell et al. 2003) nachgewiesen.

1.4.5 Thyroid transcription factor-1 (TTF-1), Synonyme: NKX2-1, NKX2A

Das Gen für das nukleäre 38-kDa-Protein TTF-1 liegt auf Chromosom 14q13 und wird in der Schilddrüse, im Bronchialepithel und während der Embryogenese im Dienzephalon exprimiert (Berghmans et al. 2006). TTF-1 aktiviert *in vitro* Promotoren von Schilddrüsen- und lungenspezifischen Genen: In Lungenepithelzellen Typ II des Bronchialepithels bindet TTF-1 an Genpromotoren für das lungenepithelzellspezifische Surfactant-Protein B und reguliert so dessen Expression (Bohinski et al. 1994). Minoo et al. zeigten an embryonalen Mäuselungen *in vitro*, dass die Hemmung der TTF-1-mRNA-Transkription mit spezifischer Oligonukleotid-DNA zu einer gestörten Lungenentwicklung führt. Daraus wurde geschlossen, dass TTF-1 weitere Funktionen bei der Morphogenese von Lungenepithel und der Differenzierung spezialisierter Lungenzelltypen hat (Minoo et al. 1995). Es wird angenommen, dass TTF-1 bei der Kanzerogenese durch die Regulation der Aktivität proliferierender Zellen und der Ausbildung neuer Blutgefäße eine Rolle spielt (Berghmans et al. 2006).

1.4.6 Telomerase (Telomer-spezifische Transferase, humane Telomerase Reverse Transkriptase)

Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex, der sich aus zwei Hauptkomponenten zusammensetzt: einer RNA-Untereinheit, der humanen Telomerase RNA (hTR), und einer Proteinkomponente, der humanen Telomerase Reversen Transkriptase (hTERT). 1989 wurde hTERT erstmals in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa beschrieben (Morin 1989). hTR hat eine zur humanen Telomer-DNA komplementäre Basenfolge von elf Nukleotiden (5'-CUAACCCUAAC-3') und dient hTERT als Matrize für die DNA-Synthese an den Telomeren (Shippen-Lentz et al. 1990, Feng et al. 1995). Telomere sind eine sich vielfach wiederholende Nukleotidsequenz an den Enden der Chromosomen mit der Basenfolge 5'-TTAGGG-3'. Durch Telomerase werden die DNA-Verluste kompensiert, welche bei jeder DNA-Replikation auftreten. Somatische Zellen ohne Telomeraseaktivität teilen sich nicht mehr, wenn die Telomere zumindest einiger Chromosomen auf eine kritische Länge gekürzt wurden (Hastie et al. 1990). Neben der Telomerenelongation hat Telomerase weitere Funktionen: Eine hTERT-Überexpression fördert nach neueren Untersuchungen die Mobilisierung epidermaler Stammzellen, das Haarwachstum und die Stammzellproliferation ohne Veränderung der Telomerenlänge. Weitere Funktionen von hTERT wurden bei der Proliferation epidermaler, hämatopoetischer und embryonaler Stammzellen ohne Änderung der Telomerenlänge nachgewiesen, die zudem hTR-unabhängig waren (Calado & Chen 2006). Das Gen für hTERT liegt auf Chromosom 5p15.33. Im Bereich der

Chromosomenregion 5p15 wurden DNA-Amplifikationen für verschiedenste Tumoren nachgewiesen, u. a. NSCLC (Bryce et al. 2000). Das hTR-Gen wurde auf Chromosom 3q26.3 lokalisiert. Auch für diesen DNA-Abschnitt waren Amplifikationen in Zellen eines Lungenkarzinoms detektierbar (Soder et al. 1997). Die Entwicklung des sogenannten TRAP-Assay (TRAP: Telomeric repeat amplification protocol) ermöglichte die Bestimmung der Telomeraseaktivität. Eine Telomeraseaktivität wurde mit dieser Methode in verschiedenen Karzinomen (speziell in Lungenkarzinomen) nachgewiesen, nicht aber in normalen somatischen Zellen und benignen Tumoren (Kim et al. 1994, Hiyama et al. 1995). Telomerase wurde und wird als universeller Marker zur Detektion von Tumoren aufgefasst.

In Tabelle 1-10 sind bisherige Arbeiten zur mRNA-Expression von Telomerase in Zelllinien, Tumorgewebe und normalem Lungengewebe aufgeführt. Die Untersuchungen extrazellulärer Materialien finden sich in den Tabellen 1-4 und 1-5.

Material	Ergebnisse			Methode	Referenz		
<i>hTERT</i>							
normale adulte Gewebe (u.a. Lunge) neoplastisches Mamma- & Kolongewebe	keine hTERT-mRNA-Expression in normalem adultem Lungengewebe			RNA ISH	Kolquist et al. 1998		
Tumorgewebe (u.a. Lungenkarzinom [n=5]) nichtmaligne Gewebe (u.a. Lunge [n=3])	-gesundes Lungengewebe niedrige hTERT-mRNA-Expression -Expression in 4/5 Tumorgeweben 5x höher			quantitative Real-time RT-PCR	de Kok et al. 2000		
normales Bronchialepithel/Bronchitis (n=24)	891 ± 840	hTERT-Kopien/µg Gesamt-RNA		quantitative Real-time RT-PCR	Shibuya et al. 2001		
metaplastisches Gewebe (n=15)	1936 ± 1704						
dysplastisches Gewebe (n=20)	3019 ± 2607						
Plattenepithelkarzinome der Lunge (n=17)	12965 ± 18008						
NSCLC-Gewebe (n=153)	51/153 (33,3 %) hTERT-positiv 5-Jahres-Überlebensrate bei hTERT+ 42,7%, bei hTERT- 62,9%			RNA ISH	Wang et al. 2002		
NSCLC-Gewebe & korrespondierendes normales Lungengewebe (n=146)	-hTERT-Detektion in 146/146 Gewebeproben →statistisch signifikante Unterschiede: 5-Jahresüberlebensrate bei hoher hTERT-Expression 46,9%, bei moderater Expression 77,9%			RNA ISH	Fujita et al. 2003		
Feinnadelaspirate mediastinaler Lymphknoten (LK) von NSCLC-Patienten (n=39) & Kontrollpatienten (n=12)	- hTERT-mRNA nicht in den 14 Lymphknoten von Kontrollpatienten ↔ hTERT in 10/16 (63%) pathologisch positiven & 18/57 (32%) pathologisch negativen (p < 0.05) LK von NSCLC-Patienten			qualitative RT-PCR	Wallace et al. 2003		
normale/hyperplastische Lunge (n=21) preinvasive Läsionen (n=106) invasive Lungenkarzinome (n=27)	signifikanter Anstieg der hTERT-Kopienanzahl von normalem über metaplastisches, dysplastisches Gewebe zu CIS & sinkende Expression bei Karzinomen			RNA ISH	Lantuejoul et al. 2005		
-NSCLC: Gewebeproben von 130 Patienten -nichtneoplastische Lungengewebe (n=30)	Überexpression von hTERT-mRNA in 94/130 (74%) Tumoren; häufiger in PeCa als in Adenokarzinomen (87 vs 68%, p=0.03), Assoziation mit fortgeschrittenem Tumorstadium & hTERT- Genamplifikation			quantitative Real-time RT-PCR	Zhu et al. 2006		
122 Biopsieproben von 81 rauchenden Patienten: normale Mukosa/Bronchitis (n=67), Metaplasie (n=12), Dysplasie (n=28), Lungenkarzinom (n=15)	mediane normalisierte hTERT _N -Werte: 6,67 normale Mukosa/Bronchitis; 18,38 Metaplasie; 13,31 Dysplasie; 75,46 Karzinome, Ergebnisse signifikant (p=0,0036)			quantitative Real-time RT-PCR	Capkova et al. 2007		
atypische adenomatöse Hyperplasien der Lunge - AAH (n=35) & bronchoalveoläre Karzinome - BAC (n=37)	hTERT-mRNA-Expression von AAH (23/35 [66%]) im Vergleich zu BAC (36/37 [97%]) signifikant erhöht (p = 0.02)			RNA ISH	Kawai et al. 2007		
NSCLC-Gewebe & angrenzendes nichtmalignes Lungengewebe (n=28)	mRNA-Expression von 4 hTERT-Splicingvarianten:			quantitative Real-time RT-PCR	Mavrogiannou et al. 2007		
	NSCLC		hTERT- Expression Lungengewebe				
		hTERT-Kopien/µg Gesamt-RNA					
	α+β-	75	82% (23/28)			29% (8/28)	
	α+β+	119				7% (2/28)	
α-β-	17	54% (15/28)	keine Expression				
α-β+	3	29% (8/28)					
<i>hTR</i>							
Tumorzelllinien, u.a. H23 (NSCLC) normales Gewebe, u.a. Lunge	-hTR-Expression in Tumorzelllinien & normalen somatischen Zellen -mRNA-Konzentration in Tumorzellen 2- bis 7fach höher als in somatischen Zellen			RT-PCR, Northern Blot	Feng et al. 1995		
Lungentumor & korrespondierende Lymphknotenmetastase (n=2)	hohe hTR-mRNA-Level in Lungentumor & Metastase mit hTR- Genamplifikation			RNA ISH	Soder et al. 1997		
Gewebeproben (n=205 normal, preneoplastisch, maligne) von 40 Patienten mit invasivem Lungenkarzinom (n=34), CIS (n=5), nichtmaligne Erkrankung (n=1)	Telomerase positiv (Enzymaktivität und/oder hTR-Expression) in 7/27 (26 %) normalen Geweben, in 20/28 (71 %) hyperplastischen Geweben, in 4/5 (80 %) Metaplasien, in 9/11 (82 %) Dysplasien, in 11/11 (100 %) CIS, in 32/34 (94 %) Lungentumoren			RNA ISH	Yashima et al. 1997		
NSCLC	PeCa (n=32)	13/32 (41%) hTR		RNA ISH	Soder et al. 1998		
	AdenoCa (n=18), LCC (n=8)	2/25 (8%) hTR					
neuroendokrine Tumore (n=91)	SCLC (n=62)	61/62 (98%) hTR		RNA ISH	Sarvesvaran et al. 1999		
	Karzinoidtumore (n=29)	17/29 (59%) hTR					
<i>hTERT & hTR</i>							
primäres Lungenkarzinom (n=92) & angrenzendes nichtmalignes Lungengewebe (n=32)	-in Tumorgewebe hTERT-mRNA-Expression in 82/92 (89%), hTR in 92/92 (100%); in nichtneoplastischem Lungengewebe hTERT- Expression in 1/32 (3%), hTR in 30/32 (94%)			qualitative RT-PCR	Arinaga et al. 2000		
Gewebe von Patienten mit Lungenkarzinom (n=115): Tumorgewebe & angrenzendes nichtneoplastisches Gewebe	hTR-mRNA-Expression in allen Tumorgeweben, hTERT in 108/115 (94%) Tumorgeweben, hTR & hTERT in nichtneoplastischen Geweben nur in aktivierten Lymphozyten detektierbar			RNA ISH	Kumaki et al. 2001		
primäre neuroendokrine Tumoren (n=70) -typisches Carcinoid, TC (n=34) -atypisches Carcinoid, AC (n=10) -großzelliges neuroendokrines Ca, LCNEC (n=16) -SCLC (n=10) NSCLC (n=7) normales Lungengewebe (LG) (n=3)	RNA-ISH		RT-PCR		RNA ISH, qualitative RT-PCR	Nishio et al. 2007	
		hTR	hTERT	hTR			hTERT
	TC	11/19 (58%)	25/34 (74%)	1/1			0/1
	AC	10/10	11/11	n.u.			n.u.
	LCNEC	9/9	16/16	3/3			2/3
	SCLC	5/5	10/10	n.u.			n.u.
	NSCLC	n.u.	n.u.	7/7			2/7
LG	Alveolar-Typ-II-Zellen, seröse Zellen, Lymphoidfollikel & nichtziliäre Bronchiolenzellen		3/3	0/3			

Tabelle 1-10 Untersuchung der mRNA-Expression von hTERT und hTR in Zelllinien, Tumorgewebe und normalem Lungengewebe, ISH...In-situ-Hybridisierung, n.u. ... nicht untersucht

1.4.7 Zentrosomenassoziierte Proteine

Das Zentrosom besteht aus dem perizentriolären Material (PCM) und einem Paar Zentriolen.

Pericentrin (*PCNT2*, Pericentrin B, Kendrin)

Pericentrin wurde von Doxsey et al. nach der Untersuchung einer Maus-cDNA-Bibliothek mit Antiserum im PCM und in mikrotubuliororganisierenden Zentren (MTOC) zentriolenloser Zellen, z.B. Mausoozyten, lokalisiert und beschrieben (Doxsey et al. 1994). Flory et al. veröffentlichten im Jahr 2000 die Erstbeschreibung des humanen Pericentrins (Flory et al. 2000). Das humane Pericentrin-codierende Gen *PCNT2* liegt auf Chromosom 21q22.3. Die experimentelle Blockierung von Pericentrin mit entsprechenden Antikörpern führt zur Störung der Mikrotubuliororganisation während Mitose und Meiose (Doxsey et al. 1994). Außerdem ist Pericentrin für die Verankerung des γ -Tubulinkomplexes am Zentrosom verantwortlich (Dichtenberg et al. 1998). Diese Verankerung kontrolliert während der Mitose die Organisation der Mitosespindel (Zimmerman et al. 2004). Da in Zellen vieler maligner Tumoren Abnormitäten der Zentrosomen in Größe, Form und Anzahl gefunden wurden (↗ Tabelle 1-11), erschien es sinnvoll, im Rahmen dieser Arbeit die Expression von Pericentrin zu untersuchen. Pihan et al. stellten nach Untersuchungen an preinvasiven Karzinomen von Cervix, Mamma und Prostata die Hypothese auf, dass Zentrosomendefekte frühe Ereignisse der Karzinogenese darstellen und ihr Nachweis für die Diagnose, Prognose und Therapie von Tumoren von Nutzen sein kann (Pihan et al. 2003).

Aurora 2 (Aurora A, STK15: Serin-Threonin-Kinase 15, BTAK: Breast tumor amplified kinase)

Aurora 2 ist eine zentrosomenassoziierte Serin-Threonin-Kinase, welche durch die Phosphorylierung zentrosomaler Proteine die Mikrotubulinukleation während der Mitose reguliert (Sen et al. 1997, Kimura et al. 1997). Die für Aurora kodierende DNA befindet sich in der Chromosomenregion 20q13.2 (Sen et al. 1997). Die mRNA-Expression von Aurora ist abhängig vom Zellzyklus und erreicht in der G2/M-Phase ihren Maximalwert (Kimura et al. 1997, Bischoff et al. 1998). Die Kinaseaktivität von Aurora ist während der Mitose am höchsten (Kimura et al. 1997). Über die Phosphorylierung von I κ B α aktiviert Aurora 2 den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Briassouli et al. 2007), welcher in aktivierter Form bei chemotherapieresistenten Tumoren nachgewiesen wurde.

Aurora-mRNA wird in vielen Tumorzelllinien und Tumoren überexprimiert (Bischoff et al. 1998, Zhou et al. 1998). Eine Aurora-mRNA-Überexpression wurde u. a. in Lungenkarzinomen (Xu et al. 2006), kolorektalen Karzinomen (Gerlach et al. 2006), und Mammakarzinomen (Miyoshi et al.

2001) detektiert. Für das Magenkarzinom wurde eine Korrelation zwischen Auroraüberexpression und Aneuploidie nachgewiesen (Sakakura et al. 2001). In Tabelle 1-11 sind bisherige Arbeiten zur mRNA-Expression von Aurora in Zelllinien, Tumorgewebe und normalem Lungengewebe aufgeführt.

Material	Ergebnisse	Methode	Referenz
<i>Pericentrin</i>			
Gewebe primärer maligner Tumoren & metastatischer Tumoren, u.a. Lunge, Tumorzelllinien	Zentrosomen in nahezu allen Tumoren/ Tumorzelllinien atypisch in Form, Größe & Zusammensetzung, II häufig erhöhte Zentrosomenzahl	(Protein: Pericentrin-AK, FISH)	Pihan et al. 1998
akute myeloische Leukemie (AML) (n=29) RNA: cDNA-Microarrays (2800 Gene), quantitative PCR euploider (n=6) & aneuploider (n=6) Proben mit 12 Genen, u.a. Pericentrin (Protein: zentrosomenspezifischer Pericentrin-AK zur Detektion von Zentrosomen-veränderungen)	RNA: 21 Gene zur Klassifikation →nach Vergleich Ploidiestatus & Zentrosomenaberrationen 18 Gene in beiden Signaturen vorhanden, u.a. Pericentrin, höhere mRNA-Expression in aneuploiden als in euploiden Proben (Protein: mehr Zentrosomenveränderungen in Proben mit numerischen [aneuploid: 8/29] Chromosomenaberrationen [48,3±9,8%] als bei normalem [euploid: 21/29] Chromosomensatz [32±8,4%])	RNA: cDNA-Microarray, quantitative PCR (Protein: Pericentrin-AK)	Neben et al. 2004
Mantelzelllymphom-Gewebe (MCL) (n=33) RNA: cDNA-Microarray, quantitative RT-PCR (Protein: Antikörper gegen Pericentrin)	RNA: Pericentrin (4,6fach, p=0,003) signifikant höher in tetraploiden als in diploiden MCL-Proben exprimiert ↔ keine Überexpression von Housekeeping Genen (PGK1, LMNB1, PPIA)	cDNA-Microarray, quantitative RT-PCR (Protein: Pericentrin-AK)	Neben et al. 2007
<i>Aurora-2</i>			
schnell proliferierende, normale Gewebe: fetale Gewebe, adultes Testis- & Thymusgewebe	Expression von Aurora-2-mRNA	Northern Blot	Bischoff et al. 1998
endotheliale Zellen, u.a. Lunge	niedrige Expression von Aurora-2-mRNA		
normale adulte Gewebe, u.a. Lunge	keine Aurora-2-mRNA-Expression		
Tumorzelllinien, u.a. Lunge	signifikant erhöhte Aurora-2-mRNA-Expression		
Patienten mit Lungenkarzinom (n=40): Tumorgewebe (TG), normales Lungengewebe (LG)	Auroraüberexpression in 25/40 (62,5%) TG; Expression in TG signifikant höher als in LG, aber Aurora-2-mRNA auf geringem Level auch in LG von Patienten mit Lungenkarzinom	qualitative RT-PCR	Xu et al. 2006

Tabelle 1-11 Arbeiten zur Protein- und mRNA-Expression von Aurora-2 & Pericentrin in Zelllinien, normalem Lungengewebe und Tumorgewebe, AK...Antikörper

1.5 Forschungsprojekt und Aufgabenstellung

Die Überlebenszeit von Patienten mit Lungenkarzinom ist vom klinischen Stadium der Erkrankung zum Diagnosezeitpunkt abhängig, wobei sie sich von TNM-Stadium I bis IV zunehmend verringert. Screeningverfahren zur Früherkennung von Lungenkarzinomen mit bildgebenden Verfahren und Zytologie existieren bis jetzt nicht. Veränderungen auf DNA-, RNA- und Proteinebene lassen sich häufig vor dem zytomorphologischen Tumornachweis detektieren.

In der Diagnostik werden bisher die durch Zentrifugation aus der Bronchiallavage gewonnenen Zellen untersucht. Das Projekt „Frühdagnostik des Lungenkarzinoms - Molekulare Tumormarker in der Bronchiallavage (BL)“ beschäftigte sich mit der Untersuchung der sonst verworfenen zellfreien BL, speziell die extrazelluläre DNA (Mikrosatelliten, p53, Methylierung) und mRNA. Dabei ist hervorzuheben, dass extrazelluläre Nukleinsäuren in zellfreier BL zuvor noch nicht detektiert wurden.

Die vorliegende Dissertation umfasst qualitative und quantitative Expressionsuntersuchungen der mRNA in zellfreier BL, Serum, BL-Zellen und Tumorgewebe.

Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation

1. Lässt sich extrazelluläre mRNA in zellfreier BL detektieren?
2. Ist bei Vorhandensein von RNA deren Qualität und Quantität ausreichend für weitere Untersuchungen?
3. Kann mit qualitativen und/oder quantitativen Analysen zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten unterschieden werden? Dabei soll die mRNA-Expression verschiedener tumorassoziierter Gene in der BL untersucht werden.
4. Ist zellfreie BL als Untersuchungsmaterial für mRNA-Expressionsanalysen geeignet? Die Ergebnisse der mRNA-Expression in der BL werden mit der Expression in zellfreiem Serum und BL-Zellen verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte (bis auf Zentrifugen)

Gerät	Hersteller
Cycler, AbiPrism 7700	Applied Biosystems
Cycler, MJR, PTC-100TM Programmable Thermo Controller	MJR-MJ Research, Inc.
Digitalkamera DC 120 Zoom	KODAK
Elektrophoresis Documentation and Analysis System 120 -Kamerahalterung und 13 x 17 cm Blende	KODAK
Elektrophorese-Gelträger, -kamm, -kammer	Carl Roth GmbH Karlsruhe
Heizblock Techne DRI-BLOCK®; DB-2A	thermo-DUX Gesellschaft für Laborgeräte mbH
Mikrowelle "Micromat"	AEG
Pipetten, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf AG
QIAvac 24-Vacuum manifold + QIAvac 24 Base, Lid, Luer Caps	QIAGEN
Sicherheitswerkbank HERAsafe	HERAEUS
Stromgerät, Phero-stab. 500 -Electrophoresis Powersupply	Biotec Fischer
Stromgerät, Elektrophorese, Consort E521	Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH
Taumel Rollenmischer TRM 56	IDL
Ultrospec 2100 pro	amersham pharmacia
UV-Transilluminator	Hofer Scientific Instruments
Vakuumabsauggerät	BIOMETRA
Vortexgerät UNIMAG ZX Vortex Mixer	UNIEQUIP Laborgeräte & Vertrieb GmbH
Waage Analytic AC 210 P	Sartorius
Wasserbad UNITHERM 1225 PC	UNIEQUIP Laborgeräte & Vertrieb GmbH

Tabelle 2-1 Geräte (bis auf Zentrifugen)

2.1.2 Zentrifugen

Bezeichnung	Maximaler Zentrifugenradius [mm]	Verwendung	Hersteller
Sorvall® RC 28 S F-28/50	114,7	14-ml-Round-Bottom-Tubes	DU PONT
Sorvall® RMC 14	66	Eppendorf-Tubes	DU PONT
BIOFUGE fresco			HERAEUS
UNIVERSAL 30 F	110	Sarstedt Monovette®	Hettich
Rotanta S	140	50-/ 14-ml-Blue-Caps, Sarstedt Monovette®	Hettich
Varifuge RF	160	50-/ 14-ml-Blue-Caps	HERAEUS SEPATECH
Minifuge RF	150	96-Well-Platten	HERAEUS SEPATECH

Tabelle 2-2 Zentrifugen

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Drei-Wege-Hahn	Smiths Medical Deutschland GmbH
Pipetten, LIQPETTE™-Einwegpasteurpipetten	ELKAY-Roth
Pipetten, Polystyren (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Falcon®-Becton Dickinson Labware
QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit (50)	QIAGEN
Sarstedt Monovette®, EDTA KE/9 ml	Sarstedt
Tubes, Blue Caps, 15 ml, Cellstar, PP	Greiner Labortechnik
Tubes, Blue Caps, 50 ml, Polypropylen	Falcon®-Becton Dickinson Labware
Tubes, Cryo-, 1,8 ml	nunc™
Tubes, Round-Bottom~ „Falcon Nr. 2059“, 14 ml, Polypropylen	Falcon®-Becton Dickinson Labware

Tabelle 2-3 Verbrauchsmaterialien

Weitere Verbrauchsmaterialien, u. a. Pipettenspitzen, Eppendorf-Gefäße, Reaktionsgefäße für die PCR, wurden von folgenden Firmen bezogen: Abgene, Biozym Scientific GmbH, Corning Incorporated, Eppendorf AG, GeneAmp®, Greiner Labortechnik.

2.2 Reagenzien

2.2.1 Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel, 2 % Agarose, 0,5 x TBE	Herstellung: ↗ 2.6.2.5.1
Agarose MP (Mehrzweck Agarose), analytical grade, 500 g	Boehringer Mannheim Biochemica
Aqua destillata, Aqua ad injectabilia-Braun	Braun-Melsungen AG
Aqua destillata, deionisiert	Reinstwasser-System IMB
Aqua destillata, DEPC ⁺ dest.	Herstellung: ↗ 2.2.7.1
β-Mercaptoethanol = 2-Mercaptoethanol, C ₂ H ₆ OS	Sigma
Borsäure	Carl Roth GmbH
Chloroform, Trichlormethan (99 %, BP 93)	Carl Roth GmbH
Chloroform-Isoamylalkohol 24:1	Merck KG
DEPC (Diethylpyrocarbonat) > 97 %	Sigma Chemical Company
DNA-Polymerase AmpliTaq Gold	Applied Biosystems
DNase, RNase-frei	Boehringer Mannheim Biochemica
DNase, RNase-frei	QIAGEN
dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Herstellung aus Ultrapure dNTP Set
Ultrapure dNTP Set 2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphate dATP 100 mM (pH 7.5), dCTP 100 mM (pH 7.5) dGTP 100 mM (pH 7.5), dTTP 100 mM (pH 7.5)	amersham pharmacia biotech
DTT 0,1 M	Invitrogen™ Life Technologies
EDTA 0,5 M pH 8.0 bei 25 °C	GIBCO BRL Life Technologies
EDTA 2 Na • 2 H ₂ O	Carl Roth GmbH
Ethanol 100 %, Ethanol absolut	Merck KG
Ethanol 75 %, 75 vol % Ethanol (100 %) + 25 vol % DEPC ⁺ dest.	Merck KG
Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml), Stammlösung	Carl Roth GmbH
5 x first strand buffer	Invitrogen™ Life Technologies
Glycerol	Serva
Guanidinthiocyanat, C ₂ H ₆ N ₄ S	Roth
Goldbuffer (10 x PCR-Puffer, ohne MgCl ₂)	Applied Biosystems
Isopropanol, 2-Propanol pro analysi	Merck KG
Ladepuffer	MBI Fermentas
Lösung D	Herstellung: ↗ 2.2.7.2
Lösung D*	Herstellung: ↗ 2.2.7.2
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ 1 M	-
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ • 6 H ₂ O, reinst	Merck KG
Magnesiumchlorid MgCl ₂ 25 mM	Applied Biosystems
Natriumacetat, 2 M, pH 4,0	-
Natriumacetat, 3 M, pH 5,2	-
Natriumacetat für die Molekularbiologie, wasserfrei	Merck KG
Natriumchlorid, 0,9 %, Natriumchlorid-Infusionslösung 154, 500 ml	Berlin Chemie AG
Natriumcitrat 0,75 M pH 7,0	-
Natriumcitrat	GIBCO BRL Life Technologies
Natriumsarkosyl 10 %	-
Phenol (redestilliert, H ₂ O-gesättigt, pH 4,5-5,0) Aqua-Roti®-Phenol	Roth
pUC Mix Marker 8, ready-to-use	MBI Fermentas
QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit (50)	QIAGEN
QIAquick® PCR Purification Kit (250)	QIAGEN
Random Hexamer Primer	Invitrogen™ Life Technologies
Recombinant RNasin, Ribonuclease-Inhibitor für RNase T1	Promega
ROX	TIB MOLBIOL
SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Invitrogen™ Life Technologies
10 x TBE-Puffer	Herstellung: ↗ 2.2.7.3
0,5 x TBE-Puffer	Herstellung: ↗ 2.2.7.3
TOPO TA Cloning® Kloning Kit-Version N (mit Klonierungsvektor pCR®2.1-TOPO® & <i>E.coli</i> Genotyp DH5α-T1 ^R)	Invitrogen™ Life Technologies
Tris Base [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan]	Carl Roth GmbH

Tabelle 2-4 Reagenzien

2.2.2 PCR-Primer

Alle verwendeten Primer und Sonden wurden von TIB MOLBIOL synthetisiert.

Gen	Sequenzen der Primer und Sonden 5' - 3'		Produktgröße
<i>Qualitative PCR</i>			
β-Aktin	forward	ACG GCT CCG GCA TGT GCA AG	196 bp
	reverse	TGA CGA TGC CGT GCT GCA TG	
hnRNP	forward	TGT TCC TTT GGA GAG GAA AAA G	hnRNP-B1 = 164 bp hnRNP-A2 = 441 bp
	reverse	TTG ATC TTT TGC TTG CAG GA	
PGP 9.5	forward	CTG TGG CAC AAT CGG ACT TA	203 bp
	reverse	TGT CAT CTA CCC GAC ATT GG	
TTF-1	forward	CCA GGA CAC CAT GAG GAA CA	236 bp
	reverse	GTC GCT CCA GCT CGT ACA C	
MAGE-2	forward	AAG TAG GAC CCG AGG CAC TG	MAGE-A2 = 217 bp MAGE-2 = 316 bp
	reverse	GAA GAG GAA GAA GCG GTC TG	
HER2/neu	forward	AGC CGC GAG CAC CCA AGT	147 bp
	reverse	TTG GTG GGC AGG TAG GTG AGT T	
Aurora	forward	GCT GGA GAG CTT AAA ATT GCA G	219 bp
	reverse	TTT TGT AGG TCT CTT GGT ATG TG	
Pericentrin	forward	AGC GTG GGA TCT TCA CAA TC	192 bp
	reverse	GCA TGT TGC TCA GAC TCA GG	
Telomerase	hTR	forward GAA GGG CGT AGG CGC CGT GCT TTT GC reverse GTT TGC TCT AGA ATG AAC GGT GGA AGG	111 bp
	hTERT	forward TGA CAC CTC ACC TCA CCC AC reverse CAC TGT CTT CCG CAA GTT CAC	95 bp
<i>Real-Time PCR</i>			
GAPDH	<u>Primersequenz 5' - 3'</u> forward GAA GGT GAA GGT CGG AGT C reverse GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC <u>Sondensequenz 5' - 3'</u> 5'-6FAM-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC XT-PH		226 bp
hnRNP-B1	<u>Primersequenz 5' - 3'</u> forward GTA AGC TCT TTA TTG GTG GCT TAA reverse GAT CCC TCA TTA CCA CAC AGT <u>Sondensequenz 5' - 3'</u> 5'- 6FAM-TTT CCC CAT TGT TCG TAG TAG TTC CT XT-PH		104 bp
MAGE-2	<u>Primersequenz 5' - 3'</u> forward TTC AGC AAA GCC TCC GA reverse TTC CTG GGA TGT GCG AA <u>Sondensequenz 5' - 3'</u> 5'-6FAM-CCT CAA ACA CCT CCA ACA TAC TCA GCT XT-PH		280 bp
hTR	<u>Primersequenz 5' - 3'</u> forward CTT CCA CCG TTC ATT CTA GAG CAA reverse GCT GAC AGA GCC CAA CTC TT <u>Sondensequenz 5' - 3'</u> 5'- 6FAM-AGC TGC TGG CCC GTT CGC XT-PH		175 bp

Tabelle 2-5 Gene, Primersequenzen, Produktgrößen

bp...Basenpaare, 6FAM...6-Carboxyfluorescein, XT-PH...3'-Ende mit LAN (Linker Arm Nukleotide) und Quencher-Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-tetramethylrhodamin)

2.2.3 Random Primers (Invitrogen™ Life Technologies)

-Ausgangskonzentration: 0.09 OD₂₆₀ units/μl bzw. 3 μg/μl

OD₂₆₀...Optische Dichte bei 260 nm

-Lagerpuffer: 3 μM Tris-HCl (pH 7.0), 0.2 mM EDTA

Die Random Primer Oligonukleotide wurden bei – 20 °C gelagert und vor ihrer Verwendung mit Aqua destillata 1:10 auf 300 ng/μl verdünnt.

2.2.4 Tumorzelllinien

Zelllinie	Tumor/Zelltyp	Gewebe
A427	NSCLC	Lunge
NCI-H23		
NCI-H520		
NCI-H522		
NCI-H596		
NCI-H146	SCLC	Lunge
NCI-H209	SCLC (Knochenmarkmetastase)	
NCI-H441	humane Lungenzelllinie mit Eigenschaften von Typ-II-Pneumocyten und Clara-Zellen	
MCF-7	Mammakarzinom-Zelllinie, Adenokarzinom	Mamma
SKBR3		
BV173 Zellkulturüberstand	Chronisch myeloische Leukämie (CML)/ humane maligne Prä-B-Zelllinie	Blut/Lymphozyten
CCRF-CEM-C1	Akute lymphoblastische Leukämie (ALL)/ humane T-Lymphoblasten-Zelllinie	
DBTRG 05 MG	humane Glioblastom-Zelllinie	Gehirn
U 87 MG	Glioblastom (humane Astrozytom-Zelllinie)	
U 373 MG		

Tabelle 2-6 Als Referenz verwendete Zelllinien und deren Herkunft

NCI...National Cancer Institute, MCF...Michigan Cancer Foundation

2.2.5 pUC Mix Marker 8, ready-to-use (MBI Fermentas)

-DNA-Fragmente: 1116 bp, 883 bp, 692 bp, 501 bp, 489 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp, 111 bp, 110 bp, 67 bp, 34 bp, 34 bp, 26 bp, 19 bp

-DNA-Konzentration: 0,1 mg DNA/ml

-Lagerpuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA

-10 % Glycerol

-Farbstoffe: 0,015 % Bromphenolblau, 0,015 % Xylencyanol FF

2.2.6 Ladepuffer (MBI Fermentas)

Inhaltsstoffe: 60 % Glycerol, 60 mM EDTA, 0,09 % Bromphenolblau, 0,09 % Xylencyanol FF

2.2.7 Herstellung ausgewählter Lösungen und Puffer

DEPC-behandeltes Wasser

500 ml deionisiertes Reinstwasser und 0,5 ml DEPC (Sigma Chemical Company) wurden gründlich vermischt, acht Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal 30 Minuten bei 2 bar und 121°C autoklaviert.

Lösung D

- 100 g Guanidinthiocyanat C₂H₆N₄S
- 117,2 ml Aqua distillata, DEPC⁺ dest.
- 7,0 ml 0,75 M Natriumcitrat pH 7,0
- 10,6 ml 10% Natriumsarkosyl

Die Reagenzien wurden bei 65 °C im Wasserbad gelöst und währenddessen gründlich gemischt.

Lösung D*: Die Herstellung von Lösung D* erfolgte unmittelbar vor deren Verwendung durch Zugabe von 7,2 µl β-Mercaptoethanol pro ml Lösung D.

Herstellung von 10 x TBE-Puffer und 0,5 x TBE-Puffer

540 g Tris Base, 37 g EDTA und 275 g Borsäure wurden in 4,148 l erhitztem Aqua destillata vollständig gelöst (ergibt 5 Liter 10 x TBE-Puffer). Der TBE-Puffer wurde gefiltert, in autoklavierte Glasflaschen gefüllt und 30 Minuten bei 2 bar und 121°C autoklaviert. Die Herstellung von 0,5 x TBE-Puffer erfolgte durch Verdünnung von 10 x TBE-Puffer mit deionisiertem Wasser nach folgender Berechnung:

$$\begin{aligned} \text{Volumen } 10 \times \text{TBE-Puffer: } & V_{10 \times \text{TBE-Puffer}} = V_{0,5 \times \text{TBE-Puffer}} : 20 \\ \text{Volumen } H_2O: & V_{H_2O} = V_{0,5 \times \text{TBE-Puffer}} - V_{10 \times \text{TBE-Puffer}} \end{aligned}$$

2.3 Patienten

2.3.1 Patienteneinschluss

Das Studienprotokoll des Projektes „Frühdiagnostik des Lungenkarzinoms - Molekulare Tumormarker in der Bronchiallavage“ wurde der Ethikkommission vorgelegt und von dieser genehmigt. Im Rahmen dieser Studie wurden die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation durchgeführt.

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, die aufgrund einer klinischen Indikation bronchoskopiert wurden, wobei folgende Gruppen unterschieden wurden:

1. Patienten mit Verdacht auf ein Lungenkarzinom (klinisch oder radiomorphologisch),
2. Patienten mit gesichertem Lungenkarzinom, die zum Staging vor oder nach Therapie untersucht wurden,
3. Patienten der Kontrollgruppe, die wegen anderer Ursachen bronchoskopiert wurden.

In die letztgenannte Patientengruppe wurden nur Patienten eingeordnet, bei welchen im weiteren Verlauf auch durch andere Untersuchungsverfahren kein primärer Lungentumor oder pulmonale Metastasen festgestellt wurden.

Patienten mit Kontraindikationen für eine Bronchoskopie (z. B. hochgradige Obstruktion [FEV₁ < 1 Liter]), Blutgerinnungsstörungen [Quick-Wert < 50 %, PTT > 50s, Thrombozytenzahl < 50/nl]), fehlender Indikation für eine Bronchoskopie außerhalb der Studie sowie nicht orientierte oder nicht kooperative Patienten wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

Bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden sämtliche routinemäßigen Untersuchungen (Mikrobiologie, Mykologie, Tuberkulose, Zytologie) durchgeführt, es ergaben sich keine therapeutischen Konsequenzen aus den molekularbiologischen Befunden der

vorliegenden Studie. Die Entscheidung hinsichtlich einer tumorspezifischen Therapie wurde nach konventionellen Kriterien getroffen.

2.3.2 Vorbereitung

In Vorbereitung auf die bronchoskopische Untersuchung erfolgte eine ausführliche Anamnese (speziell Tumor- und Raucheranamnese), die Anfertigung einer Röntgen-Thorax-Aufnahme (maximal vier Wochen alt), eine Lungenfunktionsuntersuchung (nicht älter als eine Woche) und die Erhebung aktueller Laborwerte (Blutbild, Gerinnung, Blutgruppe). Die Patienten wurden vor der Bronchoskopie sowohl über den Eingriff (Standard-Bronchoskopie-Aufklärung) als auch über die wissenschaftliche Nutzung eines Teils des Untersuchungsmaterials aufgeklärt. Von den eingeschlossenen Patienten wurde vor der Bronchoskopie eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie unterschrieben.

2.3.3 Tumorpatienten

Gruppe A – RNA-Isolation mit heißem Phenol

Es wurden Serum und Bronchiallavage von 15 Tumorpatienten (11 NSCLC, 4 SCLC; 3 weiblich, 12 männlich) in einem Alter zwischen 47 und 72 Jahren untersucht. Eine Tumorthherapie in Form einer Chemotherapie (4 Patienten) bzw. Radiatio war zum Zeitpunkt der Probenentnahme bei sieben Patienten durchgeführt worden.

Gruppe B – RNA-Isolation mit QIAamp[®] MinElute[™] Virus Vacuum Kit

Es wurde Material von 36 Patienten (31 NSCLC, 5 SCLC; 7 weiblich, 29 männlich) in einem Alter zwischen 45 und 75 Jahren untersucht. Sieben Patienten hatten zum Untersuchungszeitpunkt eine Tumorthherapie (OP n=1, Chemotherapie n=4, Radiatio n=4; Mehrfachnennungen möglich) erhalten. Von allen 36 Patienten der Gruppe B wurden Serum und Bronchiallavage untersucht, von 22 der Patienten außerdem Bronchiallavage-Zellen sowie von acht Patienten Tumorgewebe.

Raucherstatus, Tumorhistologie und Tumorstadium (TNM-Klassifikation) der Tumorpatienten sind in Tabelle 2-7 aufgeführt.

Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Raucherstatus		Diagnose, Histologie, Tumorstadium (soweit bekannt)
				pack-years (py)	
<i>Tumorpatienten Gruppe A</i>					
1	m	66	eR seit 5 Jahren	>20 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom
2	m	66	R	75 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom
3	m	63	R	>50 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom
4	w	64	eR seit 1 Jahr	15 py	NSCLC, Adenokarzinom, T4N2M0
5	m	66	eR seit 15 Jahren	>20 py	NSCLC, Rezidiv
6	w	62	R	60 py	NSCLC, T4
7	m	72	R	30 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom, mittelgradig diff. (I)
8	m	72	R	40 py	NSCLC, Adenokarzinom, T4N2M1
9	m	52	R	>40 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom, T2N2M0
10	m	69	R	>40 py	NSCLC, Adenokarzinom
11	m	47	R	>50 py	SCLC
12	m	72	R	>40 py	SCLC
13	m	67	R	>40 py	SCLC
14	m	60	R	42 py	SCLC, neuroendokrines Karzinom
15	w	58	R	>80 py	NSCLC, T3N2M0
n = 15	3 w, 12 m	Ø 63,73	12 R, 3 eR		11 NSCLC, 4 SCLC
<i>Tumorpatienten Gruppe B</i>					
16	m	75	eR seit 3 Jahren	75 py	SCLC
17	m	55	R	20 py	NSCLC, T4N3M1
18	m	65	R	>50py	NSCLC, T3N1M0
19	m	72	eR seit 7 Jahren	30 py	NSCLC, T4N2M0
20	w	66	Ohne Angabe		NSCLC, Adenoidzystisches Karzinom
21	w	70	R	>50 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom
22	m	66	R	>50 py	NSCLC, T4N2M1
23	m	62	R	40 py	NSCLC, Px
24	m	60	R	>40 py	NSCLC, großzelliges Karzinom
25	m	59	R	>40 py	NSCLC, Adenokarzinom
26	m	61	R	>80 py	NSCLC, adenoidzystisch
27	m	45	R	>40 py	NSCLC, T3N2M0
28	m	70	eR seit 0,5 Jahren	40 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom, T2-3N2M0
29	m	57	R	>100 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom, T3N2M0
30	w	59	R	>40 py	SCLC
31	m	69	eR seit 5 Wochen	30 py	NSCLC, T3, Px
32	m	68	R	45 py	NSCLC, T4M1
33	m	52	R	50 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom, Rezidiv, T4N3M0
34	m	66	R	>40 py	NSCLC, T4,M1
35	m	65	NR	-	NSCLC
36	m	60	R	>20 py	NSCLC, Adenokarzinom
37	w	61	NR	-	NSCLC
38	m	65	eR seit 39 Jahren	5 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom
39	m	75	eR seit 10 Jahren	40 py	NSCLC, Adenokarzinom
40	m	61	R	120 py	NSCLC
41	m	49	R	>20 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom
42	m	53	eR seit 1 Jahr	>20 py	SCLC
43	w	70	R	150 py	NSCLC, Adeno- & Plattenepithelkarzinom
44	m	70	R	>40 py	NSCLC, Plattenepithelkarzinom
45	m	47	R	>60 py	NSCLC, Adenokarzinom
46	w	66	R	40 py	NSCLC, Adenokarzinom
47	w	55	R	70 py	SCLC
48	m	67	R	50 py	NSCLC, Adenokarzinom
49	m	76	eR seit 1 Jahr	>20 py	NSCLC
50	m	61	R	>50 py	NSCLC
51	m	60	R	>25 py	SCLC
n = 36	7 w, 29 m	Ø 62,72	25 R, 8 eR, 2 NR, 1 ohne Angabe		31 NSCLC, 5 SCLC

Tabelle 2-7 Tumorpatienten der Gruppen A und B (w...weiblich, m...männlich, R...Raucher, eR...ehemalige Raucher, NR...Nichtraucher)

py...Pack-Years, Einheit für die geschätzte Anzahl der gerauchten Zigaretten eines Patienten bei der Annahme von 20 Zigaretten je Packung, 1 py = 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr (= 7300 Zigaretten pro Jahr)

2.3.4 Nichttumorpatienten

In die Gruppe der 35 Nichttumorpatienten (11 weiblich, 24 männlich) wurden Patienten aufgenommen, bei welchen weder zum Untersuchungszeitpunkt noch durch weiterführende Diagnostik Tumoren der Lunge und anderer Organe diagnostiziert wurden. Die Indikation zur Bronchoskopie waren bei diesen Patienten verschiedene nichtmaligne Lungenerkrankungen, z.B. Pneumonie, Sarkoidose, unklarer Husten, Stentkontrolle bei benigner Trachealstenose, Verdacht auf Tuberkulose, COPD, Hämoptysen, Lungenfibrose, radiologisch diagnostizierte Raumforderungen in der Lunge. Alter und Raucherstatus dieser Patientengruppe sind in Tabelle 2-8 dargestellt.

Von den 35 Nichttumorpatienten der Kontrollgruppe wurden Serum und Bronchiallavage aufgearbeitet, von 15 Patienten wurde RNA aus Bronchiallavage-Zellen isoliert. Die Isolation der RNA aus Serum und zellfreier Bronchiallavage von Nichttumorpatienten erfolgte mit dem QIAamp[®] MinElute[™] Virus Vacuum Kit, bei den Patienten 52 bis 71 auch mit heißem Phenol.

Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Raucherstatus	
				py
52	m	55	R	>20 py
53	m	64	eR seit 2 Jahren	>75 py
54	m	38	R	20 py
55	m	66	eR seit 30 Jahren	25 py
56	m	60	NR	-
57	m	59	eR seit 30 Jahren	8 py
58	w	47	NR	-
59	w	30	R	10 py
60	w	64	R	>20 py
61	m	46	R	>30 py
62	m	47	NR	-
63	w	47	NR	-
64	w	43	R	15 py
65	w	55	R	20 py
66	m	59	R	44 py
67	m	67	NR	-
68	m	65	eR seit 17 Jahren	> 20 py
69	m	34	NR	-
70	w	71	NR	-
71	m	71	eR seit 5 Jahren	53 py
72	m	58	R	40 py
73	m	74	eR seit 20 Jahren	37 py
74	m	65	eR seit 10 Jahren	20 py
75	m	65	R	>50 py
76	m	64	eR seit 25 Jahren	20 py
77	w	39	NR	-
78	m	58	eR seit 2 Jahren	40 py
79	m	68	NR	-
80	m	64	eR seit 28 Jahren	20 py
81	w	33	NR	-
82	m	70	eR seit 11 Jahren	32 py
83	w	48	NR	-
84	m	67	eR seit 3 Jahren	20 py
85	w	74	R	40 py
86	m	66	R	50 py
n=35	11 w, 14 m	Ø 57,17	12 R, 12 eR, 11 NR	

Tabelle 2-8 Nichttumorpatienten (w...weiblich, m... männlich, R...Raucher, eR...ehemalige Raucher, NR...Nichtraucher)

2.4 Bronchoskopie, Probenaufbereitung und -lagerung

2.4.1 Bronchoskopie, Materialgewinnung und Dokumentation

Vor der Prämedikation und der Bronchoskopie wurde Blut mittels Sarstedt Monovetten[®] entnommen. Nach dem Legen einer peripheren Venenverweilkanüle erfolgte die Prämedikation mit Midazolam i. v. (1 - 10 mg), Atropin i. v. (0,5 mg) nach Ausschluss von Herzrhythmusstörungen und Augeninnendruck erhöhungen, Dicodid s. c. (15 mg), Solu-Decortin i.v. (100 mg) bei Zeichen einer obstruktiven Ventilationsstörung ($FEV_1 < 75 \%$ /Soll, $R > 125 \%$ /Soll, $RV/TLC > 125 \%$ /Soll) sowie die Lokalanästhesie der Rachenschleimhaut (Xylonest[®]-Pumpspray). Durch Spülung mit maximal 20 ml 0,9 %iger Natriumchloridlösung und Absaugen von Bronchialsekret aus dem Trachea- und Hauptbronchusbereich wurde die Bronchiallavage gewonnen. Bei einer

Indikation für eine Schleimhautbiopsie wurde diese nach der Bronchiallavage durchgeführt, um eine Kontamination der Bronchiallavage mit intrazellulären Nukleinsäuren zu vermeiden. Die Patienten wurden nach Abschluss der Bronchoskopie bei klinischer Notwendigkeit überwacht und blieben zwei Stunden nüchtern.

Die klinischen Befunde wurden mit digitalen Befundbildern und auf entsprechenden Studiendokumentationsbögen dokumentiert. Die Proben wurden sofort nach der Entnahme bei 4°C gelagert und innerhalb von maximal drei Stunden aufbereitet.

2.4.2 Untersuchungsmaterial

Es wurden zellfreies Serum und zellfreie Bronchiallavage von insgesamt 86 Patienten, Bronchiallavage-Zellen von 37 Patienten und Tumorgewebe von acht Patienten untersucht.

Serum

Das Serum wurde 10 Minuten mit 280 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Berechnung Relative Centrifugal Force [RCF]: $RCF = 1,118 \cdot 10^{-6} \cdot n^2 \cdot r$; n...Umdrehungen pro Minute, r...Zentrifugenradius [mm]) . Nach der Überführung des Überstandes in Round-Bottom-Tubes erfolgte für 10 Minuten ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2050 x g. Der nun zellfreie Überstand wurde abgenommen und in Aliquots mit Volumina zwischen 0,5 und 1,8 ml bei -80°C aufbewahrt.

Bronchiallavage (BL) und Bronchiallavage-Zellen (BL-Zellen)

Nach zehnminütiger Zentrifugation mit ausgeschalteter Bremse bei Raumtemperatur und 350 x g wurde der zellfreie Überstand in 1,0-ml-Aliquots bei -80°C gelagert.

Das Zellpellet wurde in 0,9%iger Natriumchloridlösung aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und drei Minuten bei 540 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Aufbewahrung der gewaschenen BL-Zellen bei -80°C.

Tumorgewebe

Das Tumorgewebe wurde bei -80°C gelagert.

2.5 RNA-Isolation, DNase-Behandlung und cDNA-Synthese

Abbildung 2-1 veranschaulicht die angewendeten Methoden der RNA-Isolation.

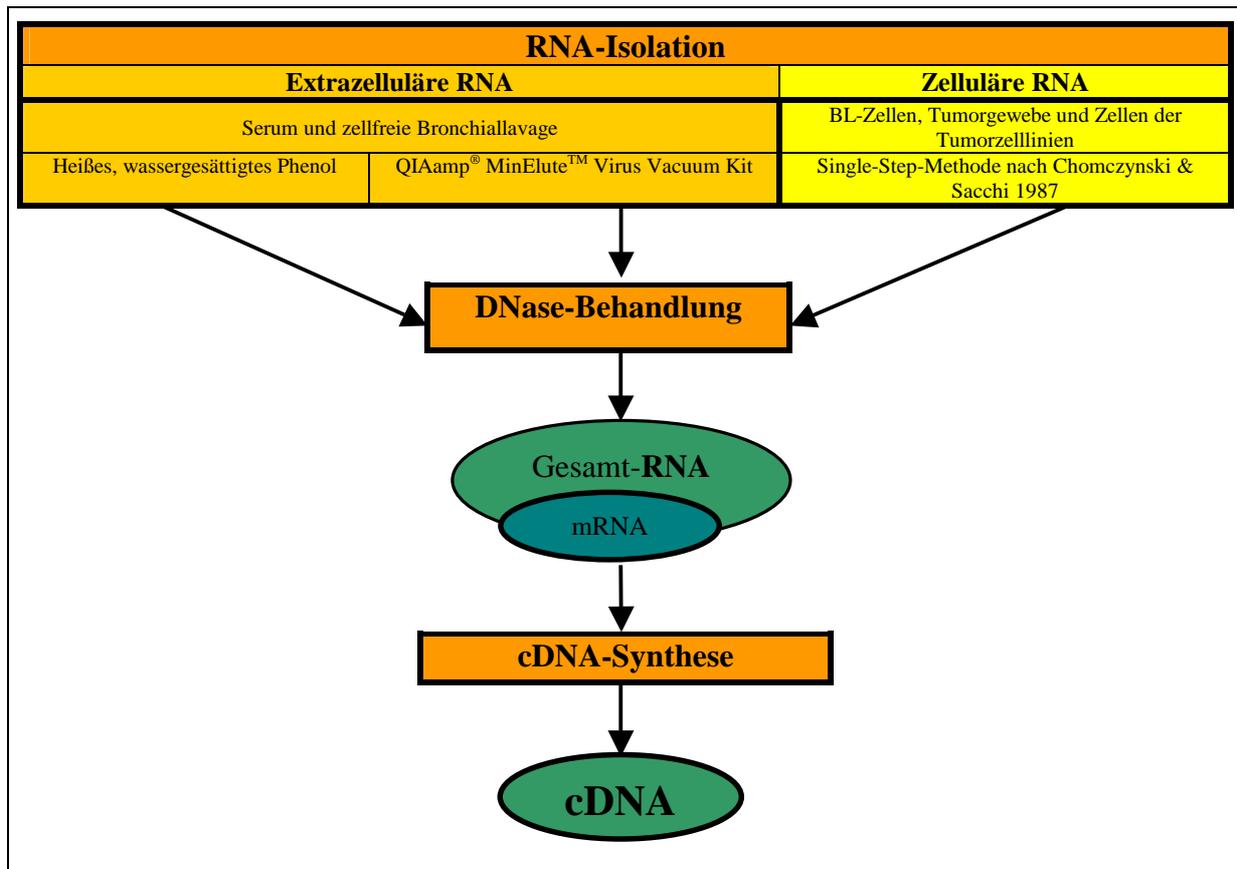


Abb. 2-1 Arbeitsschritte von der RNA-Isolation bis zur cDNA-Synthese

2.5.1 RNA-Isolation

2.5.1.1 RNA-Isolation aus Serum und BL mit heißem wassergesättigtem Phenol

Tag 1 - Phenolextraktion und 1. Präzipitation

Das Material wurde nach der Bestimmung der Probenvolumina im Eis aufgetaut und in das gleiche Volumen wassergesättigten Phenols pH 4.5-5.0 mit einer Temperatur von 65°C überführt. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben 30 Minuten bei 65°C unter zwischenzeitlichem Vortexen im Wasserbad inkubiert, 15 Minuten im Eis gekühlt und 30 Minuten bei 3620 x g und 4°C zentrifugiert. Die Oberphase wurde in Round-Bottom-Tubes „Falcon Nr. 2059“ überführt, mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2 und dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und bei -80°C mindestens zwölf Stunden präzipitiert.

Tag 2 - 2. Präzipitation

Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 8210 x g und 4°C wurden der Isopropanol-Überstand entfernt, die RNA in zweimal je 250 µl Lösung D aufgenommen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Mit 550 µl Isopropanol versetzt erfolgte über zwölf Stunden die Präzipitation der RNA bei -80°C.

2.5.1.2 RNA-Isolation aus Serum und BL mit dem QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit

Das Material war bei -80°C gelagert. Die Proben wurden gewogen und auf Eis vollständig aufgetaut. Die RNA-Isolation erfolgte nach den Vorgaben des QIAamp MinElute Virus Vacuum Protokolls unter Verwendung des vom Hersteller für die Isolation viraler Nukleinsäuren konzipierten QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kits (QIAGEN), des QIAvac 24 vacuum manifold (QIAGEN, ↗ Abb. 2-2) und einer Vakuumpumpe (BIOMETRA). Die isolierte RNA wurde zweimal mit je 75 µl Puffer AVE eluiert. Den Proben wurden $\frac{1}{10}$ Volumenanteil 3 M Natriumacetat pH 5.2 und ein dreifaches Volumen 100 % Ethanol zugesetzt. Es folgte die Präzipitation bei -80°C für mindestens zwölf Stunden.

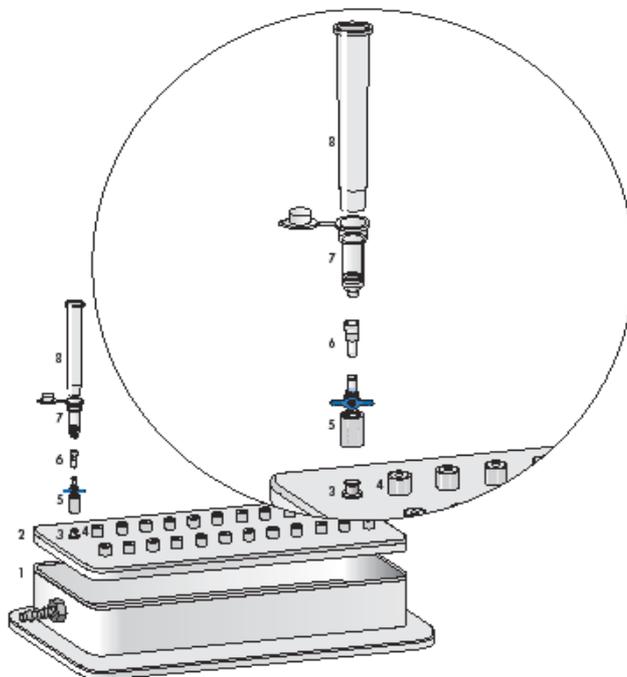


Abb. 2-2 Aufbau des QIAvac 24 vacuum manifold (aus: "QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Handbook", S. 17)

1. QIAvac 24 Basis
2. QIAvac 24 lid
3. Luer extension
4. Luer extension mit Verschlusskappe
5. Drei-Wege-Hahn
6. VacConnector
7. QIAamp MinElute Säule
8. Extensionstube

2.5.1.3 Single-Step-Methode nach Chomczynski & Sacchi 1987

Tag 1 - Lyse und 1. Präzipitation

BL-Zellen und Tumorgewebe waren bei -80°C gelagert. Proben mit über 300 µl Volumen wurden auf Eis aufgetaut. Das gefrorene bzw. aufgetaute Pellet wurde in Lösung D* gelöst und in Round-Bottom-Tubes „Falcon Nr.2059“ überführt. Den Proben wurden nacheinander 2 M Natriumacetat, pH 4.0, wassergesättigtes Phenol pH 4.5-5.0 und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt (↗ Tabelle 2-9), wobei die Tubes nach Zugabe jeder Reagenz gevortext wurden. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Ansätze 30 Minuten bei 8210 x g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase mit der gelösten RNA wurde in ein weiteres Round-Bottom-Tube „Falcon Nr. 2059“ überführt und nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol mindestens zwölf Stunden bei -80°C präzipitiert.

V _{Zellpellet} [μl]	Lösung D* [ml]	V _{2 M NaAc pH4.0} [μl]	V _{Phenol, wassergesättigt, pH 4.5-5.0} [ml]	V _{CHCl3+Isoamylalkohol} [ml]
bis 300	3	300	3	0,9
> 300	5	500	5	1,3

Tabelle 2-9 Volumina der bei der Single-Step-Methode benötigten Reagenzien in Abhängigkeit vom Volumen des Zellpellets (V...Volumen, NaAc...Natriumacetat)

Tag 2 – 2. Präzipitation

Am Folgetag wurden die Proben 30 Minuten bei 8210 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in zweimal je 250 μl Lösung D aufgenommen, in Eppendorf-Tubes überführt und nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol (ca. 550 μl) mindestens zwölf Stunden bei -80°C präzipitiert.

2.5.2 DNase-Behandlung

Die isolierte RNA wurde 30 Minuten bei 12470 x g und 4°C zentrifugiert und mit 75 %igem Ethanol gewaschen. Die in DEPC⁺-behandeltem Wasser gelöste RNA wurde zehn Minuten auf Eis gekühlt. Die Proben wurden mit 2 M Natriumacetat pH 4.0, 1 M Magnesiumchlorid, RNasin, DNase versetzt (↗ Tabelle 2-10), gemischt, kurz anzentrifugiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Reagenz	Ausgangs- konzentration	Volumen	
		DNase Boehringer	DNase QIAGEN
DEPC-behandeltes Wasser	-	200 μl	192 μl
Natriumacetat, pH 4.0	2 M	20 μl	
Magnesiumchlorid	1 M	2 μl	
RNasin (Promega)	40 U/μl	1 μl	
DNase (Boehringer/ QIAGEN)	1500 Kunitz units	2 μl	10 μl
		225 μl	

Tabelle 2-10 Zur DNase-Behandlung verwendete Reagenzien

Kunitz units: Einheit der DNase I

Zur Deproteinisierung (DNase, RNasin) wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt: Die Ansätze wurden mit je 250 μl Phenol- Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 1:1 (125 μl wassergesättigtes Phenol pH 4.5-5.0 und 125 μl Chloroform-Isoamylalkohol 24:1) versetzt, gemixt und 5 Minuten bei 12470 x g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase mit der darin gelösten RNA wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Den Proben wurden ¹/₁₀ Volumenanteil 3 M Natriumacetat pH 5.2 und ein dreifaches Volumen 100 % Ethanol zugesetzt. Es folgte die Präzipitation bei -80°C für mindestens zwölf Stunden.

2.5.3 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird die mRNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde 30 Minuten bei 12470 x g und 4°C zentrifugiert, mit 75 %igem Ethanol gewaschen und in 24 μl DEPC-behandeltem, autoklaviertem Wasser aufgelöst. Jede

Probe wurde mit 1 µl Random Hexamer Primer versetzt, gemischt, zur Auflösung vorhandener Sekundärstrukturen der RNA und zur Primeranlagerung an die mRNA zehn Minuten bei einer Temperatur 70°C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Aus 5x Reaktionspuffer, Dithiothreitol (DTT), dNTP-Mix und RNasin wurde ein Mastermix hergestellt. Die entsprechenden Volumina, Ausgangs- und Endkonzentrationen sind in Tabelle 2-11 aufgeführt. Zu jeder Probe wurden 15 µl Mastermix pipettiert. Jeder Reaktionsansatzes hatte ein Endvolumen von 40 µl. Die gemischten Ansätze wurden zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42 °C überführt. Die Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase (SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase [Invitrogen™]) mit einer Aktivität n der Stammlösung von 200 U/µl erfolgte nach zwei Minuten. Die Proben wurden zur cDNA-Synthese 60 Minuten bei 42 °C inkubiert, zur Denaturierung von SuperScript™ II zehn Minuten in einem Heizblock auf 70°C erwärmt und dann auf Eis gekühlt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Reagenz		Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen pro Ansatz [µl]
RNA in DEPC-behandeltem Wasser		-	-	24
Random Hexamer Primer (Invitrogen™)		300 ng/µl	7,5 ng/µl	1
first strand buffer (Invitrogen™)		5 x	1 x	8
Mastermix (15 µl pro Ansatz)	DTT (Invitrogen™)	0,1 M	0,01 M	4
	dNTP-Mix	10 mM	50 µM	2
	RNasin (Promega)	40 U/µl	1 U/µl	1
				40 µl

Tabelle 2-11 Für die cDNA-Synthese verwendete Reagenzien

2.6 PCR

2.6.1 Primer-Etablierung und Sequenzierung

Die Amplifikationsbedingungen der qualitativen PCR wurden für hnRNP-B1, Aurora (Miyoshi et al. 2001), Pericentrin und Telomerase (hTR und hTERT, Chen et al. 2000) etabliert. Die Amplifikation von β-Aktin, PGP 9.5, TTF-1, MAGE-2 und HER2/neu wurde in unserem Labor mit zellulärer RNA bereits erfolgreich durchgeführt (Fleischhacker et al. 2001) und für die Verwendung von extrazellulärer mRNA optimiert. Die Etablierung der Bedingungen für die Real-Time PCR erfolgte mit Ausnahme von GAPDH (Radonić et al. 2004) in unserem Labor. Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) nach dem vorgegebenen Protokoll aufgereinigt und von Dr. B. Jandrig (MDC Berlin Buch) sequenziert (Methode nach Sanger, Sanger et al. 1977). Die Kontrolle der Produktsequenzen erfolgte mit dem NCBI Sequence Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.6.2 Template

Für jeden PCR-Ansatz wurden 3 µl der aus Serum und BL synthetisierten cDNA eingesetzt. Das entspricht einem Ausgangsvolumen zwischen 62 und 96 µl Serum bzw. BL pro Ansatz. Von der aus der mRNA der BL-Zellen und des Tumorgewebes synthetisierten cDNA wurden pro PCR-Ansatz 2 µl eingesetzt.

2.6.3 Qualitative PCR

2.6.3.1 Tumorzelllinien

Die als Positivkontrollen verwendeten Tumorzelllinien sind in Tabelle 2-6 aufgeführt, die Genexpression in Tabelle 3-1. Es wurden je Ansatz 2 µl Template eingesetzt.

2.6.3.2 Amplifikationsbedingungen

Die qualitativen PCRs wurden im PTC-100TM Programmable Thermo Controller (MJ Research, Inc.) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 2-12 und 2-13 zusammengefasst.

Gen		PCR-Ansatz	Cycler-Bedingungen
	β-Aktin	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 50 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,25 µl=50 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,2 µl = 0,4 µM 	5 min 95°C, 45x 45 s 61°C, 30 s 72°C, 30 s 95°C, 5 min 72°C, ∞ 4°C
	hnRNP	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 50 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,4 µl =80 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,3 µl = 0,6 µM 	5 min 95°C, 45x 30 s 62°C, 30 s 72°C, 30 s 95°C, 5 min 72°C, ∞ 4°C
	PGP 9.5	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 50 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,4 µl =80 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,3 µl = 0,6 µM 	5 min 95°C, 45x 30 s 60°C, 30 s 72°C, 30s 95°C, 5 min 72°C, ∞ 4°C
	TTF-1	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 50 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,25 µl=50 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,2 µl = 0,4 µM 	5 min 95°C, 45x 30 s 57°C, 30 s 72°C, 30 s 95°C, 5 min 72°C, ∞ 4°C
	MAGE-2	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 50 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,25 µl =50 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,25 µl = 0,5 µM 	5 min 95°C, 45x 1 min 55°C, 1 min 72°C, 45 s 95°C, 7 min 72°C, ∞ 4°C
	HER2/neu	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 25 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,125 µl =50 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,25 µl = 1 µM 	5 min 95°C, 45x 30 s 62°C, 30 s 72°C, 30 s 95°C, 5 min 72 °C, ∞ 4°
	Aurora (STK-15)	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 50 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,2 µl =40 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,125 µl=0,25 µM 	5 min 95°C, 45x 30 s 62°C, 30 s 72°C, 30 s 95°C, 5 min 72 °C, ∞ 4°
	Pericentrin	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 50 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,2 µl =40 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,14 µl = 0,28 µM 	5 min 95°C, 45x 30 s 60°C, 30 s 72°C, 30 s 95°C, 5 min 72°C, ∞ 4°
Telomerase	hTR	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 25 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,125 µl =50 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,05 µl = 0,2 µM 	5 min 95°C, 45x 30 s 94°C, 30 s 63°C, 30 s 72°C, 5 min 72°C, ∞ 4°
	hTERT	<ul style="list-style-type: none"> • V_{Ansatz}: 25 µl • $dNTP$ 10 mM: 0,125 µl =50 µM • $forward/reverse$ Primer100 µM: je 0,75 µl = 0,3 µM 	

Tabelle 2-12 Übersicht über die PCR-Bedingungen der qualitativen PCR

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	V[μl]/Ansatz	
			25-μl-Ansatz	50-μl-Ansatz
Aqua ad injectibilia (Braun)	-	-	ad 25 μl	ad 50 μl
Goldbuffer (Applied Biosystems)	10 x	1 x	2,5	5
MgCl ₂ (Applied Biosystems)	25 mM	1,5 mM	1,5	3
dNTP-Mix	10 mM	40-80 μM	0,1 - 0,2	0,2 - 0,4
Primer (TIB MOLBIOL)	forward	0,2-1,0 μM	0,05 - 0,25	0,1 - 0,5
	reverse			
Template	-	-	Serum & BL 3 BL-Zellen, Gewebe 2	
DNA-Polymerase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)	5 U/μl	1 U/Ansatz	0,2	
			25 μl	50 μl

Tabelle 2-13 Ausgangs- und Endkonzentrationen der PCR-Reagenzien für die qualitative PCR

2.6.3.3 Post-PCR-Processing

Herstellung von Agarosegelen (2%) für die DNA-Gelelektrophorese: Die Agarose wurde mit 0,5 x TBE-Puffer ($V_{0,5 \text{ x TBE-Puffer}} [\text{ml}] = m_{\text{Agarose}} [\text{g}] \cdot 50$) angesetzt. Zu 30 ml in der Mikrowelle erhitzter, verflüssigter Agarose wurden 0,2 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pipettiert.

Agarose-Gelelektrophorese: Die Elektrophoresekammer wurde mit 0,5 x TBE-Puffer (Laufpuffer) gefüllt, so dass das Agarosegel bedeckt war. 10 μl PCR-Produkt wurden mit je 3 μl Ladepuffer vermischt. Als Elektrophoresemarker wurde pUC Mix Marker 8 (MBI Fermetas) verwendet. Die PCR-Produkte wurden eine Stunde bei einer Spannung von 95 V in der Elektrophoresekammer aufgetrennt.

Gelfotografie: Die PCR-Produkte wurden durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid auf einem UV-Transilluminator (Hoefer Scientific Instruments) visualisiert und die Gele mit einer Digitalkamera (DC 120 Zoom [KODAK]) fotografiert.

Auswertung: Die Gelfotografien wurden mit dem Programm *Corel DRAW 10* ausgewertet und archiviert. Ein Beispiel zeigt Abbildung 2-3. Die Ergebnisse wurden mittels *Excel 2000* tabellarisch und grafisch dargestellt.



Abb. 2-3 Elektrophorese von PGP9.5-PCR-Produkten: Auf beiden Seiten der Proben wurde pUC Mix Marker 8 aufgetragen. Die Produktgröße der Proben aus der BL der Patienten 44, 50, 51 und 52 liegt bei 203 bp.

2.6.4 Real-Time PCR (Quantitative PCR)

2.6.4.1 Amplifikationsbedingungen

Die Real-Time PCRs wurden im AbiPrism 7700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Zusätzlich zu den Reagenzien für die qualitative PCR wurden für die Real-Time PCR ROX (6-Carboxy-X-rhodamin) als passiver Referenzfarbstoff und eine jeweils genspezifische TaqMan-Sonde

verwendet (Tabellen 2-14, 2-15). Die Sonde, ein Oligonukleotid mit einer Basensequenz zwischen Forward- und Reverse-Primer, besitzt an ihrem 5'-Ende einen hochenergetischen Farbstoff, den Reporter (hier: FAM = 6-Carboxyfluorescein), und an ihrem 3'-Ende einen Farbstoff mit einem niedrigeren Energieniveau, den Quencher (hier: TAMRA = 6-Carboxy-tetramethylrhodamin). Durch einen Energietransfer des Reporters zum Quencher wird die Fluoreszenz im intakten Sondenzustand unterdrückt; dieses Prinzip wird als Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet. Während der Synthetisierung des PCR-Produktes durch die AmpliTaq-Gold-Polymerase wird bei vollständiger Hybridisierung der Sonde mit dem zu synthetisierenden Strang auch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert und dadurch die Sonde hydrolysiert (Holland et al. 1991). Durch die Trennung von Reporter- und Quencher-molekül ist kein FRET mehr möglich; das Reportermolekül fluoresziert. Das Fluoreszenzsignal korreliert mit der Anzahl von DNA-Molekülen des PCR-Produktes. Im Unterschied zur qualitativen PCR werden bei der Real-Time PCR höhere Magnesiumkonzentrationen verwendet. Die positive Ladung der Magnesium-Ionen führt zur Ausbildung einer Sekundärstruktur der Sonde, wodurch eine Annäherung von Reporter und Quencher und die Verstärkung des FRET bei intakter Sonde erfolgen (Livak et al. 1995, Gibson et al. 1996). Es wurden von jeder Probe Doppel- (BL-Zellen, Tumorgewebe) bzw. Dreifachbestimmungen (Serum, BL) durchgeführt und daraus ein C_T -Mittelwert gebildet (Threshold cycle: Anzahl der PCR-Zyklen, bei welchen die Fluoreszenz des Reporters den Schwellenwert übersteigt). Stark abweichende C_T -Werte (um >1 Abweichung) wurden nicht in die Berechnung einbezogen.

Reagenzien		Ausgangskonzentration	Endkonzentration	V[μ l]/25- μ l-Ansatz
Aqua ad injectabilia (Braun)		-	-	ad 25 μ l
Goldbuffer (Applied Biosystems)		10x	1x	2,5
$MgCl_2$ (Applied Biosystems)		25 mM	2,0-4,5 mM	2,0-4,5
dNTP-Mix		10 mM	50 μ M	0,125
Primer (TIB MOLBIOL)	forward	100 μ M	0,4 μ M	0,1
	reverse	100 μ M		
Sonde (TIB MOLBIOL)		10 μ M	0,132 μ M	0,3
ROX (TIB MOLBIOL)		100 μ M 150 μ M	1 μ M	0,25 (100 μ M) 0,17 (150 μ M)
Template		-	-	Serum & BL 3 BL-Zellen, Gewebe 2
DNA-Polymerase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)		5 U/ μ l	0,75 U/Ansatz	0,15
				25 μl

Tabelle 2-14 Ausgangs- und Endkonzentrationen der PCR-Reagenzien für die Real-Time PCR

Gen	Magnesiumkonzentrationen	Cycler-Bedingungen
GAPDH	Mg^{2+} 25 mM: 4,5 μ l = 4,5 mM	10 min 95 °C, 45x 15 s 95 °C, 60 s 65 °C
hnRNP-B1		10 min 95 °C, 45x 15 s 95 °C, 60 s 60 °C
MAGE-2		
hTR	Mg^{2+} 25 mM: 2,0 μ l = 2,0 mM	10 min 95 °C, 45x 15s 95°C, 60s 60°C , 15s 72 °C

Tabelle 2-15 Übersicht über die Magnesiumkonzentrationen und Cyclerbedingungen

2.6.4.2 Absolute Quantifizierung von GAPDH

Bei der absoluten Quantifizierung wurde die Startkopienanzahl des Housekeeping-Gens GAPDH bestimmt. Nach der Klonierung des PCR-Produktes in ein Plasmid diente eine Verdünnungsreihe des Plasmids sowohl der Erstellung einer Standardkurve als auch als externer Standard bei der Amplifizierung der Patientenproben.

Plasmid: Die Klonierung des Plasmids erfolgte mittels TOPO TA Cloning[®] Kit Version N (Invitrogen[™] Life Technologies) unter Verwendung des Klonierungsvektors pCR[®]2.1-TOPO[®], *E.coli*-Genotyp DH5 α -T1^R. Die Messung der GAPDH-Plasmid-DNA-Konzentration und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte im *Ultraspec[®] 2100 pro* (Amersham Pharmacia). Die Plasmid-DNA wurde vor der Messung Plasmid-DNA 1:100 verdünnt. Die Kopienanzahl pro Mikroliter wurde aus der gemessenen DNA-Konzentration berechnet.

• Klonierungsvektor pCR [®] 2.1-TOPO [®] :	3908 bp
• PCR-Produkt (GAPDH):	226 bp (-1 bp durch Restriktion des Plasmids)
• Plasmid-Größe:	4133 bp
• gemessene DNA-Konzentration:	$C_{\text{Plasmid-DNA}} = 169,4 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
• AVOGADRO-Konstante:	$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \cdot \text{mol}^{-1}$
• Molare Masse pro DNA-Basenpaar (Mittelwert):	$M_{\text{Basenpaar}} = 660 \text{ Da/bp}$
$4133 \text{ bp} \cdot 660 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{bp}^{-1} = 2727780 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ $= 2727780 \cdot 10^9 \text{ ng} \cdot \text{mol}^{-1}$ $= \frac{169,4 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}}{2727780 \cdot 10^9 \text{ ng} \cdot \text{mol}^{-1}}$ $x = 3,739769336 \cdot 10^{10} \text{ Plasmide}/\mu\text{l}$	
$\frac{x}{6,022 \cdot 10^{23} \text{ Plasmide} \cdot \text{mol}^{-1}} = \frac{3,739769336 \cdot 10^{10} \text{ Plasmide}/\mu\text{l}}{6,022 \cdot 10^{23} \text{ Plasmide} \cdot \text{mol}^{-1}}$	
<p>→ Verdünnung auf 10^8 Plasmide / 2 μl: 1:700 $\approx 0,534 \cdot 10^8$ Plasmide / μl</p> <p>→ <u>Plasmide in 2 μl: $1,06 \cdot 10^8$ Plasmide</u></p>	

Standardkurve: Zur Erstellung einer Standardkurve wurden in Mehrfachbestimmungen Verdünnungen des Plasmids von 10^1 bis 10^6 Kopien amplifiziert und aus den C_T -Mittelwerten nach linearer Regression die Geradengleichung der Standardkurve (↗ Abb. 2-4) errechnet.

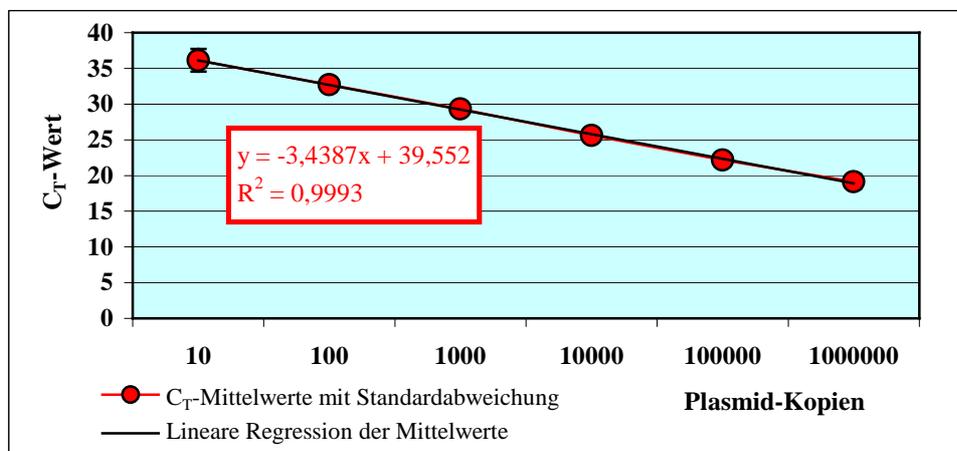


Abb. 2-4 Standardkurve der absoluten Quantifizierung von GAPDH-mRNA, R^2 ...Korrelationskoeffizient

Berechnung der Kopienanzahl: Durch die logarithmische Auftragung der C_T -Werte und lineare Regression ergab sich eine Gerade (↗ Abb. 2-4) der Gleichung $y = -3,4387x + 39,552$ (\log_{10} x...Kopienanzahl, y... C_T -Wert). Nach Umstellen der Gleichung nach x erfolgte die Berechnung der Kopienanzahl. Dieser Wert gab die Anzahl GAPDH-Kopien im für die PCR eingesetzten Template an. Mit dem bekannten Ausgangsvolumen wurde die Kopienanzahl pro Milliliter Serum bzw. BL berechnet.

2.6.4.3 Relative Quantifizierung

Untersucht wurde die Expression der Gene hnRNP-B1, MAGE-2 und hTR relativ zur Expression von GAPDH. Der ΔC_T wurde aus der Differenz aus C_T GAPDH und C_T des Gens der entsprechenden Patientenprobe ($\Delta C_T = C_T \text{ GAPDH} - C_T \text{ Gen}$) berechnet, wobei bei $\Delta C_T > 0$ die Expression des untersuchten Gens relativ höher als die Expression des Referenzgens GAPDH war. Ergebnisse mit einem $C_T = 45$ für GAPDH oder das jeweilige untersuchte Gen wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen.

2.6.4.4 Auswertung

Die statistische und grafische Auswertung erfolgte mit Unterstützung von Frau Dipl.-Math. Gerda Siebert (Institut für Medizinische Biometrie, Charité -Universitätsmedizin Berlin) und unter Verwendung des Programms *SPSS 11*. Die Daten wurden deskriptiv ausgewertet und mittels Boxplot-Diagrammen grafisch dargestellt.

Für die statistische Auswertung wurden beim Vergleich zweier unabhängiger Gruppen der U-Test nach Mann and Whitney, bei zwei verbundenen Stichproben der Wilcoxon-Test angewendet. Wurden mehr als zwei verbundene Stichproben überprüft, wurde der Friedman-Test angewendet. Ergab sich dort ein signifikantes Ergebnis, wurde für die folgenden paarweisen Teste der Wilcoxon-Test gewählt. Dabei wurden die dort erhaltenen Ergebnisse mit dem Bonferroni-Test bewertet, einem multiplen t-Test mit Alpha-Korrektur. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt, d. h. Ergebnisse mit p-Werten $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Wegen der teilweise geringen Fallzahl konnten keine multivariaten statistischen Analysemethoden angewandt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Qualitative PCR

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in Fachzeitschriften (**I, II**) publiziert und auf verschiedenen Kongressen (**V, VIII, X**) vorgestellt (↗ 11 Publikationsliste).

3.1.1 Tumorzelllinien

Tabelle 3-1 gibt einen Überblick über die mRNA-Expression in den als Positivkontrollen verwendeten Tumorzelllinien.

Gene	β-Aktin	hnRNP		PGP 9.5	TTF-1	MAGE-2		HER2/neu	Aurora	Pericentrin	Telomerase	
		hnRNP-B1	hnRNP-A2			MAGE-2	Splicing-variante				hTR	hTERT
Zelllinien												
A 427	✖	✖	—	✖	✖			✖				
BV173 Zellkultur-überstand	✖	✖	—	—		—	✖	✖	✖	✖		
CEM	✖	✖	—	—	—	✖	✖	—	✖	✖		
DBTRG 05 MG	✖								✖	✖	✖	✖
H 23	✖			✖								
H 146	✖	✖	—	✖	✖							
H 209	✖	✖	—	✖	✖	—	✖	—	✖	✖		
H 441	✖	✖	—	—	✖	✖	—					
H 520	✖	✖	—	✖	✖	✖	✖	—	✖	✖		
H 522	✖			✖								
H 596	✖			✖	—							
MCF-7	✖	✖	—	✖	—	—	✖	✖	✖	✖	✖	✖
SKBR3	✖							✖				
U 87 MG	✖											
U 373 MG	✖	✖	—	✖	—	✖	✖	✖			✖	✖

Tabelle 3-1 Genexpression der als Positivkontrollen verwendeten Zelllinien (β-Aktin als Amplifikationskontrolle)

✖	Genexpression
—	kein Expressionsnachweis
	nicht untersucht

3.1.2 Ergebnisse der Tumorpatienten der Gruppe A

Die RNA-Isolation aus zellfreiem Serum und zellfreier BL wurde zunächst mit heißem wassergesättigtem Phenol etabliert (↗ 2.5.1.1). Das Material dieser Patienten reichte für eine erneute RNA-Isolation mit dem später etablierten QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit nicht aus. Daher werden diese Ergebnisse gesondert ausgewertet. Die mRNA der 15 Tumorpatienten der Gruppe A (Nr. 1 bis 15) wurde auf die Expression von acht Genen untersucht: β-Aktin, MAGE-2, Pericentrin, hnRNP-B1, PGP 9.5, Aurora, TTF-1, HER2/neu. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-2 dargestellt.

Gene	β-Aktin		hnRNP				PGP 9.5		TTF-1		MAGE-2		HER2/neu		Aurora		Pericentrin	
			hnRNP-B1		hnRNP-A2													
	Pat.-Nr.	S	BL	S	BL	S	BL	S	BL	S	BL	S	BL	S	BL	S	BL	
1	✖	—	—	—	✖	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
2	✖	✖	—	—	✖	✖	—	—	—	—	✖	—	—	—	—	—	—	
3	✖	✖	—	—	✖	✖	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
4	✖	✖	—	—	✖	—	—	✖	—	—	✖	✖	—	—	—	—	—	
5	✖	✖	—	—	✖	—	—	—	—	—	✖	—	—	—	✖	—	—	
6	✖	✖	—	✖	✖	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✖	
7	✖	✖	—	—	—	✖	—	—	—	—	✖	✖	—	—	—	—	—	
8	✖	✖	—	—	✖	—	—	✖	—	—	✖	—	—	—	—	—	—	
9	✖	✖	—	—	✖	✖	—	—	—	—	✖	✖	—	—	—	—	✖	
10	✖	✖	—	—	✖	—	—	—	—	—	✖	—	—	—	—	—	—	
11	✖	✖	—	—	✖	—	—	—	—	—	✖	—	—	—	—	—	—	
12	✖	✖	—	✖	✖	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✖	
13	✖	✖	—	✖	✖	✖	—	—	—	—	✖	—	—	—	—	—	✖	
14	✖	✖	—	—	✖	—	—	—	—	—	✖	—	—	—	—	—	—	
15	✖	✖	—	—	✖	—	—	—	—	—	✖	✖	—	—	—	—	—	
gesamt	15/15 100%	14/15 93,3%	0/15 0%	3/15 20%	14/15 93,3%	5/15 33,3%	0/15 0%	2/15 13,3%	0/15 0%	0/15 0%	10/15 66,7%	5/15 33,3%	0/15 0%	0/15 0%	1/15 6,7%	0/15 0%	0/15 0%	4/15 26,7%

Tabelle 3-2 Expression von neun Genen in Serum (S) und zellfreier BL bei 15 Tumorpatienten der Gruppe A (β-Aktin als Amplifikationskontrolle)

✖ Genexpression
— kein Expressionsnachweis

3.1.2.1 Expression von hnRNP-A2

Bei der Auswertung der PCR-Produkte von hnRNP-B1 auf Agarosegelen zeigte sich bei 14/15 (93%) der Seren und bei 5/15 (33%) der Bronchiallavagen eine zusätzliche Bande zwischen den Banden des pUC Mix Markers 8 mit einer Größe von 404 bp und 489/501 bp. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert, sequenziert (Dr. B. Jandrig, MDC Berlin Buch) und als hnRNP-A2 identifiziert (↗ Tabelle 3-2, Abb. 3-1). Die Größe dieser PCR-Produkte beträgt 441 bp.

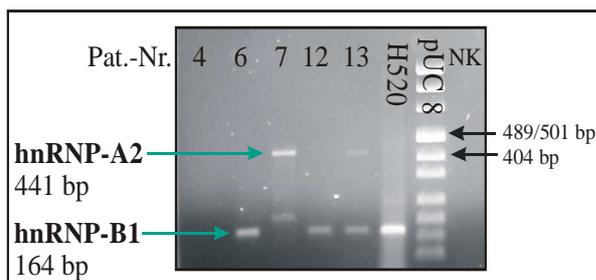


Abb. 3-1 Expression von hnRNP-B1 und hnRNP-A2 in der BL am Beispiel von fünf Tumorpatienten

H520...Zelllinie als Positivkontrolle
pUC 8...pUC Mix Marker 8 (Fermentas)
NK...Negativkontrolle (H₂O)
Expression von hnRNP-B1: Nr. 6, 12, 13
Expression von hnRNP-A2: Nr. 7, 13

3.1.3 Ergebnisse der Untersuchungen der mit dem QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit isolierten mRNA

3.1.3.1 Genexpression in Serum und BL

Untersucht wurde zunächst die Expression von elf Genen in Serum und zellfreier BL von 25 Tumorpatienten der Gruppe B (Nr. 16 bis 40) und 25 Nichttumorpatienten (Nr. 52 bis 76). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3-3 und 3-4 sowie in Abbildung 3-2 dargestellt. Abbildung 3-3 zeigt ein Beispiel eines Agarosegels nach Visualisierung.

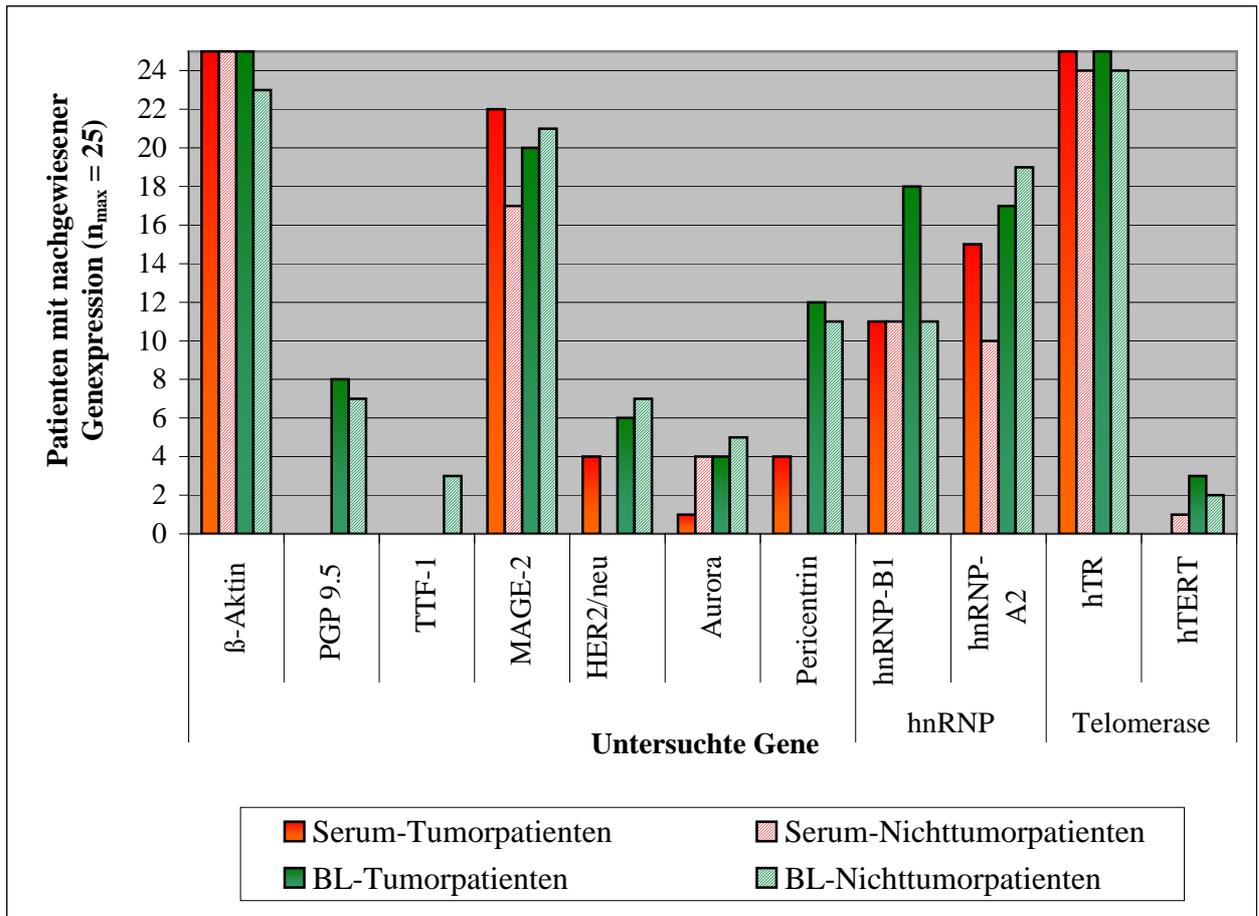


Abb. 3-2 Ergebnisse von 25 Tumorpatienten der Gruppe B (Patienten 16 bis 40) und 25 Nichttumorpatienten (Patienten 52 bis 76)

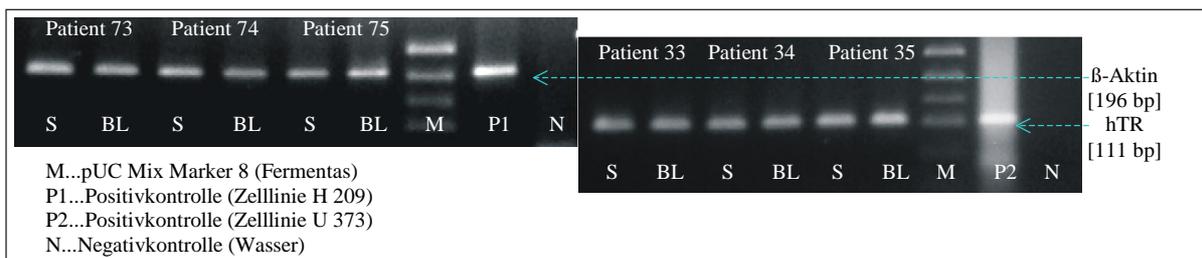


Abb. 3-3 Nachweis von β-Aktin-mRNA (Nichttumorpatienten 73 bis 75) und hTR-mRNA (Tumorpatienten 33 bis 35) in zellfreiem Serum (S) und BL

3.1.3.2 Splicevarianten

hnRNP-B1 und hnRNP-A2

Wie bei den Tumorpatienten Gruppe A wurde auch in Serum, BL und BL-Zellen der Tumorpatienten Gruppe B und den Nichttumorpatienten hnRNP-A2 nach der Sequenzierung entsprechender PCR-Produkte nachgewiesen. Die Genexpression in Serum und BL ist unter Kapitel 3.1.3.4 sowie in den Tabellen 3-3, 3-4 und Abbildung 3-4 dargestellt. Bei zwei Tumorpatienten (Nr. 36 und 40) wurde die Expression von hnRNP-A2 in den BL-Zellen detektiert.

MAGE-2

Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab für MAGE-2 zwei Splicing-Varianten: MAGE-2 mit 316 bp und MAGE-A2 mit 217 bp (Dr. B. Jandrig, MDC Berlin Buch). Die Expression von MAGE-A2 war in fünf Fällen detektierbar: im Serum eines Tumorpatienten (Nr. 26, ↗ Abb. 3-4), der BL von zwei Tumorpatienten (Nr. 31 und 34), in den BL-Zellen (Nr. 74) und der BL (Nr. 75) von zwei Nichttumorpatienten. Außerdem wurde die Expression von MAGE-A2 in einigen der als Positivkontrollen verwendeten Zelllinien detektiert: CEM, H209, H520, MCF-7, U373 und BV173-Zellkulturüberstand (↗ Tabelle 3-1).

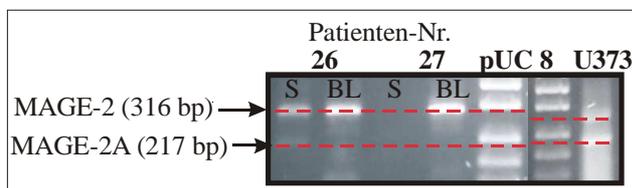


Abb. 3-4 Expressionsnachweis von MAGE-2 und MAGE-A2 in der Zelllinie U373 und in zellfreiem Serum (S) und BL von zwei Patienten

M...pUC Mix Marker 8 (Fermentas)

P...Positivkontrolle (Zelllinie U 373)

Gene Pat.- Nr.	β-Aktin			hnRNP						PGP 9.5			TTF-1			MAGE-2			HER2/neu			Aurora			Pericentrin			Telomerase							
				hnRNP-B1			hnRNP-A2																					hTR		hTERT					
	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ		
16	x	x		-	x		-	x		-	-		-	-		x	x		x	-		-	-		-	-		x	x		-	-			
17	x	x	x	x	-		-	x		-	-		-	-		-	x		-	-		-	-		x	x	x	x	x		-	-			
18	x	x		x	x		-	x		-	-		-	-		x	x		-	-		-	-		-	-		x	x		-	-			
19	x	x		-	x		-	x		-	-		-	-		x	x		x	-		-	-		-	-		x	x		-	-			
20	x	x	x	-	-		-	-		-	-	x	-	-		x	x		x	-		-	-		x	-	x	x	x		-	-			
21	x	x		-	x		-	x		-	x		-	-		-	x		-	-		-	-		-	x		x	x		-	x			
22	x	x		-	x		x	x		-	x		-	-		x	x		-	-		-	-		-	x		x	x		-	-			
23	x	x		x	-		-	x		-	-		-	-		x	x		-	-		-	-		-	-		x	x		-	-			
24	x	x		x	x		x	x		-	x		-	-		x	x		-	-		-	-		x	x		x	x		-	-			
25	x	x		x	-		x	x		-	x		-	-		x	x		-	x		-	x		-	-		x	x		-	-			
26	x	x		x	x		x	x		-	-		-	-		x	-		-	-		-	-		-	-		x	x		-	-			
27	x	x		x	-		x	-		-	-		-	-		x	x		-	-		-	-		-	-		x	x		-	-			
28	x	x	x	-	x		-	x		-	x		-	-		-	x		-	x		-	x		-	x		x	x		-	-			
29	x	x		x	x		x	x		-	x		-	-		x	x		-	-		-	-		-	x		x	x		-	-			
30	x	x		-	-		-	-		-	-		-	-		x	-		-	-		-	-		-	-		x	x		-	-			
31	x	x		-	x		x	-		-	x		-	-		x	x		-	x		-	x		-	-		x	x		-	-			
32	x	x		x	x		x	-		-	-		-	-		x	-		-	-		-	-		-	-		x	x		-	-			
33	x	x	x	-	x		x	x		-	x	x	-	-		x	x		-	x		-	x		-	x	x	x	x	x		-	x		
34	x	x	x	-	x		x	x		-	-	x	-	-		x	x		-	-		-	-		-	x	x	x	x	x		-	-		
35	x	x	x	x	x		x	x		-	-	x	-	-		x	x		-	x		x	-		-	-	x	x	x		-	-			
36	x	x	x	-	x		-	-	x	-	-	x	-	-		x	-	x	-	-		-	-		-	x		x	x	x		-	-		
37	x	x	x	-	x	x	x	-		-	-	x	-	-		x	x		-	-	x	-	-		-	-	x	x	x	x		-	-	x	
38	x	x	x	-	x	x	x	-		-	-		-	-		x	x		-	-		-	-		-	x	x	x	x	x		-	-	x	
39	x	x	x	x	-	x	x	x		-	-	x	-	-		x	x	x	x	-	x	-		-	-	x	x	-	x	x	x		-	x	x
40	x	x	x	-	x	x	x	x		-	-	x	-	-		x	-		-	x	x	-	-		-	x	x	x	x	x		-	-	x	
41	x	x	x							-	-	x													-	-		x							
42	x	x	x							-	x														-	x									
43	x	x	x							-	-	x													-	-		x							
44	x	x	x							-	-	x													-	x									
45	x	x	x							-	-	x													-	-		x							
46	x	x	x							-	-														x	x									
47	x	x	-							-	-														-	-									
48	x	x	x							-	x	x													-	x									
49	x	x	x							-	-	x													-	-									
50	x	x	x							-	x	x													-	x									
51	x	x	x							-	-	x													-	-		x							
gesamt	36/36 100%	36/36 100%	21/22 95,5%	11/25 44%	18/25 72%	4/5 80%	15/25 60%	17/25 68%	2/5 40%	0/36 0%	11/36 30,6%	17/22 77,3%	0/25 0%	0/25 0%	2/5 40%	22/25 88%	20/25 80%	2/5 40%	4/25 16%	6/25 24%	3/5 60%	1/36 2,8%	4/36 11,1%	4/22 18,2%	5/36 13,9%	17/36 47,2%	17/22 77,3%	25/25 100%	25/25 100%	5/5 100%	0/25 0%	3/25 12%	4/5 80%		

Tabelle 3-3 Genexpression in Serum (S), BL und BL-Zellen (BLZ) von 36 Tumorpatienten der Gruppe B (β-Aktin als Amplifikationskontrolle)

x Genexpression
- kein Expressionsnachweis
 nicht untersucht

Gene Pat.- Nr.	β-Aktin			hnRNP						PGP 9.5			TTF-1			MAGE-2			HER2/neu			Aurora			Pericentrin			Telomerase					
				hnRNP-B1			hnRNP-A2																					hTR		hTERT			
	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ	S	BL	BLZ
52	*	*		*	*		-	-		-	*		-	-		-	*		-	-		-	*		*	*		-	-				
53	*	*		-	*		*	-		-	-		-	-		*	-		-	*		-	*		*	*		-	-				
54	*	-		-	-		-	*		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-				
55	*	*		-	*		-	*		-	*		-	-		-	*		-	*		-	-		*	*		-	-				
56	*	*		-	-		-	*		-	-		-	-		*	*		-	-		*	*		*	*		-	-				
57	*	-		-	*		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		*	*		-	-				
58	*	*		*	-		*	-		-	-		-	-		*	*		-	-		-	-		*	*		-	-				
59	*	*		-	-		-	*		-	*		-	-		*	*		-	-		-	*		*	*		-	-				
60	*	*		*	*		-	*		-	-		-	-		*	*		-	-		-	-		*	*		-	-				
61	*	*		-	-		*	*		-	-		-	-		*	*		-	*		-	-		*	*		-	-				
62	*	*		*	-		*	*		-	-		-	-		*	*		-	-		-	*		*	*		-	-				
63	*	*		*	-		-	*		-	-		-	-		*	*		-	-		-	-		*	*		-	*				
64	*	*		*	-		-	-		-	-		-	-		*	*		-	-		-	-		*	*		-	-				
65	*	*		*	*		-	*		-	*		-	-		-	*		-	*		-	*		*	*		-	-				
66	*	*		*	*		-	-		-	*		-	-		-	*		-	-		-	*		*	*		-	-				
67	*	*		*	-		*	*		-	-		-	-		*	*		-	-		-	-		*	*		-	-				
68	*	*		-	*		*	*		-	-		-	*		-	*		-	-		-	-		*	*		-	-				
69	*	*		-	-		-	*		-	-		-	-		*	*		-	-		*	-		*	*		-	-				
70	*	*		-	-		-	*		-	*		-	-		-	*		-	-		-	*		*	*		-	-				
71	*	*		*	*		-	*		-	-		-	*		*	*		-	-		-	*		*	*		-	-				
72	*	*	*	*	*	*	-	*	*	-	-	*	-	-	-	*	*	-	-	*	-	-	*	-	*	*	*	*	*	-			
73	*	*	*	-	-	*	*	*	-	-	-	*	-	-	*	-	*	-	*	-	*	-	-	*	*	*	*	-	-	-			
74	*	*	*	-	-	*	*	*	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	*	-	*	*	*	*	*	*	-	-	-			
75	*	*	*	-	-	*	*	*	-	-	-	*	-	-	*	*	*	-	-	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*	-			
76	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	*	-	*	*	-	-	*	*	-	-	*	*	-	*	*	*	-	-	-			
77	*	-	*							-	-	*										-	-	*									
78	*	-	*							-	-	*										-	-	*									
79	*	*	*							-	-	*										-	-	*									
80	*	*	*							-	-	*										-	-	*									
81	*	*	*							-	-	*										-	-	*									
82	*	*	*							-	-	*										-	-	*	*								
83	*	*	*							-	-	-										-	-	-									
84	*	*	*							-	-	-										-	-	*									
85	*	*	*							-	-	*										-	-	*	*								
86	*	*	*							-	-	-										-	-	-									
gesamt	35/35 100%	31/35 88,6%	15/15 100%	11/25 44%	11/25 44%	5/5 100%	10/25 40%	19/25 76%	0/5 0%	0/36 0%	7/36 19,4%	0/15 0%	0/25 0%	3/25 12%	0/5 0%	17/25 68%	21/25 84%	2/5 40%	0/25 0%	7/25 28%	3/5 60%	4/36 11,1%	5/36 13,9%	2/15 13,3%	0/36 0%	14/36 38,9%	11/15 73,3%	24/25 96%	24/25 96%	5/5 100%	1/25 4%	2/25 8%	0/5 0%

Tabelle 3-4 Genexpression in Serum (S), BL und BL-Zellen (BLZ) von 35 Nichttumorpatienten (β-Aktin als Amplifikationskontrolle)

*	Genexpression
-	kein Expressionsnachweis
	nicht untersucht

3.1.4 Expression von PGP 9.5, Pericentrin und Aurora in Serum, BL und BL-Zellen

Die Expression der Gene PGP 9.5, Pericentrin und Aurora wurde in Serum, BL und BL-Zellen von 22 Tumorpatienten (Nr. 17, 20, 28, 33 bis 51) und 15 Nichttumorpatienten (Nr. 72 bis 86) untersucht. Die Amplifikationskontrolle mit β -Aktin war mit Ausnahme von RNA aus der BL zweier Nichttumorpatienten und der BL-Zellen eines Tumorpatienten positiv.

PGP 9.5 wurde in BL-Zellen von 17/22 (77%) der Tumor- und 10/15 (67%) der Nichttumorpatienten detektiert. Pericentrin-spezifische mRNA wurde in den BL-Zellen von 17/22 (77%) der Tumor- und 11/15 (73%) der Nichttumorpatienten nachgewiesen. Die mRNA-Expression von Aurora wurde in den BL-Zellen von 4/22 (18%) der Tumor- und 2/15 (13%) der Nichttumorpatienten nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-5 sowie in den Tabellen 3-3 und 3-4 dargestellt.

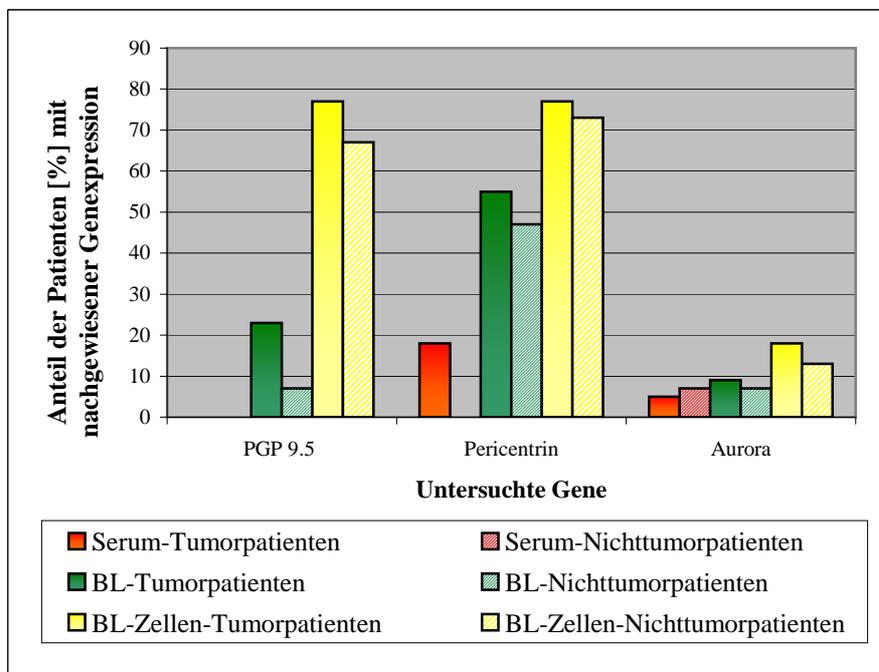


Abb. 3-5 Darstellung der Ergebnisse aus der Untersuchung von Serum, BL, BL-Zellen von 22 Tumorpatienten und 15 Nichttumorpatienten

3.2 Real-Time PCR

3.2.1 Absolute Quantifizierung von GAPDH-mRNA aus zellfreiem Serum und BL

Die Ergebnisse der Quantifizierung GAPDH-spezifischer mRNA wurden in Fachzeitschriften (IV) und auf Kongressen (XI) vorgestellt (↗ 11 Publikationsliste).

3.2.1.1 Tumorpatienten der Gruppe A

Es wurde GAPDH-spezifische mRNA aus Serum und BL von 14 Tumorpatienten (Gruppe A) quantifiziert, deren mRNA mit heißem Phenol isoliert wurde (↗ Tabelle 3-5). Da es sich um verbundene Stichproben handelte, erfolgte die statistische Auswertung (↗ Tabelle 3-6) der Ergebnisse mittels Wilcoxon-Test (nichtparametrischer Test). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) zwischen der Anzahl GAPDH-Kopien pro Milliliter Serum und BL.

Pat.-Nr.	Serum			BL		
	Ausgangsvolumen [μ l]	C _T -Mittelwert	GAPDH-Kopien/ml Serum	Ausgangsvolumen [μ l]	C _T -Mittelwert	GAPDH-Kopien/ml BL
1	1010	34,95	650	keine Untersuchung aufgrund von Materialmangel		
2	1060	31,63	5700	4500	32,89	580
3	1010	32,60	3100	1100	33,47	1600
4	980	34,72	780	4000	28,49	12400
5	920	33,35	2100	920	40,34	19
6	990	36,99	170	1070	26,19	216000
7	1110	35,53	400	6000	39,30	6
8	1110	44,52	1	1040	45	0
9	1060	45	0	1000	34,13	1100
10	1250	42,04	5	5500	45	0
11	960	35,77	390	990	45	0
12	1090	36,80	170	1110	33,57	1500
13	1010	32,55	3200	840	34,37	1100
14	1100	34,05	1100	1130	36,58	190
15	970	30,28	15400	1080	45	0

Tabelle 3-5 Ergebnisse der GAPDH-mRNA-Quantifizierung in Serum und BL von Tumorpatienten (Gruppe A)

nicht in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt, da von diesem Patienten keine BL untersucht wurde

		GAPDH/Kopien ml	
		Serum	BL
Minimum [GAPDH-Kopien/ml]		0	0
Maximum [GAPDH-Kopien/ml]		15400	216000
Perzentile [GAPDH-Kopien/ml]	25	128,75	0,375
	50	590	385
	75	3125	1525
Z		-0,847	
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		0,397	

Tabelle 3-6 Deskriptive Statistik und statistische Auswertung (Wilcoxon Test) der Quantifizierungsergebnisse von Patientengruppe A

3.2.1.2 Tumorpatienten der Gruppe B und Nichttumorpatienten

Es wurde die mit dem QIAamp[®] MinElute[™] Virus Vacuum Kit (↗2.5.1.2) isolierte mRNA von 36 Tumorpatienten (Gruppe B) und 35 Nichttumorpatienten (↗ Tabellen 3-7 und 3-8, Abb. 3-6) untersucht. Die C_T -Mittelwerte dieser Quantifizierung wurden zur Berechnung der ΔC_T -Werte für die Untersuchungen von hnRNP-B1 und MAGE-2 verwendet, da diese Messungen mit der mRNA einer RNA-Isolation durchgeführt wurden. Zur relativen Quantifizierung von hTR-spezifischer mRNA wurde von den untersuchten Patienten erneut RNA isoliert und auch diese Proben GAPDH-quantifiziert (↗ Kapitel 3.2.2.3).

Pat.-Nr.	Serum			Bronchiallavage		
	Ausgangsvolumen [µl]	C _T -Mittelwert	GAPDH-Kopien/ml Serum	Ausgangsvolumen [µl]	C _T -Mittelwert	GAPDH-Kopien/ml BL
16	970	38,98	20	990	30,28	6700
17	970	32,33	1700	950	29,46	12100
18	900	30,93	4800	1160	27,99	26000
19	1140	30,71	4300	970	25,96	123000
20	1030	31,78	2400	1120	26,10	97000
21	1140	33,30	770	1010	29,51	11000
22	960	32,65	1400	1020	29,28	13000
23	1020	32,21	1800	930	35,97	160
24	1090	30,53	5100	1120	26,26	87000
25	1070	33,26	840	1060	25,85	122000
26	1070	34,67	330	1100	32,84	1100
27	940	32,58	1500	1180	31,61	2300
28	1070	30,63	4900	980	25,70	146000
29	1080	29,64	9400	830	23,59	703000
30	950	32,68	1400	950	25,01	238000
31	1050	30,15	6900	910	27,34	52100
32	1120	29,39	10700	1070	31,90	2100
33	1090	29,62	9500	1060	29,96	7700
34	1050	32,86	1100	1080	31,18	3400
35	1070	33,32	810	1100	32,03	1900
36	1120	30,84	4100	1100	31,85	2100
37	1020	32,56	1400	1100	45	0
38	1090	31,76	2300	1120	27,83	30600
39	1090	35,75	160	1100	27,61	36000
40	1120	35,02	250	1040	30,60	5200
41	1000	30,95	4200	1000	29,53	10950
42	1050	29,66	9600	1070	27,77	33300
43	1100	34,03	490	1060	25,43	160500
44	1080	29,60	9700	1280	27,36	36500
45	1280	30,38	4800	1280	27,54	32500
46	1160	30,21	6000	1280	26,16	81700
47	1170	31,49	2500	1280	31,74	1900
48	1280	29,10	11400	1280	28,07	22700
49	1170	32,07	1700	1280	29,47	8900
50	1280	32,65	1100	1280	24,16	311000
51	1060	31,51	2700	1000	31,93	2200

Tabelle 3-7 Ergebnisse der GAPDH-Quantifizierung in Serum und BL von 36 Tumorpatienten der Gruppe B

Pat.-Nr.	Serum			Bronchiallavage		
	Ausgangsvolumen [µl]	C _T -Mittelwert	GAPDH-Kopien/ml Serum	Ausgangsvolumen [µl]	C _T -Mittelwert	GAPDH-Kopien/ml BL
52	1230	30,65	4200	1110	26,39	81000
53	1350	31,95	1600	1040	27,26	48100
54	1100	31,53	2600	1030	41,66	3
55	1010	38,67	24	1020	29,72	9500
56	1160	33,88	510	1130	28,36	21200
57	940	34,24	500	1000	34,34	440
58	1100	33,66	640	980	34,36	440
59	1170	38,30	26	950	29,15	14900
60	1020	37,38	56	950	30,83	4800
61	830	32,18	2200	1000	24,35	351000
62	910	35,67	200	860	28,53	24800
63	840	37,04	85	1070	24,58	282000
64	830	31,81	2900	990	32,82	1200
65	870	34,63	420	900	31,34	3600
66	950	30,18	7400	920	25,32	200000
67	980	30,17	7300	950	28,46	23600
68	970	39,06	19	880	33,97	639
69	1150	31,17	3200	980	38,59	26
70	1140	32,19	1600	1250	34,20	390
71	1130	31,21	3100	1110	32,18	1700
72	1150	30,21	6000	1100	29,20	12400
73	1050	31,06	3800	1060	35,23	230
74	1070	32,25	1700	1100	31,57	2500
75	1080	31,56	2600	1060	29,11	13700
76	1160	32,14	1600	1150	29,92	7300
77	1280	31,61	2100	1280	45	0
78	1280	30,50	4500	1280	34,16	390
79	1280	30,45	4600	1140	27,53	36700
80	850	33,45	940	1070	30,49	5400
81	1200	32,53	1200	1280	45	0
82	1280	35,10	205	1280	31,38	2500
83	1170	31,69	2200	990	36,71	90
84	1060	31,90	2100	1020	27,79	34300
85	1130	32,21	1600	1280	26,27	76100
86	1200	38,58	21	970	32,49	1560

Tabelle 3-8 Ergebnisse der GAPDH-Quantifizierung in Serum und BL von 35 Nichttumorpatienten

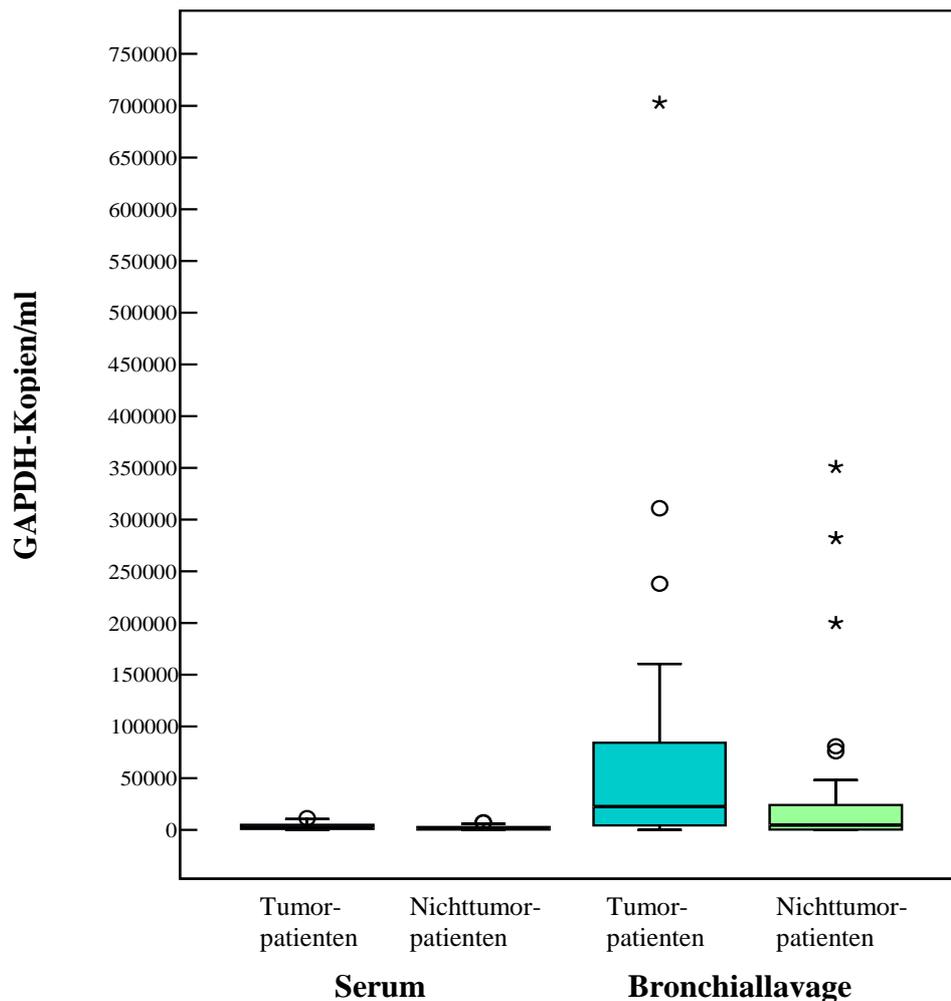


Abb. 3-6 Boxplot-Darstellung: Ergebnisse der absoluten Quantifizierung von GAPDH in Serum und BL von 36 Tumorpatienten (Gruppe B) und 35 Nichttumorpatienten („*“, „O“ = Ausreißer)

Vergleich von Tumor- und Nichttumorpatienten

Die Auswertung mithilfe nichtparametrischer Testverfahren (Mann-Whitney-U, Wilcoxon-W) ergab eine signifikant höhere GAPDH-Konzentration ($p = 0.026$) in der BL von Tumorpatienten als in der BL von Nichttumorpatienten. Zwischen den Seren von Tumor- und Nichttumorpatienten fand sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0.062$) (↗ Tabelle 3-9 und Abb. 3-6).

	GAPDH-Kopien/ml	
	Serum	BL
Mann-Whitney-U	468	436
Wilcoxon-W	1098	1066
Z	-1,864	-2,231
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,062	0,026

Tabelle 3-9 Vergleich der Quantifizierungsergebnisse von Tumor- und Nichttumorpatienten. Statistische Auswertung: Mann-Whitney-U-Test, Wilcoxon-W-Test.

Tumorpatienten

Quantifiziert wurde GAPDH-spezifische mRNA in Serum und BL von 36 Tumorpatienten (Gruppe B). Der Wilcoxon-Test ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) zwischen Serum und BL. Die GAPDH-Konzentration war dabei in der BL signifikant höher als im Serum (↗ Tabelle 3-10 und Abb. 3-6).

		Tumorpatienten		Nichttumorpatienten	
		Serum	BL	Serum	BL
N	Gültig	36	36	35	35
	Fehlend	106	106	107	107
Minimum [GAPDH-Kopien/ml]		20	0	19	0
Maximum [GAPDH-Kopien/ml]		11400	703000	7400	351000
Perzentile [GAPDH-Kopien/ml]	25	1100	2575	420	440
	50	2350	17850	1600	4800
	75	5050	85675	3100	24800
Z		-4,478		-3,341	
p: asymptotische Signifikanz (2-seitig)		0,000		0,001	

Tabelle 3-10 Deskriptive Statistik und statistische Auswertung (Wilcoxon-Test) der Quantifizierungsergebnisse von Tumor- und Nichttumorpatienten

Nichttumorpatienten

Nach Quantifizierung der GAPDH-Kopien in Serum und BL von 35 Nichttumorpatienten ergab der durchgeführte Wilcoxon-Test wie bei den Tumorpatienten eine signifikant höhere GAPDH-Konzentration in der BL ($p < 0.05$) (↗ Tabelle 3-10 und Abb. 3-6).

Auswertung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Tumorhistologie

Die Quantifizierungsergebnisse der Tumorpatienten von Gruppe B wurden entsprechend ihrem histologischen Tumortyp untersucht (↗ Abb. 3-7). Bei der Einschätzung dieser Ergebnisse ist die geringe Anzahl der SCLC-Patienten ($n = 5$) zu beachten. Die statistische Untersuchung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Serum bzw. BL von NSCLC- und SCLC-Patienten (↗ Tabelle 3-9). Der Wilcoxon-Test ergab eine signifikant höhere GAPDH-Konzentration in der BL der NSCLC-Patienten als im Serum ($p = 0.000$). Zwischen Serum und BL von SCLC-Patienten gab es keinen signifikanten Unterschied (↗ Tabelle 3-12).

	GAPDH-Kopien/ml	
	Serum	BL
Mann-Whitney-U	72,000	66,500
Wilcoxon-W	87,000	81,500
Z	-0,252	-0,503
p: asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,801	0,615
p: exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,825	0,625

Tabelle 3-11 Untersuchung der Quantifizierungsergebnisse von Tumorpatienten der Gruppe B mit NSCLC ($n=31$) und SCLC ($n=5$): Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-W-Test

		NSCLC		SCLC	
		Serum	BL	Serum	BL
N	Gültig	31	31	5	5
	Fehlend	41	41	67	67
Minimum [GAPDH-Kopien/ml]		160	0	20	1900
Maximum [GAPDH-Kopien/ml]		11400	703000	9600	238000
Perzentile [GAPDH-Kopien/ml]	25	1100	3400	710	2050
	50	2300	22700	2500	6700
	75	5100	87000	6150	135650
Z		-4,194		-1,214	
p: asymptotische Signifikanz (2-seitig)		0,000		0,225	

Tabelle 3-12 Deskriptive Statistik und statistische Auswertung (Wilcoxon-Test) der Quantifizierungsergebnisse von Tumorpatienten der Gruppe B mit NSCLC (n=31) und SCLC (n=5). Vergleich Serum-BL NSCLC- bzw. SCLC-Patienten

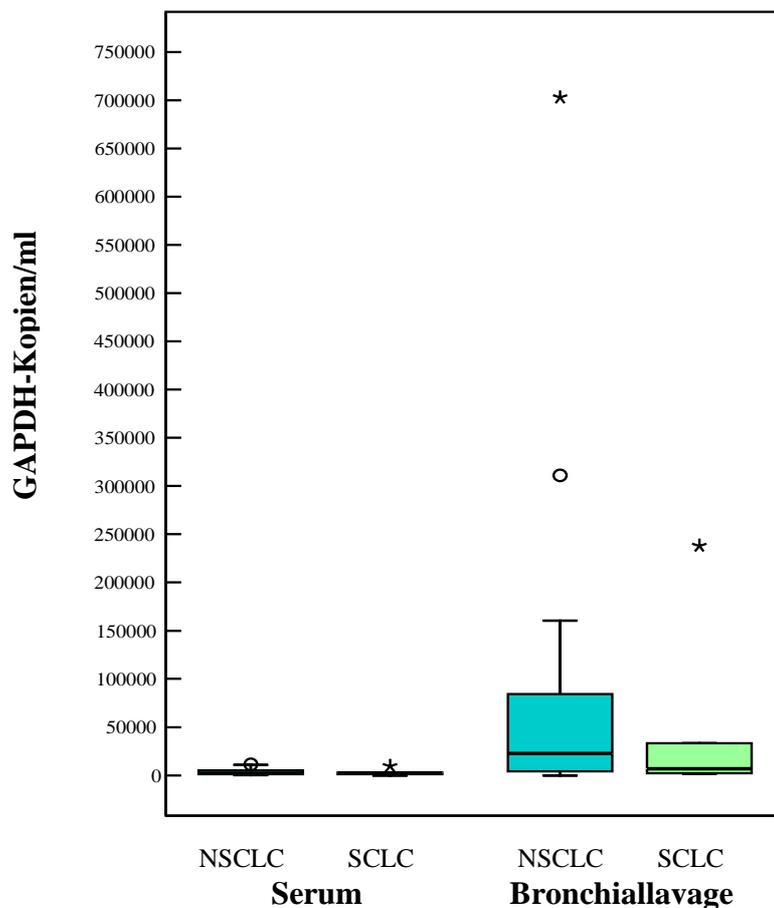


Abb. 3-7 Boxplot-Darstellung: Ergebnisse der absoluten Quantifizierung von GAPDH in Serum und BL von 36 Tumorpatienten (Gruppe B) - Unterscheidung nach histologischem Tumortyp (31 NSCLC, 5 SCLC) („*“, „○“ = Ausreißer)

3.2.2 Relative Quantifizierung tumorassoziierter mRNA

Die Gene hnRNP-B1, MAGE-2 und hTR wurden für die relative Quantifizierung ausgewählt, weil sie mittels qualitativer PCR im Material eines hohen Prozentsatzes der untersuchten Patienten nachgewiesen wurden. Bei der Etablierung der Reaktionsbedingungen wurde die Amplifikation von Splicingvarianten durch Auftragen der PCR-Produkte auf Agarosegele ausgeschlossen. Neben RNA aus Serum und BL wurden von einigen Patienten BL-Zellen und - bei Tumorpatienten - Tumorgewebe untersucht. Aufgrund von Materialmangel war die Anzahl der Patienten bei diesen Untersuchungen geringer als bei der Quantifizierung von GAPDH.

3.2.2.1 hnRNP-B1

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung hnRNP-1-spezifischer mRNA sind in den Tabellen 3-13, 3-15, 3-16 sowie in Abbildung 3-8 beschrieben.

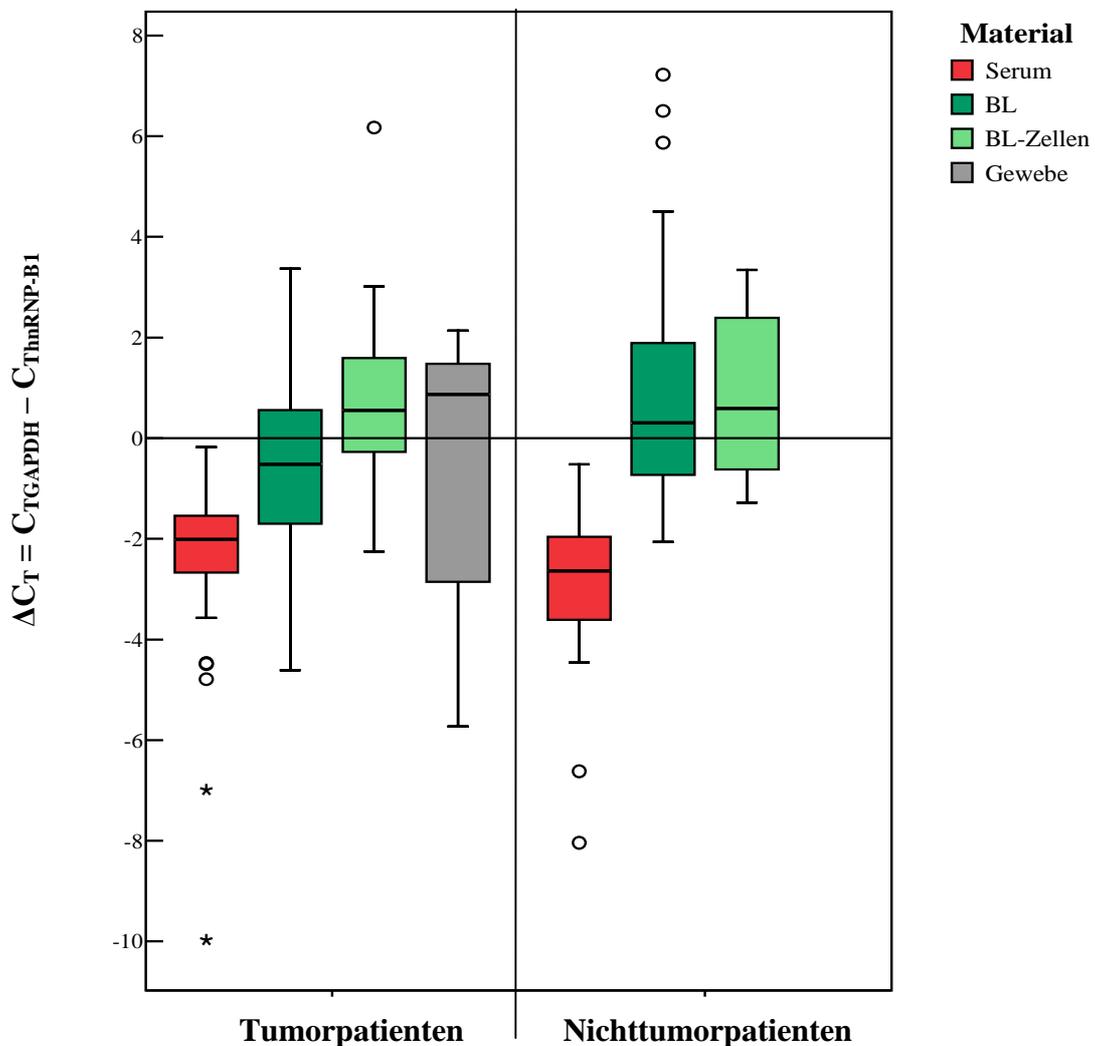


Abb. 3-8 Boxplot-Darstellung: Ergebnisse der relativen Quantifizierung von hnRNP-B1-spezifischer mRNA in Serum, BL, BL-Zellen und Tumorgewebe („*“, „O“ = Ausreißer)

		Tumorpatienten				Nichttumorpatienten		
		Serum	BL	BL-Zellen	Gewebe	Serum	BL	BL-Zellen
N	Gültig	36	34	17	7	33	30	10
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0
Minimum		-9,97	-4,61	-2,25	-5,73	-8,04	-2,06	-1,28
Maximum		-0,18	3,37	6,17	2,14	-0,52	7,22	3,34
Perzentile	25	-2,6750	-1,7075	-0,2750	-2,9900	-3,6150	-0,8000	-0,7400
	50	-2,0150	-0,5200	0,5500	0,8700	-2,6400	0,3050	0,5900
	75	-1,5250	0,5650	1,7000	1,7600	-1,9450	2,0675	2,4475

Tabelle 3-13 Deskriptive Statistik für die relative Quantifizierung von hnRNP-B1

Nach statistischer Auswertung fand sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0.011$) der ΔC_T -Werte in der BL von Tumor- und Nichttumorpatienten. Zwischen Serum bzw. BL-Zellen von Tumor- und Nichttumorpatienten war kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) festzustellen (↗ Tabelle 3-14).

	Serum	BL	BL-Zellen
Mann-Whitney-U	440,500	322,000	82,000
Wilcoxon-W	1001,500	917,000	235,000
Z	-1,844	-2,529	-0,151
p: asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,065	0,011	0,880
p: exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]			0,902

Tabelle 3-14 hnRNP-B1: Mann-Whitney-U und Wilcoxon-W

Pat.- Nr.	Serum				BL				BL-Zellen			Tumorgewebe		
	GAPDH-Quantifizierung		hnRNP-B1		GAPDH-Quantifizierung		hnRNP-B1		GAPDH	hnRNP-B1		GAPDH	hnRNP-B1	
	Ausgangs- volumen [µl]	C _T -Mittelwert	C _T - Mittelwert	ΔC _T = C _{TGAPDH} -C _{T_{hnRNP}}	Ausgangs- volumen [µl]	C _T - Mittelwert	C _T - Mittelwert	ΔC _T = C _{TGAPDH} -C _{T_{hnRNP}}	C _T - Mittelwert	C _T - Mittelwert	ΔC _T = C _{TGAPDH} -C _{T_{hnRNP}}	C _T - Mittelwert	C _T - Mittelwert	ΔC _T = C _{TGAPDH} -C _{T_{hnRNP}}
16	970	38,98	39,46	-0,48	990	30,28								
17	970	32,33	39,32	-6,99	950	29,46	29,51	-0,05	27,41	25,82	1,59			
18	900	30,93	34,29	-3,36	1160	27,99	29,08	-1,09						
19	1140	30,71	33,10	-2,39	970	25,96	28,31	-2,35						
20	1030	31,78	35,09	-3,31	1120	26,10	25,72	0,38	18,41	17,86	0,55			
21	1140	33,30	35,71	-2,41	1010	29,51	28,93	0,58						
22	960	32,65	34,37	-1,72	1020	29,28	28,58	0,70						
23	1020	32,21	32,83	-0,62	930	35,97	32,60	3,37						
24	1090	30,53	33,17	-2,64	1120	26,26	28,75	-2,49						
25	1070	33,26	34,77	-1,51	1060	25,85	26,93	-1,08						
26	1070	34,67	39,46	-4,79	1100	32,84	32,78	0,06						
27	940	32,58	34,24	-1,66	1180	31,61	29,41	2,20						
28	1070	30,63	35,12	-4,49	980	25,70	29,01	-3,31	34,11	32,30	1,81			
29	1080	29,64	33,21	-3,57	830	23,59	26,75	-3,16						
30	950	32,68	35,27	-2,59	950	25,01	26,26	-1,25						
31	1050	30,15	31,96	-1,81	910	27,34	28,41	-1,07						
32	1120	29,39	30,48	-1,09	1070	31,90	32,38	-0,48						
33	1090	29,62	32,27	-2,65	1060	29,96	30,23	-0,27	22,03	23,01	-0,98			
34	1050	32,86	35,12	-2,26	1080	31,18	29,04	2,14	28,20	25,19	3,01			
35	1070	33,32	43,29	-9,97	1100	32,03	31,45	0,58	25,22	24,38	0,84			
36	1120	30,84	33,52	-2,68	1100	31,85	31,13	0,72	28,33					
37	1020	32,56	32,74	-0,18	1100	45	45	0	23,40					
38	1090	31,76	33,20	-1,44	1120	27,83	30,12	-2,29	26,63					
39	1090	35,75	36,04	-0,29	1100	27,61	29,17	-1,56	22,05					
40	1120	35,02	36,38	-1,36	1040	30,60	31,16	-0,56	26,88					
41	1000	30,95	33,10	-2,15	1000	29,53	29,73	-0,20	24,63	26,88	-2,25			
42	1050	29,66	32,32	-2,66	1070	27,77	28,02	0,25	23,41	23,37	0,04			
43	1100	34,03	35,91	-1,88	1060	25,43	27,02	-1,59	25,16	24,19	0,97			
44	1080	29,60	31,19	-1,59	1280	27,36	29,81	-2,45	26,26	26,19	0,07	45	45	0
45	1280	30,38	34,85	-4,47	1280	27,54	26,25	1,29	29,53	28,51	1,02	24,47	23,60	0,87
46	1160	30,21	31,78	-1,57	1280	26,16	25,60	0,56	31,87	32,15	-0,28	24,56	27,55	-2,99
47	1170	31,49	33,26	-1,77	1280	31,74	31,60	0,14	41,84	35,67	6,17	29,08	26,94	2,14
48	1280	29,10	31,34	-2,24	1280	28,07	29,77	-1,70	23,57	23,84	-0,27			
49	1170	32,07	33,37	-1,30	1280	29,47	31,20	-1,73	25,66	25,15	0,51	28,35	26,59	1,76
50	1280	32,65	34,40	-1,75	1280	24,16	28,77	-4,61	25,04	25,67	-0,63	18,30	24,03	-5,73
												15,55	18,27	-2,72
51	1060	31,51	33,33	-1,82	1000	31,93	32,66	-0,73	26,09	23,71	2,38	22,14	20,94	1,20

Tabelle 3-15 Relative Quantifizierung hnRNP-B1: Tumorpatienten

 nicht untersucht

 45 C_T-Wert=45 nicht statistisch auswertbar

Pat.- Nr.	Serum				BL				BL-Zellen		
	GAPDH-Quantifizierung		hnRNP-B1		GAPDH-Quantifizierung		hnRNP-B1		GAPDH	hnRNP-B1	
	Ausgangs- volumen [µl]	C _T -Mittelwert	C _T -Mittelwert	$\Delta C_T =$ C _{TGAPDH} -C _{T_{hnRNP}}	Ausgangs- volumen [µl]	C _T -Mittelwert	C _T -Mittelwert	$\Delta C_T =$ C _{TGAPDH} -C _{T_{hnRNP}}	C _T -Mittelwert	C _T -Mittelwert	$\Delta C_T =$ C _{TGAPDH} -C _{T_{hnRNP}}
52	1230	30,65	34,26	-3,61	1110	26,39					
53	1350	31,95	33,91	-1,96	1040	27,26					
54	1100	31,53	35,99	-4,46	1030	41,66	43,47	-1,81			
55	1010	38,67	39,47	-0,80	1020	29,72	28,65	1,07			
56	1160	33,88	41,92	-8,04	1130	28,36	28,60	-0,24			
57	940	34,24	34,87	-0,63	1000	34,34	34,51	-0,17			
58	1100	33,66	40,28	-6,62	980	34,36	35,40	-1,04			
59	1170	38,30	42,61	-4,31	950	29,15	34,12	6,50			
60	1020	37,38	40,51	-3,13	950	30,83	45	0			
61	830	32,18	33,36	-1,18	1000	24,35	25,98	-1,63			
62	910	35,67	39,12	-3,45	860	28,53	25,93	2,60			
63	840	37,04	40,45	-3,41	1070	24,58	26,31	-1,73			
64	830	31,81	34,40	-2,59	990	32,82	32,66	0,16			
65	870	34,63	37,88	-3,25	900	31,34	29,88	1,46			
66	950	30,18	32,92	-2,74	920	25,32					
67	980	30,17	32,81	-2,64	950	28,46	29,14	-0,68			
68	970	39,06	45	-5,94	880	33,97	33,64	0,33			
69	1150	31,17	35,33	-4,16	980	38,59	34,09	4,50			
70	1140	32,19	34,03	-1,84	1250	34,20	26,98	7,22			
71	1130	31,21	33,57	-2,36	1110	32,18	32,55	-0,37			
72	1150	30,21	32,02	-1,81	1100	29,20	29,87	-0,67	31,37		
73	1050	31,06	31,58	-0,52	1060	35,23	32,59	2,64	19,21		
74	1070	32,25	34,29	-2,04	1100	31,57	29,76	1,81	25,84		
75	1080	31,56	32,67	-1,11	1060	29,11	30,12	-1,01	29,06		
76	1160	32,14	34,21	-2,07	1150	29,92	30,65	-0,73	30,80		
77	1280	31,61	34,65	-3,04	1280	45	45	0	15,47	16,75	-1,28
78	1280	30,50	32,93	-2,43	1280	34,16	32,86	1,30	15,79	16,41	-0,62
79	1280	30,45	34,01	-3,56	1140	27,53	27,25	0,28	24,70	22,31	2,39
80	850	33,45	37,90	-4,45	1070	30,49	29,19	1,30	23,79	23,50	0,29
81	1200	32,53	36,37	-3,84	1280	45	39,13	5,87	21,28	22,38	-1,10
82	1280	35,10	37,13	-2,03	1280	31,38	32,92	-1,54	27,75	27,27	0,48
83	1170	31,69	34,32	-2,63	990	36,71	32,95	3,76	29,37	27,49	1,88
84	1060	31,90	35,52	-3,62	1020	27,79	26,63	1,16	34,01	30,67	3,34
85	1130	32,21	34,14	-1,93	1280	26,27	28,33	-2,06	24,42	23,72	0,70
86	1200	38,58	45	-6,42	970	32,49	30,60	1,89	35,44	32,82	2,62

Tabelle 3-16 Relative Quantifizierung hnRNP-B1: Nichttumorpatienten

 nicht untersucht

 45 C_T-Wert=45 nicht statistisch auswertbar

3.2.2.2 MAGE-2

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung MAGE-2-spezifischer mRNA sind in den Tabellen 3-17, 3-19, 3-20 sowie in Abbildung 3-9 dargestellt. Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0.035$) zwischen den $BL-\Delta C_T$ -Werten von Tumor- und Nichttumorpatienten. Die ΔC_T -Werte der Tumorpatienten waren signifikant niedriger als die der Nichttumorpatienten. Es gab keinen signifikanten Unterschied bei Serum bzw. BL-Zellen ($p > 0.05$) (\nearrow Tabelle 3-18).

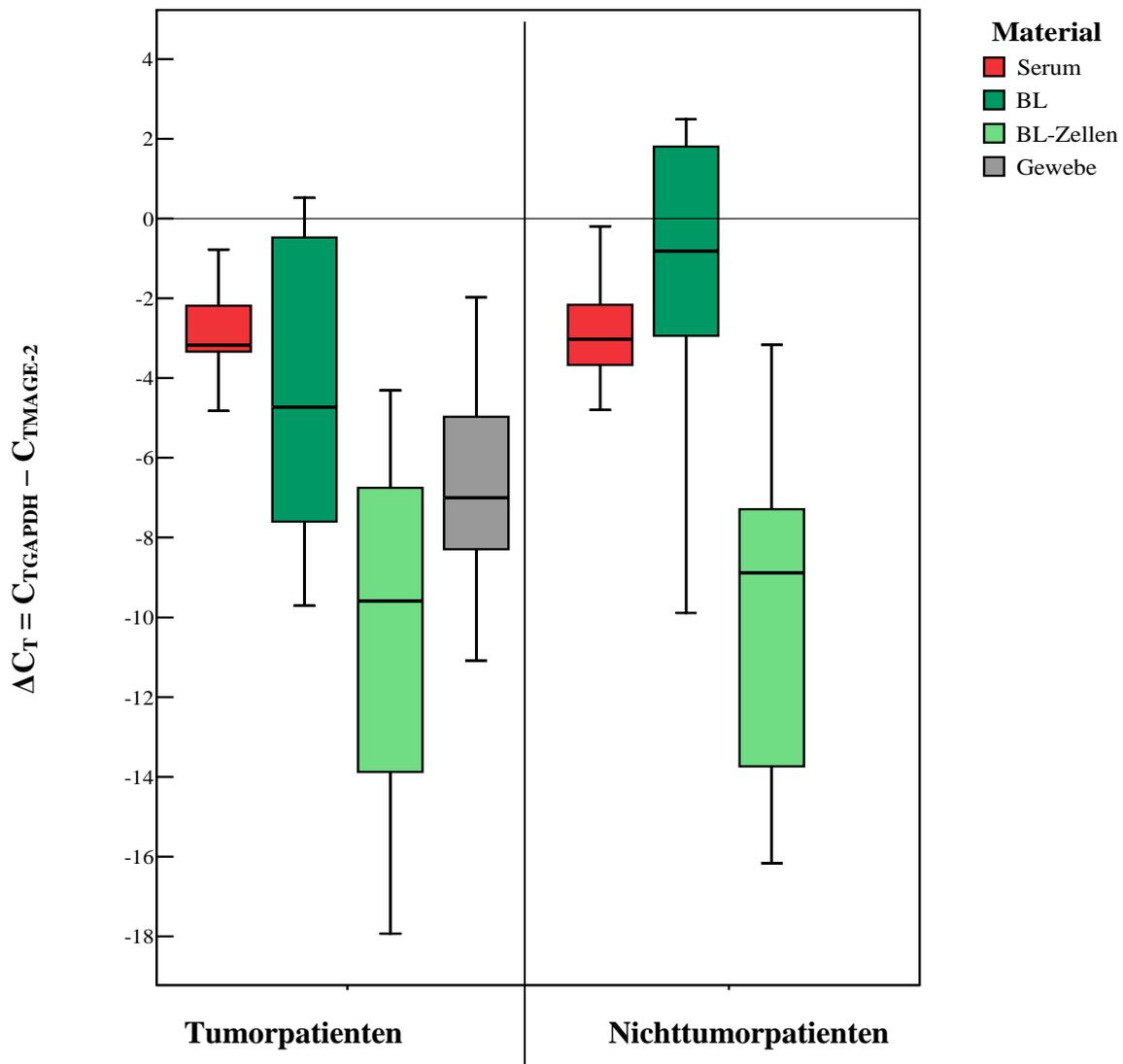


Abb. 3-9 Boxplot-Darstellung: Ergebnisse der relativen Quantifizierung von MAGE-2-spezifischer mRNA in Serum, BL, BL-Zellen und Tumorgewebe

		Tumorpatienten				Nichttumorpatienten		
		Serum	BL	BL-Zellen	Gewebe	Serum	BL	BL-Zellen
N	Gültig	14	10	8	7	9	18	7
	Fehlend	0	4	6	7	9	0	11
Minimum		-4,82	-9,71	-17,93	-11,08	-4,80	-9,89	-16,16
Maximum		-0,78	0,52	-4,31	-1,98	-0,20	2,49	-3,17
Perzentile	25	-3,4275	-7,6350	-13,9400	-8,8000	-3,9650	-3,3925	-14,5400
	50	-3,1750	-4,7300	-9,5900	-7,0000	-3,0300	-0,8200	-8,8800
	75	-2,1700	-0,3175	-6,2700	-4,7500	-1,7350	1,8450	-6,8400

Tabelle 3-17 Deskriptive Statistik für die relative Quantifizierung von MAGE-2

	Serum	BL	BL-Zellen
Mann-Whitney-U	63,000	46,000	28,000
Wilcoxon-W	108,000	101,000	56,000
Z	0,000	-2,110	0,000
p: asymptotische Signifikanz (2-seitig)	1,000	0,035	1,000
p: exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	1,000	0,035	1,000

Tabelle 3-18 MAGE-2: Mann-Whitney-U und Wilcoxon-W

Pat.- Nr.	Serum				BL				BL-Zellen			Tumorgewebe		
	GAPDH-Quantifizierung		MAGE-2		GAPDH-Quantifizierung		MAGE-2		GAPDH	MAGE-2		GAPDH	MAGE-2	
	Ausgangs- volumen [µl]	C _T - Mittelwert	C _T - Mittelwert	ΔC _T = C _T GAPDH-C _T MAGE-2	Ausgangs- volumen [µl]	C _T - Mittelwert	C _T - Mittelwert	ΔC _T = C _T GAPDH-C _T MAGE-2	C _T - Mittelwert	C _T - Mittelwert	ΔC _T = C _T GAPDH-C _T MAGE-2	C _T - Mittelwert	C _T - Mittelwert	ΔC _T = C _T GAPDH-C _T MAGE-2
16	970	38,98			990	30,28								
17	970	32,33			950	29,46			27,41	41,41	-14,00			
18	900	30,93			1160	27,99								
19	1140	30,71			970	25,96								
20	1030	31,78			1120	26,10			18,41	24,20	-5,79			
21	1140	33,30			1010	29,51								
22	960	32,65			1020	29,28								
23	1020	32,21			930	35,97								
24	1090	30,53			1120	26,26								
25	1070	33,26			1060	25,85								
26	1070	34,67			1100	32,84								
27	940	32,58			1180	31,61								
28	1070	30,63			980	25,70			34,11	41,82	-7,71			
29	1080	29,64			830	23,59								
30	950	32,68			950	25,01								
31	1050	30,15	33,42	-3,27	910	27,34	45	-17,66						
32	1120	29,39	31,50	-2,11	1070	31,90	41,61	-9,71						
33	1090	29,62	32,89	-3,27	1060	29,96	31,32	-1,36	22,03	33,03	-11,00			
34	1050	32,86	34,42	-1,56	1080	31,18	31,01	0,17	28,20	45	-16,80			
35	1070	33,32	45	-11,68	1100	32,03	45	-12,97	25,22	45	-19,78			
36	1120	30,84			1100	31,85			28,33					
37	1020	32,56			1100	45			23,40					
38	1090	31,76			1120	27,83			26,63					
39	1090	35,75			1100	27,61			22,05					
40	1120	35,02			1040	30,60			26,88					
41	1000	30,95	34,64	-3,69	1000	29,53	45	-15,47	24,63	38,39	-13,76			
42	1050	29,66	34,48	-4,82	1070	27,77	35,51	-7,74	23,41	45	-21,59			
43	1100	34,03	34,81	-0,78	1060	25,43	25,91	-0,48	25,16	45	-19,84			
44	1080	29,60	31,79	-2,19	1280	27,36	33,02	-5,66	26,26	30,57	-4,31	45	45	0
45	1280	30,38	45	-14,62	1280	27,54	27,02	0,52	29,53	45	-15,47	24,47	32,25	-7,78
46	1160	30,21	32,60	-2,39	1280	26,16	29,96	-3,80	31,87	45	-13,13	24,56	29,31	-4,75
47	1170	31,49	34,75	-3,26	1280	31,74	45	-13,26	41,84	45	-3,16	29,08	34,28	-5,20
48	1280	29,10	32,19	-3,09	1280	28,07	45	-16,93	23,57	45	-21,43			
49	1170	32,07	34,69	-2,62	1280	29,47	35,24	-5,77	25,66	43,59	-17,93	28,35	30,33	-1,98
50	1280	32,65	35,99	-3,34	1280	24,16	31,76	-7,60	25,04	33,22	-8,18	18,30	27,10	-8,80
51	1060	31,51	36,10	-4,59	1000	31,93	45	-13,07	26,09	44,43	-18,34	22,14	29,14	-7,00

Tabelle 3-19 Relative Quantifizierung MAGE-2: Tumorpatienten

 nicht untersucht  45 C_T-Wert=45 nicht statistisch auswertbar

Pat.- Nr.	Serum				BL				BL-Zellen		
	GAPDH-Quantifizierung		MAGE-2		GAPDH-Quantifizierung		MAGE-2		GAPDH	MAGE-2	
	Ausgangs- volumen [µl]	C _T -Mittelwert	C _T -Mittelwert	$\Delta C_T =$ C _{TGAPDH} -C _{TMAGE-2}	Ausgangs- volumen [µl]	C _T -Mittelwert	C _T -Mittelwert	$\Delta C_T =$ C _{TGAPDH} -C _{TMAGE-2}	C _T -Mittelwert	C _T -Mittelwert	$\Delta C_T =$ C _{TGAPDH} -C _{TMAGE-2}
52	1230	30,65	45	-14,35	1110	26,39					
53	1350	31,95	45	-13,05	1040	27,26					
54	1100	31,53	35,08	-3,55	1030	41,66	45	-3,34			
55	1010	38,67	45	-6,33	1020	29,72	35,17	-5,45			
56	1160	33,88	45	-11,12	1130	28,36	26,06	2,30			
57	940	34,24	45	-10,76	1000	34,34	45	-10,66			
58	1100	33,66	45	-11,34	980	34,36	35,21	-0,85			
59	1170	38,30	45	-6,70	950	29,15	41,91	-1,29			
60	1020	37,38	42,18	-4,80	950	30,83	42,51	2,49			
61	830	32,18	44,69	-12,51	1000	24,35	22,37	1,98			
62	910	35,67	35,87	-0,20	860	28,53	26,22	2,31			
63	840	37,04	45	-7,96	1070	24,58	23,11	1,47			
64	830	31,81	34,58	-2,77	990	32,82	34,33	-1,51			
65	870	34,63	45	-10,37	900	31,34	45	-13,66			
66	950	30,18	33,21	-3,03	920	25,32					
67	980	30,17	34,43	-4,26	950	28,46	29,25	-0,79			
68	970	39,06	45	-5,94	880	33,97	43,86	-9,89			
69	1150	31,17	45	-13,83	980	38,59	43,34	-4,75			
70	1140	32,19	45	-12,81	1250	34,20	45	-10,80			
71	1130	31,21	45	-13,79	1110	32,18	45	-12,82			
72	1150	30,21			1100	29,20			31,37		
73	1050	31,06			1060	35,23			19,21		
74	1070	32,25			1100	31,57			25,84		
75	1080	31,56			1060	29,11			29,06		
76	1160	32,14			1150	29,92			30,80		
77	1280	31,61	35,28	-3,67	1280	45	45	0	15,47	31,63	-16,16
78	1280	30,50	45	-14,50	1280	34,16	45	-10,84	15,79	28,73	-12,94
79	1280	30,45	45	-14,55	1140	27,53	32,91	-5,38	24,70	33,58	-8,88
80	850	33,45	45	-11,55	1070	30,49	45	-14,51	23,79	45	-21,21
81	1200	32,53	45	-12,47	1280	45	45	0	21,28	35,82	-14,54
82	1280	35,10	45	-9,90	1280	31,38	33,32	-1,94	27,75	45	-17,25
83	1170	31,69	33,85	-2,16	990	36,71	35,86	0,85	29,37	36,21	-6,84
84	1060	31,90	45	-13,10	1020	27,79	25,99	1,80	34,01	37,18	-3,17
85	1130	32,21	33,52	-1,31	1280	26,27	29,21	-2,94	24,42	32,16	-7,74
86	1200	38,58	45	-6,42	970	32,49	31,17	1,32	35,44	45	-9,56

Tabelle 3-20 Relative Quantifizierung MAGE-2: Nichttumorpatienten

nicht untersucht

45 C_T-Wert=45 nicht statistisch auswertbar

3.2.2.3 hTR

Aufgrund der wenigen verwendbaren Werte (↗ Tabelle 3-21) konnten die Ergebnisse der Untersuchungen mit hTR-spezifischer RNA nicht statistisch ausgewertet werden.

	Serum		BL		BL-Zellen		Gewebe	
	Untersucht	Gültig	Untersucht	Gültig	Untersucht	Gültig	Untersucht	Gültig
Tumorpatienten	11	0	11	3	17	0	8	5
Nichttumorpatienten	10	1	10	1	10	0	-	-

Tab. 3-21 Gültige Fälle der Untersuchungen mit hTR-spezifischer mRNA

3.3 Methodenvergleich

Die mRNA-Isolation erfolgte zunächst mit heißem wassergesättigten Phenol. Mit dieser Methode konnte amplifizierbare mRNA aus Serum und BL von 15 Tumorpatienten - hier als Gruppe A bezeichnet - isoliert werden. Eine zuverlässige RNA-Isolation aus BL von Nichttumorpatienten konnte mit dieser Methode nicht etabliert werden. Aus diesem Grund wurde für nachfolgende Isolationen das QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit (QIAGEN) mit leicht modifiziertem Protokoll etabliert. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse im Hinblick auf die verwendete Methode der RNA-Isolation gegenübergestellt.

3.3.1 Qualitative PCR

Die mRNA-Isolation aus der BL von zwölf Nichttumorpatienten erfolgte sowohl mit heißem Phenol als auch mit dem QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit (QIAGEN). Danach wurde die Expression tumorassoziierter Gene mittels qualitativer PCR untersucht (↗ Abb. 3-10). Deutliche Unterschiede zeigen sich in der nachgewiesenen Expression von MAGE-2 und hnRNP-A2: MAGE-2 wurde in 100 % der mit dem QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit isolierten mRNA und in 50 % der phenolisolierten Proben detektiert. Eine Expression von hnRNP-A2 wurde in 10/12 (83%) der QIAGENisolierten und in 4/12 (33%) der phenolisolierten mRNA nachgewiesen.

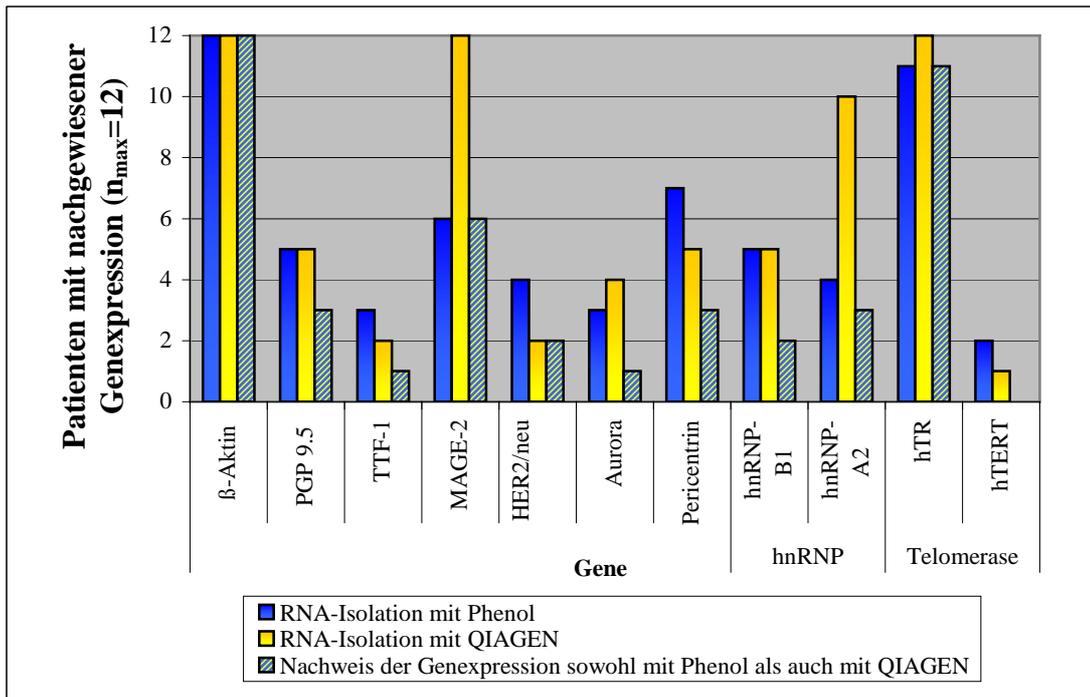


Abb. 3-10 Genexpression in mit zwei Methoden isolierter mRNA aus der BL von zwölf Nichttumorpatienten

3.3.2 Absolute GAPDH-mRNA-Quantifizierung bei Tumorpatienten der Gruppen A und B

Die Auswertung der Quantifizierungsergebnisse der Tumorpatienten der Gruppen A (mRNA-Isolation mit heißem Phenol) und B (QIAGEN) mittels nichtparametrischer Testverfahren ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Serum der Gruppen A und B ($p = 0.027$) sowie zwischen BL der Gruppen A und B ($p = 0.000$). Dabei wies das Material von Gruppe B jeweils eine höhere Anzahl GAPDH-Kopien pro Milliliter auf (↗ Abb. 3-11, Tabellen 3-22 und 3-23).

		Gruppe A		Gruppe B	
		Serum	BL	Serum	BL
N	Gültig	14	14	36	36
	Fehlend	86	86	64	64
Minimum [GAPDH-Kopien/ml]		0	0	20	0
Maximum [GAPDH-Kopien/ml]		15400	216000	11400	703000
Perzentile [GAPDH-Kopien/ml]	25	128,75	0,00	1100,00	2575,00
	50	590,00	385,00	2350,00	17850,00
	75	3125,00	1525,00	5050,00	85675,00

Tabelle 3-22 Deskriptive Statistik der Quantifizierungsergebnisse von Tumorpatienten der Gruppen A und B

	GAPDH/Kopien ml	
	Serum	BL
Mann-Whitney-U	150,000	69,000
Wilcoxon-W	255,000	174,000
Z	-2,204	-3,957
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,027	0,000

Tabelle 3-23 Vergleich der Quantifizierungsergebnisse von Tumorpatienten der Gruppen A und B mittels Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-W-Test.

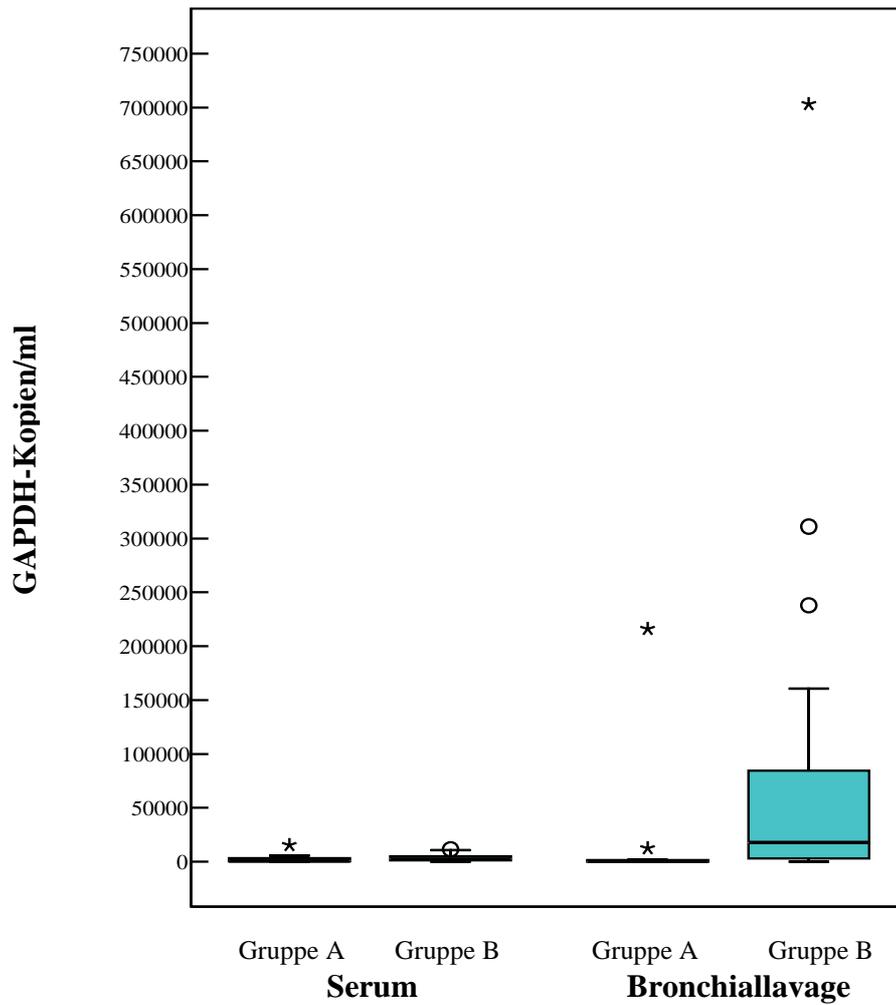


Abb. 3-11 Boxplot-Darstellung - Vergleich der Isolationsmethoden: Quantifizierung von GAPDH-mRNA in Serum und BL von 14 Tumorpatienten der Gruppe A (mRNA-Isolation mit heißem Phenol) und 36 Tumorpatienten der Gruppe B (QIAGEN) („*“, „O“ = Ausreißer)

4 Diskussion

In den letzten Jahren hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Lungenkarzinomen nicht wesentlich erhöht. Dies lässt sich u. a. mit dem häufig späten Zeitpunkt der Diagnose begründen (Ries et al. 2007). Entscheidend für eine höhere Überlebensrate ist eine möglichst frühzeitige Diagnose. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Eignung zellfreier Bronchiallavage (BL) und Serum als Untersuchungsmaterial zur Diagnose von Lungenkarzinomen.

4.1 Nachweis tumorassoziierter mRNA in zellfreier BL, Serum und BL-Zellen

Bisher existieren keine Untersuchungen zur Expression tumorspezifischer mRNA in zellfreiem Überstand der BL. Kopreski et al. untersuchten erstmals zellfreie tumorspezifische mRNA im Serum und detektierten extrazelluläre Tyrosinase-mRNA in 4/6 (67%) Seren von Melanompatienten, nicht aber im Serum gesunder Kontrollpatienten (Kopreski et al. 1999). Die erste Arbeit zur Expression tumorspezifischer extrazellulärer mRNA bei Lungenkarzinomen stammt ebenfalls von Kopreski et al. Hier wurde die Expression von 5T4, einem trophoblastischen, in epithelialen Malignitäten überexprimierten Glykoprotein, im Serum untersucht und bei 6/14 (43%) Tumorpatienten und 3/25 gesunden Probanden nachgewiesen (Kopreski et al. 2001, ↗ Tab. 1-5). Fleischhacker et al. untersuchten die mRNA-Expression im Serum von 18 Patienten mit Lungenkarzinom. Die Amplifikationskontrolle mit β -Aktin war bei 18/18 Patienten positiv. HER2/neu-spezifische mRNA wurde in 8/18 (44 %), hnRNP-B1-spezifische mRNA in 14/18 (78%) der Patienten detektiert. Bei einem Patienten wurde die Expression von PGP 9.5 nachgewiesen. Eine Expression von MAGE-2 und TTF-1 war nicht nachweisbar. Die Kombination von hnRNP-B1 und HER2/neu ermöglichte die Detektion tumorspezifischer mRNA in allen 18 Lungenkarzinomen (Fleischhacker et al. 2001, ↗ Tabellen 1-4, 1-5).

HER2/neu

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Expression von HER2/neu bei den Tumorpatienten, deren RNA mit heißem Phenol isoliert wurde (Gruppe A), weder in Serum- noch in BL nachgewiesen werden (↗ Tabelle 3-2). Bei Tumorpatienten, deren RNA mit dem QIAGEN-Kit isoliert wurde (Gruppe B), wurde eine HER2/neu-Expression in 4/25 (16%) Seren und in 6/25 (24%) BL detektiert (↗ Tabelle 3-3). Von 25 Nichttumorpatienten war HER2/neu in 7/25 (28%) BL nachweisbar, nicht aber in den entsprechenden Seren (↗ Tabelle 3-4). Je 3/5 (60%) BL-Zellen von Tumor- und Nichttumorpatienten wiesen eine HER2-Expression auf. Eine Unterscheidung zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten war mit diesen Ergebnissen nicht möglich.

Von als Positivkontrollen verwendeten Zelllinien wurde eine HER2/neu-Expression u. a. in MCF-7 und SKBR3 detektiert. HER2/neu war bei MCF-7 im Vergleich zu SKBR3 nur sehr gering exprimiert; dies wurde schon von Faltus et al. festgestellt. Versuche zur Apoptoseinduktion mit HER2-neu-mRNA-komplementärer siRNA bei diesen beiden Mammakarzinom-Zelllinien zeigten für SKBR3-Zellen eine höhere Apoptoserate als für MCF-7-Zellen (Faltus et al. 2004).

Die Detektion von HER2/neu-spezifischer mRNA in BL und BL-Zellen von Nichttumorpatienten lässt sich dadurch erklären, dass in normalen epithelialen adulten und fetalen Geweben - auch des Respirationstraktes - eine niedrige HER2/neu-mRNA-Expression detektierbar ist. Dies wurde mit den Funktionen von HER2 bei Zellwachstum und Zelldifferenzierung in normalen Zellen begründet. Press et al. zeigten mittels Northern-Blot-Verfahren, dass in fetalen Geweben die HER2/neu-mRNA-Expression höher ist als in den entsprechenden normalen adulten Geweben. In den normalen adulten Geweben entsprach die HER2/neu-mRNA-Expression etwa der von Mammakarzinomgewebe ohne HER2/neu-mRNA-Überexpression (Press et al. 1990).

Eine Differenzierung zwischen Tumorgewebe und normalem Lungengewebe wurde von zwei Arbeitsgruppen mittels Quantifizierung von HER2/neu-mRNA beschrieben: Das Tumorgewebe von 54/115 (47%) NSCLC-Patienten wies in der Real-Time RT-PCR eine höhere HER2/neu-mRNA-Expression auf als die 22 untersuchten nichtneoplastischen Lungengewebeproben (Pellegrini et al. 2003). Brabender et al. quantifizierten HER2/neu-mRNA in Tumorgewebe von NSCLC-Patienten und fanden bei hoher Expression eine geringere Überlebensrate (Brabender et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Quantifizierung von HER2-mRNA in zellfreiem Serum und BL verzichtet, da HER2/neu-mRNA nur in einigen Patientenproben qualitativ detektierbar war.

Untersuchungen der HER2-mRNA-Expression in Zelllinien ergaben eine relativ geringere mRNA-Expression in SCLC-Zellen als in NSCLC-Zellen (Schneider et al. 1989). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der geringen Patientenzahl nicht hinsichtlich der Tumorhistologie ausgewertet.

In der Untersuchung von Fleischhacker et al. wurde in 8/18 (44%) zellfreien Seren von Patienten mit Lungenkarzinom HER2/neu-spezifische mRNA detektiert, wobei die Reaktionsbedingungen hinsichtlich Primer, Produktgröße und Annealingtemperatur mit den in der Arbeit angewandten identisch waren. Die RNA wurde mit heißem Phenol isoliert (Fleischhacker et al. 2001). Die mit der gleichen Isolationsmethode behandelten Proben der vorliegenden Arbeit wiesen keine detektierbare HER2/neu-Expression auf, der Anteil der HER2/neu-exprimierenden Proben in den mit dem QIAGEN-Kit isolierten Materialien war niedriger als in Fleischhackers Arbeit. Weitere Veröffentlichungen zur HER2/neu-Expression in zellfreien Materialien existieren nicht.

hnRNP-B1

In der vorliegenden Arbeit wurde hnRNP-B1 in 3/15 (20%) der BL von Tumorpatienten detektiert, deren RNA mit heißem Phenol isoliert wurde (Gruppe A), aber in keinem der Seren. Im Serum wurde hnRNP-B1 bei je 11/25 (44%) Tumor- (Gruppe B) und Nichttumorpatienten, in der BL von 18/25 (72%) Tumor- und 11/25 (44%) Nichttumorpatienten detektiert, deren RNA mit dem QIAGEN-Kit isoliert wurde. In BL-Zellen wurde hnRNP-B1 bei 4/5 Tumor- bzw. 5/5 Nichttumorpatienten nachgewiesen. Neben den Expressionsunterschieden in der BL von Tumor- und Nichttumorpatienten fällt auch der Unterschied zwischen den Tumorpatienten der Gruppen A und B in der BL mit 20 bzw. 72 % Genexpression auf.

Die relative Quantifizierung hnRNP-B1-spezifischer mRNA ergab einen signifikanten Unterschied in der BL zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten ($p=0,011$), nicht aber in Serum ($p=0,65$) und BL-Zellen ($p=0,880$). Die ΔC_T -Werte der BL-Quantifizierung von Tumorpatienten waren signifikant niedriger als die der Nichttumorpatienten, was einer signifikant höheren hnRNP-B1-Kopienanzahl in der BL von Tumorpatienten entspricht.

Eine hnRNP-B1-Expression wurde in dieser Arbeit in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen (↗ Tabelle 3-1). Für H441 zeigten bereits Pino et al. eine hnRNP-B1-Expression (Pino et al. 2003).

Eine frühzeitige mRNA-Überexpression von hnRNP-B1 wurde für Lungenkarzinome von Sueoka et al. beschrieben. Die Gruppe zeigte eine hnRNP-B1-Überexpression in Tumorgewebe im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe von sechs Patienten mit Lungenkarzinom (Sueoka et al. 1999). Eine weitere Arbeit untersuchte Vollblut von NSCLC- und gesunden Kontrollpatienten. hnRNP-B1-mRNA erwies sich mit einer Sensitivität von 17,4% und einer Spezifität von 93 % als nicht geeignet als diagnostischer Marker (Sheu et al. 2006).

Es existieren zwei Veröffentlichungen, welche die Expression zellfreier mRNA bei Patienten mit Lungenkarzinomen untersuchen: Die Gruppe von Fleischhacker wies im Serum von 14/18 (78%) Patienten eine Expression hnRNP-B1-spezifischer mRNA nach - also signifikant häufiger als in der vorliegenden Arbeit (Fleischhacker et al. 2001). Die Untersuchung zellfreier hnRNP-B1-mRNA im Plasma von Sueoka et al. mittels quantitativer Real-time PCR detektierte bei Patienten mit Lungenkarzinomen und anderen Karzinomen eine signifikant höhere Expression als bei gesunden Probanden und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen. Aus der hohen Konzentration von hnRNP-B1-mRNA in anderen Karzinomen wurde geschlossen, dass die Untersuchung zellfreier Plasma-mRNA auch für andere maligne Erkrankungen aussagekräftig ist (Sueoka et al. 2005, ↗ Tabellen 1-4, 1-5).

Ein Nebenbefund der Untersuchungen von Fleischhacker et al. war der schwach positive Nachweis von hnRNP-B1-mRNA im zellfreien Serum eines Patienten mit Pneumonie (Fleischhacker et al. 2001, ↗ Tabelle 1-5). Satoh et al. quantifizierten hnRNP-B1-mRNA mit GAPDH als Referenzgen und fanden dabei in humanen Alveolarzellen (HSAE) 87% hnRNP-B1-Expression im Vergleich zur Zervixkarzinomzelllinie HeLa mit 100% und zur Lungenkarzinomzelllinie TKB-13 mit 239% Expression (Satoh et al. 2004, ↗ Tabelle 1-8).

hnRNP-A2

In der vorliegenden Arbeit wurde im Serum von 14/15 (93%) und in BL von 5/15 (33%) der Tumorpatienten, deren RNA mit heißem Phenol isoliert wurde (Gruppe A), hnRNP-A2 detektiert. Auch bei den Patienten, deren RNA mit dem QIAGEN-Kit isoliert wurde, war hnRNP-A2 in Serum und BL von 15/25 (60%) bzw. 17/25 (68%) der Tumorpatienten und 10/25 (40%) bzw. 19/25 (76%) der Nichttumorpatienten nachweisbar. Im Serum findet sich hier ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeit der hnRNP-A2-Detektion zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten. In BL-Zellen von zwei Tumorpatienten wurde ebenfalls eine Expression gezeigt. Für weitere Aussagen der Expression von hnRNP-A2 in Serum und BL sind Quantifizierungen erforderlich: Satoh et al. quantifizierten zelluläre hnRNP-A2-mRNA (Referenzgen GAPDH) und fanden dabei in humanen Alveolarzellen (HSAE) 70,1 % Expression im Vergleich zur Zervixkarzinomzelllinie HeLa mit 100% und der Lungenkarzinomzelllinie TKB-13 mit 200,6 % Expression (Satoh et al. 2004).

MAGE-2

Eine Expression von MAGE-2 wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Tumorpatienten, deren RNA mit heißem Phenol isoliert wurde (Gruppe A), in 10/15 (66,7%) Serum und 5/15 (33,3%) BL detektiert. Bei den Patienten, deren RNA mit dem QIAGEN-Kit isoliert wurde, war MAGE-2-spezifische mRNA im Serum von 22/25 (88%) Tumor- und 17/25 (68%) Nichttumorpatienten, in der BL von 20/25 (80%) Tumor- und 21/25 (84%) der Nichttumorpatienten detektierbar. In BL-Zellen wurde MAGE-2 in je 2/5 (40%) Tumor- bzw. Nichttumorpatienten nachgewiesen. Da eine MAGE-2-Expression mittels qualitativer PCR bei zahlreichen Patienten aller Gruppen nachweisbar, aber dadurch keine Differenzierung zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten möglich war, wurde ein Assay zur relativen Quantifizierung mit Real-Time RT-PCR etabliert. Dabei waren die ΔC_T -Werte der BL-Quantifizierung von Tumorpatienten signifikant niedriger als die der Nichttumorpatienten, was einer höheren MAGE-2-Kopienanzahl in der BL von Tumorpatienten entspricht.

Eine MAGE-2-mRNA-Expression wurde in den Zelllinien CEM, H441, H520 und U373MG detektiert, nicht aber in BV173-Zellkulturüberstand, H 209 und MCF-7. Kufer et al detektierten in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ebenfalls keine MAGE-2-Expression (Kufer et al. 2002). Die MAGE-2-mRNA-Expression bei Patienten mit Lungenkarzinom wurde vielfach untersucht. Dabei handelt es sich mit Ausnahme der Arbeit von Fleischhacker et al. um zelluläre RNA aus Tumorgewebe, Sputum, BAL und Knochenmark (↗ Tabelle 1-9). In der Arbeit von Fleischhacker et al. war in keinem der 18 zellfreien Seren von Patienten mit Lungenkarzinom eine MAGE-2-Expression nachzuweisen (↗ Tabelle 1-5, Fleischhacker et al. 2001), obwohl Primer, Isolations- und Reaktionsbedingungen der vorliegenden Arbeit entsprachen. Weitere Arbeiten zur MAGE-2-Expression in zellfreien Materialien existieren nicht. Die Gruppe von Mecklenburg et al. detektierte MAGE-2 im Sputum 1/15 (6,7%) Patienten und in der BAL von 11/23 (47,8%) Patienten (Mecklenburg et al. 2004). Sechs Studien untersuchten Lungentumorgewebe und detektierten eine mRNA-Expression von MAGE-2 in 27,3 bis 88,5% der Patienten (↗ Tabelle 1-9). Weynants et al. untersuchten Tumor- und normales Lungengewebe von NSCLC-Patienten und detektierten MAGE-2 im Tumorgewebe bei 35% (16/46) der Patienten, nicht aber in normalem Lungengewebe (Weynants et al. 1994). Zwei Arbeiten, welche Knochenmark von Lungenkarzinompatienten verwendeten, detektierten MAGE-2 bei 12% (4/33) bzw. 16% (8/50) Patienten (Kufer et al. 2002, Siel et al. 2007).

Von den ausgewählten Studien zur MAGE-2-Expression in Lungenkarzinomen in verschiedenen Materialien untersuchten 50% (5/10) keine Kontrollpatienten. In vier der fünf Arbeiten mit Nichttumorpatienten wurde keine MAGE-Expression in Kontrollen detektiert (↗ Tabellen 1-5, 1-9). Die Untersuchung von Patienten mit benignen Lungenerkrankungen von Mecklenburg et al. ergab eine MAGE-Expression in der BAL bei einem Patienten mit Aktinomykose (MAGE-2) und einem Patienten mit einer schweren Bronchitis (MAGE-1) (Mecklenburg et al. 2004). Für MAGE-1 ist eine mRNA-Expression in Hautzellen während der Wundheilung festgestellt worden, welche mit einer Genaktivierung während Entzündung und früher Gewebereparation begründet wurde (Becker et al. 1994). Chomez et al. zeigten eine ubiquitäre RNA-Expression in normalen Zellen für einige Angehörige der MAGE-Familie (Chomez et al. 2001). Bis auf die Arbeit von Fleischhacker et al. wurden in den ausgewählten Studien neben MAGE-2 auch andere Mitglieder der MAGE-Familie untersucht (↗ Tabelle 1-9). Es wäre bei weiterführenden Untersuchungen mit zellfreier BL sinnvoll, die Expression mehrerer MAGE-Gene zu untersuchen.

PGP 9.5

Eine Expression von PGP 9.5 wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Tumorpatienten, deren RNA mit heißem Phenol isoliert wurde (Gruppe A), in 2/15 (13%) BL nachgewiesen. In der BL der Patienten, deren RNA mit dem QIAGEN-Kit isoliert wurde, war PGP 9.5-mRNA bei 8/25 (32%) der Tumor- und 7/25 (28%) Nichttumorpatienten detektiert. Weiterhin wurde PGP 9.5 in BL-Zellen bei 17/22 (77%) Tumorpatienten und bei 10/15 (67%) Nichttumorpatienten nachgewiesen. Im Serum wurde PGP 9.5 in keinem Fall detektiert.

Eine PGP-9.5-mRNA-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit u. a. in den Zelllinien H146 und H520 detektiert. Auch Hibi et al. wiesen eine PGP-9.5-mRNA-Expression in diesen beiden nach (Hibi et al. 1999).

Der Expression von PGP-9.5-Protein wird eine entscheidende Rolle in der onkogenen Transformation normaler humaner Lungenepithelzellen zugeschrieben, da 1. PGP 9.5 konservierte Domänen mit anderen Mitgliedern der Ubiquitinhydrolase-Familie teilt, die z. T. als potentielle Onkogene gelten, 2. eine PGP-9.5-Protein-Expression nicht in normalem Lungenepithel, aber z. T. bei neoplastischen Zellen nachzuweisen ist und 3. eine PGP-9.5-Expression mit fortgeschrittenen Stadien von NSCLC assoziiert ist (Hibi et al. 1999). Eine mRNA-Expression von PGP-9.5 wurde von Hibi et al. in 22/23 (96%) Lungenkarzinom-Zelllinien und 10/18 (56%) primären Lungenkarzinomen detektiert, nicht aber in normalem Lungenepithel (Hibi et al. 1998). Mattano et al. nutzten die Expression PGP 9.5-spezifischer mRNA für den Nachweis disseminierter Neuroblastomzellen bei 8/18 (44 %) Patienten in peripherem Blut (Mattano et al. 1992). Die einzige bisherige Arbeit zur Expression von PGP-9.5-spezifischer mRNA in zellfreiem Material stammt von Fleischhacker et al. Es wurde in 1/18 zellfreien Seren von Lungenkarzinompatienten eine PGP-9.5-Expression detektiert (Fleischhacker et al. 2001).

Telomerase: hTR und hTERT

HTR wurde in der vorliegenden Arbeit mit Ausnahme von Serum und BL eines Nichttumorpatienten in allen untersuchten Seren, Bronchiallavagen und BL-Zellen detektiert. HTERT war im Serum eines Nichttumorpatienten, in der BL von 3/25 (12%) Tumor- und 2/25 (8%) Nichttumorpatienten sowie 4/5 (80%) BL-Zellen von Tumorpatienten nachweisbar.

Telomerase wird bereits in präneoplastischen Stadien der Karzinogenese exprimiert. So wurde an Mamma- und Kolonkarzinom eine zunehmende hTERT-mRNA-Expression von Dysplasien über Carcinoma in situ (CIS) und schließlich invasiven Karzinomen gezeigt. Kolquist et al. detektierten eine Expression von hTERT-mRNA in proliferierenden, basalen Epithelbereichen

verschiedener Gewebe, Testiszellen und hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, nicht aber in normalem Gewebe von z. B. Skelettmuskel, Niere, Lunge und Leber (Kolquist et al. 1998). Die Untersuchung der hTERT-mRNA-Expression von normalem Lungengewebe, Gewebe preinvasiver Läsionen und invasiven Lungenkarzinomen mittels in situ Hybridisierung ergab eine ansteigende Expression von normalem über metaplastisches, dysplastisches Gewebe zu CIS und eine wieder geringere Expression bei Karzinomen (Lantuejoul et al. 2005). Shibuya et al. quantifizierten hTERT-mRNA aus Lungengewebe mittels quantitativer Real-time RT-PCR und fanden einen signifikanten Anstieg der hTERT-Kopienanzahl im Verhältnis zur Gesamt-mRNA von normalem Bronchialepithel über metaplastisches und dysplastisches Gewebe zu Tumorgewebe von Plattenepithelkarzinomen (Shibuya et al. 2001).

Arinaga et al. detektierten eine hTERT-mRNA-Expression in 82/92 (89%), hTR in 92/92 (100%) Tumorgewebeproben. Im angrenzenden nichtneoplastischem Lungengewebe wurde eine hTERT-Expression in 1/32 (3%), hTR in 30/32 (94%) Proben gezeigt (Arinaga et al. 2000).

hTR-mRNA wird sowohl in normalen somatischen als auch in Tumorzellen exprimiert. Die mRNA-Konzentration in Tumorzellen ist dabei zwei- bis siebenmal höher als in somatischen Zellen (Feng et al. 1995). Die Gruppe um Novakovic detektierte im zellfreien Plasma gesunder Probanden hTR in 3/7 (43%) der untersuchten Fälle. hTERT konnte nicht nachgewiesen werden (Novakovic et al. 2004).

Mit der Expression extrazellulärer telomerasespezifischer mRNA beschäftigte sich eine größere Anzahl von Arbeiten: Die erste Untersuchung der extrazellulären Telomerase-mRNA-Expression in zellfreiem Serum von Chen et al. detektierte hTR in 5/18 (28%), hTERT in 4/16 (25%) der untersuchten Patienten mit Mammakarzinom. Im Serum von Patienten mit benignen Mammaerkrankungen und gesunden Probanden war dagegen keine mRNA-Expression von hTR und hTERT nachweisbar (Chen et al. 2000). Es finden sich zwei Studien, welche zellfreies Serum bzw. Plasma bei Patienten mit Lungenkarzinom mittels Real-Time RT-PCR untersuchten: Miura et al. verwendeten zellfreies Serum, wobei die Anzahl der hTERT-mRNA-Kopien mit Tumorgröße und -anzahl, Metastasen und Raucherstatus unabhängig korrelierte und nach chirurgischer Behandlung signifikant abnahm (Miura et al. 2006). Pelosi et al. wiesen im Plasma von 4/34 (12%) der Tumorpatienten eine hTERT-mRNA-Expression nach. Bei gesunden Kontrollpatienten war hingegen keine Expression detektierbar (Pelosi et al. 2006).

Die eigenen Ergebnisse der hTERT-mRNA-Expression in Serum und BL unterscheiden sich von den Arbeiten von Chen et al., Miura et al. und Pelosi et al. (Chen et al. 2000, Miura et al. 2006, Pelosi et al. 2006). Die Expression von hTERT in zellfreiem Serum und zellfreier BL erscheint nach diesen Ergebnissen ungeeignet zur Differenzierung von Tumor- und Nichttumorpatienten.

Die fehlende hTERT-Expression in BL-Zellen von Nichttumorpatienten und die Detektion von hTERT in 4/5 (80%) BL-Zellen von Tumorpatienten korreliert mit den Untersuchungen zu zellulärer hTERT-mRNA von Arinaga et al. Die ubiquitäre Detektion in BL-Zellen von Tumor- und Nichttumorpatienten stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen von Arinaga überein (Arinaga et al. 2000). Die eigenen Ergebnisse zur hTR-Expression in zellfreiem Serum und BL unterscheiden sich von den Ergebnissen von Chen et al., welche im Serum von Patienten mit Mammakarzinom lediglich bei 28% eine hTR-Expression und bei gesunden Probanden keine hTR-Expression detektierten (Chen et al. 2000).

TTF-1

Im zellfreien Serum wurde in der vorliegenden Arbeit weder bei Tumor- noch bei Nichttumorpatienten eine TTF-1 Expression nachgewiesen. In den BL-Zellen von zwei Tumorpatienten der Gruppe, deren RNA mit dem QIAGEN-Kit isoliert wurde, wurde TTF-1 spezifische mRNA detektiert. Bei beiden Patienten lag histologisch ein NSCLC vor. Eine Expression in zellfreier BL fand sich bei drei Nichttumorpatienten.

Von den als Positivkontrollen verwendeten Zelllinien war in der vorliegenden Arbeit eine mRNA-Expression von TTF-1 bei A427, H146, H209, H441 und H520 nachweisbar. Die Funktion des TTF-1-Proteins in Lungenepithelzellen wurde von Bohinski et al. in der humanen Adenokarzinomzelllinie H441 untersucht (Bohinski et al 1994).

Fleischhacker et al. verwendeten für ihre Untersuchungen zellfreies Serum von Patienten mit Lungenkarzinom unter Reaktionsbedingungen wie in der vorliegenden Dissertation hinsichtlich Primersequenz, Produktgröße und Annealingtemperatur und konnten in keinem der 18 Seren eine TTF-1 Expression feststellen (Fleischhacker et al. 2001). Somit sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und von Fleischhacker et al. in dieser Hinsicht vergleichbar. Weitere Arbeiten zur Expression von TTF-1-spezifischer mRNA in zellfreien Materialien existieren nicht. Aufgrund der geringen Expression in zellfreien Materialien ist die Eignung von TTF-1 als Markergen für die Untersuchung zellfreier Materialien in Frage zu stellen.

Pericentrin

Von den Tumorpatienten, deren RNA mit heißem Phenol isoliert wurde (Gruppe A), war in der vorliegenden Arbeit Pericentrin in 4/15 (27%) der BL detektierbar, aber in keinem der Seren. In der BL der mit dem QIAGEN-Kit isolierten Proben wurde Pericentrin in beiden Patientengruppen nahezu gleich häufig detektiert: in 12/25 (48%) der Tumor- und 11/25 (44%) der Nichttumorpatienten. Bei der Untersuchung von Serum, BL und BL-Zellen von 22 Tumor- und

15 Nichttumorpatienten wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt: In der BL wurde Pericentrin bei 55% (12/22) der Tumor- und 47% (7/15) der Nichttumorpatienten, in den BL-Zellen von 77% (17/22) der Tumor- und 73% (11/15) der Nichttumorpatienten nachgewiesen. Auffällig war, dass die 4/25 (16%) Tumorpatienten der Gruppe B (RNA-Isolation mit QIAGEN) mit Pericentrin-mRNA-Expression im Serum auch eine Pericentrinexpression in BL und/oder in BL-Zellen aufwiesen. Bisher gibt es keine weiteren Arbeiten zum extrazellulären Vorkommen von Pericentrin-spezifischer mRNA.

Neben et al. untersuchten 2004 die Expression von zellulärer Pericentrin-mRNA in AML-Proben und 2007 in Mantelzellymphomen mittels cDNA-Microarray-Technik und quantitativer Real-Time PCR und fanden in Zellen mit aneuploidem bzw. tetraploidem Chromosomensatz eine höhere Pericentrin-mRNA-Expression als bei diploidem Chromosomensatz (Neben et al. 2004, Neben et al. 2007).

Doxsey et al. quantifizierten die intrazellulären Pericentrin-mRNA-Mengen in verschiedenen Organen gesunder Mäuse. In dieser Untersuchung wiesen Gehirn, Lunge, Muskel und Herz mit einem relativen Wert von n=1 geringe RNA-Mengen auf; erheblich höhere relative RNA-Mengen fanden sich in Milz (n=20), Leber (n=60), Thymus (n=90) und Niere (n=300) (Doxsey et al. 1994).

Anhand der qualitativen extrazellulären Pericentrinexpression der untersuchten Patienten ist keine Differenzierung zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten möglich. Die Untersuchung zellfreier BL auf Pericentrin-spezifische mRNA mittels qualitativer PCR ist nach den vorliegenden Ergebnissen nicht für die frühe Detektion von Lungenkarzinomen geeignet. Es besteht die Möglichkeit, dass sich durch eine geringe transmembranöse Transportrate oder aufgrund einer niedrigen Halbwertszeit dieser mRNA (intra- und extrazellulärer Abbau durch RNasen) trotz einer Überexpression von Pericentrin-mRNA in Tumorzellen von Lungenkarzinomen zu wenig RNA im extrazellulären Raum befindet, um bei den durchgeführten Untersuchungen detektiert zu werden.

Aurora 2

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals Aurora-kodierende mRNA in zellfreiem Untersuchungsmaterial nachgewiesen werden. In Tumorpatienten, deren RNA mit heißem Phenol isoliert wurde, war eine Auroraexpression im Serum eines Patienten nachweisbar. In den Patientengruppen, deren mRNA mit dem QIAGEN-Kit isoliert wurde, konnte Aurora-mRNA im Serum bei 1/24 (4%) Tumor- und 4/24 (16%) Nichttumorpatienten, in der BL von 4/24 (16%) Tumor- und 5/24 (20%) Nichttumorpatienten detektiert werden. In BL-Zellen war Aurora bei

4/22 (18%) Tumor- bzw. 2/15 (13%) Nichttumorpatienten nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten war in keinem der Materialien festzustellen. Ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den nachfolgend besprochenen Arbeiten ist erschwert, da es sich dabei um Untersuchungen zellulärer Aurora-mRNA handelt.

Untersuchungen anderer Gruppen ergaben, dass Aurora-2-spezifische mRNA in schnell proliferierenden Geweben exprimiert wird: In normalem Gewebe wird Aurora-2-mRNA v. a. in fetalem Gewebe (z. B. fetalem Lebergewebe), adultem Testis- und Thymusgewebe exprimiert, in geringem Maß auch in Knochenmark, Lymphknoten- und Milzgewebe. Auch in epithelialen und endothelialen Zellen, u. a. der Lunge, ist eine niedrige Auroraexpression nachzuweisen. In normalem, adultem Gewebe von Kolon, Lunge, Leber, Pankreas und Niere konnte keine Expression nachgewiesen werden. Eine signifikant erhöhte mRNA-Expression wurde für Tumorzelllinien von Lunge (H23), Kolon, Niere, Melanom und Mamma gezeigt. Bei Patienten mit primären Kolonkarzinomen war bei 22/41 (54%) der Patienten in Tumorgewebe eine 4- bis 28-fache mRNA-Überexpression im Vergleich zu normalem Kolongewebe detektierbar (Bischoff et al. 1998). Die Expression von Aurora-2-mRNA ist im Vergleich zu normalen epithelialen Zellen bei dysplastischen Zellen bereits ähnlich hochreguliert wie bei invasiven Karzinomzellen von Patienten mit kolorektalem Karzinom (Gerlach et al. 2006). Bei Patienten mit Magenkarzinom war bei 18/35 (51%) der Fälle eine Überexpression Aurora-2-spezifischer mRNA in Tumorgewebe verglichen mit unveränderter Magenmukosa detektierbar (Sakakura et al. 2001). Eine Aurora-mRNA-Überexpression war bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich signifikant assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und Metastasen in regionalen Lymphknoten und Fernmetastasen (Reiter et al. 2006). Eine Aurora-Überexpression in Tumorgewebe von 137/224 (61%) Patienten mit hepatozellulärem Karzinom korrelierte mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Stadium IIIb-IV); in nichttumorösem Leberparenchym dieser Patienten wurde eine Überexpression in 5% der Proben detektiert (Jeng et al. 2004). Beim Ösophaguskarzinom war eine Aurora-2-Überexpression in 30% (10/33) der Gewebe ebenfalls signifikant assoziiert mit dem Auftreten von Fernmetastasen (Tanaka et al. 2005).

Die Untersuchung der RNA-Expression bei Patienten mit Lungenkarzinom mittels RT-PCR zeigte eine Auroraüberexpression in 25/40 (62,5%) der Tumorgewebeproben und eine signifikant höhere Expression in Tumor- gegenüber normalem Lungengewebe. Xu et al. detektierten Aurora-2-mRNA auf geringem Level auch in normalem Lungengewebe von Patienten mit Lungenkarzinom (Xu et al. 2006).

Eine Quantifizierung Aurora-spezifischer mRNA könnte eine Differenzierung von Tumor- und Nichttumorpatienten ermöglichen: Miyoshi et al. detektierten mittels quantitativer Real-Time RT-PCR in Mammakarzinomgewebe (n=47) eine signifikant höhere Auroraexpression als in normalem Mammagewebe (n=9) (Miyoshi et al. 2001).

4.1.1 Expression tumorassoziierter mRNA bei Nichttumorpatienten

Mit dem von uns verwendeten Genpanel war mittels qualitativer PCR keine Differenzierung zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde tumorassoziierte mRNA auch in der Gruppe der Nichttumorpatienten detektiert. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: 1. Es wurden nur Patienten in die Untersuchung mit einbezogen, bei welchen eine Bronchoskopie indiziert war. Die Gruppe der Tumorpatienten wurde demzufolge nicht mit pulmologisch gesunden Probanden verglichen. Die Nichttumorpatienten hatten zwar keine Karzinome der Lunge oder anderer Organe, aber verschiedene nichtmaligne pulmologische Erkrankungen, z. B. Pneumonie und COPD (↗ Abbildung 1-1). 2. Die Majorität der Nichttumorpatienten rauchte. Diese Gegebenheiten spiegeln die diagnostische Realität wieder, dass Tumorpatienten nicht frühzeitig von Patienten mit anderen pulmologischen Erkrankungen und/oder langjährigen Rauchern zu unterscheiden sind.

In der Literatur finden sich einige Beispiele für eine Expression hier untersuchter sogenannter tumorassoziierter Gene bei gesunden Probanden oder Patienten mit nichtmalignen Lungenerkrankungen. Dabei ist zu bemerken dass zahlreiche Expressionsstudien zu tumorspezifischer mRNA auf Kontrollgruppen und -gewebe verzichten, also die Tumorspezifität dieser Genexpression voraussetzen.

4.1.2 Quantifizierung von hnRNP-B1 und MAGE-2

Die Quantifizierung von hnRNP-B1- und MAGE-2-spezifischer mRNA in der vorliegenden Studie ergab signifikante Unterschiede zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten in der zellfreien BL, nicht aber in zellfreiem Serum und BL-Zellen (Ergebnisse ↗ 3.2.2.1 & 3.2.2.2). Die signifikant niedrigeren ΔC_T -Werte sowohl für hnRNP-B1 als auch für MAGE-2 in BL von Tumorpatienten im Vergleich zu BL Nichttumorpatienten entsprechen einer signifikant höheren hnRNP-B1- bzw. MAGE-2-mRNA-Kopienanzahl in BL von Tumorpatienten im Vergleich zu Nichttumorpatienten. Zellfreie BL erscheint also als Untersuchungsmaterial zur quantitativen Expressionsanalyse tumorspezifischer Gene bei Patienten mit Lungenkarzinom geeignet. Durch die Verwendung von GAPDH als Referenzgen müssen diese Ergebnisse unter Berücksichtigung der vorhandenen, widersprüchlichen Literatur mit Vorsicht gewertet werden. Zudem sollte die

mRNA-Expression von Referenz- und untersuchtem Gen etwa gleich hoch sein. GAPDH ist im Vergleich zu anderen Referenzgenen in vielen Geweben, darunter auch Lungengewebe, sehr hoch exprimiert (Radonić et al. 2004). GAPDH-mRNA ist aufgrund ihrer hohen Expression in zellfreien Materialien für die Quantifizierung der niedrig exprimierten Gene MAGE-2 und hnRNP-B1 nicht optimal.

Eine Lösung des Quantifizierungsproblems könnte die Verwendung mehrerer Housekeeping Gene als Referenz sein: Waxman & Wurmbach schlugen dies nach Expressionsstudien von Lebergewebe und Geweben hepatozellulärer Karzinome vor (Waxman & Wurmbach 2007). Auch Vandesompele et al. kamen nach der Untersuchung von zehn Housekeeping Genen in zahlreichen Geweben, darunter auch Lungengewebe, zu diesem Ergebnis (Vandesompele et al. 2002). Allerdings ist die Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen schwierig, wenn für jede Studie unterschiedliche Referenzgene, verschiedene Gewebe oder Tumorentitäten genutzt werden.

Eine zweite Möglichkeit der mRNA-Quantifizierung besteht darin, auf Referenzgene gänzlich zu verzichten: Sueoka et al. quantifizierten mit einer Plasmid-DNA-Standardkurve hnRNP-B1-spezifische mRNA absolut (Sueoka et al. 2005) und fanden in zellfreiem Plasma von Patienten mit Lungenkarzinom signifikant mehr hnRNP-B1-Kopien als in Plasma von gesunden Probanden. Ein Nachteil dieser Methode ist der erhöhte arbeitstechnische Aufwand, da für jedes Gen eine separate Standardkurve zu erstellen ist.

4.2 Referenzgene für die Quantifizierung tumorassoziierter mRNA

Zur Untersuchung von Veränderungen der Genexpression in malignen Tumorzellen gegenüber normalen Zellen werden Housekeeping Gene als Referenz genutzt. Die Anforderungen an ein ideales Referenzgen für RNA-Transkriptionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR sind: 1. eine konstante Transkription in allen Zelltypen und Geweben, 2. keine Beeinflussung der RNA-Transkription durch interne oder externe Einflüsse und 3. eine dem zu quantifizierenden Gen ähnliche Transkriptionsrate (Radonić et al. 2004). Ein ideales Referenzgen wurde bisher allerdings nicht gefunden (Vandesompele et al. 2002). Ein Referenzgen muss individuell für das zu untersuchende tumorspezifische Gen und das entsprechende Gewebe, Organsystem bzw. Tumor ausgewählt werden. GAPDH und β -Aktin gehören zu den für Quantifizierungen am häufigsten verwendeten Referenzgenen: Eine Arbeit aus dem Jahr 2000 untersuchte 452 Studien hinsichtlich der zur mRNA-Quantifizierung verwendeten Referenzgene und fand bei 33% GAPDH und bei 32% β -Aktin als Referenz (Suzuki et al. 2000).

β-Aktin

In der vorliegenden Arbeit wurde β-Aktin-spezifische mRNA als Amplifikationskontrolle nach mRNA-Isolation und cDNA-Synthese verwendet und erstmals in zellfreier Bronchiallavage detektiert. Bei mitogener Stimulation wurde eine schwankende mRNA-Transkription von β-Aktin gezeigt (Selvey et al. 2001, Radonić et al. 2004, Ruan & Lai 2007). Chang et al. wiesen in vergleichenden Northern-Blot-Analysen in Rattenhepatomen nach Transplantation von Zellen der Rattenhepatom-Zelllinie N1S1 eine vier- bis zehnfach höhere β-Aktin-mRNA-Expression gegenüber normalem Lebergewebe nach, welche mit dem veränderten Zytoskelett von Tumorzellen begründet wurde (Chang et al. 1998).

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Northern-Blot-Untersuchungen adulter und fetaler Gewebe, darunter u. a. Lungengewebe, ergaben in fetalen Geweben eine signifikant höhere relative GAPDH-mRNA-Expression als in adulten Geweben (Rondinelli et al. 1997).

Eine erhöhte GAPDH-mRNA-Transkription wurde für zahlreiche humane und tierische Karzinome und Zelllinien nachgewiesen. In Gewebe von Prostatakarzinomen in fortgeschrittenen Stadien war die relative Expression von GAPDH spezifischer mRNA signifikant höher als in Anfangsstadien oder Gewebe benigner Prostatahyperplasien (Rondinelli et al. 1997, Sharief et al. 1994). An Rattenprostatakarzinom-Zelllinien wurde gezeigt, dass Zelllinien mit hohem Metastasierungspotential eine signifikant höhere relative GAPDH-mRNA-Expression aufweisen als solche mit niedrigem (Epner et al. 1993).

In Rattenhepatomen wurde eine vier- bis neunfach höhere GAPDH-mRNA-Expression gegenüber normalem Lebergewebe detektiert (Chang et al. 1998). Gewebe von Hepatitis-C-Virus-induzierten hepatozellulären Karzinomen (HCC) verschiedener Stadien sowie zirrhotisches und normales Lebergewebe zeigte bei Quantifizierung sowohl mittels RT-PCR eine signifikante Hochregulation von GAPDH-spezifischer mRNA in fortgeschrittenen Stadien des HCC (Waxman & Wurmbach 2007). Northern-Blot-Analysen von HCC-Gewebe, normalem und zirrhotischem Lebergewebe kamen zu dem gleichen Ergebnis (Gong et al. 1996).

Die Quantifizierung zellfreier Plasma-RNA ergab signifikant höhere GAPDH-mRNA-Konzentrationen bei HCC-Patienten als bei gesunden Probanden. Bei HCC-Patienten waren

sowohl die freie als auch die partikelassoziierte GAPDH-mRNA-Konzentration erhöht (Ng et al. 2002).

Expression von GAPDH-mRNA in normalem und malignem Lungengewebe

Bei Radonić et al. ergaben die Untersuchungen für GAPDH die zweithöchste RNA-Transkriptionsrate von 13 potentiellen Referenzgenen in Lungengewebe (Radonić et al. 2004). Eine mRNA-Überexpression von GAPDH in Lungentumorgewebe gegenüber normalem Lungengewebe wurde von Tokunaga et al. mittels Northern Blot nachgewiesen (Tokunaga et al. 1987). Liu et al. untersuchten in normalem Lungengewebe, Gewebe von Lungenkarzinomen (NSCLC) und NSCLC-Zelllinien die mRNA-Expression von sieben potentiellen endogenen Kontrollgenen für die Real-Time PCR, darunter auch GAPDH. Die C_T -Werte von GAPDH zeigten die geringste Varianz der untersuchten Gene bei Gesamtbetrachtung der C_T -Werte von Lungen- und Tumorgewebe. GAPDH wurde für die Untersuchung der Genexpression von Lungengewebe mittels RT-PCR als die geeignetste endogene Kontrolle unter den sieben untersuchten Genen hervorgehoben (Liu et al. 2005).

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben eine signifikant höhere GAPDH-Konzentration in der BL von Tumorpatienten als in der BL von Nichttumorpatienten ($p = 0.026$). Zwischen den Seren von Tumor- und Nichttumorpatienten fand sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0.062$).

4.3 Eignung der einzelnen Gene zur Untersuchung der verschiedenen Materialien nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse

Die Expressionsuntersuchungen der Gene Aurora, HER2/neu, hnRNP-B1, MAGE-2, Pericentrin, PGP9.5, hTERT, hTR und TTF-1 mittels qualitativer PCR in zellfreier BL zeigten, dass eine Differenzierung von Tumor- und Nichttumorpatienten nicht möglich ist. Die Anwendung der quantitativen Real Time RT-PCR für GAPDH, MAGE-2 und hnRNP-B1 ermöglichte in der vorliegenden Arbeit eine Differenzierung der Patientengruppen. Tabelle 4-1 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen unter dem Aspekt der Eignung der einzelnen Gene in Serum, BL und BL-Zellen zusammen.

	Serum	BL	BL-Zellen
β-Aktin	Amplifikationskontrolle	Amplifikationskontrolle	Amplifikationskontrolle
GAPDH	-	+ bei Quantifizierung	-
Aurora	-	-	evtl. + bei Quantifizierung
HER2/neu	-	-	evtl. + bei Quantifizierung
hnRNP-B1	-	+ bei Quantifizierung	-
MAGE-2	- (evtl. andere Mitglieder der MAGE-Familie)	+ bei Quantifizierung (evtl. auch andere Mitglieder der MAGE-Familie für eine verbesserte Aussagekraft)	- (evtl. andere Mitglieder der MAGE-Familie)
Pericentrin	-	evtl. + bei Quantifizierung	evtl. + bei Quantifizierung
PGP 9.5	-	evtl. + bei Quantifizierung	evtl. + bei Quantifizierung
Telomerase	hTR	evtl. + bei Quantifizierung	evtl. + bei Quantifizierung
	hTERT	-	-
TTF-1	-	-	-

Tabelle 4-1 Eignung der einzelnen Gene zur Unterscheidung von Tumor- und Nichttumorpatienten nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse geordnet nach Materialien

„-“...ungeeignet

„+“...geeignet

„evtl. + bei Quantifizierung“...Gene, die hier nur mittels qualitativer PCR untersucht wurden, nach Quantifizierung aber ebenfalls eine Differenzierung von Tumor- und Nichttumorpatienten ermöglichen könnten

4.4 Existenz extrazellulärer mRNA in zellfreier BL trotz RNasen?

Der Nachweis von mRNA in zellfreier BL legt die Vermutung nahe, dass auch hier - ähnlich wie für Serum und Plasma bereits beschrieben - ein Schutz der RNA vor den ubiquitär vorhandenen Ribonukleasen vorliegt. Die aus BL isolierte mRNA wurde nicht dahingehend untersucht, ob auch sie partikelassoziiert ist und dadurch eine andere Stabilität als freie RNA besitzt. Für die Serumribonuklease sind bei Tumorpatienten, u. a. mit Lungenkarzinom, erhöhte Serumkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden beschrieben worden (Reddi & Holland 1976). Im Serum von Patienten mit verschiedenen malignen Tumoren wurde ein RNA-Lipoprotein-Komplex gefunden, der von Tumorzellen sezerniert wurde. Dabei wurde eine Korrelation zwischen Tumormasse und Komplexkonzentration im Serum festgestellt. Der RNA-Komplex war nicht im Serum gesunder Probanden, bei Schwangeren und bei benignen Erkrankungen nachweisbar (Wieczorek et al. 1985, Wieczorek et al. 1987). Hasselmann et al. amplifizierten extrazelluläre Tyrosinase-mRNA, die mit Apoptosekörperchen assoziiert war, noch nach 30 Minuten Inkubationszeit in Serum bei 37°C; nichtassoziierte Tyrosinase-mRNA war hingegen schon nach einer Minute Inkubation nicht mehr detektierbar (Hasselmann et al. 2001). Andere Untersuchungen zeigten, dass zellfreie (endogene) GAPDH-mRNA in Serum und Plasma auch Einfrieren und Auftauen ohne signifikanten Konzentrationsverlust übersteht (Tsui et al. 2002).

Der Mechanismus der RNA-Freisetzung in die BL ist ebenfalls nicht untersucht. In Frage kommen dabei Apoptose, Nekrose oder aktive Transportvorgänge. Beispielsweise wurde die aktive Freisetzung von RNA aus humanen Lymphozyten *in vitro* beschrieben (Stroun et al. 1978).

4.5 Fehlerbetrachtung Methodik

4.5.1 Patientenanzahl

Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation waren als Pilotprojekt angelegt und wurden daher an einer relativ geringen Anzahl von Patienten durchgeführt: 15 Tumorpatienten, deren RNA mit heißem wassergesättigtem Phenol isoliert wurde sowie 36 Tumor- und 35 Nichttumorpatienten, deren RNA mit dem QIAGEN-Kit isoliert wurde. In dieser Arbeit sollte lediglich die Eignung von BL und Serum als Material für derartige Untersuchungen festgestellt werden. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet; bei der Wertung dieser Ergebnisse ist die zugrundeliegende Datenmenge zu beachten.

4.5.2 Materialmangel und mRNA-Isolation

Einen weiteren limitierenden Faktor stellte das zur Verfügung stehende Untersuchungsmaterial dar. Deshalb konnten nicht alle Versuche an jedem Patienten durchgeführt werden. Z. B. genügte das Material der Tumorpatienten der Gruppe A nur für die RNA-Isolation mit heißem wassergesättigtem Phenol sowie für die absolute Quantifizierung mit GAPDH, aber nicht mehr für eine erneute RNA-Isolation mit dem QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit. Das vorhandene Material war z. T. nur für eine RNA-Isolation mit nachfolgender cDNA-Synthese mit 40 µl cDNA ausreichend, was ungefähr 10-12 PCR-Ansätzen entspricht. Dabei waren bei der quantitativen Real-Time PCR allein drei Ansätze pro PCR erforderlich, so dass bei Quantifizierungen neben der GAPDH-Messung maximal drei weitere Gene pro RNA-Isolation untersucht werden konnten.

Zur Isolation zellfreier mRNA aus Serum und BL wurden zwei Verfahren angewendet: 1. die mRNA-Isolation mittels heißem Phenol, 2. die RNA-Isolation mit dem QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit. Die Isolation mit heißem wassergesättigtem Phenol erstreckte sich über zwei Tage und erforderte ein zweimaliges Auftauen der bei -80°C gelagerten Proben während die Proben für die die RNA-Isolation mit dem QIAamp® MinElute™ Virus Vacuum Kit nur einmal aufgetaut wurden. Entscheidende Unterschiede beider Isolationsmethoden sind die zusätzlichen Zentrifugations- und Waschschrte bei der Isolation mit heißem Phenol. Dadurch wird die RNA bei Isolation erheblich mehr beansprucht als bei der Isolation mit dem QIAamp MinElute Virus Vacuum Kit. Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der

angewendeten Isolationsmethoden, finden sich bei der qualitativen PCR deutliche Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit der detektierbaren Genexpression: Pericentrin wurde beispielsweise mittels qualitativer PCR in 4/15 (26,7%) BL von Tumorpatienten der Gruppe A (RNA-Isolation mit heißem Phenol) und 17/36 (47,2%) BL von Tumorpatienten der Gruppe B (RNA-Isolation mit dem QIAamp[®] MinElute[™] Virus Vacuum Kit) detektiert. Weitere Differenzen finden sich bei der Detektion von PGP-9.5-mRNA in 2/15 (13,3%) BL der Gruppe A und 11/36 (30,6%) BL der Gruppe B sowie für die HER2/neu-Expression in 0/15 BL der Gruppe A und 6/25 (24%) BL der Gruppe B. Die absolute Quantifizierung von GAPDH-mRNA mittels Real-Time PCR detektierte sowohl in Serum als auch BL von Tumorpatienten der Gruppe B signifikant mehr GAPDH-Kopien als im Material von Tumorpatienten der Gruppe A (↗ 3.3.2 Absolute GAPDH-mRNA-Quantifizierung bei Tumorpatienten der Gruppen A und B). Ein weiterer, wenn auch nicht quantifizierbarer Hinweis auf das QIAGEN-Kit als RNA-schonenderes Isolationsverfahren ist die Tatsache, dass eine RNA-Isolation aus BL von Nichttumorpatienten mit heißem Phenol nicht zuverlässig gelang. Aus diesem Grund wurde dann das QIAamp MinElute Virus Vacuum Kit etabliert und als die geeignetere Isolationsmethode definiert.

4.5.3 Relative Quantifizierung

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung von MAGE-2 und hnRNP-B1 sind mit Vorsicht zu betrachten (↗ 4.1.2): Zum einen aufgrund der Verwendung von GAPDH als Referenzgen, zum anderen aufgrund des Materialmangels und der für eine statistische Erhebung geringen Patientenzahl. Die absolute Quantifizierung von MAGE-2 und hnRNP-B1 mittels Plasmid-DNA mit einer größeren Patientenzahl wäre weiterführend zur Verifizierung der Ergebnisse sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Bisher existieren keine Arbeiten zur mRNA-Expression in zellfreier Bronchiollavage (BL). Die vorliegende Dissertation umfasst qualitative und quantitative Untersuchungen der mRNA-Expression in zellfreier BL, zellfreiem Serum und BL-Zellen.

Die Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse:

1. Extrazelluläre mRNA lässt sich in zellfreier BL detektieren. Es konnte mit verschiedenen Isolationsmethoden intakte, amplifizierbare mRNA aus zellfreier BL isoliert werden.
2. Die Qualität und Quantität der mRNA aus BL, Serum und BL-Zellen sind ausreichend für weitere Untersuchungen. Neben β -Aktin als Amplifikationskontrolle wurde mittels qualitativer PCR eine mRNA-Expression von HER2/neu, hnRNP-B1, MAGE-2, PGP 9.5, TTF-1, Telomerase (hTR und hTERT), Pericentrin und Aurora 2 in BL, Serum und BL-Zellen von Tumor- und Nichttumorpatienten detektiert. Die Expression einiger Gene wurde vermehrt in jeweils einem der untersuchten Materialien nachgewiesen. Beispielsweise wurde PGP 9.5 nur in der BL und BL-Zellen, aber nicht im Serum detektiert. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten traten bei den Genen hnRNP-B1 und MAGE-2 Splicevarianten auf. Eine Unterscheidung der Tumor- von den Nichttumorpatienten war mit qualitativen Expressionsanalysen nicht möglich.
3. Mit quantitativen Analysen von mRNA aus BL ist eine Unterscheidung zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten möglich. Die absolute Quantifizierung der GAPDH-spezifischen mRNA mittels Real-Time PCR zeigte signifikant höhere GAPDH-Konzentrationen in der BL von Tumorpatienten als in der BL von Nichttumorpatienten. Die relative Quantifizierung der Gene hnRNP-B1 und MAGE-2 mit GAPDH als Referenzgen erbrachte signifikant höhere hnRNP-B1- bzw. MAGE-2-Kopienzahlen in zellfreier BL von Tumorpatienten im Vergleich zu Nichttumorpatienten. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung sind aufgrund der umstrittenen Eignung von GAPDH als Referenzgen und der geringen Patientenzahl kritisch zu betrachten. Die quantitativen Analysen der mRNA aus Serum und BL-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und Nichttumorpatienten.
4. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass zellfreie BL ebenso wie andere zellfreie Materialien, z. B. Serum, für mRNA-Expressionsanalysen geeignet ist.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Artikel

Araújo A, Ribeiro R, Azevedo I, et al.: Genetic polymorphisms of the epidermal growth factor and related receptor in non-small cell lung cancer - a review of the literature. *Oncologist* 2007; 2(2): 201-10.

Arinaga M, Shimizu S, Gotoh K, et al.: Expression of human telomerase subunit genes in primary lung cancer and its clinical significance. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 401-6.

Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, et al.: A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet* 2004; 75(3): 460-74.

Becker JC, Gillitzer R, Bröcker E-B: A member of the melanoma antigen-encoding gene (MAGE) family is expressed in human skin during wound healing. *Int J Cancer* 1994; 58: 346-8.

Benner SA: Extracellular 'communicator RNA'. *FEBS Lett* 1988; 233: 225-8.

Berghmans T, Paesmans M, Mascaux C, et al.: Thyroid transcription factor 1-a new prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol* 2006; 17(11): 1673-6.

Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, et al.: Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6407-11.

Bergsmedh A, Szeles A, Spetz AL, et al.: Loss of the p21(Cip1/Waf1) cyclin kinase inhibitor results in propagation of horizontally transferred DNA. *Cancer Res* 2002; 62(2): 575-9.

Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, et al.: A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO Journal* 1998; 17 (11): 3052-65.

Blackburn P, Wilson G, Moore S: Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and Properties. *J Biol Chem* 1977; 252: 5904-10.

Bohinski RJ, Di Lauro R, Whitsett JA: The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol Cell Biol* 1994; 14(9): 5671-81.

Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, et al.: Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res* 2001; 7(7): 1850-5.

Briassouli P, Chan F, Savage K, et al.: Aurora-A regulation of nuclear factor-kappaB signaling by phosphorylation of I κ B α . *Cancer Res* 2007; 67(4): 1689-95.

Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, et al.: Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2000; 2(3): 197-201.

Bühl A, Zöfel P: SPSS Version 10 - Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. Addison Wesley Verlag 2000.

Calado RT, Chen J: Telomerase: not just for the elongation of telomeres. *Bioessays* 2006; 28(2): 109-12.

Campbell LK, Thomas JR, Lamps LW, et al.: Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is not a specific marker of neural and nerve sheath tumors: an immunohistochemical study of 95 mesenchymal neoplasms. *Mod Pathol* 2003; 16(10): 963-9.

Capkova L, Kalinova M, Krskova L, et al.: Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. *Cancer* 2007; 109(11): 2299-307.

Chang TJ, Juan CC, Yin PH, et al.: Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep* 1998; 5(2): 469-71.

Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, et al.: Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3823-6.

Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.

Chomez P, De Backer O, Bertrand M, et al.: An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 2001; 61(14): 5544-51.

Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, et al.: Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg* 1995; 222: 415-23.

Coussens L, Yang-Feng, TL, Liao YC, et al.: Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-9.

Dasi F, Lledo S, Garcia-Granero E, et al.: Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest* 2001; 81: 767-9.

Dasí F, Martínez-Rodes P, March JA, et al.: Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the plasma of patients with prostate cancer. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1075: 204-10.

Day IN, Thompson RJ: Molecular cloning of cDNA coding for human PGP 9.5 protein. A novel cytoplasmic marker for neurones and neuroendocrine cells. *FEBS Lett* 1987; 210(2): 157-60.

De Kok JB, Ruers TJ, van Muijen GN, et al.: Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues. *Clin Chem* 2000; 46(3): 313-8.

De Plaen E, Arden K, Traversari C, et al.: Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994; 40(5): 360-9.

De Smet C, Lurquin C, van der Bruggen P, et al.: Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. *Immunogenetics* 1994; 39(2): 121-9.

Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, et al.: erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987; 237(4811): 178-82.

Dicthenberg JB, Zimmerman W, Sparks CA, et al.: Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol* 1998; 141(1): 163-74.

Doran JF, Jackson P, Kynoch PA, et al.: Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J Neurochem* 1983; 40: 1542-7.

Doxsey SJ, Stein P, Evans L, et al.: Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* 1994; 76(4): 639-50.

Epner DE, Partin AW, Schalken JA, et al.: Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression with cell motility and metastatic potential of rat prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993; 53(9): 1995-7.

Faltus T, Yuan J, Zimmer B, et al.: Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *Neoplasia* 2004; 6(6): 786-95.

Feng J, Funk WD, Wang SS, et al.: The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-41.

Ferlazzo G, Meta M, Mesiti M, et al.: Detection of MAGE-1, -2, and -3 messenger RNA in tissue samples derived from lung and mammary tumors. *Ann NY Acad Sci* 1996; 784: 448-52.

Fleischhacker M, Beinert T, Ermitsch M, et al.: Detection of amplifiable messenger RNA in the serum of patients with lung cancer. *Ann NY Acad Sci* 2001; 945: 179-88.

Fleischhacker M, Schmidt B: Review: Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer - A survey. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 181-232.

Flory MR, Moser MJ, Monnat RJ Jr, et al.: Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(11): 5919-23.

Ford LP, Wright WE, Shay JW: A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene* 2002; 21(4): 580-3.

Fujita Y, Fujikane T, Fujiuchi S, et al.: The diagnostic and prognostic relevance of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression detected in situ in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 1008-13.

García-Olmo D, García-Olmo DC: Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomemastasis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 945: 265-75.

Garrels JI, Gibson W: Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* 1976; 9(4 PT 2); 793-805.

Ge M, Shi D, Wu Q, et al.: Fluctuation of circulating tumor cells in patients with lung cancer by real-time fluorescent quantitative-PCR approach before and after radiotherapy. *J Cancer Res Ther* 2005; 1(4): 221-6.

Gerlach U, Kayser G, Walch A, et al.: Centrosome-, chromosomal-passenger- and cell-cycle-associated mRNAs are differentially regulated in the development of sporadic colorectal cancer. *J Pathol* 2006; 208(4): 462-72.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland, 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe Saarbrücken 2008.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6: 995-1001.

Gong Y, Cui L, Minuk GY: Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28s-ribosomal RNA gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 23(4): 734-7.

Groeper C, Gambazzi F, Zajac P, et al.: Cancer/testis antigen expression and specific cytotoxic T lymphocyte responses in non small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2007; 120(2): 337-43.

Guadalajara H, Domínguez-Berzosa C, García-Arranz M, et al.: The concentration of deoxyribonucleic acid in plasma from 73 patients with colorectal cancer and apparent clinical correlations. *Cancer Detect Prev* 2008; 32(1): 39-44.

Guin LW, Griswold KE, Patton S, et al.: Electrophoretic characterization of plasma RNA. *Biochem Med* 1975; 13(3): 224-30.

Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z: Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 260(2): 248-56.

Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, et al.: Extracellular Tyrosinase mRNA within Apoptotic Bodies Is Protected from Degradation in Human Serum. *Clin Chem* 2001; 47: 1488-9.

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, et al.: Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; 346(6287): 866-8.

Hibi K, Liu Q, Beaudry GA, et al.: Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58(24): 5690-4.

Hibi K, Westra WH, Borges M, et al.: PGP 9.5 as a candidate tumor marker for non-small-cell lung cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 711-5.

Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, et al.: Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers *J Nat Cancer Inst* 1995; 87: 895-902.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al.: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(16): 7276-80.

Ishikawa F, Matunis MJ, Dreyfuss G, et al.: Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)_n. *Mol Cell Biol* 1993; 13(7): 4301-10.

Iwanaga K, Sueoka N, Sato A, et al.: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 protein impairs DNA repair mediated through the inhibition of DNA-dependent protein kinase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333(3): 888-95.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al.: DNA fragments in the blood plasma of cancer patients; quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61(4): 1659-65.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al.: Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66.

Jeng YM, Peng SY, Lin CY, et al.: Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(6): 2065-71.

Kamm RC, Smith AG: Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem* 1972; 18: 519-22.

Kawai T, Hiroi S, Nakanishi K, et al.: Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol* 2007; 127(2): 254-62.

Kern JA, Robinson RA, Gazdar A, Torney L, Weiner DB: Mechanisms of p185HER2 expression in human non-small cell lung cancer cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6(4): 359-63.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266(5193): 2011-5.

Kimura M, Kotani S, Hattori T, et al.: Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *J Biol Chem* 1997; 272: 13766-71.

Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, et al.: Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet* 1998; 19(2):182-6.

Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD: Circulating RNA as a Tumor Marker- Detection of 5T4 mRNA in Breast and Lung Cancer Patient Serum. *Ann NY Acad Sci* 2001; 945: 172-8.

Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, et al.: Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1961-5.

Kufer P, Zippelius A, Lutterbüse R, et al.: Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. *Cancer Res* 2002; 62(1): 251-61.

Kumaki F, Kawai T, Hiroi S, et al.: Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol* 2001; 32: 188-95.

Kunitz M: I Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J Gen Physiol* 1950; 33(4):349-362. II Crystalline desoxyribonuclease; digestion of thymus nucleic acid; the kinetics of the reaction. *J Gen Physiol* 1950; 33(4): 363-77.

Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, et al.: Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004; 23(6-7): 879-83.

Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, et al.: Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res* 2005; 11(5): 2074-82.

Larrabee PB, Johnson KL, Peter I, et al.: Presence of filterable and nonfilterable cell-free mRNA in amniotic fluid. *Clin Chem* 2005; 51(6): 1024-6.

Leelawat K, Leelawat S, Ratanachu-Ek T, et al.: Circulating hTERT mRNA as a tumor marker in cholangiocarcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12(26): 4195-8.

Liu DW, Chen ST, Liu HP: Choice of endogenous control for gene expression in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2005; 26(6): 1002-8.

Livak KJ, Flood JA, Marmaro J, et al.: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 357-62.

Lledo SM, Garcia-Granero E, Dasi F, et al.: Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2004; 6: 236-42.

Mandel P, Metais P: Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 1948; 142: 241-3.

Mattano LA Jr, Moss TJ, Emerson SG: Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1992; 52(17): 4701-4705.

Mattson ME, Pollack ES, Cullen JW: What are the odds that smoking will kill you? *Am J Public Health* 1987; 77(4): 425-31.

Mavrogiannou E, Strati A, Stathopoulou A, et al.: Real-time RT-PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase splice variants in tumor cell lines and non-small cell lung cancer. *Clin Chem* 2007; 53(1): 53-61.

Mecklenburg I, Stratakis DF, Huber RM, et al.: Detection of melanoma antigen-A expression in sputum and bronchial lavage fluid of patients with lung cancer. *Chest* 2004; 125(5): 164S-6S.

Minoo P, Hamdan H, Bu D, et al.: TTF-1 regulates lung epithelial morphogenesis. *Dev Biol* 1995; 172(2): 694-8.

Miura N, Kanamori Y, Takahashi M, et al.: A diagnostic evaluation of serum human telomerase reverse transcriptase mRNA as a novel tumor marker for gynecologic malignancies. *Oncol Rep* 2007**a**; 17(3): 541-8.

Miura N, Maeda Y, Kanbe T, et al.: Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9): 3205-9.

Miura N, Maruyama S, Oyama K, et al.: Development of a novel assay to quantify serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA and its significance as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2007**b**; 72(1): 45-51.

Miura N, Nakamura H, Sato R, et al.: Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci* 2006; 97(12): 1366-73.

Miura N, Shiota G, Nakagawa T, et al.: Sensitive detection of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2003; 64(4): 430-4.

Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, et al.: Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer* 2001; 92(3): 370-3.

Morin GB: The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesises TTAGGG repeats. *Cell* 1989; 59(3): 521-9.

Müller K-M, Wiethege T, Krismann M & Junker K: Pulmonale Tumoren, In: Ganten D/ Ruckpaul K (Hrsg.) Nicht-hereditäre Tumorerkrankungen. Springer-Verlag 2001 Berlin Heidelberg 1. Auflage.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51(1): 263-73.

Neben K, Ott G, Schweizer S, et al.: Expression of centrosome-associated gene products is linked to tetraploidization in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer* 2007; 120(8): 1669-77.

Neben K, Tews B, Wrobel G, et al.: Gene expression patterns in acute myeloid leukemia correlate with centrosome aberrations and numerical chromosome changes. *Oncogene* 2004; 23(13): 2379-84.

Ng EKO, Tsui NBY, Lam NYL, et al.: Presence of Filterable and Nonfilterable mRNA in the Plasma of Cancer Patients and Healthy Individuals. *Clin Chem* 2002; 48(8): 1212-7.

Nishio Y, Nakanishi K, Ozeki Y, et al.: Telomere length, telomerase activity, and expressions of human telomerase mRNA component (hTERC) and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in pulmonary neuroendocrine tumors. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37(1): 16-22.

Novakovic S, Hocevar M, Zgajnar J, et al.: Detection of telomerase RNA in the plasma of patients with breast cancer, malignant melanoma or thyroid cancer. *Oncol Rep* 2004; 11(1): 245-52.

Pellegrini C, Falleni M, Marchetti A, et al.: HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3645-52.

Pelosi G, Schianchi E, Dell'orto P, et al.: Detecting cell-free circulating hTERT mRNA in the plasma may identify a subset of nonsmall cell lung cancer patients. *Virchows Arch* 2006; 448(1): 7-15.

Pihan GA, Purohit A, Wallace J, et al.: Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 1998; 58(17): 3974-85.

Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, et al.: Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* 2003; 63: 1398-404.

Pino I, Pío R, Toledo G, et al.: Altered patterns of expression of members of the heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 41: 131-43.

Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ: Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990; 5(7): 953-62.

Radonić A, Thulke S, Mackay IM, et al.: Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313(4): 856-62.

Rainer TH, Lam NY, Tsui NB, et al.: Effects of filtration on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA in the plasma of trauma patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2004; 50: 206-8.

Reddi KK, Holland JF: Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 2308-10.

Reiter R, Gais P, Jutting U, et al.: Aurora kinase a messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(17): 5136-41.

Rode J, Dhillon AP, Doran JF, et al.: PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Histopathology* 1985; 9(2): 147-58.

Rondinelli RH, Epner DE, Tricoli JV: Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in late pathological stage human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1997; 1(2): 66-72.

Ruan W, Lai M: Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta* 2007; 385(1-2): 1-5.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.

Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, et al.: Tumor amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br J Cancer* 2001; 84: 824-31.

Sambrook J, Russell D: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press 2001
New York 3. Auflage

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74(12):5463-7.

Sarvesvaran J, Going JJ, Milroy R, et al.: Is small cell lung cancer the perfect target for anti-telomerase treatment? Carcinogenesis 1999; 20(8): 1649-51.

Satoh H, Ishikawa H, Kamma H, et al.: Expression of hnRNP A2/B1 proteins in small airway epithelial cells. Int J Mol Med 2004; 14(4): 605-8.

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al.: The *neu* oncogene: an *erb B* related gene encoding a 185.000-M_r tumor antigen. Nature (Lond.) 1984; 312: 513-6.

Schneider PM, Hung MC, Chiocca SM, et al.: Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. Cancer Res 1989; 49: 4968-71.

Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, et al.: The molecular epidemiology of lung cancer. Carcinogenesis 2007; 28(3): 507-18.

Selvey S, Thompson EW, Matthaai K, et al.: Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. Mol Cell Probes 2001; 15(5): 307-11.

Semenov DV, Kuligina EV, Shevyrina ON, et al.: Extracellular ribonucleic acids of human milk. Ann NY Acad Sci 2004; 1022: 190-4.

Sen S, Zhou H, White RA: A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. Oncogene 1997; 14: 2195-200.

Shapiro R, Vallee BL: Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(8): 2238-41.

Sharief FS, Mohler JL, Sharief Y, et al.: Expression of human prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen genes in neoplastic and benign tissues. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 33(3): 567-74.

Sheu CC, Chang MY, Chang HC, et al.: Combined detection of CEA, CK-19 and c-met mRNAs in peripheral blood: a highly sensitive panel for potential molecular diagnosis of non-small cell lung cancer. *Oncology* 2006; 70(3): 203-11.

Shibuya K, Fujisawa T, Hoshino H, et al.: Increased telomerase activity and elevated hTERT mRNA expression during multistage carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 2001; 92(4): 849-55.

Shippen-Lentz D, Blackburn EH: Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 1990; 247(4942): 546-52.

Shultz J, Hurst R, Betz N: RNasin® Ribonuclease Inhibitor Part I: Characterization of the Protein. *Promega Notes* 2001; 77: 8-11.

Shutack JG, Baxt J, Wasniewski JJ: A study of the RNA levels of normal blood serum. *J Amer Orthop Ass* 1968; 67: 1051-3.

Sienel W, Mecklenburg I, Dango S, et al.: Detection of MAGE-A transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(13): 3840-7.

Sirover MA: New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1432: 159-84.

Sirover MA: New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 2005; 95(1): 45-52.

Soder AI, Hoare SF, Muir S, et al.: Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 1997; 14(9): 1013-21.

Spataro V, Norbury C, Harris AL: The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br J Cancer* 1998; 77(3): 448-55.

Stroun M, Anker P, Beljanski M, et al.: Presence of RNA in the nucleoprotein complex spontaneously released by human lymphocytes and frog auricles in culture. *Cancer Res* 1978; 38: 3546-54.

Sueoka E, Goto Y, Sueoka N, et al.: Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein B1 as a New Marker of Early Detection for Human Lung Cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 1404-7.

Sueoka E, Sueoka N, Iwanaga K, et al.: Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Lung Cancer* 2005; 48: 77-83.

Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR: Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 2000; 29(2): 332-7.

Tahara K, Takesako K, Sette A, et al.: Identification of a MAGE-2-encoded human leukocyte antigen-A24-binding synthetic peptide that induces specific antitumor cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8): 2236-41.

Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, et al.: The clinical significance of Aurora-A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(5): 1827-34.

Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, et al.: PGP 9.5 - a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 1983; 278(1-2): 224-8.

Tockman MS, Prabodh KG, Myers JD, et al.: Sensitive and specific monoclonal antibody recognition of human lung cancer antigen on preserved sputum cells: a new approach to early lung cancer detection. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1685-93.

Tokunaga K, Nakamura Y, Sakata K, et al.: Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res* 1987; 47(21): 5616-9.

Tsai CM, Chang KT, Perng RP, et al.: Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small-cell lung cancer cell lines with HER-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(11): 897-901.

Tsai JR, Chong IW, Chen YH, et al.: Differential expression profile of MAGE family in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 56(2): 185-92.

Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD: Stability of Endogenous and Added RNA in Blood Specimens, Serum, and Plasma. *Clin Chem* 2002; 48: 1647-53.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al.: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 654-9.

Vallböhmer D, Brabender J, Yang DY, et al.: Sex differences in the predictive power of the molecular prognostic factor HER2/neu in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2006; 7(5): 332-7.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254(5038): 1643-7.

Vandekerckhove J, Weber K: Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(3): 1106-10.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al.: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7): 1-12.

Wallace MB, Block M, Hoffman BJ, et al.: Detection of telomerase expression in mediastinal lymph nodes of patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(12): 1670-5.

Wang L, Soria J-C, Kemp BL, et al.: hTERT expression is a prognostic factor of survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2883-9.

Waxman S, Wurmbach E: De-regulation of common housekeeping genes in hepatocellular carcinoma. *BMC Genomics* 2007; 8: 243.

Weynants P, Lethé B, Brasseur F, et al.: Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 1994; 56(6): 826-829.

Wieczorek AJ, Rhyner C, Block LH: Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(10): 3455-9.

Wieczorek AJ, Sitaramam V, Machleidt W, et al.: Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker. *Cancer Res* 1987; 47: 6407-12.

Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, et al.: The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 1989; 246(4930): 670-3.

Xu HT, Ma L, Qi FJ, et al.: Expression of serine threonine kinase 15 is associated with poor differentiation in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Pathol Int* 2006; 56(7): 375-80.

Yoshimatsu T, Yoshino I, Ohgami A, et al.: Expression of the melanoma antigen-encoding gene in human lung cancer. *J Surg Oncol* 1998; 67(2): 126-9.

Zhou H, Kuang J, Zhong L, et al.: Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *nature genetics* 1998; 20: 189-93.

Zhou J, Mulshine JL, Unsworth EJ, et al.: Purification and characterization of a protein that permits early detection of lung cancer. Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 as the antigen for monoclonal antibody 703D4. *J Biol Chem* 1996; 271(18): 10760-6.

Zhu CQ, Cutz JC, Liu N, et al.: Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006; 94(10): 1452-9.

Zimmerman WC, Sillibourne J, Rosa J, et al.: Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry. *Mol Biol Cell* 2004; 15(8): 3642-57.

6.2 Arbeitsanleitungen

QIAquick Spin Handbook. Qiagen 1997

QIAvac Handbook. Qiagen 1999

QIAamp® Min Elute™ Virus Vacuum Handbook. Qiagen 2002

TOPO TA Cloning® Version N - Five-minute cloning of *Taq* Polymerase-amplified PCR products. Invitrogen™ Life Technologies 1999-2001.

6.3 Internet

NCBI Sequence Viewer: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Ries LAG, Harkins D, Krapcho M, et al (Hrsg.): SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/, Tabellen XV-9,-10,-11.

Tumorregister München 2007: <http://www.tumorregister-muenchen.de>

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BL	Bronchiallavage
BLZ, BL-Zellen	Bronchiallavage-Zellen
bp	Basenpaare
BTAK	Breast tumor amplified kinase
c-erbB-2	cellular avian erythroblastosis homolog B 2
CIN	Chromosomeninstabilität
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
C _T	Threshold cycle
DEPC	Diethylpyrocarbonat, RNase-Inhibitor
DNase	Desoxyribonuklease (Enzymklasse der Hydrolasen, speziell: Esterase)
DTT	Dithiothreitol
EGFR	epidermal growth factor receptor
et al.	et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum) oder et alia (Neutrum), lat.: „und andere“
FAM	6-Carboxyfluorescein
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde, Sekundenkapazität
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer
Gy	Gray die Einheit der Dosis radioaktiver Strahlung
HLA	human lymphocyte antigen
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HER	human epidermal growth factor receptor
Hrsg.	Herausgeber
i. v.	intravenös
Konz.	Konzentration
m	männlich
MCF	Michigan Cancer Foundation
MCL	Mantelzelllymphom
MDCK-Zelllinie	Madin-Darby canine kidney
MTOC	microtubule-organizing center

μl	Mikroliter
NaAc	Natriumacetat
NCI	National Cancer Institute
N1S1-Zellen	Rattenhepatom-Zelllinie
NSCLC	Non-small cell lung cancer, Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCM	perizentrioläres Material
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
py	pack year
R	Resistance, Atemwegswiderstand
RV	Residualvolumen
RV/TLC	Residualvolumen/Totalkapazität
RNase	Ribonuklease, (Enzymklasse der Hydrolasen, speziell: Esterase)
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
s. c.	subkutan
siRNA	small interfering RNA
SCLC	Small cell lung cancer, Kleinzelliges Lungenkarzinom
STK15	Serin/threonine protein kinase 15
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
Tab.	Tabelle
TLC	Totalkapazität
TPA	12-0-Tetra-decanoylphorbol-13-acetat
TRAP	Telomeric repeat amplification protocol
u. a.	unter anderem
U/μl	Units pro Mikroliter
U	Unit
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
V	Volumen
v. a.	vor allem
w	weiblich
z. B.	zum Beispiel

8 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Christian Witt für die Überlassung des Themas und Dr. Michael Fleischhacker für die Einarbeitung im Labor, die konstruktive Kritik und die fachlichen Diskussionen während der experimentellen Phase und während des Schreibens der vorliegenden Dissertation sowie Dr. Bernd Schmidt für die Unterstützung in klinischen Fragen. Mein Dank bezüglich der Literaturrecherche gilt v. a. Sabine Weickmann und Dr. Fleischhacker, aber auch meiner Schwester Melanie, Louise Immel und den Mitarbeitern der mittlerweile geschlossenen Bibliothek der Inneren Medizin auf dem Campus Mitte. Renate Weigt und Carmen Quapil aus der Pulmologie danke ich für die tolle Kommunikation bei der Gewinnung der Patientenproben, die eine schnelle Aufbereitung und damit gute Qualität des Materials ermöglichte. Aleksandar Radonić danke ich für das GAPDH-Plasmid, Dr. Burkhard Jandrig für die Primersynthesen und Sequenzierungen. Ich danke Frau Dipl.-Math. Gerda Siebert (Institut für Medizinische Biometrie, Charité -Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte) für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse der quantitativen PCRs.

Ich danke meinem privaten Umfeld, allen voran meiner Mutter Corinna Engel, meiner Schwester Melanie Engel, Karsten Schneider, Ann Lau und Anne Szerwinski sowie meinen ehemaligen Nachbarn für ihre emotionale Unterstützung und Toleranz in Phasen von chronischem Zeitmangel und der mentalen Unausgeglichenheit.

9 Erklärung über die Selbständigkeit bei der Anfertigung der Arbeit

Erklärung

„Ich, Eileen Corinna Engel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nachweis von tumorassoziierter mRNA in Serum und zellfreier Bronchiallavage von Patienten mit benigner und maligner Lungenerkrankung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

11 Publikationsliste

Artikel

I Schmidt B, Carstensen T, Engel E, Jandrig B, Witt C, Fleischhacker M: Detection of cell-free nucleic acids in bronchial lavage fluid supernatants from patients with lung cancer. Eur J Cancer 2004; 40(3): 452-60.

II Engel E, Schmidt B, Carstensen T, Weickmann S, Jandrig B, Witt C, Fleischhacker M: Detection of tumor-specific mRNA in cell-free bronchiallavage supernatant in patients with lung cancer. Ann N Y Acad Sci 2004; 1022: 140-6.

III Carstensen T, Schmidt B, Engel E, Jandrig B, Witt C, Fleischhacker M: Detection of cell-free DNA in bronchial lavage fluid supernatants of patients with lung cancer. Ann N Y Acad Sci 2004;1022: 202-10.

IV Schmidt B, Engel E, Carstensen T, Weickmann S, John M, Witt C, Fleischhacker M: Quantification of free RNA in serum and bronchial lavage: a new diagnostic tool in lung cancer detection? Lung Cancer 2005; 48(1): 145-7.

Kongressbeiträge

Workshop: Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen - Methoden und Konsequenzen, Dresden, 11. - 12.04.2003

V Engel E, Schmidt B, Carstensen T, Weickmann S, Jandrig B, Witt C, Fleischhacker M: Detection of tumor-specific mRNA in cell-free bronchial lavage supernatant in patients with lung cancer. (Abstract und Vortrag)

VI Carstensen T, Schmidt B, Engel E, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M: Microsatellite alterations in cell-free DNA from bronchial lavage of patients with lung cancer. (Abstract und Vortrag)

VII American Thoracic Society, 99th International Conference, 16. - 21.05.2003, Seattle, Wa.: Schmidt B, Schlechte H, Carstensen T, Engel E, Witt C, Fleischhacker M: Detection of DNA alterations in cell-free supernatant of bronchial lavage fluid expanding the possibilities for an early detection of lung cancer. Am J Resp Crit Care Med 2003, 167: A813.

VIII European Respiratory Society, International Conference, 27.09.-01.10.2003, Wien: Schmidt B, Engel E, Carstensen T, Liebers U, John M, Jandrig B, Fleischhacker M, Witt C: Detection of tumor-specific mRNA in cell-free bronchial lavage supernatant new possibilities in lung cancer diagnosis. Eur Respir J 2003, 22, Suppl. 45: 363s.

46. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP) – Berlin, 16. - 19. März 2005

IX Schmidt B, Carstensen T, Engel E, John M, Fleischhacker M, Witt C: P359 – Die DNA im zellfreien Lavage-Überstand könnte für die Tumordiagnostik bedeutsam werden. (Poster und Vortrag)

X Schmidt B, Engel E, Carstensen T, Liebers U, Fleischhacker M, Witt C: P356 – Tumorspezifische mRNA in der Bronchiallavage – ein neuer Baustein in der Tumordiagnostik? (Poster und Vortrag)

XI Schmidt B, Fleischhacker M, Carstensen T, Engel E, Fietze I, Witt C: V403 – Lungenkarzinomdiagnostik: Unterschiedliche mRNA-Konzentrationen im zellfreien Überstand der Bronchiallavage bei Tumor-und Nicht-Tumor-Patienten. (Vortrag)