

Quantifizierung von *SHOX2*-DNA-Methylierung als eine adjuvante Methode zur Diagnostik von primären und metastasierten malignen Neoplasien der Pleura und der Lunge

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

L. Peter Ilse
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Oktober 2016

aus dem Institut für Pathologie - Funktionsbereich Cytopathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Wesselborg

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

L. Peter Ilse

Düsseldorf, den 10. Oktober 2016

Inhaltsverzeichnis

Allgemeine Einleitung	1
Anatomie und Physiologie von Lunge und Pleura	1
Maligne und benigne Tumore	2
Maligne Tumore der Lunge	4
Maligne Tumore der Pleura	6
DNA-Methylierung	8
Nomenklatur der Gennamen	9
Biomarker auf der Basis von DNA-Methylierung in der Tumordiagnostik	9
<i>SHOX2</i>	10
<i>APC</i>	24
<i>RASSF1A</i>	25
<i>CDKN2A (p16^{INK4A})</i>	26
Morphologische Tumordiagnostik an Gewebe- und Zellproben	27
Morphologische Methoden	27
Adjuvante Methoden	29
Exkurs zur Statistik	31
Vermeidung von Fehlern in der Datenverarbeitung	35
Ausblick auf zukünftige Entwicklungen	36
Pleuraergüsse als Modellsystem zum Testen von Tumormarkern	36
Entwicklung einer Vorsorgeuntersuchung für maligne Tumore unter Einbeziehung des <i>SHOX2</i> -Methylierungs-Markers	38
Thesen	42

Publication I.....	43
<i>SHOX2</i> DNA Methylation Is a Tumour Marker in Pleural Effusions	43
Abstract.....	44
Introduction	44
Materials and Methods.....	46
Results	49
Discussion	55
Conclusion	58
Acknowledgments.....	58
Beitrag des Autors	59
Publication II.....	61
Analysis of <i>SHOX2</i> Methylation as an Aid to Cytology in Lung Cancer Diagnosis	61
Abstract.....	62
Introduction	62
Materials and Methods.....	64
Results	66
Discussion	74
Conclusion	78
Acknowledgments.....	78
Declaration of Interests	79
Beitrag des Autors	80
Zusammenfassung.....	82
Summary	84
Literaturverzeichnis	86
Danksagung	105

Allgemeine Einleitung

Anatomie und Physiologie von Lunge und Pleura

Die Lunge ist ein Organ, das dem Gasaustausch zwischen Atemluft und Blut dient. Beim ausgewachsenen Menschen hat sie im Zustand starker Ausatmung eine Oberfläche von ca. 40 m². Bei ruhiger Einatmung erweitert sich die Oberfläche auf 55-80 m². Die Haut des Menschen hat zum Vergleich nur ca. 1,6 m² Oberfläche. Die Lunge besitzt keine „eigenen“ Muskeln, die sie expandieren oder zusammendrücken. Sie wird durch die Bewegungen des Zwerchfells und des Brustkorbes mit aufgespannt und zusammengedrückt. Die einzelnen Lungenflügel sind jedoch nicht direkt mit Zwerchfell und Brustkorb verwachsen. Stattdessen haften sie jeweils an einer glatten dünnen serösen Haut, der *Pleura visceralis*. Die Innenseite des Brustkorbs und die craniale Seite des Zwerchfells haften ebenfalls an einer solchen Haut, der *Pleura parietalis*. Die *Pleura visceralis* und die *Pleura parietalis* gehen an ihren Rändern ineinander über. Im restlichen Bereich sind sie durch einen kleinen, flüssigkeitsgefüllten Spalt (Pleuraspalt) voneinander getrennt. (Frick *et al.*, 1987) Der Pleuraspalt ist beim gesunden Erwachsenen mit wenigen Millilitern (5-20 ml) (Feichter und Dalquen, 2000) seröser Flüssigkeit gefüllt, die häufig ausgetauscht wird. Da Flüssigkeiten weder dehnbar noch kompressibel sind, werden die *Pleura visceralis* und die *Pleura parietalis* durch die Pleuraflüssigkeit verschiebbar aneinander geheftet. Somit dient die Pleura der gleitend gelagerten Übertragung der Atembewegungen von Brustkorb und Zwerchfell auf die Lunge. (Frick *et al.*, 1987)

Wird der Pleuraspalt von außen oder innen so verletzt, dass Luft einströmen kann, zieht sich die Lunge auf etwa ein Drittel ihrer ursprünglichen Größe zusammen und kann den Atembewegungen von Zwerchfell und Brustkorb nicht mehr folgen (*Pneumothorax*). (Frick *et al.*, 1987) Die Atmung wird ebenfalls beeinträchtigt, wenn sich größere Mengen seröser Flüssigkeit im Pleuraraum ansammeln. Je mehr Flüssigkeit sich bei einem solchen

Pleuraerguss (*Hydrothorax*) ansammelt, desto weniger Raum bleibt zur Expansion der Lunge. Die Ansammlung der Flüssigkeit kann unterschiedliche Ursachen haben. So werden in einer Studie an Patienten in den USA, die mithilfe einer Pleurapunktion untersucht wurden, die drei häufigsten Ursachen von Pleuraergüssen wie folgt angegeben (Light, 2002):

- Herzinsuffizienz mit 36,8 % (500.000/1.360.000)
- Pneumonien mit 22,1 % (300.000/1.360.000)
- Krebs mit 14,7 % (200 000/1.360.000)

Andere Studien geben die Häufigkeit eines malignen Pleuraergusses mit 25 % (Bedrossian, 1994) bis 45 % (Motherby *et al.*, 1999) an. In unserer Studie an Pleuraergüssen war in 37 % der Fälle ein maligner Tumor die Ursache des Pleuraergusses (Ilse *et al.*, 2013). Klinisch können Pleuraergüsse in Abhängigkeit von den konkreten Beschwerden des Patienten durch Punktion oder Drainage abgezogen werden, um dem Patienten die Atmung wieder zu erleichtern. In anderen Fällen kann die Punktion auch rein diagnostischer Natur sein. Zur ursächlichen Abklärung wird empfohlen, die so erhaltene Flüssigkeit zur mikrobiologischen, laborchemischen und zytologischen Untersuchung zu schicken. (Kasper *et al.*, 2005; Light, 2002; Riede *et al.*, 2004)

Maligne und benigne Tumore

Ein Tumor ist im weiteren Sinne zunächst nur die Umschreibung der Volumenzunahme eines Gewebes, gleichgültig wie sie zustande gekommen ist. Im engeren Sinne hingegen bezeichnet der Begriff des Tumors eine abnorme Gewebemasse, die auf eine fortschreitende und übermäßige zelluläre Proliferation zurückgeht und sich weder strukturell noch funktionell in das Normalgewebe eingliedert. Tumor, Geschwulst und Neoplasie (= Neubildung) können synonym verwendet werden, sagen allerdings nichts über das biologische Verhalten (Dignität) aus. Diesbezüglich unterscheidet man zwischen benignen (gutartigen) Tumoren und malignen (bösartigen) Tumoren. (Riede *et al.*, 2004)

Ein benigner Tumor ist gekennzeichnet durch langsames, verdrängendes Wachstum, welches das benachbarte Gewebe allmählich komprimiert. Histologisch bestehen benigne Tumore aus einem meist abgekapselten, gut differenzierten Gewebe mit hoher Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe. Die Tumorzellen bilden eine monomorphe Zellpopulation mit ähnlicher Zell- und Zellkerngröße. Nekrosen (Abgestorbene Zellen und Zellverbände) innerhalb des Tumors sind sehr selten. (Riede *et al.*, 2004)

Maligne Tumore (häufig auch unter dem Begriff „Krebs“ zusammengefasst) wachsen charakteristischer Weise in die unmittelbare Tumorumgebung ein (Infiltration) und zerstören sowohl deren histologische als auch makroskopische Ordnung (Destruktion). Des Weiteren können sie in Lymph- und/oder Blutgefäße eindringen, in andere Organe gelangen und gegebenenfalls auch dort anwachsen (Metastasierung). Manche Tumorentitäten neigen außerdem dazu, sich entlang histologischer Leitstrukturen auszubreiten (z.B. Nervenscheiden). Histologisch bestehen maligne Tumore aus einem Gewebe, das je nach Differenzierungsgrad mehr oder weniger dem Ursprungsgewebe gleicht. Die Zellen des Tumorgewebes sind gerade bei geringerer Differenzierung polymorph. Sie weisen häufig unterschiedliche Zell- und Zellkerngrößen auf. Die Kern-Plasma-Relation ist häufig zu Gunsten des Kerns verschoben. Das Chromatin erscheint unregelmäßig (Heterochromasie). Es sind Mitosen zu beobachten. Darüber hinaus können die Kernkörperchen (Nukleolen) plump vergrößert erscheinen. Nicht selten weisen maligne Tumore zum Teil flächige Nekrosen auf. (Riede *et al.*, 2004)

Die intensive Erforschung von malignen Tumoren geht bereits auf das Ende des vorletzten Jahrhunderts zurück. So fragte der englische Chirurg Stephen Paget bereits 1889 nach der Ursache für die Ausbreitung einer Krebserkrankung. Seine Theorie, dass es sich mit Krebs ähnlich verhält wie mit Pflanzen, deren Samen sich in alle Richtungen verbreiten und dort anwachsen, hat bis heute Bestand und wird als Metastasierung bezeichnet. (Paget, 1889) Im Jahr 2006 veröffentlichte die Nature Publishing Group eine Zusammenfassung über die Meilensteine der Krebsforschung. Dort wurde Pagets Metastasierungstheorie als der erste von 24 Meilensteinen der

modernen Krebsforschung bezeichnet. (Dell, 2006) Heutzutage sprechen einige Beobachtungen an menschlichen Tumoren und an Mausmodellen dafür, die Entstehung und die Weiterentwicklung eines malignen Tumors als einen Evolutionsprozess zu betrachten, der sich analog zur Evolution nach Darwin verhält. Beim Fortschreiten dieses Evolutionsprozesses wandeln sich normale menschliche Zellen mit fortschreitender Zahl genetischer Veränderungen in Krebszellen um. (Hanahan und Weinberg, 2000) Im Laufe dieser Veränderungen erwerben die Krebszellen auf unterschiedliche Weise bestimmte, sie kennzeichnende Eigenschaften. Im Jahr 2000 grenzten Hanahan und Weinberg diese noch auf sechs essentielle Eigenschaften ein. Diese Eigenschaften sind das Aufrechterhalten von Proliferationssignalen, das Vermeiden von wachstumsunterdrückenden Signalen, der Widerstand gegen den Zelltod, die Befähigung zu replikativer Unsterblichkeit, die Induzierung von Angiogenese und die Kombination von der Fähigkeit zum Eindringen in andere Gewebe (Invasion) mit der Fähigkeit dort anzuwachsen (Metastasierung). (Hanahan und Weinberg, 2000) Im Jahr 2011 erweiterten Hanahan und Weinberg diese im Jahr 2000 von ihnen postulierten kennzeichnenden Eigenschaften um zwei weitere Eigenschaften. Diese Eigenschaften sind die Umprogrammierung des Energiemetabolismus und die Vermeidung der Zerstörung durch die Immunabwehr. (Hanahan und Weinberg, 2011) Darüber hinaus stellten sie erneut klar, dass ein maligner Tumor mehr sei als eine Masse proliferierender Krebszellen. Es handele sich viel eher um ein komplexes Gewebe, in dem auch normale Zellen für die Ausbildung des entstehenden Tumors rekrutiert werden. (Hanahan und Weinberg, 2011)

Maligne Tumore der Lunge

Nach den aktuellen Vorgaben der WHO von 2015 werden zwar über 70 verschiedene lungeneigene Tumore unterschieden (Travis *et al.*, 2015), aus epidemiologischer Sicht spielen von ihrer Inzidenz und Prävalenz her aber nur die malignen epithelialen Tumore, d.h. die Karzinome, eine wirkliche Rolle in der klinischen Medizin. Sie werden unter dem Oberbegriff des

Bronchialkarzinoms bzw. synonym unter dem Oberbegriff des Lungenkarzinoms zusammengefasst. (Riede *et al.*, 2004) Entsprechend den Hauptdifferenzierungen des Bronchialepithels können Bronchialkarzinome plattenepithelialen, adenomatösen oder neuroendokrinen Ursprungs sein. Teilweise können auch verschiedene Abschnitte eines Tumors den unterschiedlichen Differenzierungen zugeordnet werden. In einigen Fällen werden sogar alle für die Differenzierung betrachteten Marker innerhalb einer Tumorzelle koexprimiert. (Feichter und Dalquen, 2000)

Bei der Erstdiagnostik werden kleine Gewebe- oder Zellproben meist im Rahmen einer Lungenspiegelung entnommen und mikroskopisch untersucht. Die Artdiagnose eines Tumors bis ins letzte Detail ist hierbei oft, aber nicht immer möglich. Daher erfolgt die Klassifikation so weit wie möglich. Es wird jedoch versucht, mindestens die therapeutisch relevanten Gruppen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) und des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) zu unterscheiden, wobei letztere, wenn möglich, weiter in Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome klassifiziert werden sollten. (Feichter und Dalquen, 2000; Goeckenjan *et al.*, 2011)

Weltweit sind Bronchialkarzinome seit einigen Jahrzehnten die häufigsten malignen Tumore des Menschen. Für das Jahr 2008 wird der Anteil der Bronchialkarzinome an den gesamten Neuerkrankungen durch maligne Tumore auf 12,7 % (1.608.000/12.677.000) geschätzt. Männer (1.095.000) erkrankten dabei etwa doppelt so häufig an einem Bronchialkarzinom wie Frauen (513.000). Mit einem Anteil von 18,2 % (1.378.000/7.571.000) ist das Bronchialkarzinom auch für die meisten Tode durch maligne Tumore verantwortlich. In besser entwickelten Ländern (Nach Definition der zitierten Studie sind dies: Nordamerika, Europa, Russland, Japan, Australien und Neuseeland.) ist das Bronchialkarzinom mit 13,0 % (724.300/5.570.300) nur noch der am zweithäufigsten diagnostizierte Tumor, direkt nach dem Kolonkarzinom 13,1 % (727.400/5.570.300). Dennoch ist das Bronchialkarzinom auch in dieser Region der tödlichste Tumor mit einem Anteil von 21,8 % (600.400/2.751.400) an allen durch Krebs verursachten Toden. (Ferlay *et al.*, 2010) In Deutschland ist Lungenkrebs mit 11,0 % (52.520/477.950) sogar nur der am vierthäufigsten diagnostizierte maligne Tumor im Jahr 2012. Im

Gegensatz zu den in Deutschland häufiger diagnostizierten Brustdrüsenkrebs 14,7 % (70.170/477.950), Prostatakrebs 13,3 % (63.710/477.950) und Darmkrebs 13,0 % (62.230/477.950) existiert für das Lungenkarzinom derzeit keine etablierte Vorsorgeuntersuchung. Das Lungenkarzinom wird somit meistens erst in weiter fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Da die Heilungschance eines malignen Tumors mit dem Fortschreiten der Erkrankung sinkt, ist es nicht verwunderlich, dass Lungenkrebs mit 20,1 % (44.465/220.923) auch in Deutschland den größten Anteil an den durch Krebs verursachten Toden hat. Der am häufigsten diagnostizierte Brustdrüsenkrebs hat hingegen nur einen Anteil von 8,1 % (17.898/220.923) an den durch Krebs verursachten Toden. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 16 % bei Männern und 21 % bei Frauen ist die Prognose von Lungenkrebs somit deutlich schlechter als die von Prostatakrebs (93 %), Brustdrüsenkrebs (78 % bei Männern und 88 % bei Frauen) und Darmkrebs (58 % bei Männern und 61 % bei Frauen). (Kaatsch *et al.*, 2015)

Zu den aus der Lunge stammenden Tumoren kommen noch die Lungenmetastasen von Tumoren aus anderen Regionen des Körpers hinzu. Nahezu die Hälfte aller bösartigen Tumore metastasiert in fortgeschrittenen Stadien in die Lunge. Besonders häufig finden sich Lungenmetastasen bei Mammakarzinomen, kolorektalen Karzinomen und Nierenzellkarzinomen. Möglich sind sie auch bei Lungenkarzinomen, wobei die Unterscheidung zwischen einem zweiten Primärtumor und einer Lungenmetastase des bereits bekannten Primärtumors klinisch-bildgebend nicht immer möglich ist und auch im Vergleich der Histologie nicht immer gelingt. (Riede *et al.*, 2004) Aus den Daten von Abrams *et al.*, Kaatsch *et al.* und Seo *et al.* lässt sich ableiten, dass auf einen Primärtumor der Lunge in etwa 1,5 Lungenmetastasen kommen. (Abrams *et al.*, 1950; Kaatsch *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2001)

Maligne Tumore der Pleura

Für die Klassifikation von Tumoren der Pleura nennt die WHO aktuell rund 20 verschiedene pleuraeigene Tumore (Travis *et al.*, 2015), darunter auch maligne

Entitäten. Aus epidemiologischer Sicht ist von diesen ausschließlich das maligne Mesotheliom von Belang, eine Tumorentität, die auf die maligne Entartung der die Pleurahöhle auskleidenden Mesothelien zurückgeht. Klinisch manifestieren sich maligne Tumore der Pleura in erster Linie durch die Bildung eines Pleuraergusses. Der Erguss entsteht dabei sowohl durch die Blockade des Lymphabflusses und die perifokale Entzündung, als auch durch Sekretionsleistungen der Tumorzellen. (Feichter und Dalquen, 2000)

Der Primärtumor der Pleura, das maligne Mesotheliom, wird vom Robert Koch Institut nicht nach Lokalität getrennt aufgelistet. Allerdings wird dort angegeben, dass die häufigste Lokalität des malignen Mesothelioms mit ca. 90 % die Pleura ist. Maligne Mesotheliome stehen in aller Regel mit einem langjährigen beruflichen Kontakt mit dem inzwischen in Deutschland verbotenen Werkstoff Asbest in Zusammenhang. So werden etwa 900 neue Erkrankungsfälle jährlich von den Berufsgenossenschaften, die als gesetzliche Unfallversicherung Berufskrankheiten und Arbeitsunfälle entschädigen, anerkannt. Im Jahr 2012 belief sich die Zahl der Neuerkrankungen des malignen Mesothelioms auf 1560 Fälle. Mit 0,3 % (1.560/477.950) der gesamten Krebsneuerkrankungen ist das maligne Mesotheliom eine deutlich seltenere Krebserkrankung als der Lungenkrebs (11 %). Allerdings ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit 9 % bei Männern und 17 % bei Frauen noch schlechter als die Prognose bei Lungenkrebs. (Kaatsch *et al.*, 2015)

In der Pleura gefundene Tumore sind nur in Ausnahmefällen Primärtumore der Pleura. Auf einen Primärtumor der Pleura kommen etwa 50 Pleurametastasen. (Scherpereel, 2007) Dies spiegelt sich auch in unserer Studie an Pleuraergüssen wider, bei der für jedes Mesotheliom rund 42 nicht Mesotheliome identifiziert wurden (11/472). (Ilse *et al.*, 2013) Die meisten dieser sekundären Tumore stammen von einem Primärtumor der Lunge oder der Brust (Mamma). (Scherpereel, 2007) In unserer Studie sind im Weiteren Tumore des Gastrointestinaltraktes, Lymphome und Leukämien als Ursachen der Pleurametastase identifiziert worden. (Ilse *et al.*, 2013)

DNA-Methylierung

Wie bei allen Vertebraten wird die DNA des Menschen nur am Cytosinrest methyliert. Durch die Methylierung eines Cytosinrestes wird quasi eine fünfte Base, das 5-Methylcytosin, gebildet. Bei Wirbeltieren werden nur Cytosinreste methyliert, wenn auf das Cytidin in 5' → 3' Richtung ein Guanodin folgt. Vereinfachend wird von einem „CpG-Dinukleotid“ gesprochen. Sowohl Cytosin als auch 5-Methylcytosin können in der Zelle durch Hydrolysierung spontan desaminieren. Cytosin wird hierdurch in den RNA-typischen Rest Uracil umgewandelt. Eine solche Umwandlung wird vom DNA-Korrekturmechanismus erkannt und repariert. 5-Methylcytosin hingegen wird in Thymin umgewandelt und ist, da Thymin eine DNA-typische Base ist, für den DNA-Reparaturmechanismus nicht mehr als Fehler zu erkennen. Da Cytosine nur innerhalb einer CpG-Folge methyliert werden und nur methylierte Cytosine durch spontane Desaminierung verloren gehen können, enthalten die Genome von Mensch und Maus nur etwa 20 % der CpG-Folgen, die statistisch zu erwarten wären. Es gibt DNA-Regionen, die vor diesem Hintergrund eine starke Häufung von CpG-Folgen aufweisen. Sie werden als CpG-Inseln bezeichnet und können zwischen einigen Dutzend und einigen hundert Basenpaaren lang sein. CpG-Inseln treten stromaufwärts von mehr als 50 % aller menschlichen Gene auf. Die Cytosine in diesen Inseln sind bei aktiv transkribierten Genen oder bei Genen, die zur Expression bereit sind, nicht methyliert. Die Methylierung der DNA wirkt sich negativ auf die Expression eines folgenden Gens aus. Zum einen führt die Methylgruppe selbst durch sterische Hinderung zu einer schlechteren Bindung von Transkriptionsfaktoren. Im Weiteren fördert sie die Bindung von Proteinen mit einer Affinität für methylierte DNA. Letztere führen den Kontakt zu weiteren Proteinen herbei, welche eine Verdichtung des Chromatins vermitteln. (Knippers, 2006)

Dass zwischen menschlichem Tumorgewebe und Nicht-Tumorgewebe unterschiedliche Methylierungsmuster bestehen, wurde schon im Jahr 1983 von Feinberg und Vogelstein berichtet. (Feinberg und Vogelstein, 1983) Seitdem ist die Erforschung von aberranter DNA-Methylierung in verschiedenen komplexen Krankheiten explosionsartig angewachsen. (Paska und Hudler, 2015)

Nomenklatur der Gennamen

In der vorliegenden Arbeit findet die im Folgenden beschriebene Nomenklatur Verwendung: Entsprechend der Richtlinien des „Human Genome Organisation (HUGO) Gene Nomenclature Committee“ (HGNC) werden Gensymbole eines menschlichen Gens durchgehend in Großbuchstaben geschrieben. (Wain *et al.*, 2002) Im Gegensatz dazu werden bei Gensymbolen, die Gene der Maus betreffen, nur die jeweils ersten Buchstaben großgeschrieben. Alle darauffolgenden Buchstaben werden kleingeschrieben. Dies erfolgt entsprechend der Richtlinien für die Nomenklatur von Genen der Maus, welche durch das MGI (Mouse Genome Informatics) veröffentlicht wurden. (Eppig *et al.*, 2015) Gensymbole von anderen Lebewesen werden entsprechend der Nomenklatur für die Maus geschrieben. Sofern die Spezies nicht direkt aus dem Zusammenhang ersichtlich ist und es sich nicht um das Mausgen handelt, wird das Gensymbol um den in Klammern gesetzten Namen der Spezies ergänzt. Der Empfehlung des HGNC folgend werden Gensymbole kursiv geschrieben, wenn sich das Symbol auf eine DNA-Sequenz bezieht. Bezieht sich das Symbol auf ein Protein, wird das Symbol nicht kursiv geschrieben. (Gray *et al.*, 2015) In den im Rahmen dieser Arbeit erstellten Publikationen wurde für das *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)* alias *p16* und *p16^{INK4A}* eine Ausnahme von dieser Nomenklatur gemacht. Um den direkten Bezug zu der vorher gehenden Studie aus unserem Institut von Schramm *et al.* von 2011 (Schramm *et al.*, 2011) zu erhalten, wurde in der Publikation das Synonym *p16^{INK4A}* verwendet.

Biomarker auf der Basis von DNA-Methylierung in der Tumordiagnostik

Seit den letzten zwei Dekaden wurde das Potential veränderter DNA-Methylierungsmerkmale als Biomarker für die Krebsdiagnostik untersucht. Obwohl aus diesen Untersuchungen eine große Anzahl potentieller Marker hervorgegangen sind, müssen viele noch bezüglich ihrer Sensitivität und

Spezifität bewertet werden. Um diese Forschung voranzutreiben existieren drei Möglichkeiten (Delpu *et al.*, 2013):

- Die Verbesserung bestehender Tests mit bereits erforschten Biomarkern.
- Das Entdecken neuer Marker mit hoher Sensitivität und Spezifität.
- Die Verbindung mehrerer sich komplementierender Marker, um die schlechte Performance einzelner auszugleichen.

Bisher wird die Untersuchung von DNA-Methylierungsmarkern (insbesondere für Screening-Untersuchungen) in verschiedenen Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Tumoren, zum Teil sogar mit Nachdruck, nicht empfohlen. (Baur *et al.*, 2011; Goeckenjan *et al.*, 2011; Pox *et al.*, 2013; Travis *et al.*, 2015)

In unseren Studien an Pleuraergüssen und Bronchialaspiraten (Ilse *et al.*, 2013; Ilse *et al.*, 2014) haben wir uns hauptsächlich auf die Erforschung der Anwendbarkeit der *SHOX2*-Methylierung an den genannten Materialien fokussiert. Entsprechend wird das *SHOX2*-Gen im Folgenden ausführlich besprochen. Im Weiteren haben wir in unserer Studie an Bronchialaspiraten die mögliche Kombination des *SHOX2*-Methylierungsmarkers mit den zuvor in unserem Institut erforschten DNA-Methylierungsmarkern *APC*, *RASSF1A* und *p16^{INK4A}* (*CDNK2A*) (Schramm *et al.*, 2011) auf ihre Eignung zur Tumordiagnostik untersucht. Unsere Studie an Bronchialaspiraten haben wir mit dem verbliebenen Material aus der Studie von Schramm *et al.* durchgeführt. Durch die Verwendung desselben Untersuchungsmaterials war es möglich die Kombination von *SHOX2*-Methylierung mit diesen Biomarkern zu untersuchen ohne letztere erneut testen zu müssen. Da ausschließlich die Daten der Biomarker in unserer Studie (Ilse *et al.*, 2014) verwendet wurden und letztere nicht erneut untersucht wurden, werden die Biomarker im Folgenden lediglich stark verkürzt vorgestellt.

SHOX2

Das *short stature homeobox gene two* (*SHOX2*) wurde in Anlehnung an seine hohe Homologie zum *short stature homeobox gene* (*SHOX*) *SHOX2* genannt. Laut HGNC ist *SHOX2* im Bereich der fünfundzwanzigsten Bande auf dem

langen Arm des Chromosoms drei lokalisiert (Position 3q25.32). *SHOX2* gehört zu der Familie der *paired class homeoboxes and pseudogenes* (PRD). (Gray *et al.*, 2015; Holland *et al.*, 2007) *SHOX2* weist zwei funktionelle Einheiten auf, eine Homeodomäne und eine OAR-Domäne. Eine Homeodomäne vermittelt dem Protein die Fähigkeit, an eine spezifische DNA-Sequenz zu binden. (Blaschke *et al.*, 1998; Semina *et al.*, 1998) Viele Proteine, die eine Homeodomäne beinhalten, sind Transkriptionsfaktoren und spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und der Zelldifferenzierung. (Holland *et al.*, 2007) Auch *SHOX2* wird diese Eigenschaft zugeschrieben. (Blaschke *et al.*, 1998; Semina *et al.*, 1998) Die OAR-Domäne ist nach den Anfangsbuchstaben der Gene *orthopedia homeobox* (*OTP*), *aristaless related homeobox* (*ARX*) und *retina and anterior neural fold homeobox* (*RAX*) benannt. (Furukawa *et al.*, 1997) Der OAR-Domäne wird eine Funktion als intra-molekularer Schalter zugeschrieben. Als solcher reguliert sie die Aktivität des Transkriptionsfaktors, auf dem sie liegt. Es sind zwei verschiedene Splicevarianten von *SHOX2* bekannt. *SHOX2a* ist 1948 Basenpaare (bp) lang und kodiert für ein Protein mit 331 Aminosäuren (AS). *SHOX2b* umfasst 1541 bp und kodiert für ein Protein von 190 AS Länge. (Blaschke *et al.*, 1998) *SHOX2a* und *SHOX2b* können sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. Die Dimerisierung funktioniert aber nur dann, wenn sowohl die OAR-Domäne als auch die Homeodomäne intakt sind. (Aza-Carmona *et al.*, 2014) Beide Splicevarianten können vom Zelltyp abhängig als Transkriptionsaktivator oder -repressor fungieren. (Yu *et al.*, 2007) Die von den erstbeschreibenden Arbeitsgruppen vorgeschlagenen Bezeichnungen *SHOT* (Blaschke *et al.*, 1998) und *OG12X* (Semina *et al.*, 1998) werden von HGNC weiter als Synonyme für *SHOX2* geführt. (Gray *et al.*, 2015) Als 1997 *SHOX* und 1998 *SHOX2* beschrieben wurden, hieß das einzige (van Schaick *et al.*, 1997) Mausgen, welches zu *SHOX* und *SHOX2* homolog ist, noch *OG12* und später *Og12x*. Beide erstbeschreibenden Arbeitsgruppen von *SHOX2* stellten fest, dass *Og12x* eine höhere Homologie zu *SHOX2* als zu *SHOX* aufweist. Semina *et al.* berichteten, dass die vorhergesagte Proteinsequenz von *SHOX2* zu 100 % identisch mit der Proteinsequenz von *Og12x* ist. Auch bei der Maus heißt *Og12x* heute *Shox2*. (Gray *et al.*, 2015)

Sowohl die beiden erstbeschreibenden Publikationen von *SHOX2* als auch viele weitere der im Folgenden erwähnten Untersuchungen zur Funktionsweise von *SHOX2* haben ihre Untersuchungen im Modellorganismus Maus durchgeführt. Da in der Maus, wie bereits genannt, nur ein zu *SHOX2* und *SHOX* äquivalentes Gen (*Shox2*) existiert (van Schaick *et al.*, 1997), lassen diese Untersuchungen nicht ohne Weiteres den Rückschluss zu, dass *SHOX*, *SHOX2* oder beide Gene beim Menschen die entsprechende Funktion erfüllen. Allerdings ist die Homeodomäne beider Gene identisch, was auf identische Bindestellen in der DNA hindeutet. (Blaschke *et al.*, 1998) Die Zellkultur-experimente von Aza-Carmona *et al.* im Jahr 2014 zeigten *in vitro*, dass *SHOX2* und auch *SHOX* mit denselben Bindestellen der Regulatorregion der Gene *NPPB* und *ACAN* interagieren können. Daraus folgerten und formulierten die Autoren die Hypothese, dass *SHOX* und *SHOX2* zeit- und gewebespezifisch redundante Funktionen erfüllen können. (Aza-Carmona *et al.*, 2014)

Eine erste Einschätzung, ob *SHOX* oder *SHOX2* beim Menschen die Funktionen von *Shox2* erfüllt, kann die Studie von Clement-Jones *et al.* aus dem Jahr 2000 liefern. Die Abhandlung vergleicht die Expression von *SHOX*, *SHOX2* und *Shox2* während der Embryonalentwicklung des Menschen und der Maus. Sie zeigt, dass *SHOX2* beim Menschen und *Shox2* bei der Maus in den folgenden Regionen exprimiert werden (Clement-Jones *et al.*, 2000):

- Erster Pharyngealbogen und daraus hervorgehende Strukturen
- Zweiter Pharyngealbogen und daraus hervorgehende Strukturen
- Dritter Pharyngealbogen und daraus hervorgehende Strukturen
- Nasalentwicklungszone
- Basalplatte des Zentralen Nervensystems
- Dorsales Wurzelganglion
- Einströmtrakt des Herzens
- Knochen
- Muskeln
- Bindegewebe
- Genitalknötchen

Die Expression von *SHOX* war deutlich begrenzter. So wurde *SHOX* beim Menschen nur in den folgenden Regionen exprimiert (Clement-Jones *et al.*, 2000):

- Erster Pharyngealbogen und daraus hervorgehende Strukturen
- Zweiter Pharyngealbogen und daraus hervorgehende Strukturen
- Knochen
- Bindegewebe

Sowohl Blaschke *et al.* als auch Semina *et al.* stellten die These auf, dass das *SHOX2*-Gen ein möglicher Kandidat für die Ursache des Cornelia de Lange Syndroms (CdLS) ist. (Blaschke *et al.*, 1998; Semina *et al.*, 1998) Das CdLS ist eine dominant vererbte Krankheit, deren Merkmale mangelhaft ausgebildete Gliedmaßen, zurückgebliebenes Wachstum, beschränkte geistige Fähigkeiten und für die Krankheit charakteristische Gesichtszüge sind. (Krantz *et al.*, 2004) Beide Arbeitsgruppen stützten ihre These darauf, dass *Shox2* bei der Embryonalentwicklung der Maus an den gleichen Orten exprimiert wird, an denen beim Menschen die Merkmale des CdLS auftreten. Als weiteres Argument für ihre These erachteten sie die Publikation einer Fallstudie von Ireland *et al.* aus dem Jahr 1991. Ireland *et al.* schlossen anhand der Bruchstellen einer Chromosomentranslokation, im von ihnen vorgestellten CdLS-Fall, auf die Lokalisation der Ursache des CdLS an Position 3q26.3. (Ireland *et al.*, 1991) Somit lag die vermutete Ursache des CdLS in der Region, in der sich nach Semina *et al.* und Blaschke *et al.* auch *SHOX2* befand (3q22-26 respektive 3q25-26). (Blaschke *et al.*, 1998; Semina *et al.*, 1998) *SHOX2* wird heute allerdings nicht mehr mit dem CdLS assoziiert. Als Hauptursache des CdLS werden laut einem zuletzt im Januar 2016 aktualisierten Überblick zum CdLS Mutationen des *Drosophila melanogaster* homologe „Nipped-B“ (*NIPBL*) betrachtet (ca. 60 % der Fälle). In diesem Bericht werden noch vier weitere Gene mit dem CdLS assoziiert. *SHOX2* gehört nicht zu den aufgeführten Genen. (Deardorff *et al.*, 1993-2016) Die Gründe dafür, dass *SHOX2* bis heute nicht in diese Liste aufgenommen wurde, könnten folgende sein: Die heute genau bekannte Position von *SHOX2* (3q25.32) ist über 15 Millionen Basenpaare von der Region 3q26.3 entfernt, der Ireland *et al.*

die Ursache vom CdLS zuordneten. (Gray *et al.*, 2015; Ireland *et al.*, 1991) Im Weiteren wird das CdLS, wie bereits beschrieben, autosomal dominant vererbt. Bei Mäusen allerdings konnte bei einer hemizygoten Deletion von *Shox2* kein besonderer Phänotyp festgestellt werden. Eine homozygote Deletion von *Shox2* war vermutlich aufgrund der fehlerhaft ausgebildeten Herzregion pränatal letal. (Blaschke *et al.*, 2007) Es lässt sich daher spekulieren, dass auch *SHOX2*-Mutationen beim Menschen keinen sichtbaren Phänotyp ausbilden. Zwar existiert mit *SHOX* beim Menschen ein homologes Gen, welches ähnliche Funktionen übernehmen könnte (Aza-Carmona *et al.*, 2014), jedoch wird *SHOX* nur sehr restriktiv und nicht im Bereich des Herzens exprimiert. *SHOX2* hingegen wird überall dort exprimiert, wo bei der Maus auch *Shox2* exprimiert wird (Clement-Jones *et al.*, 2000).

Im Folgenden werden verschiedene Untersuchungen zu *Shox2* vorgestellt, um einen bisher in diesem Umfang nicht existierenden Überblick über die Interaktionen und Funktionen von *Shox2* darzulegen und dabei mögliche Interaktionspartner zu benennen. Die Interaktionspartner und die vermutete oder auch nachgewiesene Interaktion sind in Abbildung 1 dargestellt. Ein Unterschied zwischen den beiden Splicevarianten von *Shox2* ist bei den meisten Abhandlungen nicht untersucht oder entdeckt worden. Im Folgenden wird daher nur dann auf die Splicevarianten eingegangen, wenn in der vorgestellten Untersuchung von einem unterschiedlichen Verhalten von *Shox2a* und *Shox2b* berichtet wurde. Da homozygote Deletionen von *Shox2* embryonal letal sind (Blaschke *et al.*, 2007), erfolgten die vorgestellten Studien in den meisten Fällen mit Hilfe einer räumlich oder temporal eingegrenzten Ausschaltung von *Shox2*.

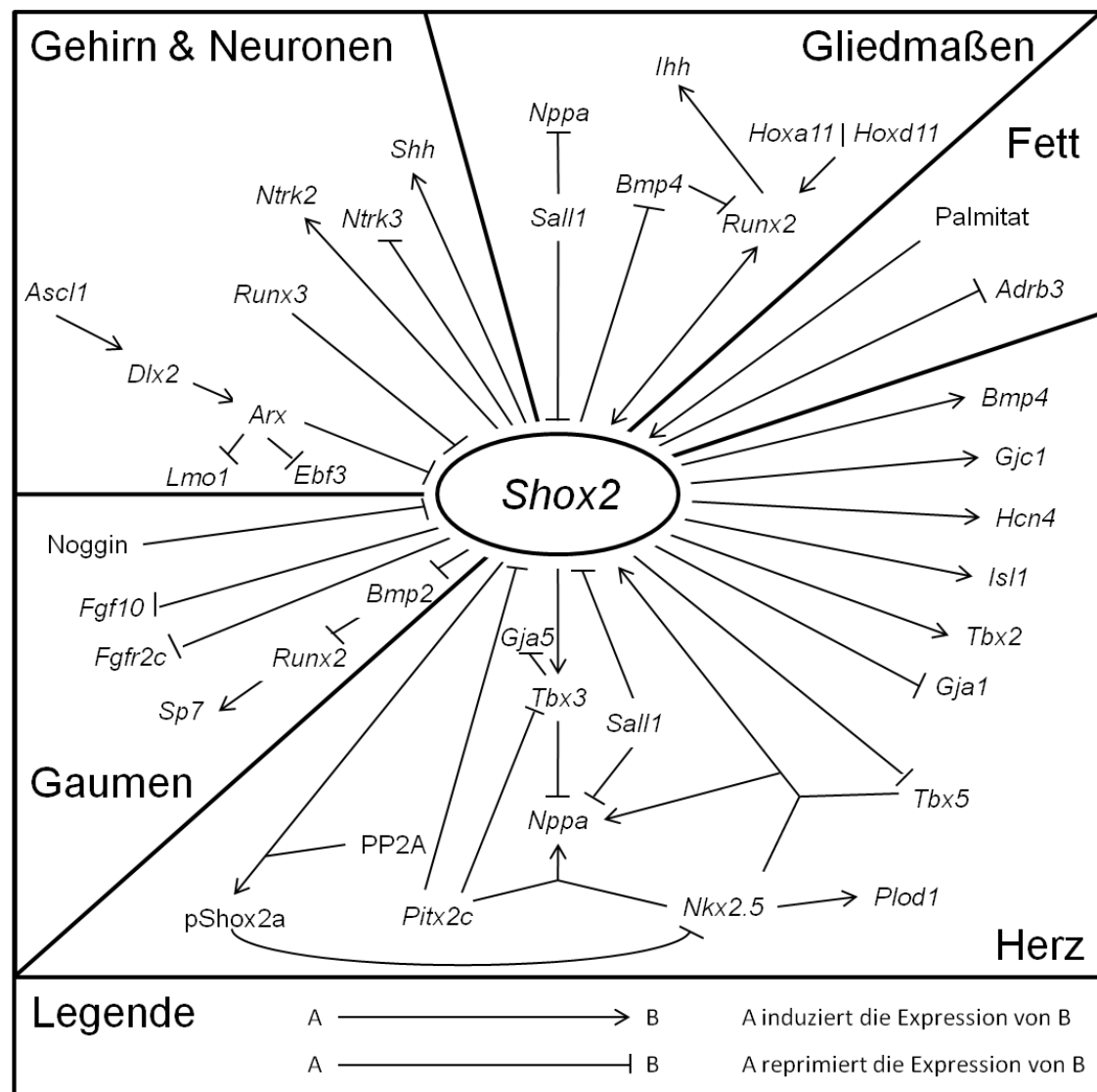


Abbildung 1: Bekannte und vermutete Interaktionen von *Shox2* in verschiedenen Geweben. (Abdo *et al.*, 2011; Blaschke *et al.*, 2007; Colasante *et al.*, 2008; Espinoza-Lewis *et al.*, 2009; Fulp *et al.*, 2008; Ganga *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2008a; Gu *et al.*, 2008b; Hashem und Claycomb, 2013; Hashem *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013; Hoogaars *et al.*, 2004; Kiefer *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Polidori *et al.*, 2012; Puskaric *et al.*, 2010; Rosin *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007)

Expression und Interaktion von *SHOX2* in Gehirn und Neuronen

Rosin *et al.* berichteten 2015, dass *Shox2* für die Expression von *sonic hedgehog* (*Shh*) durch dorsale Purkinje-Zellen (eine Neuronenart) benötigt wird. Ist *Shox2* im Gehirn der Mäuse ausgeschaltet, so sezernieren die Purkinje-Zellen kein *Shh*, was zu einem Ungleichgewicht zwischen *Shh* und *bone morphogenic protein 4* (*Bmp4*) führt. Die Mäuse, in deren Gehirnregion

Shox2 ausgeschaltet wurde, zeigen eine Beeinträchtigung des Kleinhirns und damit einhergehend eine Störung der Bewegungskoordination. (Rosin *et al.*, 2015)

Mutationen des Gens *aristaless related homeobox (ARX)* beim Menschen werden als Ursache verschiedener neurologischer Störungen betrachtet. In einer genomweiten Studie wurde gezeigt, dass *Arx* direkt die Transkriptionsfaktoren *Shox2*, *LIM domain only 1 (Lmo1)* und *early B-cell factor 3 (Ebf3)* reprimiert. (Fulp *et al.*, 2008) *Arx* ist laut Colasante *et al.* ein direktes Ziel von *distal-less homeobox 2 (Dlx2)*, *Dlx2* wiederum sehr wahrscheinlich ein Ziel von *achaete-scute family bHLH transcription factor 1 (Ascl1)* ist. (Colasante *et al.*, 2008)

Dougherty *et al.* berichteten 2013 darüber, dass es eine Subgruppe an Interneuronen gibt, deren besonderes Kennzeichen die Expression von *Shox2* ist. Die meisten dieser *Shox2*-Interneuronen sind während der Fortbewegung rhythmisch aktiv. Ein Ausschalten dieser Neuronen führt zu einer Störung des Fortbewegungsrhythmus. (Dougherty *et al.*, 2013)

Die Expression von *Shox2* beeinflusst die Mechanismen zur Diversifikation der *TrkB*- und *TrkC*-positiven mechanorezeptiven Neuronen. Diese Neuronen werden durch die Expression der Gene *neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 (Ntrk2)* (ehemals *TrkB* (Gray *et al.*, 2015)) und *neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 (Ntrk3)* (ehemals *TrkC* (Gray *et al.*, 2015)) charakterisiert. (Abdo *et al.*, 2011) Ein Ausschalten von *Shox2* in den Vorläuferzellen des dorsalen Wurzelganglions führte zu einer Reduktion von *TrkB*-Neuronen und einem Anstieg von *TrkC*-Neuronen. Die Expression von *Shox2* ist dabei eine essentielle, aber nicht ausreichende Komponente für die Spezifikation der *TrkB*-Subgruppe. (Scott *et al.*, 2011) Eine Untersuchung an Mäusen mit einer konditionellen Deletion von *Shox2* an Mäusen mit einer homozygoten Deletion von *runt related transcription factor 3 (Runx3)* zeigte, dass *Runx3* die Expression von *Shox2* unterdrückt, die Expression von *Shox2* aber essentiell für die Expression von *Ntrk2 (TrkB)* ist. (Abdo *et al.*, 2011)

Expression und Interaktion von SHOX2 bei der Entwicklung der Zähne

Lin *et al.* (2007) fanden Indizien für die partielle Übertragbarkeit vom *Shox2*-Expressionmuster im Mausmodell auf die Expressionsmuster von *SHOX2* beim Menschen. Die Untersuchungen zeigten, dass *BMP4*, *fibroblast growth factor 8 (FGF8)*, *msh homeobox 1 (MSX1)*, *paired box 9 (PAX9)*, *paired like homeodomain 2 (PITX2)* und *SHOX2* die gleichen grundlegenden Expressionsmuster in der menschlichen Zahnanlage zeigen wie in der Zahnanlage der Maus. (Lin *et al.*, 2007)

Expression und Interaktion von SHOX2 bei der Entwicklung des Gaumens

Shox2 wird während der Ausbildung des Gaumens, begrenzt auf die anteriore Domäne, exprimiert. Mäuse, bei denen das *Shox2*-Gen deletiert ist, bilden eine auf den anterioren Gaumen begrenzte Gaumenspalte aus. Weiter zeigen diese Mäuse eine ektopische Expression von *fibroblast growth factor 10 (Fgf10)* und *fibroblast growth factor receptor 2 c (Fgfr2c)*. Dies legt eine, wenn auch nicht unbedingt direkte, Repression dieser beiden Gene durch *Shox2* nahe. Während das Einbringen einzelner Proteine (*Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* und *Bmp7*) aus der Familie der *bone morphogenetic proteins (Bmp)* die Expression von *Shox2* nicht induzieren konnte, führte das Einbringen des *Bmp*-Antagonisten *Noggin* zu einer reduzierten *Shox2*-Expression. Daraus wurde auf eine notwendige, aber nicht ausreichende Rolle von *Bmp* bei der Induktion der *Shox2*-Expression geschlossen. (Yu *et al.*, 2005) Mäuse mit einer konditionellen Inaktivierung von *Shox2* im Mesenchym des Gaumens können die embryonale und die neonatale Phase überleben. Auch diese Mäuse bilden eine auf den anterioren Bereich des Gaumens begrenzte Gaumenspalte und entwickeln ein Schwindsuchtsyndrom. Dieses könnte seine Ursache in der Gaumenspalte haben, da die Mäuse hierdurch vermutlich Probleme beim Einsaugen der Muttermilch haben. Die *Shox2*-Inaktivierung verursacht eine deutlich reduzierte Knochenbildung im Vordergaumen. Als Ursache wird die Herabregulation von *runt related transcription factor 2 (Runx2)* und *Sp7 transcription factor (Sp7)* (ehemals *Osterix* (Gray *et al.*, 2015)) vermutet. Allerdings überlappt sich die Expression von *Shox2* zeitlich nicht mit der Expression der Gene *Runx2* und *Sp7*. Die

Inaktivierung von *Shox2* führt zu einer deutlich erhöhten Expression von *Bmp2*. Die Applikation von *Bmp2* wiederum konnte die Expression von *Runx2* und *Sp7* unterdrücken. (Gu *et al.*, 2008b) Es wäre daher denkbar, dass *Shox2* die Expression von *Runx2* indirekt durch die Repression von *Bmp2* vermittelt.

Expression und Interaktion von SHOX2 bei der Entwicklung der Gliedmaßen

Gliedmaßen der Vertebraten werden von proximal nach distal in drei distinkte Bereiche, Stylopodium, Zygopodium und Autopodium, eingeteilt. Beim Menschen besteht das Stylopodium aus dem Oberarm und dem Oberschenkel, das Zygopodium aus Unterarm und Unterschenkel und das Autopodium aus den Händen bzw. den Füßen. Bei der Entwicklung der Gliedmaßen wird *Shox2*, wie auch bei der Entwicklung des Gaumens, regional begrenzt exprimiert. Eine homozygote Deletion des *Shox2*-Gens führt zu einer virtuellen Eliminierung des Stylopodiums. Zygopodium und Autopodium hingegen entwickeln sich relativ normal. Die Initiierung des Stylopodium erfolgt normal, aber das anschließende Wachstum des Elementes und die endochondrale Ossifikation bleiben aus. (Yu *et al.*, 2007) Unter normalen Umständen würden die frühen Chondrozyten zum Wachstum eines Knorpelvorläufers des Knochens beitragen und anschließend in hypertrophe (angeschwollene) Chondrozyten ausdifferenzieren. Letztere würden im Prozess der endochondralen Ossifikation apoptotisch abgebaut, während der aus Knorpel bestehende Knochenvorläufer durch Kalzifizierung (Kalkablagerung) von innen nach außen in Knochen umgewandelt wird. (Severmann und Vortkamp, 2015) Durch das Ausbleiben dieser Prozesse verbleibt das Stylopodium deutlich zu kurz gewachsen und komplett unverknöchert. Die Gene *Runx2*, *Runx3* und *indian hedgehog (Ihh)* sind herabreguliert, während die Expression von *Bmp4* verstärkt und ektopisch stattfindet. Die Expressionen von *Runx2* und *Ihh* überlappen sich zeitlich nicht mit der Expression von *Shox2*. Dies legt nahe, dass *Shox2* keinen direkten Einfluss auf die Expression von *Runx2* oder *Ihh* hat. (Yu *et al.*, 2007) *Runx2* kann direkt mit dem Promoter von *Ihh* interagieren und fördert dessen Expression. (Yoshida *et al.*, 2004) *Shox2* wirkt reprimierend auf die Expression von *Bmp4*. (Yu *et al.*, 2007) Die Fähigkeit von *Shox2*, an den Promoter von

Bmp4 zu binden, wurde sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* nachgewiesen. (Puskaric *et al.*, 2010) *Bmp4* wirkt seinerseits reprimierend auf die Expression von *Runx2*, vermutlich aber nicht direkt, da die Promoterregion von *Runx2* keine Bindestellen für *Bmp4* aufweist. (Yu *et al.*, 2007) *Shox2* ist ein wichtiger Repressor der Chondrogenese in zwei verschiedenen Stadien, und zwar bei der initialen Differenzierung von Chondroprogenitorzellen in frühe Chondrozyten sowie bei der Reifung von frühen Chondrozyten in hypertrophische Chondrozyten. (Bobick und Cobb, 2012) *Runx2* aktiviert die Expression von *Shox2* in frühen Chondrozyten. *Shox2* wiederum induziert indirekt die Expression von *Runx2* und reguliert so die hypertrophische Differenzierung. Die Gene *homeobox A11 (Hoxa11)* und *homeobox D11 (Hoxd11)* agieren oberhalb (*upstream*) von *Runx2* und *Shox2* und fördern deren Expression. (Gross *et al.*, 2012) Schon 2004 wurde von Yoshida *et al.* publiziert, dass *Runx2* wiederum das Gliedmaßenwachstum durch die Organisation von Chondrozytenreifung und -proliferation reguliert, indem es die Expression von *Ihh* induziert. (Yoshida *et al.*, 2004)

Aza-Carmona *et al.* haben 2014 darüber berichtet, dass *SHOX2* *in vitro* in der Lage ist, mit den gleichen Interaktionspartnern zu kooperieren wie *SHOX*. Sie zeigten, dass *SHOX2*, wie auch *SHOX*, die Expression von *natriuretic peptide B (NPPB)* positiv beeinflussen kann. *NPPB* ist ein wichtiger Bestandteil der Signalgebung zur endochondralen Ossifikation, einem Prozess, bei dem bestehendes Knorpelgewebe von innen nach außen in Knochen umgewandelt wird. Aza-Carmona *et al.* zeigten weiter, dass *SHOX2* mithilfe der *SHOX*-Interaktionspartner *SRY-box 5 (SOX5)*, *SRY-box 6 (SOX6)* und *SRY-box 9 (SOX9)* in der Lage ist, die Expression von *aggrecan (ACAN)* zu initiieren. *ACAN* ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix des Knorpels. Die Proteine *SHOX2a* und *SHOX2b* sind, solange die OAR-Domäne intakt ist, in der Lage, sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden. Auch *SHOX* und *SHOX2* können Dimere bilden. Zusammengefasst legen diese Untersuchungen nahe, dass *SHOX2* und *SHOX* zeit- und gewebespezifisch redundante Funktionen erfüllen können. (Aza-Carmona *et al.*, 2014)

Expression und Interaktion von SHOX2 im Fettgewebe

Neben einigen anderen, an der Entwicklung beteiligten Genen wird auch *Shox2* bei Nagern in subkutanem Fett deutlich stärker exprimiert als in visceralem Fett. (Gesta *et al.*, 2006) *Shox2* wird daher sogar als Marker für subkutanes Fett bezeichnet. (Lee *et al.*, 2013) Das Expressionsmuster der verschiedenen Entwicklungsgene ist unterschiedlich und abhängig von der Position des Fettdepots, aber größtenteils unabhängig vom Ernährungszustand. (Yamamoto *et al.*, 2010) Im Zellkulturexperiment führte die Applikation der langkettigen Fettsäure Palmitat zu einer erhöhten Expression von *Shox2*. (Polidori *et al.*, 2012) Das Ausschalten der *Shox2*-Expression in männlichen Mäusen führte dazu, dass diese Mäuse trotz einer sehr fettreichen Ernährung nicht fettleibig wurden. Die Expression von *adrenoceptor beta 3* (*Adrb3*) und, daraus folgend, auch die Lipolyserate waren bei diesen Mäusen erhöht. Die Überexpression von *Shox2* führte zur Repression von *Adrb3* und somit zu einer geringeren Lipolyserate. *Shox2* bindet dabei direkt an den Promotor von *Adrb3*. (Lee *et al.*, 2013)

Expression und Interaktion von SHOX2 bei der Entwicklung des Herzens

Während der embryonalen Entwicklung des Herzens entsteht die Regelmäßigkeit des Herzschlages mit der Reifung des natürlichen Schrittmachers des Herzens. Dieser befindet sich zu Beginn in der caudalen Region des linearen Herzschlauches, dem *Sinus venosus*. Letzterer entwickelt sich schließlich zu der als Sinusknoten (SAN) bekannten Struktur. (Espinoza-Lewis *et al.*, 2009) *Shox2* spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des SAN (Blaschke *et al.*, 2007) und wird dabei stark begrenzt auf den *Sinus venosus* exprimiert. In Abwesenheit einer *Shox2*-Expression sterben die Mausfeten in der Mitte der Trächtigkeit und weisen morphologische Abnormalitäten auf. Die frühe Sterblichkeit kann auf kardiovaskuläre Effekte zurückgeführt werden, welche sich in Herz- und Gefäßödemen zeigen. Weiter zeigt die SAN-Region ein reduziertes Wachstum und auch eine um 50 % verringerte Herzschlagrate gegenüber dem Wildtyp. (Espinoza-Lewis *et al.*,

2009) *In vitro* führt die Überexpression von *Shox2* in embryonalen Körperchen (einer Aggregation von embryonalen Stammzellen) zu einer Anreicherung von Schrittmacherzellen des Herzens. (Ionta *et al.*, 2015) *Pitx2* (*paired like homeodomain 2*) und *Nkx2.5* (*NK2 homeobox 5*) sind die ältesten bekannten transkriptionellen Marker der Herzentwicklung. *Pitx2c* und *Nkx2.5* wirken zusammen bei der Aktivierung des Promoters des *natriuretic peptide precursor A* (*Nppa*), ehemals ANF (Gray *et al.*, 2015) genannt. (Ganga *et al.*, 2003) *Shox2* interagiert mit *Nkx2.5*, *gap junction protein alpha 5* (*Gja5*) (ehemals *Cx40* (Gray *et al.*, 2015)) und *gap junction protein alpha 1* (*Gja1*) (ehemals *Cx43* (Gray *et al.*, 2015)). (Blaschke *et al.*, 2007) Mäuse, denen *Shox2* fehlt, zeigen eine ektopische Expression von *Nppa*, *Gja5* und *Nkx2.5* bei gleichzeitigem Wegfall der Expression von *T-box 3* (*Tbx3*) und *hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel* (*Hcn4*). (Espinoza-Lewis *et al.*, 2009) *Tbx3* unterdrückt die Promoteraktivität von *Nppa* und *Gja5*. (Hoogaars *et al.*, 2004) In *Xenopus laevis*-Embryonen führte die Überexpression von *Shox2* zu einer weitreichenden Unterdrückung der *Nkx2.5*-Expression. (Espinoza-Lewis *et al.*, 2009) Die Unterdrückung der *Nkx2.5*-Expression ist essentiell für die ordnungsgemäße Entwicklung des SAN. (Espinoza-Lewis *et al.*, 2011) *Shox2* ist allerdings nur dann in der Lage, die Expression von *Nkx2.5* zu unterdrücken, wenn eine zweifach phosphorylierte Version von *Shox2a* vorliegt. Ein möglicher Interaktionspartner, der die Phosphorylierung vermitteln könnte, ist die *protein phosphatase 2 A* (PP2A). (Liu *et al.*, 2011) *Pitx2c* bindet direkt an den Promoter von *Shox2* (Wang *et al.*, 2010) und unterdrückt die Expression von *Shox2*. (Espinoza-Lewis *et al.*, 2009) Neben der direkten Unterdrückung der *Shox2*-Expression fördert *Pitx2* die Generierung der micro RNAs miR-17-92 und miR-106b-25. Diese miR unterdrücken ihrerseits die Expression von *Shox2* und *Tbx3*. (Wang *et al.*, 2014) Die Expression von *Shox2* wird durch die Interaktion von *Nkx2.5* und *T-box 5* (*Tbx5*) gefördert. (Puskaric *et al.*, 2010) *Tbx5* und *Nkx2.5* wirken auch bei der Aktivierung des *Nppa*-Promoters zusammen. Diese Aktivierung wird allerdings in Anwesenheit von *Tbx3* unterdrückt. (Hoogaars *et al.*, 2004) Genomweit überlappen sich die Bindestellen von *Nkx2.5* und *Shox2* sehr häufig. Ein großer Teil dieser Bindestellen weist zusätzlich eine Bindestelle von *Tbx5* auf, was für einen sich

gegenseitig regulierenden Mechanismus dieser drei Gene spricht. (Ye *et al.*, 2015) *Shox2* hat zwei Bindestellen im Intron 2 von *ISL LIM homeobox 1 (Isl1)*. Die Deletion von *Shox2* führt zu einer Herabregulierung der *Isl1*-Expression. (Hoffmann *et al.*, 2013) Im Gegensatz zur Entwicklung der Gliedmaßen, bei der *Shox2* die Expression von *Bmp4* unterdrückt (Yu *et al.*, 2007), fördert die direkte Bindung von *Shox2* an den *Bmp4*- Promoter bei der Entwicklung des Herzens die Expression von *Bmp4* (Puskaric *et al.*, 2010). In der Signalkette oberhalb (*upstream*) von *Shox2* könnte das Gen *spalt-like transcription factor 1 (Sall1)* agieren. Mäuse mit einer Mutation von *Sall1*, die das Protein stark verkürzt, wiesen während der Entwicklung des Herzens und der Gliedmaßen ein deutlich erhöhtes Expressionsniveau von *Shox2* und *Nppa* auf. (Kiefer *et al.*, 2008) In embryonalen Körperchen führte die Deletion von *Shox2* zur Herabregulierung von *Hcn4*, *gap junction protein gamma 1 (Gjc1)*, *T-box 2 (Tbx2)*, *Tbx3* und *Bmp4*. Im Weiteren führte sie zu einer Steigerung der Expression von *Gja5*, *Gja1*, *Nkx2.5* und *Tbx5*. (Hashem *et al.*, 2013)

SHOX2 als Onkogen

In der 2014 erschienenen Publikation von Hong *et al.* wurden die Auswirkungen der Mikro-RNA 375 (MiR-375) auf das *SHOX2*-Gen und die Funktion des *SHOX2*-Gens in verschiedenen Brustkrebstumorzelllinien untersucht. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der Transkriptionsfaktor *SHOX2* in Brustkrebstumorzelllinien direkt den *transforming growth factor beta receptor 1 (TGFB1)* hochreguliert und so zum Verlust der Differenzierung beiträgt. Weiter berichteten sie, dass dieser Effekt durch die MiR-375 aufgehoben werden kann. Sie berichteten darüber hinaus von einer hohen Korrelation zwischen niedriger *SHOX2*-Expression mit einer hohen Überlebensrate von Patienten. Daraus schlussfolgerten sie, dass ihr *in vitro* gezeigter Pathway möglicherweise auch *in vivo* gültig ist. (Hong *et al.*, 2014) Die Möglichkeit, dass *SHOX2* onkogene Eigenschaften besitzt, wird durch die Ergebnisse der Arbeit von Yang *et al.* 2013 unterstützt: Sie untersuchten die *SHOX2*-Expression in Tumorgewebeproben von 60 Patienten nach Resektion eines hepatozellulären Karzinoms. 30 Patienten wiesen innerhalb von fünf Jahren nach der Resektion

ein Rezidiv auf, während die anderen 30 Patienten weiter Rezidiv frei waren. Eine erhöhte *SHOX2*-Expression korrelierte signifikant mit der Abwesenheit einer Tumorverkapselung, dem Vorhandensein von Tumortromben und einem fortgeschrittenem TNM-Stadium. Darüber hinaus wiesen sie in einer HCC-Zelllinie nach, dass die durch RNAi vermittelte Stilllegung der *SHOX2*-Expression zu einer Reduktion von sowohl der Proliferation als auch der Invasion dieser Zelllinie führt. (Yang *et al.*, 2013) Weitere Indizien liefern die Arbeiten von Zhao *et al.* 2014 und Gu *et al.* 2008. Zhao *et al.* untersuchten am Mausmodell die durch *Helicobacter pylori* vermittelte STAT3-Aktivierung. Letztere ist für ihr Mitwirken bei der Initiierung und dem Fortschreiten von Magenkrebs bekannt. Sie identifizierten sechs Gene, deren Expression durch die STAT3-Aktivierung hochreguliert wurde. Zu diesen sechs Genen gehörte auch *SHOX2*. (Zhao *et al.*, 2014) Gu *et al.* berichteten, dass Mausmutanten mit einem *Shox2*-Mangel eine deutlich verringerte Proliferationsrate im Bereich der Kiefergelenksentwicklung aufweisen. (Gu *et al.*, 2008a)

SHOX2-Test auf DNA-Methylierung

Der Test auf DNA-Methylierung des *SHOX2*-Gens (*SHOX2*-Test) wurde von der Firma Epigenomics AG Berlin als Hilfe für die Diagnose von Lungenkrebs an Bronchialaspiraten entwickelt. Die Methylierung des *SHOX2*-Gens wurde dabei nicht auf Grund der Eigenschaft von *SHOX2* als Tumorsuppressorgen oder als Onkogen gewählt, sondern auf Grund der empirisch ermittelten häufigen Methylierung des *SHOX2*-Gens in verschiedenen Lungentumorzelllinien. (Schmidt *et al.*, 2010) Diese wurde von Lewin *et al.* 2007 mit Hilfe der differentiellen Methylierungs-Hybridisierung (DMH) ermittelt. Die DMH-Methode basiert auf einer Microarray-Untersuchung von über 50.000 CpG-reichen DNA-Fragmenten. (Lewin *et al.*, 2007) Wie bereits beschrieben, führt die Methylierung eines Gens häufig zur Unterdrückung der Expression desselben Gens. (Knippers, 2006) Das legt die Annahme nahe, dass auch die Expression von *SHOX2* in Lungentumoren häufig durch Methylierung abgeschaltet sein könnte, und wäre somit ein Indiz für eine Wirkung von *SHOX2* als Tumorsuppressorgen.

Im Jahr 2011 haben Schneider *et al.* das Expressionsniveau von *SHOX2* im Tumorgewebe und im benachbarten Nicht-Tumorgewebe von 55 operierten Lungenkarzinom-Patienten verglichen. Eine Herabregulierung des Expressionsniveaus aufgrund der Hypermethylierung von *SHOX2* konnte dabei nicht beobachtet werden. Allerdings wurde in der Diskussion eingeräumt, dass ein potentieller Effekt durch die Durchmischung von Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen innerhalb des Tumorgewebes maskiert worden sein könnte. (Schneider *et al.*, 2011) Unter Ausschluss der Maskierung könnte dies aber auch ein Indiz dafür sein, dass die Methylierung des *SHOX2*-Gens keinen Einfluss auf dessen Expression hat.

Wie Yu *et al.* 2007 berichteten, kann *SHOX2* abhängig von der zellulären Umgebung sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Expression des gleichen Gens wirken. (Yu *et al.*, 2007) Es ist daher vorstellbar, dass *SHOX2* in der einen Umgebung als Tumorsuppressorgen und in anderer Umgebung als Onkogen fungieren kann. Dies betont die Wichtigkeit, den *SHOX2*-Test für unterschiedliche Untersuchungsmaterialien jeweils neu einzustellen und zu validieren.

APC

Das Gen „*adenomatous polyposis coli*“ (*APC*) ist in der Region q22.2 des Chromosoms 5 lokalisiert. (Gray *et al.*, 2015) Das früher *DP2.5* genannte Gen wurde 1991 von Groden *et al.* als Ursache der adenomatösen Polyposis coli identifiziert. (Groden *et al.*, 1991) *APC* weist Tumor unterdrückende Eigenschaften auf (Hoshino *et al.*, 1991) und ist mit alpha-catenin und beta-catenin assoziiert, was indirekt eine Funktion in der Zelladhäsion nahelegt, da diese Proteine mit dem Zelladhäsionsmolekül E-cadherin binden (Rubinfeld *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1993). Darüber hinaus ist *APC* während der Mitose am Ende der Mikrotubuli und eingebettet in den Kinetochoren lokalisiert. Zellen mit einem verkürztem *APC*- Gen weisen Defekte in der Chromosomensegregation auf. Gemeinsam legt dies eine Funktion in der Verbindung von Mikrotubuli mit dem Kinetochor nahe und bei defektem *APC* könnte es so zur

Chromosomeninstabilität in Krebszellen beitragen. (Kaplan *et al.*, 2001) Die Mutation des *APC*-Gens ist ein häufiges und frühes Ereignis in der Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms. (Powell *et al.*, 1992) Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit, die durch Mutationen in dem Tumorsuppressorgen *APC* verursacht wird. Der genaue Ort der Mutation kann dabei die Geschwindigkeit des Krankheitsverlaufes beeinflussen. (Ficari *et al.*, 2000) Die Leitlinie zum kolorektalen Karzinom empfiehlt Verwandten eines FAP-Patienten eine *APC*-Keimbahnmutationsanalyse. Eine Untersuchung einer abberanten *APC*-Promotermethylierung wird in der Leitlinie hingegen nicht besprochen. (Pox *et al.*, 2013) Eine aberrante Methylierung des *APC*-Promotors ist ein häufiges Ereignis in Lungentumoren. (Grote *et al.*, 2004) In unserer Studie an Bronchialaspiraten erreichte der *APC*-Methylierungsmarker eine Sensitivität von 24 % (18/75) bei einer Spezifität von 98 % (42/43). (Ilse *et al.*, 2014)

RASSF1A

Das Gen „*ras association domain family member 1*“ (*RASSF1A*) befindet sich auf Chromosom 3 in der Region p21.3. Damit liegt *RASSF1A* in einer Region, deren genetische Instabilität häufig bei Lungenkrebs beschrieben worden ist. Die RASSF-Proteinfamilie ist nach der *Ras*-Assoziations-Domäne (RA-Domäne) ihrer zugehörenden Proteine benannt worden. Die RA-Domäne vermittelt den Proteinen das Potential mit Proteinen der *Ras*-Familie zu interagieren. Die *Ras*-Familie ist eine Subfamilie der kleinen GTPasen. Sie kontrolliert verschiedene zelluläre Prozesse inklusive Membrantransport, Apoptose und Proliferation. *RASSF1A* ist an den Mikrotubuli lokalisiert und an der Regulation von Wachstum und Migration beteiligt. Der Verlust der *RASSF1A* Lokalisation an den Mikrotubuli, führt sowohl zur Unterdrückung der Tumor suppressierenden Eigenschaften, zur Tubulin-Instabilität, zur Inhibition des Todesrezeptor abhängigen Zelltodes als auch zur Förderung genomischer Instabilität durch den Verlust von Zentrosom und Mikrotubuli abhängigen Spindelkörper Strukturen. (Volodko *et al.*, 2014) Die Methylierung des *RASSF1A*-Promoters ist ein häufiges und frühes Ereignis der Tumorgenese,

was *RASSF1A* zu einem nützlichen diagnostischen Marker machen könnte. (Richter *et al.*, 2009) In einer Studie an primären Lungentumoren war der *RASSF1A*- Promoter in 40 % (24/60) der Fälle hypermethyliert. (Dammann *et al.*, 2000) In unserer Studie an Bronchialaspiraten erreichte der *RASSF1A*-Methylierungsmarker eine Sensitivität von 29 % (22/75) bei einer Spezifität von 100 % (43/43). (Ilse *et al.*, 2014)

CDKN2A (p16^{INK4A})

Das Gen „*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*“ (*CDKN2A*) ist auch unter den Synonymen *p16*, *INK4A* und *p16^{INK4A}* bekannt. (Gray *et al.*, 2015) Es ist in der chromosomalen Region 9p21 lokalisiert. Das *p16^{INK4A}* ist ein multipler Tumorsuppressor, der an der Regulation des Zellzykluses beteiligt ist. (Rocco und Sidransky, 2001) Es kann dabei einen Zellzyklus- Arrest sowohl in der G1-Phase als auch in der G2/M-Phase vermitteln. (Stott *et al.*, 1998) In Zelllinien, die von Tumoren der Lunge, der Brust, des Gehirns, der Knochen, der Haut, der Blase, der Nieren, der Eierstöcke sowie von Lymphozyten stammen, ist das Gen sehr häufig homozygot deletiert. (Kamb *et al.*, 1994) Eine aberrante Methylierung von *p16^{INK4A}* ist ein frühes Ereignis bei der Entstehung von Lungenkrebs. (Belinsky *et al.*, 1998) Darüber hinaus ist *p16^{INK4A}* in einer Vielzahl an Tumoren hypermethyliert. (Belinsky *et al.*, 1998; Shim *et al.*, 2000) In unserer Studie an Bronchialaspiraten erreichte der *p16^{INK4A}*-Methylierungsmarker eine Sensitivität von 13 % (10/75) bei einer Spezifität von 100 % (43/43). (Ilse *et al.*, 2014)

Morphologische Tumordiagnostik an Gewebe- und Zellproben

Morphologische Methoden

Wurde im Körper eines Menschen eine Raumforderung entdeckt, z.B. mit der Hilfe eines bildgebenden Verfahrens wie der Magnetresonanztomographie (MRT) oder der Computertomographie (CT), oder zeigt ein Patient Symptome, die auf einen Tumor hindeuten, bedarf es einer morphologisch-pathologischen (mikroskopischen) Untersuchung, um den Tumorverdacht abzusichern und den Tumortyp genauer zu klassifizieren. Dies ist notwendig, da verschiedene Tumore im menschlichen Körper ganz unterschiedliche therapeutische Verfahren benötigen. Diagnostik und Therapie geschehen zunehmend nach den Empfehlungen von nationalen und internationalen Leitlinien (Baur *et al.*, 2011; Goeckenjan *et al.*, 2011; Pox *et al.*, 2013; Travis *et al.*, 2015), die in Deutschland federführend von der AWMF, der „Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen-Medizinischen Fachgesellschaften e.V.“, verwaltet und herausgegeben werden.

Bei der histopathologischen Untersuchung erfolgen nach der makroskopischen Beurteilung des Untersuchungsmaterials die Fixation und die Einbettung des gesamten Materials bzw. einer repräsentativen Gewebeprobe in einen oder mehrere Paraffinblöcke. Im Anschluss werden etwa 5 µm dicke Schnitte des Paraffinblocks mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung), gegebenenfalls auch mit weiteren Färbungen, gefärbt. Die so erstellten histologischen Präparate werden mikroskopisch von Fachärzten für Pathologie untersucht und beurteilt.

Materialien, bei denen die Zellen meist nicht mehr in einem Gewebeverband zusammenliegen, wie bei Körperflüssigkeiten, Spülflüssigkeiten und Bürstenabstrichen, werden zytopathologisch untersucht. Dazu werden die entnommenen Materialien direkt oder nach Konzentration durch Zentrifugierung auf Objektträger aufgebracht. Je nach Herkunft des Untersuchungsmaterials werden die Objektträger zunächst nach der

Papanicolaou- (Pap) oder der May-Grünwald-Giemsa (MGG)-Methode gefärbt. Bei einigen Materialien, wie zum Beispiel Pleuraergüssen, werden auch beide Färbemethoden angewandt. Die so erhaltenen zytologischen Präparate werden unter dem Lichtmikroskop vollständig meanderförmig durchgemustert und durch Fachärzte für Pathologie beurteilt.

Da die hier präsentierten Studien auf zytologische Untersuchungen zurückgehen, soll auf die Nomenklatur der zytologischen Diagnostik an dieser Stelle präziser eingegangen werden. In Deutschland werden zytologische Diagnosen gemäß der Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und der Deutschen Gesellschaft für Zytologie in folgende Kategorien eingeteilt (Böcking, 1998):

- positiv – Im Präparat liegen Tumorzellen vor.
- dringend verdächtig (oder dringender Verdacht) – Im Präparat liegen verdächtige Zellen vor, die mit hoher Wahrscheinlichkeit maligne sind.
- zweifelhaft – Im Präparat liegen verdächtige Zellen vor, bei denen die Wahrscheinlichkeit von Malignität eher gering ist.
- negativ – Im Präparat liegen keine Tumorzellen vor.
- unzureichendes Material – Im Präparat liegen keine, zu schlecht erhaltene oder zu wenige Zellen für eine Beurteilung vor.

Die Angabe der zutreffenden Kategorie wird um einen Klartext ergänzt, in welchem die vorgefundenen Veränderungen im Kontext der klinischen Angaben erläutert und interpretiert werden. Finden sich beispielsweise in einem Bronchialsekret Tumorzellen eines Adenokarzinoms, so lautet ein typischer Befund:

- Mit Nachweis maligner Tumorzellen (= positiv). Das Zellbild entspricht einem entzündlichen Bronchialsekret mit Zellen eines gering differenzierten Adenokarzinoms.

Zweifelhafte oder dringend verdächtige Befunde werden in der internationalen Literatur, abweichend von den oben genannten, in Deutschland üblichen Kategorien, häufig auch unter der Kategorie „unklar“ bzw. „verdächtig“ zusammengefasst. Während sicher tumorpositive oder -negative Diagnosen

unmittelbar die Einleitung therapeutischer Schritte ermöglichen, besteht bei einer unklaren Diagnose weiterer Abklärungsbedarf. Die Abklärung kann an zusätzlich gewonnenen Proben erfolgen oder zum Teil auch durch die Anwendung adjuvanter Methoden. Letzteres erspart dem Patienten eine unnötige zusätzliche Belastung durch eine erneute Probengewinnung. Manche der adjuvanten Methoden, insbesondere die Immunzytochemie, dienen auch der Tumortypisierung, also der Zuordnung eines bereits zuvor gesicherten Tumors zu einer bestimmten Organherkunft. (Böcking, 1998) Grundzüge der adjuvanten Diagnostik sind im Folgenden wiedergegeben.

Adjuvante Methoden

Als adjuvante Methoden (Hilfsmethoden) werden in der Zytopathologie Methoden bezeichnet, die dazu verwendet werden, nach einer unklaren morphologischen Diagnose den Tumorverdacht abzusichern oder genauere Informationen über die Organzuordnung von Tumorzellen zu erhalten. (Feichter und Dalquen, 2000) Im Folgenden werden die im Funktionsbereich Cytopathologie des Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD) aktuell zur Diagnose verwendeten adjuvanten Methoden kurz skizziert.

Immunzytochemie

Bei der immunzytochemischen Untersuchung werden vorwiegend monoklonale Antikörper dazu verwendet, bestimmte membranäre, zytoplasmatische oder nukleäre Strukturen der Zellen anzufärben. Die Färbung liefert, je nach verwendeter Antikörperkombination, Informationen über die zytogenetische Herkunft einer Zellpopulation und/oder über den Grad der Differenzierung. (Feichter und Dalquen, 2000) So kann mithilfe dieser Methode z.B. die Differenzierung zwischen einem Adenokarzinom der Lunge und einem malignen Mesotheliom gelingen. Ein Adenokarzinom der Lunge kann typischer Weise positiv auf die folgenden Marker getestet werden: TTF-1, CEA, B72.3, Ber-EP4 und MOC-31. Zellen eines malignen Mesothelioms hingegen werden meist positiv auf die nun folgenden Marker getestet: Calretinin, Wt-1, CK5/6,

D2-40, BMA 120. Ein weiteres Beispiel ist die Differenzierung zwischen einem Adenokarzinom der Lunge und einer Adenokarzinom-Metastase. Ein Adenokarzinom der Lunge wird meist auf die folgenden Marker positiv getestet: TTF-1, CK7 Auf die nun folgenden Marker ist der Test allerdings meist negativ: CK20, Thyreoglobulin und CDX2. Bei einer Adenokarzinom-Metastase ist das genaue Gegenteil der Fall. (Goeckenjan *et al.*, 2011)

AgNOR-Analyse

Die Nukleolus-organisierenden Regionen (NOR) werden durch eine Silber (Ag)-Färbung hervorgehoben. Im Anschluss werden NOR pro Zellkern gezählt. Die Zahl der NOR korreliert mit dem Wachstumsverhalten der Zelle und ist daher in Tumorzellen gegenüber dem Ausgangsgewebe erhöht. (Feichter und Dalquen, 2000) Die Untersuchung wird bei der frühen Diagnostik von Mesotheliomen in serösen Ergüssen eingesetzt. Sie erlaubt durch die Anwendung von experimentell ermittelten Schwellenwerten die Unterscheidung zwischen reaktiven (benigen) und neoplastischen (malignen) Mesothelzellen. (Pomjanski *et al.*, 2001)

FISH

Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) werden tumorverdächtige Zellen auf Chromosomenaberrationen und bestimmte Genamplifikationen/-deletionen untersucht. (Feichter und Dalquen, 2000) Die FISH-Untersuchung an serösen Ergüssen kann bei der Unterscheidung zwischen malignen und reaktiven Mesothelzellen helfen. Dazu erfolgt eine Untersuchung auf die Deletion der 9p21-Region in der auch das $p16^{INK4A}$ -Gen liegt. Bei einer über dem experimentell bestimmten Schwellenwert liegenden Häufung von homozygoten und oder heterozygoten 9p21-Deletionen wird vom Vorliegen von malignen Zellen ausgegangen. Differentialdiagnostisch kommt neben dem malignen Mesotheliom auch ein metastasierendes Karzinom in Frage. (Onofre *et al.*, 2008) Durch die Verwendung von Chromosomenzählungs-Sonden (CEP) kann die häufig in malignen Tumoren vorkommende Aneuploidie durch

FISH-Untersuchungen nachgewiesen werden. (Brown *et al.*, 1994) Auch die Amplifikation des *HER-2/neu*-Gens, welche die Therapie beeinflusst, kann in zytologischem Untersuchungsmaterial von Mammakarzinomen mit Hilfe einer FISH-Untersuchung nachgewiesen werden. (Bozzetti *et al.*, 2002)

DNA-Bildzytometrie

Die zellgebundene DNA wird am zytologischen Präparat nach der Feulgen-Methode gefärbt. Die Färbung nach Papanicolaou und die Hämatoxylin-Färbung als Routinefärbungen der Zytopathologie sind für die DNA-Bildzytometrie ungeeignet. (Biesterfeld *et al.*, 2011) Im Anschluss an die Feulgen-Färbung wird die Lichtabsorption von tumorverdächtigen Zellen und, zwecks Eichung, auch von normalen Gewebezellen gemessen. Weicht der DNA-Gehalt von Werten einer unauffälligen proliferierenden, regenerierenden oder auch entzündlich veränderten Zellpopulation ab (zweifacher DNA-Gehalt oder ganzzahlige Vielfache hiervon, was einem doppelten Chromosomensatz inklusive ganzzahliger Verdopplungen hiervon entspricht), wird dies als DNA-Aneuploidie bezeichnet wie sie typischerweise in malignen Tumoren auftritt. (Schramm *et al.*, 2011) Die Untersuchung ist international durch die „European Society for Analytical and Cellular Pathology“ (ESACP) weitgehend standardisiert. (Haroske *et al.*, 1998) Die Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen maligner und benigner Ursache einer Läsion durch die DNA-Bildzytometrie ist für eine Vielzahl unterschiedlicher Lokalisationen belegt. (Biesterfeld und Deacu, 2009)

Exkurs zur Statistik

Bei der Beschreibung und Bewertung eines diagnostischen Tests kommen verschiedene Bereiche aus der Statistik zur Anwendung. Die Häufigkeit einer Erkrankung, die Prävalenz, wird durch ein einfaches Verhältnis angegeben. Die Prävalenz entspricht der Anzahl der Erkrankten in einer Bevölkerung geteilt durch die Gesamtheit der Bevölkerung. Die Qualität und die Aussagekraft eines Tests werden mit Hilfe bedingter Wahrscheinlichkeiten angegeben. Diese

bedingten Wahrscheinlichkeiten sind die Sensitivität, die Spezifität, der positive Vorhersagewert (PPV) und der negative Vorhersagewert (NPV). (Hilgers *et al.*, 2007)

Die Sensitivität ist definiert als die Zahl der Erkrankten mit positivem Testergebnis geteilt durch die Gesamtzahl der Erkrankten. Somit gibt die Sensitivität die Wahrscheinlichkeit für ein positives Testergebnis an unter der Bedingung, dass die getestete Person krank ist. Es handelt sich somit um ein Maß für die Empfindlichkeit eines Tests. (Hilgers *et al.*, 2007)

Auch die Spezifität ist eine Aussage zur Qualität eines Tests. Sie ist definiert als die Zahl der Gesunden mit einem negativen Testergebnis geteilt durch die Gesamtzahl der Gesunden. Sie gibt somit die Wahrscheinlichkeit für ein negatives Testergebnis an unter der Bedingung, dass die getestete Person gesund ist. Sie ist ein Maß für die Treffsicherheit des Tests (Hilgers *et al.*, 2007)

Auch wenn es intuitiv zunächst so erscheinen mag, ist die Umkehrung der Aussagen von Sensitivität und Spezifität nicht zulässig, da es sich um bedingte Wahrscheinlichkeiten handelt. Die Sensitivität sagt somit nichts darüber aus, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, die Krankheit zu haben unter der Bedingung eines positiven Testergebnisses. Letzteres ist die Definition des positiven prädiktiven Wertes (PPV). Im Gegensatz zur Sensitivität wird der PPV von der Häufigkeit der Krankheit in der zu untersuchenden Gruppe (Prävalenz) beeinflusst. Bei steigender Prävalenz steigt auch der PPV. Sind die Sensitivität eines Tests, die Spezifität eines Tests und die Prävalenz einer Krankheit bekannt, lässt sich der PPV mit der folgenden Formel berechnen (Hilgers *et al.*, 2007):

$$\text{PPV} = \frac{\text{Sensitivität} \times \text{Prävalenz}}{\text{Sensitivität} \times \text{Prävalenz} + (1 - \text{Spezifität}) \times (1 - \text{Prävalenz})}$$

Ähnlich wie sich Sensitivität und PPV zueinander verhalten, verhalten sich auch der NPV und die Spezifität zueinander. Der NPV ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, gesund zu sein, wenn ein negatives Testergebnis vorliegt. Anders als beim PPV bewirkt eine höhere Prävalenz einen niedrigeren NPV. Der NPV lässt sich bei gegebener Prävalenz, Sensitivität und Spezifität mit Hilfe der folgenden Formel berechnen (Hilgers *et al.*, 2007):

$$\text{NPV} = \frac{\text{Spezifität} \times (1 - \text{Prävalenz})}{\text{Spezifität} \times (1 - \text{Prävalenz}) + (1 - \text{Sensitivität}) \times \text{Prävalenz}}$$

Die oben angegebenen Definitionen beziehen sich jeweils auf die Grundgesamtheit. Das bedeutet, dass die genaue Berechnung nur möglich ist, wenn die gesamte Bevölkerung getestet werden würde. In der Praxis ist das Testen der gesamten Bevölkerung nicht umsetzbar. Daher werden diese Werte mit Hilfe einer Stichprobe (des untersuchten Patientenkollektivs) abgeschätzt. Dabei gilt, je größer eine Stichprobe ist, desto wahrscheinlicher stimmt die Schätzung mit dem tatsächlichen Wert überein. Alternativ ist es ebenfalls möglich, statt den Wert selbst zu schätzen, ein Intervall einzugrenzen, in dem der tatsächliche Wert mit einer 95 %-Wahrscheinlichkeit liegt. Dieses Intervall wird als 95 %-Konfidenzintervall (CI) bezeichnet. Für das CI gilt, je größer die Stichprobe und je kleiner die Varianz, desto kleiner ist auch das Intervall. (Hilgers *et al.*, 2007)

Die Konstruktion eines diagnostischen Tests ist häufig abhängig von einer Testvariablen. Für diese Testvariable gilt es, den geeigneten Schwellenwert zu finden. Der Schwellenwert legt dabei fest, welche Werte der Testvariable für ein positives Testergebnis und welche Werte für ein negatives Testergebnis stehen. Bei einer Veränderung des Schwellenwertes wirken die Sensitivität und die Spezifität als Antagonisten. So sinkt die Sensitivität bei steigender Spezifität und umgekehrt. Um dies zu veranschaulichen, gibt es die so genannte (receiver-operating characteristic) ROC-Kurve. Dabei wird in einem Koordinatensystem auf der x-Achse die Falschpositiv-Rate (=1-Spezifität) und auf der y-Achse die Richtigpositiv-Rate (Sensitivität) abgetragen. Darüber hinaus hat sich die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) als Maßzahl für die Qualität eines Tests etabliert. (Hilgers *et al.*, 2007)

Der AUC-Wert ist identisch mit der Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein zufällig aus der Gruppe der tatsächlich Positiven ausgewähltes Individuum ein positiveres Testergebnis aufweist, als ein zufällig aus der Kontrollgruppe ausgewähltes Individuum. Würde man beispielsweise einen Test beurteilen, bei dem ein kleiner Wert der Testvariablen einem positiven Testergebnis entspricht und ein großer Wert einem negativen Testergebnis, so gibt der AUC die Wahrscheinlichkeit an, dass ein zufällig ausgewähltes, tatsächlich positives

Individuum einen kleineren Wert der Testvariablen aufweist als ein zufällig ausgewähltes, tatsächlich negatives Individuum. Der AUC kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Ein zufälliges Ereignis würde eine ROC-Kurve aufweisen, die der Winkelhalbierenden entspricht, und somit einen AUC von 0,5 aufweisen. Ein perfekter Test würde einen AUC-Wert von 1 aufweisen. Ein ebenfalls hervorragendes Testergebnis würde der AUC-Wert 0 bedeuten, allerdings mit der Einschränkung, dass die Aussage des Tests ins Gegenteil verkehrt ist. (Abel, 1993)

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests auf Unabhängigkeit kann geprüft werden, ob bestimmte Merkmale voneinander abhängig sind. Dabei wird die Ausgangshypothese (Nullhypothese), dass die Merkmale unabhängig sind, zu Gunsten der Alternativhypothese (die Merkmale sind voneinander abhängig) abgelehnt, sobald das zuvor festgelegte Signifikanzniveau erreicht wird. (Rönz und Eckstein, 1994) Üblicherweise wird ein Signifikanzniveau von 95 % gewählt, welches mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 % korreliert, die Nullhypothese irrtümlich abzulehnen ($p = 0,05$). (Hilgers *et al.*, 2007)

Werden anhand der gleichen Stichprobe mehrere Merkmale untersucht, so ergibt sich die Problematik einer multiplen Testung. Würde man beispielsweise zwei unabhängige statistische Tests mit einem jeweiligen Signifikanzniveau von 95 % durchführen, so sinkt das Signifikanzniveau der multiplen Testung auf $0,95 \times 0,95 = 0,9025$ ab. Eine fälschliche Annahme der Alternativhypothese ist somit nicht mehr nur zu 5 % sondern zu 9,75 % wahrscheinlich. (Hilgers *et al.*, 2007) Als Ausweg bietet sich hier die Bonferroni-Korrektur an.

Sie ist eine einfache, aber auch konservative Methode (konservativ sind Methoden welche die Ausgangshypothese favorisieren), dem abnehmenden Signifikanzniveau bei einer multiplen Testung zu begegnen. Dabei wird die akzeptierte Fehlerwahrscheinlichkeit α zu gleichen Teilen auf die durchgeführten Tests aufgeteilt. Dadurch wird gewährleistet, dass das Signifikanzniveau des gesamten multiplen Tests nicht unter das beabsichtigte Maß sinkt. Um zum Beispiel bei fünf unabhängigen einzelnen Tests ein gesamtes Signifikanzniveau von 95 % zu halten, wird die akzeptierte Fehlerwahrscheinlichkeit (hier $\alpha = 5\%$) durch die Anzahl der Tests (5) geteilt.

Daraus folgt, dass alle fünf Tests ein Signifikanzniveau von 99 % ($\alpha = 1\%$) erreichen müssen, damit der multiple Test ein Signifikanzniveau von 95 % halten kann. (Bland und Altman, 1995)

Vermeidung von Fehlern in der Datenverarbeitung

Je größer eine Datenbank ist, desto wichtiger ist es, einige Grundsätze der Datenverarbeitung zu beachten, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen. Beim Erstellen einer großen Patientendatenbank aus verschiedenen Akten wird häufig ein ausgedruckter Fragebogen zur Hilfe genommen. Der Nachteil eines Papierfragebogens ist, dass die Möglichkeit von Übertragungsfehlern verdoppelt wird. Die Fehler können nicht nur bei der Übertragung der Daten auf den Fragebogen geschehen, sondern auch bei der Übertragung der Daten auf die Datenbank im PC. Um mit der Datenbank arbeiten zu können, ist es darüber hinaus wichtig, dass die erhobenen Daten einheitlich eingegeben werden. Wenn ein Mammakarzinom zum Beispiel in verschiedenen möglichen Formen, wie z.B. Mamma Ca, Mamma-Ca., Mammakarzinom und Brustkrebs, in einer Datenbank vorliegt, so erschwert dies die spätere Auswertung und macht sie anfälliger für Fehler. Auf der anderen Seite hilft die Verwendung eines Fragebogens bei der Standardisierung der erhobenen Merkmale.

Die zu erhebenden Daten der Studie (Ilse *et al.*, 2014) an Bronchialaspiraten wurden mit Hilfe eines standardisierten Papierfragebogens festgelegt. Um die Übertragungsfehlerrate möglichst niedrig zu halten, wurden die Daten direkt von der Patientenakte auf den PC übertragen. Bei der deutlich größeren Kohorte der Studie (Ilse *et al.*, 2013) an Pleuraergüssen wurde ebenfalls ein Fragebogen verwendet. Letzterer wurde allerdings als Eingabemaske auf dem PC programmiert, um so die Übertragungsfehlerrate noch weiter zu senken. Der Fragebogen war dabei so entworfen worden, dass einmal verwendete Begriffe, wie z.B. Mammakarzinom, in einem Drop-down-Menü angeboten wurden. Gleichzeitig wurde jeder verwendete Begriff in einer gesonderten Liste gespeichert. Somit wurde ein hohes Maß an Standardisierung bereits durch das Drop-down-Menü gewährleistet. Die

zusätzlich entstandenen Listen wurden auf die unterschiedliche Bezeichnung gleicher Merkmale überprüft, um die Standardisierung weiter voranzutreiben.

Die Kontrolle der Dateneingaben erfolgte, soweit möglich, durch einen automatisierten Abgleich der Daten, die in der Cytopathologie mit den Daten die in der neu erstellten Datei gespeichert wurden. Gefundene Abweichungen wurden durch eine erneute manuelle Sichtung der Ursprungsdaten geklärt.

Eine stichprobenartige Überprüfung der klinischen Daten erfolgte an einer Teilmenge der Fälle, die aus der Uniklinik Düsseldorf stammten.

Ausblick auf zukünftige Entwicklungen

Pleuraergüsse als Modellsystem zum Testen von Tumormarkern

Pleuraergüsse für das Testen von Tumormarkern zu verwenden hat einige Vorteile. Dadurch, dass die allermeisten malignen Tumore in der Pleurahöhle Metastasen sind (Scherpereel, 2007), kommt in der Pleura ein breites Spektrum an Tumorentitäten vor. Fast alle malignen Tumore können die Pleura beteiligen. (Loddenkemper, 2005) Allerdings ist zu berücksichtigen, dass einige Tumorentitäten häufiger vorkommen als andere. Auch wenn je nach Quelle die Verteilung stark schwanken kann, so sind Lungenkrebs und Brustkrebs die häufigsten Primärtumore der Pleurametastasen. (Loddenkemper, 2005; Scherpereel, 2007) Loddenkemper gibt die Quelle des Primärtumors in seiner Zusammenfassung von Zytologie-Übersichten wie folgt an: Lungenkrebs mit 25 %-52 %, Brustkrebs mit 3 %-27 %, Lymphom mit 12 %-22 % und andere Tumore mit 29 %-46 %. (Loddenkemper, 2005) In unserer Studie an prospektiv gesammelten Pleuraergüssen waren die Tumorentitäten wie folgt verteilt: 46 % (111/241) Lungenkarzinome, 12 % (29/241) Mammakarzinome, 10 % (23/241) Lymphome und Leukämien, 12 % (30/241) Karzinome des Gastrointestinaltraktes sowie 17 % (42/241) andere Tumore (Ilse *et al.*, 2013). Fasst man wie bei Loddenkemper die Tumore des Gastrointestinaltraktes mit der Kategorie andere Tumore zusammen, dann liegen unsere Zahlen alle innerhalb der von Loddenkemper angegebenen Intervalle.

Im Gegensatz zur Untersuchung von reinen Tumorzelllinien wird durch die Verwendung von Pleuraergüssen eine breite Vielfalt an Tumoren unterschiedlicher genetischer Ausstattung innerhalb der gleichen Tumorentität abgedeckt. Wie bereits zuvor erwähnt, wird die Entstehung eines malignen Tumors mit einem Evolutionsprozess verglichen, an dessen Ende ein maligner Tumor mit bestimmten Eigenschaften steht. Dabei können diese Eigenschaften auf unterschiedliche Art und Weise erlangt werden. Bei Tumorzelllinien werden aber nur Klone jeweils eines bestimmten Tumors untersucht. Bei der Untersuchung an Pleuraergüssen kommen analog dazu mehrere individuelle Typen des gleichen Tumors zur Untersuchung.

Pleuraergüsse kommen in der Praxis relativ häufig vor. Die zu untersuchende Flüssigkeit fällt bei der Behandlung der Symptome als Restprodukt an und erfordert somit keine zusätzliche, rein auf die Forschung bezogene, investigative Materialentnahme. Darüber hinaus werden die Pleuraergüsse häufig auch direkt von malignen Tumoren verursacht, deren Zellen dann im Pleuraerguss zu finden sind. Um einen solchen malignen Pleuraerguss (MPE) in der Diagnostik zu identifizieren, ist eine zytologische Untersuchung unumgänglich. Somit liegt die Fragestellung nach einem MPE im Untersuchungsmaterial in der Pathologie relativ häufig vor. (Feichter und Dalquen, 2000) Diesen Sachverhalt konnten wir mit unserer Untersuchung an Pleuraergüssen untermauern. In einem Zeitraum von 20 Monaten konnten 1270 untersuchbare Pleuraergüsse von unterschiedlichen Patienten gesammelt werden. Von diesen 1270 Proben konnten 472 anhand der klinischen Daten als maligner Pleuraerguss identifiziert werden (Ilse *et al.*, 2013).

In einem MPE liegen nicht nur Tumorzellen, sondern auch Nicht-Tumorzellen, wie Entzündungszellen (Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen) oder Zellen der anatomischen Auskleidung der serösen Höhle (Mesothelien), vor. Diese Durchmischung gilt allerdings auch für Untersuchungen an Tumorgeweben, da ein maligner Tumor auch Nicht-Tumorzellen zur Bildung des Tumorgewebes rekrutiert (z.B. Angiogenese). (Hanahan und Weinberg, 2011) Für die isolierte Betrachtung von einzelnen Tumorzellen, wie es bei der Untersuchung an Tumorzelllinien möglich ist, wäre somit bei Pleuraergüssen zusätzlicher Untersuchungsaufwand, wie

z.B. eine Laser-Mikrodissektion, nötig, um die Krebszellen zu separieren. (Schneider *et al.*, 2011)

Die Zusammensetzung von Pleuraergüssen variiert stark. Pleuraergüsse können sowohl proteinreich als auch proteinarm sein und darüber hinaus Schleim, Lipide oder Blut enthalten. Diese Variabilität ist sowohl ein Vorteil als auch ein Nachteil, denn dies führt dazu, dass das System, mit dem der Biomarker verwendet wird, ebenfalls auf die Probe gestellt wird.

Maligne Pleuraergüsse stellen fast immer ein fortgeschrittenes Tumorstadium dar, schon weil die meisten in der Pleura manifestierten Tumore Metastasen sind. (Scherpereel, 2007) Entsprechend kann ein Tumormarker an Pleuraergüssen auf seine allgemeine Funktionalität hin geprüft werden, nicht aber auf die Fähigkeit, Tumore in frühen Stadien zu erkennen. Im Weiteren sind Pleuraergüsse durch ihr Auftreten in späten Tumorstadien nicht als Testmaterial für eine Screening-Untersuchung geeignet. Für eine Screening-Untersuchung eignen sich eher Testmaterialien, die auch bei gesunden oder vermeintlich gesunden Personen entnommen werden können, wie zum Beispiel Blutplasma.

Bei Ergebnissen aus Untersuchungen an Pleuraergüssen ist zu berücksichtigen, dass Pleuraergüsse bei gesunden Personen nicht vorkommen. Entsprechend können Negativkontrollen nur am Material von Patienten mit einer anderen, einen Pleuraerguss verursachenden Erkrankung gebildet werden. Dass eine solche andere Erkrankung einen Einfluss auf das Testergebnis haben könnte, ist somit nicht sicher auszuschließen. Allerdings ist auch bei Kollektiven mit gesunden Personen ein Einfluss durch unbekannte Faktoren nicht sicher auszuschließen.

Entwicklung einer Vorsorgeuntersuchung für maligne Tumore unter Einbeziehung des *SHOX2*-Methylierungs-Markers.

Der *SHOX2*-Test auf Methylierung könnte unter Umständen zu einem Test weiterentwickelt werden, der der Früherkennung von malignen Tumoren auf der Basis einer Blutplasmauntersuchung dient. Im Jahr 2011 zeigten Kneip *et al.*, dass der Test auch an freier, im Blutplasma zirkulierender DNA angewandt

werden kann, und berichteten über eine Sensitivität von 60 % bei 90 % Spezifität. Das Patientenkollektiv dieser Studie bestand hauptsächlich aus Patienten mit Lungenkarzinomen und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen. Nicht-Lungentumore sind in dieser Studie zwar den Kontrollen zugeordnet worden, um die Spezifität für Lungenkrebs zu bestätigen, allerdings waren Nicht-Lungentumore in dieser Studie deutlich unterrepräsentiert und wiesen keine hohe Variabilität der Tumorentitäten auf. Nur vier der 343 untersuchten Patienten wiesen einen Nicht-Lungentumor auf, alle vier waren Prostatakarzinome. Allerdings bestätigen die Kombination von 60 % Sensitivität mit 90 % Spezifität sowie der in der Studie angegebene AUC-Wert von 0,91 die hohe Qualität des *SHOX2*-Tests auch für die Anwendung an Blutplasma. (Kneip *et al.*, 2011)

In unserer Studie an Pleuraergüssen haben wir die Lokalisation des Primärtumors überprüft, dessen Metastase den Pleuraerguss verursachte. Der *SHOX2*-Test detektierte hierbei 40 % (44/111) der von einem Lungentumor stammenden Metastasen. Darüber hinaus wurden aber auch 38,5 % (50/130) der Metastasen, die nicht von einem Lungentumor stammten, detektiert. Die nicht aus der Lunge stammenden Tumore sind in Tabelle III unserer Studie an Pleuraergüssen aufgelistet. Der Unterschied der Erkennungsraten war nicht signifikant ($p = 0,85$). Daraus folgt, dass der *SHOX2*-Test in der Lage ist, neben Lungentumoren, auch Tumore anderer Herkunft zu detektieren. (Ilse *et al.*, 2013) Es wäre interessant zu wissen, ob sich diese Eigenschaft auch bei der Verwendung von Blutplasma als Untersuchungsmaterial bestätigen ließe.

Bei einer Anwendung als Vorsorgeuntersuchung sind die Ansprüche an das Testsystem bezüglich der Sensitivität und Spezifität besonders hoch. Dies liegt darin begründet, dass Sensitivität und Spezifität zwar eine Aussage über die Qualität eines Tests liefern, aber keine Aussage über die Relevanz des Testergebnisses für den Patienten treffen. Aus Sicht des Patienten sind die Werte für den PPV und den NPV interessanter. Diese Werte können mit denen im Exkurs zur Statistik angegebenen Formeln berechnet werden. Wie diese Formeln zeigen, werden sowohl PPV als auch NPV sehr stark von der Prävalenz beeinflusst, welche bei Vorsorgeuntersuchungen naturgemäß sehr niedrig ist. Betrachtet man die Formel für den PPV genauer, fällt auf, dass sich

der PPV proportional zur Spezifität und zur Prävalenz verhält, während sich der NPV proportional zur Sensitivität, aber antiproportional zur Prävalenz verhält. Da bei einer Vorsorgeuntersuchung der Anteil der nicht erkrankten Patienten sehr hoch ist, ist die Prävalenz entsprechend niedrig. Daraus folgt, dass der PPV durch die niedrige Prävalenz negativ beeinflusst wird, während der NPV positiv beeinflusst wird. Damit PPV und NPV bei einer Vorsorgeuntersuchung möglichst große Werte annehmen, ist für einen hohen PPV eine besonders hohe Spezifität wichtig. Der NPV wird durch die niedrige Prävalenz bereits sehr stark positiv beeinflusst. Entsprechend könnte man argumentieren, dass eine hohe Sensitivität nicht so wichtig sei. Allerdings beeinflusst eine niedrige Sensitivität die Kosten-Nutzen-Rechnung des Tests negativ.

Wir konnten in unserer Untersuchung an Pleuraergüssen zeigen, dass der *SHOX2*-Test durch eine Modifikation des Schwellenwertes so umgestellt werden kann, dass er bei Pleuraergüssen eine Spezifität von 100 % (443/443) (95 % CI = 99,2 %–100 %) bei einer Sensitivität von 17,8 % (49/276) (95 % CI = 13,4 %–22,8 %) aufweist. Der *SHOX2*-Test erreichte bei Pleuraergüssen einen AUC-Wert von 0,72. (Ilse *et al.*, 2013) In der Blutplasma-Studie des *SHOX2*-Tests wurde ein AUC-Wert von 0,91 berichtet. (Kneip *et al.*, 2011) Entsprechend kann man erwarten, dass der Test an Blutplasma bei einer äquivalenten Umstellung des Schwellenwertes die von uns an Pleuraergüssen ermittelte Sensitivität von 17,8 % übertreffen würde.

In unserer Studie an Bronchialaspiraten konnten wir zeigen, dass der *SHOX2*-Marker durch die Anwendung weiterer Tumormarker komplementiert werden kann. Weiter zeigten wir, dass ein Tumormarkerpanel bestehend aus Methylierung quantifizierenden Tests der Gene *SHOX2*, *RASSF1A*, *APC* und *p16^{INK4A}* mit der Bedingung, dass zwei der Tests positiv ausfallen müssen, eine Spezifität von 100 % (43/43) (95 % CI: 92 %-100 %) und eine Sensitivität von 47 % (35/75) (95 % CI: 35 %-59 %) liefert. (Ilse *et al.*, 2014) Sollten diese Werte an einer größeren Patientenkohorte bestätigt werden, könnte dieses Tumormarkerpanel auch eine interessante Alternative zu einer alleinigen *SHOX2*-Testung bieten.

Zwar mögen Werte wie 17,8 % oder 47 % Sensitivität nicht besonders hoch klingen, aber durch die Kombination mit 100 % Spezifität würden sie bedeuten, dass bei einem Screening zwar nur jeder 5te, respektive jeder 2te Fall entdeckt würde, aber dass diejenigen, die ein positives Testergebnis erhalten, auch mit Sicherheit einen malignen Tumor haben. Dies liegt daran, dass eine Spezifität von 100 % unabhängig von der Prävalenz automatisch zu einem PPV von 100 % führt (siehe die im Exkurs zur Statistik genannte Formeln).

Es wäre daher besonders interessant zu sehen, wie der *SHOX2*-Test bei einer groß angelegten Studie an Blutplasma abschneidet, nachdem der Test durch eine Veränderung des Schwellenwertes auf eine äußerst hohe Spezifität eingestellt wurde. Darüber hinaus bleibt zu klären, ob der *SHOX2*-Test an Blutplasma ebenfalls in der Lage ist Tumore anderer Herkunft, wie zum Beispiel Mammakarzinome, zu detektieren, und ob andere Tumormarker auch bei Blutplasmaproben als Testmaterial dazu in der Lage sind, den Test zu komplementieren.

Thesen

- Die Quantifizierung von *SHOX2*-Methylierung (*SHOX2*-Test) ist grundsätzlich dazu geeignet, die zytologische Untersuchung an Pleuraergüssen und an Bronchialaspiraten zu ergänzen.
- Der *SHOX2*-Test ist neben der Detektion von Lungenkarzinomen auch in der Lage, Tumore anderen Ursprungs zu detektieren.
- Im Weiteren ist der *SHOX2*-Test dazu in der Lage, andere auf der Quantifizierung von Methylierung basierende Biomarker zu komplementieren.
- Unsere Ergebnisse könnten darüber hinaus dazu beitragen, die Untersuchung an Pleuraergüssen als Modellsystem für die Untersuchung von häufig pleural metastasierenden malignen Tumoren (z.B. Lungen- und Brusttumore) zu etablieren.
- Auch haben unsere Ergebnisse Erkenntnisse erbracht, die die Entwicklung einer auf dem *SHOX2*-Test basierenden Krebsvorsorgeuntersuchung beeinflussen könnten.

Publication I

SHOX2 DNA Methylation Is a Tumour Marker in Pleural Effusions

Authors: Peter Ilse, Stefan Biesterfeld, Natalia Pomjanski, Christian Fink and Martin Schramm

Institute: Department of Cytopathology, Institute of Pathology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

Published: Cancer Genomics & Proteomics
September-October 2013 vol. 10 no. 5 217-223

Online available: <http://cgp.iarjournals.org/content/10/5/217.long>

Abstract

Background: The published sensitivity of cytological examination for malignant pleural effusions (MPE) ranges between 50 % and 71 %. The Epi *proLung*® BL Reflex Assay (Epigenomics AG, Berlin, Germany) has been reported as being highly sensitive and specific for lung cancer using bronchial aspirates. We hypothesize the assay to be of use in the detection of MPE. **Materials and Methods:** To test our hypothesis, we performed a retrospective cohort study on pleural effusion specimens of 1,270 patients (472 cases and 798 controls). The assay is based on quantification of methylated Short Stature Homeobox gene two (*SHOX2*) DNA in the specimen measured via multiplex real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) on bisulfite-converted DNA. **Results:** Surprisingly, the assay detects metastases of lung cancer, as well as metastases of other malignant tumours. With a re-defined cut-off criterion, the test achieved a sensitivity of 39.5 % with a specificity of 96.2 %. **Conclusion:** This assay is able to detect MPE while not limited to the detection of lung cancer.

Introduction

Although epidemiological studies are not available, the annual incidence of pleural effusion in the 27 European Union Member States (EU27) is estimated to be more than 1,600,000, based on the observed incidence in a well-defined region in central Bohemia and EU27 demographic data (European Commission, 2013; Marel *et al.*, 1993). Each year, more than 1,360,000 patients are subjected to thoracocentesis in the United States, even, if only the leading causes of pleural effusion are included (Light, 2002). The reported share of patients with a malignant pleural effusion (MPE) is 25 % to 45 % (Bedrossian, 1994; Motherby *et al.*, 1999), highly depending on the observed population and study design, but nevertheless representing a common problem. 15 % of patients with a malignant tumour in a post-mortem series presented pleural effusion (Rodriguez-Panadero *et al.*, 1989). The high probability of a malignant

cause of pleural effusion necessitates thoracocentesis and detailed cytological analysis in every case. Non-malignant aetiologies of pleural effusion include congestive heart failure, infection, pulmonary embolus or infarction, cirrhosis and collagen disease (Bedrossian, 1994). Malignant tumours presenting with MPE include cancer of the lung (approximately one third of the MPE), breast, ovary, gastrointestinal tract, mesothelioma and lymphoma (Antony *et al.*, 2001; Bedrossian, 1994). In the vast majority of cases, MPE is a sign of metastasized cancer, meaning that a curative therapy is no longer reasonable. This necessitates the accurate diagnosis of MPE and avoidance of invasive diagnostic procedures in order to prevent further stress for the patient.

Pleural fluid cytology for the diagnosis of MPE is the standard procedure, with a high specificity (97 % to 100 %) but limited sensitivity (50 % to 71 %) (Motherby *et al.*, 1999). In addition, some pleural fluid specimens cannot be diagnosed cytologically as being definite tumour-positive or -negative (Bedrossian, 1998), leading to an equivocal result in 5.8 % of cases in a previous study from our Department (Motherby *et al.*, 1999). Thus, there is a need for additional methods, preferentially on the same pleural fluid, again to prevent repeated diagnostic efforts and harm of the patient. There are numerous different strategies to enhance the diagnostic yield of cytology (Mohanty and Dey, 2003; Sriram *et al.*, 2011). These strategies include morphological, DNA, RNA, methylation and protein analyses (including immunocytochemistry), electron microscopy, analysis of the argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), flow cytometry, image cytometry, fluorescence in situ hybridization (FISH) and polymerase chain reaction (PCR)-based assays.

Aberrant DNA methylation plays an important role in carcinogenesis (Ting *et al.*, 2006) and is purported to be a valuable cancer biomarker (Esteller, 2007; Laird, 2003). Epigenetic cancer biomarkers are independent of classical morphology and thus exhibit great potential to overcome the limitations of cytology. The usefulness of epigenetic cancer biomarkers has been shown for body fluids, such as bronchial aspirate (Schmiemann *et al.*, 2005), sputum (Belinsky *et al.*, 2006; Palmisano *et al.*, 2000), plasma (Hsu *et al.*, 2007) and serum (Benlloch *et al.*, 2006). Short Stature Homeobox gene two (SHOX2) DNA

methylation in particular has been shown to occur at a high prevalence (96 %) in carcinomas of the lung, especially in squamous cell carcinomas and small cell carcinomas, compared to matched morphologically normal adjacent tissues from the same patients (Schneider *et al.*, 2011). In addition, SHOX2 DNA methylation has been proven to be a useful biomarker in bronchial aspirates to detect lung cancer, even subsequent to tumour-negative or equivocal cytology. The ability of SHOX2 methylation was successfully tested and validated in two case-control studies, including 523 and 250 patient samples, respectively, with high sensitivity (78 %) and specificity (96 %) (Dietrich *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2010). This led to the development of the Epi *proLung*® BL Reflex Assay (Epigenomics AG, Berlin, Germany), an in vitro diagnostic test kit to aid pathologists in the diagnosis of lung cancer. SHOX2 encodes for a homeo-domain-transcription factor and has been identified as highly homologous to the short stature homeobox gene SHOX. Both genes are involved in skeletogenesis and heart development (Blaschke *et al.*, 2007; Blaschke *et al.*, 1998; Clement-Jones *et al.*, 2000).

The objective of our current study was to analyze the diagnostic value of testing SHOX2 DNA methylation in a retrospective cohort of pleural effusions sent to the Department of cytopathology. Furthermore, we wanted to confirm if aberrant SHOX2 DNA methylation is specific to lung carcinoma, as suspected in recent studies (Dietrich *et al.*, 2012; Kneip *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2011), or if the SHOX2 DNA methylation marker may also be of use to identify other tumour entities.

Materials and Methods

Study design. The study was a retrospective cohort study, and the pleural effusions were collected before the examination started. The specimens were examined blinded for the reference standard, and the reference standard was obtained blinded for the examination data. The study was approved by the Local Ethics Committee (#3383).

Study inclusion criteria. First-time pleural effusion samples of 1,617 patients were submitted to the Department of Cytopathology between January 2010 and August 2011. Only specimens from hospitals submitting more than 20 specimens during the mentioned period were included.

Cytological diagnosis. The submitted native pleural effusion fluid (usually about 50 ml) was processed according to standard laboratory protocols. In brief, the specimens were centrifuged at 670 ×g for 5 min. The supernatant was transferred to a new container. Eight smears were prepared with aliquots of the resuspended pellet. Three of them were stained according with May-Grünwald-Giemsa. The other five smears were fixated by the Delaunay method and stained according to Papanicolaou. A final cytological diagnosis was made by experienced cytopathologists, including diagnostic immunocytochemistry, DNA image cytometry or AgNOR analysis, when necessary.

Sample preparation. Remaining material from the pellet was preserved in Saccomanos fixative [50 % (v/v) ethanol, 2 % (w/v) polyethylene glycol 1,500, and 60 mg/l rifampicin] and stored at 4°C until further use. DNA extraction and bisulfite conversion were performed with 80 µl of the fixed sample using the Epi proLung® BL DNA Preparation Kit (Epigenomics AG). The samples were prepared in groups of 22 samples, together with positive and negative controls from the Epi proLung® BL Work Flow Control Kit (Epigenomics AG).

Real-time PCR. The real-time PCR was performed using the Epi proLung® BL real-time PCR Kit (Epigenomics AG), and a Applied Biosystems® 7500 Fast real-time PCR instrument (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). The Epi proLung® BL real-time PCR Kit was designed to detect lung cancer in bronchial lavage specimens. The PCR is a multiplex real-time PCR with two targets. The first target is a methylation-sensitive sequence of SHOX2. The second target is a methylation independent sequence of the beta-actin gene (ACTB). According to the PCRkit manual, the PCR was performed in triplets of each sample, positive control, negative control and calibrator provided by the work flow kit. A PCR run was valid if the following criteria were met: two out of three replicates of the negative control with a cycle threshold (Ct) value

Ct(SHOX2) ≥ 38 and a Ct(ACTB) of between 28 and 37; all replicates of the positive control with a Ct(SHOX2) ≤ 37 and a Ct(ACTB) ≤ 31 ; two or more of the calibrator replicates with Ct(ACTB) ≤ 32 and a $\Delta\text{Ct}(\text{Cal}) [= \text{Ct}(\text{SHOX2}) - \text{Ct}(\text{ACTB})]$ in the range of -2.6 and -0.6. The measurement of a sample was valid if the PCR run was valid and if more than one of the three replicates had a Ct(ACTB) of 29 or less.

Data and statistical analysis. For each valid sample, a relative methylation value was determined using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) in which the frequency of methylation is inversely proportional to the $\Delta\Delta\text{Ct}$ value and can be approximated using the formula: Methylation (%) = $100\% / 2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$. According to the Epi proLung® BL kit manual, a $\Delta\Delta\text{Ct}$ equal or below 9.5 would define the sample as being SHOX2 methylation-positive and therefore as lung cancer-positive. The cut-off had been determined for bronchial lavage samples (Dietrich *et al.*, 2012). Examining pleural effusions, we reviewed this cut-off and used the receiver operating characteristic (ROC) to determine an optimal cut-off for pleural effusions. Invalid measured samples and samples with indistinct reference standard were excluded from this analysis. All statistical data were calculated using R (version 3.0.1) (R Core Team, 2013). If not otherwise stated, significance was calculated using the “Pearson’s Chi-square Test for count data” without the Yates’ continuity correction. The level of significance was set at $p = 0.05$. In cases of multiple testing, the individual level of significance for each test was adjusted using the Bonferroni correction. The calculation of the ROC, the 95 % confidence interval (CI) for the ROC and the area under the ROC curve (AUC) was carried out using the R package “pROC” (version 1.5.4) (Robin *et al.*, 2011). Contingency tables were used to analyse the categorical data provided by both index tests and reference standard to determine the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of cytology and *SHOX2* methylation. 95 % Confidence intervals (CI) are given, using the R package “bdpv” (version 1.0) (Schaarschmidt, 2012).

Reference standard. Clinical follow-up was obtained by review of the patients’ medical files. A reference standard (malignant pleural tumour present/absent) was compiled for each patient. Special emphasis was placed on the final clinical

decision regarding the underlying cause of the pleural effusion, existence of a malignant tumour from the patients' history (confirmed by histology or adequate tumour therapy) and tumour exclusion by medical imaging.

Results

The flow of the patients through the study is presented in a Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) diagram (Figure 2) (Bossuyt *et al.*, 2003). Pleural effusion samples of 1,617 patients were collected. Out of these, 172 specimens were excluded from the study either because the material was not sufficient for DNA extraction (no visible pellet after centrifugation), or because the follow-up data were inaccessible due to missing patient's medical files or rejection of the hospital's participation in the study. In the case of 175 patients with tumours, the reference standard could not be definitively determined because of comorbidity. Therefore, the follow-up reference standard was evaluated regarding 1,270 out of the total of 1,445 patients. The clinical characteristics of the 1,270 patients are presented in Table I.

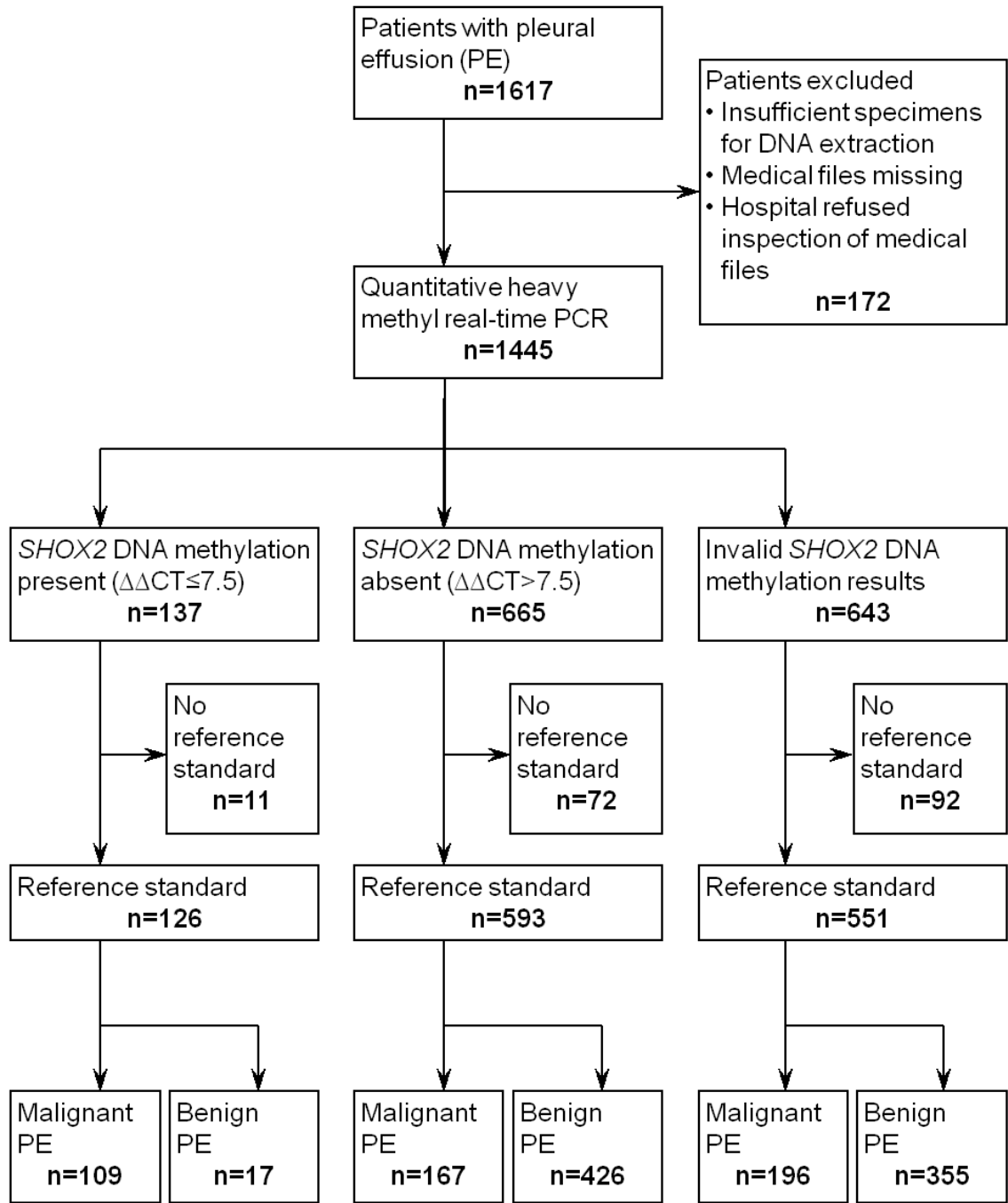


Figure 2: The figure presents the data of our study on pleural effusion (PE) in a flow chart according to the STARD initiative (Bossuyt *et al.*, 2003).

All 1,445 pleural effusions were analysed using the Epi proLung® BL Reflex Assay. A valid measurement (according to the assay's manual) was achieved for 802 specimens (55.5 %), leaving 643 specimens (44.5 %) with invalid measurements. The Ct(ACTB) criterion was the most frequent reason for invalid measurements. The reference standard was evaluable for 719 out of the 802 specimens with valid measurements, and for 551 out of the 643 of those with invalid measurements. Of the 1,270 specimens with an evaluable reference standard, the 719 patients with valid test results were compared to the 551 with invalid test results for the parameters gender, follow-up result, cytological examination result and age. Both groups were not significantly different in their distribution between the sexes ($p = 0.80$), their follow-up result ($p = 0.30$), cytological examination result ($p = 0.63$), or in the distribution of their age ($p = 0.02$) (acceptable level of significance, $p < 0.0125$ according to Bonferroni correction).

The next step was comparing the 719 valid *SHOX2* methylation measurements with the corresponding follow-up diagnoses. The reference standard defined 276 of these as positive and 443 as negative. With the cut-off criterion of $\Delta\Delta Ct \leq 9.5$ as stated by the assay, 138 of the 276 positive samples had a correct positive test result (sensitivity = 50.0 %, 95 % CI = 43.9 %-56.1 %). Out of the 443 negative samples, there were 373 with a correct negative test result (specificity = 84.2 %, 95 % CI = 80.5 %-87.5 %). The cut-off criterion of the assay had been determined for bronchial aspirates (Dietrich *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2010). In order to adjust the cut-off for use with pleural effusions, the cut-off criterion was optimized by analyzing the test with its receiver operating characteristic (ROC) curve. The area under the ROC curve (AUC) was 0.72 (95 % CI = 0.68-0.76) and the new cut-off determined as an optimization between sensitivity and specificity was therefore $\Delta\Delta Ct \leq 7.5$. With this cut-off, the test achieved a sensitivity of 39.5 % (109/276) (95 % CI = 33.7 %-45.5 %) and a specificity of 96.2 % (426/443) (95 % CI = 93.9 %-97.7 %).

Publication I

Table I: Clinical characteristics of the patient population. The table presents the data of 1,270 patients with evaluable reference standard.

	Benign pleural effusion ^a (n = 798)		Malignant pleural effusion ^a (n = 472)	
	Female	Male	Female	Male
Frequency	333	465	240	232
Age				
Average	73.4	70.0	67.3	67.7
Standard deviation	15.6	14.4	13.1	11.7
Median	77	73	69	70
Range	4 – 97	2 – 96	20 – 96	3 – 90
Frequency	333	465	240	232
Benign conditions ^b				
Infectious disease ^c	171	255	19	33
Congestive heart failure	260	301	26	17
Gastrointestinal disease ^d	14	35	4	5
Trauma/hemothorax	18	21	1	
Renal failure	99	147	21	26
Post-surgery	31	31	5	7
Collagen vascular disease ^e	8	8	2	2
Others ^f	113	143	39	61
Malignant conditions ^g				
Lung cancer	1	4	71	125
Breast cancer	14	1	101	
Gastrointestinal cancer ^h	6	10	30	49
Lymphoma/leukaemia ⁱ	10	4	21	21
Mesothelioma			2	9
Others ^j	13	31	44	67
Cancer therapy ^k				
Surgery	29	34	114	81
Radiotherapy	11	7	80	66
Chemotherapy	17	16	160	150
Pleurodesis			48	44
Stem cell therapy		1	1	8

Unless otherwise stated, the data are presented as frequency.

- a. According to reference standard criteria.
- b. Comorbidities are frequent.
- c. Pneumonia (331); empyema (38); mediastinitis (1); pleuritis (35); sepsis (60); tuberculosis (13).
- d. Liver cirrhosis (46); pancreatitis (12).
- e. Lupus erythematosus (7); rheumatoid arthritis (13).
- f. Amyloidosis (1); sarcoidosis (6); chronic obstructive pulmonary disease (199); emphysema (24); myocardial infarction (22); cardiac arrhythmias (104).
- g. Some patients developed more than one tumour.
- h. Cholangiocarcinoma (4); colorectal carcinoma (38); gastric carcinoma (20); pancreatic carcinoma (21); esophageal carcinoma (12).
- i. Acute myeloid leukaemia (4); chronic myelogenous leukaemia (7); Hodgkin lymphoma (3); myelodysplastic syndrome (6); precursor and mature B- and T-cell neoplasms (35); unclassified lymphoma (1).
- j. Carcinoma (6) and melanoma (2) of the skin; carcinoma of the oropharynx (6), larynx (6), salivary gland (2), thyroid (4), vulva (2), uterine cervix (2), endometrium (1), ovary (23), prostate (28), urinary system (23), kidney (17); hepatocellular carcinoma (7); primary peritoneal carcinoma (1); Kaposi sarcoma (2); rhabdomyosarcoma (1); synovial sarcoma (1); extraskeletal Ewing's sarcoma (1); uterine sarcoma NOS (1); medulloblastoma (1); paraganglioma (1); cancer of unknown primary (17).
- k. Repeated therapies are only mentioned once.

The cytological examination of these specimens achieved 52.5 % (145/276) (95 % CI = 46.5 %-58.6 %) sensitivity and 99.8 % (442/443) (95 % CI = 98.7 %-100.0 %) specificity. A combined evaluation of the cytological examination and the *SHOX2* assay was carried out as follows: All cytological tumour-positive diagnoses were counted as positive, and no additional *SHOX2* assay was performed. All tumour-negative and tumour-suspicious cytological diagnoses were followed by an additional *SHOX2* assay. This led to 58.0 % (160/276) (95 % CI = 51.9 %-63.9 %) sensitivity and 96.2 % (426/443) (95 % CI = 93.9 %-97.7 %) specificity. These data are presented in Table II together with the positive and negative predictive value (PPV, NPV) of these tests. With a cut-off of $\Delta\Delta Ct \leq 3.5$, the sensitivity was 17.8 % (49/276) (95 % CI = 13.4 %-22.8 %) without any false-positive results (specificity = 100 % (443/443) (95 % CI = 99.2 %-100.0 %)).

Table II: Sensitivity and specificity of the short stature homeobox gene-two (*SHOX2*) methylation assay and the cytological examination. The table shows the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for the examination of 719 valid measured specimens using *SHOX2* methylation assay, cytological examination and a combination of cytological examination and the *SHOX2* assay. The data are presented as the percentage (frequency) [95 % CI].

	<i>SHOX2</i> assay		Cytological examination	Cytology + <i>SHOX2</i> assay ($\Delta\Delta Ct \leq 7.5$)
	($\Delta\Delta Ct \leq 9.5$)	($\Delta\Delta Ct \leq 7.5$)		
Sensitivity	50.0 % (138/276) [44.1 %-55.9 %]	39.5 % (109/276) [33.7 %-45.3 %]	52.5 % (145/276) [46.6 %-58.4 %]	58.0 % (160/276) [52.1 %-63.8 %]
Specificity	84.2 % (373/443) [80.8 %-87.6 %]	96.2 % (426/443) [94.4 %-98.0 %]	99.8 % (442/443) [99.3 %-100 %]	96.2 % (426/443) [94.4 %-98.0 %]
PPV	66.3 % (138/208) [59.9 %-72.8 %]	86.5 % (109/126) [80.5 %-92.5 %]	99.3 % (145/146) [98.0 %-100 %]	90.4 % (160/177) [86.1 %-94.7 %]
NPV	73.0 % (373/511) [69.1 %-76.8 %]	71.8 % (426/593) [68.2 %-75.5 %]	77.1 % (442/573) [73.7 %-80.6 %]	78.6 % (426/542) [75.1 %-82.1 %]

In addition to lung carcinomas which were identified as positive, the *SHOX2* assay also detected cancer of other origins, no matter which of the presented cut-off values were used. Table III presents the sensitivity to different malignant tumour entities as related to the cut-off of $\Delta\Delta Ct \leq 7.5$. Some patients (n = 35) had more than one malignant tumour, possibly metastasized to the pleural cavity, hence they were excluded from subsequent evaluation.

The frequency of detected lung cancer was not significantly different from the frequency of detected malignant tumours of other origin (p = 0.85).

SHOX2 DNA Methylation Is a Tumour Marker in Pleural Effusions

Table III: Performance of the short stature homeobox gene-two (*SHOX2*) methylation assay for different types of malignant tumours. The frequency and percentage of *SHOX2*-positive and -negative results for different tumour types, with a cut-off of $\Delta\Delta Ct \leq 7.5$, and the frequency of these tumour types are shown. Only patients with positive reference standards and only one known cancer origin were evaluated.

	<i>SHOX2</i>		Frequency
	Positive	Negative	
Lung cancer	44 (40 %)	67 (60 %)	111
Breast cancer	16 (55 %)	13 (45 %)	29
Mesothelioma	4 (67 %)	2 (33 %)	6
Lymphoma/leukaemia	6 (26 %)	17 (74 %)	23
Gastrointestinal cancer	11 (37 %)	19 (63 %)	30
Others	13 (31 %)	29 (69 %)	42
Total	94 (39 %)	147 (61 %)	241

Of the 17 patients with a false-positive *SHOX2* result, three had a malignant tumour (Hodgkin lymphoma, basalioma and salivary gland carcinoma) in their history besides benign pleural effusion according to the follow-up. All three of them died within 15 days after we received their specimens. Two more of the 17 patients died within 18 days after we received their specimens. The remaining 12 patients did not exhibit development of a malignant tumour during the follow-up period which differs between 2 and 18 months. The 17 patients had the following spectrum of relevant benign diseases (sorted by frequency): congestive heart failure (n = 7), cardiac congestion (n = 7), advanced renal disease (n = 3), pneumonia (n = 3), sepsis (n = 3) and post myocardial infarction (n = 2). These diseases were also present in the group of the patients who were *SHOX2*-negative.

Discussion

The performance of the *SHOX2* methylation assay when used for its intended use on bronchial aspirates was 81 % (95 % CI = 71 %-89 %) sensitivity and 95 % (95 % CI = 88 %-99 %) specificity (Dietrich *et al.*, 2012). As expected, the test performance on pleural effusions with the same cut-off criterion was different: its sensitivity was 50.0 % (95 % CI = 43.9 %-56.1 %) and its specificity was 84.2 % (95 % CI = 80.5 %-87.5 %). For both studies, only the valid

measured specimens were evaluated. The most probable reason for these highly different results is the difference in the tested materials themselves: pleural effusion fluid is a very different source of analyte from bronchial lavage, especially in regard to its composition. Pleural effusion is a serous fluid, seldom mucoid, in most cases sterile, frequently with a haemorrhagic component and usually contains mesothelial cells. In contrast, bronchial aspirates are aspirated mucoid fluids, often mixed with rinsing fluids (lavage), frequently with bacterial and macrophagial background, rarely with a haemorrhagic component and usually contain epithelial cells. In contrast to the recommendations of the user's-manual for the Epi *proLung*® test, the Saccomannos-fixed material used in this study was stored at 4°C for a maximum of two years. However, this should not be of great influence as the Saccomannos-fixed material used for the previous studies with this test on bronchial lavage was stored at room temperature for 12 years (Dietrich *et al.*, 2012). The AUC regarding this study was 0.72 and as such between the value of 0.94 achieved by the *SHOX2* methylation assay on bronchial aspirates (Dietrich *et al.*, 2012) and that of 0.63 evaluated with methylation-sensitive high resolution melting analysis of 97 non-small cell lung cancer samples and corresponding normal lung tissue (Heller *et al.*, 2013).

The cut-off criterion of the *SHOX2* methylation assay established for the diagnosis of bronchial lavage is not directly transferable to the diagnosis of pleural effusions as shown above. Therefore, two new cut-off criteria were considered. These criteria were the $\Delta\Delta Ct \leq 7.5$ criterion, which provides an optimum balance of sensitivity and specificity, and the $\Delta\Delta Ct \leq 3.5$ criterion, with a very high specificity at the expense of sensitivity.

The *SHOX2* methylation assay was able to achieve a valid measurement in 719 cases out of 1,270 specimens with evaluable reference standard. Consequently, 43.4 % (551/1,270) measurements were declared invalid. This matches the validation study by Dietrich and co-workers on bronchial aspirates, who had 38.4 % (96/250) invalid results, most probably due to DNA degradation of the archival specimens, applying the validity criteria provided by the assay (Dietrich *et al.*, 2012). The valid and invalid results in the presented study are not significantly different in the distribution of the follow-up result, cytological

diagnosis, sex and age of the patients. Accordingly, we conclude that the above-mentioned crucial parameters do not influence the consideration of measurement of a specimen as being valid or invalid.

Schmidt and co-workers measured *SHOX2* DNA methylation on 523 bronchial aspirates from 281 lung cancer patients and 242 controls, and stated that increased *SHOX2* methylation is highly specific for the detection of lung cancer, and that this specificity is increased by the origin of their material (Schmidt *et al.*, 2010). Kneip and co-workers investigated *SHOX2* DNA methylation as a biomarker for the detection of malignant lung disease in plasma of patients with lung cancer (Kneip *et al.*, 2011). Using the same assay, they achieved a sensitivity of 60 % (95 % CI = 53 %-67 %) and a specificity of 90 % (95 % CI = 84 %-94 %). Their collective consisted of 188 lung tumour cases and 155 controls. Of the controls, 151 were samples from healthy individuals or patients with a benign lung disease, and the remaining four samples were from patients who had carcinoma of the prostate. In contrast to our study on pleural effusions, patients with other types of malignant tumours were not included. Our results on pleural effusions demonstrate that the *SHOX2* methylation marker is able to detect lung cancer and other tumour types. Furthermore, the detection rates regarding lung cancer and tumours of other origin do not significantly differ. Therefore, we conclude that the ability of the *SHOX2* methylation marker when used on pleural effusions is not limited to the detection of lung cancer.

Comparing the results of the cytological examination to the results of the *SHOX2* methylation assay, the cytological examination provides higher sensitivity and higher specificity. Therefore, the *SHOX2* methylation assay is not suitable for replacing the cytological examination. The evaluated combination of both methods is also not advisable since it has an increased sensitivity at the cost of reduced specificity. Using the stricter cut-off ($\Delta\Delta Ct \leq 3.5$) for the combination of both methods would not lead to any increase in sensitivity nor in specificity. Nevertheless, the assay could be of use. The cytological examination requires a network of very well-trained pathologists. This infrastructure may not be established in every region. The *SHOX2* methylation assay is a PCR-based method, and can as such be up-scaled to a

high-throughput method. As a high-throughput method, its use could be centralized until a network of pathologists is established.

Further applicability of the *SHOX2* methylation assay for pleural effusions, using the $\Delta\Delta C_t \leq 3.5$ criterion to provide a sensitivity of 17.8 % with a specificity of 100 %, could be the combination with other methylation-based tumour markers to enhance the sensitivity of detecting MPE. Admittedly 17.8 % sensitivity is very low, but in order to maintain high specificity, it is crucial that all of the combined methods provide high specificity. These other markers could, for example, be some of those examined by Brock *et al.* (Brock *et al.*, 2005). They achieved 67 % sensitivity (100 % specificity) on a prospective cohort of 31 patients with pleural effusions applying methylation-specific PCR with a marker panel of eight different genes [retinoic acid receptor-beta (*RARB*), adenomatous polyposis coli (*APC*), breast cancer 1 early onset (*BRCA1*), methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*), cellular retinol-binding protein 1 (*CRBP1*), fragile histidine triad (*FHIT*), ras association domain family member 1 (*RASSF1A*) and cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*p16^{INK4A}*)].

Conclusion

The *SHOX2* DNA methylation assay is a promising method for the detection of a malignant cause of pleural effusion. The lung cancer specificity reported for bronchial aspirates, however, is not confirmed for pleural effusions.

Acknowledgments

The Authors thank Baldur Eberle (Life Technologies, Darmstadt, Germany) for providing the AB 7500 Fast Real-time PCR System, Dr. Dima Dietrich (Epigenomics AG, Berlin, Germany) for providing the Epi *proLung*® BL Reflex Assay Kit (Epigenomics AG, Berlin, Germany) and Dr. Jörn Lewin (Epigenomics AG, Berlin, Germany) for proofreading of the manuscript.

Beitrag des Autors

Die Publikation „SHOX2 DNA Methylation Is a Tumour Marker in Pleural Effusions“ wurde von den Autoren: Peter Ilse, Stefan Biesterfeld, Natalia Pomjanski, Christian Fink und Martin Schramm im Jahr 2013 im Journal „Cancer Genomics & Proteomics“ veröffentlicht. Nach Angaben von „Cancer Genomics & Proteomics“ hat das Journal derzeit einen Impact Factor von 2,7. Der Autor dieser Inaugural Dissertation ist der Erstautor der Publikation. Im Folgenden werden die Beiträge der Autoren an der Veröffentlichung aufgelistet:

- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld, Dr. Martin Schramm und Peter Ilse haben gemeinsam das Studiendesign erarbeitet.
- Die Einwerbung der von der Firma Epigenomics zur Verfügung gestellten Testmaterialien erfolgte durch Prof. Dr. Stefan Biesterfeld, Dr. Martin Schramm und Peter Ilse.
- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld hat die Mittel für die Finanzierung der Anstellung von Peter Ilse eingeworben.
- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld hat den Ethikantrag an die Ethikkommission geschrieben.
- Die Ausarbeitung des verwendeten Datenerhebungsbogens für die klinischen Daten, erfolgte in Zusammenarbeit von Dr. Martin Schramm, Christian Fink und Peter Ilse
- Peter Ilse programmierte den erarbeiteten Fragebogens als Eingabemaske für die erstellte Datenbank zu den klinischen Patientendaten.
- Christian Fink hat die klinischen Daten der Patienten in den einsendenden Krankenhäusern erhoben.
- Peter Ilse betreute Christian Fink beim Sammeln der klinischen Patientendaten.
- Dr. Martin Schramm und Christian Fink haben gemeinsam die Kriterien zur Bildung des Referenzstandards erarbeitet und die erhobenen klinischen Daten auf das Vorliegen des positiven oder negativen Referenzstandards geprüft.

- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld und Dr. Natalia Pomjanski haben die zytopathologische Diagnostik der Pleuraergüsse durchgeführt.
- Die Quantifizierung von *SHOX2* DNA Methylierung an Pleuraergüssen wurde von Peter Ilse durchgeführt.
- Die Pflege, Überarbeitung und Zusammenführung der erstellten Datenbanken wurde von Peter Ilse durchgeführt.
- Die statistische Auswertung wurde von Peter Ilse durchgeführt.
- Prof. Dr. Biesterfeld, Dr. Martin Schramm und Peter Ilse haben die erhobenen klinischen und experimentellen Ergebnisse in den Erkenntniszusammenhang der molekularen Cytopathologie eingeordnet.
- Das Manuskript wurde von Peter Ilse angefertigt.
- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld und Dr. Martin Schramm haben das Manuskript vor Einreichung gründlich Korrektur gelesen und wichtige Impulse zur Überarbeitung gegeben.
- Die Einarbeitung der im Peer Review Prozess vorgeschlagenen Korrekturen und Ergänzungen erfolgte durch Peter Ilse.

Anmerkung: Christian Fink hat die erhobenen klinischen Daten im Rahmen seiner 2015 abgeschlossenen Inaugural-Dissertation zum Dr. med. dent. selbstständig und unabhängig von der hier vorgelegten Studie im Hinblick auf die Treffsicherheit der zytologischen Untersuchung statistisch ausgewertet. Das in dieser Studie verwendete Patientenkollektiv stellt eine Teilmenge des Patientenkollektivs in Christian Finks Inaugural-Dissertation dar.

Publication II

Analysis of *SHOX2* Methylation as an Aid to Cytology in Lung Cancer Diagnosis

Authors: Peter Ilse, Stefan Biesterfeld, Natalia Pomjanski, Christian Wrobel and Martin Schramm

Institute: Department of Cytopathology, Institute of Pathology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

Published: Cancer Genomics & Proteomics
September-October 2014 vol. 11 no. 5 251-258

Online available: <http://cgp.iiarjournals.org/content/11/5/251.long>

Abstract

Background/Aim: The Epi *proLung*® BL Reflex Assay [short stature homeobox gene two methylation assay (*SHOX2* assay)] (Epigenomics AG, Berlin, Germany) utilizes quantitative methylation-sensitive real-time polymerase chain reaction (QMSP) for the quantification of methylated short stature homeobox gene two (*SHOX2*) DNA. In the present study, the diagnostic utility of the *SHOX2* assay was tested with regard to cytology for different cytological diagnostic categories to assess whether it can complement the cytological examination and the DNA methylation marker panel targeting the gene promoters of adenomatous polyposis coli 1A (*APC*), cyclin-dependent kinase inhibitor-2A (*p16^{INK4A}*) and Ras association domain family protein 1 (*RASSF1A*) regarding lung cancer detection in bronchial aspirates. **Materials and Methods:** Prospectively collected DNA from 169 patients (cytological diagnosis: 47 tumour-positive, 56 equivocal and 66 tumour-negative) was analyzed for *SHOX2* DNA methylation utilizing QMSP. Patients were followed-up for a period of 11 months maximum. **Results:** When equivocal diagnoses were categorized as tumour-positive, cytology and *SHOX2* DNA methylation achieved 72 % and 64 % sensitivity and 63 % and 98 % specificity, respectively. *SHOX2* DNA methylation identified 66 % of the patients with cancer subsequent to a cytological equivocal diagnosis. *SHOX2* complements the cytological diagnosis and the methylation marker panel. **Conclusion:** The assay could be of use for the improvement of diagnostic accuracy if applied subsequent to equivocal or negative cytology (sensitivity = 69 %, specificity = 98 %). Furthermore, the *SHOX2* assay can complement a methylation-based marker panel.

Introduction

Worldwide, lung cancer has been the most common type of cancer for several decades. It is the most common cancer in men, and the fourth most common in women. Lung cancer was also the most common cause of death from cancer in 2008, with 1.38 million deaths (18.2 % of the total number of fatalities caused by cancer) (Ferlay *et al.*, 2010). In Germany in 2010, lung cancer was the fourth

most commonly diagnosed type of cancer (52,070 cases), behind breast, prostate, and colorectal cancer (70,950; 65,830; and 62,430 cases, respectively). Nevertheless, lung cancer was the most frequent cause of death (42,008 cases) by cancer (Kaatsch *et al.*, 2013). In contrast to breast, prostate and colorectal cancer, there is no established screening for lung cancer, which is probably one reason for the high mortality rate. The cytological examination of bronchial aspirates, brush biopsies and fine-needle aspiration biopsies, is a widely used method in the diagnostic work-up of suspected lung cancer, recommended by medical guidelines (Goeckenjan *et al.*, 2011). Bronchial aspiration cytology is known for moderate sensitivity (48 % and 43 % for central and peripheral tumours, respectively) (Schreiber and McCrory, 2003). Adjuvant methods are used in order to enhance the diagnostic accuracy of the morphological cytological examination. Both at our Institute and other specialized centres, for example, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and DNA image cytometry are used in daily diagnostic routine for that purpose. A promising method for the enhancement of diagnostic accuracy is the analysis of DNA methylation (Laird, 2003). Since cytological specimens provide high quality of extracted DNA, as shown on bronchial aspirates (Grote *et al.*, 2003), the analysis of DNA methylation should be possible with all kinds of the aforementioned bronchial specimens (Schramm *et al.*, 2011).

The Epi *proLung*® BL Reflex Assay [short stature homeobox gene two methylation assay (*SHOX2* assay)] (Epigenomics AG, Berlin, Germany) was introduced as an aid for the diagnosis of lung cancer via bronchial aspirates. The test uses quantitative methylation-sensitive real-time polymerase chain reaction (QMSP) to determine levels of methylation of the short stature homeobox gene two (*SHOX2*) in specimens. In its validation study on 204 valid measured bronchial lavage specimens, the test achieved a sensitivity of 78 % and a specificity of 96 % (Dietrich *et al.*, 2012). In malignant pleural effusions (MPE), the *SHOX2* assay displayed a sensitivity of 40 % and a specificity of 96 %, and was not specific for lung cancer (Ilse *et al.*, 2013).

After gaining experience in handling the *SHOX2* assay on pleural effusions, the aim of our present study was to clarify if the *SHOX2* test could complement the morphological cytological examination and the methylation

assay used in a previous study on bronchial aspirates (Schramm *et al.*, 2011). Furthermore, the performance of the *SHOX2* assay was separately tested for different tumour types and localizations, as well as for different cytological diagnostic groups (tumour-positive, equivocal and tumour-negative).

Materials and Methods

Study design. The collection of 210 specimens, the extraction of DNA from bronchial aspirates and the collection of the follow-up has previously been published by Schramm *et al.* (Schramm *et al.*, 2011). In short, samples had been collected prospectively in 2008 and early 2009 until 70 cytological samples which tested as cancer-positive, 70 which tested as suspicious and 70 which tested as cancer-negative were gathered. Cytological results were compared to a reference standard, defined in advance, by review of the patients' charts. The patients were followed-up for 11 months. The *SHOX2* assay and the morphological cytological diagnosis of the specimens were both performed blinded to the reference standard and *vice versa*. The study was approved by the local Ethics Committee (#3059).

Study inclusion criteria. All specimens included in the previously mentioned study (Schramm *et al.*, 2011) were accepted on the condition that there was more than 800 µg of DNA for performing the Epi *proLung*® BL Reflex Test (Epigenomics AG, Berlin, Germany).

Cytological diagnosis. The morphological cytological diagnoses on bronchial aspirates were divided into three groups: cancer-positive, equivocal and cancer-negative. These initial cytological diagnoses rely on microscopy of smears which are stained according to Papanicolaou. In contrast to routine cytology, several additional specimens (bronchial aspirates from different locations, bronchial brushings or fine-needle aspiration biopsies from regional lymph nodes) and adjuvant methods (DNA image cytometry or FISH) were not included for the cytological diagnosis in this study.

Sample preparation. The DNA extraction from the bronchial aspirates was performed in a previous study (Schramm *et al.*, 2011) utilizing the Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). The DNA was solvated in water and stored at -20°C for up to six years. After thawing the samples at room temperature, the DNA concentration was determined using a NanoDrop 100 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA). An 80 µl aliquot was created for each sample containing 800 µg to 1000 µg of DNA. Bisulphite conversion was performed using the Epi *proLung*® BL Preparation Kit (Epigenomics AG). The samples were prepared in sets of 22 samples. A positive and a negative control from the Epi *proLung*® BL Work Flow Control Kit (Epigenomics AG) were also included in each set.

Real-time PCR. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using an Applied Biosystems® 7500 Fast real-time PCR instrument (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and the Epi *proLung*® BL real-time PCR Kit (Epigenomics AG). The assay was designed to detect lung cancer in bronchial aspirates. All samples were measured in triplicates. A sample was declared test-positive if the validity criteria of the *SHOX2* test kit were met and if the methylation level was higher than or equal to the cut-off as predefined by the assay ($\Delta\Delta C_t \leq 9.5$). The methylation level was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001; Winer *et al.*, 1999).

Data and statistical analysis. To enable a comparison between the two possible assay results and the three possible results of the morphological cytological diagnoses, an artificial construction was used. The equivocal results were counted as positive for the calculation of the sensitivity and the specificity, similar to the previous study (Schramm *et al.*, 2011). Therefore, the diagnostic accuracy of cytology in the presented study is not directly comparable with previously quoted literature (Schreiber and McCrory, 2003). All statistical results were calculated using the R-Project for Statistical Computing (Version 3.0.1) and the R packages bdpv (Version 1.0) (Steinberg *et al.*, 2009) and pROC (Version 1.5.4) (Robin *et al.*, 2011). Confidence intervals (CI) were calculated at 95 %.

Results

The DNA concentration of the leftover material was determined. A total of 169 specimens had enough DNA for the performance of the SHOX2 assay. These samples had the following morphological cytological diagnoses on bronchial aspirates: 47 tumour-positive, 56 equivocal and 66 tumour-negative. All 169 samples were measured using the SHOX2 assay. No valid results could be achieved for 51 samples. The patients' characteristics are displayed in

Table IV and Table V. The Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) diagram presents the flow of patients through the study Figure 3 (Bossuyt et al., 2003).

Table IV: Patient data

	Cases (n = 111) No. (%) or median [range]	Controls (n = 58) No. (%) or median [range]
Age, years	66 [27-89]	65 [27-88]
Gender		
Female	44 (40 %)	28 (48 %)
Male	67 (60 %)	30 (52 %)
Smoking status		
Smoker	87 (78 %)	31 (53 %)
Pack years	40 [10-150]	42,5 [6-150]
Never smoker	10 (9 %)	10 (17 %)
No data	14 (13 %)	17 (29 %)

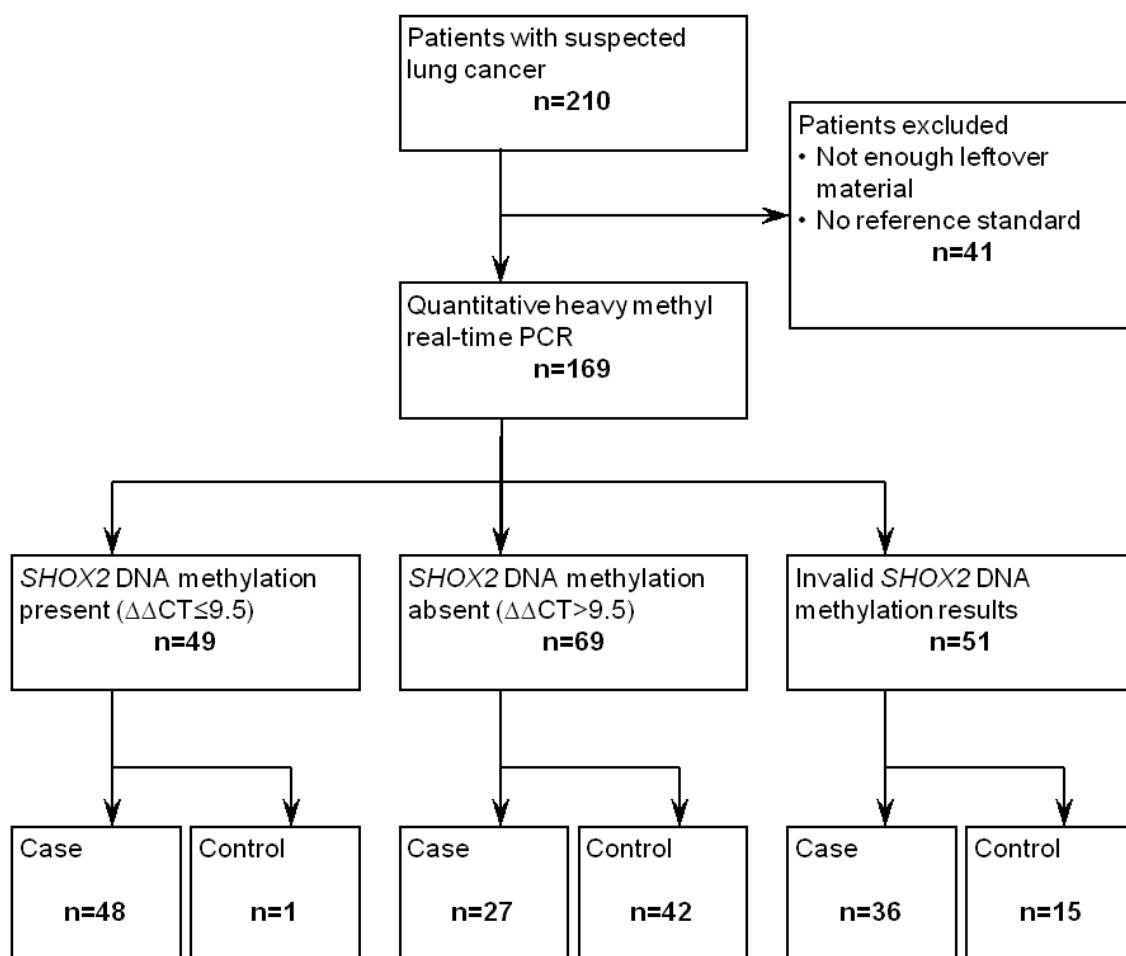


Figure 3: Flow of the patients through the study according to recommendations of the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) initiative (Bossuyt *et al.*, 2003). *SHOX2*: short stature homeobox gene two.

Publication II

Table V: Localization and histogenetic classification of tumours represented in the patient collective and numbers of valid Epi *proLung*® BL Reflex Assay (*SHOX2* assay) measurements.

	Cases (n = 111)	Valid <i>SHOX2</i> Measurement (n = 75)
	No. (%)	No. (%)
Tumour Location		
Peripheral only	30 (27 %)	18 (24 %)
Central	68 (61 %)	47 (63 %)
Unknown	13 (12 %)	10 (13 %)
Tumour type		
Lung cancer	99 (89 %)	65 (87 %)
SCLC	18 (16 %)	11 (15 %)
NSCLC – squamous cell carcinoma	25 (23 %)	16 (21 %)
NSCLC – adenocarcinoma	39 (35 %)	26 (35 %)
NSCLC – (NOS)	17 (15 %)	12 (16 %)
Other tumours	12 (11 %)	10 (13 %)
Breast carcinoma	1 (1 %)	1 (1 %)
T-Cell lymphoma	1 (1 %)	1 (1 %)
B-Cell lymphoma	1 (1 %)	0 (0 %)
Sarcoma (NOS)	1 (1 %)	1 (1 %)
Colorectal cancer	2 (2 %)	2 (3 %)
Carcinoma of the uterine cervix	1 (1 %)	0 (0 %)
Cancer of unknown primary	5 (5 %)	5 (7 %)

NOS: Not otherwise specified

NSCLC: non-small cell lung cancer

SCLC: small cell lung cancer.

Valid and invalid measured specimens were inspected for significant differences. Age was tested using the unpaired *t*-test; the other characteristics were compared using the Chi-square test. The level of significance ($p \leq 0.05$) was adjusted to $p \leq 0.0083$ using the Bonferroni correction. Neither the cytological diagnosis ($p = 0.33$), nor the follow-up result ($p = 0.38$), gender ($p = 0.82$), age ($p = 0.80$), histological tumour type ($p = 0.94$) or tumour localization ($p = 0.38$) (exclusively peripheral *versus* otherwise localized) presented significant differences between the valid and invalid measured specimens.

Out of the 118 valid *SHOX2* assay results, 49 were classified positive and 69 were classified negative. With 48 positive cases out of the 75 cases, the test achieved a sensitivity of 64 % (95 % CI = 52 %-75 %). With 42 true-negative results out of 43 controls, a specificity of 98 % (95 % CI = 88 %-100 %) was attained. The area under (AUC) the receiver operating characteristic (ROC) curve was calculated on a non-smooth curve (Figure 4). The AUC value was 0.92 (95 % CI = 0.88-0.97).

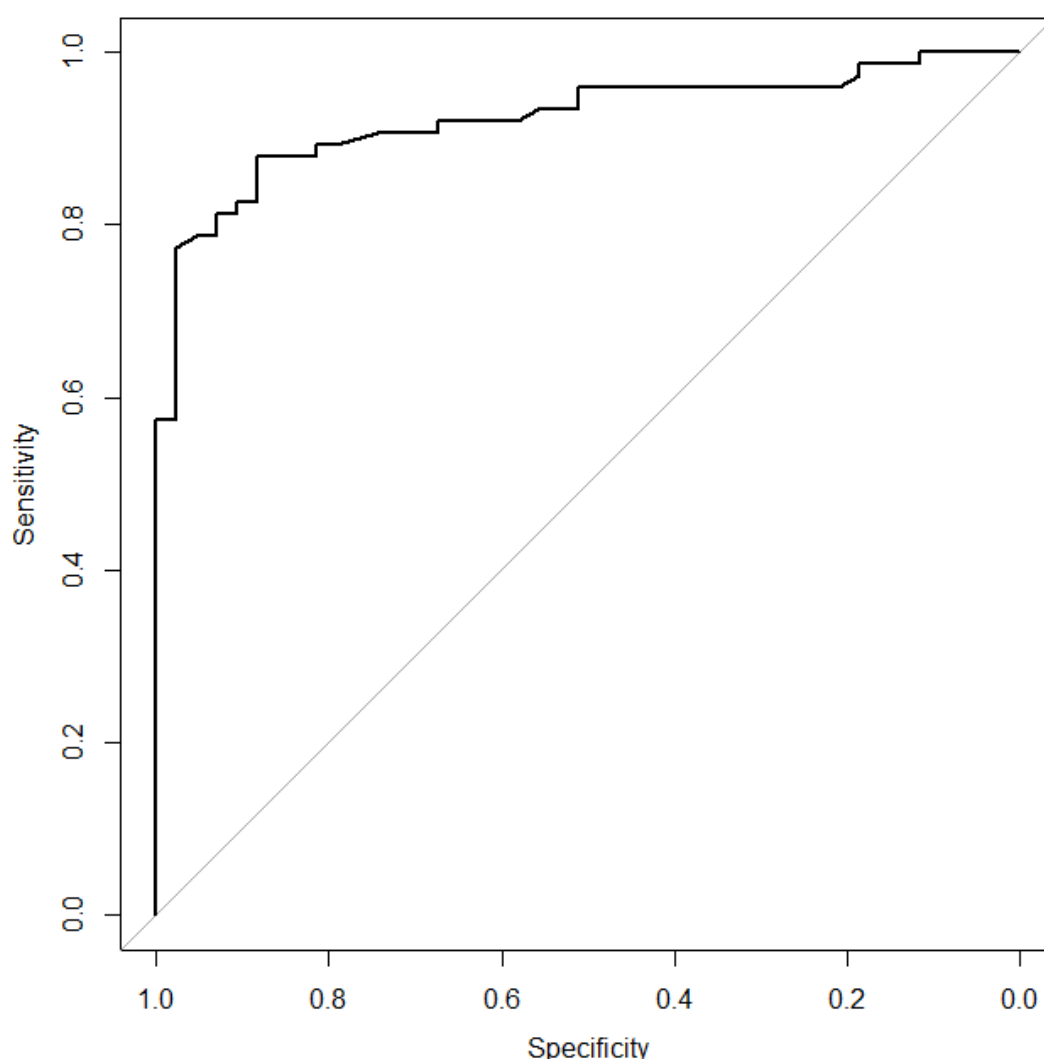


Figure 4: Receiver operating characteristic curve of the Epi *proLung*® BL Reflex Assay.

Furthermore, the sensitivity for the detection of different primary lung carcinomas was examined. At a sensitivity of 82 % (9/11) (95 % CI =

48 %-98 %), small cell lung cancer (SCLC) was identified best, followed by squamous cell carcinoma at 81 % (13/16) (95 % CI = 54 %-96 %), adenocarcinoma at 65 % (17/26) (95 % CI = 44 %-83 %) and non-small cell lung cancer (NSCLC), not otherwise specified, at 50 % (6/12) (95 % CI = 21 %-79 %). Other lung tumours and metastases were identified at a rate of 30 % (3/10) (95 % CI = 7 %-65 %), including sarcoma and two out of the five cancer of unknown primary (CUP) syndromes with pulmonary manifestation. Both CUP syndrome tumours may have originated from the lung. While the different identification rates for SCLC and NSCLC were not significantly different ($p = 0.28$), *SHOX2* DNA methylation was significantly different between these groups (SCLC and NSCLCs) and other lung tumours and metastases ($p = 0.03$).

The *SHOX2* assay detected centrally localized tumours at a rate of 68 % (32/47) (95 % CI = 53 %-81 %), and peripheral ones at 56 % (10/18) (95 % CI = 31 %-78 %). Nonetheless, this difference was not statistically significant ($p = 0.34$).

Table VI presents how the *SHOX2* assay performed for the different morphological cytological diagnostic groups. *SHOX2* identified 66 % (14/21) (95 % CI = 43 %-85 %) of cancers subsequent to an equivocal cytological diagnosis. The sensitivity and specificity of the morphological cytology (evaluated only on *SHOX2*-valid specimens) and the combination of cytology with subsequent *SHOX2* test on equivocal and negative specimens are presented in Table VII.

Analysis of *SHOX2* Methylation as an Aid to Cytology in Lung Cancer Diagnosis

Table VI: The short stature homeobox gene two (*SHOX2*) methylation results for each of the cytological diagnostic groups. The values are presented as percentage, numbers and 95 % confidence intervals, respectively.

	Cytological result		
	Positive (n = 33)	Equivocal (n = 37)	Negative (n = 48)
Sensitivity	88 % (29/33) (72 %-97 %)	66 % (14/21) (43 %-85 %)	24 % (5/21) (8 %-47 %)
Specificity	*	100 % (16/16) (79 %-100 %)	96 % (26/27) (81 %-100 %)

* As there was no false positive cytological result, the positive group was not including any control cases which rendered a calculation of the specificity impossible.

Table VII: Results of cytological examination (Cyto), the measurement of short stature homeobox gene two (*SHOX2*) methylation and a combination of both methods. The values are presented as percentage, numbers and 95 % confidence intervals, respectively.

	Cyto (equivocal counted as positive)	<i>SHOX2</i> methylation	Cyto + <i>SHOX2</i> on negative and equivocal specimens
Sensitivity	72 % (54/75) (60 %-82 %)	64 % (48/75) (52 %-75 %)	69 % (52/75) (58 %-79 %)
Specificity	63 % (27/43) (47 %-77 %)	98 % (42/43) (88 %-100 %)	98 % (42/43) (88 %-100 %)

The cytological examination achieved a sensitivity of 72 % (54/75) (95 % CI = 60 %-82 %) and a specificity of 63 % (27/43) (95 % CI = 47 %-77 %), on valid *SHOX2* measured specimens. The cytology identified squamous cell carcinoma best, with a detection rate of 88 % (14/16) (95 % CI = 62 %-98 %), followed by NSCLC (NOS) with 75 % (9/12) (95 % CI = 43 %-95 %), adenocarcinoma with 73 % (19/26) (95 % CI = 52 %-88 %), and SCLC with 64 % (7/11) (95 % CI = 31 %-89 %) detection rate. Other lung tumours and metastases were identified at a rate of 50 % (5/10) (95 % CI = 19 %-81 %), including breast carcinoma, sarcoma and three out of the five lung manifestations in CUP syndrome. The cytological examination was able to detect 67 % (12/18) (95 % CI = 41 %-87 %) of the peripheral tumours, and 74 % (35/47) (95 % CI = 60 %-86 %) of those

tumours localized centrally. The difference in sensitivity was significant neither for tumour type ($p = 0.13$) nor for localization ($p = 0.55$).

In a previous study (Schramm *et al.*, 2011), a QMSP-based marker panel was applied to the same group of patients as in the present study. The marker panel focused on three different methylation sites. The studied sites were gene promoters of adenomatous polyposis coli 1A (*APC*), cyclin-dependent kinase inhibitor-2A ($p16^{INK4A}$) and Ras association domain family protein 1 (*RASSF1A*). The sensitivity and the specificity for 160 possible combinations of these biomarkers with the *SHOX2* assay and the cytological examination were calculated in order to test the combinations for complementarity. The performance values were calculated on the 118 valid *SHOX2*-measured specimens. A selection of these combinations and their sensitivity and specificity values are presented in Table VIII. The *SHOX2* biomarker had by far the best sensitivity as a single biomarker. While *RASSF1A* (52 %) and a combination of *RASSF1A* and $p16^{INK4A}$ (59 %) enhanced the sensitivity of the cytological examination without reducing the specificity (100 %); the enhancement of sensitivity by *SHOX2* in addition to the cytological examination was larger (69 %) but at a small cost of specificity (98 %). The combination of cytological examination and *SHOX2* was complemented by the *RASSF1A* biomarker to a sensitivity of 72 % without a decrease in specificity. A further addition of the $p16^{INK4A}$ biomarker did not complement this combination any further. The application of *APC* instead of $p16^{INK4A}$ to this combination enhanced the sensitivity by only 1 % but reduced the specificity by 3 %. The marker panel of the previous study achieved a sensitivity of 51 % (38/75) (95 % CI = 39 %-62 %) and a specificity of 98 % (42/43) (95 % CI = 88 %-100 %). Evaluating the *SHOX2* results in combination with this QMSP marker panel on valid *SHOX2*-measured specimens, a sensitivity of 71 % (53/75) (95 %CI = 59 %-81 %) and a specificity of 95 % (41/43) (95 % CI = 84 %-99 %) were achieved. Up to this point, a combination was considered test-positive if at least one of the markers gave a positive test result. If a stricter criterion is applied and a panel is only considered test-positive if at least two of the markers gave a positive result, the $p16^{INK4A}$ marker is more useful, as it complements a panel of *SHOX2*, *RASSF1A* and *APC* [sensitivity of 39 % (29/75), 95 % CI = 28 %-51 %]

Analysis of *SHOX2* Methylation as an Aid to Cytology in Lung Cancer Diagnosis

to give a sensitivity of 47 % (35/75) (95 % CI = 35 %-59 %) without reducing the specificity [100 % (43/43), 95 % CI = 92 %-100 %].

Table VIII: Sensitivity and specificity of different biomarkers and biomarker panels in combination with cytological examination are presented. Except for the last two presented panels, a panel was considered positive if at least one of the included examinations gave a positive test result. All data were calculated on specimens with a valid measurement of short stature homeobox gene two (*SHOX2*) methylation. Values are presented as percentage, numbers and 95 % confidence intervals, respectively.

	Sensitivity	Specificity
Single biomarker		
<i>SHOX2</i>	64% (48/75) (52%-75%)	98% (42/43) (88%-100%)
<i>RASSF1A</i>	29% (22/75) (19%-41%)	100% (43/43) (92%-100%)
<i>APC</i>	24% (18/75) (15%-35%)	98% (42/43) (88%-100%)
<i>p16^{INK4A}</i>	13% (10/75) (7%-23%)	100% (43/43) (92%-100%)
Cytology with ¹		
<i>RASSF1A</i>	52% (39/75) (40%-64%)	100% (43/43) (92%-100%)
<i>RASSF1A</i> + <i>p16^{INK4A}</i>	59% (44/75) (49%-70%)	100% (43/43) (92%-100%)
<i>SHOX2</i>	69% (39/75) (58%-79%)	98% (42/43) (88%-100%)
<i>SHOX2</i> + <i>RASSF1A</i>	72% (54/75) (60%-82%)	98% (42/43) (88%-100%)
<i>SHOX2</i> + <i>RASSF1A</i> + <i>p16^{INK4A}</i>	72% (54/75) (60%-82%)	98% (42/43) (88%-100%)
<i>SHOX2</i> + <i>RASSF1A</i> + <i>APC</i>	73% (55/75) (62%-83%)	95% (41/43) (84%-99%)
Biomarker panels		
Single-positive ¹		
<i>RASSF1A</i> + <i>APC</i> + <i>p16^{INK4A}</i>	51% (38/75) (39%-62%)	98% (42/43) (88%-100%)
<i>SHOX2</i> + <i>RASSF1A</i> + <i>APC</i>	71% (53/75) (59%-81%)	95% (41/43) (84%-99%)
<i>SHOX2</i> + <i>RASSF1A</i> + <i>APC</i> + <i>p16^{INK4A}</i>	71% (53/75) (59%-81%)	95% (41/43) (84%-99%)
Double-positive ²		
<i>SHOX2</i> + <i>RASSF1A</i> + <i>APC</i>	39% (29/75) (28%-51%)	100% (43/43) (92%-100%)
<i>SHOX2</i> + <i>RASSF1A</i> + <i>APC</i> + <i>p16^{INK4A}</i>	47% (35/75) (35%-59%)	100% (43/43) (92%-100%)

Considered positive if:

¹ at least one biomarker gives a positive result.

² at least two biomarkers give a positive result.

RASSF1A: Ras association domain family protein 1

APC: adenomatous polyposis coli 1A

p16^{INK4A}: cyclin-dependent kinase inhibitor-2A

Discussion

SHOX2 methylation was introduced in 2010 as a biomarker with the ability to distinguish between malignant and benign lung disease with a sensitivity of 68 % and a specificity of 95 % in a case-control study with 523 valid measured samples (Schmidt *et al.*, 2010). In 2011, the performance of the *SHOX2* biomarker on blood plasma was reported to have a sensitivity of 60 % and a specificity of 90 % in a case-control study with 343 valid measured specimens (Kneip *et al.*, 2011). In 2012, the *SHOX2* assay was evaluated on bronchial aspirates, with a sensitivity of 78 % and a specificity of 96 % in a case-control study with 250 patients (Dietrich *et al.*, 2012). In 2013, the assay's performance on MPE was reported, with 40 % sensitivity and 96 % specificity, evaluated on 802 valid measurements with a modified cut-off criterion (Ilse *et al.*, 2013). In contrast to case-control studies on bronchial aspirates, our patient collective was accrued prospectively. Furthermore, our patient collective was also examined using other biomarkers. Therefore, it is possible to estimate the performance of combinations of these biomarkers with the *SHOX2* biomarker.

According to the validation study of the *SHOX2* assay (Dietrich *et al.*, 2012), the test validity is strongly inversely proportional to the age of the sample. The material they had stored for up to 12 years resulted in 62 % (154/250) valid results. With 70 % (118/169) valid results from our material, which had been stored for up to six years, our result meets all expectations. Furthermore, we tested if the cytological diagnosis, the follow-up result, gender, age, tumour type or tumour localization influence the validity of the measurement, but none of these factors displayed a significant influence. We hence assume the 30 % invalid measurements to be a result of the materials' storage.

Comparing the sensitivity values of the *SHOX2* assay between the presented study (64 %, 95 % CI = 52 %-75 %) and the *SHOX2* assay validation study (78 %, 95 % CI = 69 %-86 %) (Dietrich *et al.*, 2012), the sensitivity result of the validation study could not be reproduced. However, with a specificity of 98 % (95 % CI = 88 %-100 %) and an AUC of 0.92 (95 % CI = 0.88-0.97), the presented results are very similar to the specificity value (96 %, 95 % CI = 90 %-99 %) and the AUC value (0.94, 95 % CI = 0.91-0.98) of the validation

study (Dietrich *et al.*, 2012). We consider the tumour type to influence the difference between studies. SCLC was detected best in both studies, but in our study, the proportion of SCLC in the valid measured cases was only 15 % compared to 30 % in the validation study. However, as the detection rate for each of the lung tumour types (SCLC and NSCLC) was lower in our study than in the validation study, this is not the only reason for the lower overall sensitivity. As cigarette smoke is a very powerful environmental modifier of DNA methylation (Breitling *et al.*, 2011), the different smoker ratio could also have been of influence. The cases in our study consisted of at least 78 % smokers (known smokers) and 91 % smokers at maximum (smokers plus unknown smoking status), while in the validation study, 98 % of the cases were smokers. Furthermore, the 95 % CIs for the sensitivity values of both studies overlap, so it is plausible to assume the real sensitivity value to be somewhere in between these. This assumption is further supported by the fact that the first examination of *SHOX2* methylation as a biomarker on bronchial aspirates achieved a sensitivity of 68 % (Schmidt *et al.*, 2010).

Lung cancer was identified with a significantly higher detection rate than other tumour types (69 % vs. 30 %). Therefore, it may be concluded that the *SHOX2* assay has a tendency to detect primary lung carcinomas more frequently than other malignant neoplasms of the lung; on the other hand, however, it is not specific for lung cancer. This is consistent with the fact that use of the *SHOX2* methylation biomarker is primarily focused on the diagnosis of lung carcinomas on bronchial aspirates (Schmidt *et al.*, 2010). However, this effect of lung cancer specificity seems to depend on the origin of the specimen. *SHOX2* methylation was able to detect breast cancer (55 %) at an even higher detection rate than primary lung carcinomas (44 %) in MPE. Furthermore, there was no significant proof ($p = 0.85$) that there is a difference in the detection rate between lung cancer and other types of tumour including breast cancer, mesothelioma, lymphoma/leukaemia and gastrointestinal cancer on MPE (Ilse *et al.*, 2013).

Cytological examination and the *SHOX2* assay are not directly comparable. The *SHOX2* assay dichotomizes the results. The cytological examination has

tumour-positive, equivocal and tumour-negative results and delivers information about composition, condition and histogenetical origin of the cells. In order to compare the results, we also had to dichotomize the results of the cytological examination. Therefore, we counted the equivocal results as test-positive. An effect of this construct is an increased sensitivity and a reduced specificity. In Table VII, this construct displayed a specificity for cytology of only 63 %. But in fact there was no false-positive cytological tumour diagnosis in the group of patients (compare Table VI). The false-positive cases in this construct originate from equivocal results. The alternative for the dichotomization, namely to count the equivocal results as negative, would not consider the equivocal result to be a strong indication that the patient must be examined further. In a nutshell, data for cytological examination as shown in Table VII and data for sensitivities regarding different tumour types or tumour localizations can be used for a first impression of the ability of the cytological examination, but it should be kept in mind that these values are influenced by the artificial construct used.

Table VI shows that the *SHOX2* assay complements the equivocal cytological diagnosis group best. Although the *SHOX2* results are best in the group of specimens diagnosed as cytologically positive, it provides no additional information on the cytological examination. Therefore, its application is not necessary in the diagnostic routine if tumour cells are identified cytologically. Negative cytological results could also benefit from complementation by the *SHOX2* assay, but it seems to be less effective and at the expense of specificity. With us, the detection rate in specimens which were diagnosed as negative for cytological tumour was only 24 %, whereas the validation study of the *SHOX2* assay achieved a tumour detection rate of 63 % of the cases in the same group (Dietrich *et al.*, 2012). As the *SHOX2* assay is expensive, the usage of the *SHOX2* assay on all specimens which were diagnosed as negative for cytological tumours is questionable with regard to cost effectiveness, based on our data. The *SHOX2* reflex assay competes with the FISH analysis and the DNA image cytometry, which our Institute and other specialized centres currently use as reflex test for equivocal cytological test results. The FISH analysis has been reported to have a sensitivity of 76 % (95 % CI = 66 %-84 %) and a specificity of 98 % (95 % CI = 94 %-100 %) (Schramm *et al.*, 2011). The

DNA image cytometry had a sensitivity of 77 % (95 % CI = 68 %-85 %) and a specificity of 98 % (95 % CI = 94 %-100 %) (Schramm *et al.*, 2011). From the *SHOX2* assay values displayed in Table VII, the *SHOX2* assay seems to be inferior. However, the major difference between the *SHOX2* assay and these two methods is that the latter require a large amount (DNA image cytometry) or a small amount (FISH) of suspicious cells recognized during the cytological examination. In contrast, the *SHOX2* assay is applicable even if there are no recognizable suspicious cells.

Schmiemann and co-workers developed a methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates in 2005 (Schmiemann *et al.*, 2005). They examined a marker panel of three different methylation sites (*APC*, *p16^{INK4A}* and *RASSF1A*) utilizing QMSP. Their QMSP marker panel achieved a sensitivity of 63 % (22/35) for central tumours and of 44 % (21/48) for peripheral tumours. The *SHOX2* assay in the present study detected centrally localized tumours at a rate of 68 % (32/47) (95 % CI = 53 %-81 %) and tumours localized in the periphery at a rate of 56 % (10/18) (95 % CI = 31 %-78 %). Although in both studies the difference in the detection rate was not significant [$p = 0.09$ (own calculation) and $p = 0.34$, respectively], the methylation-based assays seem to detect peripheral tumours less effectively than central ones. This might be attributed to the fact that bronchial aspirates contain more cells from central than peripheral regions of the lung due to the washing of primarily central airways.

Schmiemann and co-workers suggested that their assay could be enhanced by addition of complementary markers. Their marker panel (*APC*, *p16^{INK4A}* and *RASSF1A*) was applied to our patient collective in a previous study (Schramm *et al.*, 2011) and achieved a sensitivity of 50 % and a specificity of 98 %. In a direct comparison, the *SHOX2* assay was superior to this QMSP marker panel of the previous study as it had 14 % higher sensitivity and the same specificity. The combination of the marker panel with the *SHOX2* assay resulted in a further increase of sensitivity (71 %) and a slight decrease of specificity (95 %). Therefore, we conclude that the QMSP marker panel can complement the *SHOX2* assay. The combination of the cytological examination, the *SHOX2* assay and the *RASSF1A* biomarker was more useful. Further

application of the *p16^{INK4A}* or the *APC* biomarker was not useful. The *p16^{INK4A}* biomarker did not complement this combination, and the *APC* biomarker reduced the specificity in that context and merely increased the sensitivity. If a marker panel is only considered positive when at least two of the markers give a positive result, the application of *APC* and *p16^{INK4A}* increases the accuracy of the panel and is therefore useful in this regard.

Conclusion

Although we were not able to reproduce the high sensitivity of the validation study, the *SHOX2* assay could complement the cytological diagnosis well. If applied subsequently to equivocal or negative cytology (sensitivity = 69 %, specificity = 98 %), the combined diagnostic accuracy is enhanced. Additional application of the *RASSF1A* biomarker could lead to further enhancement. Moreover, the *SHOX2* assay has the tendency to detect primary lung carcinomas in bronchial aspirates better than other tumour types.

Acknowledgments

The Epi *proLung*® BL Reflex Assay was kindly provided by the Epigenomics AG (Berlin, Germany). Furthermore, the Authors would like to thank Baldur Eberle (Life Technologies, Darmstadt, Germany) for providing the AB7500 Fast Real-time PCR System.

Declaration of Interests

All Authors are employed at the Department of Cytopathology at the Heinrich Heine University of Düsseldorf in Germany. The employment of P. Ilse was granted by the research commission of the medical faculty of the Heinrich Heine University of Düsseldorf (Grant no. 9772432). The Epigenomics AG had no influence on the study except for the provision of the *SHOX2* assay.

Beitrag des Autors

Die Publikation „Analysis of *SHOX2* Methylation as an Aid to Cytology in Lung Cancer Diagnosis“ wurde von den Autoren: Peter Ilse, Stefan Biesterfeld, Natalia Pomjanski, Christian Wrobel und Martin Schramm im Jahr 2014 im Journal „Cancer Genomics & Proteomics“ veröffentlicht. Nach Angaben von „Cancer Genomics & Proteomics“ hat das Journal derzeit einen Impact Factor von 2,7. Der Autor dieser Inaugural-Dissertation ist der Erstautor der Publikation. Im Folgenden werden die Beiträge der Autoren an der Veröffentlichung aufgelistet:

- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld, Dr. Martin Schramm und Peter Ilse haben gemeinsam das Studiendesign in Anlehnung an das Studiendesign der vorhergehenden Studie erarbeitet.
- Das Studiendesign der vorhergehenden Studie ist von Dr. Martin Schramm erarbeitet worden.
- Dr. Martin Schramm hat den Ethikantrag an die Ethikkommission geschrieben.
- Die Einwerbung der von der Firma Epigenomics zur Verfügung gestellten Testmaterialien erfolgte durch Prof. Dr. Stefan Biesterfeld, Dr. Martin Schramm und Peter Ilse.
- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld hat die Mittel für die Finanzierung der Anstellung von Peter Ilse eingeworben.
- Christian Wrobel hat zusammen mit Ingmar Born die klinischen Daten der Patienten in den einsendenden Krankenhäusern im Rahmen einer eigenen vorhergehenden Studie erhoben.
- Dr. Martin Schramm und Christian Wrobel haben gemeinsam die Kriterien zur Bildung des Referenzstandards erarbeitet und die erhobenen klinischen Daten auf das Vorliegen des positiven oder negativen Referenzstandards geprüft.
- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld und Dr. Natalia Pomjanski haben die zytopathologische Diagnostik der Bronchialaspirate durchgeführt.

- Peter Ilse modifizierte das Protokoll für die Quantifizierung von *SHOX2* DNA Methylierung für die Anwendung an bereits isolierter DNA.
- Peter Ilse führte die Quantifizierung der *SHOX2* DNA Methylierung an gelöster isolierter DNA von Bronchialaspiraten durch.
- Die Isolierung der DNA erfolgte im Rahmen einer vorhergehenden Studie durch Christian Wrobel.
- Christian Wrobel und Dr. Martin Schramm haben im Rahmen einer vorhergehenden Studie die Laborarbeiten zur Quantifizierung der der DNA Methylierung der anderen vorgestellten Marker (*APC*, *p16^{INK4A}*, *RASSF1A*) durchgeführt.
- Die Überarbeitung und Zusammenführung der erstellten Datenbanken wurde von Peter Ilse durchgeführt.
- Die statistische Auswertung wurde von Peter Ilse durchgeführt.
- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld, Dr. Martin Schramm und Peter Ilse haben die erhobenen klinischen und experimentellen Ergebnisse in den Erkenntniszusammenhang der molekularen Cytopathologie eingeordnet.
- Das Manuskript wurde von Peter Ilse angefertigt.
- Prof. Dr. Stefan Biesterfeld und Dr. Martin Schramm haben das Manuskript vor Einreichung gründlich Korrektur gelesen und wichtige Impulse zur Überarbeitung gegeben.
- Die Einarbeitung der Im Peer Review Prozess vorgeschlagenen Korrekturen erfolgte durch Peter Ilse.

Anmerkung: Das Patientenkollektiv der vorgestellten Publikation stellt eine Teilmenge des Patientenkollektivs der vorhergehenden Studie (Schramm *et al.*, 2011) „Equivocal Cytology in Lung Cancer Diagnosis“ der Autoren Martin Schramm, Christian Wrobel, Ingmar Born, Marietta Kazimirek, Natalia Pomjanski, Marina William, Reiner Kappes, Claus Dieter Gerharz, Stefan Biesterfeld und Alfred Böcking dar. Christian Wrobel und Ingmar Born haben Daten aus dieser vorhergehenden Studie im Rahmen ihrer Inauguraldissertationen zum Dr. med. verwendet.

Zusammenfassung

Weltweit ist Lungenkrebs seit vielen Dekaden der am meisten diagnostizierte Tumortyp. Er ist der häufigste Tumortyp bei Männern und der vierthäufigste Tumortyp bei Frauen. Obwohl Lungenkrebs in den besser entwickelten Ländern nicht mehr der am häufigsten diagnostizierte Krebs ist, ist er immer noch der Krebstyp, der die meisten Todesfälle verursacht. (Ferlay *et al.*, 2010) Dieser Umstand wird u.a. darauf zurückgeführt, dass für die häufiger diagnostizierten Tumore (Mamma-, Gastrointestinal- und Prostatakarzinome) Vorsorgeuntersuchungen zur Verfügung stehen. So werden diese Tumore nicht nur häufiger diagnostiziert, sie führen aufgrund der besseren Heilungschancen bei frühzeitigerer Erkennung auch nicht mehr so oft zum Tode. (Goeckenjan *et al.*, 2011) Angesichts dessen wäre eine effektive Vorsorgeuntersuchung im Hinblick auf Lungentumore äußerst wertvoll.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein umfassender Überblick über die Interaktionen von *Shox2* in verschiedenen Geweben vorgestellt sowie die möglichen Eigenschaften von *Shox2* als Tumorsuppressorgen oder Onkogen diskutiert.

Die Epigenomics AG (Berlin) hat im Jahr 2010 den quantifizierenden Test auf *SHOX2*-Methylierung (*SHOX2*-Test) als einen potentiellen Biomarker für die Diagnostik von Lungentumoren an Bronchialaspiraten vorgestellt. Es wurde schon früher gezeigt, dass die Methylierung verschiedener Gene mit dem Auftreten von malignen Tumoren korreliert. Der *SHOX2*-Test wurde als lungentumorspezifisch für die Anwendung an Bronchialaspiraten und Blutplasma beschrieben. (Dietrich *et al.*, 2012; Kneip *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2010) Ziel unserer Untersuchungen war es, zu prüfen, ob der *SHOX2*-Test ebenfalls zur Anwendung an Pleuraergüssen geeignet ist. Da neben metastasierenden Lungentumoren auch Metastasen von Tumoren anderer Herkunft in der Pleura nicht ungewöhnlich sind, konnten wir zeigen, dass der *SHOX2*-Test nicht ausschließlich Lungenkarzinome detektiert. Im Weiteren konnten wir zeigen, dass der Schwellenwert des *SHOX2*-Tests für die Diagnose

von Tumoren an Pleuraergüssen angepasst werden muss, da die Sensitivität und Spezifität stark von den Werten zur Diagnose an Bronchialaspiraten abweichen. (Ilse *et al.*, 2013) Der *SHOX2*-Test ist mit einem AUC-Wert von 0,72 (Ilse *et al.*, 2013) etwas schlechter dazu geeignet, Tumore in Pleuraergüssen zu identifizieren, als Lungenkarzinome in Bronchialaspiraten (AUC = 0,86) (Schmidt *et al.*, 2010). Um die höhere Qualität des Tests an Bronchialaspiraten zu verifizieren und um die mögliche Komplementation des *SHOX2*-Tests mit anderen Biomarkern zu überprüfen, haben wir ebenfalls eine Studie an Bronchialaspiraten durchgeführt. (Ilse *et al.*, 2014) Das Untersuchungsmaterial stammte aus einer vorhergehenden Studie unseres Institutes, die das Ziel hatte, die Methylierung von bekannten Tumorsuppressorgenen (*APC*, *p16^{INK4A}*, *RASSF1A*) als Tumormarker für die Diagnose von Tumoren an Bronchialaspiraten zu untersuchen. (Schramm *et al.*, 2011) Die Testqualität hinsichtlich Bronchialaspiraten konnten wir mit einem AUC-Wert von 0,92 verifizieren. Im Weiteren konnten wir zeigen, dass die *SHOX2*-Testergebnisse durch die parallele Anwendung der zuvor getesteten Tumormarker komplementiert werden können (Ilse *et al.*, 2014).

Summary

Lung cancer is the most frequently diagnosed tumour type worldwide since several decades. It is the most frequent tumour type in men and the fourth most frequent tumour type in women. Although lung cancer is not the most frequent diagnosed cancer in highly developed countries anymore, it is still the tumour type which causes most of the deaths. (Ferlay *et al.*, 2010) This circumstance is due to the availability of screening for the more frequent diagnosed tumours (breast, gastrointestinal and prostate carcinoma). Therefore these tumours are not only diagnosed more frequent, they are also less deadly due to the better chances of recovery through earlier detection. (Goeckenjan *et al.*, 2011)

As a part of this work a wide spread review of the interactions of *Shox2* was compiled and presented. Furthermore the possible features of *Shox2* as a tumour supressor gene or oncogene were discussed.

The Epigenomics AG (Berlin) presented the quantifying test on *SHOX2* DNA methylation (*SHOX2* test) as a potential biomarker for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates in 2010. Previously it was shown that methylation of several genes correlates with the occurrence of malignant tumours. The *SHOX2* test was presented as specific for lung cancer executed on bronchial aspirates and blood plasma. (Dietrich *et al.*, 2012; Kneip *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2010) The aim of our investigations on pleural effusions was to examine if the *SHOX2* test is suitable for the application on pleural effusions. Apart from metastasizing lung cancer, metastases of other origin are common in the pleura. Therefore we were able to show that the *SHOX2* test is also able to detect tumours other than lung cancer. Furthermore we showed that the cut-off criterion of the *SHOX2* test has to be adjusted for the application on pleural effusions, as sensitivity and specificity differ greatly from those of bronchial aspirates. (Ilse *et al.*, 2013) The *SHOX2* test is somewhat less suitable to identify tumours in pleural effusions (AUC = 0,72) (Ilse *et al.*, 2013) than to identify lung tumours in bronchial aspirates (AUC = 0,86) (Schmidt *et al.*, 2010). To verify the higher quality of the *SHOX2* test on bronchial aspirates and

to examine the possible complementation with other biomarkers we conducted a study on bronchial aspirates as well. (Ilse *et al.*, 2014) The specimens originates from a previous study of our institute which was aimed at the examination of the methylation of known tumour suppressor genes (*APC*, *p16^{INK4A}*, *RASSF1A*) as a tumour marker for the diagnosis of tumours on bronchial aspirates. (Schramm *et al.*, 2011) We were able to verify the high test quality on bronchial aspirates with an AUC of 0.92. Furthermore we were able to show that the *SHOX2* test can be complemented by the parallel application of the previously tested tumour markers. (Ilse *et al.*, 2014)

Literaturverzeichnis

- Abdo, Li, Lallemand, Bachy, Xu, Rice, and Ernfors (2011).** Dependence on the transcription factor Shox2 for specification of sensory neurons conveying discriminative touch. *European Journal of Neuroscience* 34, 1529-1541.
- Abel (1993).** Die Bewertung diagnostischer Tests : 10 Tabellen, (Hippokrates-Verlag Stuttgart).
- Abrams, Spiro, and Goldstein (1950).** Metastases in carcinoma; analysis of 1000 autopsied cases. *Cancer* 3, 74-85.
- Antony, Loddenkemper, Astoul, Boutin, Goldstraw, Hott, Rodriguez Panadero, and Sahn (2001).** Management of malignant pleural effusions. *European Respiratory Journal* 18, 402-419.
- Aza-Carmona, Barca-Tierno, Hisado-Oliva, Belinchon, Gorbenko-del Blanco, Rodriguez, Benito-Sanz, Campos-Barros, and Heath (2014).** NPPB and ACAN, two novel SHOX2 transcription targets implicated in skeletal development. *PloS One* 9, e83104.
- Baur, Clasen, Fisseler-Eckhoff, Heger, Hering, Hofmann-Reiss, Köhler, Kranig, Kraus, Letzel, Neumann, Tannapfel, Schneider, Sitter, Teschler, Voshaar, and Weber (2011).** Diagnostik und Begutachtung asbestbedingter Berufskrankheiten, Interdisziplinäre S2-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin. *Pneumologie* 65, e1-e47.
- Bedrossian (1994).** Malignant Effusions: A Multimodal Approach to Cytologic Diagnosis, (Igaku-Shoin, New York).
- Bedrossian (1998).** Diagnostic problems in serous effusions. *Diagnostic Cytopathology* 19, 131-137.

Belinsky, Liechty, Gentry, Wolf, Rogers, Vu, Haney, Kennedy, Hirsch, Miller, Franklin, Herman, Baylin, Bunn, and Byers (2006). Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Research* 66, 3338-3344.

Belinsky, Nikula, Palmisano, Michels, Saccomanno, Gabrielson, Baylin, and Herman (1998). Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11891-11896.

Benlloch, Galbis-Caravajal, Martin, Sanchez-Paya, Rodriguez-Paniagua, Romero, Mafe, and Massuti (2006). Potential diagnostic value of methylation profile in pleural fluid and serum from cancer patients with pleural effusion. *Cancer* 107, 1859-1865.

Biesterfeld, Beckers, Del Carmen Villa Cadenas, and Schramm (2011). Feulgen staining remains the gold standard for precise DNA image cytometry. *Anticancer Research* 31, 53-58.

Biesterfeld, and Deacu (2009). DNA image cytometry in the differential diagnosis of benign and malignant lesions of the bile duct, the pancreatic duct and the papilla of Vater. *Anticancer Research* 29, 1579-1584.

Bland, and Altman (1995). Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 310, 170.

Blaschke, Hahurij, Kuijper, Just, Wisse, Deissler, Maxelon, Anastassiadis, Spitzer, Hardt, Scholer, Feitsma, Rottbauer, Blum, Meijlink, Rappold, and Gittenberger-de Groot (2007). Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaking development. *Circulation* 115, 1830-1838.

- Blaschke, Monaghan, Schiller, Schechinger, Rao, Padilla-Nash, Ried, and Rappold (1998).** SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2406-2411.
- Bobick, and Cobb (2012).** Shox2 regulates progression through chondrogenesis in the mouse proximal limb. *Journal of Cell Science* 125, 6071-6083.
- Böcking (1998).** Standardisierung der zytopathologischen Diagnostik. *Der Pathologe* 19, 236-241.
- Bossuyt, Reitsma, Bruns, Gatsonis, Glasziou, Irwig, Lijmer, Moher, Rennie, and de Vet (2003).** Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *BMJ* 326, 41-44.
- Bozzetti, Nizzoli, Guazzi, Flora, Bassano, Crafa, Naldi, and Cascinu (2002).** HER-2/neu amplification detected by fluorescence in situ hybridization in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Annals of Oncology* 13, 1398-1403.
- Breitling, Yang, Korn, Burwinkel, and Brenner (2011).** Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *American Journal of Human Genetics* 88, 450-457.
- Brock, Hooker, Yung, Guo, Han, Ames, Chang, Yang, Mason, Sussman, Baylin, and Herman (2005).** Can we improve the cytologic examination of malignant pleural effusions using molecular analysis? *Annals of Thoracic Surgery* 80, 1241-1247.
- Brown, Alcaraz, Takahashi, Persons, Lieber, and Jenkins (1994).** Chromosomal aneusomies detected by fluorescent in situ hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma. *Journal of Urology* 152, 1157-1162.

- Clement-Jones, Schiller, Rao, Blaschke, Zuniga, Zeller, Robson, Binder, Glass, Strachan, Lindsay, and Rappold (2000).** The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Human Molecular Genetics* 9, 695-702.
- Colasante, Collombat, Raimondi, Bonanomi, Ferrai, Maira, Yoshikawa, Mansouri, Valtorta, Rubenstein, and Broccoli (2008).** Arx is a direct target of Dlx2 and thereby contributes to the tangential migration of GABAergic interneurons. *Journal of Neuroscience* 28, 10674-10686.
- Dammann, Li, Yoon, Chin, Bates, and Pfeifer (2000).** Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature Genetics* 25, 315-319.
- Deardorff, Noon, and Krantz (1993-2016).** Cornelia de Lange Syndrome. In GeneReviews(R), Pagon, Adam, Ardinger, Wallace, Amemiya, Bean, Bird, Fong, Mefford, Smith, and Stephens, eds. (Seattle (WA)).
- Dell (2006).** Milestone 1 (1889) Seed and soil hypothesis. *Nature Reviews: Cancer*, S7.
- Delpu, Cordelier, Cho, and Torrisani (2013).** DNA methylation and cancer diagnosis. *Int J Mol Sci* 14, 15029-15058.
- Dietrich, Kneip, Raji, Liloglou, Seegebarth, Schlegel, Flemming, Rausch, Distler, Fleischhacker, Schmidt, Giles, Walshaw, Warburton, Liebenberg, and Field (2012).** Performance evaluation of the DNA methylation biomarker SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates. *International Journal of Oncology* 40, 825-832.
- Dougherty, Zagoraiou, Satoh, Rozani, Doobar, Arber, Jessell, and Kiehn (2013).** Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal shox2 excitatory interneurons. *Neuron* 80, 920-933.

- Eppig, Blake, Bult, Kadin, Richardson, and Mouse Genome Database (2015).** The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Research* 43, D726-736.
- Espinoza-Lewis, Liu, Sun, Chen, Jiao, and Chen (2011).** Ectopic expression of Nkx2.5 suppresses the formation of the sinoatrial node in mice. *Developmental Biology* 356, 359-369.
- Espinoza-Lewis, Yu, He, Liu, Tang, Shi, Sun, Martin, Wang, Yang, and Chen (2009).** Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Developmental Biology* 327, 376-385.
- Esteller (2007).** Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286-298.
- European Commission (2013).** European social statistics-edition 2013. In, (Publications Office of the European Union, Luxembourg).
- Feichter, and Dalquen (2000).** Zytopathologie, (Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York).
- Feinberg, and Vogelstein (1983).** Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.
- Ferlay, Shin, Bray, Forman, Mathers, and Parkin (2010).** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 127, 2893-2917.
- Ficari, Cama, Valanzano, Curia, Palmirotta, Aceto, Esposito, Crognale, Lombardi, Messerini, Mariani-Costantini, Tonelli, and Battista (2000).** APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *British Journal of Cancer* 82, 348-353.

Frick, Leonhardt, and Starck (1987). Spezielle Anatomie II, Vol 3. überarbeitete erweiterte Auflage, (Georg Thieme Verlag Stuttgart New York).

Fulp, Cho, Marsh, Nasrallah, Labosky, and Golden (2008). Identification of Arx transcriptional targets in the developing basal forebrain. *Human Molecular Genetics* 17, 3740-3760.

Furukawa, Kozak, and Cepko (1997). rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3088-3093.

Ganga, Espinoza, Cox, Morton, Hjalt, Lee, and Amendt (2003). PITX2 isoform-specific regulation of atrial natriuretic factor expression: synergism and repression with Nkx2.5. *Journal of Biological Chemistry* 278, 22437-22445.

Gesta, Bluher, Yamamoto, Norris, Berndt, Kralisch, Boucher, Lewis, and Kahn (2006). Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6676-6681.

- Goeckenjan, Sitter, Thomas, Branscheid, Flentje, Griesinger, Niederle, Stuschke, Blum, Deppermann, Ficker, Freitag, Lubbe, Reinhold, Spath-Schwalbe, Ukena, Wickert, Wolf, Andreas, Auberger, Baum, Baysal, Beuth, Bickeboller, Bocking, Bohle, Bruske, Burghuber, Dickgreber, Diederich, Dienemann, Eberhardt, Eggeling, Fink, Fischer, Franke, Friedel, Gauler, Gutz, Hautmann, Hellmann, Hellwig, Herth, Heussel, Hilbe, Hoffmeyer, Horneber, Huber, Hubner, Kauczor, Kirchbacher, Kirsten, Kraus, Lang, Martens, Mohn-Staudner, Muller, Muller-Nordhorn, Nowak, Ochmann, Passlick, Petersen, Pirker, Pokrajac, Reck, Riha, Rube, Schmittel, Schonfeld, Schutte, Serke, Stamatis, Steingraber, Steins, Stoelben, Swoboda, Teschler, Tessen, Weber, Werner, Wichmann, Irlinger Wimmer, Witt, Worth, German Respiratory, and German Cancer (2011).** Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie* 65, e51-75.
- Gray, Yates, Seal, Wright, and Bruford (2015).** Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Research* 43, D1079-1085.
- Groden, Thliveris, Samowitz, Carlson, Gelbert, Albertsen, Joslyn, Stevens, Spirio, Robertson, and et al. (1991).** Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 589-600.
- Gross, Krause, Wuelling, and Vortkamp (2012).** Hoxa11 and Hoxd11 regulate chondrocyte differentiation upstream of Runx2 and Shox2 in mice. *PLoS One* 7, e43553.
- Grote, Schmiemann, Kiel, Bocking, Kappes, Gabbert, and Sarbia (2004).** Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli promoter 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *International Journal of Cancer* 110, 751-755.

Grote, Schmiemann, Sarbia, and Böcking (2003). DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: which method to take? *Analytical Cellular Pathology* 25, 83-88.

Gu, Wei, Yu, Fei, and Chen (2008a). Shox2-deficiency leads to dysplasia and ankylosis of the temporomandibular joint in mice. *Mechanisms of Development* 125, 729-742.

Gu, Wei, Yu, Jiang, Fei, and Chen (2008b). Mice with an anterior cleft of the palate survive neonatal lethality. *Developmental Dynamics* 237, 1509-1516.

Hanahan, and Weinberg (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, and Weinberg (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Haroske, Giroud, Reith, and Bocking (1998). 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. *Analytical Cellular Pathology* 17, 189-200.

Hashem, and Claycomb (2013). Genetic isolation of stem cell-derived pacemaker-nodal cardiac myocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 383, 161-171.

Hashem, Lam, Mihardja, White, Lee, and Claycomb (2013). Shox2 regulates the pacemaker gene program in embryoid bodies. *Stem Cells Dev* 22, 2915-2926.

Heller, Babinsky, Ziegler, Weinzierl, Noll, Altenberger, Müllauer, Dekan, Grin, Lang, End-Pfützenreuter, Steiner, Zehetmayer, Döme, Arns, Fong, Wright, Yang, Klepetko, Posch, Zielinski, and Zöchbauer-Müller (2013). Genome-wide CpG island methylation analyses in non-small cell lung cancer patients. *Carcinogenesis* 34, 513-521.

- Hilgers, Bauer, and Schreiber (2007).** Einführung in die medizinische Statistik, 2te Auflage edn (Springer Verlag Berlin Heidelberg New York).
- Hoffmann, Berger, Glaser, Bacon, Li, Gretz, Steinbeisser, Rottbauer, Just, and Rappold (2013).** Islet1 is a direct transcriptional target of the homeodomain transcription factor Shox2 and rescues the Shox2-mediated bradycardia. *Basic Research in Cardiology* 108, 339.
- Holland, Booth, and Bruford (2007).** Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biology* 5, 47.
- Hong, Noh, Teng, Shao, Rehmani, Ding, Dong, Su, Shi, Kim, and Huang (2014).** SHOX2 is a direct miR-375 target and a novel epithelial-to-mesenchymal transition inducer in breast cancer cells. *Neoplasia* 16, 279-290 e271-275.
- Hoogaars, Tessari, Moorman, de Boer, Hagoort, Soufan, Campione, and Christoffels (2004).** The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovascular Research* 62, 489-499.
- Hoshino, Horikawa, Oshimura, and Yuasa (1991).** Normal human chromosome 5, on which a familial adenomatous polyposis gene is located, has tumor suppressive activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 174, 298-304.
- Hsu, Chen, Hung, Wen, Lin, Lee, and Wang (2007).** Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma. *Cancer* 110, 2019-2026.
- Ilse, Biesterfeld, Pomjanski, Fink, and Schramm (2013).** SHOX2 DNA methylation is a tumour marker in pleural effusions. *Cancer Genomics & Proteomics* 10, 217-223.
- Ilse, Biesterfeld, Pomjanski, Wrobel, and Schramm (2014).** Analysis of SHOX2 methylation as an aid to cytology in lung cancer diagnosis. *Cancer Genomics & Proteomics* 11, 251-258.

Ionta, Liang, Kim, Rafie, Giacomello, Marban, and Cho (2015). SHOX2 overexpression favors differentiation of embryonic stem cells into cardiac pacemaker cells, improving biological pacing ability. *Stem Cell Reports* 4, 129-142.

Ireland, English, Cross, Houlsby, and Burn (1991). A de novo translocation t(3;17) (q26.3;q23.1) in a child with Cornelia de Lange syndrome. *Journal of Medical Genetics* 28, 639-640.

Kaatsch, Spix, Hentschel, Katalinic, Luttmann, Stegmaier, Caspritz, Cernaj, Ernst, Folkerts, Hansmann, Kranzhöfer, Krieghoff-Henning, Kunz, Penzkofer, Treml, Wittenberg, Baras, Barnes, Bertz, Buttermann-Schweiger, Dahm, Franke, Haberland, Kraywinkel, Wienecke, and Wolf (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010, Vol 9. Ausgabe, (Robert Koch- Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)).

Kaatsch, Spix, Katalinic, Hentschel, Luttmann, Stegmaier, Caspritz, Christ, Ernst, Folkerts, Hansmann, Klein, Kranzhöfer, Kunz, Manegold, Penzkofer, Treml, Weg-Remers, Wittenberg, Baras, Barnes, Bertz, Buttmann-Schweiger, Dahm, Fiebig, Franke, Haberland, Kraywinkel, Wienecke, and Wolf (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe edn (Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)).

Kamb, Gruis, Weaver-Feldhaus, Liu, Harshman, Tavitigian, Stockert, Day, Johnson, and Skolnick (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.

Kaplan, Burds, Swedlow, Bekir, Sorger, and Nathke (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nature Cell Biology* 3, 429-432.

Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, and Jameson, eds. (2005). Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th edition edn (USA: McGraw-Hill Medical Publishing Division).

- Kiefer, Robbins, Barina, Zhang, and Rauchman (2008).** SALL1 truncated protein expression in Townes-Brocks syndrome leads to ectopic expression of downstream genes. *Human Mutation* 29, 1133-1140.
- Kneip, Schmidt, Seegebarth, Weickmann, Fleischhacker, Liebenberg, Field, and Dietrich (2011).** SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. *Journal of Thoracic Oncology* 6, 1632-1638.
- Knippers (2006).** Molekulare Genetik, 9. Auflage edn (Georg Thieme Verlag Stuttgart New York).
- Krantz, McCallum, DeScipio, Kaur, Gillis, Yaeger, Jukofsky, Wasserman, Bottani, Morris, Nowaczyk, Toriello, Bamshad, Carey, Rappaport, Kawauchi, Lander, Calof, Li, Devoto, and Jackson (2004).** Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nature Genetics* 36, 631-635.
- Laird (2003).** The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews: Cancer* 3, 253-266.
- Lee, Yamamoto, Boucher, Winnay, Gesta, Cobb, Bluher, and Kahn (2013).** Shox2 is a molecular determinant of depot-specific adipocyte function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 11409-11414.
- Lewin, Plum, Hildmann, Rujan, Eckhardt, Liebenberg, Lofton-Day, and Wasserkort (2007).** Comparative DNA methylation analysis in normal and tumour tissues and in cancer cell lines using differential methylation hybridisation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39, 1539-1550.
- Light (2002).** Clinical practice. Pleural effusion. *New England Journal of Medicine* 346, 1971-1977.

- Lin, Huang, He, Gu, Zhang, Chen, and Zhang (2007).** Expression survey of genes critical for tooth development in the human embryonic tooth germ. *Developmental Dynamics* 236, 1307-1312.
- Liu, Chen, Espinoza-Lewis, Jiao, Sheu, Hu, Lin, Zhang, and Chen (2011).** Functional redundancy between human SHOX and mouse Shox2 genes in the regulation of sinoatrial node formation and pacemaking function. *Journal of Biological Chemistry* 286, 17029-17038.
- Liu, Chen, Ye, Espinoza-Lewis, Hu, Zhang, and Chen (2014).** Phosphorylation of Shox2 is required for its function to control sinoatrial node formation. *J Am Heart Assoc* 3, e000796.
- Livak, and Schmittgen (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loddenkemper (2005).** Management der malignen Pleuraergüsse. *Pneumologie* 59, 120-135.
- Marel, Zrustova, Stasny, and Light (1993).** The incidence of pleural effusion in a well-defined region. Epidemiologic study in central Bohemia. *Chest* 104, 1486-1489.
- Mohanty, and Dey (2003).** Serous effusions: diagnosis of malignancy beyond cytomorphology. An analytic review. *Postgraduate Medical Journal* 79, 569-574.
- Motherby, Nadjari, Friegel, Kohaus, Ramp, and Böcking (1999).** Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagnostic Cytopathology* 20, 350-357.
- Onofre, Onofre, Pomjanski, Buckstegge, Grote, and Bocking (2008).** 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. *Cancer* 114, 204-215.
- Paget (1889).** The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 133, 571-573.

- Palmisano, Divine, Saccomanno, Gilliland, Baylin, Herman, and Belinsky (2000).** Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Research* 60, 5954-5958.
- Paska, and Hudler (2015).** Aberrant methylation patterns in cancer: a clinical view. *Biochemia Medica: Casopis Hrvatskoga Drustva Medicinskih Biokemicara* 25, 161-176.
- Polidori, Lomax, and Docherty (2012).** Palmitate enhances the differentiation of mouse embryonic stem cells towards white adipocyte lineages. *Molecular and Cellular Endocrinology* 361, 40-50.
- Pomjanski, Motherby, Buckstegge, Knops, Rohn, and Bocking (2001).** Early diagnosis of mesothelioma in serous effusions using AgNOR analysis. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 23, 151-160.
- Powell, Zilz, Beazer-Barclay, Bryan, Hamilton, Thibodeau, Vogelstein, and Kinzler (1992).** APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235-237.
- Pox, Aretz, Bischoff, Graeven, Hass, Heußner, Hohenberger, Holstege, Hübner, Kolligs, Kreis, Lux, Ockenga, Porschen, Post, Rahner, Reinacher-Schick, Riemann, Sauer, Sieg, Scheppach, Schmitt, Schmoll, Schulmann, Tannapfel, and Schmiegel (2013).** S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0 – Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 51, 753-854.
- Puskaric, Schmitteckert, Mori, Glaser, Schneider, Bruneau, Blaschke, Steinbeisser, and Rappold (2010).** Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart. *Human Molecular Genetics* 19, 4625-4633.
- R Core Team (2013).** R: A language and environment for statistical computing. In, (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

- Richter, Pfeifer, and Dammann (2009).** The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1796, 114-128.
- Riede, Werner, and Schäfer, eds. (2004).** Allgemeine und spezielle Pathologie, 5te komplett überarbeitete Auflage edn (Georg Thieme Verlag Stuttgart New York).
- Robin, Turck, Hainard, Tiberti, Lisacek, Sanchez, and Müller (2011).** pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 12, 77.
- Rocco, and Sidransky (2001).** p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Experimental Cell Research* 264, 42-55.
- Rodriguez-Panadero, Borderas Naranjo, and Lopez Mejias (1989).** Pleural metastatic tumours and effusions. Frequency and pathogenic mechanisms in a post-mortem series. *European Respiratory Journal* 2, 366-369.
- Rönz, and Eckstein (1994).** Lexikon Statistik, (Gabler Verlag Wiesbaden).
- Rosin, McAllister, Dyck, Percival, Kurrasch, and Cobb (2015).** Mice lacking the transcription factor SHOX2 display impaired cerebellar development and deficits in motor coordination. *Developmental Biology* 399, 54-67.
- Rubinfeld, Souza, Albert, Muller, Chamberlain, Masiarz, Munemitsu, and Polakis (1993).** Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731-1734.
- Schaarschmidt (2012).** bdpv: Inference and design for predictive values in binary diagnostic tests. In.
- Scherpereel, and French Speaking Society for Chest Medicine Experts (2007).** Guidelines of the French Speaking Society for Chest Medicine for management of malignant pleural mesothelioma. *Respiratory Medicine* 101, 1265-1276.

Schmidt, Liebenberg, Dietrich, Schlegel, Kneip, Seegebarth, Flemming, Seemann, Distler, Lewin, Tetzner, Weickmann, Wille, Liloglou, Raji, Walshaw, Fleischhacker, Witt, and Field (2010). SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer* 10, 600.

Schmiemann, Böcking, Kazimirek, Onofre, Gabbert, Kappes, Gerharz, and Grote (2005). Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. *Clinical Cancer Research* 11, 7728-7734.

Schneider, Dietrich, Fleischhacker, Leschber, Merk, Schaper, Stapert, Vossenaar, Weickmann, Liebenberg, Kneip, Seegebarth, Erdogan, Rappold, and Schmidt (2011). Correlation of SHOX2 gene amplification and DNA methylation in lung cancer tumors. *BMC Cancer* 11, 102.

Schramm, Wrobel, Born, Kazimirek, Pomjanski, William, Kappes, Gerharz, Biesterfeld, and Böcking (2011). Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis. *Cancer Cytopathology* 119, 177-192.

Schreiber, and McCrory (2003). Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. *Chest* 123, 115-128.

Scott, Hasegawa, Sakurai, Yaron, Cobb, and Wang (2011). Transcription factor short stature homeobox 2 is required for proper development of tropomyosin-related kinase B-expressing mechanosensory neurons. *Journal of Neuroscience* 31, 6741-6749.

Semina, Reiter, and Murray (1998). A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse. *Human Molecular Genetics* 7, 415-422.

- Seo, Im, Goo, Chung, and Kim (2001).** Atypical pulmonary metastases: spectrum of radiologic findings. *Radiographics* 21, 403-417.
- Severmann, and Vortkamp (2015).** [Hypertrophic chondrocytes: Programmed cell death or stem cell reservoir?]. *Zeitschrift für Rheumatologie* 74, 898-901.
- Shim, Kang, and Ro (2000).** Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Laboratory Investigation* 80, 689-695.
- Sriram, Relan, Clarke, Duhig, Yang, Bowman, Lee, and Fong (2011).** Diagnostic molecular biomarkers for malignant pleural effusions. *Future Oncology (London, England)* 7, 737-752.
- Steinberg, Fine, and Chappell (2009).** Sample size for positive and negative predictive value in diagnostic research using case-control designs. *Biostatistics* 10, 94-105.
- Stott, Bates, James, McConnell, Starborg, Brookes, Palmero, Ryan, Hara, Vousden, and Peters (1998).** The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO Journal* 17, 5001-5014.
- Su, Vogelstein, and Kinzler (1993).** Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262, 1734-1737.
- Ting, McGarvey, and Baylin (2006).** The cancer epigenome-components and functional correlates. *Genes and Development* 20, 3215-3231.
- Travis, Brambilla, Burke, Marx, and Nicholson, eds. (2015).** WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, 4th edition edn (Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC)).
- van Schaick, Smidt, Rovescalli, Luijten, van der Kleij, Asoh, Kozak, Nirenberg, and Burbach (1997).** Homeobox gene Prx3 expression in rodent brain and extraneural tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12993-12998.

- Volodko, Gordon, Salla, Ghazaleh, and Baksh (2014).** RASSF tumor suppressor gene family: biological functions and regulation. *FEBS Letters* 588, 2671-2684.
- Wain, Bruford, Lovering, Lush, Wright, and Povey (2002).** Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 79, 464-470.
- Wang, Bai, Li, Ye, Zhang, Greene, Tao, Chen, Wehrens, and Martin (2014).** Pitx2-microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 9181-9186.
- Wang, Klysik, Sood, Johnson, Wehrens, and Martin (2010).** Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9753-9758.
- Winer, Jung, Shackel, and Williams (1999).** Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical Biochemistry* 270, 41-49.
- Yamamoto, Gesta, Lee, Tran, Saadatirad, and Kahn (2010).** Adipose depots possess unique developmental gene signatures. *Obesity (Silver Spring)* 18, 872-878.
- Yang, Zhang, Cai, Shen, Yuan, Yang, Wu, Lu, and Shen (2013).** Elevated SHOX2 Expression is Associated with Tumor Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 20, 644-649.
- Ye, Wang, Zheng, He, Sribastav, Wang, Wang, Liu, and Leung (2015).** Role of SHOX2 in the development of intervertebral disc degeneration. *Journal of Orthopaedic Research*.

Yoshida, Yamamoto, Fujita, Furuichi, Ito, Inoue, Yamana, Zanma, Takada, Ito, and Komori (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes and Development* 18, 952-963.

Yu, Gu, Alappat, Song, Yan, Zhang, Zhang, Jiang, Zhang, Zhang, and Chen (2005). Shox2-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development* 132, 4397-4406.

Yu, Liu, Yan, Yang, Long, Muneoka, and Chen (2007). Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Developmental Biology* 306, 549-559.

Zhao, Dong, Kang, Go, Tong, Ng, Chiu, Cheng, To, Sung, and Yu (2014). Helicobacter pylori-induced STAT3 activation and signalling network in gastric cancer. *Oncoscience* 1, 468-475.

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meines Promotionsstudiums unterstützt und begleitet haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Biesterfeld und Dr. Martin Schramm für die Überlassung des interessanten und spannenden Themas und der Bereitstellung der Möglichkeiten es zu bearbeiten. Im Weiteren möchte ich mich auch bei beiden für anregende Diskussionen und Unterhaltungen sowohl zum Thema als auch privater Natur bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Sebastian Wesselborg für die freundliche Übernahme des Korreferates und die Anregung, die Interaktionspartner von *SHOX2* genauer zu beschreiben, bedanken.

Auch bei den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern und Doktoranden des Fachbereichs Cytopathologie möchte ich mich für die humorvolle und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders hervorheben möchte ich dabei Dr. Christian Fink, Christian Wrobel und Dr. Martin Schramm, durch deren Ausarbeitung des Referenzstandards die Erstellung beider Studien in dieser Qualität erst ermöglicht wurde.

Außerdem möchte ich mich bei Christoph, Vasko und Björn für einige interessante Diskussionen zu Formulierungen und zur Statistik bedanken, die bei der eigentlich geplanten Ablenkung doch immer wieder aufkamen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mir stets mit offenem Ohr und viel Geduld und Diskussionsbereitschaft zur Seite stand.