

Aus dem Institut für Immunologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Brocker

***Verbesserung der Sensitivität und Genauigkeit der EBUS-
TBNA durch die MAGE-PCR bei Lungenkarzinompatienten***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian Universität zu München

vorgelegt von
Beatrix Rita Cucuruz

aus
Timisoara, Rumänien

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Klein.

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ludger Klein
Priv. Doz. Dr. Falk Hlubek

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Bernhard Polzer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2013

Gliederung

1	Einleitung.....	4
1.1	Das Lungenkarzinom	4
1.2	Tumormarker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen beim Lungenkarzinom.....	8
1.3	Ziel der Studie	9
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	11
2.2	Material	12
2.3	Methoden	19
2.3.1	Untersuchung der Primärtumore	19
2.3.2	Untersuchung der Lymphknotenproben	30
2.4	Patientenkollektiv	35
3	Ergebnisse	39
3.1	Etablierung der RNA Isolierung aus EBUS-TBNA und MSK Proben.....	40
3.2	CK19 als Tumormarker in Lymphknotenproben nach EBUS-TBNA.....	42
3.3	Die MAGE PCR Etablierung.....	43
3.4	Die MAGE - Expression in Lymphknotenproben	48
3.5	MAGE-A Expression in Primärtumoren	54
4	Diskussion	59
4.1	Methodische Gesichtspunkte	59
4.2	Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknotenproben	59
4.3	Analyse der MAGE-A Expression in Primärtumoren	61
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	65
7	Publikationen.....	69
8	Lebenslauf.....	70
9	Danksagungen	71

1 Einleitung

1.1 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom ist für die meisten tumorbedingten Todesfälle in der westlichen Welt verantwortlich. 12 % aller Tumorpatienten leiden an einem Lungenkarzinom (Parkin, Pisani et al. 1999). Bislang gibt es keine Hinweise auf familiäre Vererbung spezifischer Krebsgene. Als wichtigster ätiologischer Faktor wird das Zigarettenrauchen angesehen, das für ca. 85 % der Lungenkarzinome ursächlich verantwortlich ist. So wurde erwiesen, dass Nikotinabusus bleibende genetische Schäden des respiratorischen Epithels hervorruft (Hoffman, Mauer et al. 2000). Lungenkarzinome sind hochmaligne Tumore, die alle über einen gemeinsamen Differenzierungsweg aus normalem Epithel entstehen, und nach ihrem histopathologischen Erscheinungsbild in 4 Typen unterteilt werden:

1. Kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC)
2. Plattenepithelkarzinome
3. Adenokarzinome und
4. Großzellige Karzinome.

Die Prognose des Patienten und das therapeutische Konzept hängen dabei wesentlich vom histologischen Typ und von der Tumorausdehnung ab. Die Einteilung der Lungenkarzinomstadien dient der Prognose und Therapieplanung und wird bei allen Patienten standardmäßig durchgeführt (Tabelle 1.1). Dabei werden Tumorgröße, mediastinaler Lymphknotenbefall und Metastasierung in anderen Organen dokumentiert. Insgesamt beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Lungenkarzinom nur 10 – 15 %, und selbst Patienten mit einem frühen Tumorstadium (Stadien I und II) sind durch eine operative Resektion des Tumors nur in 60 % heilbar (Tabelle 1.1). In fortgeschrittenen Fällen (Stadien III und IV) dient ein operativer Eingriff nur noch der Tumorreduktion (Hoffman, Mauer et al. 2000)). Aus diesem Grund ist ein frühes Erkennen der Erkrankung entscheidend für die Möglichkeit einer kompletten Resektion des Tumors und damit für die Prognose des Patienten. Problematisch ist dabei, dass frühe Lungentumore meist keine Beschwerden verursachen und die Patienten deshalb keinen Arzt aufsuchen.

Symptome entstehen oft erst, wenn der Tumor bereits eine gefährliche Größe erreicht hat und eine kurative operative Resektion nicht mehr möglich ist. So werden 75% der Patienten mit Lungenkarzinom im Stadium IIIA oder später diagnostiziert. Eine pulmonale Raumforderung und vergrößerte Lymphknoten gelten so lange als malignitätsverdächtig, bis das Gegenteil diagnostisch bewiesen ist (Huber 2009). Eine wichtige Methode hierbei ist die Thorax-Computertomographie (CT), in der neben der Ausdehnung der pulmonalen Raumforderung auch die Größe der mediastinalen Lymphknoten beurteilt wird. Hierbei ist zu beachten, dass auch nicht vergrößerte Lymphknoten in ca. 20% Metastasen beinhalten (De Leyn, Lardinois et al. 2007). Zur genaueren diagnostischen Abklärung, ob ein Lymphknoten von Tumorzellen befallen ist, hat sich die Mediastinoskopie mit einer Sensitivität bei 84% - 95% (Gunluoglu, Melek et al. 2010)) als Gold-Standard erwiesen. Hierbei handelt es sich um eine offene Biopsie unter Vollnarkose, die zu schwerwiegenden Komplikationen, wie einer Verletzung der Arteria pulmonalis oder einer Schädigung des Nervus recurrens führen kann. Am häufigsten wird die zervikale Mediastinoskopie verwendet, die eine Abklärung der höchsten mediastinalen (Station 1), oberen paratrachealen (Station 2 rechts und links), unteren paratrachealen (Station 4 rechts und links) und subkarinalen (Station 7) Lymphknotenstationen erlaubt (Detterbeck 2001) (Tab. 1.2).

Tabelle 1.1: Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms und 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom.

Klinisches Stadium ¹	TNM			5 - Jahres - Überlebensrate
Stadium IA	T1a/b	N0	M0	67%
Stage IB	T2a	N0	M0	57%
Stage IIA	T2b	N0	M0	55%
	T1a/b, T2a	N1	M0	34%
Stage IIB	T2b	N1	M0	24%
	T3	N0	M0	22%
Stage IIIA	T3	N1	M0	9%
	T1-T3	N2	M0	13%
	T4	N0-N1	M0	8%
Stage IIIB	T4	N2	M0	7%
	T1-T4	N3	M0	3%
Stage IV	T1-T4	N0-N3	M1	1%

¹ Die Einteilung erfolgte entsprechend der Zuordnung zum Internationalen Staging System nach TNM (UICC, 2010)

Tabelle 1.2: Bezeichnung der biopsierten Lymphknoten im Rahmen der Mediastinoskopie

Lymphknoten-Station	Bezeichnung ¹
1	oberste mediastinale Lymphknoten
2	obere paratracheale Lymphknoten
4	untere paratracheale Lymphknoten
7	subkarinale Lymphknoten

¹ Die Bezeichnung der Lymphknotenstationen erfolgte nach Mountain 1997

Eine neue Methode zum mediastinalen Staging ist der endobronchiale Ultraschall mit Feinnadelbiopsie (EBUS), bei dem ein flexibles Bronchoskop mit Ultraschallkopf verwendet wird. Die EBUS bietet die Möglichkeit einer direkten Lokalisation von hilären und mediastinalen Lymphknoten und erlaubt darüber hinaus eine durch Ultraschall gesteuerte Feinnadelpunktion dieser Strukturen. Ein großer Vorteil für den Patienten ist, dass die EBUS nicht-invasiv ist und ambulant durchgeführt werden kann. Ein Nachteil ist, dass die Sensitivität der EBUS und der anschließenden gängigen zytologischen Untersuchungen nur bei 60%-90% (Block 2010)(Khoo and Ho 2011) und damit unter der Sensitivität der operativen Mediastinoskopie liegt.

Die multimodale Therapie des Lungenkarzinoms wird abhängig von der Histologie und dem Stadium des Lungenkarzinoms zusammengestellt. Wenn keine Lymphknoten tumorbefallen sind, ist nach der operativen Resektion keine weitere Therapie erforderlich. Bei Patienten im Stadium N1 (Metastasierung in ipsilaterale intrapulmonale, peribronchiale und/oder hiläre Lymphknoten (Stationen 10-14) wird eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Bei Befall der mediastinalen Lymphknoten werden präoperativ eine Chemotherapie und eine Bestrahlung empfohlen. Im Stadium IV wird eine palliative Chemotherapie durchgeführt ((Huber 2009), (Hammerschmidt and Wirtz 2009), Tab. 1.3).

Tabelle 1.3: Therapie des Lungenkarzinoms in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Histologie	Ausdehnung	Therapie
SCLC	limited disease	Chemotherapie + lokale Radiatio + Ganzhirnbestrahlung
	extended disease	Chemotherapie
NSCLC	T1-2 N0 ¹	Resektion
	T1-3 N0-1M0	Resektion + adjuvante Chemotherapie
	T1-3 N2 M0	neoadjuvante Chemotherapie + Radiatio + Resektion
	T4 N2, T1-4 N3	Radiochemotherapie, ggf. Resektion
	T1-4 N1-3 M1	palliative Chemotherapie

¹ bei T2 N0 ist die Datenlage unsicher, ob eine adjuvante Chemotherapie sinnvoll ist (Laack, Bokemeyer et al. 2008)

Es wurde gezeigt, dass es trotz fehlendem Nachweis von Tumorzellen nach Mediastinoskopie oder EBUS in einigen Patienten mit frühen Stadien, bei denen also nach der Operation keine weiteren Therapien eingeleitet wurden, zu einem erneuten Auftreten der Erkrankung mit Metastasen kam (Laack, Bokemeyer et al. 2008; Mountain 2009). Diese Patienten konnten durch übliche Staging Methoden nicht identifiziert werden, weshalb dringend neue diagnostische Methoden zur Untersuchung der Lymphknoten auf Tumorzellen benötigt werden. Die frühe Disseminierung einzelner Tumorzellen führt dazu, dass selbst nach der vollständigen chirurgischen Resektion des Tumors noch immer 50% der Patienten an Metastasen versterben (Petersen, Heckert et al. 2000). Zur besseren Therapie und Stadieneinteilung ist es deshalb notwendig, auch diese Zellen in den Lymphknoten nachzuweisen (De Leyn, Vansteenkiste et al. 1997; Mountain 1997). Einzelne disseminierte Tumorzellen können aus den Lymphknoten der Patienten gewonnen werden, die routinemäßig für das Staging entnommen werden (De Plaen, Arden et al. 1994). Molekulare Marker für diese Tumorzellen könnten dazu beitragen, Nutzen und Schaden der Behandlung für den Patienten zu ermessen.

Das Ziel ist demnach die Sensitivität der nicht-invasiven Diagnostik zu verbessern.

1.2 Tumormarker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen beim Lungenkarzinom

Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen wurde Cytokeratin 19 (CK-19) verwendet, ein bekannter epithelialer Marker. In normalem Lungengewebe wird er nicht exprimiert, dafür aber sehr häufig in epithelialen Tumoren. CK-19 wurde bereits erfolgreich zur Detektion maligner Zellen im Knochenmark ((Braun, Pantel et al. 2000), Lymphknoten (Wang, Siene et al. 2005), und Blut (Ji, Sato et al. 2006), mittels immunhistochemischer Färbung und quantitativer PCR verwendet. Im primären Lungenkarzinom wird eine CK-19 Expression von 88%-94% beschrieben (Nhung, 1999 #348).

Eine weitere spezifische Klasse von Tumormarkern sind die Melanoma-Antigene (MAGE). Diese gehören zur Familie der Cancer-Testis Antigene (CTA) und sind als tumor-spezifische Marker beschrieben (Tajima, 2003 #24). Insgesamt wurden über 44 CTAs beschrieben, eine Vielzahl davon wird auch in primären Karzinomen der Lunge exprimiert. CTAs wie NY-ESO-1, SSX 2, XAGE-1 oder MAGE sind an der humoralen und zellulären Abwehr beteiligt. Sie kommen praktisch ausschließlich in Keimzellen und in fast allen Tumorzellen vor, nicht aber im gesunden Gewebe. Diese Exklusivität macht die MAGE-Antigene zu potentiellen Kandidaten für Immuntherapien (Atanackovic, Altorki et al. 2008), (Kufer, Zippelius et al. 2002; Mecklenburg, Weckermann et al. 2007).

MAGE-Gene umfassen vier Gengruppen, die auf dem X-Chromosom kodiert werden. Die MAGE-A Gene sind in der Region q28, die MAGE-B Gene in p21.3, die MAGE-C Gene in q26 und die MAGE-D Gene in der Region p11 des X-Chromosoms lokalisiert (Nakagawa, Noguchi et al. 2005). MAGE-A, -B und -C Gene werden von vielen Tumoren exprimiert, nicht aber von gesunden Geweben (Ausnahme Hoden- und Plazentagewebe). MAGE-D Gene sind ubiquitär vorhanden (Chomez, De Backer et al. 2001).

Die Gruppe der MAGE-A Gene umfasst MAGE - A1 bis MAGE -A12. Sieben MAGE-A Gene (A1, A2, A3, A4, A6, A10 und A12) werden von vielen Tumoren in großer Menge transkribiert (Van den Eynde and van der Bruggen 1997; Kirkin, Dzhandzhugazyan et al. 2002; Tajima, Obata et al. 2003; Nakagawa, Noguchi et al.

2005). Die übrigen MAGE-A Gene werden im Tumorgewebe entweder nicht (wie das MAGE-A7 Pseudogen) oder nur in geringen Mengen exprimiert. In den Genprodukten von MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 und A-12 sind zahlreiche Antigene nachweisbar, die über HLA-I CD-8-zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. Bei der Prozessierung von MAGE-A1 und -A3 werden darüber hinaus Peptide generiert, die über HLA-II Moleküle von CD-4-Lymphozyten erkannt werden. Die MAGE Expression im Lungenkarzinom ist heterogen. Frühere Studien beschreiben eine MAGE mRNA Expression in 30-50 % von primären Lungenkarzinomen (Weynants, Lethe et al. 1994; Brasseur, Rimoldi et al. 1995; Gotoh, Yatabe et al. 1998; Lucas, De Smet et al. 1998; Yoshimatsu, Yoshino et al. 1998), neuere Veröffentlichungen finden in 70-85 % MAGE mRNA (Jang, Soria et al. 2001). Einheitlich beschrieben wird, dass eine hohe MAGE Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechteren Prognose einhergeht (Kufer, Zippelius et al. 2002), (Baran, Baj-Krzyworzeka et al. 2010; Han, Eom et al. 2010; Pastorcic-Grgic, Sarcevic et al. 2010). In diesem Kontext, ist es erstaunlich, dass im Sputum und in der Bronchiallavage (BAL) auch bei entzündlichen Veränderungen eine MAGE Überexpression gefunden wurden (Mecklenburg, Stratakis et al. 2004). Ebenso konnten in Bronchiallavagen von Rauchern in 50% eine MAGE Expression nachgewiesen werden (Jang, Soria et al. 2001). In normalem Gewebe, welches 9 Monate lang Zigarettenrauch ausgesetzt war, kam es in Folge von genomischer Hypomethylation zu einer MAGE Expression (Liu, Killian et al. 2010). MAGE scheint eine wichtige Rolle in der Tumor Progression und Entwicklung zu haben (Yang, O'Herrin et al. 2007) was nahelegt, ihn als Diagnose- und Prognosefaktor zur Verbesserung der Sensitivität der Nicht-Invasiven Staging Verfahren beim Lungenkarzinom zu verwenden.

1.3 Ziel der Studie

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werde, ob durch diesen neuen molekularbiologischen Ansatz der Nachweis von disseminierten Tumorzellen nach EBUS-TBNA und MSK verfeinert werden kann und dadurch die aktuellen Staging-Methoden verbessert werden können.

Konkret sollten folgende Fragen angegangen werden: (i) welche Marker zur Detektion maligner Zellen in Lymphknoten geeignet sind, (ii) ob die MAGE

Expression von der Histologie des Primärtumor abhängig ist, (iii) ob die MAGE - qPCR zur Detektion maligner Zellen sensitiver ist als die in der Klinik verwendeten Routineverfahren, (iv) ob die Kombination von molekularen und klinischen Verfahren die Sensitivität der Staging-Untersuchung erhöhen und (v) ob die MAGE Expression mit genomischen Veränderungen korreliert.

2 Material und Methoden

2.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Formelgrößen wurden mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten bezeichnet. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wurde gemäß Duden verfahren.

A	Adenin
BSK	Bronchoskopie
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dig	Digoxigenin
DNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EBUS-TBNA	Endonbronchialer Ultraschall mit Biopsieentnahme
FCS	Fötalen Kälberserum
FITC	Fluorescein
G	Guanin
g	Beschleunigung
h	Stunde
min	Minute
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
MSK	Mediastinoskopie
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PBS	Phosphatbuffer-Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
SSC	Salins-Sodiumcitrat
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
THT	Thorakotomie
Tris	Tris(hydroxymethyl)
T	Thymin

Upm. Umdrehungen pro Minute

2.2 Material

Geräte

Cytospinzentrifuge Cytospin2	Shandon
CCD-Kamera (CGH)	Photometrix
Elektronische Präzisionswaage	Sartorius Laboratory
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Entwicklermaschine – Compact 35	Airclean 200
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMXA-RF8
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Heizplatte	Bachofer
Horizontal Gel Electrophoresis System	Gibco BRL
Hybridisierungsofen Shake `n` Stack	Hybraid
Invertmikroskop	Leica DM IRB
Kryotom	Leica Jung Frigocut 2800 E
Lasermikroskop	P.A.L.M., Bernried
LightCycler I	Roche, Mannheim
LightCycler 480	Roche, Mannheim
Medimaschine	Dako
Mikroskopkop Labovert FS	Leitz
Mini-Zentrifuge	Costar
EBUS-TBNA Gerät, 21-gauge Nadel	Olympus ViziShot®
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc.
Photometer	Eppendorf
Robo Cycler Gradient 96	Stratagene
Roller/Mixer SRT 1	Stuart Scientific
Spannungsquelle (Agarose-Gel)	EPS 200, Pharmacia Biotech
Spektrometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermocycler primus 25	peqLab
UV-Lampe	INTAS
Vortexgerät Type REAX 1 DR	Heidolph
Wasserbad Lauda MT/2	MGW
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf

Verbrauchsmaterial

Deckgläschen	Langenbrinck
--------------	--------------

Falcon	Sarsted
Filmbox	Siemens
Glas-Küvetten	Roth, Karlsruhe
Glas-Kapillaren	Roche, Mannheim
Haft-Objektträger	Micromet, München
Hybridisierungsröhren	Biometra
Kulturfläschchen (Cellstar)	Greiner
LightCycler 480 MultiwellPlate 384	Roche, Mannheim
Medicons (50µm)	Dako
Multiwell Plate 480	Roche
Nylonmembran	Sigma, Deisenhofen
Objektträger (Mattrand)	Langenbrinck
PCR Soft Tubes	Biozym
PCR Soft Tubes Ständer	peqLab
Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen, steril mit Filter	Biozym
Pipettenständer	Gilson
Polyethylenmembran	P.A.L.M. Microlaser Technologies
QIAshredder	Qiagen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 200 µl	Thermo-Fast 96, Abgene
Transferpipetten	Sarsted
Scientific Imaging Film, Biomax ml	Kodak

Enzyme und Antikörper

A45-B/B3	Micromet, München
Anti-Dig-AP Fab (Dig Luminescent Detection Kit)	Roche, Mannheim
Anti-DIG-Flourescein	Roche, Mannheim
Avidin-Cy3.5	Roche, Mannheim
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
DNA-Polymerase I (<i>E. coli</i>)	New England Biolabs, Frankfurt
DNase I	New England Biolabs, Frankfurt
Expand Long Template	Roche, Mannheim
Mse I 50 U/µl	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Pan, Invitrogen
Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Terminale Desoxy Nucleotidyltransferase (TdT)	Amersham Pharmacia Biotech
Thermo Sequenase™ DNA Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim

Tru I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuclease H	Invitrogen, Karlsruhe
RT, Superscript II (200U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
RNase A	Roche, Mannheim

Kits

Dynalbeads mRNA DIRECT KIT	Dynal
Dig Luminescent Detection Kit	Roche, Mannheim
Expand™ Long Template Kit	Roche, Mannheim
First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
LightCycler-DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim
Omniscript RT-Kit	Qiagen, Hilden
1 st Strand cDNA Synthesis Kit (AMV)	Roche, Mannheim
Rneasy Protect MiniKit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
Taq Long Template	Roche, Mannheim

Chemikalien

AB-Serum (10ml)	Biotest, Dreieich
Agarose GTG Seakem	Biozym, Hameln
peqGOLD Universal Agarose	peqLab
ATP	Roche, Mannheim
BSA	Roche, Mannheim
CSPD = Chemiluminescence Substrate	Roche, Mannheim
Colcemid	Sigma, Deisenhofen
DAPI	Roche, Mannheim
dNTP 10 mM	Fermentas
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Biosci., Freiburg
Dynalbeads Oligo(dT)25	Dynal, Invitrogen, Karlsruhe
Dig Easy Hyb Granules	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-UTP	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP stabil	Roche, Mannheim
DNA-Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Größenmarker 100 bp	Fermentas
0,1M DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merk, Darmstadt
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-Ethyl-9-Phenyl-Phenanthridinium Bromid)	Sigma, Deisenhofen
Eisessig 100%	Merk, Darmstadt

Ethanol unvergällt	JT Baker, Griesheim
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Ficoll-400	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Merk, Darmstadt
Glykogen	Roche
Hämatoxylinlösung (Mayer's)	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Herring-Sperm-DNA (10mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Human Cot-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
KH ₂ PO ₄	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Boeringer
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merk, Darmstadt
Molekulargewichtsstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Montagekleber (Fixogum)	Marabu, Tamm
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Orange G	Sigma, Deisenhofen
PCR-Öl	Sigma, Deisenhofen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merk, Darmstadt
pBS DNA	Stratagene
5X RT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend)	Merk, Darmstadt
SDS (Dodecylsulfat-Na-Salz)	Sigma, Deisenhofen
SYBR Gold	Molecular Probes, Leiden, NL
Thermo Sequenase Reaction Puffer	Amersham Biosci., Freiburg
TLT, expand long template PCR system	Roche, Mannheim
TRIS-ultra rein	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Sigma, Deisenhofen
Tween20	Sigma, Deisenhofen

RPMI ohne L-Glutamin
Vectashield
Wasser
Xylol

Invitrogen, Karlsruhe
Linearis, Hamburg
Merk, Darmstadt
Roth, Karlsruhe

Puffer

PBS (Phosphatbuffer-Saline):

Na₂HPO₄ 8,5 mM
KH₂PO₄ 2 mM
NaCl 150 mM
pH 7,4

SSC (Saline-Sodiumcitrat):

NaCitrat 15 mM
NaCl 150 mM
pH 7,4

TBE (Tris-Borat-EDTA Puffer):

Tris 89 mM
Borat 89 mM
EDTA 2 mM
pH 8,3

Probenpuffer (Dye)

25% Ficoll-400
0,3% w/v Orange-G
in 1xTBE gelöst

TAE

Tris 89 mM
Glacial acetic acid 57.1 ml
EDTA 500 mM
pH 8.0

cDNA – Waschpuffer I

Tris 50 mM
KCl 75 mM
MgCl₂ 3 mM
DTT 10 mM
pH 8,3

cDNA – Waschpuffer II

Tris 50 mM
KCl 75 mM
MgCl₂ 3 mM
DTT 10 mM
pH 8,3

Tailing Waschpuffer

KH₂PO₄ 50mM
DTT 1mM
Igepal 0,25%
pH 7,0

Tailing Puffer

KH₂PO₄ 10mM

	MgCl ₂ 4 mM
	DTT 0,1mM
	dGTP 200 µM
	pH 7,0
I PCR Puffer	Puffer 14 µl (Roche)
	Formamid 3%
II PCR Puffer	NTPs 350 µM
	CP 2 Primer 1,2 µM
	DNA Poly-Mix 5U
Labeling Puffer	dig – UTP 50µM
	dTTP 300µM
	dNTPs 300µM
Proteinase K-Mix	OFA 0,5 µl
	Tween 10% 0,13 µl
	Igepal 10% 0,13 µl
	Proteinase K (10mg/ml) 0,26 µl
	H ₂ O 3,5 µl
7/8 dNTP-Mix:	8,75 mM dTTP
	10 mM dATP
	10 mM dCTP
	10 mM dGTP
1% Superblock-Mix:	1xPBS+0,2% Tween (pH 8,5)
	1% BSA Fraktion V
	5% FCS

Oligonucleotide und Primer

β-Aktin-5'	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA
β-Aktin-3'	CTC ACT GCT ATT ACC TGT GC
β-Aktin-5'	CCT TCC TGG GCA TGG AGT C CT G
β-Aktin-3'	GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC
CK19-5'	TGA GCA GGT CCG AGG TTA
CK19-3'	CTG GGC TTC AAT ACC GCT
Pan-MAGE-RT	ACC TGC CGG TAC TCC AGG
PBGD-RT	TGG GGC CCT CGT GGA
MAGE-MMRP1	CTG AAG GAG AAG ATC TGC C
MAGE-MMRP2	CTC CAG GTA GTT TTC CTG CAC
MAGE-MMRP3	CTG AAG GAG AAG ATC TGC CWG TG,W ist A oder T
MAGE-MMRP4	CCA GCA TTT CTG CCT TTG TGA
MAGE-A1 outer-5'	GTA GAG TTC GGC CGA AGG AAC
MAGE-A1 outer-3'	CAG GAG CTG GGA AAT GAA GAC
MAGE-A1 inner-5'	TAG AGT TCG GCC GAA GGA AC
MAGE-A1 inner-3'	CTG GGC AAT GAA GAC CCA CA
MAGE-A2 outer-5'	CAT TGA AGG AGA AGA TCT GCC T

MAGE-A2 outer-3'	GAG TAG AAG AGG AAG AAG CGG T
MAGE-A2 inner-5'	CAT TGA AGG AGA AGA TCT GCC T
MAGE-A2 inner-3'	CAG GCT TGC AGT GCT GAC TC
MAGE-A3/6 outer-5'	GAA GCC GGC CCA GGC TCG
MAGE-A3/6 outer-3'	GAT GAC TCT GGT CAG GGC AA
MAGE-A3/6 inner-5'	GGC TCG GTG AGG AGG CAA G
MAGE-A3/6 inner-3'	GAT GAC TCT GGT CAG GGC AA
MAGE-A4 outer-5'	CAC CAA GGA GAA GAT CTG CCT
MAGE-A4 outer-3'	TCC TCA GTA GTA GGA GCC TGT
MAGE-A4 inner-5'	CAC CAA GGA GAA GAT CTG CCT
MAGE-A4 inner-3'	CAG GCT TGC AGT GCT GAC TCT
MAGE-A10 outer-5'	CTA CAG ACA CAG TGG GTC GC
MAGE-A10 outer-3'	GCT TGG TAT TAG AGG ATA GCA G
MAGE-A10 inner-5'	ATC TGA CAA GAG TCC AGG TTC
MAGE-A10 inner-3'	CGC TGA CGC TTT GGA GCT C
MAGE 12 outer-5'	TCC GTG AGG AGG CAA GGT TC
MAGE 12 outer-3'	ATC GGA TTG ACT CCA GAG AGT A
MAGE 12 inner-5'	TCC GTG AGG AGG CAA GGT TC
MAGE 12 inner-3'	GAG CCT GCG CAC CCA CCA A
PBGD-5'	AGA GTG ATT CGC GTG GGT ACC
PBGD-3'	TTG GGT GAA AGA CAA CAG CAT C
EGP-5'	GCG AGT GAG AAC CTA CTG
EGP-3'	CAC ATC AGC TAT GTC CAC ATC
EF1- α 5'	TGC CC AGG ACA CAG AGA CT
EF1- α 3	CTG TGT CGG GGT TGT AGC CA
CP2	TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC CCC CCC

Die Oligonukleotide wurden von Metabion (München) synthetisiert.

2.3 Methoden

2.3.1 Untersuchung der Primärtumore

2.3.1.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium mit zusätzlich 10% fetalem Kälberserum gezüchtet. Der Zustand der Zellen wurde lichtmikroskopisch geprüft und das Nährmedium wurde alle 2 Tage erneuert.

2.3.1.2 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Primärtumore wurden nach der Resektion sofort in flüssigen Sickerstoff gebracht und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Für die histologische Begutachtung wurden $5\ \mu\text{m}$ dicke Kryoschnitte angefertigt, auf einen Glasobjektträger übertragen, 15 min mit Aceton fixiert und 45 s mit Meyer's Hämatoxylin gefärbt. Nach 30 min in Leitungswasser wurde der Schnitt mit Eosin 0,1% für 2 min gefärbt, 1 min in H_2O dest. gewaschen, dehydriert in 70%, 90% und 100% Ethanol und nochmals 15 min in Xylol fixiert. Die Schnitte wurden dann histologisch begutachtet und Tumorareale markiert.

Für die Mikrodisektion des Primärtumors wurden ebenfalls $5\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und anschließend auf eine Polyethylenmembran auf dem Glasobjektträger aufgebracht. Die Färbbedingungen mussten für die Mikrodisektion angepasst werden, da später mRNA aus den Zellen isoliert werden sollte. Aus diesem Grund wurde die Inkubation mit Meyer's Hämatoxylin auf 30 s reduziert und nur maximal fünf Minuten in Leitungswasser gebläut. Die Eosin-Gegenfärbung entfiel, da Eosin eine Gewinnung von qualitativ hochwertigen Nukleinsäuren für die nachfolgenden Analysen unmöglich macht (sciencelab 2005). Die weiteren Dehydrierungsschritte in Ethanol wurden wie oben beschrieben durchgeführt, während die Behandlung mit Xylol ebenfalls entfällt. Anschließend wurden die Schnitte bei 37°C für eine Stunde getrocknet.

2.3.1.3 Lasermikrodissektion

Für die Mikrodissektion und das Katapultieren der Gewebestücke wurde das P.A.L.M. Microbeam System (Carl Zeiss AG, Jena) verwendet. Das P.A.L.M. Laser Mikrodissektionsmikroskop wurde von Firma Altana Pharma zur Verfügung gestellt. Ein mikrodissektiertes Areal besteht jeweils aus 3-5 nahe beieinander liegenden Tumorstücken, von denen jedes nicht größer als $10000 \mu\text{m}^2$ ist. Zum Auffangen der gelaserten Stücke wurden $5 \mu\text{l}$ Lysispuffer (Dynal) in den Deckel des Reaktionsgefäßes pipettiert. nachdem mit Hilfe des Mikroskops überprüft wurde, ob der Vorgang des Katapultierens erfolgreich war, wurde kurz abzentrifugiert.

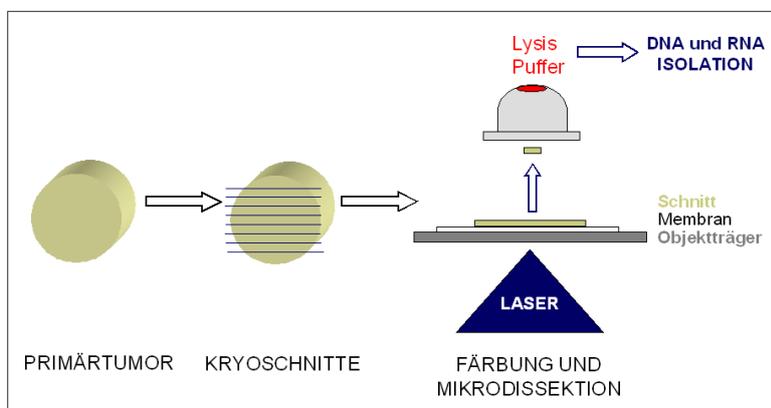


Abb. 2.1: Lasermikrodissektion. Der Primärtumor wird im gefrorenen Zustand geschnitten und auf dem Objektträger mittels Hämatoxylin gefärbt. Danach werden Areale mit dem Laser herausgeschnitten. Diese kommen sofort in einen Lysispuffer, was die simultane DNA- und RNA- Isolation ermöglicht. (Wendler 2008)

2.3.1.4 Methode zur Isolierung von DNA und RNA

Um Kontaminationen der Proben und dem Abbau der mRNA vorzubeugen, wurden die folgenden Verfahren in einem separaten und RNase-freien Raum durchgeführt. Die mikrodissektierten Zellareale des Primärtumors wurden zuerst in LiDS-haltigem Lyse-Puffer lysiert. Bei der mRNA-Isolierung machte man sich den Poly-A-Schwanz der mRNA zu Nutze, über den das Molekül an das Oligo-dT(25)-Nukleotid der paramagnetischen Beads gebunden wird. An einem Magneten konnte die mRNA von der genomischen DNA und dem Zelldebris getrennt werden. Nach der Zelllyse und den Waschschritten wurden alle Überstände in einem silanisierten Tube gesammelt (insgesamt $60 \mu\text{l}$). Es wurden noch $20 \mu\text{g}$ Glycogen zur genomischen DNA dazugegeben, um die Präzipitation der DNA zu unterstützen und einen Verlust von DNA zu verhindern. Das Pellet wurde 3mal mit 70% Ethanol zur Entfernung von

Salzen gewaschen (Klein, Seidl et al. 2002). Die so gesammelte genomische DNA wurde über Nacht mit Ethanol bei -20°C gefällt.

Um die gesamte mRNA an die Beads zu binden, wurden die Proben für 30 min bei Raumtemperatur rotiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit cDNA – Waschpuffer I (10µl) und 0,5% Igepal. Nach dem Mischen kamen die Beads an den Magneten um die mRNA vom Überstand zu trennen. Danach wurden die Beads mit dem cDNA – Waschpuffer II (20 µl) mit 0,5% Tween20gewaschen. Die Tubes wurden wieder an den Magneten gebracht und die Überstände abgetrennt. Zum Schluss wurde noch einmal mit cDNA – Waschpuffer I gewaschen um alle DNA Reste zu entfernen.

Die im abgetrennten Überstand gesammelte genomische DNA wurde bei -20° gelagert. Die mRNA wurde kurzfristig bei -80° gelagert bevor sie in cDNA umgeschrieben wurde.

2.3.1.5 cDNA – Synthese der Isolierten RNA

Die mRNA wurde mittels Superscript II Reverse Transkriptase in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in cDNA umgeschrieben (44°C, 45 min, im PCR-Cycler). Da die cDNA weiterhin an die paramagnetischen Beads gebunden blieb, erfolgte ein Waschschrift mit Tailing–Waschpuffer zum Entfernen der Beads. Nach Denaturierung der cDNA-mRNA Hybride (94°C, 4 min) wurden die Proben sofort auf Eis gelagert.

Im nächsten Schritt folgte das G-Tailing der cDNA Sequenzen. Dazu wurden 10 U der Terminalen Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) dazugegeben (37°C, 60 min). Nach Inaktivierung des Tailing-Enzyms (70°C, 5 min) wurde zunächst der PCR Puffer I (35 µl) hinzugemischt. Die Proben wurden auf 78°C im PCR-Cycler erwärmt. Der PCR Puffer II (5 µl), welcher die dNTPs und den CP2 Primer enthält, wurde in einem Hot Start Verfahren sofort dazugegeben und dann nach Hot Start bei 94°C wurde der PCR Puffer II (5 µl) zugegeben. Insgesamt wurde die cDNA innerhalb von 40 Zyklen im PCR-Cycler amplifiziert.

PCR-Programm: 1. 15 s bei 94°C
 2. 30 s bei 65°C
 3. 2 min bei 68°C

Während der letzten 20 Zyklen wurde die Elongationszeit bei jedem Zyklus um 10 s verlängert, so dass man während des letzten Zyklus eine Elongationszeit von 7 min bei 68°C erreicht.

2.3.1.6 Markierung der cDNA für die Filterhybridisierung

Zur Markierung der cDNA wurde eine nichtradioaktive Markierung mit Digoxigenin-11-dUTP ausgewählt, um die gebundene cDNA sichtbar zu machen. Vom ursprünglichen PCR Produkt wurden 1,0 µl entnommen und mit dem Labeling Puffer und DNA Poly-Mix gemischt. Nach einer ersten Denaturierung von 2 min bei 94°C folgten 12 Zyklen mit einer Denaturierung von 15 s bei 94°C, Annealing für 3 min bei 68°C, die finale Extensionszeit war 7 min bei 68°C.

2.3.1.7 Kontroll – PCR zur Überprüfung der cDNA – Qualität

Von jeder Probe wurde eine Kontroll-PCR mit spezifischen Primern für die Transkripte der Gene β -Aktin, EF1- α und EGP durchgeführt. Hierzu wurden 1,0 µl des cDNA-Produktes verwendet (Jeweils 32 PCR-Zyklen für β -Aktin und EGP und 40 Zyklen für EF1- α). Die Proben waren dann für die Hybridisierung auf die Filterarrays geeignet, wenn die PCR mindestens zwei der drei PCRs positiv war.

2.3.1.8 Arrayhybridisierung

Die folgenden Versuche wurden durch Sabine Schilling etabliert und die Methode in ihrer Dissertation 2005 beschrieben.

Ziel der Hybridisierung war es cDNA auf einer geladenen Nylonmembran mit Hilfe einer markierten Sonde, die an membrangebundene DNA bindet, nachzuweisen. Ein spezifischer enzymgekoppelter Antikörper, der an die markierte Sonde bindet, visualisiert schließlich das Ergebnis. Die Konzentration der Sonden betrug 20 ng/ µl, diese wurden mittels BioGrid Roboter auf die Filter aufgetragen, wobei hierbei ein Punkt 15 ng cDNA entsprach (Schilling 2005)

Die Prähybridisierung wurde mit 50 µg/ml Escherichia coli und 50 µg/ml pBS DNA in 6 ml Dig-easy Hyb Puffer über Nacht durchgeführt. Die markierten PCR-Produkte wurden dem Prähybridisierungspuffer in einer Konzentration von 1,5 µg/ml zugegeben. Zum Verhindern von unspezifischen Bindungen wurde 100 µg Hering Sperm DNA dazugemischt. Die Hybridisierung wurde für 36–48 h bei 45°C

durchgeführt. Die folgenden Waschschrirte wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers Roche durchgeföhrt mit zwei zusätzlirhen Waschschrirten mit 0,1xSSC und 0,1%SDS für 15 min bei 68°C. Die Entwicklung der Filter wurde mit Dig Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids vonRoche durchgeföhrt.

Zum Schluss wurden die Filter auf eine saubere Folie überföhrt, danach für 15 Min bei 37°C erwärmt zum Aktivieren der Alkalischen Phosphatase. Um das Ergebniss Abzubilden wurden die fertigen Filter in einer Entwicklungsbox (Siemens) fixiert und ein Film (Scientific Imaging Film, Biomax, Kodak) darübergerlegt. Es wurden verschiedene Entwicklungszeiten durchgeföhrt (2 min, 15 min, 30 min, 1 h).

Tab. 2.1: Primer der cDNA-Sonden auf den Nylonarrays

Laborname	Genname nach dem HUGO Nomenclature Committee	Symbol	Primersequenzen
β-Aktin	Actin, beta	ACTB	5'-Primer: 5'-gtg ggg cgc ccc agg cac ca 3'-Primer: 5'-ctc ctt aat gtc acg cac gat ttg
CK 7	Keratin 7	KRT7	5'-Primer: 5'-aga gct gca gtc caa gat c 3'-Primer: 5'-cgg tag gtg gcg atc tcg a
CK 8	Keratin 8	KRT8	5'-Primer: KER8FOR 5'-cca agt tgt ccg agc tgg ag 3'-Primer: KER8REV 5'-tga gcc tca ggt ggg tct c
CK 10	Keratin 10	KRT10	5'-Primer: 5'-cag atc gac aat gcc agg ct 3'-Primer: 5'-gcc tga atc tgt gag agc tg
CK 13	Keratin 13	KRT13	5'-Primer: 5'-ctg aat gaa gag cta gcc tac 3'-Primer: 5'-cca gac gtg tct tga tgt cca
CK 18	Keratin 18	KRT18	5'-Primer: 5'-gtt ctg cag att gac aat gcc 3'-Primer: II 5'-cat gga gtc cag gtc gat c
CK 19	Keratin 19	KRT19	5'-Primer: 5'-gaa gat ccg cga ctg gta c 3'-Primer: 5'-ttc atg ctc agc tgt gac tg
CK 20	Keratin 20	KRT20	5'-Primer: 5'-tac gtc taa cag tgg aag ctg 3'-Primer: 5'-ctg gag ttc tat ctc aag gct
EF-1alpha	Eukaryotic translation elongation factor alpha 1	EE1A1	5'-Primer: 5'-tgc ccc agg aca cag aga ct 3'-Primer: 5'-ctg tgt cgg ggt tgt agc ca
Mage 1	Melanoma antigen, family A, 1	MAGEA1	5'-Primer: "gesamt" 5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 3	Melanoma antigen, familiy A, 3	MAGEA3	5'-Primer: "gesamt" 5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 4	Melanoma antigen, familiy A, 4	MAGEA4	5'-Primer: "gesamt"5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 6	Melanoma antigen, family A, 6	MAGEA6	5'-Primer: "gesamt"5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 12	Melanoma antigen, family A, 12	MAGEA12	5'-Primer: "gesamt"5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 1F	Melanoma antigen, family A, 1	MAGEA1	5'-Primer: out 5'-gta gag ttc ggc cga agg aac 3'-Primer: out 5'-cag gag ctg ggc aat gaa gac
Mage 2F	Melanoma antigen, family A, 2	MAGEA2	5'-Primer: out 5'-cat tga agg aga aga tct gcc t 3'-Primer: out 5'-gag tag aag agg aag aag cgg t
Mage 3F	Melanoma antigen, family A, 3	MAGEA3	5'-Primer: out 5'-gaa gcc ggc cca ggc tgc 3'-Primer: out 5'-gat gac tct ggt cag ggc aa
Mage 4F	Melanoma antigen, family A, 4	MAGEA4	5'-Primer: out 5'-cac caa gga gaa gat ctg cct 3'-Primer: out 5'-tcc tca gta gta gga gcc tgt
Mage 12F	Melanoma antigen, family A, 12	MAGEA12	MAGEA12 5'-Primer: out 5'-tcc gtg agg agg caa ggt tc 3'-Primer: 5'-atc gga ttg act cca gag agt a

2.3.1.9 Restriktionsenzymverdau, Annealing und Ligation der Adaptoren, Primäre PCR zur Vorbereitung der DNA – Überstände für die Comparative Genomische Hybridisierung

Nach dem Fällen der Überstände (2.3.1.4) wurde das DNA-Pellet nach zwei Waschschrritten getrocknet. Dazu kam dann 4,5 µl Proteinase K-Mix. Zum Lösen des Pellets wurde die Probe 10 min bei 40°C im Heizblock geschüttelt. Der Proteinase K Verdau lief für 15 h bei 42°C. Nachdem das zelluläre Protein entfernt war, wurde die Aktivität der Proteinase K durch 10 min bei 80°C gestoppt.

Zu der Proteinase K verdauten Probe pipettierte man 0,25 µl MSE I (50U/µl) und 0,25 µl H₂O. Der Verdau lief bei 37°C für 3 h und wurde zum Schluss bei 65°C für 5 min inaktiviert. Das Restriktionsenzym MSE I (Schnittstelle: T▼TAA) fragmentierte die DNA, wodurch 5'-TA Überhänge entstehen, an die ein Adapter aus den Oligonukleotiden LIB1 und ddMse11 ligiert werden kann. Dieser Adaptoren werden parallel zum MSE I-Verdau aneinander gebunden. Dazu beginnt man bei einer Temperatur von 65°C und kühlt mit einer Geschwindigkeit von 1°C/min bis auf 15°C herunter.

Bei 15°C wurden 1 µl ATP (10mM) und 1 µl T4-DNA-Ligase zu den MSE I verdauten Zellen pipettiert, was über Nacht bei 15°C zur Ligation des Lib1 Primer an die DNA-Fragmente führt. Zur primären Amplifikation wurde zu jeder Probe, gemäß der Anleitung des Expand™ Long Template Kits (Roche), 1µl PolMix Enzym, 3 µl 10xPCR Puffer, 2 µl dNTPs (10mM) und 35 µl Wasser dazugegeben.

Die Adapter-Enden wurden bei 68°C für 3 min aufgefüllt, wodurch komplementäre Bindungsstellen für den LIB1 Primer entstehen. Das Amplifikat konnte bei -20°C gelagert werden und diente als Ausgangsmaterial für alle folgenden DNA-Untersuchungen.

2.3.1.10 Anfertigung von Metaphase-Objektträgern zur Vorbereitung der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)

Zu 20 ml heparinisiertem Blut eines gesunden Spenders wurde ein Kulturmedium für Lymphozyten zugegeben (250 ml RPMI Medium ohne Glutamin, 15% FCS, Penicillin 200 U/ml, Streptomycin 200 U/ml, L-Glutamin 2 mM, 3mg Phytohemagglutinin), in 10 ml Kulturflaschen aufgeteilt und 3 Nächte bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Damit die Zellteilung in der Metaphase stoppt, wurden in jede Zellkulturflasche 100µl Colcemidlösung (10µg/ml) pipettiert und die Kulturen für eine Stunde weiter inkubiert.

Danach wurden sie in 15 ml Falkons überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend gab man für 8 min bei 37°C 10 ml hypotone 75 mM KCl Lösung dazu. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in einem eiskalten Fixativ (7,5 ml Methanol, 2,5 ml Eisessig 100%) vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal in 10 ml Fixativ gewaschen und abzentrifugiert. Auf diese Weise wurden die Reste der lysierten Erythrozyten entfernt. Nach diesem Schritt kann die Zellsuspension in 3 ml Fixativ bei –20°C für einige Monate aufbewahrt werden.

Vor dem Auftropfen der Zellsuspension wurden die Glasobjektträger über Nacht in Küvetten mit 70% EtOH gereinigt. Der Alkohol wurde anschließend abgegossen und die Objektträger in kaltes destilliertes Wasser auf 4°C abgekühlt.

Die in Methanol/Eisessig gelagerte Lymphozytenkultur wurde mit einer Transferpipette aus einem Abstand von ca. 50 cm auf die Objektträger aufgetropft und auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet. Nasse Tücher, die vorher auf die Heizplatte gelegt wurden erhöhten die Luftfeuchtigkeit und sollten so zu einer besseren Qualität der Metaphasen beitragen.

2.3.1.11 Markierung und Fällung der DNA für die Comparative Genomische Hybridisierung

Die Markierung der primären PCR-Produkte erfolgte mit Digoxigenin-11-dUTP für die zu testende DNA und Biotin-16-dUTP für die Referenz-DNA. Die Desoxynucleotid-Derivate wurden bei der Reamplifikation (Tab. 2.2) eingebaut und konnten dann nach erfolgreicher Hybridisierung durch Fluoreszenz gemessen werden.

Tab. 2.2: Protokoll für die Reamplifikation

Expand-Long-Template Puffer 1	4 µl
LIB1 10 µM	6 µl
7/8 dNTP-Mix	1,4 µl
1 mM Biotin-dUTP (Referenz) oder 1 mM Digoxigenin-dUTP (Tumor)	1,75 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl	1 µl
H2O	26,35 µl

Zu dem Markierungs-PCR-Mix wurde 0,75 µl des primären PCR-Produkts dazugegeben.

PCR-Programm:	1.	94°C	1 min
	2.	60°C	30 sec

3.	72°C	2 min
4.	94°C	30 sec
5.	60°C	30 sec
6.	72°C	2 min + 20 sec / Zyklus
7.	zu 4.	10 Zyklen

Nach der Reamplifikation wurde der LIB1 Primer durch einen Restriktionsverdau mit Tru I (Isozym von Mse I, Schnittstelle entsprechend T▼TAA) entfernt. 2 µl Puffer R und 2 µl Tru I (50 U/µl) wurden zu dem 40µl Reamplifikationsansatz pipettiert und für 2 bis 3 Stunden bei 65°C inkubiert.

Nach dem Markieren wurden Test – und Referenz – DNA mit Humaner Cot1-DNA und Heringssperm DNA gemeinsam über Nacht bei -20° gefällt (Tab 2.3)

Tab. 2.3: Protokoll zum Ausfällen der DNA

Dig markierte Referenz-DNA	80 µl
Biotin markierte Test-DNA	80 µl
Humane Cot1-DNA	100 µl
Heringssperm DNA	10 µl
Natrium Acetat 3M (pH 5,2)	27 µl
kalter unvergällter 100% EtOH	600 µl

2.3.1.12 Vorbehandlung der Metaphasen – Objektträger

Zuerst wurden die Objektträger unter dem Mikroskop nach geeigneten Auftragsflächen durchsucht und die Stellen markiert, an denen ausreichend Metaphasen zu finden waren. Die Objektträger wurden kurz zwei Mal in 2x SSC gewaschen. Zum Entfernen der RNA wurden sie für 1h bei 37°C mit 200µl RNase-Lösung (100 µg/ml in 2x SSC) inkubiert. Anschließend wurde die RNase durch dreimaliges 5 minütiges Waschen in 2x SSC entfernt. Zu 100 ml 10 mM HCl (pH2), das im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde, pipettierte man 50µl Pepsin-Lösung (100 mg/ml in H₂O). Abhängig von der Menge der Zytoplasmareste ließ man den Objektträger 2 bis 4 min in der Pepsin-HCl Lösung inkubieren. Indem man zwei Mal in 1xPBS wusch, wurde der Verdau gestoppt. In 200µl PFA-Lösung (50 mM MgCl₂ in PBS mit 1% PFA) wurden die Objektträger 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt fixiert das Chromatingerüst und stabilisiert die Chromosomenstruktur.

In der aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min in 70%, 85%, 100%) wurde der Objektträger dehydriert. Die getrockneten Objektträger wurden für 1 min 45 sec bis maximal 2 min in der auf 70°C vorgewärmten Formamidlösung (70 ml 100% Formamid, 10 ml 20x SSC, 20 ml H₂O, pH 7,5) denaturiert.

Die optimale Dauer der Denaturierung war abhängig von der Kondensation der Chromosomen und der Intensität des Pepsinverdau und musste individuell ausgetestet werden. Nach einer weiteren aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min in 70%, 85%, 100%) ließ man die Objektträger trocknen und pipettierte anschließend die vorbereitete DNA-Probe auf das vorher markierte Feld. Ein 18x18 mm großes Deckglas und Fixogum Montagekleber verschließen das Hybridisierungsfeld.

2.3.1.13 DNA Hybridisierung auf Metaphasen

Für den DNA-Hybridisierungsansatz wurde die präzipitierte DNA bei 4°C für 45 min mit 14000 rpm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 70% unvergälltem EtOH gewaschen und 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Alkohol wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet bei 37°C getrocknet. In 7 µl 100% deionisiertem Formamid im Heizblock bei 37°C für 45 min wurde das Pellet geschüttelt, bis sich dieses gelöst hat. Nachdem man 7 µl Master-Mix (30% Dextran Sulfat in 4x SSC) dazu pipettierte, lies man die Probe erneut für 30 min bei 37°C schütteln.

Die Probe wurde erneut abzentrifugiert und 6 min im Heizblock bei 78°C denaturiert. Anschließend ließ man die Proben für 30 bis 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren. Bei diesem Schritt hybridisierte die Cot-1 DNA an die repetitiven Sequenzen der Test/Referenz-DNA. Die Proben wurden noch kurz abzentrifugiert und konnten dann auf die vorbehandelten Metaphasen-Objektträger aufgetropft und abgedichtet werden. Die Hybridisierung erfolgte für 48–72 h in einer feuchten Kammer bei 37°C.

2.3.1.14 Entwicklung der Objektträger

Alle verwendeten Lösungen mussten vor Beginn auf 42°C erwärmt werden. Nach Entfernen des Deckglases wurde das Dextransulfat mit zwei Mal 5 min in 4x SSC auf dem Schüttler ausgewaschen. Anschließend wurde der Objektträger drei Mal bei

42°C in Formamid-Lösung (150 ml 100% Formamid, 20 ml 20x SSC, 120 ml H₂O, pH 7,5) und drei Mal in 1x SSC gewaschen.

Der Objektträger wurde nun in 1x PBS + 0,2 % Tween gewaschen und die Proteinbindungsstellen für 45 min mit 1ml 3 % Superblock-Lösung (1x PBS + 0,2% Tween pH 8.5, 3% BSA Fraktion V, 5% FCS) blockiert.

Der Objektträger wurde kurz in 1x PBS + 0,2% Tween gewaschen und anschließend für 45 min in einer feuchten Kammer im Dunkeln bei 37°C mit dem Antikörper-Mix (180 µl 1% Superblock, 20µl Anti-Digoxigenin-FITC, 2 µl Anti-Biotin Cy 3.5) inkubiert und mit einem 24x55 mm Deckglas abgedeckt.

Nicht gebundene Fluorochrome wurden durch dreimaliges Waschen für 5 min auf dem Schüttler in 4x SSC + 0,2 % Tween entfernt. Abschließend wurden die Chromosomen noch mit DAPI gegengefärbt, indem man für 2 min 1 ml DAPI-Lösung (1 ml 4x SSC + 0,2% Tween, 10 µg DAPI) auf den Objektträger gab.

Die in Wasser gespülten und getrockneten OT wurden noch mit Vectashield H-1000 und großen Deckgläsern eingedeckelt.

2.3.1.15 Auswertung der CGH

Alle bei der Auswertung der CGH verwendeten Geräte und Software stammen von Leica. Die Aufnahmen der hybridisierten Metaphasen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop, an das eine CCD-Kamera angeschlossen war, durchgeführt. Mit Hilfe der Leica-QFISH Software wurden zwischen 10 und 15 geeignete Metaphasen aufgenommen. Dazu wurden die Fluoreszenzfilter für DAPI, FITC (Test-DNA) und Cy3.5 (Referenz-DNA) verwendet. Mit der Leica-QCGH Software konnten die fotografierten Metaphasen nach der DAPI-Bänderung in ein Karyogramm sortiert werden. Nach der Normalisierung verglich die Software die Intensitäten der einzelnen Fluorochrome für jedes einzelne Chromosom. In einem Gesamt-CGH Profil wurden dann alle ausgewerteten Metaphasen einer Hybridisierung dargestellt. Bei einem Verhältnis der Intensitäten von FITC zu Cy3.5 von mehr als 1,25 handelte es sich um einen Gewinn, bei einem Verhältnis kleiner als 0,75 um einen Verlust eines Chromosomenabschnitts.

Das hier verwendete Protokoll wird bereits seit längerem erfolgreich angewandt und wurde speziell für geringe Mengen DNA etabliert (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999).

2.3.1.16 Primäre (nested) MAGE-A PCR

Nach erfolgreicher cDNA – Synthese wurde zunächst eine Präamplifikation mit 2 µl der cDNA in einem 20 µl Reaktionsgemisch mit 2 µl 10xPCR-Puffer (200 mM Tris, pH=8.0, 500 mM KCl), 0,6 µl MgCl₂(50 µM), 1,6 µl dNTP(0.2 µM), 0,2 µl hitzestabile Taq-DNA-Polymerase und je 0,4 µl der Outer-MAGE-Primer(0.2 µM) durchgeführt.

Folgendes PCR – Programm wurde verwendet:

- | | | |
|----|-------|-----------|
| 1. | 95°C | 3 min |
| 2. | 95°C | 30 s |
| 3. | 60°C | 45 s |
| 3. | 72°C | 1 min |
| 4. | zu 2. | 20 Zyklen |
| 5. | 72°C | 7 min |

2.3.1.17 QuantitativeMultimarker-Real-Time-PCR (RT-PCR)

Für die Real-Time-PCR wurden dann 15 µl Reaktionsgemisch mit 2 µl des präamplifizierten PCR Produktes, 1.5 µl FastStart DNA Master SYBR Green I Reagenz und je 10 pmol der Inner-MAGE-Primer in einer Konzentration von 2.5 µM MgCl₂ (MAGE-A1, MAGE-A3/6 und MAGE-A4) und 3.0 µM MgCl₂ (MAGE-A2, MAGE-A10 und MAGE-A12) verwendet.

PCR – Programm für MAGE:

- | | | |
|----|----------|-----------|
| 1. | 95°C | 5 min |
| 2. | 95°C | 10 s |
| 3. | 60°C | 5 s |
| 4. | 72°C | 10 s |
| 5. | zu 2 | 40 Zyklen |
| 6. | bis 95°C | + 0,1°/s |

PCR – Programm für PBGD:

- | | | |
|----|------|-------|
| 1. | 95°C | 5 min |
|----|------|-------|

2. 95°C 15 s
3. 60°C 10 s
4. 72°C 20 s
5. zu 2 40 Zyklen
6. bis 95°C + 0,1°/s

Nach Abschluss des Reaktionszyklus wurden die PCR-Produkte einer Schmelzpunktanalyse unterzogen.

2.3.1.18 Gelelektrophorese

Die Spezifität der Amplifikation wurde durch Elektrophorese im Agarosegel überprüft (1,5 % Agarose in 1x TBE). SYBR Gold (Verdünnung 1:1600) wird mit dem Probenlaufpuffer Dye im Verhältnis 1:2 gemischt. Davon werden jeweils 3 µl SYBR-Dye-Mix zu jedem PCR-Produkt dazugegeben und auf das Gel aufgetragen. Als Marker pipettiert man 4 µl SYBR Gold (1:1600) zu 10 µl 1kb-Marker (Ladder). Durch Anlegen einer Spannung von 100–150 V bei 400 mA und einer Laufzeit von 30–60 min (je nach gewünschter Auftrennung) werden die PCR-Produkte im Horizontal-Gelelektrophorese-System aufgetrennt. Anschließend kann das Gelbild auf dem UV-Transilluminator und mit Hilfe einer CCD-Kamera photographiert und digital gespeichert werden.

2.3.2 Untersuchung der Lymphknotenproben

Die Lymphknotenproben wurden mediastinoskopisch oder mittels endobronchialen Ultraschall mit Biopsieentnahme gewonnen.

2.3.2.1 RNA Isolation aus Proben nach Mediastinoskopie

Nach Mediastinoskopie wurden die Proben in 500 µl RNAlater (Qiagen) bei -20° gelagert. Vor der RNA-Extraktion wurden die Proben mittels Pinzette aus dem RNAlater entfernt und in Puffer RLT mit β-Mercaptoethanol gegeben. Damit es zu einer besseren Auflösung der Zellmembranen kommt, wurden die Proben zusätzlich gemörsert. Danach wurden die Proben nach dem Protokoll von Qiagen zur RNA-Extraktion (RNeasy®MiniKit) verarbeitet. Das verwendete Säulensystem beruht auf

dem Grundprinzip, dass die RNA selektiv an die Silica-Gel-Membran im Inneren der Säulen bindet. Kontaminationen, DNA und Proteine werden mit mehreren Waschschritten entfernt. Das dazugegebene Ethanol soll die Bindebedingungen verbessern. Die RNA wird mit 50 µl Wasser aus der Membran entfernt.

2.3.2.2 RNA Isolation aus Proben nach Endobonchialem Ultraschall mit Biopsieentnahme

Die Feinnadelaspirate wurden gleich nach Punktion in Puffer RLT mit β -Mercaptoethanol (Qiagen) bei -80° gelagert. Einen Einfluss der Lagerzeit auf die Qualität der RNA konnten wir nicht feststellen. Nach Auftauen der Proben wurde die RNA-Extraktion (RNeasy[®]MiniKit) nach dem Protokoll von Qiagen durchgeführt.

2.3.2.3 Bestimmung der RNA – Konzentration

Dazu wurde ein µl RNA der Probe nach RNA-Extraktion mit 49 µl Wasser verdünnt, in einer Galsküvette in das Photometer eingebracht, so dass die genaue Konzentration der Lösung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt werden konnte. Die RNA wurde danach bei -80° gelagert.

2.3.2.4 cDNA-Synthese und β -Aktin- Kontroll-PCR

Zur weiteren cDNA-Synthese wurde immer 500 ng der Gesamt-RNA in einer 20 µl PCR-Lösung. Die cDNA-Synthese wurde mittels dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) von Roche durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe einer reversen Transkription umgeschrieben.

PCR – Programm:

- | | |
|-------------------------|--------|
| 1. 25°C | 10 min |
| 2. 42°C | 60 min |
| 3. 99°C | 5 min |

Zur Ergebnistestung wurde eine β -Aktin PCR durchgeführt. Zu 1 µl cDNA wurden 99 µl Kontroll-PCR-Mix (Tab. 2.4)dazugegeben.

10xPCR Puffer	10 μ l
10 mM dNTPs	2 μ l
dNTP (10 mM)	2 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	3 μ l
β -Actin 10 μ M 3'	5 μ l
β -Actin 10 μ M 5'	5 μ l
Taq DNA Polymerase	0.5 μ l
H ₂ O	74 μ l

PCR – Programm:

1. 94°C 3 min
2. 94°C 45 sec
3. 55°C 30 sec
4. 72°C 1 min 30 sec
5. zu 2. 30 Zyklen

Eine spezifische Bande wurde bei 206 bp erwartet (Abb. 2.3).

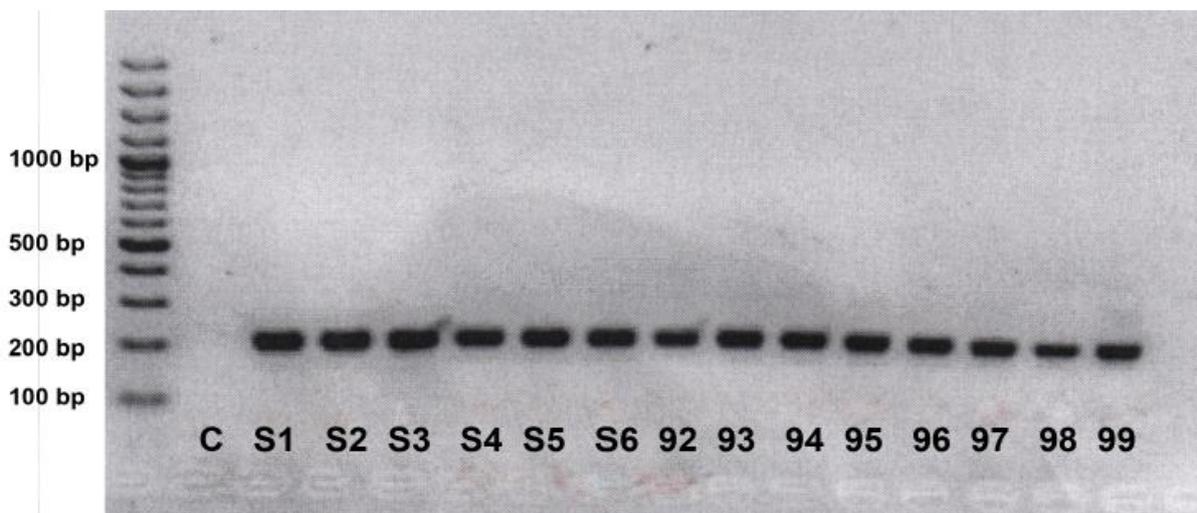


Abb. 2.2: Beispiel der Gelelektrophorese nach β -Aktin PCR. C ist der Leerwert der Kontroll-PCR, S1-S6 ist der Standard, 92-99 sind die Proben. Eine positive Bande für β -Aktin wurde bei 206 Bp erwartet.

2.3.2.5 Primäre MAGE-A 1-6 und MAGE A 12 PCR

Zur Bestimmung der MAGE Expression in den Lymphknotenproben wurde ein Primer gewählt, der fast alle MAGE-A Gene abdeckt. Da er nur zu 80% an MAGE 12 bindet, wurde für MAGE A12 zusätzlich ein spezifischer Primer, wie unter 2.3.1.16 beschrieben, verwendet (Mecklenburg, Weckermann et al. 2007).

Zur primären Amplifikation wurde 1 µl cDNA zu 99 µl nested – PCR Mix (Tab. 2.5) dazugegeben. Die verwendeten Primer sind MMRP1 und MMRP2 zur Amplifikation von MAGE 1-6 und MAGE 12 inner Primer 3' und 5' zur Amplifikation von MAGE 12.

Tab. 2.5: Protokoll für den nested-PCR-Mix:

10xPCR Puffer	10 µl
10 mM dNTPs	2 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl
Primer 5 µM 3'	5 µl
Primer 5 µM 5'	5 µl
Taq DNA Polymerase	0.5 µl
H ₂ O	74 µl

PCR – Programm für MAGE 1-6:

1. 95° 5 min
2. 95° 30 sec
3. 60° 45 sec
4. 72° 45 sec
5. zu 2. 15 Zyklen
6. 72° 10 min

Für MAGE 12 wurde eine Amplifikation von 20 Zyklen durchgeführt.

2.3.2.6 Quantitative Multimarker-Real-Time-PCR (RT-PCR)

Zum Unterschied zur MAGE Analyse der Primärtumore (2.3.1.17) wurde die Quantifizierung der MAGE Expression der Lymphknotenproben mit dem LightCycler 480 von Roche durchgeführt. Das verwendete Kit war LightCycler 480 SYBR Green I Master.

Für die Quantifizierung von MAGE 1-6 und MAGE 12 wurden 2 µl der primären PCR verwendet. Dazu wurden insgesamt 18 µl eines Ansatzes bestehend aus 4 µl PCR –

Reagenz, je 2 µl des verwendeten Primers und 10 µl SYBR MasterMix. Das Gemisch wurde in eine 384 well Platte pipettiert. Vor Beginn der Analyse wurde die Platte abzentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Von jeder Probe wurden Dreifachansätze verwendet.

PCR – Programm für PBGD, MAGE 1-6 und MAGE 12:

1. 95° 5 min
2. 95° 15 sec
3. 61° 10 sec
4. 72° 20 sec
5. zu 2 40 Zyklen
6. bis 95° + 0,1°/sec

Zur Verifizierung der Spezifität des Produktes wurde zuerst eine Schmelzkurven – Analyse durchgeführt und im Anschluss eine Ethidiumbromid Gelelektrophorese durchgeführt. Im Unterschied zur Gelelektrophorese wie in 2.3.1.17 beschrieben wurde Ethidiumbromid statt SYBR als Fluoreszenzfarbstoff verwendet.

Als Standard wurde die Zelllinie HT29 verwendet. Nach RNA – Extraktion hatte diese eine Konzentration von 365 ng/µl. Es wurde jeweils 500 ng für die cDNA – Synthese verwendet. Eine Verdünnungsreihe davon wurde als interne Standardkurve bei jeder quantitativen PCR mitgemacht (Abb. 2.4 und 2.5). Für die MAGE 1-6 und MAGE 12 PCR wurde auch mit dem Standard die nested PCR durchgeführt.

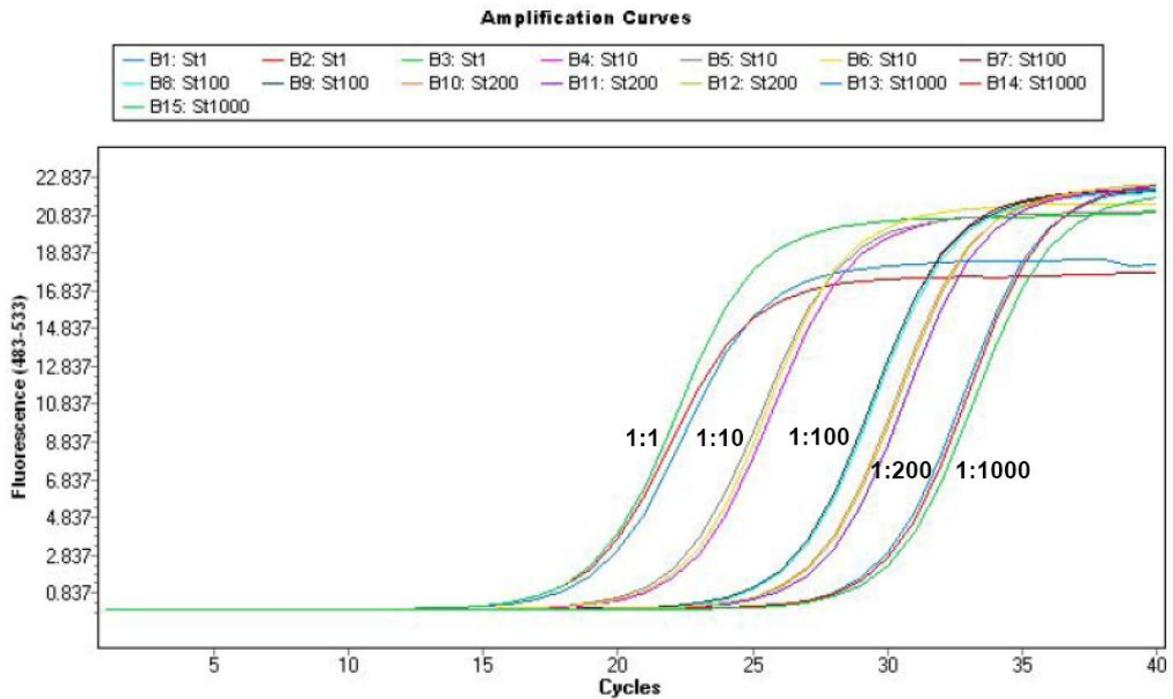


Abb 2.4: Grafik der Real-Time-Amplifikation. RNA wurde aus HT29 Tumorzelllinie gewonnen. Die cDNA Synthese, primäre MAGE 1-6 und MAGE 12 PCR wurden nach Protokoll durchgeführt. Danach wurden Verdünnungen 1:1, 1:10, 1:100; 1:200; 1:1000 durchgeführt. Die Grafik zeigt das Ergebnis nach quantitativer MAGE 1-6 PCR.

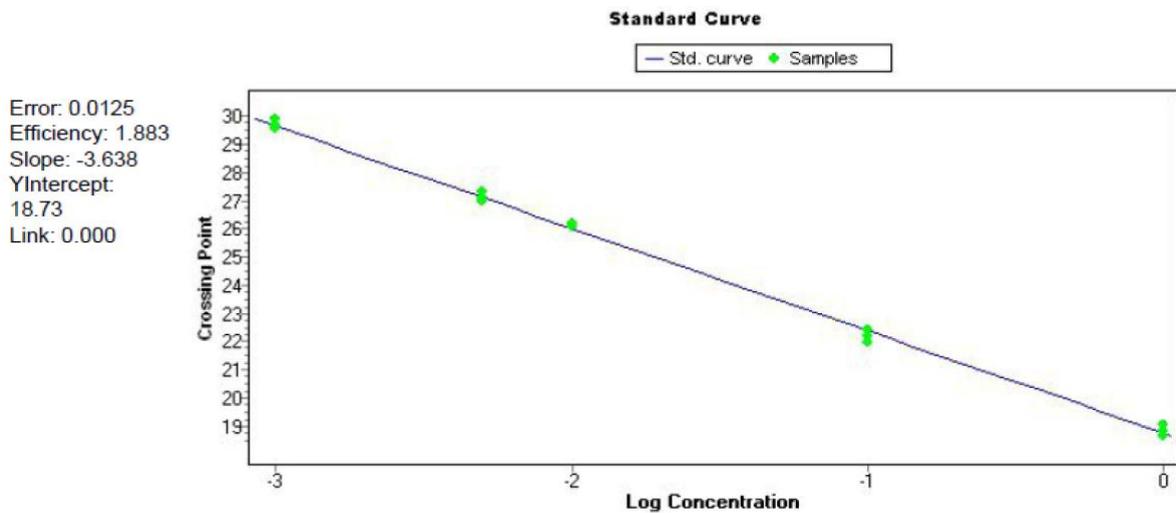


Abb 2.5: Grafik der Real-Time-PCR, Standardkurve. Die Standardkurve entsteht durch Auftragen des jeweiligen Anstiegs-Zyklus gegen den Logarithmus der Konzentration der jeweiligen Probe. Die Neigung der Kurve zeigt die Effizienz der PCR (gut: $E > 1,7$).

2.4 Patientenkollektiv

Im Zeitrahmen von Oktober 1999 bis August 2001 wurden Gewebeproben von operierten Nicht – Kleinzelligen Lungenkarzinomen aus der Asklepios Klinik (Zentrum

für Pneumologie und Thoraxchirurgie, München-Gauting) gewonnen. Von diesem Kollektiv wurden 28 Proben von 22 Patienten analysiert (Tab 2.1).

Abb 2.6: Klinische Charakteristiken der Patienten (n=22) Das Tumorstadium wurde entsprechend der TNM – Klassifikation eingeteilt.

Charakteristik	Patienten n	Patienten %
Alter		
0 - 33	0	0
34 - 60	5	23
61 - 75	10	45
>76	7	32
Histologie		
Adenokarzinom	14	64
Plattenepithelkarzinom	7	32
Metastase	1	1
Tumorstadium		
IA - IIB	12	57
IIIA - IIIB	9	43

Im Zeitrahmen von Oktober 2007 bis Mai 2009 wurden 120 Patienten mit unklarer Lymphadenopathie, Verdacht auf Lungenkarzinom untersucht und prospektiv in diese Analyse aufgenommen. Davon wurde bei 89 Patienten ein Lungenkarzinom diagnostiziert (klinisches Stadium IIA- IIIB) und 31 Patienten hatten benigne Erkrankungen (Sarkoidose, Tuberkulose, Anthrakosilikose oder reaktive Lymphadenopathie). Das Alter der Patienten war zwischen 33 – 88 Jahren. Alle Patienten wurden in der Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Freiburg behandelt. Routinemäßig wurde von den Patienten zum Staging ein CT-Thorax, eine Bronchoskopie, EBUS-TBNA und/oder eine MSK durchgeführt. Zur Durchführung der EBUS-TBNA wurde ein Olympus ViziShot® System verwendet, welches mit einem 7,5 MHz Ultraschallkopf ausgestattet war. Mit einer 21-gauge Nadel wurde in den jeweiligen Lymphknoten 3-5 mal biopsiert, wie in der Literatur beschrieben (Herth et al.). Vor einem Wechsel zum nächsten Lymphknoten wurde die Nadel, wie vom Hersteller angegeben, gereinigt. Die Probe wurde zunächst durch den Durchführer visuell begutachtet, danach zum Pathologen gebracht, welcher die Probe mikroskopisch und zytologisch untersuchte. Im Falle negativer Lymphknoten wurde eine MSK durchgeführt, falls diese ebenfalls negativ ausfiel bei V.a. Lungenkarzinom

wurde der Patient Thorakotomiert, mit intraoperativer Lymphadenektomie. Das pathologische Ergebnis nach MSK oder THT wurde als Bezugsgrenze verwendet. Bei den Proben handelte es sich um Lymphknoten der Stationen 4R, 4L und 7 nach EBUS-TBNA und 2R, 2L, 4R, 4L und 7 nach MSK. Bei ipsilateral positiven Lymphknoten wurde der Patient als pN2 eingeteilt, bei contralateral positiven Lymphknoten als pN3. Die Einteilung erfolgte nach dem TNM-System, UICC 2010.

Tab 2.2 Klinische Charakteristiken der Patienten (n=120)

Charakteristik	Patienten	
	n	Patienten %
Alter		
0 - 33	1	1
34 - 60	36	30
61 - 75	65	54
>76	18	15
Histologie		
Plattenepithelkarzinom	29	24
Adenokarzinom	40	33
Großzelligeskarzinom	7	6
Kleinzelligeskarzinom	13	11
Gutartige Veränderungen	31	26
Gesamt	120	100
Tumorstadium		
IA - IIB	21	24
IIIA-IIIB	68	76
Tumor Größe		
pT1	9	10
pT2	50	56
pT3	12	14
pT4	18	20
Hilläre oder mediastinale Lymphknoten		
pN0	19	21
pN1	7	8
pN2	41	46
pN3	22	25
Gesamt Lungentumor	89	100

3 Ergebnisse

Für die Wahl der Therapie von Lungenkarzinomen ist ein adäquates Staging und insbesondere der Befall der mediastinalen Lymphknoten entscheidend. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde getestet, inwieweit molekulare Untersuchungen die etablierten histopathologischen bzw. zytologischen Methoden unterstützen können. Hierfür wurden Lymphknotenproben von Patienten mit Verdacht auf Lungenkarzinom mittels qPCR auf die Expression von MAGE-A Genen und CK19 untersucht. Zusätzlich wurden an Gewebeproben eines zweiten Patientenkollektiv die Expression von MAGE-Genen in Primärtumoren und ein möglicher Zusammenhang mit chromosomalen Veränderungen untersucht. Ein Überblick des diagnostischen Vorgehens zeigt Abbildung 3.1.

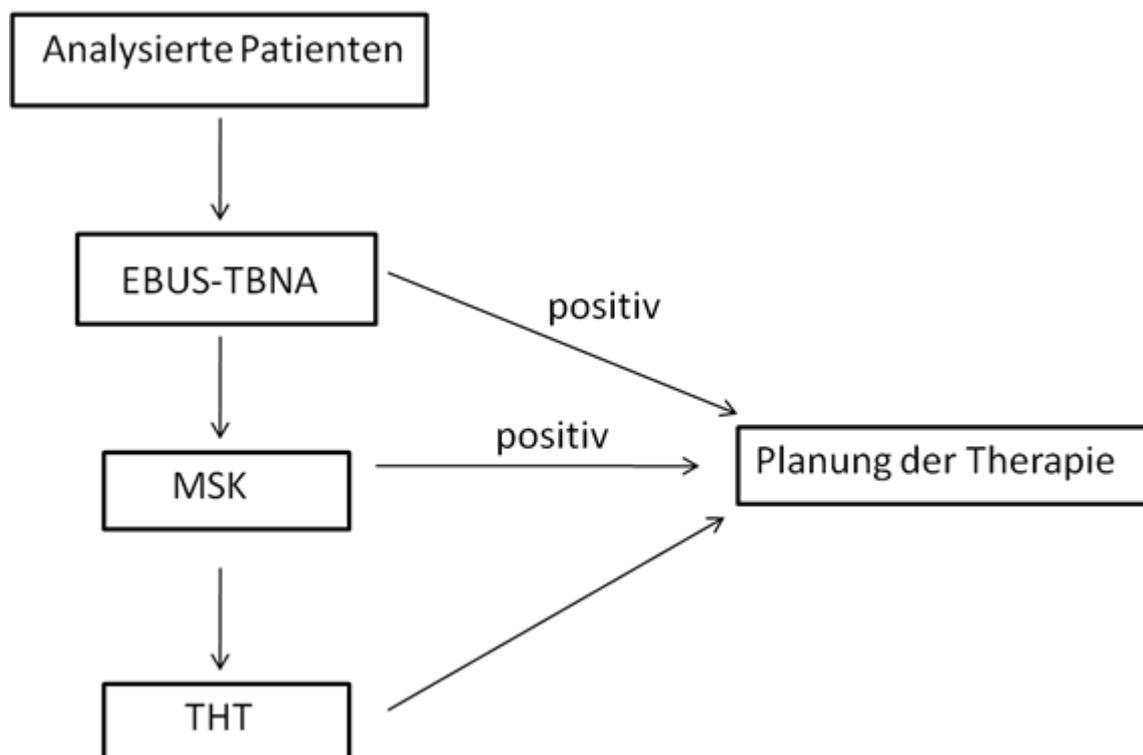


Abb. 3.1 Schema des diagnostischen Vorgehens bei Patienten mit Verdacht auf Lungenkarzinom. Zum Staging wurden die mediastinalen Lymphknoten zunächst mittels EBUS-TBNA untersucht. Bei positiven Ergebnissen (pN2) wurde die weitere neoadjuvante Therapie geplant, bei negativen Ergebnissen wurden die mediastinalen Lymphknoten mittels MSK untersucht.

Falls kein Tumornachweis erbracht wurde, wurden die Patienten thorakotomiert mit intraoperativer Lymphadenektomie. Als Referenz für diese Studie wurde die letzte klinische Untersuchung des Patienten verwendet (MSK, falls diese positiv, oder letztendlich die THT, falls der Patient operiert wurde).

3.1 Etablierung der RNA Isolierung aus EBUS-TBNA und MSK Proben

Im Routine-Staging von Patienten mit Verdacht auf Lungenkarzinom, werden die mediastinalen Lymphknoten zunächst mittels Endobronchialem Ultraschall (EBUS-TBNA) und danach zum Ausschluss eines falsch negativen Ergebnis mittels der sensitiveren Mediastinoskopie (MSK) auf gestreute Tumorzellen untersucht. In der vorliegenden Studie wurde nach der Gewinnung der Lymphknoten durch EBUS-TBNA oder MSK ein Teil der Probe zur Routinediagnostik in die Pathologie geschickt, während aus einem zweiten Teil der Probe total-RNA isoliert wurde, die danach mittels quantitativer PCR untersucht wurde. Die Verteilung der Proben erfolgte zufällig. Als Marker für den Nachweis disseminierter Tumorzellen mit Hilfe der qPCR wurde zunächst CK19 gewählt, ein epithelialer Marker, der breite Anwendung als Tumormarker findet.

Nach RNA Isolierung aus den Lymphknotenproben, wurde diese in cDNA umgeschrieben und danach mittels real-time PCR amplifiziert (Abbildung 3.1.1). Sowohl Proben nach EBUS-TBNA, als auch nach MSK wurden zunächst in einer speziellen RNA-stabilisierenden Lösung (RNA-later) gesammelt. Da es jedoch schwierig war die einzelnen Zellen nach EBUS-TBNA aus der RNA-later Lösung zu isolieren, war die Konzentration der gewonnen RNA aus EBUS-TBNA Proben dementsprechend gering. Zur Verbesserung der Ausbeute wurden die Proben nach EBUS-TBNA sofort in Puffer RLT und β -Mercaptoethanol überführt. Dieser Puffer dient laut dem Herstellerprotokoll zur Auflösung der Zellmembran im Rahmen der RNA-Extraktion. Da er ebenfalls RNA-stabilisierende Eigenschaften hat, konnten die EBUS-TBNA Proben darin gelagert werden, allerdings bei deutlich niedriger Temperatur als die Proben nach Mediastinoskopie (-80° , statt -20° , wie für RNA later empfohlen). Diese Änderung in der RNA-Präparation führte zu einer deutlich gesteigerten Ausbeute (Tab. 3.1.1.).

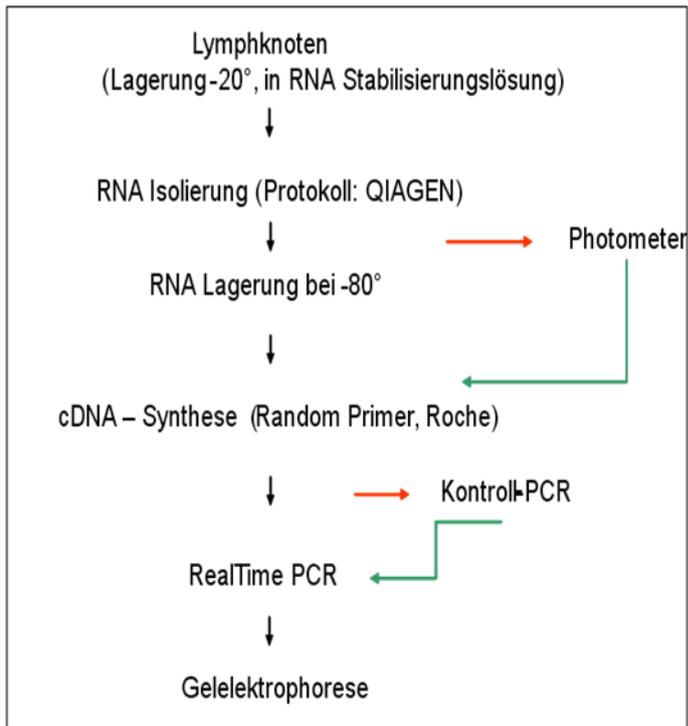


Abb. 3.1.1 Aufarbeitung der Lymphknotenproben. Arbeitsschritte im Überblick. Zur Stabilisierung der RNA wurden alle Proben in einer RNA- Stabilisierungslösung (RNAlater) gelagert, unabhängig ob sie mittels MSK oder EBUS-TBNA gewonnen wurden.

Tab. 3.1.1. Ergebnisse der RNA Extraktion von EBUS-TBNA Proben.

Probe	RNA later		RLT + β -Mercaptoethanol	
	RNA-Konz ($\mu\text{g/ml}$)	β -Aktin PCR	RNA-Konz ($\mu\text{g/ml}$)	β -Aktin PCR
1	0	neg	n.d.	n.d.
2	0	neg	n.d.	n.d.
3	0	neg	n.d.	n.d.
4	0	neg	n.d.	n.d.
5	0	neg	20	pos
7	0	neg	5	pos
22	n.d.	n.d.	25	neg
23	n.d.	n.d.	90	pos
24	n.d.	n.d.	0	pos
25	n.d.	n.d.	50	pos
26	n.d.	n.d.	5	pos
27	n.d.	n.d.	100	pos

3.2 CK19 als Tumormarker in Lymphknotenproben nach EBUS-TBNA

Ein Überblick des diagnostischen Vorgehens zeigt Abbildung 3.2.1. Besondere Sorgfalt wurde zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse verwendet. Von 58 Patienten mit Verdacht auf Lungenkarzinom wurden 86 Proben mittels EBUS-TBNA gewonnen, und von 22 Patienten, 37 Proben mittels MSK. Von 11 Patienten wurden 14 Proben zunächst mittels EBUS-TBNA gewonnen, danach mittels MSK. In der Kontrollgruppe wurden von 20 Patienten, 28 Proben nach EBUS-TBNA untersucht und von 6 Patienten, 8 Proben nach MSK analysiert. CK19 war in der Tumorgruppe in 84/86 (98%) der Proben nach EBUS-TBNA nachweisbar, aber auch in 28/28 (100%) der Proben in der Kontrollgruppe. Nach MSK war CK19 in 16/37 (43%) nachweisbar, in der Kontrollgruppe in 0/8 Proben. Dies ergibt eine Sensitivität von 98%, bei einer Spezifität von 0% (Tab. 3.2.1). Da CK19 nur nach EBUS-TBNA falsch positiv war, nicht aber nach MSK, musste das Problem an der Methode der EBUS-TBNA liegen, nicht an dem gewählten Primer, oder der PCR. Da man während der EBUS-TBNA aus dem Bronchialsystem heraus die Lymphknoten punktiert, wurden die Lymphknotenproben offenkundig mit dem normalen Bronchialepithel kontaminiert.

Nach diesen Ergebnissen wurde CK19 als Primer zur Erkennung von Tumorzellen in Proben nach EBUS-TBNA nicht weiter verwendet.

Tab. 3.2.1 CK19 Expression in Lymphknotenproben

		Kontrolle	Maligne Erkrankung	Gesamt	p*
EBUS-TBNA	Negativ	0	2	2	0,64
	Positiv	28	84	84	
	Gesamt	28	86	114	
MSK	Negativ	8	21	29	0,02
	Positiv	0	16	16	
	Gesamt	8	37	45	

*Die p-Werte wurden mittels Pearson's Chi Quadrat Test ermittelt

3.3 Die MAGE PCR Etablierung

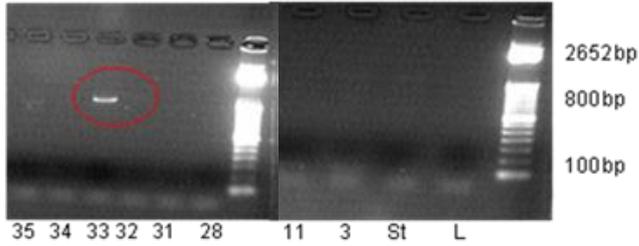
Die Familie der Melanoma-Antigene (MAGE) gelten als tumorspezifische Marker. In der Literatur wird ein Primerpaar für eine Consensus-Sequenz aller MAGE-A Gene beschrieben, der sich als deutlich sensitiver herausstellte, als ein Panel spezifischer Primer für jedes einzelne MAGE Gen (Park, Kwon et al. 2002). Da dieses Primerpaar (MAGE A1-6) jedoch nur zu 80% an MAGE 12 Sequenzen bindet, welches als relevant für das Lungenkarzinom beschrieben wurde (Mecklenburg, Weckermann et al. 2007), wurde zusätzlich ein Primerpaar für das MAGE A12 Gen (MAGE 12) verwendet .

In der ersten Versuchsreihe war die Sensitivität der MAGE PCR deutlich niedriger, als die der Routine-Zytologie (Tab. 3.3.1). Alle MAGE-Proben waren negativ, unabhängig ob es sich um Patienten aus der Kontrollgruppe (0/7) oder der Tumorgruppe (0/3) handelte. Bei der Kontrollgruppe handelt es sich um Patienten mit Sarkoidose oder reaktiver Lymphadenopathie. Aus diesem Grund musste zunächst die Sensitivität der MAGE-PCR verbessert werden. Dazu wurde vor der quantitativen PCR eine zusätzliche nested-PCR durchgeführt. Die MAGE A 1-6 nested PCR wurde nach dem Protokoll von Park et al. durchgeführt, in dem 30 Zyklen der primären PCR vorgeschlagen wurden.

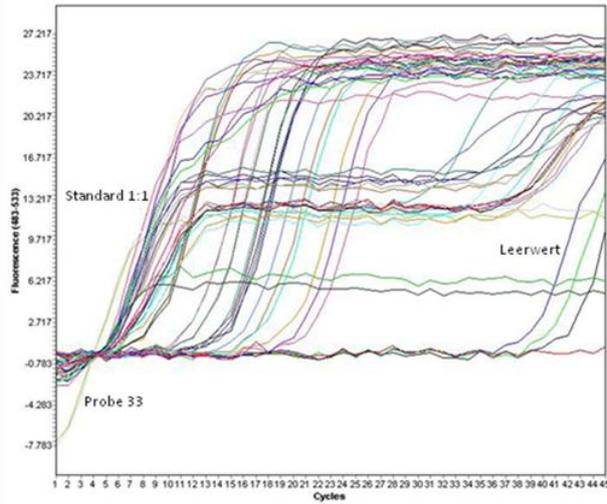
Nach 30 Zyklen konnte bereits bei einer Probe eine Amplifikation detektiert werden (Abb. 3.3.1 A), was bei der nachgeschalteten real-time PCR von 40 Zyklen eine Auswertung unmöglich machte, da das Signal zu intensiv war (Abb. 3.3.1 B).

Nach mehreren Versuchen zeigte sich, dass 15 Zyklen nested PCR für MAGE A 1-6 ausreichend sind, das erzielte MAGE Signal war für die weitere Auswertung optimal (Abb. 3.3.1C). Für MAGE A 12 wurden wie in der Literatur beschrieben 20 Zyklen der primären PCR belassen, (Kufer, Zippelius et al. 2002; Mecklenburg, Weckermann et al. 2007). Nach verändertem Protokoll (Abb. 3.3.2) konnte nun in 34% der Lymphknotenproben nach EBUS-TBNA und in 86% der Lymphknotenproben nach MSK MAGE nachgewiesen werden (Tab. 3.3.1), während in der Kontrollgruppe kein MAGE nachweisbar war.

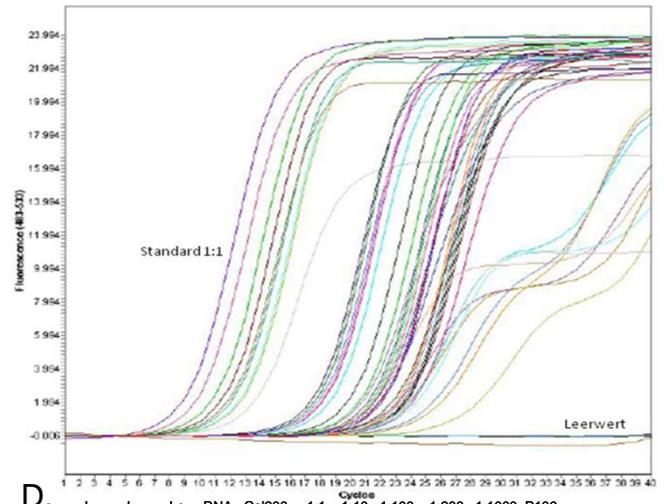
A.



B.



C.



D.

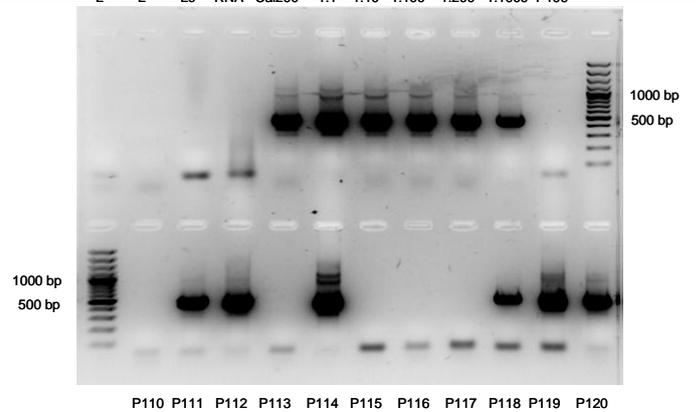


Abb. 3.3.14.1

- A. **Gelelektrophorese nach 30 Zyklen nested PCR.** Rechts im Bild der Leerwert (L) und der Standard (St), Danach die Proben 3,11, 31 bis 35, links im Bild auffällig die Bande bei 831-855 bp der Probe 33, welche bereits nach 30 Zyklen nested PCR sichtbar wird und dadurch die Auswertung mittels quantitativer PCR (B) unmöglich macht.
- B. **MAGE-A 1-6 qPCR nach 30 Zyklen nested PCR.** Eine sinnvolle Auswertung ist hier nicht mehr möglich, da das Signal der Probe 33 und des unverdünnten Standards bereits vor dem ersten Zyklus messbar sind.
- C. **MAGE-A 1-6 qPCR.** Das erste Signal vom unverdünnten Standard ist nach 6 Zyklen angestiegen, danach folgen die Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:200, 1:1000 der Standardkurve
- D. **Gelelektrophorese nach MAGE-A1-6qPCR**
Das erwartete Produkt liegt zwischen 469 bp – 493 bp
Die Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:200, 1:1000 gehören zur Standardkurve. Es wurden 3 Leerwerte verwendet (L, L und Lc, der Leerwert von der cDNA-Synthese), dazu als Leerwert eine Probe, welche nur RNA beinhaltet, als Kalibrator diente der Standard mit der Verdünnung 1:200 (Cal 200). Die Proben P110 – P120 sind Lymphknotenproben nach EBUS-TBNA von Patienten mit Verdacht auf Lungenkarzinom.

Tab. 3.3.1 MAGE Expression in Lymphknotenproben vor (MAGE A 1-6) und nach nestedPCR (nMAGE A1-6 / nMAGE A12). Die Proben wurden mittels EBUS-TBNA und mittels MSK gewonnen.

		MAGE A 1-6 /12		nMAGE A1-6		nMAGE A12		Gesamt
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	
EBUS-TBNA	Kontrolle	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	7 (100%)	1 (14%)	6 (86%)	7
	Maligne	0 (0%)	3 (100%)	1 (34%)	2 (66%)	1 (34%)	2 (66%)	3
MSK	Kontrolle	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	2
	Maligne	0 (0%)	7 (100%)	6 (86%)	1 (14%)	6 (86%)	1 (14%)	7

Durch die beschriebene Anpassung des PCR-Protokolls konnte die Sensitivität der MAGE PCR deutlich angehoben werden. Die Spezifität wurde nach jeder Analyse mit einer Schmelzkurvenanalyse bestimmt und einer zusätzlich durchgeführten Ethidium-Bromid-Gelelektrophorese des qPCR-Produktes durchgeführt. Abbildung 3.3.1 D zeigt die Gelelektrophorese nach einer qPCR MAGE A 1-6. Die erwartete Produktlänge liegt in einem Bereich zwischen 469 und 493 bp, da der Primer mehrere MAGE Gene abdeckt. Die zusätzliche dünne Bande bei 831–855 bp entsteht durch das PCR-Produkt der vorgeschalteten nested PCR. Als Positivkontrolle für alle Experimente diente die Kolonkarzinomzelllinie HT29, in welcher alle MAGE Gene in hoher Intensität exprimiert werden. Die interne Standardkurve, welche bei jeder quantitativen PCR durchgeführt wurde, stammt von HT29 cDNA, beziehungsweise dem Amplifikationsprodukt nach MAGE A 1-6 oder MAGE A 12 nested PCR.

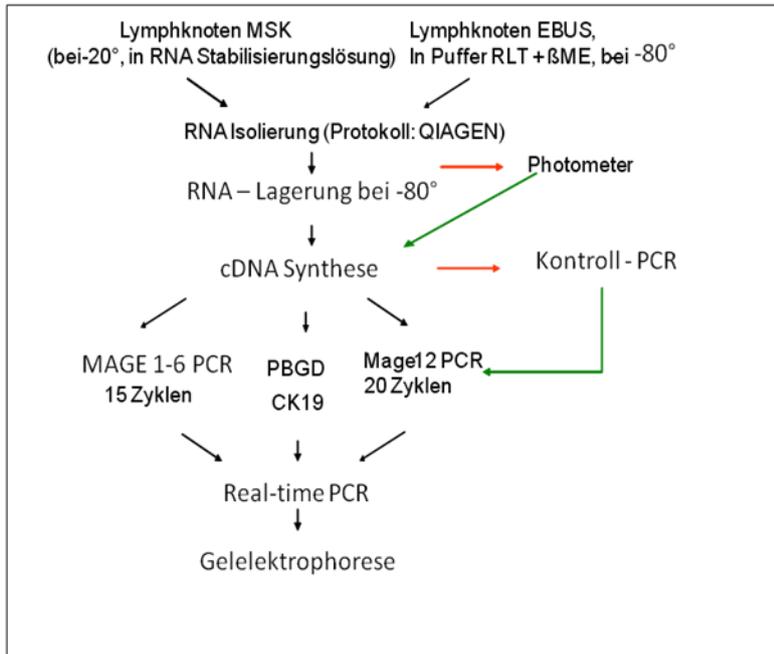


Abb. 3.3.2: Aufarbeitung der Lymphknotenproben. Angepasstes Protokoll.

3.4 Die MAGE - Expression in Lymphknotenproben

Als nächstes wurde die MAGE-Expression in 60 Lymphknotenproben von 31 Patienten ohne Nachweis einer Tumorerkrankung untersucht, da in der Literatur eine MAGE-Expression in verschiedenen chronischen Lungenerkrankungen nachgewiesen wurde (Jang, Soria et al. 2001), (Kim, Kim et al. 2010), (Mecklenburg, Stratakis et al. 2004; Liu, Killian et al. 2010). Davon wurden 40 Proben mittels EBUS-TBNA gewonnen und 20 nach MSK. In 56 Proben (93,3%) konnte keine MAGE A 1-6 Expression nachgewiesen werden, 54 (90%) waren MAGE A12 negativ. In 4 Proben konnte MAGE A 1-6 nachgewiesen werden (relative Quantifizierung: 0,0008, 0,011, 0,060 und 0,07, von 2 Patienten mit Sarkoidose, einem mit Anthrasilikose, und einer mit reaktiver Lymphadenopathie), und in 6 Proben MAGE A12 (relative Werte: 0,055; 0,061; 0,100; 0,130; 0,211 und 0,616; davon waren 4 Proben von Patienten mit Sarkoidose, einer mit Tuberkulose und einer mit reaktiver Lymphadenopathie). In dieser Gruppe waren keine Proben, welche MAGE A1-6 und MAGE A12 positiv waren. Aufgrund der niedrigen Werte nach relativer Quantifizierung wurde ein Schwellenwert bestimmt, oberhalb dessen die Proben MAGE positiv gewertet wurden. Der Schwellenwert wurde anhand des 95% Konfidenzintervalls der positiven Werte in der Kontrollgruppe berechnet. Dies ergab 0,091 für MAGE A1-6 und 0,420 für MAGE A12 (Tab. 3.4.1)

Tab. 3.4.1 MAGE A1-6 und MAGE A12 Expression in Lymphknotenproben

	n	MAGE A 1-6		MAGE A 12	
		vor Korrektur*	nach Korrektur [#]	vor Korrektur*	nach Korrektur [#]
Lymphknotenproben von Kontrollpatienten					
EBUS-TBNA	40	3 (7,5%)	0	2 (5,0%)	0
Median [§]		0,06		0,8	
Bereich [§]		0,011-0,07		0,061-0,10	
MSK	20	1 (5,0%)	0	4 (20,0%)	1 (5,0%)
Median [§]		0,00008		0,17	0,62
Bereich [§]				0,055-0,62	
Lymphknotenproben von Tumorpatienten					
EBUS-TBNA	122	50 (41,0%)	35 (28,7%)	29 (23,8%)	9 (7,4%)
Median [§]		0,69	1,36	0,2	4,55
Bereich [§]		0,0021-30,47	0,10-30,4	10 ⁻¹⁰ -24,5	0,60-24,5
MSK	80	31 (38,8%)	16 (20,0%)	42 (52,5%)	9 (11,3%)
Median [§]		0,1	3,24	0,058	3
Bereich [§]		0,0043-2878	0,10-2078	0,00007-2,2	0,57-25,2

*Alle Proben mit nachweisbarer MAGE Expression wurden als positiv gewertet

Nur Proben oberhalb des Schwellenwertes (bestimmt anhand von 95% des Konfidenzintervalls des positiven Proben in der Kontrollgruppe) wurden positiv gewertet: oberhalb 0,091 für MAGE A 1-6 und 0,420 für MAGE A 12.

§ Median und Bereich der quantitativen Werte nach qPCR

Um zu überprüfen, ob die MAGE-qPCR die Routine-Verfahren im Staging verbessern kann, wurden unter Verwendung des Schwellenwertes 202 Lymphknotenproben von 89 Patienten mit Lungenkarzinom untersucht. 122 Proben von 69 Patienten wurden mittels EBUS-TBNA gewonnen, und 80 Proben von 44 Patienten mittels MSK. Der Nachweis von MAGE 1-6 mRNA wurde in 35/122 (28,7%, Median der relativen Quantifizierung 1,36, Werte zwischen 0,100-30,4) und MAGE 12 in 10/122 EBUS-TBNA Proben nachgewiesen (8,2%, Median der relativen Quantifizierung 4,55 Werte zwischen 0,60-24,5) erbracht. Nach MSK wurde MAGE 1-6 in 16/80 Proben nachgewiesen (20,0%, Median der relativen Quantifizierung 3,24, Werte zwischen 0,100-2878) und MAGE 12 mRNA in 9/80 (11,3%, Median der relativen Quantifizierung 3,0, Werte zwischen 0,570-25,2). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen MAGE A 1-6 oder MAGE A 12 Expression nach EBUS-TBNA und MSK mit

dem Befall der Lymphknoten bei Lungenkarzinompatienten ($p=0,004$ und $p=0,033$). Es zeigte sich keine Korrelation der MAGE-Expression zum Alter der Patienten, Histologie des Tumors oder der TumorgroÙe (Tab. 3.4.2). Aber es ergab sich eine Korrelation zwischen hohen MAGE 1-6 und MAGE 12 Werten (Abb. 3.4.1; Spearman-Rho $r=0,422$; $p<0,001$ für EBUS-TBNA Proben und $r=0,257$, $p=0,004$ für MSK Proben).

Tab. 3.4.2 MAGE Expression in Korrelation zu klinischen Parametern

	n = 69* Patienten mit EBUS-TBNA			n = 44* Patienten mit MSK		
	n	MAGE Expression	p^{\S}	n	MAGE Expression	p^{\S}
Alter			0,576			0,27
<60	19	4 (21,1%)		12	6 (50,03%)	
61 - 70	23	8 (34,8%)		29	5 (17,2%)	
>70	27	9 (33,3%)		3	3 (100%)	
Histologie			0,995			0,577
Plattenelithelkarzinom	24	7 (29,2%)		12	3 (25,0%)	
Adeokarzinom	29	9 (31,0%)		20	6 (30,0%)	
GroÙzelliges Karzinom	7	2 (28,6%)		3	2 (66,6%)	
Kleinzelliges Karzinom	9	3 (33,3%)		9	3 (33,3%)	
TumorgroÙe[#]			0,438			0,531
pT1	8	1 (12,5%)		4	0	
pT2	36	10 (27,8%)		30	10 (33,3%)	
pT3	9	3 (33,3%)		5	2 (40,0%)	
pT4	16	7 (43,8%)		5	2 (40,0%)	
Lymphknotenstatus[#]			0,004			0,033
pN0	15	0		11	0	
pN1	6	0		5	1 (20,0%)	
pN2	29	13 (44,8%)		19	8 (42,1%)	
pN3	19	8 (42,1%)		9	5 (55,6%)	

*Von 24 Patienten wurden Proben sowohl mittels EBUS-TBNA, als auch mittels MSK gewonnen, somit 89 Patienten insgesamt

§Die p -Werte wurden mittels Pearson's Chi Quadrat Test ermittelt

#Die Einteilung erfolgte nach der UICC TNM-Klassifikation

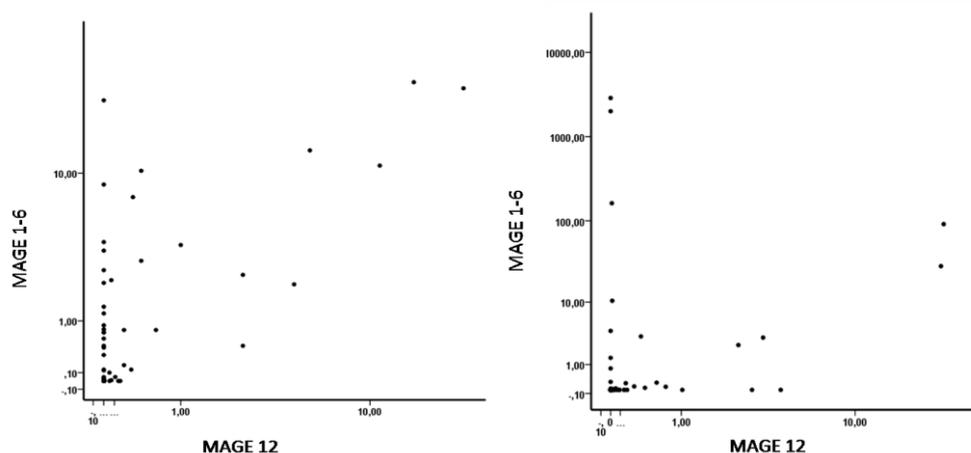


Abb. 3.4.1 Vergleich zwischen der quantitativen MAGE A 1-6 und MAGE 12 A Expression. Die Quantitativen Werte der MAGE A 1-6 und MAGE A 12 Expression wurden logarithmiert und miteinander verglichen. Die Abbildung links zeigt EBUS-TNBA Proben (Spearman Korrelationskoeffizient $r=0,422$; $p<0,001$) und Abbildung rechts zeigt MSK Proben (Spearman Korrelationskoeffizient $r=0,257$; $p=0,004$).

Die Ergebnisse der MAGE-PCR wurden mit den Ergebnissen der Routine-Histopathologie verglichen. Die MAGE-Expression korrelierte mit den histopathologischen Ergebnissen (Tab. 3.4.3) für MSK-Proben ($p=0,010$ für MAGE A 1-6 und $p=0,044$ für MAGE A 12) und für EBUS-TBNA Proben ($p<0,001$ für MAGE A 1-6 und $p=0,048$ für MAGE A 12).

Aufgrund der klinischen Relevanz des mediastinalen Lymphknotenbefalls wurde überprüft, ob die Kombination der MAGE-PCR mit der Histopathologie eine genauere Einteilung der Patienten ermöglicht. Es wurden 69 Patienten nach EBUS-TBNA untersucht und 44 nach MSK. MAGE A 1-6 mRNA war in 21/69 Patienten nach EBUS-TBNA (30,4%) und 11/44 Patienten nach MSK (25%) nachweisbar. MAGE A 12 konnte in 8/69 (11,6%) nach EBUS-TBNA und 7/44 nach MSK (15,9%) der Patienten nachgewiesen werden. Die 8 MAGE A 12 positiven Proben nach EBUS-TBNA waren auch MAGE A 1-6 positiv, wobei 3/7 Patienten nach MSK MAGE A 12 positiv waren, aber MAGE A 1-6 negativ. Mit einer Ausnahme waren alle Patienten mit MAGE Nachweis in den mediastinalen Lymphknoten vor Thorakotomie,

postoperativ mit nachgewiesenen N2 oder N3 Status. Könnte man weitere obsolete operative Eingriffe in Zukunft vermeiden, wenn man die EBUS-TBNA Ergebnisse mit der MAGE-PCR kombiniert? Im Rahmen dieser Studie wurden nach EBUS-TBNA 27/48 Patienten richtig als pN2 oder pN3 eingestuft (Genauigkeit 69,6%), nach MSK 21/28 Patienten (Genauigkeit 84,1%). Addiert man zu diesen Werten die Ergebnisse der MAGE PCR konnte eine korrekte Diagnose von Patienten mit pN2 und pN3 Status in 35/48 Fällen nach EBUS-TBNA (Genauigkeit 81,2 %; Tab 3.6) und 23/28 nach MSK (Genauigkeit 86,4%, Tab 3.4.4).

Tablle 3.4.3 Korrelation der MAGE-A 1-6 und MAGE-A 12 Expression mit der histopathologischen Diagnose des untersuchten Lymphknotens.

EBUS-TBNA (n=122)				
Histopathologische Diagnose				
		Negativ	Positiv	<i>p</i> *
MAGE-A 1-6	Negativ (n=87)	55	32	<0,001
	Positiv (n=35)	6	29	
MAGE-A 12	Negativ (n=112)	59	53	0,048
	Positiv (n=10)	2	8	

Mediastinoskopie (n=80)				
Histopathologische Diagnose				
		Negativ	Positiv	<i>p</i> *
MAGE-A 1-6	Negativ (n=64)	39	25	0,01
	Positiv (n=16)	4	12	
MAGE-A 12	Negativ (n=71)	41	30	0,044
	Positiv (n=9)	2	7	

*Chi Quadrat Test wurde zu der Berechnung der Korrelation der MAGE-A 1-6 / MAGE-A 12 Expression mit der entsprechenden histopathologischen Diagnose des untersuchten Lymphknotens verwendet

Tab 3.4.4 Statistische Auswertung der preoperativen diagnostischen Methoden

	EBUS-TBNA			MSK		
	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit
Histopathologie	56,3%	100%	69,6%	75,0%	100,0%	84,1%
MAGE qPCR	43,8%	100%	60,9%	46,4%	93,8%	63,6%
Kombination der Methoden	72,1%	100%	81,2%	82,1%	93,8%	86,4%

3.5 MAGE-A Expression in Primärtumoren

Durch die Analyse der MAGE-A Expression in Lymphknotenproben konnte die Genauigkeit des prooperativen Stagings durch EBUS-TBNA von 69,6% auf 81,2% angehoben werden. MAGE ist somit ein Marker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in mediastinalen Lymphknoten. Eine hohe MAGE Expression war vor allem im pN2 und pN3 Patienten zu finden, also bei fortgeschrittenen Tumoren. Die MAGE Expression scheint mit der Progression des Tumors und dessen Metastasierung einherzugehen, möglicherweise als Folge von genomischen Veränderungen, welche die MAGE Expression begünstigen. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde in Primärtumoren von Lungenkarzinompatienten die MAGE Expression mit den genomischen Veränderung verglichen.

Die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) ist eine Methode zur Darstellung genomischer Veränderungen. Sie basiert auf dem quantitativen Vergleich von Tumor- und Referenz-DNA. Das hier verwendete Protokoll wird bereits seit längerem erfolgreich angewandt und wurde speziell für geringe Mengen DNA etabliert (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999).

Die fluoreszenzmarkierten Proben wurden nach Hybridisierung auf humane Metaphasen photographiert und anschließend mit der dazugehörigen Software ausgewertet. Von jeder Metaphase wurden jeweils 3 Aufnahmen gemacht: DAPI, FITC und Cy3.5. Durch Übereinanderlagerung der Aufnahmen erhält man das typische Bild einer Metaphase mit Amplifikationen und Deletionen. Mit Hilfe der DAPI-Bänderung werden die Chromosomen anschließend zu einem Karyogramm sortiert. Die Software berechnet aus der Intensität der Fluoreszenz die genaue Amplifikations-, bzw. Deletionsrate und ermöglicht auch die graphische Darstellung des Profils (Amplifikation grün, Deletion rot). Nach Auswertung mehrerer Metaphasen werden alle Profile eines Tumors, bzw. einer Zelle übereinander gelegt und ein Gesamtprofil erstellt. (Abb. 3.5.1)

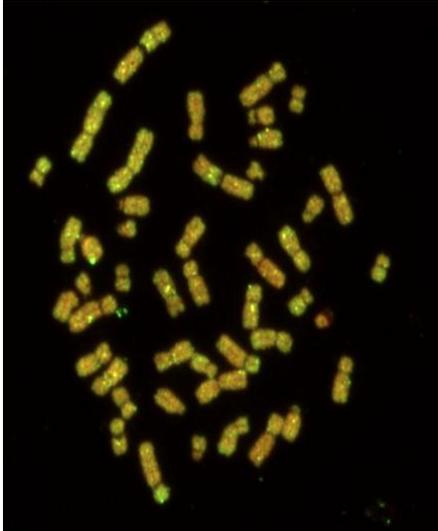


Abbildung 3.5.1: Comparative Genomische Hybridisierung einer Metaphase aus einem Primärtumor eines Adenokarzinompatienten. Zwischen 7 und 11 Metaphasen von einem Patienten wurden untersucht. Die Abbildung ist das Ergebnis nach der Überlagerung von DAPI, FITC und Cy 3.5. Rot dargestellt die Deletionen des Primärtumors.

Um zu überprüfen, ob die MAGE Expression mit höherer Instabilität und damit Aggressivität der Tumorzellen einhergeht, wurde aus verschiedenen Arealen von insgesamt 19 Primärtumoren mRNA und DNA gleichzeitig isoliert und analysiert. Die Expressionsprofile wurden mittels Filterhybridisierung erstellt, um dadurch die Expression aller MAGE Gene auf einmal miteinander vergleichen zu können. Die MAGE Expression wurde anhand der Intensität des Signals quantifiziert: schwaches Signal, entsprach einer geringer Expression, mäßiges Signal einer mittleren Expression, während ein starkes Signal einer hohen Expression entsprach. Da die bisherigen Untersuchungen mittels qPCR durchgeführt wurden, wurde zunächst überprüft, ob die Ergebnisse nach MAGE-A qPCR mit den Ergebnissen der Filterhybridisierung korrelieren (Tab. 3.5.1). Nach mRNA Extraktion eines Zellpools der Zelllinien MCF7, SkBr3, HT29 und BT20 wurden die MAGE Expressionsprofile mittels Filterhybridisierung und quantitativer PCR untersucht. Die Werte nach qPCR geben die Zykluszahl an, bei der erstmals ein Signal gemessen werden konnte, d.h. je niedriger die Zykluszahl, desto höher die Expression. Die Ergebnisse der beiden Methoden sind gut vergleichbar ($p = 0,04$, Chi Quadrat Test).

Tab. 3.5.1 Die MAGE A Expression ermittelt durch Filterhybridisierung (array) und qPCR.

Zelllinie	MAGE A 1		MAGE A 2		MAGE A 3/3		MAGE A 10		MAGE A 12	
	Array	qPCR	Array	qPCR	Array	qPCR	Array	qPCR	Array	qPCR
MCF7	+	12,81	-	11,27	+	4,03	-	35	+	12,95
SkBr3	+	13,02	-	11,88	+	7,09	-	21,96	+	11,18
HT29	+	n.d.	+	n.d.	+	6,89	-	n.d.	+	13,27

BT20 + 18,59 + 3,47 + 4,17 - 21,61 + 4,7

Es zeigt sich keine signifikante Korrelation der Anzahl der CGH – Veränderungen mit dem Tumorstadium ($p=0,36$) und keine signifikante Korrelation der MAGE Expression mit dem Tumorstadium ($p=0,37$). Zur Berechnung der MAGE-A Expression wurde die Anzahl der MAGE-A Gene mit der Expressionsstärke multipliziert (Tab. 3.5.2).

Bei Gegenüberstellung der MAGE – Expressionsprofile mit den CGH Ergebnissen zeigt sich, dass eine hohe MAGE – Expression nicht mit einer höheren genomischen Instabilität einhergeht ($p=0,221$). Ebenso zeigt sich kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der exprimierten MAGE-A Gene und den CGH-Veränderungen (Abb. 3.5.2). Unterschiedliche Areale der Primärtumore weisen unterschiedliche Expressionsmerkmale und genomische Profile auf (Tab. 3.5.3).

Tab. 3.5.2 Die Anzahl der CGH-Veränderungen und MAGE-A Expression in Abhängigkeit des Tumorstadiums

Tumorstadium	Anzahl der CGH - Veränderungen			Gesamt	<i>p</i>
	1-10	>10			
IA - IIB	6	6		12	0,36
IIIA - IIIB	2	5		7	
Gesamt	8	11		19	
MAGE-A Expression					
Tumorstadium	keine	1-9	>9	Gesamt	<i>p</i>
IA - IIB	5	4	3	12	0,283
IIIA - IIIB	5	2	0	17	
Gesamt	10	6	3	19	

Tab. 3.5.3 Die Anzahl der CGH-Veränderungen und MAGE-A Expression in verschiedenen Arealen desselben Primärtumors.

Tumor	CGH Veränderungen	MAGE-A
B (1)	14	1
B (2)	12	0
G (1)	12	5
G (2)	10	3
D (1)	n.d.	0
D (2)	13	0
K (1)	8	0
K (2)	n.d.	0

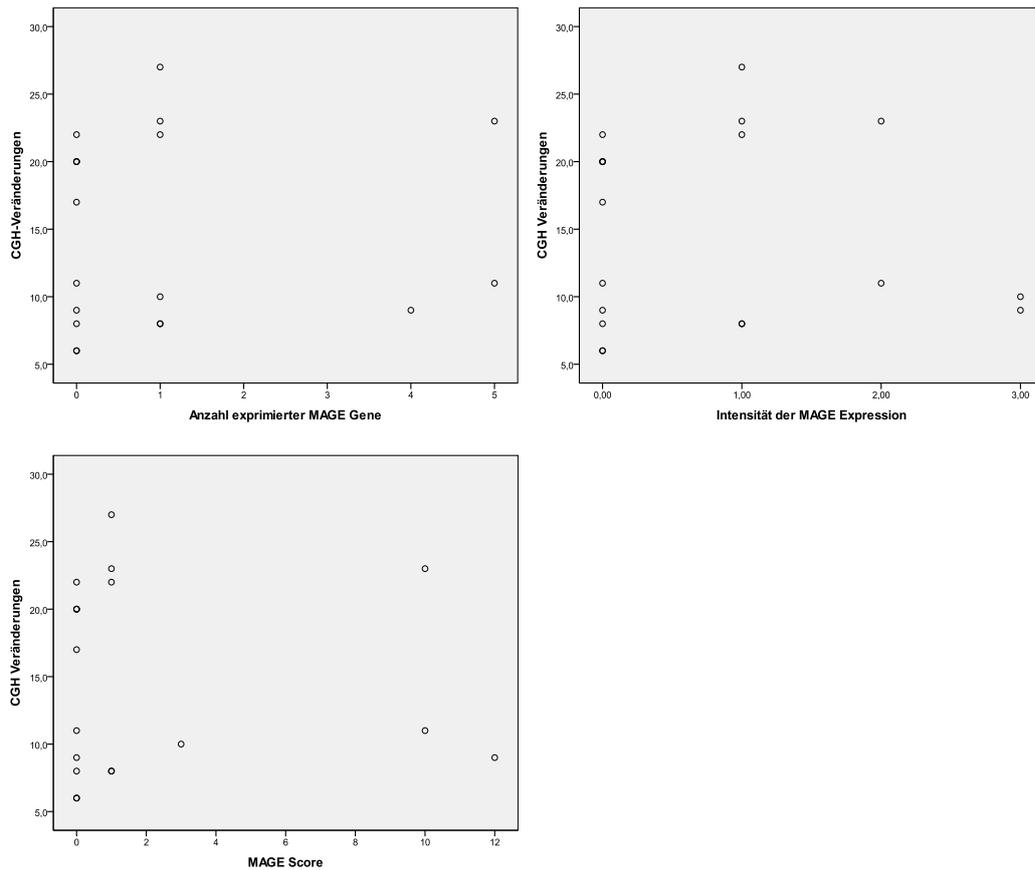


Abb. 3.5.2: CGH – Veränderungen pro Areal des Primärtumors und MAGE-A Expression. Die Expression von MAGE A1, 2, 3, 4, 6 und 12 mittels Filterhybridisierung wurde untersucht. Es wurden 19 Primärtumorproben von 19 Lungenkarzinompatienten (6 Plattenepithelkarzinome und 13 Adenokarzinome) untersucht. In der Abbildung links oben wurde die Anzahl der exprimierten MAGE Gene dargestellt, während rechts die Intensität der Expression erörtert wird hoch 3, mittel 2, gering 1, keine 0. Im untersten Bild wurde ein MAGE – Score berechnet, indem die Anzahl der exprimierten MAGE-A Gene mit deren Intensität multipliziert wurden.

Um zu überprüfen, ob die MAGE A Expression des Primärtumors von der Histologie abhängt, wurden die Ergebnisse der Filterhybridisierung nach der Anzahl der exprimierten MAGE A Gene verglichen. Bei 10 von 21 Patienten (48%) konnte die Expression mindestens eines MAGE A Gens nachgewiesen werden, wobei sich keine Abhängigkeit zur Histologie des Primärtumors zeigte (Tab. 3.5.4).

Tab. 3.5.4 MAGE A Expression im Primärtumor im Vergleich zu der Histologie des Tumors

MAGE A Gene	Plattenepithelkarzinom	Adenokarzinom
0	3 (43%)	8 (57%)
1	3 (43%)	3 (22%)
2	0	1 (7%)
4	0	1 (7%)
5	1 (14%)	1 (7%)
Gesamt	7	14

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, um die Routine-Staging Methoden bei Lungenkarzinompatienten zu verbessern. Dabei kristallisierte sich MAGE-A 1-6 als vielversprechender Marker heraus. Um die Deregulation der MAGE-Gene beim Lungenkarzinom besser zu verstehen, wurden verschiedene mikrodisektierte Areale von primären Lungenkarzinom auf die Expression von MAGE-A mRNA und chromosomale Genveränderungen hin untersucht.

4.1 Methodische Gesichtspunkte

Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen wurde zum einem der bewährte Tumormarker CK 19 verwendet (Ji, Sato et al. 2006; Nissan, Jager et al. 2006), zum anderen MAGE-A, welcher von Tumorzellen und Keimzellen exprimiert werden.

Die CK19 qPCR von Proben nach MSK war vergleichbar mit Ergebnissen aus der Literatur (Wang, Siemel et al. 2005), in den EBUS-TBNA Proben waren allerdings 28/28 Kontrollproben CK19 positiv. Interessanterweise waren MSK Proben der gleichen Patienten CK19 negativ. Eine mögliche Erklärung hierfür ist in der Durchführung der EBUS-TBNA zu finden. Hierbei werden von endotracheal unter Sonographiekontrolle Proben aus den benachbarten Lymphknoten gewonnen. Zwangsläufig wird die Tracheawand dabei mitpunktiert, was zu einer Kontamination der Proben mit normalen Bronchialepithelzellen führt. Da CK19 in epithelialen Zellen der Trachea exprimiert wird Marker sind Proben nach EBUS-TBNA folglich falsch positiv und CK19 ist als Tumormarker nach EBUS-TBNA ungeeignet.

4.2 Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknotenproben

MAGE-A ist ein tumorspezifischer Marker, welcher nicht im normalen Gewebe, mit Ausnahme von Keimzellen, exprimiert wird. Dennoch konnte in der Kontrollgruppe in vier Lymphknotenproben von Sarkoidosepatienten MAGE-A 12 nachgewiesen werden. Bisher gibt es keine Untersuchungen zur MAGE Expression in

Sarkoidosepatienten, jedoch Studien, welche über eine MAGE Expression in Patienten mit chronischen Lungenschaden (z.B. Z.n. Nikotinabusus) berichten (Jang, Soria et al. 2001; Mecklenburg, Stratakis et al. 2004). Die relative Expression der MAGE Transkripte in Proben von Patienten mit benignen Erkrankungen war deutlich niedrig, so dass ein Schwellenwert für tumorspezifische MAGE-A_1-6 und MAGE-A 12 Expression berechnet werden konnte. Dieser Schwellenwert wurde basierend auf das 95%-Konfidenzintervall der Kontrollgruppe ermittelt. Es wurde darauf Wert gelegt, die Spezifität so hoch wie möglich zu setzen, was zu einer erniedrigten Sensitivität führte. Aufgrund der quantitativen Messungen konnten Tumorpatienten klar von Patienten mit benignen Erkrankungen unterschieden werden. Deshalb ist die MAGE - qPCR als Ergänzung der histopathologischen Untersuchungen nach EBUS-TBNA / MSK zu sehen, nicht als deren Ersatz.

In Lungenkarzinompatienten konnte MAGE-A 1-6 über den Schwellenwert in 28,7% der EBUS-TBNA Proben nachgewiesen werden und in 20,0% der MSK Proben, während MAGE 12 in 8,2% der EBUS-TBNA Proben und 11,3% der MSK Proben (Tab. 3.4.2). Eine Korrelation zwischen MAGE Expression und histologischen Subtyp konnte nicht gefunden werden, was auch von mehreren Publikationen bestätigt wird (Weynants, Lethe et al. 1994; Lucas, De Smet et al. 1998; Yoshimatsu, Yoshino et al. 1998; Sienel, Mecklenburg et al. 2007). Die geringe Rate der MAGE 12 Expression könnte durch die intratumorale Heterogenität der MAGE Expression begründet sein, was bereits im Malignen Melanom beschrieben wurde (dos Santos, Torensma et al. 2000; Sigalotti, Fratta et al. 2004). Der dabei zugrundeliegende Mechanismus liegt wahrscheinlich an unterschiedlicher Promotor-Methylierung der MAGE Gene in verschiedenen zellulären Subtypen (Sigalotti, Fratta et al. 2004; Fratta, Sigalotti et al. 2010). Ein Beispiel hierfür ist eine aktuelle Studie, welche eine MAGE Hypomethylierung nach 9 Monate langer Inkubation von normalem Gewebe mit Zigarettenrauch beschreibt (Liu, Killian et al. 2010.)

Es wurde überprüft, ob die MAGE qPCR die Genauigkeit der aktuell verwendeten Staging Methoden EBUS-TBNA und MSK verbessern kann. In dieser Studie war die Genauigkeit der EBUS-TBNA in der Diagnostik tumorbefallener Lymphknoten der MSK deutlich unterlegen (Genauigkeit der EBUS-TBNA 69,6%, während 84,1% nach

MSK). Mit der MAGE qPCR zusammen konnte die Genauigkeit der EBUS-TBNA auf 81,2% verbessern, während die Genauigkeit der MSK auf 86,4% verbessert wurde. Im Rahmen dieser Studie wurden eine Sensitivität der EBUS-TBNA von 56,3% ermittelt, deutlich unter der in der Literatur beschriebenen Sensitivität (79-95%) (Detterbeck, Jantz et al. 2007). Dies liegt einerseits an der geringen Anzahl der untersuchten Patienten, andererseits daran, dass die EBUS-TBNA erst kurz vor Beginn der Studie als neue Methodik in der Abteilung eingeführt wurde. Die EBUS-TBNA Methode ist technisch anspruchsvoll, so dass die Sensitivität stark vom durchführenden Arzt abhängig ist (Detterbeck, Jantz et al. 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels MAGE-PCR die Genauigkeit der EBUS-TBNA unabhängig vom Untersucher bis auf das Niveau der MSK angehoben werden kann. Dies erleichtert es, die nötige Zeit zu überbrücken, bis die Methode in der jeweiligen Abteilung etabliert ist, bzw. ein neuer Operateur die Methode erlernt hat. Dies könnte ein flächendeckendes Einführen der EBUS-TBNA erlauben.

Mehrere Studien zeigten, dass der Nachweis disseminierter Tumorzellen in pN0 Patienten mit einer erniedrigten Prognose einhergeht (Kubuschok, Passlick et al. 1999; Osaki, Oyama et al. 2002). Ob ein MAGE positiver Lymphknotenstatus mit einer erniedrigten Prognose einhergeht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

Zusammenfassend betrachtet, konnte durch die Kombination der EBUS-TBNA mit der MAGE-qPCR die Genauigkeit der EBUS-TBNA auf Niveau der MSK gebracht werden. Wenn man im klinischen Alltag nach EBUS-TBNA immer eine zusätzliche MAGE qPCR durchführen würde, könnte damit die invasive und komplikationsreiche MSK ersetzt werden.

4.3 Analyse der MAGE-A Expression in Primärtumoren

Die Untersuchungen in den Lymphknotenproben zeigten, dass eine MAGE-A-Expression in fortgeschrittenen Tumorstadien hoch ist, jedoch v.a. MAGE-A 12 auch in Frühstadien nachgewiesen werden kann. In der Literatur wurde beschrieben, dass aberrante MAGE-Expression am Anfang der Carcinogenese stehen könnte (Jang, Soria et al. 2001; Liu, Killian et al. 2010), da durch die Expression von MAGE die p-53 abhängige Apoptose gehemmt wird, was Tumorzellen einen Überlebensvorteil verschafft (Yang, O'Herrin et al. 2007). MAGE wurde sogar in der umgebenden, normalen Mucosa von Colonkarzinompatienten (Jeon, Kim et al. 2011) und in normalem Lungenewebe von Lungenkarzinompatienten nachgewiesen (Jang, Soria et al. 2001). Die Untersuchungen an primären Lungenkarzinomen erfolgten zu einem Stadium, als der Tumor eine Größe erreicht hatte, welche diagnostiziert werden konnte (T1-2), jedoch vor einer Lymphknotenmetastasierung. In diesem Stadium konnte keine Korrelation zwischen der MAGE Expression und genomischen Veränderungen gesehen werden, jedoch war in jedem untersuchtem Tumor mindestens ein MAGE Gen nachweisbar. Das könnte bedeuten, dass MAGE den Beginn der Carcinogenese markiert, in dieser Phase jedoch die quantitative MAGE Expression oder die Anzahl der exprimierten MAGE Gene noch nicht von Bedeutung ist. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung kommt es auch zu einer Zunahme der MAGE Expression. Die MAGE Expression ist bei aggressiven Tumorerkrankungen und fortgeschrittenen klinischem Stadium besonders hoch.

5 Zusammenfassung

Zur Bestimmung der geeigneten Therapie eines Lungenkarzinompatienten ist die Kenntnis über den Befall der mediastinalen Lymphknoten von zentraler Bedeutung. Bei einem Befall der mediastinalen Lymphknoten (Stadium N2) wird präoperativ eine Radiochemotherapie durchgeführt. Der Goldstandard des mediastinalen Stagings ist die Mediastinoskopie (MSK), mit einer Sensitivität von 84-95%, welche jedoch zu schwerwiegenden Komplikationen wie massiven Blutungen oder Nervenschädigungen führen kann. Eine Alternative dazu ist der endobronchiale Ultraschall mit Biopsieentnahme (EBUS-TBNA), welcher nicht-invasiv ist, jedoch eine geringere Sensitivität (60-90%) aufweist. Um die Sensitivität des mediastinalen Stagings zu verbessern, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknotenproben von Lungenkarzinompatienten entwickelt. Als mögliche Marker wurden das Melanoma-Antigen (MAGE), welches vor allem in Tumorzellen, nicht aber in normalen Gewebe exprimiert wird, und Zytokeratin 19 (CK19) ein bekannter epithelialer Marker untersucht.

Es zeigte sich, dass CK19 als Marker für Tumorzellen in EBUS-TBNA Proben nicht geeignet ist, da er in allen Kontrollproben nachweisbar war. Ursächlich ist wohl eine Kontamination der Proben mit gesundem bronchialem Epithelgewebe bei der Punktion.

Im Gegensatz dazu waren in fast allen Kontrollproben keine Transkripte der MAGE Gene und nur in wenigen eine sehr geringe Expression nachweisbar. Deshalb konnte zunächst ein Schwellenwert für die MAGE Expression im Kontrollkollektiv ermittelt werden. Höhere Expressionswerte im Patientenkollektiv wurden als Nachweis für eine Tumorzeldisseminierung gewertet. Die Genauigkeit der EBUS-TBNA alleine war 69,6%, die der MSK 84,1%. Zusammen mit der MAGE-PCR konnte die Genauigkeit der EBUS-TBNA auf 81,2% gesteigert werden, die der MSK auf 86,4%.

Nach den Untersuchungen der Lymphknotenproben, wurden primäre Lungenkarzinome untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Deregulation der MAGE Expression und den genomischen Veränderungen zu analysieren. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen der Anzahl der exprimierten MAGE Gene oder der quantitativen MAGE Expression mit der Anzahl der genomischen Veränderungen im Primärtumor, obgleich in jedem Primärtumor mindestens ein MAGE Gen nachweisbar war.

Zusammenfassend betrachtet ist MAGE ein geeigneter Marker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten bei Lungenkarzinompatienten auch bei Punktion im Rahmen der EBUS-TBNA. Durch die Kombination der EBUS-TBNA mit der MAGE-qPCR kann die Genauigkeit der EBUS-TBNA auf Niveau der MSK gebracht werden. Damit könnte man auch im klinischen Alltag die invasive und komplikationsreiche MSK ersetzen und dem Patienten das Routine-Staging sowohl erleichtern, als auch verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Atanackovic, D., N. K. Altorki, et al. (2008). "Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming." Proc Natl Acad Sci U S A**105**(5): 1650-1655.
- Baran, J., M. Baj-Krzyworzeka, et al. (2010). "Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients." Cancer Immunol Immunother**59**(6): 841-850.
- Block, M. I. (2010). "Endobronchial ultrasound for lung cancer staging: how many stations should be sampled?" Ann Thorac Surg**89**(5): 1582-1587.
- Brasseur, F., D. Rimoldi, et al. (1995). "Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma." Int J Cancer**63**(3): 375-380.
- Braun, S., K. Pantel, et al. (2000). "Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer." N Engl J Med**342**(8): 525-533.
- Chomez, P., O. De Backer, et al. (2001). "An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family." Cancer Res**61**(14): 5544-5551.
- De Leyn, P., D. Lardinois, et al. (2007). "ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer." Eur J Cardiothorac Surg**32**(1): 1-8.
- De Leyn, P., J. Vansteenkiste, et al. (1997). "Role of cervical mediastinoscopy in staging of non-small cell lung cancer without enlarged mediastinal lymph nodes on CT scan." Eur J Cardiothorac Surg**12**(5): 706-712.
- De Plaen, E., K. Arden, et al. (1994). "Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family." Immunogenetics**40**(5): 360-369.
- Detterbeck, F. C., M. A. Jantz, et al. (2007). "Invasive mediastinal staging of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)." Chest**132**(3 Suppl): 202S-220S.
- Detterbeck, F. C., Rivera, M.P., Socinski, M. and Rosenman, J. (2001). Diagnosis and Treatment of Lung Cancer: An Evidence-Based Guide for the Practicing Clinician. Philadelphia, Saunders.
- dos Santos, N. R., R. Torensma, et al. (2000). "Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines." Cancer Res**60**(6): 1654-1662.
- Fratta, E., L. Sigalotti, et al. (2010). "Epigenetically regulated clonal heritability of CTA expression profiles in human melanoma." J Cell Physiol**223**(2): 352-358.
- Gotoh, K., Y. Yatabe, et al. (1998). "Frequency of MAGE-3 gene expression in HLA-A2 positive patients with non-small cell lung cancer." Lung Cancer**20**(2): 117-125.
- Gunluoglu, M. Z., H. Melek, et al. (2010). "The validity of preoperative lymph node staging guidelines of European Society of Thoracic Surgeons in non-small-cell lung cancer patients." Eur J Cardiothorac Surg.
- Hammerschmidt, S. and H. Wirtz (2009). "Lung cancer: current diagnosis and treatment." Dtsch Arztebl Int**106**(49): 809-818; quiz 819-820.

- Han, M. H., H. S. Eom, et al. (2010). "Detection of circulating lymphoma cells in patients with non-Hodgkin lymphoma using MAGE-A3 gene expression in peripheral blood." Leuk Res**34**(9): 1127-1131.
- Hoffman, P. C., A. M. Mauer, et al. (2000). "Lung cancer." Lancet**355**(9202): 479-485.
- Huber, R. M. (2009). Tumoren der Lunge und des Mediastinums. Germering bei München, Zuckerschwerdt Verlag.
- Jang, S. J., J. C. Soria, et al. (2001). "Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis." Cancer Res**61**(21): 7959-7963.
- Jeon, C. H., D. D. Kim, et al. (2011). "Melanoma-associated antigen (MAGE) expression in the normal mucosa around colorectal cancer after curative resection: presence of undetectable free cancer cells." Int J Biol Markers**26**(2): 88-93.
- Ji, X. Q., H. Sato, et al. (2006). "Real-time quantitative RT-PCR detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the LightCycler System." Gynecol Oncol**100**(2): 355-360.
- Khoo, K. L. and K. Y. Ho (2011). "Endoscopic mediastinal staging of lung cancer." Respir Med**105**(4): 515-518.
- Kim, H., S. J. Kim, et al. (2010). "Usefulness of melanoma antigen (MAGE) gene analysis in tissue samples from percutaneous needle aspiration biopsy of suspected lung cancer lesions." Lung Cancer**69**(3): 284-288.
- Kirkin, A. F., K. N. Dzhandzhugazyan, et al. (2002). "Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties." Cancer Invest**20**(2): 222-236.
- Klein, C. A., O. Schmidt-Kittler, et al. (1999). "Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells." Proc Natl Acad Sci U S A**96**(8): 4494-4499.
- Klein, C. A., S. Seidl, et al. (2002). "Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells." Nat Biotechnol**20**(4): 387-392.
- Kubuschok, B., B. Passlick, et al. (1999). "Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol**17**(1): 19-24.
- Kufer, P., A. Zippelius, et al. (2002). "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**62**(1): 251-261.
- Laack, E., C. Bokemeyer, et al. (2008). "Adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung cancer." Dtsch Arztebl Int**105**(14): 249-254.
- Liu, F., J. K. Killian, et al. (2010). "Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate." Oncogene**29**(25): 3650-3664.
- Lucas, S., C. De Smet, et al. (1998). "Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis." Cancer Res**58**(4): 743-752.
- Marcar, L., N. J. Maclaine, et al. (2010). "MAGE-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin." Cancer Res**70**(24): 10362-10370.
- Mecklenburg, I., D. F. Stratakis, et al. (2004). "Detection of melanoma antigen-A expression in sputum and bronchial lavage fluid of patients with lung cancer." Chest**125**(5 Suppl): 164S-166S.

- Mecklenburg, I., D. Weckermann, et al. (2007). "A multimarker real-time RT-PCR for MAGE-A gene expression allows sensitive detection and quantification of the minimal systemic tumor load in patients with localized cancer." J Immunol Methods**323**(2): 180-193.
- Mountain, C. F. (1997). "Revisions in the International System for Staging Lung Cancer." Chest**111**(6): 1710-1717.
- Mountain, C. F. (2009). "A new international staging system for lung cancer. 1986." Chest**136**(5 Suppl): e25.
- Nakagawa, K., Y. Noguchi, et al. (2005). "XAGE-1 expression in non-small cell lung cancer and antibody response in patients." Clin Cancer Res**11**(15): 5496-5503.
- Nardiello, T., A. A. Jungbluth, et al. (2011). "MAGE-A inhibits apoptosis in proliferating myeloma cells through repression of Bax and maintenance of survivin." Clin Cancer Res**17**(13): 4309-4319.
- Nissan, A., D. Jager, et al. (2006). "Multimarker RT-PCR assay for the detection of minimal residual disease in sentinel lymph nodes of breast cancer patients." Br J Cancer**94**(5): 681-685.
- Osaki, T., T. Oyama, et al. (2002). "Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol**20**(13): 2930-2936.
- Park, J. W., T. K. Kwon, et al. (2002). "A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers." J Immunol Methods**266**(1-2): 79-86.
- Parkin, D. M., P. Pisani, et al. (1999). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin**49**(1): 33-64, 31.
- Pastorcic-Grgic, M., B. Sarcevic, et al. (2010). "Prognostic value of MAGE-A and NY-ESO-1 expression in pharyngeal cancer." Head Neck**32**(9): 1178-1184.
- Petersen, S., C. Heckert, et al. (2000). "Gene expression profiling of advanced lung cancer." Int J Cancer**86**(4): 512-517.
- Schilling, S. (2005). Proteasenexpression einzelner disseminierter Tumorzellen aus Lymphknoten. München, LMU.
- sciencelab (2005). material and safty data shield.
- Sienel, W., I. Mecklenburg, et al. (2007). "Detection of MAGE-A transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non-small-cell lung cancer." Clin Cancer Res**13**(13): 3840-3847.
- Sigalotti, L., E. Fratta, et al. (2004). "Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine." Cancer Res**64**(24): 9167-9171.
- Tajima, K., Y. Obata, et al. (2003). "Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer." Lung Cancer**42**(1): 23-33.
- Van den Eynde, B. J. and P. van der Bruggen (1997). "T cell defined tumor antigens." Curr Opin Immunol**9**(5): 684-693.
- Wang, X. T., W. Sienel, et al. (2005). "Detection of disseminated tumor cells in mediastinoscopic lymph node biopsies and lymphadenectomy specimens of patients with NSCLC by quantitative RT-PCR." Eur J Cardiothorac Surg**28**(1): 26-32.
- Wendler, N. (2008). Die lymphogene Metastasierung beim Bronchialkarzinom:Analyse von Genomstruktur und Proteasenexpression beiPrimärtumoren und disseminierten Tumorzellen. München, LMU.

- Weynants, P., B. Lethe, et al. (1994). "Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas." Int J Cancer**56**(6): 826-829.
- Yang, B., S. O'Herrin, et al. (2007). "Select cancer testes antigens of the MAGE-A, -B, and -C families are expressed in mast cell lines and promote cell viability in vitro and in vivo." J Invest Dermatol**127**(2): 267-275.
- Yang, B., S. M. O'Herrin, et al. (2007). "MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines." Cancer Res**67**(20): 9954-9962.
- Yoshimatsu, T., I. Yoshino, et al. (1998). "Expression of the melanoma antigen-encoding gene in human lung cancer." J Surg Oncol**67**(2): 126-129.

7 Publikationen

1. Cucuruz B, Dango S, Jurinovic V, Mayer O, Follo M, Böhm J, Freudenberg N, Elze M, Siene W, Klein CA, Passlick B, Polzer B. MAGE qPCR Improves the Sensitivity and Accuracy of EBUS-TBNA for the Detection of Lymphatic Cancer Spread. *J Thorac Oncol*. 2012 Jan 10.
2. Dango S, Cucuruz B, Mayer O, Brabletz S, Follo M, Elze M, Siene W, Brabletz T, Passlick B. Detection of disseminated tumour cells in mediastinoscopic lymph node biopsies and endobronchial ultrasonography-guided transbronchial needle aspiration in patients with suspected lung cancer. *Lung Cancer*. 2009 Sep 3.
3. Dango S, Wang XT, Gold M, Cucuruz B, Klein CA, Passlick B, Siene W. Expression of melanoma-antigen-A (MAGE-A) in disseminated tumor cells in regional lymph nodes of patients with operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009 May 19.
4. Siene W, Dango S, Kirschbaum A, Cucuruz B, Hörth W, Stremmel C, Passlick B. Sublobar resections in stage IA non-small cell lung cancer: segmentectomies result in significantly better cancer-related survival than wedge resections. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Apr;33(4):728-34. Epub 2008 Feb 7.
5. S.J. Schließmann, K. Höhne, A. Charra, A. Kirschbaum, B. Cucuruz, S. Schumann, G. Zissel, J. Guttmann Differences in form stability between human non-tumorous alveolar epithelial cells type 2 and alveolar carcinoma cells under biaxial stretching. IFMBE, 2009

Posterpräsentationen:

1. Cucuruz B, Dango S, Brabletz S, Wellner U, Elze M, Siene W, Klein CA, Brabletz T, Passlick B. Nachweis von einzelnen disseminierten Tumorzellen in mediastinoskopisch und mittels endobronchialem Ultraschall mit Biopsie gewonnenen Lymphknotenproben in Patienten mit Verdacht auf Lungenkarzinom. 2009, 10. DGT Augsburg, 08.10.-10.10.
2. K. Höhne, A. Kirschbaum MD, B. Cucuruz MD, J. Müller-Quernheim, Prof., G. Zissel PhD. Influence of CCL18 on Epithelial-to-Mesenchymal Transdifferentiation of Epithelial Cells, ATS 2009 San Diego
3. Cucuruz B, Wendler N, Siene W, Passlick B, Klein CA. Korrelation von Melanom-Antigen-A (MAGE-A) Expression und genetischer Instabilität bei operablen Bronchialkarzinompatienten. 2007, 11. Chirurgische Forschungstage Saarbrücken, 15.11.-17.11.
4. M. Cucuruz, E. Boeriu, M. Pop, B. Cucuruz. Clinical and immunological features in pediatric autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS); , Annual Meeting of the Austrian Society for Allergy and Immunology, 01-03.12.2005, Graz, Austria, abstract 93-94.
5. M. Cucuruz, E. Boeriu, C. Petrescu, S. Arghirescu, C. Damacus, M. Serban, B. Cucuruz. The impact of the histopathological type upon the evolution of the malignant soft-tissue tumors in children; *Oncohematologia Pediatrica*, 2005, 4, 17-21.
6. Cucuruz Porcza M, Boeriu E, Ferencz I, Cucuruz B Primary immunodeficiencies - diagnosis difficulties in Romania; ; VI-th World Meeting of Hungarian Physicians, Pharmacists and nurses, 8-10.05. Debrecen, Hungary, abstract, 51

9 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Gert Riethmüller danke ich für seine Unterstützung und sein Interesse an meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Christoph Klein möchte ich mich für seine Ideen, Geduld und Hilfsbereitschaft, die stetige Unterstützung als Doktorvater dieser Arbeit und mein Mentor, nicht zuletzt für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken, die mich in all den Jahren motiviert hat. Des Weiteren möchte ich ihm für seine Unterstützung während meines Aufenthaltes an der Uniklinik Freiburg, seine unermüdliche Hilfe bei all meinen wissenschaftlichen Tätigkeiten und letztendlich deren Veröffentlichung danken.

Besonderer Dank geht an Herrn Professor Bernward Passslick, der mir gezeigt hat, dass man alles erreichen kann, wenn man es wirklich will.

Ohne die unermüdliche Unterstützung von Bernhard Polzer als Betreuer wäre diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen, er hat mich mit einer Engelsgeduld bei den statistischen Auswertungen unterstützt, danach unzählige Male Korrektur gelesen, ohne dabei seine gute Laune zu verlieren! Christoph und Bernhard, ich möchte Euch für die Freundschaft, die Ihr mir gewährt habt, danken!

Die gesamte AG Klein hat dazu beigetragen, dass diese Arbeit in einem angenehmen und inspirierenden Umfeld entstehen konnte. Euch allen Danke dafür!

Für ihre technische Unterstützung bedanke ich mich vor allem bei Manfred Mayer, Elke Burkhart, Barbara Lindner, Isabell Blochberger und Nicole Wendler.

Besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Reinhard Aigner, der mich dazu gebracht hat, die ersten fünf Seiten dieser Arbeit zu schreiben.

Meinen Kollegen von der Chirurgischen Abteilung des Klinikums Landshut möchte für Ihre Geduld mit mir danken, vor allem Herrn Dr. Georg Schober und Herrn Prof. Florian Löhe, die ich ganz besonders mit den Problemen und Problemchen während dieser Arbeit genervt hatte.

Meiner Familie, meinen Eltern, Oti und Sandy danke ich für Ihre Rücksichtnahme, für Ihre Unterstützung und Ihre Aufmunterung und dass sie immer für mich da waren.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Beatrix Rita Cucuruz, an Eides statt,
dass ich die vorgelegte Doktorarbeit selbstständig und
nur mit den angegebenen Quellen angefertigt habe.

München, den 09.08.2012