

Abschlussbericht zum Vorhaben
„Entwicklung proteomanalytischer Verfahren
zur Identifikation von Kandidatenmarkern
zur Unterstützung der (Früh-)Diagnose
asbestassoziiierter Lungen- und
Pleuratumoren“ (FP-0339)

Laufzeit

01.03.2013 – 30.06.2015

Bericht vom 11.11.2015

Autoren

Prof. Dr. K. Gerwert (Leitung des Verbundprojekts)

Prof. Dr. B. Sitek (Leitung MPC)

Prof. Dr. T. Brüning (Leitung IPA)

Prof. Dr. T. Behrens, MPH (Leitung WESZ)

Dr. G. Johnen (Leitung Epigenetik)

Prof. Dr. L. Freitag und Dr. K. Darwiche, MPH

(Leitung Interventionelle Pneumologie/Bronchologie)

Dr. M. Altmayer, MPH und Prof. Dr. G. Stamatis (Emeritus,
Leitung Thoraxchirurgie und thorakale Endoskopie)

Prof. Dr. K. W. Schmid und Prof. Dr. D. Theegarten (Leitung
Institut für Pathologie)

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung

2. Forschungszweck/-ziel

3. Methodik

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

8. Anhang/Anhänge

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Kurzfassung deutsch

Für die nachgehende Vorsorge von Versicherten, die in der Vergangenheit gegenüber krebserzeugenden Gefahrstoffen exponiert waren, werden Methoden benötigt, um Tumoren frühzeitiger zu erkennen und damit die Behandlungschancen für Erkrankte zu verbessern.

Im Rahmen des Projekts konnten verschiedene Markerkandidaten, die potentiell zur Früherkennung von Lungen bzw. Pleuratumoren geeignet sind, erfolgreich identifiziert werden. Dabei wurden in der ersten Projekt-Phase, deren Schwerpunkt auf der Identifizierung neuer Marker und Nachweismethoden lag (Discovery-Phase), v. a. biophotonische und proteinanalytische Verfahren sowie epigenetische Marker und die Atemluftdiagnostik durch Ionenmobilitätsspektrometrie angewandt.

Es wurden rund 850 Probanden für die Studie rekrutiert. Die Pathologie klassifizierte zunächst alle Proben entsprechend der aktuellen Leitlinien und stellte diese den Plattformen zur Verfügung. Für die einzelnen Tumorentitäten und Vergleichskollektive wurden ergänzend microRNA-Profile erstellt, die zur Unterscheidung beitragen können.

Mittels der nichtinvasiven Ionenmobilitätsspektrometrie wurde die Ausatemluft von Patienten, die mit dem Verdacht auf einen bösartigen Lungen- oder Pleuratumor in der Ruhrlandklinik aufgenommen wurden, analysiert. Die gefundenen, charakteristischen Muster werden zur Zeit abschließend ausgewertet. Für die spektrale Histopathologie mittels FTIR-Imaging konnte eine spektrale Datenbank generiert werden, die eine automatisierte Erkennung von Lungentumoren und Mesotheliomen auf Basis spektraler Biomarker erlaubt. Auf Grundlage dieser Gewebecharakterisierung mit anschließender Lasermikrodissektion, Proteomanalyse und Identifikation von differentiellen Proteinen wurden in Kooperation zwischen Biophysik und Proteomik zahlreiche neue Biomarkerkandidaten identifiziert, um Mesotheliome und deren Subtypen (epitheloide und sarkomatoide Wachstumsform) zu detektieren.

Ein mutmaßlich entscheidender, translationaler Einsatz der spektralen Histopathologie kann in der „just-in-time“ und „on-site“ Diagnostik während Interventionen und Operationen liegen. Durch die spektrale Histopathologie könnte somit die klassische pathologische Diagnostik ergänzt und beschleunigt werden. Dadurch könnte die vollständige Resektion im Gesunden intraoperativ bereits bestätigt werden, was Nachoperationen oder -behandlungen mit Bestrahlung oder Chemotherapie deutlich reduzieren könnte.

Im Rahmen von epigenetischen Gewebeanalysen konnten über 800 Markerkandidaten auf der Ebene der DNA-Methylierung identifiziert werden. Zudem konnte der Nachweis einiger potentieller Lungenkrebs-Marker bereits erfolgreich in kleinen Biopsien sowie in Speichel- und Blutproben bestätigt werden.

Die neu identifizierten, zahlreichen Markerkandidaten ermöglichen die Zusammenstellung von sogenannten Panels aus epigenetischen und Protein-Markern, um die Nachweisempfindlichkeit im Vergleich zu einzelnen Testverfahren zu erhöhen. Sobald sich diese Multimarker-Panels in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten wie Blut und Speichel verifizieren und anschließend in einer prospektiven Studie für die Früherkennung von Tumoren validieren lassen, würden dringend benötigte und für die Versicherten nicht belastende Testverfahren für die Sekundärprävention zur Verfügung stehen. Hier bietet sich beispielsweise eine Ergänzung zu radiologischen Verfahren an, wie die hochauflösende Niedrig-Dosis-Computer-Tomographie (LD-HRCT), die derzeit von der DGUV im Rahmen einer erweiterten Vorsorge angeboten wird.

Summary

For surveillance of workers formerly exposed to carcinogens, new screening methods to diagnose tumors at an early stage and to improve the chances for treatment are needed.

Several candidate markers, potentially capable of the (early) diagnosis of tumors of the lung and pleura, have been successfully identified in the project. The first phase of the project from 2013-2015 focused on the discovery phase, in which biophotonical and proteome-analytical methods as well as epigenetic makers and the diagnosis of breathable air by ion mobility spectrometry technology were applied.

Approximately 850 subjects were included in the study. Pathology classified all specimens according to current clinical guidelines and provided the research platforms with them. In addition, microRNA profiles were investigated for the different tumour entities and control samples, which allowed for discrimination of different tumor subtypes.

Using ion-mobility-spectrometry, exhaled air of patients attending the Ruhrlandklinik in Essen with a suspected diagnosis of lung or pleural cancer was analyzed. The identified spectrometry patterns are currently analyzed.

Using FTIR-Imaging techniques, a spectral data bank for “spectral histopathology” was created, which was used to identify spectral biomarkers, allowing for an automated detection of lung tumours. We combined the spectral detection with laser microdissection of tissue slides and a subsequent identification of differentially expressed proteins to select a collective of mesothelioma samples, in which we differentiated two different histological subtypes (epithelioid vs. sarcomatoid). Applying this new workflow of spectroscopic characterization, laser microdissection and proteome analysis, new candidate markers were identified, which are capable of differentiating between the two aforementioned subtypes.

A promising translational application of these methods may be “just-in-time” or “on-site” diagnostics during surgery. Here, spectral histopathology may complement the classical pathological diagnostics and accelerate clinical diagnosis. This would allow implementing the “new” classification of pulmonary adenocarcinomas from 2012 regarding the assessment of the extent of surgery. Also, resection “in healthy tissue” could be confirmed intraoperatively, which could reduce the need of follow-up operations or subsequent treatment with irradiation or chemotherapy.

On the level of DNA-methylation, more than 800 marker candidates were identified by epigenetic tissue analysis. Moreover, the evidence of potential markers for lung cancer has successfully been confirmed in small biopsies as well as in saliva and blood samples.

The newly identified marker candidates allow for the composition of panels of epigenetic and protein markers with enhanced sensitivity. As soon as these multi marker panels are verified in non-invasive body fluids like blood or saliva and validated in prospective studies, simple and non-invasive marker tests would be available for secondary prevention. These panels may also be used in addition to radiological procedures such as low-dose high-resolution computer tomography (LD-HRCT), currently offered by the DGUV for past exposure examinations.

1. Problemstellung

Lungenkrebs gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Für 2014 wurden ungefähr 56.000 Lungenkrebs-Neuerkrankungen in Deutschland vorhergesagt (RKI 2013).

Neben Faktoren wie Rauchen und wohnortbedingter Radonbelastung gibt es zahlreiche berufsbedingte Expositionen, die zu einem erhöhten Risiko führen, an Tumoren der Lunge oder der Pleura zu erkranken. Hierzu zählt besonders eine berufsbedingte Exposition gegenüber Asbest (Cassidy et al. 2006). Asbestbedingte Tumoren der Lungen können in Zusammenhang mit einer beruflichen Exposition als Berufskrankheit anerkannt werden (BK 4104, 4114). Im Jahr 2014 wurde bei über 850 Personen eine Berufskrankheit (BK 4104, 4114) im Zusammenhang mit einem asbestbedingten Lungentumor neu anerkannt. Auch die Zahl der asbestassoziierten Mesotheliome (BK 4105) ist aktuell mit rund 1000 anerkannten Berufskrankheiten pro Jahr weiterhin auf einem sehr hohen Niveau (DGUV-Statistiken für die Praxis 2014). Daneben gibt es eine Vielzahl anderer Kanzerogene, wie Chrom, Nickel, Quarz, PAK oder ionisierende Strahlen, die für sich alleine oder in Kombination (Synkanzerogenese) geeignet sind, beruflich bedingte Lungentumoren hervorzurufen. Es ist davon auszugehen, dass weitere Verdachtstoffe (K2 Stoffe gem. MAK-Liste) in den kommenden Jahren als gesicherte Lungenkanzerogene beschrieben werden.

Durch die intensivierten Präventionsmaßnahmen liegt der Beginn insbesondere hoher beruflicher Expositionen gegenüber krebserzeugenden Gefahrstoffen in der Regel viele Jahre zurück. Nichtsdestotrotz ist aufgrund der jahrzehntelangen Latenzzeiten zwischen Exposition und Erkrankungsbeginn mit einer weiterhin hohen Inzidenz an beruflich bedingten Lungentumoren und Mesotheliomen zu rechnen. Trotz eines Asbestverbotes in Deutschland Anfang der neunziger Jahre muss also auch weiterhin mit hohen Erkrankungszahlen gerechnet werden.

Hinsichtlich der Früherkennung von Lungen- und Pleuratumoren ist eine regelmäßige arbeitsmedizinische Vorsorge essentiell, um die Prognose dieser Tumoren zu verbessern. Die ehemals asbestexponierten Beschäftigten werden daher im Rahmen von Nachuntersuchungen und nachgehenden Untersuchungen nach Beendigung der Exposition durch den Organisationsdienst für nachgehende Untersuchungen (ODIN) der gesetzlichen Unfallversicherungsträger sowie die Gesundheitsvorsorge der DGUV (GVS) betreut. Mit diesem optimierten Konzept zur Sekundärprävention wird eine frühzeitige Diagnose von Tumorerkrankungen angestrebt, die eine wichtige Voraussetzung für einen erfolgreichen Therapieansatz darstellt.

Aktuell werden im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen der Lunge verschiedene radiologische Verfahren angewandt, wie z.B. die Röntgen-Übersichtsaufnahme des Thorax oder die Computertomographie (CT), die aufgrund der Strahlenbelastung allerdings nur eingeschränkt für Hochrisikogruppen empfohlen werden. Das HRCT-basierte Screening kann jedoch noch nicht als Methode der Wahl für ein generelles Lungenkrebscreening angesehen werden.

Da mit den derzeit verwendeten Untersuchungsmethoden somit eine hinreichend frühzeitige Diagnose eines Lungentumors bzw. Mesothelioms für die Allgemeinbevölkerung und für beruflich exponierte Arbeitnehmer nur mit Einschränkung möglich ist, sollen im Rahmen der beantragten Studie Kandidaten für neue, spektrale und molekulare Marker zur Früherkennung von Lungentumoren bzw. Mesotheliomen auf Grundlage proteinanalytischer Verfahren entwickelt werden, mit denen eine erfolgreiche Sekundärprävention möglich ist.

In der hier durchgeführten Identifizierungsphase der Studie werden zunächst verschiedene Körpermaterialien (z. B. Gewebe) auf geeignete Biomarkerkandidaten hin untersucht. Die anschließende Verifizierung testet die identifizierten Markerkandidaten in einem unabhängigen Patientenkollektiv. Die abschließende Validierungsphase hat zum Ziel, die gewonnenen Biomarker auf ihre Validität in der praktischen Anwendung hin zu testen. Für den Einsatz in der arbeitsmedizinischen Vorsorge (z. B. in der G 1.2 Asbestfaserhaltiger Staub) sollen die entwickelten Marker schließlich auch in nicht-invasiv oder minimal-invasiv gewonnenen Proben (z. B. in Blut-, Sputum- oder Ausatemluftproben) nachgewiesen werden können.

Zur Validierung kann für Mesotheliome u. a. die am IPA laufende Studie MoMar dienen, in der in einem prospektiven Design neue, nicht-invasive Marker für die Früherkennung von Mesotheliomen und anderen asbestbedingten Tumoren für einen Einsatz bei nachgehenden und Nachuntersuchungen getestet und validiert werden. Da ein einzelner Marker kaum eine hinreichende Sensitivität und Spezifität zur Detektion eines spezifischen Tumors erreichen kann, wird innerhalb der MoMar-Studie auch ein Panel von mehreren verschiedenen Markern (Multimarker-Panel) zusammengestellt und getestet, um die Früherkennung weiter zu optimieren. Mehrere Marker können sich – insbesondere auch, wenn sie von verschiedenen molekularen Ebenen (Proteine, DNA, RNA, Metaboliten) stammen – gegenseitig ergänzen.

2. Forschungszweck/-ziel

Ziel des Projektes war es, neue nicht-invasive Biomarkerkandidaten für die Früherkennung zu identifizieren, die thorakale Tumoren früher und sicherer aufdecken, um derzeit teure und belastende diagnostische Verfahren (u. a. die Computertomographie, CT) langfristig zu ergänzen und zielgerichteter einsetzen zu können. Das Projekt fokussierte sich dabei zunächst auf die Identifizierungsphase („Discovery“-Phase) der Biomarker-Entwicklung, d. h. die Entdeckung neuer Markerkandidaten. Entsprechend ist das beantragte Projekt zunächst auf zwei Jahre begrenzt, u. a. um besser abschätzen zu können, wie erfolgversprechend der Ansatz ist. In folgenden Studienphasen müssen die identifizierten Markerkandidaten dann sowohl methodisch bzw. an unabhängigen Patientenkollektiven (Verifizierung) als auch in prospektiven Studien (Validierung) bestätigt werden (Details s. Kap. 3.1 „Phasen der Biomarkerentwicklung“).

Bei der Identifizierung von neuen Biomarkerkandidaten in Patientenkollektiven sind die entscheidenden Eigenschaften eines Biomarkers, dass er mit hinreichender Spezifität und Sensitivität zwischen kranken und gesunden Personen unterscheiden kann sowie hinreichend stabil und feldtauglich ist. Optimalerweise schließt dieser Weg jedoch nicht aus, dass die identifizierten Marker gleichzeitig wertvolle Hinweise auf generelle und individuelle Mechanismen der Krebsentstehung – auch in Frühphasen – geben und so einerseits Targets für neue oder bereits bestehende Therapien liefern als auch eine wesentliche Grundlage der personalisierten Medizin bilden (Stricker et al. 2011; Gonzalez-Angulo et al. 2010; Tan et al. 2009).

Die sich an dieses Projekt anschließenden Phasen der Markerentwicklung, die Verifizierungs- und Validierungsphase, haben zum Ziel, die identifizierten Biomarkerkandidaten auf ihren klinischen Nutzen zu testen. Für den Einsatz in der arbeitsmedizinischen Vorsorge sollen die entwickelten Marker schließlich auch in nicht-invasiv oder minimal-invasiv gewonnenen Proben (z. B. in Blut-, Sputum- oder Ausatemluftproben) nachgewiesen werden können. Die Entwicklung preiswerter und einfach

anzuwendender Tests für abschließend validierte Marker ist insbesondere für proteinbasierte Marker möglich, da sich hier preiswerte immunbasierte Assays anbieten.

Die Spektroskopie/Imaging-Plattform soll soweit etabliert werden, dass sie langfristig in die Routinediagnostik integriert werden kann. Dabei werden zunächst verschiedene Probenmatrices unabhängig voneinander untersucht, um dann deren Ergebnisse miteinander zu korrelieren. Der Vorteil dieses biophotonischen Verfahrens besteht darin, dass diese Methode, sobald sie implementiert und validiert wurde, sich in Zukunft mit relativ preiswerten (<30 T€) und kompakten FTIR Spektrometern durchführen lässt. So wird angestrebt, dass – zumal praktisch keine weiteren Kosten für Verbrauchsmaterial anfallen – die Vibrationsspektroskopie zukünftig ohne hochspezifische Vorkenntnisse direkt in den Kliniken oder Großpraxen als Routinediagnostik (point-of-care) eingesetzt werden soll. Entscheidend für die Diagnostik ist der Abgleich der Spektren mit der hier im Projekt aufgebauten Datenbank.

Nach Validierung der Methodik sind darüber hinaus in der Thoraxchirurgie auch Ansätze für einen translationalen Einsatz der Biospektrometrie zur Bestimmung des Resektions-Ausmaßes und der Tumorfreiheit von Absetzungsstellen möglich. Hierbei sind sowohl intraoperative Einsatzmöglichkeiten bzw. ex-vivo-Bestimmungen denkbar. Erste Kontakte zu externen Partnern sollen aufgebaut und Diagnoseaufträge angenommen werden.

3. Methodik

3.1 Studiendesign und Studienkollektiv

Das Ruhrgebiet als einmaliger, nationaler Ballungsraum mit vielen Bezügen zum Bergbau, der Stahlverarbeitung und Energiegewinnung (alle mit hohem Asbestumsatz in der Vergangenheit) hat einen Bevölkerungsanteil mit überdurchschnittlich hohem Patientenanteil mit beruflicher Asbestexposition mit konsekutiv unterschiedlichen Krankheitsbildern und -ausprägungen. Als Einrichtung des Gesundheitscampus NRW führt das Europäische Proteinforschungsinstitut PURE (Protein-research Unit Ruhr within Europe) Kompetenzen aus der angewandten Grundlagenforschung und der klinischen Krebsforschung zusammen. Für dieses Forschungsprojekt ergänzt die Ruhrlandklinik aufgrund ihres Patienteneinzugsgebietes und der eigenen medizinisch-wissenschaftlichen Expertise in idealer Weise die analysierenden Plattformtechnologien von PURE.

Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde im Rahmen einer Querschnittstudie durchgeführt. Zur Detektion von Biomarkern wurden verschiedene Körpermaterialien in verschiedenen Methodenplattformen untersucht. Dabei wurden Biomaterialien von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten miteinander und mit denen von gesunden Probanden verglichen.

Die Probanden rekrutierten sich aus Patientinnen und Patienten mit einer Erkrankung an Lungen- und Pleuratumoren, die sich in der Ruhrlandklinik zur Diagnostik oder zu einem thoraxchirurgischen Eingriff vorstellten. Zusätzlich wurden Probanden mit gutartigen Erkrankungen der Lunge und Pleura sowie mit Lungen- und Pleurametastasen primär anderenorts lokalisierter Tumoren rekrutiert. Gesunde Kontrollprobanden rekrutierten sich aus bevölkerungsbezogenen Kontrollen aus der Studienregion, die über das Einwohnermeldeamt angeschrieben wurden.

Die Studie wurde in pseudonymisierter Form durchgeführt, wozu ein Treuhänderkonzept erarbeitet wurde. Dabei wurde von dem Datenschutzkonzept und dem darin integrierten

Pseudonymisierungsverfahren profitiert, welches durch das Wissenschaftliche Studienzentrum im Rahmen des PURE-Projektes entwickelt und vom Datenschützer der Ruhr-Universität Bochum bereits genehmigt worden war. Aufgrund der Kongruenz in wesentlichen Merkmalen der Studie war eine weitgehende Übertragung des Konzeptes möglich.

Es muss betont werden, dass das hier vorliegende Studiendesign es nicht erlaubt, kausale Zusammenhänge zwischen der frühzeitigen Diagnose eines Tumors der Lunge oder Pleura und den ihn verursachenden Faktoren z.B. einer beruflichen Einwirkung gegenüber bestimmten Gefahrstoffen wie polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, Chrom, Nickel, Partikel, Asbest o.ä. zu erkennen. Dies gilt für sämtliche Früherkennungsmaßnahmen und ist vollständig unabhängig von der Wahl der diagnostischen Methoden, da z.B. ein durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe verursachter Lungentumor grundsätzlich eine ähnliche Pathophysiologie aufweist wie ein Chrom- oder Nickel-induzierter Lungentumor. Auch eine HRCT ist per se nicht in der Lage, die verursachende Noxe (z.B. Asbest) eines Lungentumors zu identifizieren. Erst im Zusammenhang mit der Wahl geeigneter Hochrisiko-Kollektive wie denjenigen der DGUV (ODIN, ZeBWis, etc.) und durch den Vergleich mit nicht exponierten Kontrollpersonen könnten möglicherweise kausale Risikofaktoren identifiziert werden. Dementsprechend ist vorgesehen, die identifizierten Biomarker zum frühestmöglichen Zeitpunkt zu Studienzwecken in zukünftige oder bereits laufende Studien der DGUV (z. B. MoMar) zu integrieren bzw. in die arbeitsmedizinische Nachsorge von vormals gegenüber Kanzerogenen exponierten Beschäftigten zu implementieren.

Phasen der Biomarkerentwicklung

Bevor ein Biomarker in der klinischen Praxis eingesetzt werden kann, muss er mehrere Phasen der Biomarkerentwicklung durchlaufen, in denen der Nutzen eines Markers für die Früherkennung bzw. Diagnostik unter Beweis gestellt werden muss (Pesch et al. 2014, Pepe et al. 2008). Grob unterteilen lassen sich hier die Identifizierung, die Verifizierung und die Validierung (Abb. 1).

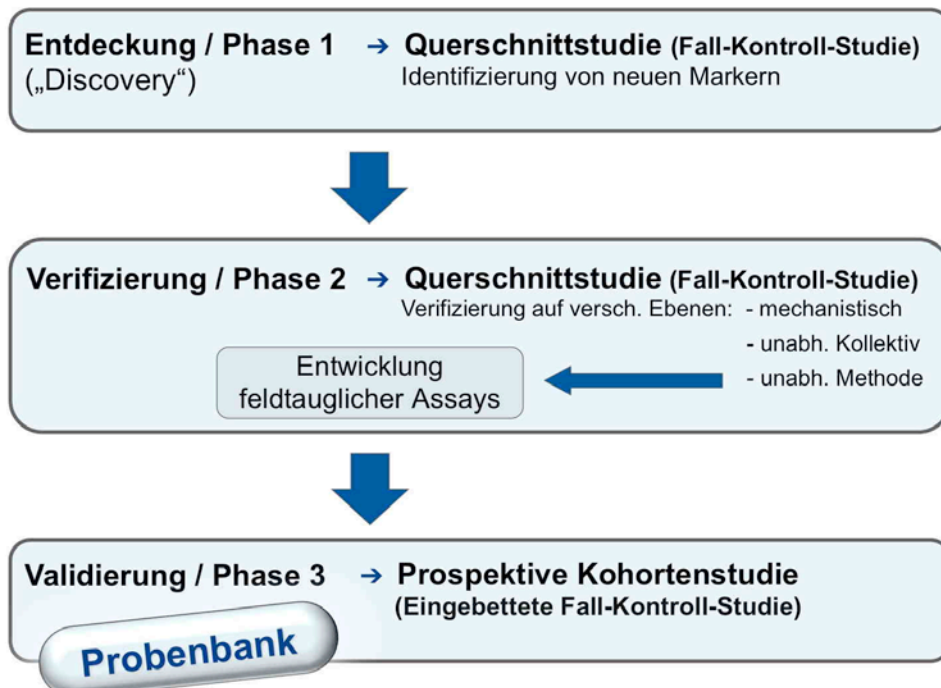


Abb. 1: Phasen der Biomarker-Entwicklung

In der allgemeinen Biomarker-Entwicklung werden häufig nur zwei Entwicklungsphasen angegeben (Identifizierung und Validierung). Dabei ist die hier als „Verifizierung“ bezeichnete Phase häufig Teil der Validierung. Biomarker zur Früherkennung können abschließend nur mit einer aufwändigen Längsschnittstudie (Kohortenstudie) validiert werden. Bevor also das wertvolle Probenmaterial einer Kohorte für die Validierung neu entdeckter Marker verwendet wird, sollten diese Marker in einem separaten Schritt mit einer unabhängigen Methode und einem unabhängigen Patientenkollektiv verifiziert werden.

Der erste Schritt der Biomarkerentwicklung, auf den sich die aktuelle Projektphase konzentriert hat, wird als Identifizierungs- oder Entdeckungsphase („Discovery“) bezeichnet. In dieser Phase gilt es, möglichst viele Biomarkerkandidaten zu identifizieren, die gut zwischen (an Krebs) erkrankten und nicht erkrankten Personen unterscheiden können. Typischerweise wird die Identifizierung im Rahmen von klinischen Querschnittstudien durchgeführt, in denen prävalente Krebsfälle in allen klinischen Stadien mit einem Sample von Patienten, deren maligner Anfangsverdacht sich nicht bestätigt hat, verglichen werden. Querschnittstudien sind durch zahlreiche Verzerrungsquellen gekennzeichnet, die künstliche Konzentrationsunterschiede von Markern zwischen Kranken und Gesunden bedingen können. Eine erfolgreiche Abgrenzung zwischen prävalent kranken Krebsfällen (häufig in mittleren und späten Stadien) und gesunden Probanden sagt darüber hinaus nichts über die Fähigkeit eines Markers aus, frühe Tumorstadien im Rahmen der Früherkennung zu detektieren. Hinzu kommt, dass sich im Rahmen der Discovery i.d.R. viele Marker, z.B. auf Basis von chipbasierten Technologien identifizieren lassen, die allein auf statistischen Zufallsbefunden beruhen. Es ist daher typisch, dass sich im Laufe der Markerentwicklung die Zahl der getesteten Biomarkerkandidaten drastisch reduziert (Pesch et al. 2014, Behrens et al. 2014).

Zur Reduzierung dieser Störfaktoren und Verzerrungsquellen dient die „Verifizierung“, die mit unabhängigen Methoden, und optimalerweise in einem unabhängigen klinischen Sample erfolgen sollte. Zudem sollten die Marker auch in Hinblick auf den Pathomechanismus der Tumorerkrankung einen Sinn ergeben.

Die abschließende „Validierung“ bezeichnet die Untersuchung der nach dem Selektionsschritt der Verifizierung übrig gebliebenen Marker in einem prospektiven Kollektiv von zu Studienbeginn noch nicht erkrankten Personen, die in regelmäßigen Abständen wieder eingeladen werden, um eine Bioprobe abzugeben, bis sie die Zielerkrankung entwickelt haben. Dieser Schritt ist entscheidend, um feststellen zu können, ob ein Marker die Krebserkrankung in einem Frühstadium vor einer klinischen Diagnose detektiert, so dass der betroffene Patient frühzeitig einer Therapie zugeführt werden kann. Da prospektive Studien eine lange Zeit und hohe Logistik erfordern, durchlaufen viele Kandidaten aus publizierten Biomarkerstudien diese Phase nicht (Behrens et al. 2014).

Um eine ausreichende Zahl von Erkrankungsfällen beobachten zu können, bietet es sich deshalb an, die prospektive Validierung an einem Kollektiv von Personen durchzuführen, die ein hohes Risiko für die Entwicklung der untersuchten Krebserkrankung aufweisen. Derartige Hochrisikokollektive von Beschäftigten, die in der Vergangenheit Umgang mit karzinogenen Arbeitsstoffen hatten, stehen z.B. im Rahmen der Nachgehenden Untersuchungen der DGUV zur Verfügung.

Da diese Beschäftigten sich von der Allgemeinbevölkerung unterscheiden, ist es i.d.R. anschließend noch erforderlich, die validierten und zur Marktreife gebrachten Marker in der Allgemeinbevölkerung zu testen. Hier können dann auch randomisierte Studien zum Einsatz kommen, die belegen, ob ein bevölkerungsweites Screening mit Markern zu einem Überlebensvorteil der gescreenten Personen führt.

Eine gesenkte Mortalität durch Früherkennung stellt eine Grundvoraussetzung für die Anwendung von Früherkennungsmaßnahmen dar (Pepe et al. 2008).

Leider herrscht in der Literatur hinsichtlich der einzelnen Phasen der Biomarkerentwicklung nicht immer Begriffsklarheit, da viele Autoren den Begriff „Validierung“ auch für die methodische Verifizierung bzw. Verifizierung in einem unabhängigen Probandenkollektiven verwenden (Brenner und Normolle 2007). Um hier eindeutige Begriffe zu verwenden, haben wir uns entschlossen, die unabhängige und methodische „Validierung“ eines Markerkandidaten unter den Begriff der „Verifizierung“ zu fassen. Diese begriffliche Klarstellung ändert aber nichts am typischen Verlauf der Markerentwicklung, der mit der Validierung in prospektiven Studien abschließen muss.

Workflow

Die Einbindung des europäischen Proteinforschungskonsortiums PURE, in welchem proteinbasierte Methoden und Biomarker für die Frühdiagnostik von onkologischen und neurodegenerativen Erkrankungen entwickelt werden, gewährleistet die Bereitstellung der an eine erfolgreiche Biomarkeridentifizierung geforderten strukturellen und forschungstechnischen Grundvoraussetzungen. Auf den in PURE bereits existierenden Strukturen aufbauend, wird im Rahmen des gemeinsamen Projekts mit Klinikern der Essener Ruhrländklinik und dem Institut für Pathologie der Universität Duisburg-Essen ein effizienter Workflow für die Entwicklung proteomanalytischer Verfahren zur Identifikation von Markerkandidaten zur Unterstützung der (Früh-)Diagnose asbestassoziierter Lungen- und Pleuratumoren etabliert (Abb. 2).

Der Workflow integriert unter der Überschrift „Klinik“ die beiden klinischen Bereiche Interventionelle Pneumologie/Bronchologie und Thoraxchirurgie und thorakale Endoskopie sowie das Institut für Pathologie, ein Studienzentrum, die beiden Plattformtechnologien Biophotonik und Proteomik sowie die Bioinformatik.

Der Bereich „Klinik“ ist insbesondere für die Probengewinnung, die klinische Charakterisierung des Probenmaterials aber auch die pathologisch-anatomische und zytologische Charakterisierung des Probenmaterials zuständig. Begleitend werden hier allerdings auch die Atemluftdiagnostik durch Ionenmobilitätsspektrometrie und Micro-RNA-Screenings durchgeführt.

Das Studienzentrum entwickelt die für die Durchführung der Studien erforderlichen Ethik- und Datenschutzkonzepte, entwickelt die Probandeninterviews, führt Maßnahmen zur Qualitätssicherung durch und unterstützt die statistische Auswertung der Daten.. Darüber hinaus werden potentielle für die Früherkennung geeignete Marker auf der Ebene der DNA-Methylierung untersucht.

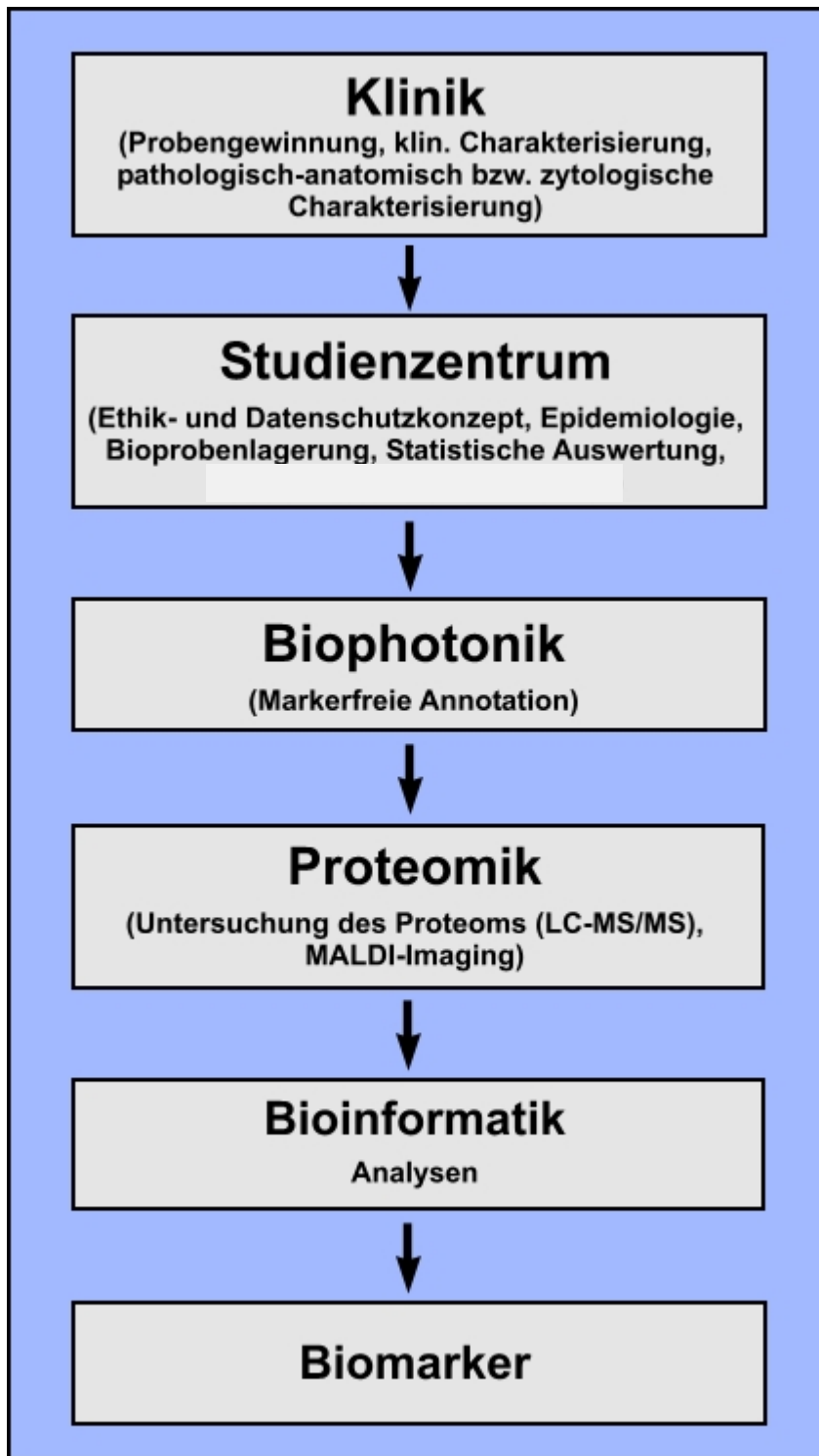


Abb. 2: Für das Projekt aus PURE adaptierter Workflow für die Entwicklung proteinanalytischer Verfahren zur Identifikation von Marker Kandidaten zur Unterstützung der (Früh-)Diagnose asbestassoziierter Lungen- und Pleuratumoren.

Die Biophotonik analysiert Blut- und Gewebeprobe mit Hilfe vibrationspektroskopischer Methoden. Hierbei dient das Vibrationspektrum als molekularer Fingerabdruck, der integral das Proteom, Transkriptom, Metabolom und Genom reflektiert. Die spektralen Daten werden mit Hilfe von bioinformatischen Algorithmen klassifiziert. Ermöglicht wird hierdurch eine automatisierte, Label-freie, objektive histopathologische Charakterisierung von Lungentumoren und deren Subtypen. Die Analyse des nativen Lungengewebes ermöglicht eine Label-freie Erkennung der Tumoren und ihrer Subklassen

mit höchster räumlicher Genauigkeit. Die durch das Imaging präzise definierten topologischen Informationen über Tumorregionen werden mit Hilfe einer eigens entwickelten Software auf ein Lasermikrodissektionsgerät (LMD) übertragen, wo diese Regionen automatisiert ausgeschnitten und den anderen Bereichen zur Verfügung gestellt werden können.

In der Proteomik werden u. a. die von der Biophotonik gelieferten Proben massenspektrometrisch analysiert. Als besonders vielversprechend erweist sich dabei, neben gelbasierten Verfahren in Kombination mit Massenspektrometrie, die „labelfreie“ Massenspektrometrie-basierte Quantifizierung von Proteinspezies.

Die bioinformatische Auswertung der Proteomanalysen liefert zum Beispiel Biomarker-Kandidaten, die trotz technischer und biologischer Varianz signifikant zwischen zwei experimentellen Gruppen – etwa „krank“ und „gesund“ – unterscheiden können. Weitergehende Analysen der Protein-Ergebnislisten, wie z. B. Enrichment- oder Pathway-Analysen können eine Gesamteinschätzung des funktionellen Hintergrunds bieten und eine weitere Eingrenzung der Biomarker-Kandidaten für zukünftige Validierungs-Schritte ermöglichen.

Rekrutierung

In die Studie eingeschlossen werden sollten nicht-kleinzellige Lungentumoren, kleinzelligen Lungentumoren, Mesotheliome und Probanden mit gutartigen Erkrankungen der Lunge und der Pleura sowie mit Lungen- und Pleurametastasen, die sich in der Ruhrlandklinik zur Diagnostik oder zu einem thoraxchirurgischen Eingriff vorstellten. Zusätzlich sollte ein Kollektiv von ca. 200 gesunden Kontrollprobanden aus der Studienregion untersucht werden, welches über das Einwohnermeldeamt rekrutiert wurde (siehe Tabellen). Alle Probanden wurden ausführlich zu ihrem Lebensstil und Ihrer beruflichen Biographie befragt.

Studienkollektiv:

Tabelle 1: Übersicht der im Projekt rekrutierten und letztlich in die Studie eingeschlossenen Fallzahlen. In Klammern sind jeweils die bei Antragstellung geplanten/geschätzten Fallzahlen angegeben.

	Rekrutierte Fallzahlen (im Antrag geschätzt)
Kleinzellige Lungenkarzinome	33 (100)
Nicht-Kleinzellige Lungenkarzinome	392 (300) hiervon <ul style="list-style-type: none"> - 109 (100) Plattenepithel-Ca - 200 (100) Adeno-Ca - 12 (30) NSCLC Pleurakarzinose - 71 (70) seltenere Tumoren
Mesotheliome	24 (100)
Andere bösartige Erkrankungen der	37 (0)

Atemwege/Brust	
Andere gutartige Erkrankungen der Atemwege	158 (200) hiervon - 144 (100) der Lunge - 14 (100) der Pleura
Diagnose nicht gesichert	12
Patienten insgesamt	656 (700)
Gesunde Kontrollen	190 (200)
Insgesamt	846 (900)

Probengewinnung

Im Rahmen der Studie wurden unterschiedliche Probenmatrices gesammelt, deren standardisierte Gewinnung und Verarbeitung in „Standard Operating Procedures“ (SOPs) nachvollziehbar und qualitätsgesichert etabliert wurde. Die etablierten SOPs zur Probengewinnung beinhalten klare Vorgaben für die Probenaufbereitung und minimieren Einflüsse durch unterschiedliche Lagerungstemperaturen oder -zeiten. Von den Patienten wurden Gewebeproben, Blutproben, Speichelproben sowie Proben von punktierter Pleuraflüssigkeit gesammelt. Die Zusammensetzung der Ausatemluft der Patienten wurde mittels Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) analysiert. Die gesunden Kontrollprobanden wurden um Blut- und Speichelproben gebeten. Eine aufwändige und umfangreiche Probengewinnung im laufenden Routine-Betrieb einer großen Klinik stellt eine besondere Herausforderung dar. Da zur zeitaufwändigen Gewinnung von Sputumproben häufig eine Provokation mit hypertoner Kochsalzlösung erforderlich ist und Urin nicht den untersuchten Zielorganen des Thorax zuzuordnen ist, wurde während der Pilotphase der Studie von allen beteiligten Kooperationspartnern übereinstimmend beschlossen, auf die zusätzliche Sammlung der zunächst vorgesehenen Urinproben zu verzichten und anstelle der Sputumproben leichter und schneller zugängliche Speichelproben zu sammeln.

In den Abteilungen für Thoraxchirurgie und Interventionelle Pneumologie der Ruhrlandklinik konnten insgesamt 653 Patienten, mit Verdacht auf ein Lungenkarzinom in bildgebenden Verfahren, in die Studie eingeschlossen werden. 17 Patienten wurden wegen einer Infektionserkrankung (Tuberkulose, MRSA, etc. oder nachträglicher Ablehnung) wieder ausgeschlossen. Es wurden Blutproben, Gewebeproben (operativ und bronchoskopisch) sowie ab März 2014 zusätzlich Speichelproben entnommen. Zudem wurde das Exhalat von 245 Patienten mittels Ionenmobilitätsspektrometrie vor Ort gemessen. 22 Pleuraerguss-Proben wurden entnommen und verarbeitet.

Die genannten Proben wurden in der Pathologie als Frischmaterial entgegen genommen, aufgearbeitet, untersucht und entsprechend den SOPs den Plattformen zur Verfügung gestellt.

Gesammelte Bioproben:

Tabelle 2: Übersicht der Anzahl der Probanden, von denen im Rahmen der Studie Materialien gesammelt wurden. In Klammern sind jeweils die bei Antragstellung geplanten/geschätzten Probandenzahlen angegeben.

	Anzahl Probanden, von denen die Materialien gesammelt wurden (im Antrag geschätzte Anzahl)				
	Blut	Speichel	Ausatemluft	Gewebe	Pleurapunktat
Kleinzellige Lungenkarzinome	32 (100)	20 (100)	17 (100)	10 (100)	2 (10)
Nicht-Kleinzellige Lungenkarzinome	379 (300)	193 (300)	148 (300)	231 (300)	9 (30)
Mesotheliome	22 (100)	7 (100)	9 (100)	23 (80)	3 (20)
Andere bösartige Erkrankungen der Atemwege/Brust	37 (0)	15 (0)	10 (0)	26 (0)	0 (0)
Andere gutartige Erkrankungen der Atemwege	154 (200)	79 (200)	56 (200)	62 (200)	8 (10)
Diagnose nicht gesichert	12 (0)	8 (0)	5 (0)	0 (0)	0 (0)
Patienten gesamt	636 (700)	322 (700)	245 (700)	352 (680)	22 (70)
Gesunde Kontrollen	208 (200)	203 (200)	0 (200)	0 (0)	0 (0)
Proben insgesamt	844 (900)	525 (900)	245 (900)	352 (680)	22 (70)

3.3 Biospektroskopie

Im Gegensatz zu den klassischen Analysemethoden (Histologie, etc.) beruht die Biospektroskopie auf der Darstellung der gesamten Biochemie einer Probe im infraroten Spektralbereich und der Auswertung durch computergestützte Spektren- und mehrdimensionale Bildanalyse. Biospektroskopie erfolgt an unbehandelten Gewebeschnitten und Körperflüssigkeiten wie z.B. Blut, Pleuraflüssigkeit oder Urin. Diese werden parallel zur spektralen Datenaufnahme vergleichend mit konventionellen Analysemethoden diagnostiziert.

Die Lungengewebe-Proben wurden mit Hilfe des IR- und Raman-Imaging untersucht und charakterisiert. Die dafür erforderlichen Messprotokolle wurden etabliert. Hierzu wurde ein state-of-the-art IR-Mikroskop mit focal plane array Detektor (Bruker Hyperion 3000) verwendet.

Blut und Pleuraflüssigkeit wurden mit einem weltweit einmaligen Hochdurchsatz-FTIR-System analysiert (Dispensierautomat M2 Automation instrumentTwo, Vakuumspektrometer Bruker Vertex70v, Mikrotiterplattenleser HTS-XT, Titerplattenwechsler Twister, 384-well Mikrotiterplattenformat), das auf hohe Signalqualität optimiert wurde. Dafür wurden Protokolle entwickelt, um IR-Spektren von Körperflüssigkeiten reproduzierbar und in hoher Qualität zu messen. Diese wurden automatisiert gesammelt und die Datensätze mit Computeralgorithmen ausgewertet.

3.4 Bioinformatik

Die Auswertung erfolgte durch moderne Methoden der multivariablen Statistik und der Feature-Erkennung, die in der Bioinformatik erarbeitet worden sind. Diese Algorithmen können kleine, korrelierte Spektraländerungen selbst in der Anwesenheit von größerer, unkorrelierter Varianz identifizieren und diagnostisch auswerten. Die computergestützte Mustererkennung geschah in zwei Phasen, einer sogenannten Trainingsphase sowie einer Validierungsphase. In der Trainingsphase wurden spektral vermessene Gewebeproben klassisch angefärbt, so dass Pathologen einzelne Gewebekomponenten annotieren konnten. Anhand der so annotierten Spektralbilder wurden dann spektrale Klassifizierer antrainiert, die markerfrei nicht nur Gewebekomponenten, sondern auch gesundes von krankem Gewebe unterscheiden können.

Als Teil dieses Projekts wurden bestehende und etablierte bioinformatische Methoden in Zusammenhang mit der oben beschriebenen Trainings- und Validierungsphase angepasst, um sie zur Analyse von Lungenschnitten zu verwenden. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf der Optimierung Lungengewebes-spezifischer Klassifikatoren gelegt: Zunächst wurde anhand einiger sorgfältig annotierter Trainingsdatensätze ein etablierter Standard-Klassifikator in Form eines Random Forests trainiert, der unterschiedliche Gewebekomponenten anhand spektraler Merkmale unterscheiden kann. Um den Klassifikationsfehler dieses Random Forests zu minimieren, wurden weitere Klassifikatoren, beispielsweise Support Vector Maschinen trainiert, die speziell auf die Unterscheidung von all jenen Gewebekomponenten trainiert wurden, bei denen der Erkennungsfehler des Random Forests besonders hoch ist.

Zudem wurden bestehende Methoden zur Annotation von Gewebeschnitten weiter verbessert. So konnten automatisierte Methoden entwickelt werden, um innerhalb eines HE-gefärbten Gewebeschnittes den spektral vermessenen Ausschnitt schnell und automatisiert zu lokalisieren.

Insgesamt wurden mit klassischen Methoden annotierte, innovative spektrale Biomarker identifiziert und charakterisiert, die unter Umständen herkömmlichen Merkmalen überlegen sind.

3.5 Untersuchung des Proteoms

Die Entwicklung von Biomarkern erfolgt in einem zweistufigen Verfahren: Zunächst werden aus Gewebeproben Kandidatenproteinspezies mittels Label-freier Proteomanalyse identifiziert, welche sich dann im Anschluss auf ihre Tauglichkeit als Marker in Körperflüssigkeiten weiter qualifizieren.

Im Querschnitt wurden die Proteome von unterschiedlichen Tumortypen miteinander verglichen und potentielle Proteinspezies als Marker identifiziert. Um ausschließlich relevante Zellen analysieren zu können, werden diese zunächst mit Hilfe der etablierten Lasermikrodissektion isoliert und Proteine isoliert. Diese werden mit Protease behandelt und die entstehenden Peptide nach einer Auftrennung mit einer Flüssigkeitschromatographie mit dem Hochleistungs-Massenspektrometer LTQ Orbitrap Velos identifiziert und quantifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgt mit uni- und multivariaten Analysen, *feature selection*- und Klassifikationsverfahren sowie *enrichment*- und Pathway-Analysen. Hierfür wird

einerseits kommerzielle Software eingesetzt und andererseits Software-Tools, die von am Projekt beteiligten Bioinformatikern und Statistikern selbst entwickelt wurden.

Die erhaltenen Kandidaten müssen sich anschließend auf ihre Tauglichkeit als Protein-Biomarker durch weitere Experimente qualifizieren. Hierzu werden Westernblot Analysen und – sofern verfügbar – Immunoassays (ELISA) eingesetzt.

3.6 Atemluftdiagnostik mittels Ionenmobilitätsspektrometrie

Bei den Probanden der Pneumologie erfolgte die Gewinnung von Atemkondensat (EBC) und Exhalat. Das Atemkondensat wird durch Kondensation infolge Kühlung der Ausatemluft auf -20°C gewonnen. Dadurch gelingt es, den Wasserdampf in Wasser zu überführen und die aus der Lungentiefe beförderten Aerosoltröpfchen durch Adhäsion an der Wandung der Kühlfalle zu binden. Für die Gewinnung der Atemkondensat-Probe atmet der Proband in Ruhe für eine Dauer von 20 Minuten über ein Mundstück durch ein Nichtrückstromventil, in dem die Ein- und Ausatemluft separiert wird.

Die Untersuchung des Exhalats erfolgt mit Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS), wobei die exhalierte Luft der Probanden im Rahmen einer normalen Ausatmung über ein Mundstück aufgefangen und dem Analysegerät zur IMS zugeführt wurde. Die IMS gestattet die Untersuchung des exhalierten Proteoms, ohne einzelne Metabolite weiter zu spezifizieren. Hierbei werden die Moleküle im Exhalat ionisiert und diese Ionen bewegen sich gegen die Strömungsrichtung eines Gases auf eine Elektrode hin und werden hierbei in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit aufgetrennt. In einem zweiten Schritt können Einzelsubstanzen durch massenspektrometrische Analysen identifiziert werden.

3.7 Pathologisch-anatomische bzw. zytologische Charakterisierung der Gewebe und Zytoproben

Zur Untersuchung und Charakterisierung der Proben auf konventioneller Ebene dienen die Histologie und Immunhistochemie.

Als microRNA-Methoden sollten nach der initialen Planung an den entsprechenden Proben [Gewebe, Flüssigkeiten (Serum/Plasma, Pleuraerguss, BAL)] zur initialen Charakterisierung relevanter microRNAs eine Plattform-Technologie sowie im Weiteren RT-PCR TaqMan microRNA Assays und die Multiplex-Technologie auf Luminex-Basis zum Einsatz kommen (Biscontin et al. 2010). Durch den möglichen Zugriff auf die NanoString nCounter Technologie wurde jedoch diese eingesetzt.

3.8 Molekulare Charakterisierung der Bioproben

3.8.1 Epigenetik

Die molekulare Charakterisierung der Proben erfolgte vor allem auf der Ebene der DNA-Methylierung. Dieser wichtige epigenetische Mechanismus manifestiert sich in einer biochemischen Modifizierung bestimmter DNA-Abschnitte durch Anhängen einer Methylgruppe an die DNA-Base Cytosin. Allerdings sind nicht alle Cytosine betroffen, sondern vorwiegend Cytosin-Guanin Dinukleotide (CpG), die gehäuft in sogenannten CpG-Inseln auftreten können. Die CpG-Inseln finden sich meist in den regulatorischen Bereichen (Promotoren) der Gene. In der DNA aus Tumorgewebe wird häufig ein vom Normalfall abweichendes Methylierungsmuster beobachtet. Es kann sowohl zu einer vermehrten (Hyper-) als auch verminderten Methylierung (Hypo-) kommen. Die lokale Hypermethylierung führt zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, während eine globale Hypomethylierung eine Aktivierung von schädlichen DNA-Elementen bewirkt, die eine Destabilisierung des Genoms zur Folge haben kann. Daneben können Proto-Onkogene, die im Normalgewebe ausgeschaltet sind, durch Hypomethylierung reaktiviert werden.

Der erste Schritt dieses Projektes (Discovery-Phase) beinhaltete ein Screening, um einen Gesamtüberblick über die Veränderungen der DNA-Methylierung im Genom zwischen Tumor und Nichttumormaterial zu erhalten. Ursprünglich war ein DNA-Microarray-basiertes Verfahren geplant, welches mit einer Immunfällung (MeDIP: methylated DNA immunoprecipitation) von methylierter DNA gekoppelt war. Die Microarrays (NimbleGen) beinhalteten 25.000 Transkripte in über 18.000 Regionen des menschlichen Genoms. Allerdings wurde die Chipproduktion seitens des Herstellers kurzfristig eingestellt, so dass ein neues Verfahren etabliert werden musste. Die neue MBD-Seq-Methode hatte den Vorteil, dass im gesamten Genom auch nach neuen Methylierungsbereichen gesucht werden konnte (Lan et al. 2011; Li et al. 2010).

Von jedem Patienten wurde genomische DNA aus Tumorfrischgewebe und angrenzendem Normalgewebe extrahiert. Danach wurde zunächst die zielgerichtete Fragmentierung der genomischen DNA auf 190 Basenpaare mittels fokussiertem Ultraschall (M220 Focused-ultrasonicator, Covaris) durchgeführt. Danach erfolgte die Anreicherung von methylierten DNA-Fragmenten mittels einer an magnetische Beads gekoppelten und an methylierte DNA-Bereiche bindenden Proteindomäne (MBD) (MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit von Thermo Fisher Scientific). Aus der angereicherten methylierten DNA wurden sogenannte Libraries mit dem TruSeq ChIP Sample Preparation Kit (Illumina) hergestellt, indem spezifische Adapter an die Fragmente ligiert wurden. Anschließend erfolgten eine Größenselektion, eine Anreicherung der Libraries und eine Bead-basierte Aufreinigung. Abschließend wurde die Qualität und die Menge der Libraries bestimmt. Jede Tumorgewebeprobe wurde zusammen mit ihrem korrespondierenden Normalgewebe gleichzeitig mittels eines Next Generation Sequencers (MiSeq, Illumina) beidsträngig (Paired End, 2x75 Zyklen) sequenziert. Mit dieser Methode wurden sowohl das Lungenkrebs- als auch das Mesotheliom-Screening durchgeführt. Die Untersuchung der Unterschiede im Methylierungsgrad zwischen Tumor- und Normalgewebe im gesamten Genom zeigte spezifische Methylierungsmuster, die sowohl bei der Tumor-Charakterisierung als auch zur Markerfindung genutzt wurden. Die Auswertung erfolgte durch die Bioinformatik des MPC mit dem Software Paket MEDIPS. Es sollten von 100 Patienten sowohl Lungentumor- als auch Nichttumorgewebe mit bestimmten Anforderungen (80% Tumoranteil bzw. 100% Nichttumorgewebe) analysiert werden, da jedoch die Anzahl an Patienten erst am Ende der Studie erreicht wurde und bereits eine große Anzahl potenzieller Marker gefunden werden konnte (siehe 4.3.3.1), wurde nach 80 Patienten von weiteren MBD-Sequenzierungen abgesehen.

Vielversprechende Marker aus diesem Screening wurden mittels Einzelassays (Pyrosequencing) jeweils in bis zu 84 von 160 Gewebeproben verifiziert. Das Pyrosequencing ermöglicht nicht nur eine qualitative Aussage über den Methylierungsstatus eines Genpromotorbereichs sondern auch eine Quantifizierung der Methylierung einzelner CpG-Positionen in einem Genpromotor. Die Einzelassays haben gegenüber den MBD-Seq Verfahren den Vorteil, dass Bestimmungen auch in geringerem Probenmaterial möglich sind. So kann beispielsweise auch eine Bestimmung des Methylierungsgrades von freier DNA im Plasma erfolgen. Für die Pyrosequencing-Methode musste zuerst die DNA aus Frischgewebe und Speichel mit dem QIAamp DNA Mini Kit, aus den EBUS-TBNA Proben (endobronchiale Ultraschall-geführte transbronchiale Nadel-Aspiration) und dem Pleurapunktatpellet mit dem QIAamp DNA Micro Kit, aus Plasma mit dem PME free-circulating DNA Extraction Kit und aus dem Pleurapunktat Überstand mit dem QIAamp-Circulating-Nucleic-Acid Kit isoliert werden. Danach erfolgte die Bisulfit-Konvertierung der DNA, wobei bei DNA-Mengen von $\geq 300\text{ng}$ das EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) und bei $\leq 300\text{ng}$ DNA das Premium Bisulfite Kit (Diagenode) verwendet wurde. Die Einzelassay-spezifischen PCRs wurden mit dem PyroMark PCR Kit mit unterschiedlichen, auf den jeweiligen Assay abgestimmten, Annealing-Temperaturen durchgeführt. Nach Assay-Design, Etablierung und Verifizierung der neuen Einzelassays

im Gewebe wurden daraufhin zwei der potenziellen Biomarker-Kandidaten in allen Plasmaproben aus dem Patientenkollektiv und dem Kontrollkollektiv analysiert. Zusätzlich wurden mehrere neue Einzelassays in nahezu allen EBUS-TBNA-, Speichel- und Pleurapunktatproben aus dem gesamten Kollektiv dieser Studie getestet.

3.8.2 Proteine

Die Proteine Survivin und HIF1A gelten als potentielle Biomarker für Lungenkrebs, da diese in Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen in größeren Mengen nachweisbar sind. Für den Einsatz als Biomarker sollte der Nachweis allerdings in humanen Körperflüssigkeiten erfolgen. Zu diesem Zweck wurden Antikörper-basierte Messverfahren (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) zum Nachweis von Survivin und HIF1A entwickelt. Dazu wurden zunächst die kodierenden Gene für Survivin und HIF1A kloniert, heterolog überexprimiert und die entsprechenden Proteine isoliert. Für die Antikörpergenerierung wurden diese als Antigene Kaninchen appliziert, um anschließend die spezifischen Antikörper aus den Seren der immunisierten Kaninchen zu isolieren. Die gewonnenen Antikörper wurden abschließend für den Aufbau und die Optimierung der Sandwich-ELISAs verwendet. Die etablierten Sandwich-ELISAs wurden zur Quantifizierung von Survivin und HIF1A in den gesammelten 731 humanen Plasmaproben eingesetzt.

3.9 Studieninstrumente

Um die Qualität des Projektes sichern zu können, werden alle wichtigen Arbeitsschritte in einem Operationshandbuch als Standard Operating Procedures (SOPs) dokumentiert. Weitere Studieninstrumente sind die Fragebögen, das Studienprotokoll und das Coding Manual, welches die Struktur der Datenbank beschreibt.

3.10 Statistische Auswertung

Die gesammelten Vibrationsspektren von Gewebe- und Bodyfluid-Proben wurden durch etablierte Analyse-Abläufe ausgewertet. Hierbei kommen bewährte Techniken des überwachten und unüberwachten Lernens zum Einsatz. Die Vorhersage des Krankheitsstatus einer Probe erfolgt üblicherweise mit Hilfe von überwachten Klassifizierern, insbesondere mit bei Bildspektren sehr zuverlässigen Random Forests oder aber mit Techniken der Linearen Diskriminanten Analyse oder Support Vector Maschinen. Zur Validierung dieser Klassifikatoren werden Qualitätsmaße wie Genauigkeit, Sensitivität und Spezifität betrachtet; wann immer möglich, wird auch die Kurvenfläche (Area under Curve) einer Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Kurve ermittelt.

Zur Charakterisierung der Bildspektren der spektralen Histopathologie wurde ein mehrschichtiger überwachter Klassifizierer entwickelt, welcher aus drei Ebenen von Random Forest (RF) Klassifizierern besteht. Der erste RF (100 spektrale Merkmale, 500 Bäume) unterscheidet sehr robust zwischen gesunden und pathologisch auffälligen Regionen. Die auffälligen Regionen werden an den zweiten RF (385 spektrale Merkmale, 500 Bäume) weitergegeben, welcher die Tumorklasse und Entzündungen differenziert. Die dritte Ebene von RFs (385 spektrale Merkmale, 500 Bäume) wird jeweils für die Subklassifizierung der Tumorklassen (z. B. Adenokarzinome) trainiert. Sensitivität und Spezifität können bei diesem Ansatz nicht getrennt bestimmt werden, da es sich um einen System mit mehr als zwei Klassen handelt. Der verwendete Trainingsdatensatz für die Subklassifizierung der Adenokarzinome besteht aus 5 Klassen mit jeweils mehr als 5000 Spektren. Für die spektrale Histopathologie (SHP) wurden auch Support Vector Maschinen getestet, diese zeigen nach vorheriger Merkmalsselektion ähnlich gute Ergebnisse wie die RFs. Aufgrund der Recheneffizienz wurde den RFs der Vorzug gegeben. Wichtig für die Bewertung der Ergebnisse ist, dass bei allen gezeigten Klassifizierern die Trainingsdaten

strikt von den Validierungsdaten getrennt sind. Bei einer Unterrepräsentierung einzelner Klassen können Validierungsdatensätze zu Trainingsdatensätzen werden, fallen dann aber zur Validierung weg.

Bei den Auswertungen zur labelfreien Proteomik wurde die Hauptkomponentenanalyse für quantitative Protein-Daten verwendet und grafisch dargestellt. Die Grafiken wurden hier verwendet, um die globale Struktur der Daten zu visualisieren und die technische Varianz, Reproduzierbarkeit und mögliche Ausreißer zu beurteilen. Für die Erstellung einer Liste von differenziellen Kandidaten-Proteinen wurde der Hypothesen-Test ANOVA (Annahme gleicher Varianzen in beiden Gruppen) verwendet und die Regulation zwischen den zwei experimentellen Gruppen berechnet (*fold change*, FC). Zur finalen Selektion von Kandidatenproteinen wurde die euklidische Distanz berechnet, die beide Kriterien (p-Wert, FC) zusammenfasst. Außerdem wurde die Proteinliste mit bekanntem biologischem Wissen annotiert und die Überrepräsentation von differenziell regulierten Proteinen in bekannten biologischen Pathways berechnet.

Bei den Epigenetik-Auswertungen wurde zur Ermittlung der differentiellen DNA-Methylierungsunterschiede zwischen Tumor- und Kontrollgewebeprobe durch die verwendete Software MEDIPS ein t-Test angewandt. Um die Ergebnisse von Messungen mit einer Technologie mit denen einer anderen Technologie zu vergleichen, wurde eine Punktwolke zur visuellen Überprüfung erstellt und der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet.

3.11 Bioprobenbank

Für die im Rahmen des Projektes gesammelten Bioproben zur Identifizierung und Charakterisierung von neuen Biomarkern wurde eine Bioprobenbank durch das in das Projekt eingebundene Wissenschaftlich-Epidemiologische Studienzentrum von PURE aufgebaut. Die Proben wurden zeitnah direkt nach der Gewinnung in den Kliniken gemäß der SOPs aufgearbeitet, konserviert und bis zum Verbrauch in der Bioprobenbank eingelagert. Die Basis für die Logistik und Dokumentation des Bioprobenmaterials bildete die für PURE weiterentwickelte Biobanksoftware StarLims, welche sämtliche qualitätsrelevanten Prozesse des Biomaterials protokolliert. Die für die Forschung wichtigsten proben- und probandencharakterisierend Daten wurden ebenfalls in StarLims erfasst, so dass die Plattformen für die Analyse geeigneter Bioproben direkt über die Datenbank vornehmen konnten.

3.12 Maßnahmen zur Qualitätssicherung

Die Feldarbeit erfolgte nach den Standards der Good Epidemiological Practice (GEP). Dabei kamen die entsprechenden Instrumente wie Studienprotokoll und das Operationshandbuch zum Einsatz. Die Laboranalysen wurden nach Good Laboratory Practice (GLP)-Standards durchgeführt.

3.13 Zeitplan des Projektes

Gesamtdauer: Die ursprünglich beantragte Gesamtdauer des Projektes betrug 24 Monate. Das Projekt wurde um 4 Monate bis 06/2015 kostenneutral verlängert, um die Arbeiten, insbesondere die zeitlich nach der Probensammlung angeordneten Analysen und Auswertungen, zu einem erfolgreichen Ergebnis zu führen. Die Verlängerung betrifft insbesondere das Arbeitspaket B.

Die beiden Arbeitspakete A und B gliedern sich in:

Arbeitspaket A:

- A1 Ruhrlandklinik:
Probengewinnung
klinische Charakterisierung der Probanden
- A2 Pathologie:
Pathologisch-anatomische bzw. zytologische Charakterisierung der Gewebe- und Zytoproben

Arbeitspaket B:

- B1 Wissenschaftliches Studienzentrum PURE:
Ethik- und Datenschutzkonzept
Erstellung von Fragebögen und Erfassung medizinischer und berufsanamnestischer Daten
Datenhaltung
Bioprobenbank
Statistische Auswertung
Molekulare Charakterisierung der Proben
Biostatistische Analyse
- B2 Biophysik:
Biospektroskopische Untersuchung
Bioinformatische Analyse
- B3 MPC:
Untersuchung des Proteoms mit Massenspektrometrie (LC-MS/MS)
MALDI-Imaging
Bioinformatische Proteomanalysen

Der überwiegende Anteil der Arbeiten des Arbeitspaketes A, vor allem die Rekrutierung und die klinische Charakterisierung der Patientenproben an der Ruhrlandklinik, konnten innerhalb der ursprünglich beantragten Projektlaufzeit bis Ende 02/2015 abgeschlossen werden. Insbesondere die Charakterisierung des Probenmaterials durch die Pathologie war jedoch auch für die weiteren Arbeiten im Arbeitspaket B bis Ende 06/2015 elementar.

Der überwiegende Anteil der Arbeiten des Arbeitspaketes B umfasst die Untersuchung des im Arbeitspaket A erhaltenen Biomaterials mit unterschiedlichen Methoden und die anschließende Analyse

der erhaltenen Daten zur Identifizierung von Biomarkerkandidaten. Insbesondere die zeitlich nach der Probensammlung angeordneten Analysen und Auswertungen machten eine Verlängerung des Projekts um vier Monate bis Ende 06/2015 erforderlich.

Die im Zeitraum der Verlängerung erfolgten Arbeiten im Arbeitspaket B1 beinhalteten die weiterführende molekulare Charakterisierung der Proben und die biostatistischen Analysen.

Die im Zeitraum der Verlängerung erfolgten Arbeiten im Arbeitspaket B2 beinhalteten insbesondere die Probenpräparation, Spektrensammlung und die spektroskopische Evaluation der im Arbeitspaket A gesammelten bzw. zytologisch charakterisierten Gewebeproben und Körperflüssigkeiten sowie abschließende bioanalytische Datenanalysen. Außerdem wurden die High-Throughput-Anlage und die IR-Mikroskope weiter optimiert. Weiterhin konnte die Probengewinnung auf spektraler Basis für die Proteomik etabliert werden.

Die im Zeitraum der Verlängerung erfolgten Arbeiten im Arbeitspaket B2 beinhalteten insbesondere abschließende massenspektrometrische Messungen, Datenauswertungen und biostatistische Datenanalysen.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

4.1. Biophysik (Leiter Prof. K. Gerwert)

4.1.1. Kurzdarstellung des Teilvorhabens

In der biophotonischen Analyse werden Untersuchungen an Blut- und Gewebeproben durchgeführt. Hierbei dient das Vibrationsspektrum als molekularer Fingerabdruck, der integral das Proteom, Transkriptom und Genom reflektiert. Die spektralen Daten werden mit Hilfe von bioinformatischen Algorithmen klassifiziert. Ermöglicht wird hierdurch eine automatisierte, lautfreie, objektive histopathologische Charakterisierung von Lungentumoren und deren Subtypen.

Die Analyse des nativen Lungengewebes ermöglicht eine lautfreie Erkennung der Tumoren und ihrer Subklassen mit hoher räumlicher Genauigkeit. Die durch das Imaging präzise definierten topologischen Informationen über Tumorregionen werden mit Hilfe einer von uns entwickelten Software auf ein Lasermikrodissektionsgerät (LMD) übertragen, wo diese Regionen automatisiert ausgeschnitten werden können. Das gut definierte Gewebe wird in den weiteren Plattformen durch Proteomik und Genomik genauer charakterisiert. Damit werden die der Erkrankung zu Grunde liegenden molekularen Veränderungen in den Signalwegen der Zelle bestimmt und Proteinbiomarker identifiziert. Im Rahmen dieses Projekts wurde dieser Ansatz zur proteomischen Analyse der Subklassen der Mesotheliome in Zusammenarbeit mit dem Medizinischen Proteom-Center eingesetzt. Die Ergebnisse werden unter Abschnitt 4.2 beschrieben. Identifizierte potentielle Biomarker werden mit den spektralen Markern korreliert, um den Multiplexcharakter der spektralen Histopathologie zu verifizieren.

4.1.2. Darstellung der Forschungsarbeiten

Die Forschungsarbeiten im Teilvorhaben Biophysik konzentrieren sich einerseits auf die Analysen von Gewebeproben und Körperflüssigkeiten, andererseits auf die Entwicklung faseroptischer Sonden. Erste FTIR-spektroskopische Erfolge in Bezug auf Spektrale Histopathologie (SHP) wurden kürzlich zusammenfassend veröffentlicht (Großerüschkamp, Kallenbach-Thieltges et al. 2015).

Gewebe

Im Rahmen des Lungenprojektes wurden 169 native Gewebeproben vermessen. Nach erfolgter Optimierung der Auswertungsprozeduren zur Gewinnung der Lernspektren für den überwachten Klassifizierer, Random Forest (RF), konnte zunächst zwischen „krank“ bzw. „gesund“ unterschieden werden. Eine automatisierte Erkennung der Tumorart und Subklassifizierung für Adenokarzinome und Mesotheliome konnte etabliert werden. Die Charakterisierung der Proben erfolgte anhand der nach der Messung angefertigten Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung der Gewebeproben in enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Theegarten.

Diese Erkennung wird im weiteren Verlauf der Analysen genutzt, um an den nativen Gewebeproben Lasermikrodissektion (LMD) einzusetzen. Mit der LMD können die tumorhaltigen Areale des Gewebeschnitts sehr exakt und weitestgehend automatisiert gesammelt werden, um sie dann in Zusammenarbeit mit dem MPC proteomanalytisch weiter zu untersuchen.

Körperflüssigkeiten

Ziel der Analysen von Körperflüssigkeiten ist es, mit Hochdurchsatz-FTIR-Spektroskopie spektrale Markermuster für die Erkennung eines vorliegenden Lungenkarzinoms zu identifizieren und ggf. unterschiedliche Karzinomtypen durch einen Test von Körperflüssigkeiten unterscheiden zu können.

Faseroptische Sonden

Um eine Anwendung im OP zu ermöglichen, wird eine Erkennung mit handlichen und relativ robusten Fasersonden trainiert. Fasersonden ermöglichen eine schnelle Messung mit grober Ortsauflösung, jedoch hoher Empfindlichkeit. Die Messung wird mit einem flexiblen Sondenkopf durchgeführt, der über einen faseroptischen Lichtleiter mit einem kleinen, mobilen Spektrometer gekoppelt ist.

So werden Spektren von der Oberfläche entnommener Gewebeproben mit FTIR aufgenommen. Mit elaborierten bioinformatischen Verfahren werden diese Spektren auf Markermuster für veränderte und normale Bereiche analysiert.

In diesem Projekt wurde die Anwendbarkeit der faseroptischen FTIR-Sensorik an entnommenen Gewebeproben erforscht, um eine schnelle Klassifikation krankhaft veränderten Lungengewebes praktisch noch im OP-Saal zu ermöglichen.

Ausreichend kleine und flexible Fasern könnten den Einsatz dieser Methoden auch bei Bronchoskopien erlauben.

4.1.3. Beschreibung erreichter Ergebnisse

Gewebe

Zur Identifizierung der pathogenen Regionen in nativem Lungengewebe wurden 169 Gewebeproben von 135 verschiedenen Patienten vermessen. Bei der Auswahl der untersuchten Patienten konnten verschiedene Charakteristika wie z. B. Rauchstatus, Geschlecht oder Alter berücksichtigt werden. Der entwickelte Datensatz unterscheidet zunächst zwischen pathologisch verändertem und gesundem Gewebe. Anschließend erfolgt eine Einteilung in verschiedene Tumorentitäten und im Fall von Adenokarzinomen und Mesotheliomen wurde zusätzlich eine Subklassifizierung vorgenommen.

Die definierten Klassen beinhalten im Detail das benigne Hamartochondrom, Karzinoide, Adenokarzinome der Lunge, Pleuramesotheliome, Plattenepithelkarzinome der Lunge und kleinzellige Karzinome. Hierbei war es wichtig, nicht nur gesunde und entzündliche Regionen, sondern möglichst alle in der Lunge auftretende und infiltrierende Tumore in den Datensatz aufzunehmen. Die Berücksichtigung aller auftretenden Gewebe- und Tumorformen ist für eine genaue Karzinomerkenkung nötig. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten erfolgreich veröffentlicht werden (Großerüschkamp et al. 2015).

Im Falle der Adenokarzinome konnte mit Hilfe der Spektroskopie eine automatisierte, labelfreie Subklassifizierung vorgenommen werden. Hierzu wurden acht Patienten mit unterschiedlicher Subklassifizierung für den Trainingsdatensatz der hierarchisch angeordneten Random Forests verwendet. Die Patienten wiesen sowohl einen unterschiedlichen Raucherstatus wie auch ein unterschiedliches Alter und Geschlecht auf. Nach Vermessung der Proben wurden diese durch den Pathologen Prof. Dr. Theegarten erneut annotiert, um die exakten Tumorregionen und ihre Subklassifizierung besser zu definieren. Nach erfolgreichem Training der automatisierten Erkennung von Subklassen des Adenokarzinoms erfolgte eine methodische Validierung mit 49 Adenokarzinomproben. Die Genauigkeit in den 49 Validierungsschnitten lag bei 96% im Vergleich zur finalen Tumorklassifizierung des Pathologen. Leider können Sensitivität und Spezifität für einen Klassifizierer mit mehr als zwei Klassen methodenbedingt nicht bestimmt werden und somit in einer ROC-Kurve dargestellt werden, da hierzu derzeit kein mathematisches Modell zur Verfügung steht. In der Gruppe parallel laufende Studien zu Darmkrebs und Blasenkrebs haben an deutlich größeren Fallzahlen gezeigt, dass aufgrund der hohen Anzahl an zugrundeliegenden Spektren (etwa 10 Millionen Spektren pro

Probe) schon an kleinen Fallzahlen sehr gut eine Einschätzung der zu erwartenden Genauigkeit möglich ist, die durch eine Erhöhung der Fallzahlen noch verbessert werden kann. Exemplarisch für die Subtyperkennung sind in Abb. 3 die Falschfarbenbilder der automatisierten Erkennung im Vergleich zur klassischen H&E-Färbung gezeigt.

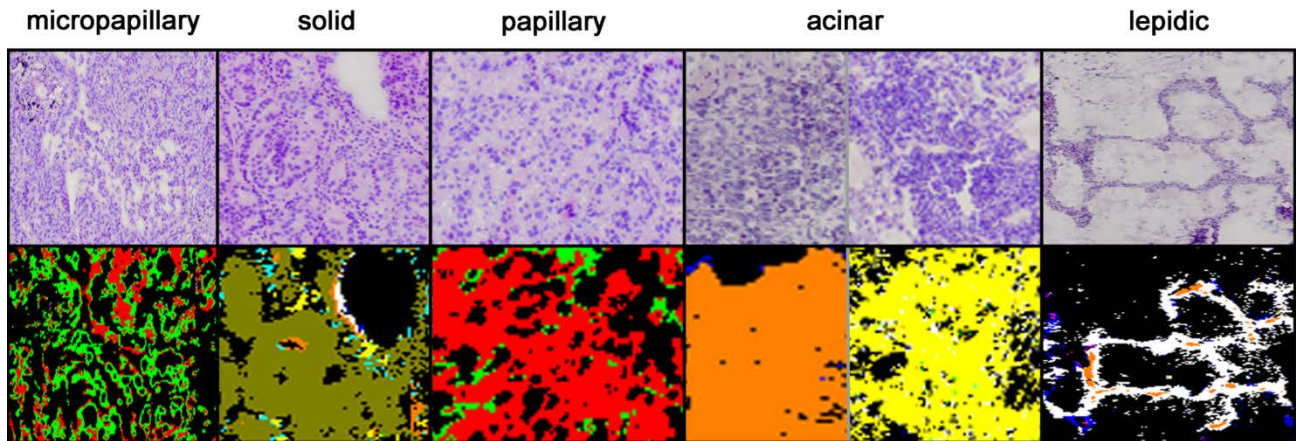


Abb. 3: Vergleich der klassischen H&E-Färbung mit der automatisierten, spektralen Subklassifizierung von Adenokarzinomen. Die Subklassifizierung von lepidisch nach mikropapillär repräsentiert den prognostischen Wert der Diagnose.

Für die Charakterisierung der Mesotheliome wurden von allen verfügbaren Patienten zusätzliche biologische Replikate verwendet, um eine höhere Probenzahl zu erreichen. Sämtliche Proben konnten als Mesotheliom klassifiziert und in den epitheloiden und sarkomatoiden Subtyp klassifiziert werden. Dies wurde genutzt, um durch Koordinatentransfer an eine Lasermikrodissektion Proben der beiden Subtypen automatisiert für die labelfreie Proteomik zu sammeln. Als Beispiel eines identifizierten Proteins kann Calretinin genannt werden (Abb. 4). Hierbei zeigte sich, dass für den Patienten LA0086 das Calretinin in der Proteomanalyse nicht als differentiell überexprimiertes Protein nachgewiesen werden konnte (Abb. 4A). Dieser Befund stimmt mit der Erkennung durch die spektrale Histopathologie überein, welche einen eher sarkomatoiden Anteil in dem Tumor erkannt hat. Durch immunhistochemische Färbung mit anti-Calretinin konnten diese Ergebnisse und der Widerspruch zur ursprünglichen Diagnose durch den Pathologen bestätigt werden (Abb. 4B). Die spektrale Histopathologie ist trotz der geringen Probenanzahl zum jetzigen Zeitpunkt bereits in der Lage, dies korrekt zu identifizieren ohne auf eine Färbung wie anti-Calretinin angewiesen zu sein.

Insgesamt konnten 159 Proteine identifiziert werden, die signifikant unterschiedlich reguliert sind und als potentielle Biomarkerkandidaten in Frage kommen. Eine Veröffentlichung dieser Ergebnisse ist in Vorbereitung. Insbesondere konnten sieben sehr vielversprechende Biomarkerkandidaten neu identifiziert werden. Es muss jetzt geprüft werden, ob sich diese Biomarkerkandidaten in Blut wiederfinden und nachweisen lassen.

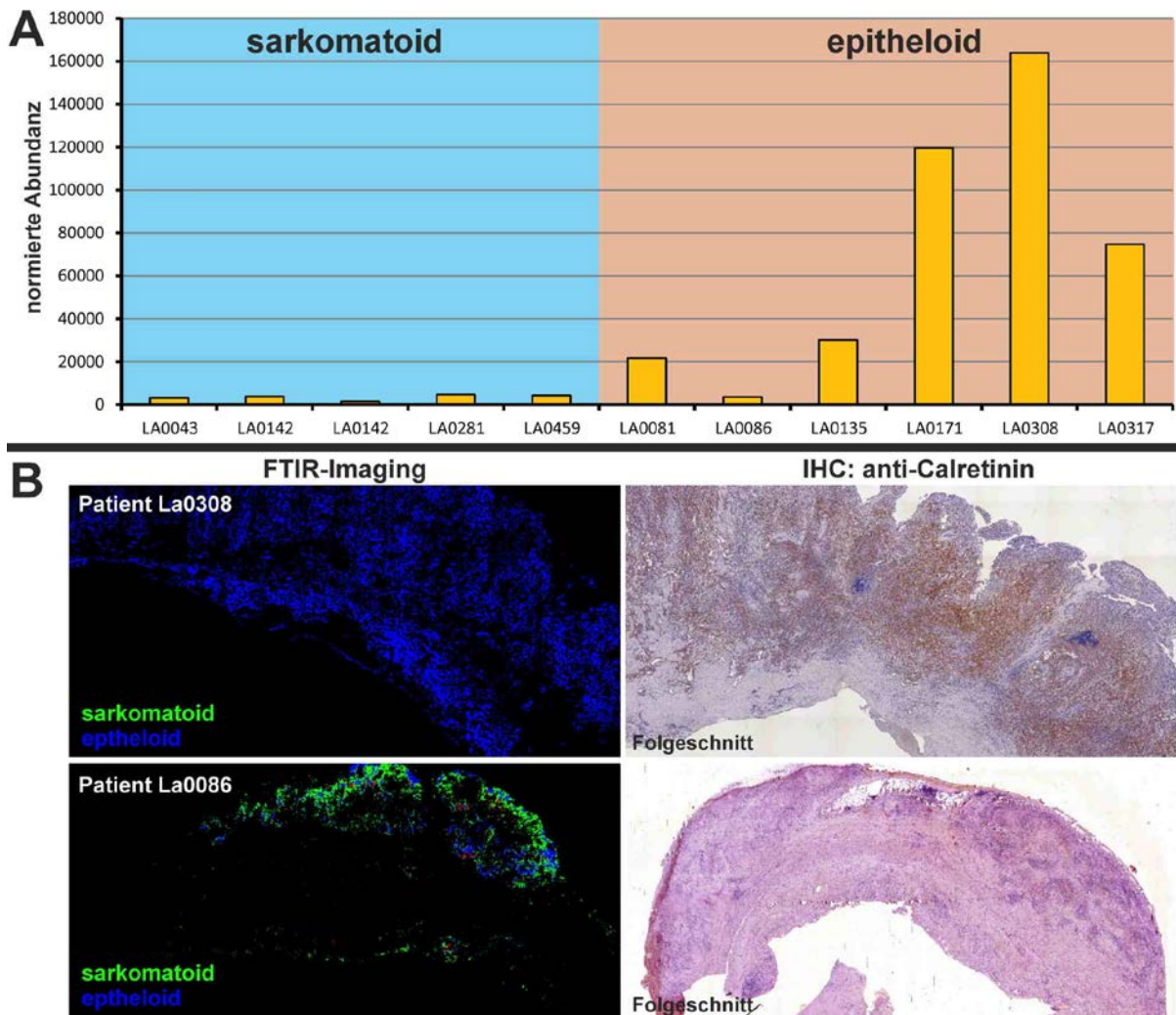


Abb. 4: A) Normierte Abundanz des Proteins Calretinin in der Proteomanalyse. Calretinin gehört zum IHC-Panel für die Unterscheidung von epitheloiden Mesotheliomen und Adenokarzinomen (Doglioni et al. 1996; Arif und Husain 2015; Ordonez 2007). Außer in einem Patienten (LA0086) konnte dies bestätigt werden. B) Vergleich der anti-Calretinin-Färbung für die Patienten LA0317 und LA0086 mit der Detektion durch die spektrale Histopathologie. Es ist zu erkennen, dass die Ergebnisse der Proteomanalyse, der Immunhistochemie und der spektralen Histopathologie übereinstimmen.

In diesen Grenzfällen ist die Kombination der spektralen Histopathologie zur Probengewinnung für die labelfreie Proteomik ein sehr potentes Tool, um neue Proteinbiomarkerkandidaten zu identifizieren, die in Blut zur Früherkennung verifiziert werden sollen. Das Multiplexing der Methode kann aufwendige immunhistochemische und andere Vorbehandlungen der Proben ersetzen. Die auf diese Weise naturgetreu, präzise und störfaktorfrei gewonnenen Probengruppen können neben der Diagnostik für die Proteom- und zukünftig Genomanalyse genutzt werden. Durch zukünftige Kombination mit Raman und CARS wird eine höhere räumliche Auflösung erreicht werden, die die Selektion auf Zellebene ermöglichen wird.

Körperflüssigkeiten

In dem abgeschlossenen Projektzeitraum wurden drei unterschiedlich stabilisierte Blutproben standardisiert gesammelt. Für die Studie werden Serum, EDTA- und Zitrat-stabilisiertes Plasma asserviert. Die Verwendbarkeit weiterer Flüssigkeiten wie Pleura-Erguss wurde geprüft, SOPs und die Erfassung wurden vorbereitet. Bis Projektende wurden 22 Pleura-Erguss-Proben akquiriert, was vor dem

Hintergrund hoher biologischer Varianz noch nicht für eine aussagekräftige Analyse auf spektrale Biomarker ausreicht.

Für die höchst reproduzierbare Analyse von Infrarot-Absorptionsspektren getrockneter Flüssigkeitsfilme wurde ein Hochdurchsatz-Verfahren eingesetzt, das sich zur Identifikation spektraler Markermuster in Blut-Absorptionsspektren von Patienten mit Harnblasenkrebs oder Harnwegsinfekten bewährt hat (Ollesch et al. 2013, Ollesch et al. 2014). Die im Rahmen dieser Studie entwickelten Präparations- und Auswertemethoden wurden auf die Lungenkrebsstudie angepasst. Für Lungentumoren konnten spektrale Markermuster in Blut-Absorptionsspektren identifiziert werden, anhand derer mit einer Sensitivität und Spezifität von 68 bis 80 % zwischen an Krebs erkrankten und nicht erkrankten Patienten unterschieden werden konnte.

Aufgrund der unterschiedlichen Tumorarten wurde die Suche nach spektralen Markermustern auf die häufigsten Fälle in der Studie beschränkt. Es wurden Proben von 266 Lungenkrebs-Studienpatienten, entsprechend 798 Blutproben analysiert. Unter ihnen waren 99 Adenokarzinom-Patienten, 54 mit Plattenepithel-Karzinom, 53 tumorfreie und 60 Patienten mit anderen Diagnosen, deren Einzeldiagnosen jedoch unzureichend für eine spektroskopische Klassifikation in Blut waren. Anhand dieses relativ begrenzten Datenmaterials konnten Hinweise auf eine prinzipielle spektrale Unterscheidbarkeit der Patientengruppen „Plattenepithel- oder Adenokarzinom“, „Plattenepithelkarzinom“, „Adenokarzinom“ und „tumorfreie Kontrollgruppe“ erzielt werden. Beide Karzinomgruppen waren mit einer höheren Genauigkeit als 70 % von Kontrollpatienten anhand des Blutspektrums unterscheidbar. Die histologischen Typen der Lungenkarzinome ließen sich sogar mit 79 % Genauigkeit unterscheiden. Diese Ergebnisse beruhen auf 50-facher Kreuzvalidierung unter jeweils randomisiertem Auslassen eines Drittels des Datensatzes und müssen noch mit weiteren Daten validiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine direkte spektrale Erkennung im Blut im Gegensatz zum Gewebe zwar möglich, für eine diagnostische Anwendung in der klinischen Praxis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch ungeeignet ist.

Faseroptische Sonden

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der spektralen Histopathologie zur Gewebeerkenntnis wurden die Einsatzmöglichkeiten flexibler faseroptischer Sonden für Infrarot-Spektroskopie zur Unterstützung der Befundung an Lungengewebsproben untersucht. Aktuell verfügbare infrarotoptische Sonden sind für eine bronchoskopische Anwendung ungeeignet, da sie entweder zu starr sind, oder über einen zu geringen Signaldurchsatz für eine sinnvolle Messung verfügen. Es gibt allerdings eine Vielzahl an flexiblen Fasern, die für den sichtbaren und nahinfraroten Bereich der elektromagnetischen Strahlung spezifiziert sind, und unter bestimmten Voraussetzungen auch für die Raman-Spektroskopie verwendbar sind. Die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie für die intraoperative Anwendung sollte in weitergehenden Studien geprüft werden.

Infrarot-Absorptionsspektren von tumorösen und nicht-tumorösen Kontroll-Bereichen verschiedener Lungen-Resektate wurden mit grober Ortsauflösung erfasst. Aufgrund der großen Diversität der erfassten Lungenerkrankungen ist die erfasste Datenbasis noch nicht ausreichend für eine abschließende Feststellung, ob anhand spektraler Markermuster die sichere Vorhersage des Krankheitszustands und insbesondere des Grades des Karzinoms erfolgen kann. Die Daten deuten an, dass zumindest Adenokarzinome sich spektral deutlich vom umgebenden benignen Gewebe unterscheiden. Die Erkenntnisse zeigen jedoch, dass der wenig invasive Ansatz der Fasersonden zur

endoskopischen Detektion von Tumoren in weiterführenden Studien auf Basis der flexiblen Raman-Sonden verfolgt werden sollte.

4.2. Medizinisches Proteom-Center (Leiter Jun. Prof. B. Sitek, Nachfolgering von Prof. H.E. Meyer nach dessen Ausscheiden aus der Ruhr-Universität Bochum)

4.2.1. Kurzdarstellung des Teilvorhabens

Der Begriff der differentiellen Proteomanalyse beschreibt unterschiedliche Verfahren, die eine Vielzahl von Proteinen simultan quantifizieren können. In den letzten Jahren wurden die unterschiedlichen Techniken weiterentwickelt, so dass in einem typischen Experiment mittlerweile ca. 2.000 Proteinspezies simultan quantifiziert werden können. Ein Vorteil von Untersuchungen auf Proteinebene ist, dass auch Unterschiede in Proteinisoformen gefunden werden können, die repräsentativ für Krankheiten und Krankheitsstadien sind.

Insbesondere haben sich am Medizinischen Proteom-Center (MPC) Verfahren als erfolgreich herausgestellt, bei denen zunächst relevantes Tumor- und Gewebematerial mittels Mikrodisektion präpariert wird und nur dieses in der Analyse eingesetzt wird (Meyer und Stühler 2007, Mölleken et al. 2009, Poschmann et al. 2009). Für die hochsensitive Analyse reichen wenige tausend Tumorzellen. Neben erfolgreich durchgeführten Studien mit gelbasierten Verfahren in Kombination mit Massenspektrometrie, z. B. zum Plattenepithelkarzinom der Lunge (Poschmann et al. 2009), hat sich in den letzten Jahren die sogenannte „labelfreie“ Massenspektrometrie-basierte Quantifizierung von Proteinspezies als sehr erfolgreich erwiesen. Diese Methode konnte innerhalb von PURE dank des Einsatzes von modernen Hochleistungsmassenspektrometern etabliert und optimiert werden. Ein wesentlicher Beitrag zur Identifizierung von potentiellen Proteinbiomarkern leistet hierbei auch die bioinformatische Auswertung sowohl der erhobenen Massenspektren, als auch der Daten zur multidimensionalen Auftrennung der analysierten Protein- und Peptidspezies und ihrer Korrelation mit klinischen Daten. Diese Auswertung liefert zum Beispiel Biomarker-Kandidaten, die trotz technischer und biologischer Varianz signifikant zwischen zwei experimentellen Gruppen – etwa „krank“ und „gesund“ – unterscheiden. Weitergehende Analysen der Protein-Ergebnislisten, wie z. B. Enrichment- oder Pathway-Analysen können eine Gesamteinschätzung des funktionellen Hintergrunds bieten und eine weitere Eingrenzung der Biomarker-Kandidaten für nachfolgende Validierungs-Schritte ermöglichen.

4.2.2. Darstellung der Forschungsarbeiten

Die Untersuchungen des Proteoms erfolgen am MPC und sind als zweistufiges Verfahren konzipiert, bei dem zunächst aus Gewebeproben Kandidatenproteine identifiziert werden, welche in einem zweiten Schritt in Körperflüssigkeiten verifiziert werden.

Für den ersten Teil der Proteomanalysen wird das Gewebe im Wesentlichen mit drei komplementären Kerntechniken behandelt: 1. MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) -Imaging, 2. *Laser-Mikrodisektion* und 3. label-freie LC-MS (Flüssigkeits-chromatographie-Massenspektrometrie) -Analyse, wobei letztere für die spätere Quantifizierung entscheidend ist.

MALDI-Imaging ist ein bildgebendes massenspektrometrisches Verfahren, das es ermöglicht, Aussagen über die molekulare Zusammensetzung und die relative Häufigkeit sowie räumliche Verteilung einzelner Biomoleküle in bestimmten Geweberegionen zu treffen. Für die Messung wird das gewünschte

Gewebeareal mit einem Laser gerastert und für jede Position ein orts aufgelöstes Massenspektrum erzeugt. Im Gegensatz zur ebenso verwendeten LC-MS Methode bleibt die Probe hierbei intakt und kann nach der Messung z. B. H&E gefärbt und histologisch befundet werden. Innerhalb der Proteomforschung wird diese noch relativ neue Technik bereits erfolgreich für die Krebsforschung eingesetzt.

Durch den Einsatz der **Laser-Mikrodissektion** soll die Sensitivität der nachfolgenden LC-MS-Analyse zum quantitativen Vergleich der Proben („gesund“ vs. „krank“) erhöht werden. Unter Verwendung spezieller Membranslides ist es möglich, durch präzise Charakterisierung der histologisch relevanten Gewebeareale oder Zellverbände mittel FTIR-Imaging im Projektbereich Biophysik, höchst selektiv die entsprechenden Bereiche zu isolieren.

Bei ausreichender Fallzahl und gesammelter Probenmenge schließt sich die **LC-MS-Analyse** der Mikrodissektion an. Im Vorfeld der quantitativen labelfreien Vergleichsstudie erfolgte eine Reihe von Probemessungen zur Bestimmung der optimalen Probenmenge, um die Reproduzierbarkeit des Systems garantieren zu können. Für die Messungen stehen dem Institut hochsensitive Massenspektrometer zur Verfügung.

Im ersten Jahr des Forschungsvorhabens stand die gezielte Etablierung der Messmethodiken MALDI-Imaging und Mikrodissektion im Vordergrund sowie die Entwicklung entsprechender einheitlicher Workflows in Form von SOPs (*Standard Operation Procedures*). Im Fall des Imagings bedeutete dies konkret das Austesten verschiedener Waschprotokolle, Matrices, Proteinverdauzeiten und Proteasen.

Um Proteomstudien mit geringen Mengen von Untersuchungsmaterial (einige 1.000 Zellen) erfolgreich durchführen zu können, muss die Bearbeitung und Aufbereitung von Mikrodissektionsmaterial für verschiedene Gewebe- bzw. Zelltypen, getestet werden. Die verschiedenen Versuche hierzu wurden durchgeführt und werden im Folgenden genauer beschrieben.

Erste LC-MS-Messdaten unterschiedlicher Proben haben zum Zeitpunkt des Zwischenberichts belegt, dass mit den technischen Gegebenheiten und der bioinformatischen Infrastruktur die Durchführung einer umfassenden labelfreien Analyse möglich war. Diese wurde im zweiten Jahr für Mesotheliom-Proben durchgeführt, die aus den Gruppen „epitheloide“ und „sarkomatoide“ Wachstumsform rekrutiert worden waren.

4.2.3. Beschreibung erreichter Ergebnisse

Primäres Ziel des Arbeitspakets des Medizinischen Proteom Centers war die „Proteomanalyse und Massenspektrometrie“ zur Identifizierung von potentiellen Biomarkern aus Gewebeproben asbestassoziierten Tumoren.

Während im Verlauf der ersten Förderphase vor allem die Etablierung des sogenannten MALDI-Imaging im Vordergrund stand, lag der Fokus in der zweiten Projekthälfte auf der Optimierung und Anwendung der beiden anderen Techniken sowie der Auswertung der Daten mit bereits implementierter kommerzieller Software, multivariater Analyse sowie im Rahmen von PURE selbstentwickelter Softwaretools.

MALDI-imaging

Die Methode besteht aus vielen verschiedenen Arbeitsschritten, von denen einige einen mehr oder weniger starken Einfluss auf die Qualität des Gewebes und letztlich auf die Messung haben können. Kritische Parameter, wie zum Beispiel die Matrix, wurden im Einzelnen variiert und beurteilt. Auf diese Weise wurde ein speziell für das Lunge-Projekt zugeschnittener Workflow und Dokumentationsbogen zur Qualitätssicherung entwickelt.

Erste Messungen von im Haus angefertigten Gewebeschnitten belegten, dass die Technik in der Lage ist, unterschiedliche Gewebetypen zu differenzieren (Abb. 5).

Nach erfolgreicher Etablierung aller Schritte der MALDI-Imaging Technologie wurde die Anwendbarkeit an einer klinischen Fragestellung getestet. Dafür wurde ein Mesotheliomprobenkollektiv ausgewählt, bei dem sich zwei Subtypen (epitheloide vs. sarkomatoide Wachstumsform) unterscheiden lassen.

Bei diesem Ansatz konnten zwar Tumorbereiche erkannt werden, jedoch war die Unterscheidung zwischen den zwei Subtypen nicht möglich. Aufgrund der Tatsache, dass MALDI-Imaging nicht über die erforderliche Sensitivität verfügt, wurde diese Technik nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurden die Arbeiten zur Identifizierung neuer Biomarker mit den beiden weiteren Techniken, der Laser-Mikrodissektion und der labelfreien Proteomstudie fortgeführt.

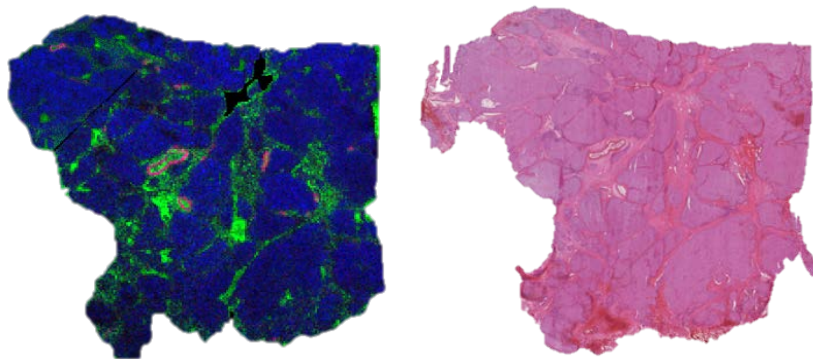


Abb. 5: MALDI Imaging von Lungengewebe. Das Drei-Farbenbild links zeigt das Gewebe nach dem Imaging. Die verschiedenen Gewebetypen sind deutlich voneinander zu unterscheiden. Das rechte Bild entspricht dem *Hämatoxylin-Eosin* gefärbten Konsekutivschnitt.

Laser-Mikrodissektion

Im Vorfeld der eigentlichen Laser-Mikrodissektion wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Projektbereich Biophysik verschiedene Färbetests am Gewebe durchgeführt mit dem Ziel, die spätere Auswahl und gezielte Isolation von speziellen Zellen unter direkter lichtmikroskopischer Kontrolle zu vereinfachen. Hierfür wurden verschiedene Färbetechniken getestet und die Reproduzierbarkeit der Laser-Mikrodissektion bezüglich der Anzahl der identifizierten Proteine geprüft. Das optimierte Protokoll wurde für anschließende Arbeiten am Tumorgewebe verwendet.

Label-freie Proteomanalyse

Die durchgeführte labelfreie Proteomstudie wurde als plattformübergreifender Ansatz konzipiert, wodurch sich der finale Workflow bestehend aus fünf aufeinander aufbauenden Methoden ergab.

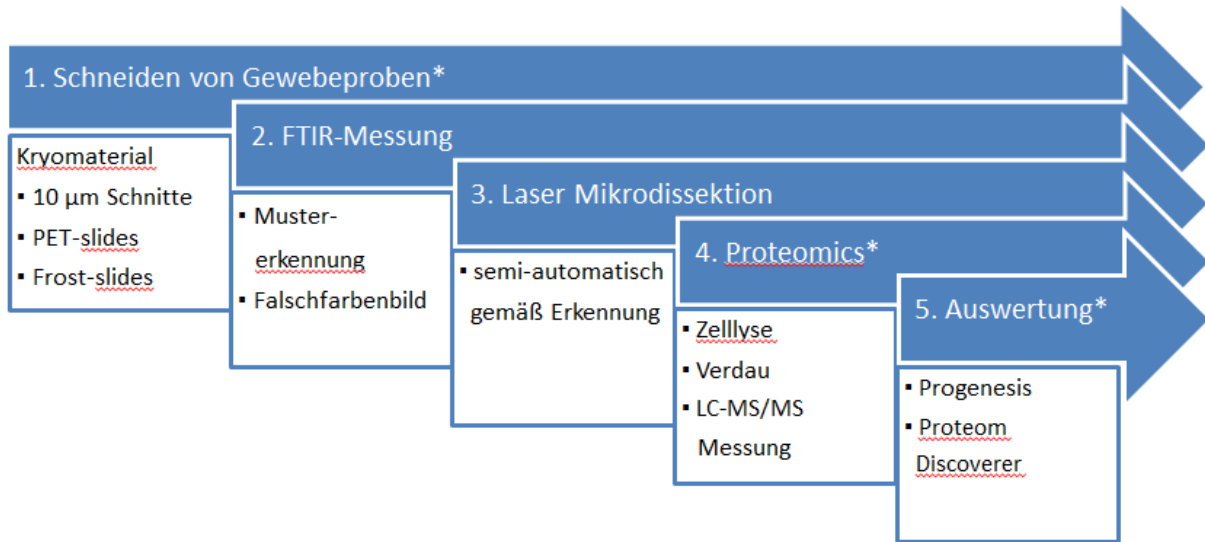


Abb. 6: Workflow der labelfreien Studie von Mesotheliomproben: Die mit einem Stern (*) markierten Arbeitsschritte wurden vom MPC durchgeführt, die ohne vom Kooperationspartner in der Biophysik. Abkürzungen: FTIR = Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie, LMD = Laser Mikrodisektion

Im Rahmen der Gewebecharakterisierung mit anschließender Identifikation von differentiellen Proteinen wurde in Kooperation mit der Plattform Biophysik ein Mesotheliomprobenkollektiv ausgewählt, bei dem sich zwei Subtypen (epitheloide vs. sarkomatoide Wachstumsform) unterscheiden lassen. Die Detektion von repräsentativen Arealen der unterschiedlichen Subtypen innerhalb eines Gewebeschnitts erfolgte mit Hilfe der Spektroskopie und einer automatisierten, markerfreien Subklassifizierung in der Biophysik (Details siehe Abschnitt 4.1 - Biophysik). Von den insgesamt 11 vermessenen Frischgewebeproben wurden gemäß Erkennung 6 epitheloide und 5 sarkomatoide Proben für die anschließende LMD verwendet.

Datenauswertung der labelfreien quantitativen Proteom-Daten

Für die Datenauswertung wurden die Daten in die Auswerte-Software Progenesis QI (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) importiert. Dabei wurden Bereiche ohne Peptid-Ionensignale ausgeschlossen („Säulen-Leerlauf“).

Progenesis erlaubt die Anwendung der Hauptkomponentenanalyse für diese quantitativen Daten und stellt das Ergebnis grafisch dar. Die Grafiken wurden hier verwendet, um die globale Struktur der Daten zu visualisieren und die technische Varianz und mögliche Ausreißer zu beurteilen: mit Ausnahme der technischen Replikate mit hohen Normalisierungsfaktoren (in Abb. 7 rot umkreist) waren die technischen Replikate in der PCA eng benachbart. Dies ist ein Beleg für die gute Reproduzierbarkeit der Messungen mit dem verwendeten Workflow, siehe Abb. 6

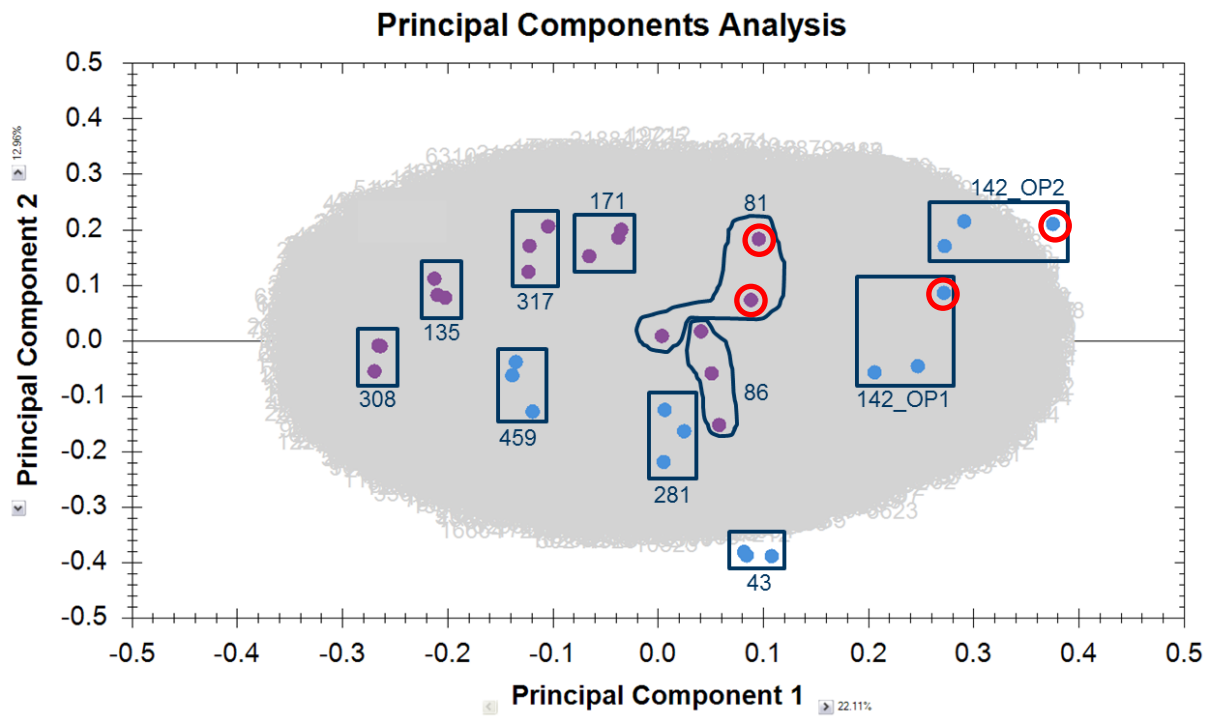


Abb. 7: Hauptkomponentenanalyse (Principal Components Analysis – PCA) quantitativer Daten der labelfreien Proteomikexperimente unter Berücksichtigung der betrachteten Mesotheliom-Subtypen (blau: sarkomatoides, violett: epitheloides Wachstumsmuster). Rote Ringe markieren Läufe mit hohen Normalisierungsfaktoren. Die PCA wird hier zur Qualitätskontrolle eingesetzt, sie belegt eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Messungen.

Insgesamt wurden 159 signifikante Proteine ($p < 0.05$ und $|FC| \geq 2$) identifiziert. Zur finalen Selektion von Kandidatenproteinen wurde die euklidische Distanz berechnet, die beide Kriterien (p-Wert, FC) zusammenfasst (siehe Abb. 8). Die auf diese Weise selektierten und in eine Reihenfolge gebrachten Kandidaten könnten nach Validierung zur Unterscheidung der Subtypen verwendet werden.

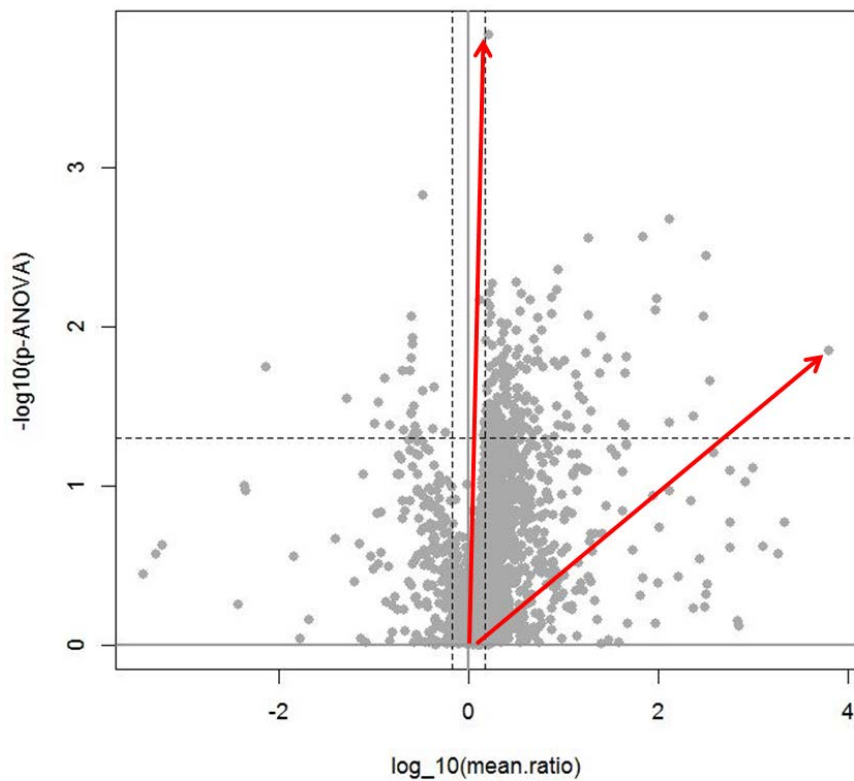


Abb. 8: Volcano – Plot quantifizierbarer Proteine (graue Punkte) aus den labelfreien Proteomikexperimenten. Auf der X-Achse sind *fold change* (FC) – Werte, auf der Y-Achse die *p*-Werte der ANOVA abgetragen (logarithmische Skalen!). Zwei rote Pfeile zeigen beispielhaft die euklidische Distanz zweier Proteine an. Proteine mit einer großen Entfernung zum Ursprung (d.h. mit großer euklidischer Distanz) sind aussichtsreiche Biomarker-Kandidaten.

Außerdem wurde die Resultatliste mit bekanntem biologischen Wissen annotiert (Berechnung signifikanter Überrepräsentation von differenziell regulierten Proteinen in biologischen Pathways, Software ‚Ingenuity Pathway Analysis‘ (QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity), siehe Abb. 9).

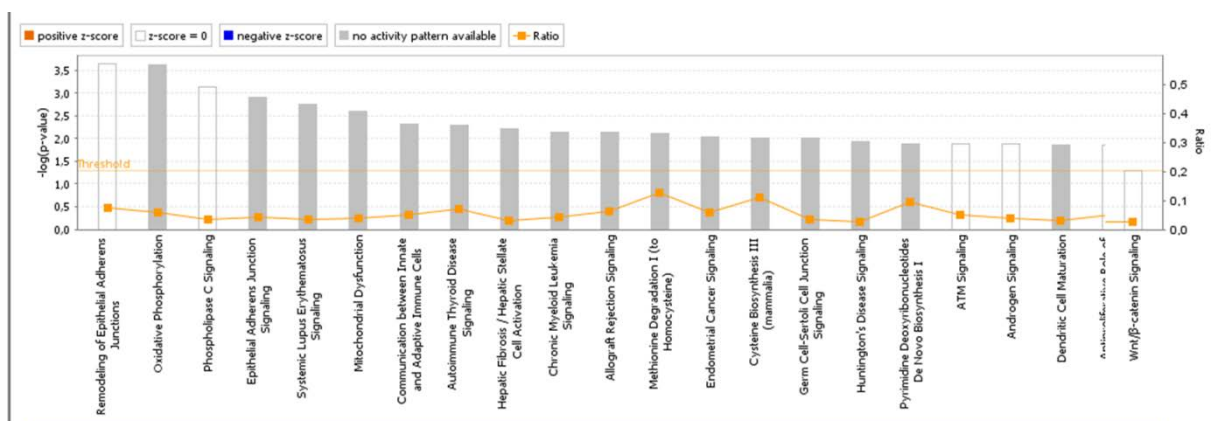


Abb. 9: Ergebnis der Pathway-Analyse mit Ingenuity Pathway Analysis: *Canonical Pathways* (bekannte biochemische Pathways) mit signifikant überrepräsentiertem Anteil an signifikant differenziellen ($p < 0.05$, $|FC| \geq 2$) Proteinen (Mesotheliom-Subtypen: epitheloides vs. sarkomatoides Wachstumsmuster).

Die so erfolgte funktionelle Charakterisierung unterstützt die Korrektheit und Sinnhaftigkeit der Ergebnisse, da differenzielle Proteine z. B. in „Remodeling of Epithelial Adherens Junction“ und

„Epithelial Adherens Junction Signalling“ überrepräsentiert vorkommen und das einen Unterschied zwischen epitheloider und sarkomatoider Wachstumsform von Mesotheliomen sein könnte.

Ein weiterer Hinweis auf die Belastbarkeit der Ergebnisse ist (*proof of principle*), dass Calretinin in der Ergebnisliste der signifikant differenziell regulierten Proteine auftaucht (ANOVA-p-Wert: 0,0145, *fold change* FC: 17,45) (siehe Abbildung 10). Dieses Protein wird bereits von Pathologen zur Unterscheidung von Mesotheliomen und pleural metastasierten Adenokarzinomen verwendet (Doglioni et al. 1996; Arif und Husain 2015; Ordonez 2007).

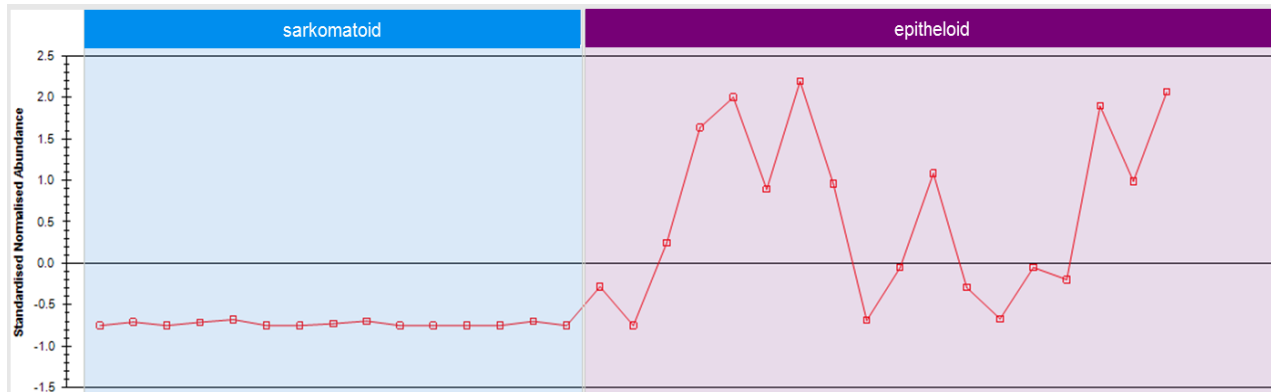


Abb. 10: *Proof of principle:* Quantitatives Profil von Calretinin, einem von Pathologen bereits verwendeten Protein zum Nachweis von Mesotheliomen (Standard-Normalisierte Werte, Mesotheliom-Subtypen: epitheloides vs. sarkomatoides Wachstumsmuster). Bei der epitheloiden Wachstumsform sind die Werte wie erwartet im Durchschnitt höher.

Weitere Protein-Biomarker-Kandidaten mit guten p- und FC-Werten sowie einem vielversprechenden quantitativen Profil finden sich in Tabelle 3. Es ist geplant, diese in Folgestudien zu verifizieren, weil erst dann eine Eignung als Biomarker angenommen werden kann.

Tabelle 3: Protein-Biomarker-Kandidaten mit guten p- und FC-Werten sowie einem vielversprechenden quantitative Profil („Accession“: Eindeutige ID der UniProt-Protein-Datenbank, „Peptide count“: Anzahl der quantifizierbaren Peptide des Proteins, „Unique peptides“: Anzahl der quantifizierbaren Peptide, die in keinem anderen Protein vorkommen; für die beiden letzten Spalten gilt: je mehr, desto verlässlicher die Quantifizierungen)

Accession	Anova.p	Fold change	Peptide count	Unique peptides	Description
Q5VT79	0.016	29.33	9	1	Annexin A8-like protein 2
Q9Y4L1	0.008	3.52	8	7	Hypoxia up-regulated protein 1
Q9NRW1	0.005	3.24	2	1	Ras-related protein Rab-6B
P47712	0.043	45.78	3	3	Cytosolic phospholipase A2
P12532	0.02	24.38	4	4	Creatine kinase U-type, mitochondrial
runter regulierte Proteine					
Q9BXX0	0.009	-3.95	2	2	EMILIN-2
P12109	0.019	-4.04	20	20	Collagen alpha-1(VI) chain

Eine Veröffentlichung der Ergebnisse zu Protein-Biomarker-Kandidaten beim Mesotheliom ist geplant, sobald eine methodische Verifizierung vorliegt.

Epigenetik-Kooperation mit dem IPA

Am IPA werden mit der MDB-Seq-Methode methylierte Bereiche von Patienten-DNA (jeweils eine Lungentumor- und eine Kontrollprobe pro Patient) zunächst angereichert und mittels *Illumina Next Generation Sequencing* vermessen. Zur Auswertung der sehr umfangreichen Datenmengen (13 Millionen Fragment-Sequenzierungen bzw. 8 GB Daten pro Lauf) wurde in Zusammenarbeit mit der Bioinformatik des MPC das Software Paket MEDIPS für R (Lienhard et al., 2014) angepasst und eingesetzt. Ein Vergleich erbrachte, dass die Anzahl und Qualität der alignierten Reads bei 75 bp Länge deutlich besser ist als bei 50 bp und deshalb alle Proben entsprechend vermessen wurden.

Nach dem Alignment an das humane Genom wurden aufgrund von Qualitätsmerkmalen (CpG Coverage >50%) zunächst 74 Patienten ausgewählt und analysiert. Die Auswertung zeigte signifikante ($p \leq 0,01$) differentielle DNA-Methylierungsunterschiede (Fold Change ≥ 5) zwischen Tumor- und Kontrollgewebeprobe an 812 Stellen (Loci) im gesamten Genom. Diese Loci wurden zum einen in tabellarischer Form aufbereitet und nach p-Werten (Signifikanz) sortiert, zum anderen mittels des Genombrowsers JBrowse (Skinner et al., 2009) visualisiert.

Für einige hochsignifikante Genombereiche wurde der Methylierungsgrad mittels Pyrosequencing überprüft. Die Ergebnisse der MDB-Seq-Analysen und des Pyrosequencing sind in der folgenden Grafik (Abb. 11) und Tabelle 4 ersichtlich. Die Methoden haben für die vermessenen Genombereiche eine Korrelation von durchschnittlich 0.82, was bedeutet, dass beide Methoden in ihren Ergebnissen gut übereinstimmen.

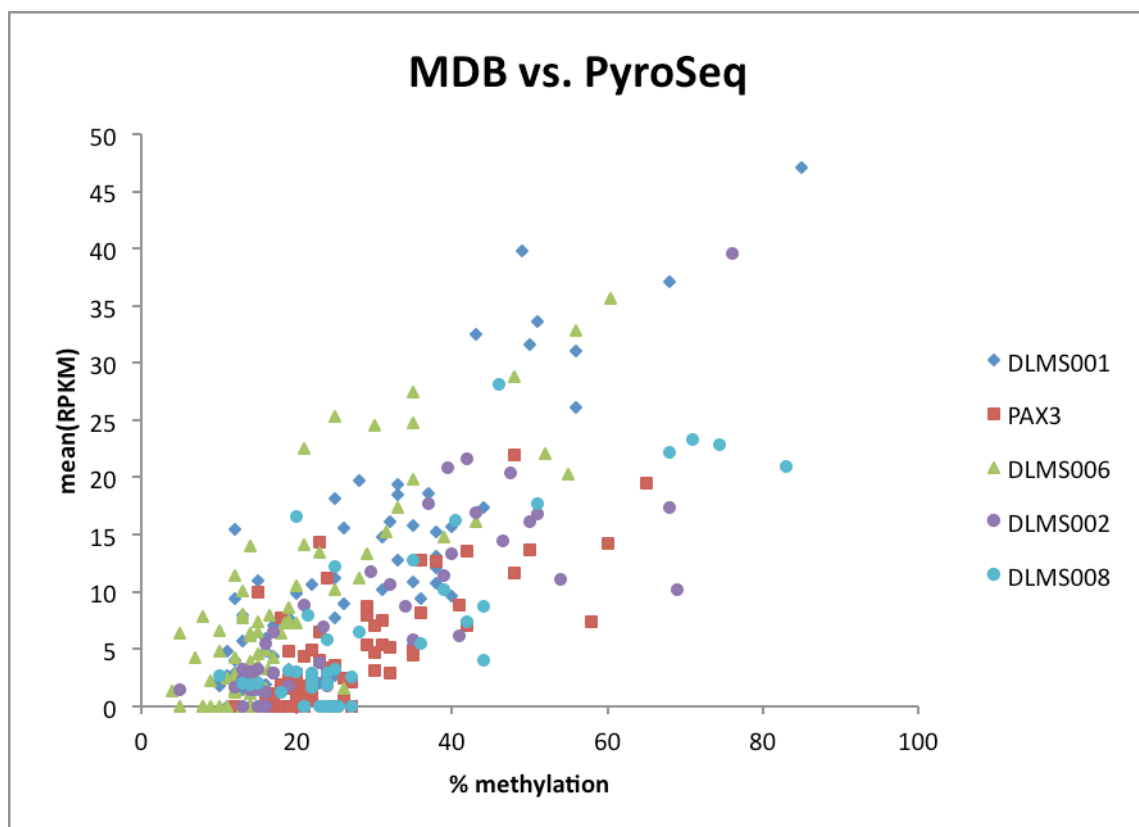


Abb. 11: Gezeigt werden die mittleren Counts (in RPKM) aufgetragen gegen die Anteile der Methylierung gemessen mittels Pyrosequencing. Die Messungen wurden für jeweils 41 Tumor- und Kontrollproben durchgeführt. Der Plot zeigt eine Tendenz, dass beide Messverfahren ähnliche Ergebnisse erzeugen. Dies wird durch die Korrelationskoeffizienten in Tabelle 4 bestätigt.

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die Pearson Korrelationskoeffizienten der durch MDB und Pyrosequencing gemessenen Methylierungen für die angegebenen Genombereiche. Alle Koeffizienten deuten darauf hin, dass die Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern, d.h. dass beide Methoden in der Angabe des Methylierungsgrades der gemessenen Proben übereinstimmen. Die Normalisierung mittels RPKM erhöht die Korrelation erwartungsgemäß.

	DLMS001	PAX3	DLMS006	DLMS002	DLMS008
raw counts	0.8447	0.7749	0.8400	0.7754	0.8023
RKPM	0.8907	0.7509	0.8485	0.8452	0.8018

Zusätzlich zu den Lungentumor-Proben wurden auch die Mesotheliom-Proben (siehe Epigenetik-Abschnitt des WESZ) untereinander mittels des MEDIPS-Workflows verglichen. Zum einen wurden alle Mesotheliom Proben mit den übrigen Pleuraerkrankungen verglichen. Hierbei konnten jedoch nach den üblichen Kriterien keine signifikanten Ergebnisse festgestellt werden ($p \leq 0.01$, Fold change ≥ 5). Zusätzlich wurden nur die epitheloiden gegen die sarkomatoiden Mesotheliome verglichen. Hierbei konnten einige interessante Genomloci detektiert werden. Eine Liste der Loci, die sowohl signifikant als auch in einem annotierten Genbereich liegen, ist in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Diese Tabelle zeigt die regulierten Genombereiche, die bei der Analyse der epitheloiden gegen die sarkomatoiden Mesotheliome detektiert wurden. Die Gene, die sowohl einen sehr guten p-Wert (≤ 0.01) als auch hohen Fold change (> 5) haben, sind in Fett hervorgehoben.

chrom	start	end	gene	p-value	Fold-change
chr4	41637300	41637350	LIMCH1	0.0067	-4.85
chr8	1574300	1574350	DLGAP2	0.0016	2.43
chr9	33037050	33037100	DNAJA1	0.0063	-8.25
chr12	12899950	12900000	APOLD1	0.0238	-3.71
chr14	45588850	45588900	FKBP3	0.0141	-2.24
chr16	12597750	12597800	SNX29	0.0199	-11.00
chr16	23363000	23363100	SCNN1B	0.0223	-11.00
chr16	67084550	67084600	CBFB	0.0070	-11.00
chr18	8719900	8719950	MTCL1	0.0052	-9.04
chr19	16672350	16672400	SLC35E1	0.0102	-6.29
chr19	37924550	37924600	ZNF569	0.0160	-11.00

Eine Veröffentlichung der Epigenetikanalysen wird zusammen mit weiteren Auswertungen angestrebt.

4.3. Wissenschaftlich-Epidemiologisches Studienzentrum (Leiter Prof. T. Behrens)

4.3.1. Kurzdarstellung des Teilvorhabens

Das Wissenschaftlich-Epidemiologische Studienzentrum (WESZ) gewährleistet die qualitätsgesicherte Durchführung der beantragten Studie nach den Regeln der "Guten Epidemiologischen Praxis". Des Weiteren führt es die erforderlichen Arbeitsschritte zur Erstellung eines Ethikantrags, Datenschutzkonzepts und die Studienplanung (Erstellung der Studieninstrumente wie Fragebögen, Probendokumentationsbögen etc.) durch. Es übernimmt Aufgaben der Qualitätssicherung, der Datenhaltung und -dokumentation, sichert den Datenschutz und baut eine Bioprobenbank auf.

Die präzise molekulare Charakterisierung stellt eine wichtige Ergänzung zur pathologisch-histologischen Charakterisierung des Probenmaterials dar und ist eine essentielle Grundlage für die gezielte Einlagerung von gewonnenem Probenmaterial in eine qualitätsgesicherte Bioprobenbank. Zudem können epigenetische Veränderungen mit Änderungen der Proteinexpression korreliert werden. Epigenetische Veränderungen im Gewebe spielen eine zentrale Rolle bei der Fehlregulation der Gen- und Proteinexpression während der Krebsentstehung. Die molekulare Charakterisierung bietet somit auch eine hervorragende Möglichkeit, neue potenzielle Kandidaten für das Marker-Panel der Validierungsstudie MoMar zu identifizieren.

4.3.2. Darstellung der Forschungsarbeiten

Studienvorbereitung

Vor Beginn der Pilotphase der Studie wurden alle ethischen und rechtlichen Voraussetzungen für die Studie geklärt. Der Ethikantrag für das Forschungsvorhaben wurde im November 2012 zunächst bei der Ethik-Kommission der Ruhr-Universität Bochum (RUB) gestellt. Im April 2013 wurde das Projekt von der Ethikkommission der RUB genehmigt. Anschließend wurde der Antrag bei der Ethik-Kommission der Universität Duisburg-Essen eingereicht, die Ende Mai 2013 ein positives Anschlussvotum für das Forschungsvorhaben erteilte. Sich aus notwendigen Anpassungen des Studienprotokolls ergebende nachträgliche Amendments wurden von beiden Ethikkommissionen abschließend im Januar 2014 genehmigt.

Dem im Rahmen des Projektes entwickelten Datenschutzkonzept für die pseudonymisierte Datensammlung wurde von den Datenschützern der RUB und des Universitätsklinikums Essen (UKE) abschließend Ende 2013 zugestimmt. Für die Verwaltung der personenidentifizierenden Daten konnte der Lehrstuhl für Kriminologie, Kriminalpolitik und Polizeiwissenschaft der Ruhr-Universität Bochum (LS Kriminologie) als Treuhandstelle gewonnen werden.

Alle Untersuchungsschritte im Rahmen der Studie wurden in Standard Operation Procedures (SOPs) festgehalten, die mit den Kooperationspartnern auf mehreren vom WESZ koordinierten Treffen abgestimmt und im Laufe der Pilotphase an die klinischen Gegebenheiten angepasst wurden. Somit wurden für jede Probenart gesondert Standards für die Sammlung, die Verarbeitung, die Lagerung und den Transport formuliert. Ebenso wurden die einzuhaltenden Standards zur Rekrutierung der Patienten und der gesunden Kontrollprobanden sowie für die Datenerhebung detailliert festgelegt.

Die Instrumente zur Datenerhebung (Fragebogen für das Patienteninterview, Dokumentationsbögen für die Auswahl der Studienteilnehmer, für klinische Befunde und die Probenverarbeitung) wurden vom WESZ entworfen und in der Pilotphase der Studie gemeinsam mit den Kooperationspartnern der Ruhrlandklinik (RLK) und des UKE angepasst. Das insbesondere aufgrund der enthaltenen

Berufsbiographie umfangreiche Patienteninterview wurde vom WESZ für die Hauptphase zusätzlich als elektronisch ausfüllbares und mit programmierten Sperr- und Sprungfunktionen versehenes Formular etabliert. Dadurch konnte die benötigte Interviewdauer im Sinne der Patienten minimiert und die Qualität der Interviewdaten durch Vermeidung von Ein- und Übertragungsfehlern gesichert werden.

Datenverarbeitung und Biobank

Alle Dokumente wurden mittels der Software Teleform als elektronische Formularvorlagen erstellt. Ausgefüllte Dokumente wurden dann von den Study Nurses des WESZ über Teleform geprüft und anschließend in die dazugehörige Datenbank exportiert. Die Ergebnisse der Dokumentenprüfung wurden im Rahmen der Qualitätssicherung den für die Datenerhebung zuständigen Mitarbeitern berichtet. Die Mitarbeiter des WESZ prüften darüber hinaus die Daten zur Probenverarbeitung und Auszüge klinischer Befunde mittels Plausibilitätskontrollen. Die Daten wurden den Kooperationspartnern dann in je nach Anforderung zusammengestellten Datensätzen zur Verfügung gestellt. Ein Teil der Daten wurde zusätzlich in die Datenbank der Bioprobenbank importiert und so zentral für die probenanalysierenden Plattformen zugänglich gemacht.

Die am WESZ eingerichtete Bioprobenbank basiert auf der für PURE weiterentwickelte Biobanksoftware StarLims. In StarLims wurden die für die Studie erstellten SOPs abgebildet, wofür die Software teilweise projektspezifisch erweitert wurde.

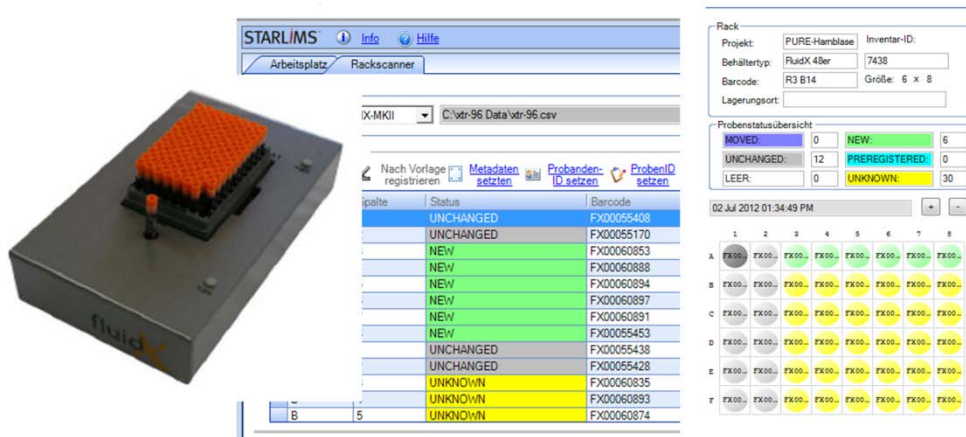


Abb. 12: Beispiel einer projektspezifischen Erweiterung: Hinzufügen von Biomaterial über den Rackscanner.

So konnten sämtliche qualitätsrelevanten Prozesse, die das barcodierte Probenmaterial von der Gewinnung in der Klinik über die verbrauchende Forschung bis zur Entsorgung nach der wissenschaftlichen Analyse durchlief, protokolliert werden.

Biomaterialbank

Suchen Hinzufügen Löschen Drucken Metadaten Export to Excel

Proben Behälter

Probenübersicht

Spaltenkopf in dieses Feld ziehen, um nach diesem zu gruppieren

Starlims ID	Barcode	Material	Probenbehälter	Menge	Status	Probanden ID	Untersuchungsnummer	Verwalter	Inhalt
I130037418	68M4VZU0I9V	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037419	KZ27B44E1Z	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037420	Z4FDVB93DRV	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037421	51VHCPTZ7EO	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	WES
I130037422	Q01YN0TT5P9	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	WES
I130037423	69IFH7IEEIV4	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	WES
I130037424	PTXBUSTBFUL	Paraffin-Gewebe	Paraffin-Block	1.0000 Units	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	PAT
I130037425	8DOCXD0LAKL6	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037426	WUWY07MGT...	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037427	LB70BT10UAF	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037428	LY4Q5AU54AI	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	WES
I130037429	IK3PVULOY0L	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	WES
I130037430	HSD4WCR9KR...	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	WES
I130037431	G9OT71CM0VI	Paraffin-Gewebe	Paraffin-Block	1.0000 Units	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	PAT
I130037432	3S4VWY6E5BE	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037433	ZGCD0DH0UQ...	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037434	MGU02KCB0P	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037435	ZPKU0GT36MK	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	WES
I130037436	298HT0Y501S	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	WES
I130037437	C6U2LVITS0E	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	WES
I130037438	9GNT6DR6RJ4	Paraffin-Gewebe	Paraffin-Block	1.0000 Units	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	PAT
I130037439	2EKSKTJD6ZO	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037440	6CE0X4KXCKT	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA
I130037441	NORTOULET98	Paraffin-Gewebe	Eppendorf SL Tu...	5.0000 um	Freigegeben	P-B-0010	BA0011	KLEIMANN	IPA

Transaktionen

- Kommentar hinzufügen
- Status ändern
- ID-Transaktion
- Verfallsdatum bearbeiten
- Menge anpassen
- Probandeneinwilligung setzen
- Verwalter zuweisen
- Besitzer zuweisen
- Test zuweisen
- Projekt zuweisen
- Teilmenge entnehmen
- Entsorgen
- Auftauanzahl erhöhen
- Aliquotieren (Metadaten erben)
- Umlagern (aus Boxen in Boxen)
- Umlagern (ohne Box)
- Umlagern (in Boxen)
- Umlagern (mit Box) alle Proben der Box markieren!
- Auf Labortisch verschieben (ohne Box)
- Materialien vereinigen (Pool)
- Material reservieren
- Versenden
- Material aufteilen (Split)

Abb. 13: Hauptliste der Starlims-Datenbank (links) und Transaktionsoptionen (rechts).

Allgemeines Lagerung Stammbaum Anhänge Prüfergebnisse **Kontrollkette** Patient

Kontrollkette

Benutzeraktion	Zeitstempel	Benutzer	Status	Menge	
Status ändern	20.10.2014 08:24:45	RUOTOLO	Freigegeben (Warnung)	10.0000 um	TK-4-BpH » Fach 2
New Reception	16.10.2014 14:56:40	RUOTOLO	Freigegeben	10.0000 um	TK-4-BpH » Fach 2
Versenden	16.10.2014 14:02:03	RUOTOLO	Im Versand	10.0000 um	
Status ändern	16.10.2014 14:02:03	RUOTOLO	Packed	10.0000 um	
Verwalter zuweisen	16.10.2014 14:02:02	RUOTOLO	Freigegeben	10.0000 um	
Auf Labortisch verschieben (ohne Box)	16.10.2014 14:02:02	RUOTOLO	Freigegeben	10.0000 um	
ID-Transaktion	16.10.2014 13:25:52	RUOTOLO	Freigegeben	10.0000 um	TK-80 » Fach 3
Close Reception	16.10.2014 11:01:32	RUOTOLO	Freigegeben	10.0000 um	TK-80 » Fach 3
Verwalter zuweisen	16.10.2014 11:01:32	RUOTOLO	Leer	10.0000 um	TK-80 » Fach 3
Umlagern 2 (ohne Box)	16.10.2014 11:01:32	RUOTOLO	Leer	10.0000 um	TK-80 » Fach 3
New Reception	16.10.2014 11:01:28	RUOTOLO	Leer	10.0000 um	Kitschrank » Schrank...
Close Reception	14.08.2014 13:11:11	RUOTOLO	Leer	10.0000 um	Kitschrank » Schrank...
Besitzer zuweisen	14.08.2014 13:10:52	RUOTOLO	Entwurf	10.0000 um	Kitschrank » Schrank...
Projekt zuweisen	14.08.2014 13:10:52	RUOTOLO	Entwurf	10.0000 um	Kitschrank » Schrank...
New Reception	14.08.2014 13:10:49	RUOTOLO	Entwurf	10.0000 um	Kitschrank » Schrank...

Abb. 14: Über den Reiter „Kontrollkette“ können die Zeitstempel alle Transaktionen eines Biomaterials eingesehen werden.

Über ein webbasiertes Portal konnten die Forschungsplattformen direkt auf die Biodatenbank zugreifen. Dies ermöglichte den Plattformen im Bereich PURE-Lunge die Auswahl und Anforderung des zur Verfügung stehenden Probenmaterials anhand von probencharakterisierenden Metadaten, welche vom WESZ nach Aufbereitung und Validierung kontinuierlich in die Datenbank eingepflegt wurden.

Abb. 15: Über den Reiter „Allgemeines“ können Metadaten zum einzelnen Biomaterial eingesehen werden (links). Die Suche nach Biomaterial erfolgt mit einer sehr flexiblen Suchmaske (rechts).

Seitens der Forschungsplattformen erlaubte die StarLims-Projekt Datenbank zudem, die erfolgten Analysen, Qualitätsmerkmale und den Verbrauch der Proben zu dokumentieren und diese Informationen zwischen den Projektpartnern zu kommunizieren. Hierzu wurden alle beteiligten Nutzer durch das WESZ geschult.

Die in der Studie gewonnenen Biomaterialien (Nativ- und Paraffingewebe, Blutproben, Speichel und Pleurapunktat) wurden seit Herbst 2013 routinemäßig mit StarLims verwaltet, so dass in der Studie ca. 25.000 Gefäße von Blutproben, 900 Speichelprobengefäße, 650 Pleurapunktatgefäße und 10.000 Materialien mit Gewebeproben in der Bioprobenbank erfasst und verwaltet wurden (Abb. 12-15).

Rekrutierung und Logistik

Innerhalb der Klinik als auch zwischen Klinik und Biobank sowie den verarbeitenden Plattformen wurde eine Infrastruktur für die Tiefkühlagerung und den Transport der Probenmaterialien aufgebaut. Die in der Ruhrlandklinik gesammelten Proben wurden von Mitarbeiterinnen des WESZ zu den probenanalysierenden Stellen und zur Bioprobenbank transportiert. Darüber hinaus unterstützten sie die Study Nurses der Ruhrlandklinik bei der Datenerhebung sowie der Probensammlung und -verarbeitung.

Das WESZ rekrutierte mittels Melderegisterdaten gesunde Kontrollprobanden aus der Bevölkerung. Diese wurden in einem mehrstufigen Verfahren kontaktiert und zum IPA eingeladen. Dort erfolgte dann nach ärztlicher Aufklärung die Probennahme und Datenerhebung. Bis Ende Juni 2015 wurden so 165 Personen in die Studie eingeschlossen.

4.3.3. Beschreibung erreichter Ergebnisse

4.3.3.1 Studienpopulation

Tabelle 6 zeigt, getrennt nach Untersuchungsgruppe, einige deskriptive Kennzahlen der Studienpopulation. Alter und Geschlecht waren zwischen Fällen und Kontrollen ähnlich verteilt. Erwartungsgemäß zeigte sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollen aus der Bevölkerung bei den Krebsfällen und Krankenhauskontrollen ein höherer Anteil von ehemaligen und aktuellen Rauchern. Nicht überraschend war auch das Überwiegen von eher niedrigen Bildungsabschlüssen bei den Probanden aus der Klinik.

Überraschend war das Ergebnis zur selbstberichteten Exposition gegenüber Asbest im Beruf. Um kurzfristige Expositionen auszuschließen, beschränkten wir die Analyse auf eine Asbestexposition von über einem Jahr. Hier berichtete im Vergleich zu den Krebsfällen ein höherer Anteil von Bevölkerungskontrollen über einen früheren Umgang mit Asbest (14,5 vs. 12%).

Es lässt sich nur spekulieren, ob diese hohen, auf Selbstangaben beruhenden Prävalenzen belastbar sind oder evtl. auf einem Missverständnis der gesunden Kontrollprobanden, was unter Asbest zu verstehen ist, beruhen. Möglicherweise spielen hier auch differentielle Interviewereffekte eine Rolle. Jedoch sind die beobachteten hohen Prävalenzen nicht a priori auszuschließen, da die Zahl der potentiell gegenüber Asbest exponierten Handwerker, die bei Sanierungsarbeiten von alten Häusern bzw. gegenüber asbesthaltigen Bauprodukten (Fliesenkleber, Spachtelmasse etc.) exponiert waren, höher ist, als bisher angenommen (vgl. Smola T, Vortrag A+A, Düsseldorf 2015).

Da Krebs aufgrund von einheitlichen molekularen Veränderungen in Gewebe entsteht, die unabhängig von der Exposition gegenüber einem spezifischen Karzinogen verlaufen (Hanahan und Weinberg 2011), wurde in dieser Studie der Ansatz zur Identifizierung eines asbestspezifischen Markers nicht verfolgt.

Tabelle 6: Deskriptive Faktoren der Studienpopulation

	Maligne Tumore, N (%)	Nicht maligne Lungenerkrankungen, N (%)	Bevölkerungskontrollen, N (%)
Insgesamt	486	158	207
Geschlecht			
Männer	311 (64)	87 (55,1)	143 (69,1)
Frauen	175 (36)	71 (44,9)	64 (30,9)
Alter, Mittelwert (Standardabweichung)	66,2 (9,5)	62,3 (11,9)	65,1 (8,8)
Rauchstatus			
Nie geraucht	55 (11,4)	43 (27,4)	57 (27,5)
Ex-Raucher	264 (54,6)	75 (47,8)	109 (52,7)
Aktueller Raucher	165 (34,1)	39 (24,8)	41 (19,8)
Schulbildung			
Ohne Schulabschluss	17 (3,5)	6 (3,8)	2 (1)

Haupt/Realschule	317 (65,2)	98 (62)	133 (64,3)
Fachabitur/Abitur	58 (11,9)	18 (11,4)	67 (32,4)
Andere/Keine Angabe	94 (19,3)	36 (22,8)	5 (2,4)
>1 Jahr mit Asbest gearbeitet (Selbstangabe)			
Ja	49 (12)	19 (15,1)	30 (14,5)
... Ja, aber nur als Bystander	5 (1,2)	0	0
Nein	261 (64,1)	70 (55,6)	163 (78,7)
Weiß nicht	92 (22,6)	37 (29,4)	14 (6,8)

4.3.3.2 Epigenetik – erreichte Ergebnisse

Die epigenetischen Analysen tragen sowohl zur molekularen Charakterisierung der Bioproben als auch zur Entdeckung neuer Biomarker bei. Da über die Epigenetik die Gene reguliert und somit die Expression von Proteinen gesteuert wird, liefert sie einen wichtigen Beitrag zum Verständnis pathologisch veränderter Proteinmuster und ermöglicht es, Kausalketten bei der Kanzerogenese aufzudecken. Dadurch kann unter anderem die Plausibilität neu entdeckter Proteinbiomarker untermauert und die Zahl von Screening-Artefakten reduziert werden. Die DNA-Methylierung eignet sich aufgrund ihrer Rolle bei der Krebsentstehung und auch wegen ihrer hohen biochemischen Stabilität als gute Quelle für die Identifizierung potenzieller Tumormarker.

Identifizierung potentieller neuer Marker in Lungentumor-Frischgewebe

Für die Suche nach Methylierungsänderungen im Genom wurde zunächst die sogenannte Methylation Binding Domain Sequenzierung (MBD-Seq) etabliert. Die ursprünglich geplante chipbasierte Methode wurde aufgrund der kurzfristigen Einstellung der Chipproduktion seitens des Herstellers durch das MBD-Seq-Verfahren ersetzt. Mit dieser neuartigen Methode können im Gegensatz zu bisher üblichen DNA-chipbasierten Methoden neben bekannten auch neue Methylierungsbereiche gefunden werden. Die Methode basiert auf der Anreicherung von methylierten DNA-Fragmenten mittels einer methylierte DNA-Bereiche bindenden Proteindomäne (MBD) und einer anschließenden Sequenzierung mit einem sog. Next-Generation-Sequencer (Lan et al. 2011, Li et al. 2010). Durch die Erstellung eines gesamtgenomischen Profils wird jede Probe molekular charakterisiert, wobei ca. 50.000 methylierte DNA-Bereiche erfasst werden; gleichzeitig können durch den Vergleich von Tumor- und Nichttumorproben neue Biomarker-Kandidaten entdeckt werden.

Für Methylierungsanalysen standen initial Gewebeproben von 220 Patienten zur Verfügung, deren DNA für die weitere Verwendung in ausreichenden Mengen isoliert und anschließend charakterisiert wurde. Für die MBD-Seq-Methode standen von 87 Patienten sowohl geeignetes Tumor- als auch Nichttumorgewebe zur Verfügung. Die Tumor-/Nichttumorgewebeproben-Paare von 80 Patienten konnten erfolgreich sequenziert werden. Zur Auswertung der sehr umfangreichen Datenmengen (13 Millionen Fragment-Sequenzierungen bzw. acht GB Daten pro Lauf) wurde in Zusammenarbeit mit der Bioinformatik des MPC das MEDIPS-Softwarepaket angepasst und eingesetzt. Nach dem *Alignment* an das humane Genom wurden aufgrund von Qualitätsmerkmalen (*CpG Coverage* > 50%) 74 Patienten ausgewählt und analysiert, die eine durchschnittliche Alignmentrate von 91% mit 13,2 Mio. Reads besaßen. Die Auswertung, in Kooperation mit der Abteilung Bioinformatik des MPC zeigte signifikante ($p \leq 0,01$) differentielle DNA-Methylierungsunterschiede (*Fold Change* ≥ 5) zwischen Tumor- und

Normalgewebeproben an 812 Stellen (Loci) im gesamten Genom, d.h. es stehen somit rund 800 Kandidatenregionen für die weitere Evaluierung als mögliche Biomarker zur Verfügung. Details zur Auswertung finden sich im Ergebnisteil des MPC (Kap. 4.2.3.). Aufgrund der großen Zahl signifikant veränderter Methylierungsbereiche wurden zunächst keine weiteren Lungentumorgewebe mittels MBD-Seq untersucht. Vielmehr wurde der Fokus auf die Verifizierung der Ergebnisse mittels Einzelassays (Pyrosequencing, s. u.) verlagert. Die 80 untersuchten Gewebe umfassten vorwiegend Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und Karzinoide. Für kleinzellige Lungenkarzinome, die in der Regel nicht operiert werden und für die somit keine größeren Gewebeproben vorlagen, wurde eine andere Strategie verfolgt. Hierbei wurde auf Feinnadelbiopsien von Lymphknotengewebe und die Pyrosequencing-Methode zurückgegriffen (s. u.).

Von den 812 gefundenen Loci liegen zahlreiche nicht direkt innerhalb von bekannten Genen, sondern in der unmittelbaren Nähe oder sogar weit von ihnen entfernt. So liegt der Locus *DLMS113* in der Umgebung des Gens *ZIC1* und der Locus *DLMS129* in einiger Entfernung des Gens *HOXD8*. *DLMS003* liegt dagegen genau innerhalb des Gens *PAX3* und *DLMS454* im Promotorbereich von *CDKN2A*. Viele der Gene, die mit den gefundenen Loci assoziiert sind, kodieren Transkriptionsfaktoren, insbesondere Homeobox-Gene. Somit ist von den Methylierungsunterschieden eine deutliche Zahl von Master-Genen betroffen, die für die Entwicklung und Differenzierung von Lungengewebe sowie die Zellsteuerung eine wichtige Rolle spielen (Abe et al. 2006, Lechner et al. 2001). Die MBD-Seq-Ergebnisse stimmen für Adeno- und Plattenepithelkarzinome generell gut mit bisherigen vergleichbaren Untersuchungen zu veränderten Methylierungsmustern im Genom von Lungentumoren überein (Rauch et al. 2008, Rauch et al. 2012, Carvalho et al. 2012, Carvalho et al. 2013). Obwohl deren Fallzahlen insgesamt sehr gering waren und teilweise eine andere Methodik eingesetzt wurde, waren sowohl bei Rauch et al. als auch bei Carvalho et al. übereinstimmend mit unseren Ergebnissen viele Homeobox-Genen, u.a. Transkriptionsfaktoren, differenziell methyliert. So detektierten beispielsweise Rauch et al. ebenfalls eine Hypermethylierung in den Genen *PAX3* und *CDKN2A* (Rauch et al. 2008, Rauch et al. 2012).

Identifizierung potentieller neuer Marker in Mesotheliom-Frischgewebe

Insgesamt stand Frischgewebe von 21 Mesotheliom-Patienten zur Analyse zur Verfügung. Dabei konnte aus allen 21 Geweben für MBD-Seq ausreichende DNA-Mengen isoliert werden, die anschließend sequenziert wurden, wobei zwei Proben eine CpG-Coverage < 50 hatten und nicht bei der Auswertung berücksichtigt wurden. Weiterhin wurden ergänzend die Mesotheliom-Zelllinien H28, H2452, MSTO-211H, DM-3, RS-5 und JL-1 sequenziert. Die Zelllinie H2452 wurde ebenfalls infolge einer zu geringen CpG-Coverage bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Da grundsätzlich keine ausreichenden Mengen an gesundem Mesothelium gewonnen werden konnten, wurden als Kontrollen zunächst Proben von Patienten mit Pleurafibrose, Pleuraplaques bzw. Pleuritis verwendet. Hier konnten von 15 Kontrollgeweben elf mit der MBD-Seq-Methode analysiert werden. Bei den übrigen vier Proben war die DNA-Menge zu gering und konnte daher nicht analysiert werden. Bei der Analyse stellte sich heraus, dass nur 13 Loci signifikant differentielle DNA-Methylierungsunterschiede aufwiesen, obwohl bereits weniger stringente Kriterien ($p \leq 0,05$, *Fold Change* ≥ 2) im Vergleich zum Lungenkrebs Screening ($p \leq 0.01$, *Fold Change* ≥ 5) angewendet wurden. Mit den Kriterien aus dem Lungenkrebs Screening konnten hingegen keine signifikanten DNA-Methylierungsunterschiede gefunden werden. Zudem zeigte sich, dass die Mesotheliome oft niedriger methyliert waren als die Kontrollen (in neun von 13 Fällen). Daher wurde alternativ die transformierte Mesothel-Zelllinie MeT5A als Kontrolle analysiert. Mit dieser Kontrolle konnten unter Vorgabe der gleichen strengen Kriterien wie im Lungenkrebs Screening ($p \leq 0.01$, *Fold Change* ≥ 5) über 10.000 Loci gefunden werden, von denen etwa ein Drittel im Bereich annotierter Gene liegt. Inwieweit diese im Vergleich sehr hohe Anzahl potenzieller Loci auf die

Verwendung der Zelllinie MeT5A als einzige Kontrolle zurückzuführen ist, muss analysiert und in weiteren unabhängigen Einzelassays untersucht werden. Außerdem wurden, analog zum Proteomic-Ansatz, die Methylierungsgrade der epitheloiden mit denen der sarkomatoiden Mesotheliome verglichen. In 33 Loci unterscheiden sich die beiden histologischen Subtypen voneinander ($p \leq 0.05$, *Fold Change* ≥ 2), wobei mit den stringenteren Kriterien ($p \leq 0.01$, *Fold Change* ≥ 5) nur noch acht interessante Loci erhalten bleiben. 91% der Loci sind in sarkomatoiden im Vergleich zu epitheloiden Mesotheliomen höher methyliert. In Tabelle 5 (Bioinformatik) sind die Loci aufgelistet, die in einem annotierten Genbereich liegen. Die assoziierten Gene kodieren u.a. Transkriptions- und Microtubuli-assoziierte Faktoren, aber auch einen Natrium-Kanal, ein Co-Chaperon und einen Transporter. Für die Pyrosequencing-basierte, methodische Verifizierung könnten insbesondere die Gene *CBFB*, *MTCL1* und *DNAJA1* von Interesse sein.

Identifizierung potentieller neuer Marker in Lymphknotenmetastasen von Lungentumoren

Bestimmte Tumoren werden in der Regel entweder nicht oder erst nach Chemotherapie operiert. Damit steht für diese Tumorarten kein oder – insbesondere für kleinzellige Karzinome – nur sehr wenig Frischgewebe aus der Thoraxchirurgie zur Verfügung. Eine Alternative stellen durch Biopsie gewonnene Gewebeproben dar. Hier bietet sich z.B. die endobronchiale Ultraschall-geführte transbronchiale Nadel-Aspiration (EBUS-TBNA) von mediastinalen Lymphknoten an. Es standen insgesamt 97 EBUS-Proben aus der Pneumologie zur Verfügung, darunter u.a. 14 kleinzellige Karzinome, 19 Adenokarzinome und 16 Plattenepithelkarzinome sowie 41 Kontrollen (Tumorpatienten mit tumorfreiem Lymphknotengewebe und sieben Sarkoidosen).

Die geringen durch Biopsien gewonnenen Probenmengen schränken die anwendbare Methodik ein. So ist ein gesamtgenomisches Screening zur Entdeckung neuer Marker nicht möglich, jedoch können gezielte Einzelassays von bereits bekannten Targets durchgeführt werden. Die Pyrosequencing-Methode erlaubt hier eine Quantifizierung des Methylierungsgrades einzelner Gene selbst in kleinsten Proben. In Vorversuchen im Rahmen dieser Studie wurden Pyrosequencing-basierte Einzelassays für verschiedene bereits bekannte Gen-Targets etabliert. In den mittels EBUS-TBNA gewonnenen Geweben konnte so die Methylierung der Gene *LINE1*, *RASSF1*, *APC*, *CDH13*, *EFEMP1*, *MGMT* und *RARB* quantifiziert werden.

Die Analysen ergaben, dass einige Tumorsubtypen ein spezifisches Muster an Methylierungsveränderungen in der Gesamtheit der sieben untersuchten Genbereiche aufwiesen (exemplarisch für *LINE1* siehe Abb. 15). Kleinzellige Karzinome zeigten in 13 von 14 Fällen eine deutliche Hypermethylierung des *RASSF1*-Gens sowie in 79% der Fälle eine Hypomethylierung in *LINE1* und vereinzelt Hypermethylierungen in *EFEMP1*, *APC* u.a. Genen. Adenokarzinome zeigten in 42% der Fälle eine Hypermethylierung des *RASSF1*-Gens sowie in 42% eine Hypomethylierung in *LINE1* und in mehreren Fällen Hypermethylierungen in *APC*, *CDH13*, *RARB* und *EFEMP1*. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Subtypen ist es insbesondere für Adenokarzinome schwierig, diese mit einem einzelnen Biomarker nachzuweisen. Mit dem Biomarker-Panel *LINE1*, *RASSF1*, *RARB* und *CDH13* konnten 84% der Adenokarzinome identifiziert werden. Plattenepithelkarzinome zeigten in 44% der Fälle eine Hypermethylierung des *RASSF1*-Gens, in fast allen Fällen (15 von 16) eine Hypomethylierung von *LINE1* und vereinzelt Hypermethylierungen in *APC*, *EFEMP1* und *MGMT*. Interessanterweise waren bei den vier adenosquamösen Karzinomen praktische keine Änderungen in den untersuchten Genbereichen feststellbar – alle Werte waren mit denen der Kontrollen vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass die adenosquamösen Karzinome keine einfache Mischform aus Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen darstellen – wie dies die Histologie und die Immunhistochemie suggerieren – sondern vielmehr eine eigene Tumorentität. Dies würde sich auch mit Untersuchungen zu Tumorstammzellen decken (Mather et al. 2013). Auch das großzellige neuroendokrine Karzinom und die

Dys-/Metaplasien zeigten keine Veränderungen. In diesen Fällen (einschließlich adenosquamösen Karzinome) waren aber die Fallzahlen gering, so dass hier noch keine validen Aussagen möglich sind.

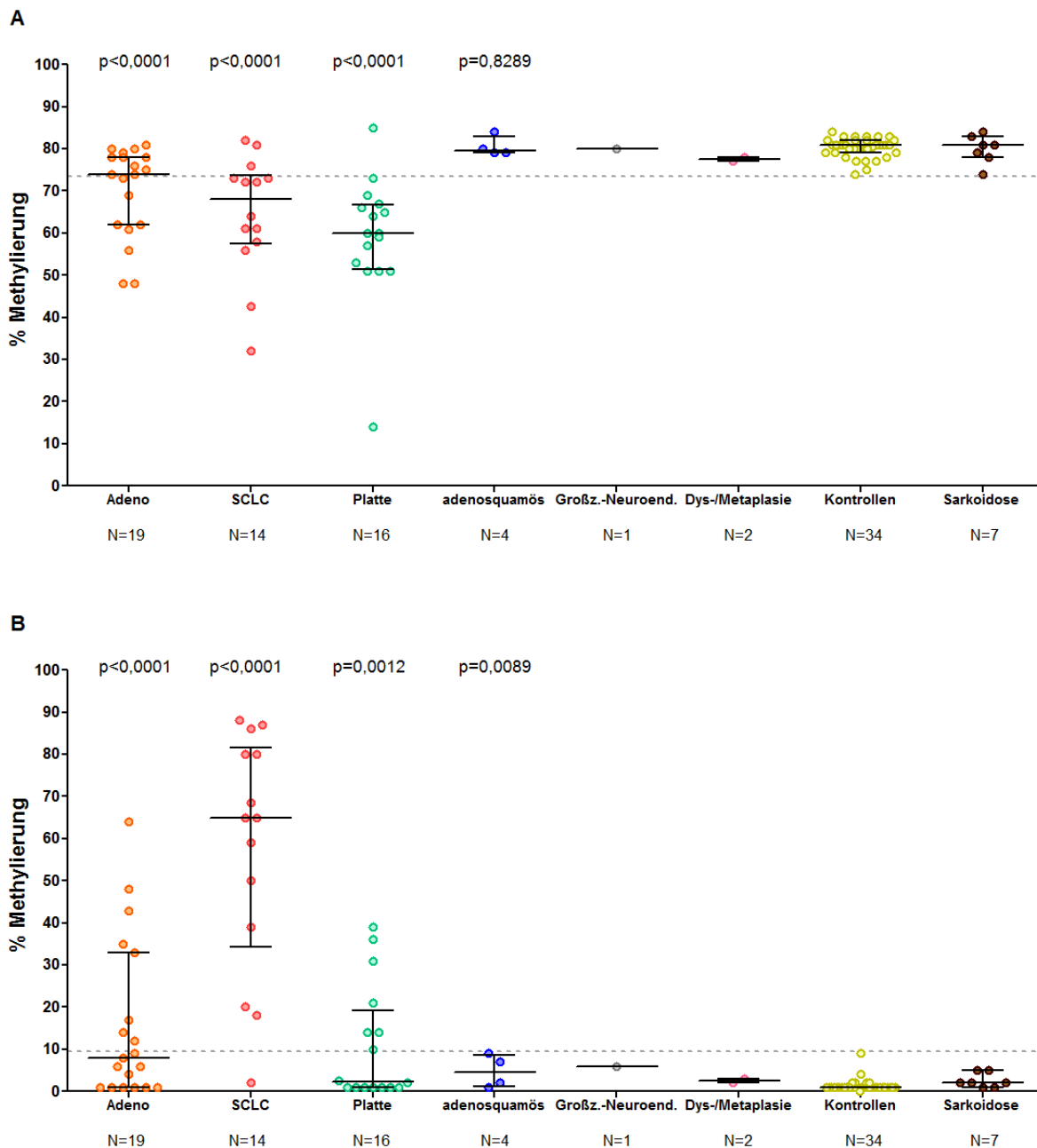


Abb. 15: **(A)** DNA-Methylierung von *LINE1*: einzelne Tumortypen gegen Kontrollen. In gesundem Gewebe ist *LINE1* normalerweise zu ca. 80% methyliert, in Tumoren ist es häufig untermethyliert. **(B)** DNA-Methylierung von *RASSF1*: einzelne Tumortypen gegen Kontrollen. In gesundem Gewebe ist *RASSF1* normalerweise nahezu unmethyliert, in Tumoren ist es häufig hypermethyliert. Alle Signifikanzberechnungen wurden mit dem Mann Whitney Test durchgeführt.

Initiale methodische Verifizierung ausgewählter potentieller Marker aus MBD-Seq mittels Pyrosequencing

Von den 812 mittels MBD-Seq in der Discovery-Phase identifizierten Loci wurden für 12 ausgewählte Genbereiche Einzelassays, basierend auf der Pyrosequencing-Methode, entworfen. Die

Methylierungsstellen im Bereich dieser 12 Genbereiche hatten nach Auswertung der MBD-Seq-Daten statistisch die deutlichsten Veränderungen zwischen Tumor- und Nichttumorgewebe gezeigt (siehe Abb. 16 und Tabelle 7). Zehn dieser Einzelassays wurden zunächst an den zuvor mittels MBD-Seq untersuchten Geweben getestet. Es ergab sich beispielsweise für den Assay *DLMS001* eine Übereinstimmung beider Methoden von 89%, und für die Assays *DLMS002* und *DLMS006* eine von 85%. Dies repräsentiert unter der Berücksichtigung, dass sich beide Methoden fundamental unterscheiden, einen hohen Grad an Übereinstimmung. Die neun bislang näher untersuchten Einzelassays zeigen alle einen signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$) im Methylierungsgrad zwischen Tumor- und Nichttumorgewebe. Daher erscheinen sie potenziell geeignet, in EBUS-, Speichel- und Plasmaproben weitergehend analysiert zu werden.

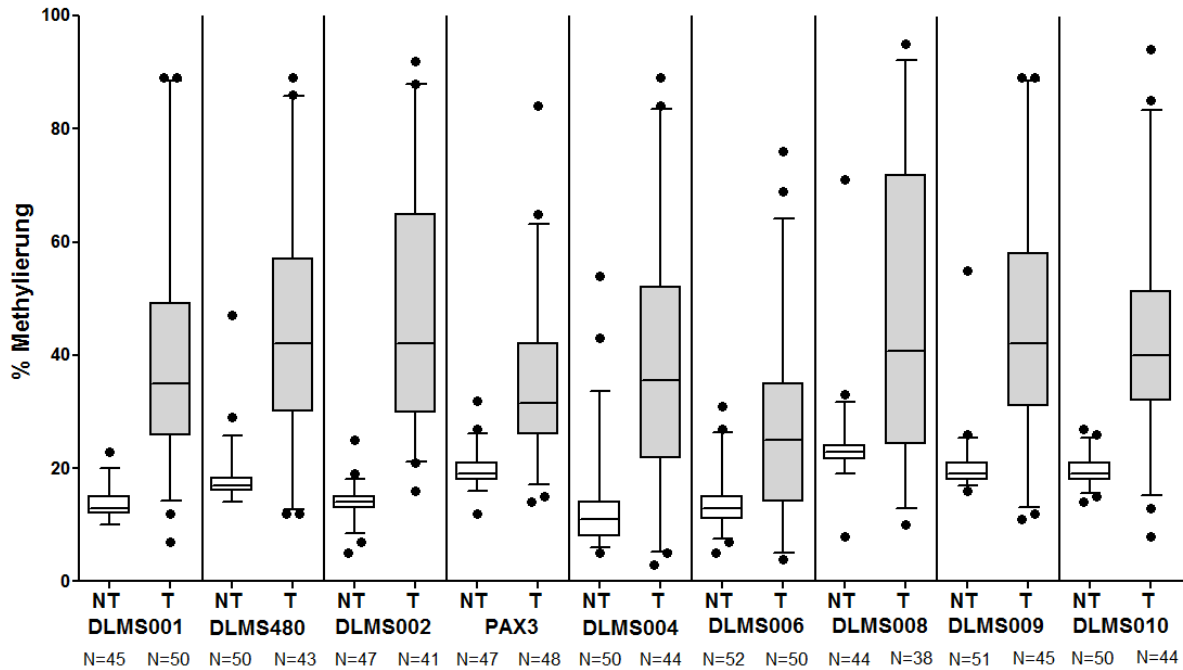


Abb. 16: Veränderte DNA-Methylierung in Lungentumorgewebe (T) im Vergleich zu angrenzendem Normalgewebe (NT) (Mann Whitney Test: $p < 0,0001$). Methodische Verifizierung einzelner MBD-Seq-Ergebnisse mittels Pyrosequencing für die Loci *DLMS001*, *DLMS480*, *DLMS002*, *PAX3*, *DLMS004*, *DLMS006*, *DLMS008*, *DLMS009* und *DLMS010*.

Tabelle 7: Methodische Verifizierung von ausgewählten Methylierungsassays

Assay	Chromosom	Assay-Design abgeschlossen	technische Assay-Verifizierung mit 14 Proben (T und NT)	Verifizierung: Vergleich PyroSeq/MBD-Seq (40 T/NT-Gewebe-Paare) [% Übereinstimmung]
DLMS001	chr7	✓	✓	89%
DLMS480	chr1	✓	✓	83%
DLMS002	chr1	✓	✓	85%
PAX3	chr2	✓	✓	75%

DLMS004	chr20	✓	✓	75%
DLMS006	chr8	✓	✓	85%
DLMS008	chr2	✓	✓	80%
DLMS009	chr4	✓	✓	66%
DLMS010	chr12	✓	✓	88%
CDKN2A	chr9	✓	✓	n.b.

(Details zur Berechnung siehe Kap. 4.2.3., n.b. = nicht bestimmt)

Nachweis von ausgewählten Markern aus MBD-Seq in Lymphknotenmetastasen von Lungentumoren

Die DLMS001-, DLMS002-, PAX3-, DLMS004-, DLMS006- und DLMS008-Assays wurden in Lymphknotenmetastasen von Lungentumoren, sowie tumorfreien Lymphknoten (Kontrollen) und Lymphknoten von Sarkoidose Patienten untersucht (Kollektiv siehe s.o.: „Identifizierung potentieller neuer Marker in Lymphknotenmetastasen von Lungentumoren“). Ein signifikanter DNA-Methylierungsunterschied ($p < 0,05$) zwischen Tumor und Kontrollen/Sarkoidose wurde für alle sechs neuen Marker festgestellt (siehe Abb. 17). Bei einer Spezifität von 98% zeigt der DLMS001-Marker eine Sensitivität von 75%, der DLMS002-Marker eine von 48%, der PAX3-Marker eine von 70%, der DLMS006-Marker eine von 65% und der DLMS008-Marker eine Sensitivität von 72%. Der DLMS004-Marker hatte eine Sensitivität von 55% bei einer Spezifität von 97%. Ein Biomarker Panel mit diesen sechs Assays und LINE1 führt zu einer Sensitivität von 89% bei einer Spezifität von 100%.

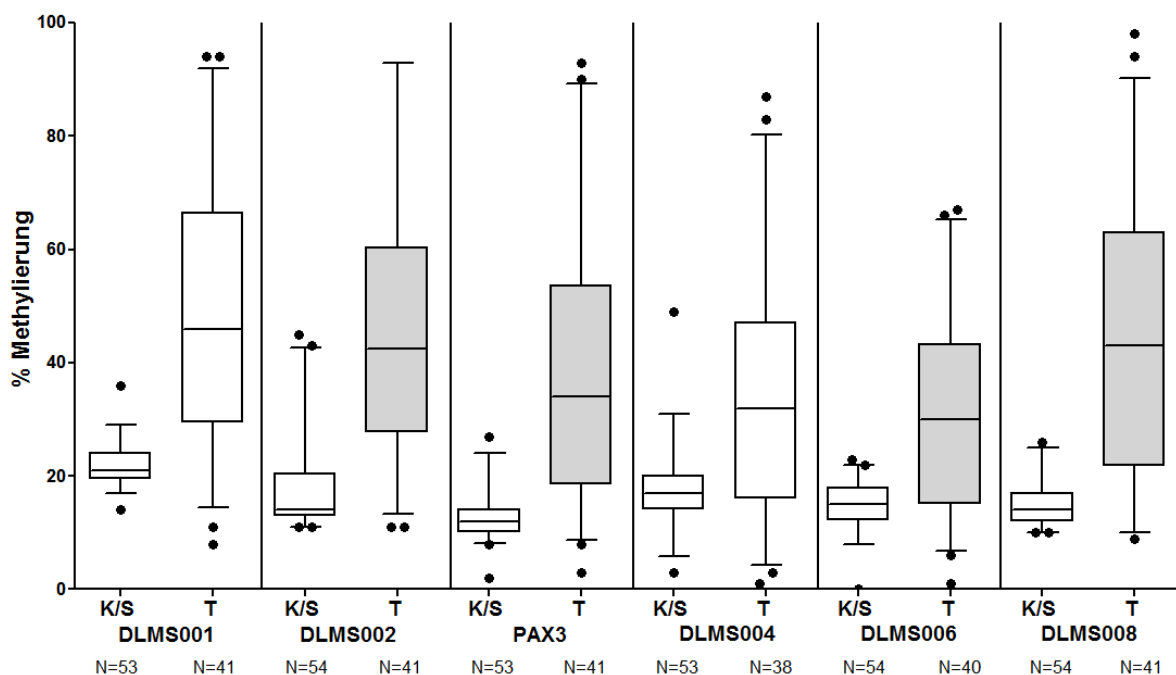


Abb. 17: DNA-Methylierung von *DLMS001*, *DLMS002*, *PAX3*, *DLMS004*, *DLMS006* und *DLMS008* in tumorfreien EBUS-TBNA Proben sowie von Sarkoidose-Patienten (K/S) im Vergleich mit EBUS-TBNA-Proben von Lungentumorpatienten (T) (Mann Whitney Test: $p < 0,0001$).

Nachweis von ausgewählten Markern in Plasma und Speichel mittels Pyrosequencing

Die in Plasma zirkulierenden DNA-Mengen sind in Tumorpatienten zwar häufig erhöht, jedoch sind sie insgesamt so gering, dass ihre Analyse eine große methodische Herausforderung darstellt. Ein direktes Screening des gesamten Genoms in Plasma-DNA mit MBD-Seq ist daher nicht möglich. Mit einer empfindlicheren Methode, wie z.B. Pyrosequencing, ist es aber grundsätzlich möglich, gezielt einzelne der im Gewebe-Screening mittels MDB Seq identifizierter Methylierungs-Loci zu quantifizieren.

Mit Pyrosequencing-Assays wurden 33 Plasmaproben korrespondierender EBUS-Proben untersucht. *LINE1* und *RASSF1* waren bei Lungentumorpatienten nur in wenigen Fällen gegenüber gesunden Kontrollen verändert. Weiterhin wurden zunächst mit zwei der mit MBD-Seq entdeckten und mittels Pyrosequencing verifizierten Assays 501 Plasmaproben (407 Tumoren, 94 Kontrollen) analysiert. Hier zeigte sich mit Ausnahme der kleinzelligen Karzinome kein signifikanter Unterschied zwischen Tumoren und Kontrollen. Bei kleinzelligen Karzinomen lag die Sensitivität des Assays für *DLMS001* bei 47%, für *DLMS002* bei 53%, für *DLMS008* bei 40% und für *PAX3* bei 29%, mit jeweils um die 97% Spezifität. In Speichelproben (108 Tumoren, 131 Kontrollen) hingegen wiesen auch andere Tumorsubtypen eine signifikant erhöhte Methylierung ($p < 0,0001$) auf. So zeigte für die Gesamtheit der Lungentumoren *DLMS001* eine Sensitivität von 57%, *DLMS002* eine von 40%, *PAX3* eine von 23%, und *DLMS008* eine Sensitivität von 31%, jeweils bei einer Spezifität von 93-95% (Abb. 18). Subtypen-spezifisch können mit dem *DLMS001*-Assay kleinzellige Karzinome sogar mit einer Sensitivität von 75%, Adenokarzinome mit 61% und Plattenepithelkarzinome mit einer Sensitivität von 59% – bei einer Spezifität von 93% – im Speichel identifiziert werden. Somit erscheint eine speichelbasierte Detektion von Lungentumoren mit epigenetischen Markern grundsätzlich möglich, eine plasmabasierte Detektion deutet sich zumindest bei Kleinzellern an.

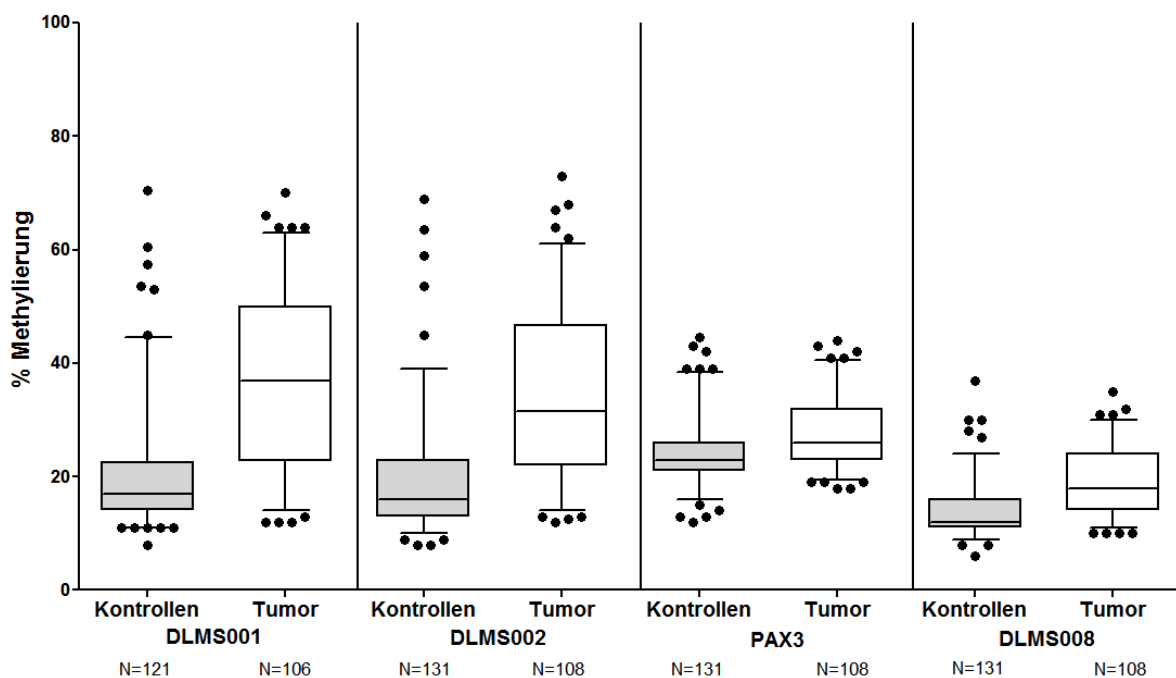


Abb. 18: DNA-Methylierung von *DLMS001*, *DLMS002*, *PAX3* und *DLMS008* in Speichelproben von Lungentumorpatienten und gesunden Kontrollen (Mann Whitney Test: $p < 0,0001$).

Nachweis von Markern in Pleurapunktaten

Es standen 21 Punktate von Pleuraergüssen bei verschiedenen Tumoren (N=15) und benignen Erkrankungen (N=6) zur Verfügung. In diesen Proben wurde der Methylierungsgrad in den Promotoren der Gene *RASSF1*, *LINE1*, *RARB*, *APC* und *PAX3* sowie bei *DLMS001* mittels Pyrosequencing bestimmt. Erste Ergebnisse weisen im Pleurapunktat auf differentielle DNA-Methylierungsmuster in den Standardgenen sowie in den neuen Loci *PAX3* und *DLMS001* hin. Im Gegensatz zum Zellpellet eignete sich der Überstand des Pleurapunktats, in dem sich frei zirkulierende DNA befindet, besser für die DNA-Methylierungsanalyse. Im Überstand konnten 60% der Proben eindeutig als Tumor identifiziert werden, wohingegen im Pellet nur 33% Fälle erkannt wurden. In der Kombination aller sechs Methylierungsbereiche konnten alle Lungen-, Pleurakarzinome und Mesotheliome entdeckt werden, wobei aber 40% der Proben nahe am *Cutoff* lagen. Lediglich einer der sechs Kontrollpatienten, der eine chronische fibrosierende Pleuritis aufwies, zeigt eine erhöhte DNA-Methylierung in einigen der Genbereiche. Die Fallzahlen sind aber derzeit noch zu gering, um statistisch belastbare Aussagen machen zu können.

4.3.3.3 Proteine

Die beiden Sandwich-ELISAs für Survivin und HIF1A konnten erfolgreich etabliert werden und wurden zur Analyse von insgesamt 731 Plasmaproben von Tumorfällen und Kontrollen eingesetzt. Ein erhöhter Survivin-Gehalt zeigte sich nur in 43 der 441 Tumor-Fälle (10%), sowie bei vier der 96 gesunden Kontrollen (4%) und 19 der 194 Patienten mit benignen Erkrankungen (10%). Erhöhte HIF1A-Werte wurden ebenfalls bei nur 42 der 441 (10%) Patienten mit positivem Lungentumorbefund nachgewiesen. Ein erhöhter HIF1A-Gehalt wurde zudem bei fünf Kontrollen (5%) sowie bei 22 benigne erkrankten Patienten (11%) gemessen. Insgesamt lag der Median bei allen drei Patientengruppen (Kontrollen, benigne Erkrankungen, Tumoren) sowohl beim Survivin- als auch beim HIF1A-ELISA unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze von 200 pg/ml (Survivin) bzw. 500 pg/ml (HIF1A). Auf der Basis dieser Datenlage scheinen die Marker-Proteine Survivin und HIF1A in der Form eines klassischen ELISA nicht für die Früherkennung von Lungen- und Pleuratumoren in Plasmaproben geeignet zu sein. Zukünftig böte sich jedoch ein Einsatz der gewonnenen Antikörper in anderen Technologien wie beispielsweise der sogenannten Immuno-PCR an, die ein hochsensitives Verfahren darstellt und so die geringeren Mengen nachweisen könnte. Ein entsprechender Immuno-PCR Assay für den Nachweis geringster Mengen von Survivin ist derzeit bereits in der Entwicklung.

4.3.3.4 Postpower-Kalkulation

Da in der Studie mit verschiedensten Methoden Proben analysiert werden, ist eine allgemeine Fallzahlplanung nur bedingt möglich. Für eine konkrete Powerberechnung müssen verschiedene Grundannahmen bekannt sein. So ist z.B. der Konzentrationsunterschied eines Markers zwischen gesundem und tumorösem Gewebe nicht bekannt und für jeden einzelnen getesteten Marker unterschiedlich. Dennoch war es uns möglich, >800 Markerkandidaten zu identifizieren, die statistisch signifikant zwischen an Krebs erkrankten und gesunden Probanden unterscheiden konnten.

Für die zwei Marker DLMS001 und DLMS002 mit der stärksten Differenzierung zwischen Kranken und Gesunden präsentieren wir im Folgenden eine Postpowerkalkulation. Zu diesem Zweck wurde ein *Cutoff* für ein positives Testergebnis so gewählt, dass eine Spezifität von 93% erreicht wird. Für DLMS001 ergibt sich damit eine Sensitivität von 56,6% und für DLMS002 von 40%. Bei einem Alphafehler von 5% beobachten wir unter den beobachteten Fallzahlen eine Power von >99,9% für beide Marker. Korrigiert man den Alphafehler für die Anzahl gescreenter Methylierungsmarker im Gewebe (ca. 50.000) auf $p < 10^{-6}$, um einer Alphafehlerkumulierung bei multiplen Paarvergleichen entgegenzuwirken, zeigen die

genannten Marker bei den beobachteten Fallzahlen immer noch eine Power von >99,9% (DLMS001) und 90% (DLMS002).

Die eingeschlossenen Fallzahlen sind also ausreichend, um geeignete Markerkandidaten für die Früherkennung von thorakalen Tumoren zu identifizieren.

4.4. Ruhrlandklinik - Das Lungenzentrum: Interventionelle Pneumologie/Bronchologie (Leiter Prof. Dr. L. Freitag) und Thoraxchirurgie und thorakale Endoskopie (Leiter Prof. Dr. G. Stamatis)

4.4.1. Kurzdarstellung des Teilvorhabens

Die Ruhrlandklinik ist mit fast 1.000 neu diagnostizierten thorakalen Tumoren pro Jahr eine der größten Lungenkrebskliniken in Europa. Ein nicht unerheblicher Anteil dieser Tumoren ist in einer beruflichen Exposition karzinogener Substanzen (v. a. Asbest) begründet.

In der hier beantragten Studie werden diese Patienten klinisch charakterisiert. Prognostisch und funktionell operable Patienten werden in der thoraxchirurgischen Abteilung operiert ohne Abweichung vom sonst üblichen diagnostischen Vorgehen. Das entfernte Gewebe wird der Abteilung für Pathologie übergeben. Bei Patienten, die primär nicht operiert werden, wird bronchoskopisch Tumormaterial in der Abteilung für Interventionelle Pneumologie durch unterschiedliche Biopsieverfahren entnommen. Auch dieses Gewebe wird zur pathologischen und molekularen Typisierung an die Abteilung für Pathologie übergeben. Das Tumormaterial wird auch zur biospektroskopischen Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Ein weiterer Schwerpunkt der Interventionellen Pneumologie ist die Bestimmung volatiler Marker in der Ausatemluft durch die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS). Bei allen Studienteilnehmern wird eine IMS der Ausatemluft durchgeführt. Bei zu bronchoskopierenden Patienten wird zusätzlich Luft zur IMS entnommen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Ausatemluft von Tumorpatienten in der Zusammensetzung volatiler Substanzen (VOCs) von der Ausatemluft gesunder Probanden unterscheidet. Die Untersuchung der Ausatemluft mittels IMS ist einfach durchzuführen, nicht-invasiv und führt innerhalb von 5 Minuten zu einem Ergebnis. Sie bietet somit die Option eines "Point of Care"-Screeningverfahrens für Lungenkrebs. Nach Diagnosestellung der thorakalen Tumorerkrankung ist eine weitere Datenerhebung nicht vorgesehen.

Mit der Option des Einsatzes der Infrarotspektroskopie auch im unmittelbar perioperativen Umfeld, hat die Abteilung für Thoraxchirurgie und thorakale Endoskopie gemeinsam mit der Biophysik der RUB einen ersten translationalen Arbeitsansatz an entnommenem Gewebe in die Studie eingeschlossener Patienten bereits im ersten Studienjahr entwickeln können.

4.4.1.1 Interventionelle Pneumologie/Bronchologie

4.4.1.1.2 Darstellung der Forschungsarbeiten

Alle Patienten, die in der Abteilung für Interventionelle Pneumologie stationär aufgenommen wurden, wurden gescreent, ob ein Einschluss in die Studie möglich war.

In der Abteilung Interventionelle Pneumologie wurden 222 Patienten, mit Verdacht auf ein Lungenkarzinom in bildgebenden Verfahren untersucht. Bei 214 dieser Patienten konnten Blutproben SOP-konform asserviert und verarbeitet werden. Von diesen Patienten konnten 82 Gewebeprobe (63 operative Proben, 17 Kryobiopsien und 2 Zangenbiopsien) gewonnen werden. Ab März 2014 wurden zusätzlich insgesamt 130 Speichelproben entnommen.

Die entnommenen Proben sind im Detail in Tabelle 2 (S. 10) aufgeführt.

Nach Abschluss der histologischen Analyse der Patientenproben erfolgte für alle 683 Patienten an der Ruhrlandklinik eingeschlossenen Patienten (Interventionelle Pneumologie und Thoraxchirurgie) eine Stadiierung nach TNM anhand der computertomographischen Bildgebung und der Staging-Untersuchungen (Schädel-Computertomogramm, Abdomensonographie, Knochenszintigraphie), die an die forschenden Abteilungen weitergegeben wurde.

Auf Grund der Ein-/ und Ausschlusskriterien, die vortherapierte Patienten und auch metastasierte Patienten zunächst ausgeschlossen hatten, konnte zunächst nur eine begrenzte Zahl von Patienten in die Untersuchung eingeschlossen werden. Ebenfalls wurden initial diejenigen Patienten ausgeschlossen, deren Tumor potentiell inoperabel oder aber nicht erreichbar war. Von denjenigen Patienten, bei denen bildmorphologisch ein endobronchiales Tumorwachstum oder eine mediastinale Lymphknotenmetastasierung angenommen werden konnte, wurden interventionell-pneumologisch Gewebeprobe entnommen.

Wir haben Methoden zur Durchführung molekular-genetischer Untersuchungen an bronchoskopisch gewonnenem Gewebe evaluiert, um auch kleinste Proben – endobronchial-ultraschallgestützte transbronchiale Nadelaspirationsbiopsien (EBUS-TBNA) aus mediastinalen Lymphknotenmetastasen – auf epigenetische und andere molekulare Marker untersuchen zu können. Hierzu erhielt die Abteilung für Molekulare Medizin am IPA Lymphknoten/ bzw. Lungenkarzinomproben von Patienten mit nicht-kleinzelligem und kleinzelligem Lungenkarzinom (97 Fälle) und entsprechende Kontrollen mit tumorfreiem Gewebe (41).

4.4.1.1.3. Beschreibung erreichter Ergebnisse

Ionenmobilitätsspektrometrie

Wir führten bei insgesamt 290 Patienten eine Ionenmobilitätsspektrometrische Atemluftanalyse durch. Hiervon lag bei 74 Patienten ein Adenokarzinom, bei 41 ein Plattenepithelkarzinom, bei 39 ein nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom ohne genauere Subtypisierung, bei 33 ein kleinzelliges Lungenkarzinom, bei neun ein Pleuramesotheliom, bei weiteren neun Patienten ein Karzinoid und bei 98 Patienten lagen gutartige Erkrankungen oder Metastasen eines Tumors mit anderem Ursprungsort als der Lunge vor.

212 der Ionenmobilitätsspektrometrischen Messungen waren auswertbar, diese befinden sich aktuell in der abschließenden Auswertung durch das Institut für Humangenetik (Prof. Sven Rahmann) am UK Essen.

Epigenetische und weitere molekulare Analysen an EBUS-TBNA-Proben

Die Probenentnahmetechnik der EBUS-TBNA-Proben konnte so optimiert werden, dass eine Untersuchung durch den Pathologen wie auch eine DNA-basierte Analyse (Quantifizierung der DNA-Methylierung in verschiedenen Genbereichen) durch die Abteilung für Molekulare Medizin am IPA möglich war.

4.4.1.2. Thoraxchirurgie und thorakale Endoskopie

4.4.1.2.2. Darstellung der Forschungsarbeiten

Die Abteilung für Thoraxchirurgie rekrutierte in der Studienphase seit August 2013 insgesamt 431 Patienten und damit den Großteil relevanter, „großer“ Proben. Berücksichtigt worden sind sowohl Probanden, von denen alle Proben in den etablierten SOPs gewonnen werden konnten inklusive der epidemiologischen Interviews, aber auch diejenigen, die rückwirkend infolge der Ausschlusskriterien des Studienprotokolls ausgeschlossen werden mussten – regelhaft z.B. Patienten, aus deren Gewebeproben eine Tuberkulose diagnostiziert wurde.

4.4.1.2.3. Beschreibung erreichter Ergebnisse

Während der Pilotphase lag der Schwerpunkt bis Ende des Jahres 2013 auf der klinischen Implementierung und Koordination der klinischen Schnittstellen zwischen Stationen, Funktionen (OP, Bronchoskopie) und Pathologie sowie den Schnittstellen der Forschungsplattformen am WESZ und der RUB. Parallel wurden die SOPs für Rekrutierung und Untersuchung, Studiendesign, Interview, Gewebe, Blut und Ausatemluft etabliert und umgesetzt und wo nötig adaptiert.

Eine Überarbeitung der Ein- und Ausschlusskriterien für die Hauptphase ermöglichte eine höhere Patientenrekrutierung. Eine elektronisch unterstützte Dokumentation der epidemiologischen und patientenbezogenen Daten wurde in Zusammenarbeit mit dem WESZ erfolgreich getestet und eingeführt.

Große, chirurgische Proben konnten für maligne Pleuramesotheliome in nur geringerem Ausmaß und ausschließlich in der Thoraxchirurgie gewonnen werden. Es konnten daneben zahlreichen Blut-, Atemluft-, Speichel- und Pleuraergussproben dieser Patienten gewonnen werden. Vorwiegend mit diesen „großen“ Bioproben kann die Entwicklung proteomanalytischer Verfahren zur Identifikation von Kandidatenmarkern zur Unterstützung der (Früh-)Diagnose insbesondere asbestassoziiertes Pleuratumoren und Korrelation der Ergebnisse der einzelnen Plattformen stattfinden.

4.5. Institut für Pathologie (Leiter Prof. Dr. K. W. Schmid)

4.5.1. Kurzdarstellung des Teilvorhabens

Die im Gesamtkollektiv vorhandenen Proben wurden gemäß den Leitlinien pathologisch-anatomisch charakterisiert (Wohlschläger et al. 2010) und die Daten entsprechend eingebracht.

Die Regulierung der Genexpression bzw. der folgenden Proteinsynthese ist durch viele Ebenen geregelt. Methylierungen der Histone auf denen die DNA aufgewickelt ist, auch DNA-Methylierungen und miRNAs sind potente Regulationsmechanismen der Proteinexpression. miRNAs greifen in die Proteinsynthese ein, indem die kurzen Nukleinsäuren an die komplementäre mRNA hybridisieren. Für diesen Nukleinsäuredoppelstrang ist eine Proteinsynthese über die Ribosomen nicht mehr möglich und wird abgebaut. In vielen Tumoren ist bereits eine Deregulierung verschiedener miRNAs beschrieben. Durch die erhöhte Expression von bestimmten miRNAs können mRNAs und damit die Proteinmenge von z.B. Tumorsuppressorproteinen reduziert werden.

Bisher werden die verschiedenen Tumortypen durch ihr morphologisches Erscheinungsbild und Proteinexpression unterschieden. Die Färbung der Proteine durch Immunhistochemie ist ein gängiges und weit verbreitetes Verfahren um die Herkunft und Dignität des Tumors festzustellen. Da die miRNAs mit dem Proteingehalt der Zellen verknüpft sind, sollte ein Zusammenhang zwischen miRNA-Expression

und Proteingehalt zu sehen sein. Daher sollte es möglich sein, mittels miRNA-Expressionsmuster verschiedene Subtypen voneinander abzugrenzen.

Nach den bisherigen Ergebnissen spielen microRNAs beim Lungenkarzinom (Wu et al. 2009) und Mesotheliom (Guled et al. 2009) eine Rolle. Diese sind im Gewebe, aber auch im Serum nachweisbar (Chen et al. 2008).

Sie können die entsprechenden Tumorentitäten charakterisieren und sind von prognostischer Relevanz. Eine Bedeutung wird auch in der Karzinogenese von der Entzündung zum Tumor gesehen (Schetter et al. 2010). In der Früherkennung könnten insbesondere Serumuntersuchungen von Bedeutung sein. Neueste Untersuchungen sprechen bei Personen mit Asbestexposition auch von Asbest-spezifischen microRNA Profilen (Nymark et al. 2011). Umfangreiche eigene Voruntersuchungen bestehen auf dem Gebiet der microRNAs bei Schilddrüsentumoren und Nebennierentumoren (Sheu et al. 2009, Schwertheim et al. 2009, Sheu et al. 2010a und 2010b, Schmitz et al. 2011).

Zur Untersuchung und Charakterisierung der Proben auf konventioneller Ebene dienen die Histologie und Immunhistochemie. Als microRNA-Methoden wurde die NanoString nCounter-Technologie eingesetzt.

4.5.2. Darstellung der Forschungsarbeiten

Von den operativ und bronchoskopisch entnommenen Gewebeproben werden, zusätzlich zum Nativgewebe, Paraffinblöcke angefertigt. Diese Blöcke werden geschnitten und aus dem Gewebe wird die RNA isoliert. Anschließend wird eine Quantifizierung der Nukleinsäuren durchgeführt, um deren Konzentration festzustellen. Danach werden die Proben weiter aufgearbeitet und mittels der nCounter Technologie gemessen.

Die NanoString nCounter Plattform ist eine neue und vielversprechende Technologie, um die Expression von Nukleinsäuren zu messen. Mehrere Vorteile gegenüber einer PCR-basierten Methode, wie zum Beispiel die Vermeidung einer Amplifikation, sequenzspezifische Abfrage und digitale Detektion für eine absolute Quantifikation der Nukleinsäuren, machen diese Technologie zu unserer Methode der Wahl. Diese Eigenschaften minimieren experimentelle Fehler und auch bei schweren Verhältnissen wie formalinfixierten paraffin-eingebetteten (FFPE) Proben ist diese Technik zuverlässig.

4.5.3. Beschreibung erreichter Ergebnisse

Ein Patientenkollektiv von insgesamt 84 Fällen wurde für das miRNA-Screening untersucht und ausgewertet (siehe Tabelle 8). Zur Bestimmung wurde die NanoString-Technologie (nCounter Analysis System, Seattle USA) eingesetzt.

Tabelle 8: Übersicht der einzelnen paraffinierten Gewebetypen für das miRNA-Screening

Anzahl Fälle	Gewebeprobe
6	Adenokarzinom (azinär)
4	Adenokarzinom (lepidisch)
7	Plattenepithelkarzinom
10	Pleuramesotheliom (epitheloid)
9	Pleuramesotheliom (sarkomatoid)
8	Kleinzelliges Karzinom
8	atypisches Karzinoid
8	typisches Karzinoid

10	tumorfremie Referenzgruppe (7 Lunge/ 3 LK)
4	Sarkoidose Lymphknoten
3	Sarkoidose Lunge
4	Anthrakosilikose Lymphknoten
3	Pleuritis

Die gemessenen Daten zeigen zwischen den verschiedenen Geweben signifikante Expressionsunterschiede bezüglich der microRNA Profile der einzelnen Gewebe.

Innerhalb der Lungentumoren wurden die verschiedenen Tumorarten miteinander und mit der Referenz verglichen und zeigen Deregulationen der folgenden miRNAs:

Tabelle 9: Signifikante Expressionsunterschiede von miRNAs beim Vergleich aller Tumorentitäten gegen einander.

miRNA	p-value
miR.183.5p	0,0064
miR.543	0,01296
miR.141.3p	0,02792
miR.181c.5p	0,03952

Eine statistische Auswertung (Exact Wilcoxon Rank Sum Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur) der Daten von allen NSCLC gegen SCLC zeigen:

Tabelle 10: Vergleich der miRNA-Profile beim nicht kleinzelligen vs. kleinzelligem Karzinom.

miRNA	Z	p-value
let.7d.5p	-3,9614	0,0014792
miR.135a.5p	-3,9458	0,0029584
miR.107	-3,7866	0,010352
miR.28.3p	3,7866	0,010352
miR.454.3p	-3,7873	0,010352
miR.98	-3,7866	0,010352
miR.335.5p	-3,6364	0,038464

Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den tumorfremien Referenzlungenproben und allen Lungentumoren wurden ermittelt:

Tabelle 11: Vergleich der miRNA-Profile bei Lungentumoren vs. tumorfremiem Lungengewebe.

miRNA	Z	p-value
miR.183.5p	-3,7401	0,01256
miR.200b.3p	-3,7099	0,0162
miR.126.3p	3,6368	0,032096
miR.200a.3p	-3,5788	0,049232
miR.598	-3,5784	0,04948

Auch zwischen den Subtypen des malignen Pleuramesothelioms (epitheloid – sarkomatoid) wurden signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs gefunden:

Tabelle 12: Vergleich der miRNA-Profile beim epitheloiden vs. sarkomatoiden Pleuramesotheliom.

miRNA	Z	p-value
miR.21.5p.024	-3,9686	0,0019576
miR.26a.5p	-3,9686	0,0019576
miR.361.5p	-3,9686	0,0019576
miR.362.3p	-3,8436	0,007832
miR.374b.5p	-3,8426	0,007832
let.7f.5p	-3,7167	0,023496
miR.20a.5p miR.20b.5p	-3,7167	0,023496
miR.24.3p	-3,7167	0,023496

Zudem sind auch ein paar miRNAs aufgefallen, die in bestimmten Gewebearten nahezu nicht vorhanden waren. In Adenokarzinomen ist im Gegensatz zu Plattenepithelkarzinomen die miR-1246 sehr stark unterexprimiert. Innerhalb der Gruppe der NSCLC die Expression der miR-9, miR-7 und miR-95 im Vergleich zu SCLC stark verringert. Karzinoide zeigen im Vergleich zu SCLC eine starke Überexpression der miR-129. Im Gegensatz dazu sind die miR-20a, miR-20b, miR-106a, miR-17, miR-15 und miR-19b in Karzinoiden unterrepräsentiert. Die miRNAs miR-663, miR-377 und miR-431 sind in „normalem“ Lungengewebe überwiegend nicht vorhanden im Vergleich zu allen gemessenen Lungentumorproben. Diese miRNAs können durch ihre starke Deregulierung möglicherweise als Biomarker eingesetzt werden.

Durch ein verzögertes Anlaufen der Studie, der notwendigen Etablierungsarbeiten bei der Einführung bzw. Umstellung auf die NanoString Technologie und dem erheblichen Zeitbedarf für das Einbringen der Proben konnte eine Verifizierung des umfangreichen Gesamtkollektives bisher nicht durchgeführt werden. Dieses ermöglicht jedoch eine Kombination mit einer gleichzeitigen mRNA-Messung, welches im Ausblick weiter ausgeführt wird.

An anderen Kollektiven des Institutes für Pathologie, die zeitgerecht vor dem Abschluss der Probengewinnung dieser Studie komplett zur Verfügung standen, wurden jedoch weitere Ergebnisse hinsichtlich der miRNA- bzw. mRNA-Expression verschiedener Lungen- und Pleuratumoren erarbeitet und publiziert (Mairinger et al. 2014, Walter et al. 2015).

4.6. Projektveröffentlichungen

Publikationen

Behrens, T., Pesch, B., **Brüning, T.** (2015). Tumormarkerforschung für die klinische Praxis - Epidemiologische Standards und Herausforderungen. *Onkologie* 21:250-56

Darwiche, K., Özkan, F., Ting, S., **Johnen, G.**, **Brüning, T.**, Soltermann, A., Huber, L.C., Christoph, D.C., **Freitag, L.**, Franzen, D. (2014) Prätherapeutische Biomarker des Lungenkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung der Bronchoskopie. *Pneumologie* 68(11):719-26.

Deutsch, E.W., Albar, J.P., Binz, P.A., **Eisenacher, M.**, Jones, A.R., Mayer, G., Omenn, G.S., Orchard, S., Vizcaíno, J.A., Hermjakob, H. (2015) Development of data representation standards by the human proteome organization proteomics standards initiative. *J Am Med Inform Assoc* 22(3):495-506. doi: 10.1093/jamia/ocv001. Epub 2015 Feb 28.

El-Mashtoly, S.F., Niedieker, D., Petersen, D., Krauss, S.D., Freier, E., Maghnoouj, A., **Mosig, A.**, Hahn, S., Kötting, C., **Gerwert, K.** (2014) Automated Identification of Subcellular Organelles by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering. *Biophysical J* 106, 1910-1920.

Großerüschkamp, F., Kallenbach-Thieltges, A., **Behrens, T.**, **Brüning, T.**, **Altmayer, M.**, **Stamatis, G.**, **Theegarten, D.**, **Gerwert, K.** (2015) Marker-free automated histopathological annotation of lung tumour subtypes by FTIR imaging. *Analyst* 140(7):2114-20.

Mayer G, Stephan C, Meyer HE, Kohl M, Marcus K, **Eisenacher M** (2015) ProCon - PROteomics CONversion tool. *J Proteomics* pii:S1874-3919(15)30053-1. doi: 10.1016/j.jprot.2015.06.015

Pesch, B., **Brüning, T.**, **Johnen, G.**, Casjens, S., Bonberg, N., Taeger, D., Müller, A., Weber, D.G., **Behrens, T.** (2014) Biomarker research with prospective study designs for the early detection of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1844(5):874-83.

Walter RF, Werner R, Ting S, Vollbrecht C, **Theegarten D**, Christoph DC, Schmid KW, Wohlschlaeger J, Mairinger FD (2015). Identification of deregulation of apoptosis and cell cycle in neuroendocrine tumors of the lung via NanoString nCounter expression analysis. *Oncotarget* (Epub ahead of print) PMID: 26008974

Weber, D.G., **Johnen, G.**, Casjens, S., Bryk, O., Pesch, B., Jöckel, K.H., Kollmeier, J., **Brüning, T.** (2013) Evaluation of long noncoding RNA MALAT1 as a candidate blood-based biomarker for the diagnosis of non-small cell lung cancer. *BMC Res Notes* 6;6:518.

Weber, D.G., Casjens, S., **Johnen, G.**, Bryk, O., Raiko, I., Pesch, B., Kollmeier, J., Bauer, T.T., **Brüning, T.** (2014) Combination of MiR-103a-3p and mesothelin improves the biomarker performance of malignant mesothelioma diagnosis. *PLoS One* 9(12):e114483.

Zhong, Q., Yang, C., Großerüschkamp, F., Kallenbach-Thieltges, A., Serocka, P., **Gerwert, K.**, **Mosig, A.** (2013) Similarity maps and hierarchical clustering for annotating FT-IR spectral images. *BMC Bioinformatics*, 14:333.

Kongressbeiträge

SPEC 2013: Shedding New Light on Disease, August 2014, "Label-free annotation of tissue, living-cells and body fluids by FTIR-, Raman- and CARS-imaging"

COST Action BM1401 Raman4Clinics, Mai 2015, "Marker-free vibrational imaging and integration of Proteome-analysis provides molecular resolution"

8th ICAVS 2015 (International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy), Juli 2015, "Marker-free cancer annotation by FTIR imaging"

Agilent Workshop auf der ICAVS 2015, Juli 2015, "Prognostic subclasses of lung cancer annotated by FTIR imaging"

Johnen G, Walter R, Rozynek P, Meier S, Casjens S, Mairinger FD, Wohlschläger J, Theegarten D, Weber D, Brüning T. Veränderte DNA-Methylierung in Lungentumoren als Basis für zukünftige Biomarker, 56. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (DGAUM), München, 9.-11. März 2016

Johnen G, Pesch B, Weber DG, Gawrych K, Raiko I, Rozynek P, Meier S, Brik A, Casjens S, Taeger D, Wiethage T, Aguilar-Madrid G, Brüning T. Biomarkers for early detection of asbestos-associated cancers, 31st International Congress on Occupational Health 2015 (ICOH) & MEDICHEM Minisymposium "Prevention and Management of Asbestos-Related Diseases", Seoul, Korea, 31. Mai - 6. Juni 2015

Müller A, Lanzer A, Josephs B, Brüning T, Behrens T. Einsatz eines LIMS als Biomaterial-Information-Management-System einer projektbasierten Biobank: Erfahrungen und Empfehlungen. 3. Nationales Biobanken-Symposium; Berlin, 03.- 04.12.2014. Abstraktband S. 187

Müller A, Lanzer A, Josephs B, Brüning T, Behrens T. Experiences, Considerations, and Recommendations towards the development of a web-based, customizable LIMS as a project-based Biobank-Management-System. ESBB Annual Meeting, Leipzig, 21.-24.10.2014; Abstraktband S. 94-95

Schutzrechtsanmeldungen und erteilter Schutzrechte

Es wurden keine Schutzrechtsanmeldungen als Folge der Forschungsarbeiten innerhalb des Projekts eingereicht.

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

Den Projektbeteiligten sind keine Schutzrechtsanmeldungen oder -erteilungen zur Forschungsprogrammatik seit Projektbeginn bekannt.

Wesentliche neue wissenschaftliche Erkenntnisse ergeben sich aus der neuen Klassifikation pulmonaler Adenokarzinome der IASLC, die die Alltagspraxis nachhaltig beeinflussen wird, sollte die intraoperative Diagnose per Spektroskopie genauso detailliert, aber deutlich zeitiger erbracht werden können.

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Ziel des durchgeführten Projektes war die **Identifizierung** von nicht-invasiven Biomarkern zur Früherkennung von Lungen- und Pleuratumoren für den zukünftigen Einsatz bei der Sekundärprävention. Das proteomanalytische Methodenrepertoire von PURE wurde dabei ergänzt durch epigenetische Analysen und microRNA Screenings sowie die Atemluftdiagnostik mittels Ionenmobilitätsspektrometrie. Es konnten methodenübergreifend verschiedene Markerkandidaten, die potentiell zur Früherkennung von Lungen- bzw. Pleuratumoren geeignet sind, erfolgreich identifiziert werden.

- Rekrutierungsziel erreicht und umfangreiche Probenlogistik etabliert

Im Rahmen des Projekts konnten in Zusammenarbeit zwischen WESZ und der Klinik rund 850 Probanden rekrutiert werden. Die Probennahme und Datenerfassung wurde erfolgreich in die laufende Klinik-Routine integriert. Die Zahl der Probanden war ausreichend für die geplanten Analysen und erlaubte die Entwicklung von Biomarkern zur statistisch signifikanten Identifikation von Lungentumoren, Mesotheliomen und deren Subtypen.

- Automatisierte spektrale Histopathologie erfolgreich entwickelt

Es sollte eine robuste und Nutzer-unabhängige Methode zur markerfreien Erkennung von Lungenkrebs und Mesotheliomen mittels FTIR-Imaging und umfangreicher bioinformatischer Analysen entwickelt werden. Mit der vibrationspektroskopischen Mikroskopie von Gewebedünnschnitten wurde dieses Ziel erreicht. So konnte gezeigt werden, dass eine automatisierte Erkennung anhand spektraler Biomarker für Tumorerkrankungen genutzt werden kann. Die entwickelten Methoden erreichten Genauigkeiten von über 95 %.

- Workflow zur Identifizierung von Protein-Biomarkern etabliert

Auf Grundlage der spektralen Gewebecharakterisierung mit anschließender Lasermikrodissektion, Proteomanalyse und Identifikation von differentiell exprimierten Proteinen wurden in Kooperation zwischen Biophysik, Proteomik und Bioinformatik zahlreiche neue Biomarkerkandidaten identifiziert, um Mesotheliome und deren Subtypen (epitheloide und sarkomatoide Wachstumsform) diagnostisch zu unterscheiden. Dieser Workflow kann grundsätzlich für alle Tumor-Entitäten genutzt werden, für die eine spektrale Histopathologie etabliert wurde.

- Zahlreiche Protein-Biomarker identifiziert

Mit Hilfe des neu etablierten Workflows konnten durch Proteom-Analyse von mikrodisseziertem Tumorgewebe 159 Proteine identifiziert werden, die als Markerkandidaten für Mesotheliome dienen könnten. Neben zahlreichen neuen Markern konnten auch bereits bekannte Marker gefunden werden, was darauf hindeutet, dass auch die neu gefundenen Marker plausibel sind.

- Zahlreiche Biomarker auf der Ebene der DNA-Methylierung identifiziert

Im Rahmen von epigenetischen Analysen und bioinformatischen Auswertungen konnten über 800 Markerkandidaten auf der Ebene der DNA-Methylierung zur Detektion von bösartigen Lungentumoren identifiziert werden. Ebenso wurde eine hohe Zahl an potenziellen Methylierungsmarkern für

Mesotheliome gefunden. In Kooperation zwischen Epigenetik und Pneumologie konnten in Lymphknoten-Biopsien verschiedene Lungentumoren durch spezifische Methylierungsmuster charakterisiert werden. Somit sind auch Tumorarten diagnostisch zugänglich, die normalerweise nicht operiert werden.

- Initiale Verifizierung von epigenetischen und spektralen Biomarkern in Blut und Speichel

Von den Markerkandidaten der DNA-Methylierung, die mit der höchsten statistischen Signifikanz zwischen an Lungentumoren erkrankten und nicht erkrankten Probanden unterschieden, wurden bereits einige mit einer unabhängigen Methode bestätigt und in Hinblick auf eine spätere praktische Anwendung in nicht-invasiv gewonnenen Speichel- und Blutproben verifiziert.

Im Bereich der Analyse von Körperflüssigkeiten mittel FTIR-Spektroskopie konnte die prinzipielle Unterscheidbarkeit von Patienten mit Verdacht auf Lungenkarzinom (Adeno- oder Plattenepithelkarzinom) anhand von FTIR-Absorptionsspektren von Blutproben gezeigt werden.

- Entdeckung von neuen Marker-Mustern in der Ausatemluft von Tumorpatienten

Mittels der nichtinvasiven Ionenmobilitätsspektrometrie wurde die Ausatemluft von Patienten, die mit dem Verdacht auf einen bösartigen Lungen- oder Pleuratumor in der Ruhrlandklinik aufgenommen wurden, analysiert. Die gefundenen, charakteristischen Muster werden zurzeit abschließend ausgewertet. Eine Identifikation von Asbest-typischen Mustern konnte bisher nicht bestätigt werden.

- Zahlreiche microRNA-Biomarker identifiziert

Am Institut für Pathologie erfolgte neben der pathologisch-anatomischen Charakterisierung auch eine molekulare Charakterisierung der Tumorgewebe mittels microRNA-Analysen. Es wurden spezifische microRNAs identifiziert, die zwischen Tumor und gesundem Gewebe bzw. zwischen verschiedenen Tumor-Subtypen unterscheiden können.

Somit konnten alle grundlegenden Ziele der Identifizierungs-/Discovery-Phase erreicht werden. Es steht nun eine ausreichende Zahl an erfolgversprechenden molekularen und spektralen Markern zur Verfügung, um diese in einem Folgevorhaben und für die spätere Anwendung in der arbeitsmedizinischen Praxis zu verifizieren. Für einige der neu entdeckten Marker konnte bereits gezeigt werden, dass die Entwicklung robuster Assays und eine erfolgreiche Verifizierung möglich ist.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan / Ausblick

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert noch kein konkreter Umsetzungs- und Verwertungsplan, da sich an die im Projekt durchgeführte Identifizierungsphase die Verifizierungs- und abschließend eine Validierungsphase anschließen muss, bevor die identifizierten Marker ggf. vermarktet und in der arbeitsmedizinischen Praxis eingesetzt werden können. Auf Basis des erfolgreichen Abschlusses des vorliegenden Projekts kann jedoch ein Weg skizziert werden, wie die weitere technologische Entwicklung von Markerkandidaten im Rahmen der zweiten Projektphase erfolgt und die spätere Anwendung im Rahmen der nachgehenden Vorsorge aussehen könnte.

Mit den zahlreichen in der Discovery-Phase identifizierten potentiellen Markern stehen auf der Protein-, RNA- und Methylierungs-Ebene ausreichend Kandidaten für die zweite Phase der Marker-Entwicklung, der Marker-Verifizierung, zur Verfügung. Die Verifizierung dieser potentiellen Marker sollte im nächsten Schritt mit unabhängigen Methoden und in einem unabhängigen Patienten-Kollektiv erfolgen. Ein wichtiger Aspekt für die spätere Anwendung ist hierbei die Überprüfung, ob sich die Marker auch in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten wie Blut und Speichel einsetzen lassen. Für einige der Methylierungsmarker und die FTIR-Spektroskopie deutet sich dies bereits an. Durch die Zusammenarbeit der Kooperationspartner können Synergien zwischen den verschiedenen Technologie-Plattformen und der Bioinformatik genutzt werden, um molekular breit aufgestellte Multimarker-Panels zu entwickeln, mit denen sich die Sensitivität der Tumordetektion gegenüber Einzelmarkern deutlich verbessern lässt. Durch die Analyse von Signalwegen und den Vergleich der Daten der drei molekularen Ebenen wäre auch eine pathomechanistische Verifizierung möglich, die die Plausibilität der Markerkandidaten untermauern würde.

Da sich Marker zur Früherkennung nur mit prospektiv gesammelten Proben aus Kohortenstudien abschließend validieren lassen, muss sich an die Verifizierungs- noch eine Validierungsphase anschließen. Der Aufbau einer Kohorte ist normalerweise ein langwieriger Prozess, da eine große Zahl an nicht erkrankten Hochrisiko-Probanden rekrutiert und über Jahre verfolgt wird, bis eine ausreichende Zahl an Krebsfällen aufgetreten ist. Mit der MoMar-Studie des IPA stehen jedoch Blutproben von Probanden der Zielgruppe (ehemals asbestexponierte Versicherte) zur Verfügung. Die Fallzahlen in MoMar entwickeln sich wie erwartet und sollten bis Abschluss der Studie in 2017 in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen. Eine Validierung blutbasierter Biomarker aus dem vorliegenden Projekt mit MoMar-Proben sollte daher in relativ kurzer Zeit möglich sein.

Parallel zur Verifizierung kann die Entwicklung preiswerter Assays vorangetrieben werden. Insbesondere für Protein-Marker können kostengünstige* ELISAs (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays) entwickelt werden, wie wir es für HIF1A und Survivin zeigen konnten. Im Vorfeld konnte dies bereits im Rahmen der MoMar-Studie am Beispiel des Mesotheliom-Markers Calretinin, für den am IPA ein ELISA für Serum- und Plasma-Proben entwickelt wurde, erfolgreich demonstriert werden (Raiko et al. 2010). Der Calretinin-Assay steht kurz vor der Kommerzialisierung.

Auch für epigenetische u.a. Nukleinsäure-basierte Marker wie microRNAs lassen sich kostengünstige Assays entwickeln, da Hochdurchsatzverfahren zur Sequenzierung stetig billiger werden und durch Multiplexing effizienter genutzt werden können.

Validierte und preiswerte Marker bzw. Multimarker-Panels würden dringend benötigte und für die Versicherten nicht belastende Testverfahren für die Sekundärprävention zur Verfügung stellen. Hier

bietet sich beispielsweise eine Ergänzung zu radiologischen Verfahren an, wie die hochauflösende Niedrig-Dosis-Computer-Tomographie (LD-HRCT), die derzeit von der DGUV im Rahmen einer erweiterten Vorsorge angeboten wird. Dabei könnte entweder ein Prescreening mit Biomarkern erfolgen oder die Marker könnten nach der LD-HRCT-Untersuchung bei auffälligen CT-Befunden zur Reduzierung falsch-positiver Befunde eingesetzt werden.

Preisgünstige und hinreichend spezifische Marker-Assays könnten neben einer Anwendung bei beruflich Exponierten zukünftig auch für bevölkerungsbasiertes Screening in Betracht gezogen werden.

Auch die Ergebnisse der faseroptischen Gewebsanalyse und der spektralen Körperflüssigkeitsanalyse sind derzeit noch nicht verifiziert. Sobald die Sensitivität und Spezifität der Methode in weiteren Studien geprüft sind, könnte die faseroptische Spektroskopie als „just-in-time“ und „on-site“ Diagnostik während Interventionen und Operationen angewendet werden. Durch die spektrale Histopathologie könnte somit die klassische pathologische Diagnostik ergänzt und beschleunigt werden. Dadurch könnte die vollständige Resektion im Gesunden intraoperativ bereits bestätigt werden, was Nachoperationen oder -behandlungen mit Bestrahlung oder Chemotherapie deutlich reduzieren könnte.

Um die Ergebnisse des FTIR-Imagings in die klinische Anwendung zu bringen, wurde ein Kooperationsvertrag mit der Firma Cireca Theranostics, LLC (Cambridge, MA, USA) geschlossen. Hierbei sollen die Anwendbarkeit der spektralen Histopathologie vereinfacht und das Verfahren standardisiert werden. Mit der Firma Bruker wird derzeit geprüft, ob handliche und leicht zu bedienende Spektrometer für den Einsatz direkt in der Klinik entwickelt werden können, da die derzeit in der Forschung eingesetzten Geräte für die klinische Routinediagnostik ungeeignet sind.

Langfristiges Ziel im Rahmen einer biomarkergestützten Früherkennung bleibt jedoch die Bereitstellung von einfachen, kostengünstigen und für die Versicherten nicht belastenden Testverfahren. Marker mit hinreichend guter Performance, die sich nicht- bzw. minimal-invasiv nachweisen lassen, würden einen großen Schritt in Richtung Anwendung in der arbeitsmedizinischen Praxis darstellen. Gut denkbar wäre beispielsweise eine Ergänzung von radiologischen Verfahren, wie die LD-HRCT im Rahmen des erweiterten Vorsorgeangebot der DGUV zur Früherkennung asbestverursachter Erkrankung, um die Spezifität der Tumordetektion zu verbessern.

*Kostenabschätzung: Ein kommerzieller ELISA (in Doppelbestimmung) wird pro Patient mit etwa 15 EUR, ein ELISA in Eigenherstellung mit etwa 3 EUR angesetzt.

8. Anhänge

Zitierte Publikationen:

Abe M, Hamada J, Takahashi O, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Moriuchi T (2006) Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 15: 797-802.

Arif Q, Husain AN (2015) Malignant Mesothelioma Diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 139(8):978-980.

Behrens T, Bonberg N, Casjens S, Pesch B, Brüning T (2014) A practical guide to epidemiological practice and standards in the identification and validation of diagnostic markers using a bladder cancer example. *Biochim Biophys Acta Prot Proteom* 1844:145-55.

Biscontin A, Casara S, Cagnin S, Tombolan L, Rosolen A, Lanfranchi G, De Pittà C (2010) New miRNA labeling method for bead-based quantification. *BMC Mol Biol* 16;11:44. doi: 10.1186/1471-2199-11-44.

Brenner DA, Normolle DP (2007) Biomarkers for cancer risk, early detection, and prognosis: the validation conundrum, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 1918–1920.

Carvalho RH, Haberle V, Hou J, van Gent T, Thongjuea S, van Ijcken W, Kockx C, Brouwer R, Rijkers E, Sieuwerts A, Foekens J, van Vroonhoven M, Aerts J, Grosveld F, Lenhard B, Philipsen S (2012) Genome-wide DNA methylation profiling of non-small cell lung carcinomas. *Epigenetics Chromatin* 5: 9.

Carvalho RH, Hou J, Haberle V, Aerts J, Grosveld F, Lenhard B, Philipsen S (2013) Genomewide DNA methylation analysis identifies novel methylated genes in non-small-cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol* 8: 562-573.

Cassidy A, Myles JP, Liloglou T, Duffy SW, Field JK (2006): Defining high-risk individuals in a population-based molecular-epidemiological study of lung cancer, *Int J Oncol* 28: 1295-1301.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18(10):997-1006. doi: 10.1038/cr.2008.282.

Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (2014): DGUV-Statistiken für die Praxis 2014, Berlin.

Dogliani C, Dei Tos AP, Laurino L, Iuzzolino P, Chiarelli C, Celio MR, Viale G (1996) Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 20(9):1037-1046.

Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB (2010) Future of personalized medicine in oncology: a systems biology approach. *J Clin Oncol* 28: 2777-2783.

Großerüschkamp F, Kallenbach-Thieltges A, Behrens T, Brüning T, Altmayer M, Stamatis G, Theegarten D, Gerwert K (2015). Marker-free automated histopathological annotation of lung tumour subtypes by FTIR-Imaging. *Analyst* 140(7):2114-20.

Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG, Knuutila S (2009) CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 48(7):615-23. doi: 10.1002/gcc.20669.

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-74.

Lan X, Adams C, Landers M, Dudas M, Krissinger D, Marnellos G, Bonneville R, Xu M, Wang J, Huang TH, Meredith G, Jin VX (2011) High resolution detection and analysis of CpG dinucleotides methylation using MBD-Seq technology. *PLoS One* 6: e22226.

Lechner JF, Fugaro JM, Wong Y, Pass HI, Harris CC, Belinsky SA (2001) Perspective: cell differentiation theory may advance early detection of and therapy for lung cancer. *Radiat Res* 155: 235-238.

Li N, Ye M, Li Y, Yan Z, Butcher LM, Sun J, Han X, Chen Q, Zhang X, Wang J (2010) Whole genome DNA methylation analysis based on high throughput sequencing technology. *Methods* 52: 203-212.

Lienhard M, Grimm C, Morkel M, Herwig R, Chavez L (2014) MEDIPS: genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments. *Bioinformatics*. 2014;30(2):284-286. doi:10.1093/bioinformatics/btt650.

Mairinger FD, Ting S, Werner R, Walter RF, Hager T, Vollbrecht C, Christoph D, Worm K, Mairinger T, Sheu-Grabellus SY, Theegarten D, Schmid KW, Wohlschlaeger J (2014) Different micro-RNA expression profiles distinguish subtypes of neuroendocrine tumors of the lung: results of a profiling study. *Mod Pathol*. 2014; 27(12):1632-40.

Mather JP, Roberts PE, Pan Z, Chen F, Hooley J, Young P, Xu X, Smith DH, Easton A, Li P, Bonvini E, Koenig S, Moore PA (2013) Isolation of cancer stem like cells from human adenosquamous carcinoma of the lung supports a monoclonal origin from a multipotential tissue stem cell. *PLoS One* 8: e79456.

Meyer HE, Stühler K (2007) High-performance proteomics as a tool in biomarker discovery. *Proteomics* 7 (Suppl 1):18-26.

Mölleken C, Sitek B, Henkel C, Poschmann G, Sipos B, Wiese S, Warscheid B, Broelsch C, Reiser M, Friedman SL, Tornøe I, Schlosser A, Klöppel G, Schmiegel W, Meyer HE, Holmskov U, Stühler K (2009) Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis. *Hepatology* 49(4):1257-66. doi: 10.1002/hep.22764.

Nymark P, Guled M, Borze I, Faisal A, Lahti L, Salmenkivi K, Kettunen E, Anttila S, Knuutila S. (2011) Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 50(8):585-97. doi: 10.1002/gcc.20880. Epub 2011 May 11.

Ollesch J, Drees SL, Heise HM, Behrens T, Brüning T, Gerwert K (2013). FTIR spectroscopy of biofluids revisited: an automated approach to spectral biomarker identification. *Analyst* 138(14):4092-4102.

Ollesch J, Heinze M, Heise HM, Behrens T, Brüning T, Gerwert K (2014). It's in your blood: spectral biomarker candidates for urinary bladder cancer from automated FTIR spectroscopy. *J Biophotonics* 7(3-4):210-21.

Ordenez NG (2007) What are the current best immunohistochemical markers for the diagnosis of epithelioid mesothelioma? A review and update. *Hum Pathol* 38(1):1-16.

Pepe MS, Feng Z, Janes H, Bossuyt PM, Potter JD (2008) Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *J Natl Cancer Inst*. 100: 1432–1438.

Pesch B, Brüning T, Johnen G, Casjens S, Bonberg N, Taeger D, Müller A, Weber DG, Behrens T (2014) Biomarker research with prospective study designs for the early detection of cancer. *Biochim Biophys Acta Prot Proteom* 1844(5): 874–83

Poschmann G, Sitek B, Sipos B, Ulrich A, Wiese S, Stephan C, Warscheid B, Klöppel G, Vander Borcht A, Ramaekers FC, Meyer HE, Stühler K (2009) Identification of proteomic differences between squamous cell carcinoma of the lung and bronchial epithelium. *Mol Cell Proteomics* 8(5):1105-16.

Raiko I, Sander I, Weber DG, Raulf-Heimsoth M, Gillissen A, Kollmeier J, Scherpereel A, Brüning T, Johnen G (2010) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human calretinin in plasma and serum of mesothelioma patients. *BMC Cancer* 10:242-249

Rauch TA, Zhong X, Wu X, Wang M, Kernstine KH, Wang Z, Riggs AD, Pfeifer GP (2008) High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 252-257.

Rauch TA, Wang Z, Wu X, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP (2012) DNA methylation biomarkers for lung cancer. *Tumour Biol* 33: 287-296.

RKI (2010): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin.

Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC (2010) Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 31(1):37-49. doi: 10.1093/carcin/bgp272. Epub 2009 Dec 2.

Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S, Sheu SY, Suttorp AC, Seggewiss J, Willscher E, Walz MK, Worm K, Schmid KW (2011) Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *J Clin Pathol* 64(6):529-35.

Schwertheim S, Sheu SY, Worm K, Grabellus F, Schmid KW (2009) Analysis of deregulated miRNAs is helpful to distinguish poorly differentiated thyroid carcinoma from papillary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res* 41(6):475-81.

Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Worm K, Broecker-Preuss M, Schmid KW (2010) Differential miRNA expression profiles in variants of papillary thyroid carcinoma and encapsulated follicular thyroid tumours. *Br J Cancer* 102(2):376-82. doi: 10.1038/sj.bjc.6605493. Epub 2009 Dec 22.

Sheu SY, Vogel E, Worm K, Grabellus F, Schwertheim S, Schmid KW (2010) Hyalinizing trabecular tumour of the thyroid-differential expression of distinct miRNAs compared with papillary thyroid carcinoma. *Histopathology* 56(5):632-40. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03526.x.

Sheu SY, Schmid KW. (2010) Multiple endocrine neoplasia type 2. *Pathologe* 31(6):449-54.

Skinner ME, Uzilov AV, Stein LD, Mungall CJ, Holmes IH (2009) JBrowse: a next-generation genome browser. *Genome Res* 19(9):1630-8.

Stricker T, Catenacci DV, Seiwert TY (2011) Molecular profiling of cancer – the future of personalized cancer medicine: a primer on cancer biology and the tools necessary to bring molecular testing to the clinic. *Semin Oncol* 38: 173-185.

Tan E, Warren N, Darnton AJ, Hodgson JT (2010) Projection of mesothelioma mortality in Britain using Bayesian methods. *Br J Cancer* 103: 430-436.

Walter RF, Werner R, Ting S, Vollbrecht C, Theegarten D, Christoph DC, Schmid KW, Wohlschlaeger J, Mairinger FD (2015) Identification of deregulation of apoptosis and cell cycle in neuroendocrine tumors of the lung via NanoString nCounter expression analysis. *Oncotarget*. May 4. (Epub ahead of print) PMID: 26008974.

Wohlschläger J, Wittekind C, Theegarten D (2010) Die neue TNM Klassifikation der malignen Lungentumoren. *Pathologe* 31: 355-60.

Wu X, Piper-Hunter MG, Crawford M, Nuovo GJ, Marsh CB, Otterson GA, Nana-Sinkam SP. (2009) MicroRNAs in the pathogenesis of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 4(8):1028-34.

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Projektnummer: FP-0339

Titel: Entwicklung proteinanalytischer Verfahren zur Identifikation von Kandidatenmarkern zur Unterstützung der (Früh-)Diagnose asbestassoziierter Lungen- und Pleuratumoren

Erklärung für das Berichtswesen in Kooperationsprojekten

Hiermit erklären die Unterzeichnenden, dass der zum 11.11.2015 vorgelegte

Abschlussbericht mit allen Kooperationspartnern abgestimmt ist.



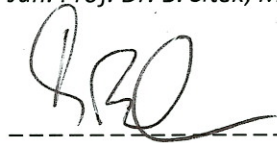
Datum: 13.11.2015

Prof. Dr. K. Gerwert, Sprecher des Europäischen Proteinforschungszentrums PURE und Leiter des Lehrstuhls für Biophysik, RUB



Datum: 13.11.15

Jun. Prof. Dr. B. Sitek, Medizinisches Proteom-Center, RUB



Datum: 13.11.15

Prof. Dr. T. Behrens, Wissenschaftlich-Epidemiologisches Studienzentrum PURE, RUB

_____ Datum:

Prof. Dr. K.-W. Schmid, Direktor des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Essen

_____ Datum:

Prof. Dr. D. Theegarten, Arbeitsgruppenleiter, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Essen

_____ Datum:

Prof. Dr. G. Stamatis, Chefarzt der Abteilung für Thoraxchirurgie und thorakale Endoskopie, Ruhlandklinik Essen

----- Datum:

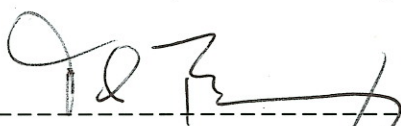
Dr. M. Altmayer, Ruhlandklinik Essen

----- Datum:

Prof. Dr. L. Freitag, Chefarzt der Abteilung für interventionelle Pneumologie, Ruhlandklinik Essen

----- Datum:

Dr. K. Darwiche, Ruhlandklinik Essen



----- Datum: *13.11.2015*

Prof. Dr. med. T. Brüning, Direktor des Instituts für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der RUB

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Projektnummer: FP-0339

Titel: Entwicklung proteomanalytischer Verfahren zur Identifikation von Kandidatenmarkern zur Unterstützung der (Früh-)Diagnose asbestassoziierter Lungen- und Pleuratumoren

Erklärung für das Berichtswesen in Kooperationsprojekten

Hiermit erklären die Unterzeichnenden, dass der zum 11.11.2015 vorgelegte

Abschlussbericht mit allen Kooperationspartnern abgestimmt ist.

----- Datum:

Prof. Dr. K. Gerwert, Sprecher des Europäischen Proteinforschungszentrums PURE und Leiter des Lehrstuhls für Biophysik, RUB

----- Datum:

Jun. Prof. Dr. B. Sitek, Medizinisches Proteom-Center, RUB

----- Datum:

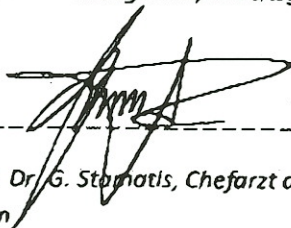
Prof. Dr. T. Behrens, Wissenschaftlich-Epidemiologisches Studienzentrum PURE, RUB

----- Datum:

Prof. Dr. K.-W. Schmid, Direktor des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Essen

----- Datum:

Prof. Dr. D. Theegarten, Arbeitsgruppenleiter, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Essen



----- Datum:

17/11/2015

Prof. Dr. G. Stomatidis, Chefarzt der Abteilung für Thoraxchirurgie und thorakale Endoskopie, Ruhlandklinik Essen

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Projektnummer: FP-0339

Titel: Entwicklung proteinanalytischer Verfahren zur Identifikation von Kandidatenmarkern zur Unterstützung der (Früh-)Diagnose asbestassoziiierter Lungen- und Pleuratumoren

Erklärung für das Berichtswesen in Kooperationsprojekten

Hiermit erklären die Unterzeichnenden, dass der zum 11.11.2015 vorgelegte

Abschlussbericht mit allen Kooperationspartnern abgestimmt ist.

----- Datum:

Prof. Dr. K. Gerwert, Sprecher des Europäischen Proteinforschungszentrums PURE und Leiter des Lehrstuhls für Biophysik, RUB

----- Datum:

Jun. Prof. Dr. B. Sitek, Medizinisches Proteom-Center, RUB

----- Datum:

Prof. Dr. T. Behrens, Wissenschaftlich-Epidemiologisches Studienzentrum PURE, RUB


----- Datum:

Prof. Dr. K.-W. Schmid, Direktor des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Essen


----- Datum:

Prof. Dr. D. Theegarten, Arbeitsgruppenleiter, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Essen

----- Datum:

Prof. Dr. G. Stamatidis, Chefarzt der Abteilung für Thoraxchirurgie und thorakale Endoskopie, Ruhlandklinik Essen

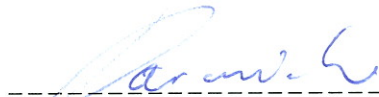
----- Datum:

Dr. M. Altmayer, Ruhlandklinik Essen



----- Datum: *19.11.15*

Prof. Dr. L. Freitag, Chefarzt der Abteilung für interventionelle Pneumologie, Ruhlandklinik Essen



----- Datum: *17/11/15*

Dr. K. Darwiche, Ruhlandklinik Essen

----- Datum:

*Prof. Dr. med. T. Brüning, Direktor des Instituts für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen
Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der RUB*