

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und  
Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin IV  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring**

**Modifizierte Nucleoside als potenzielle Tumormarker  
beim Mammakarzinom**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Fabian Wolfgang Klaus  
aus  
Stuttgart-Bad Cannstatt**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. M. Liebich

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Schleicher

---

<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b>	Seite
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>1.1 Tumormarker</b>	2
1.1.1 Einteilung der Tumormarker beim Mammakarzinom	3
1.1.2 CA 15-3 und CA 27.29	6
1.1.3 CEA	7
1.1.4 Östrogen- und Progesteronrezeptoren	8
1.1.5 DNA-Durchflusszytometrie	10
1.1.6 HER-2/neu (c-erbB-2)	11
1.1.7 p53	13
1.1.8 Cathepsin D	14
<b>1.2 Modifizierte und nichtmodifizierte Nucleoside</b>	14
1.2.1 Aufbau der Nucleoside	15
1.2.2 Modifizierte Nucleoside und deren Vorkommen in der RNA	19
1.2.3 Synthese der modifizierten Nucleoside in der tRNA	20
1.2.4 Funktion der modifizierten Nucleoside in der tRNA	21
1.2.5 Modifizierte Nucleoside beim Abbau der RNA	22
1.2.6 Modifizierte Nucleoside als Tumormarker	23
<b>1.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</b>	23
<b>1.4 Neuronale Netze (Artificial Neural Networks = ANN)</b>	26
<b>1.5 Ziel der Arbeit</b>	30
<b>2. Material und Methoden</b>	31
<b>2.1 Probanden und Gewinnung der Urinproben</b>	31
2.1.1 Kollektiv der gesunden Probandinnen	31
2.1.2 Kollektiv der Mammakarzinompatientinnen	32
<b>2.2 Methode zur Bestimmung der Nucleosidkonzentrationen</b>	33
2.2.1 Erstellen der Absorptionsspektren der Nucleoside	34
2.2.2 Aufbereitung der Urinproben	37

2.2.3	Apparative Bedingungen an der HPLC-Anlage	41
2.2.4	Bestimmung der Retentionszeiten der Nucleoside	44
2.2.5	Kalibrierung der HPLC-Anlage	46
2.2.6	Anwendung der Methode auf Urinproben und Formulierung des Endergebnisses	47
<b>2.3</b>	<b>Validierung der Methode</b>	<b>48</b>
2.3.1	Apparative Reproduzierbarkeit	48
2.3.2	Reproduzierbarkeit des gesamten Probenansatzes	49
2.3.3	Linearitätskontrolle des Messbereichs	49
2.3.4	Untere Nachweisgrenzen	49
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Chromatogramme</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Validierung der Methode</b>	<b>53</b>
3.2.1	Apparative Reproduzierbarkeit	54
3.2.2	Reproduzierbarkeit des gesamten Probenansatzes	55
3.2.3	Linearitätskontrolle des Messbereichs	57
3.2.4	Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen	58
<b>3.3</b>	<b>Auswertung der Daten mittels klassischer Statistik und ANN</b>	<b>59</b>
3.3.1	Klassische statistische Auswertung der erhaltenen Daten	59
3.3.2	Auswertung der Daten durch das Neuronale Netz	67
3.3.3	Vergleich der Spezifitäten und Sensitivitäten der einzelnen Nucleoside und der ANN-Auswertung sowie der Tumor- marker CA 15-3 und CEA	68
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Validierung der Methode</b>	<b>70</b>
4.1.1	Apparative Reproduzierbarkeit	70
4.1.2	Reproduzierbarkeit des gesamten Probenansatzes	71
4.1.3	Linearitätskontrolle des Messbereichs	72

4.1.4	Untere Nachweisgrenzen	72
<b>4.2</b>	<b>Auswertung der Daten mittels klassischer Statistik und ANN</b>	<b>73</b>
4.2.1	Klassische statistische Auswertung der erhaltenen Daten	74
4.2.2	Auswertung der Daten durch das Neuronale Netz	78
4.2.3	Vergleich der Spezifitäten und Sensitivitäten der einzelnen Nucleoside und der ANN-Auswertung sowie der Tumormarker CA 15-3 und CEA	79
<b>4.3</b>	<b>Bedeutung der Nucleoside als Tumormarker</b>	<b>80</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>



## **1. Einleitung**

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste Krebserkrankung unter Frauen (74). Im Jahr 1997 erkrankten in Deutschland 45800 Frauen neu an einem Mammakarzinom, 18378 Frauen starben 1997 an Brustkrebs. Legt man das Saarländische Krebsregister zugrunde, dürfte mittlerweile die jährliche Neuerkrankungsrate (ohne In-situ-Karzinome) bei über 50.000 Fällen liegen. Somit erkrankt in Deutschland ungefähr jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (23). Fünf bis zehn Prozent dieser bösartigen Tumoren der Brustdrüse sind hereditären und 90 bis 95 Prozent spontanen Ursprungs (16).

Hierzulande können auch unter Einsatz einer optimalen lokoregionären Therapie nur ca. 36 Prozent der an einem Mammakarzinom leidenden Patientinnen als geheilt – frei von (Mikro-)Metastasen – gelten (83).

Bezüglich des Auftretens des Mammakarzinoms werden Punkte wie anthropometrische Parameter, körperliche Aktivität, reproduktive Faktoren, Nahrung, exogener Östrogenzufuhr, benigne Brusterkrankungen sowie Vererbung diskutiert und bezüglich einer Senkung der Mortalität die Wichtigkeit von Primärprevention sowie früher Detektion betont (17). Abnahmen der Mortalitätsraten des Mammakarzinoms in den USA, Kanada und einigen europäischen Ländern, darunter Deutschland, Österreich und Großbritannien, werden verbessertem Screening sowie höherer Effektivität in der adjuvanten Therapie zugeschrieben. Die sehr niedrigen Mortalitätsraten in einigen asiatischen Regionen weisen auf die eventuelle Bedeutung von diätetischen und kulturellen Faktoren sowie Einflüssen der Umgebung hin (62).

Die Therapie des Mammakarzinoms sowie eventueller Metastasen betreffend existieren zahlreiche Strategien, welche zum Teil etabliert sind, zum Teil noch in Studien auf ihre Effektivität hin untersucht werden. Zu diesen Behandlungen zählen die Operation, Chemotherapie, Hormontherapie, Immuntherapie und die Strahlentherapie; auch werden zunehmend neoadjuvante Therapien angewandt, beispielsweise beim inflammatorischen und lokal fortgeschrittenen

Mammakarzinom. Des Weiteren werden neuere Therapieansätze wie stammzellgestützte Hochdosischemotherapie sowie molekulare Therapien – Therapie über Oberflächenrezeptoren, Blockade mitogener bzw. onkogener Signalketten, Hemmung der Tumorangiogenese sowie die Gen- und Pharmakotherapie – diskutiert (32, 71, 83).

Behandlungsleitlinien für nicht an Studien teilnehmende Patientinnen bezüglich der risikoadaptierten adjuvanten systemischen Therapie des primären Mammakarzinoms wurden durch Expertenpanels auf der letzten internationalen Konsensuskonferenz 2001 in St. Gallen aufgestellt (27).

Das Erkennen von Brustkrebs in einem frühen Stadium ist wie bei allen malignen Erkrankungen von großer Bedeutung. Bislang existieren jedoch für das Mammakarzinom keine befriedigenden Tumormarker (109, 110), weswegen zusätzliche Marker mit diagnostischer Relevanz von großem Interesse sind. In dieser Arbeit sollen sog. modifizierte Nucleoside auf ihre Qualität als Tumormarker überprüft werden.

Daher sollen in diesem Kapitel zunächst die „klassischen“ Tumormarker und anschließend die untersuchten modifizierten Nucleoside beschrieben werden sowie das zur Detektion der Nucleoside angewandte Verfahren, die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) und das zur Auswertung herangezogene Artifizielle Neuronale Netz. Abschließend wird die Zielsetzung der Arbeit erörtert.

### **1.1 Tumormarker**

Im Allgemeinen sind Tumormarker Proteine mit einem Kohlenhydrat- oder Lipidanteil, welche entweder Bestandteile der Zellmembran oder des Zytoplasmas maligner Zellen sind, beispielsweise Tumor-assoziierte Antigene, oder welche als Reaktion auf das maligne Wachstum vom gesunden Gewebe gebildet werden (99). Der Begriff kann jedoch auch weiter gefasst werden und so unter anderem auch Veränderungen auf genetischer Ebene mit einbeziehen.

### 1.1.1 Einteilung der Tumormarker beim Mammakarzinom

Auf dem Gebiet des Mammakarzinoms existieren zahlreiche Tumormarker, die in verschiedene Typen eingeteilt werden können. So können in jeder Zelle des Körpers genetische Anzeichen von eventuell vererbter Suszeptibilität gegenüber dem Mammakarzinom gefunden werden, bezeichnet als Keimlinienmarker (94). An dieser Stelle sind als wichtiges Beispiel BRCA1 und BRCA2 (Breast Cancer Gene 1 und 2) zu nennen, die für gewöhnlich mit dem familiären Mammakarzinom assoziiert werden und kürzlich kloniert wurden (91, 98). Der Status dieser Gene – normal, mutiert oder deletiert – kann in Leukozyten bestimmt werden und hilft Patienten aus Hochrisikofamilien, ihr individuelles Risiko zu bestimmen und bringt so Empfehlungen für Screening und Prävention mit sich (94).

Andererseits existieren Marker, die im Tumorgewebe selbst nachgewiesen werden können und welche das Vorhandensein oder den Status von malignem Gewebe anzeigen (94). Stellvertretend sollen hier die später detaillierter betrachteten Tumormarker c-erbB-2, Östrogen- und Progesteronrezeptoren und Cathepsin D genannt werden.

Des Weiteren gibt es die zirkulierenden Marker, zu welchen diejenigen gerechnet werden, die im Plasma oder Serum detektiert werden können. Die zirkulierenden Marker werden wiederum in Untergruppen untergliedert (94):

Eine Untergruppe bilden die Tumor-assoziierten Antigene (TAA). Es gibt drei primäre Mechanismen, die zu ihrer Erhöhung beitragen: Die Expression der TAAs durch (maligne und benigne) Zellen, die Anzahl der Zellen, die zur Produktion beitragen und die Eliminationsrate (Clearance) (94). Aufgrund der Tatsache, dass sowohl maligne als auch normale/benigne (in besonderem Maße bei gutartigen neoplastischen oder entzündlichen Prozessen) Zellen TAAs exprimieren können, die Expression bei malignen Zellen ausbleiben kann oder zu wenige maligne Zellen vorhanden sein können, die Clearance in irgendeiner

Weise erhöht oder abgeschwächt sein kann, ist zu berücksichtigen, dass sich falsch positive oder falsch negative Werte ergeben können. Daher kommt der Festlegung eines „cut off“ - Punktes große Bedeutung zu: Durch ihn wird das Verhältnis von diagnostischer Spezifität (Anteil der richtig negativen Untersuchungsergebnisse geteilt durch die Gesamtzahl der Probanden ohne die Erkrankung) und Sensitivität (Anteil der richtig positiven Untersuchungsergebnisse geteilt durch die Gesamtzahl der Probanden mit der Erkrankung) bestimmt. Betragen im Idealfall Spezifität und Sensitivität 100 %, so stellt sich dieser Sachverhalt in der Realität in der Regel folgendermaßen dar: Wählt man eine hohe Spezifität, um Gesunde auch als solche einzustufen, ergibt sich daraus meist eine niedrigere Sensitivität, da dadurch mehr Kranke nicht als krank erkannt werden und ihre bereits pathologischen Werte noch als normal eingestuft werden. Entsprechend folgt einer höher gewählten Sensitivität eine niedrigere Spezifität (Abbildung 1). Um möglichst wenig Gesunde als krank zu

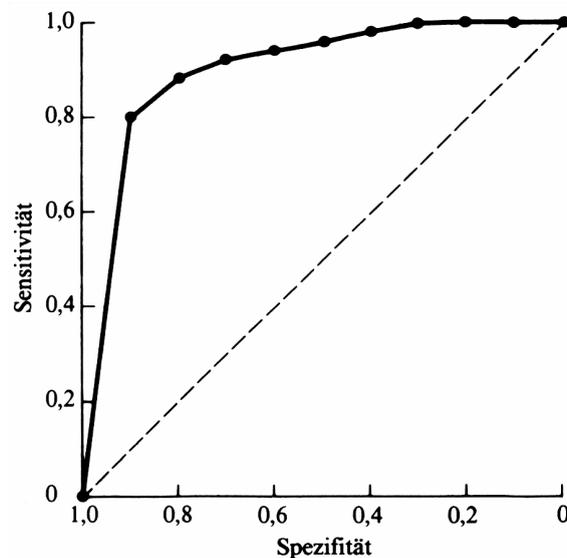


Abbildung 1: Schematische Darstellung der gegenseitigen Abhängigkeit von Sensitivität und Spezifität: Je höher die Sensitivität, desto niedriger die Spezifität. Bei Annäherung der Kurve an den Abschnitt oben links nimmt die Nützlichkeit eines Tests zu, bei Annäherung an die gebrochene Linie ab (28).

bezeichnen, wird als „cut off“ – Punkt meist eine Spezifität von 95% angesetzt und daraus dann die Sensitivität berechnet.

Eine weitere Untergruppe bilden die Marker der Tumorbiologie, zu welcher unter anderem Marker gehören, die die Stimulation oder Inhibition der Zellproliferation und Angiogenese steuern. Um das Beispiel der Angiogenese heranzuziehen, ist anzumerken, dass die Marker sowohl von den Krebszellen selbst oder vom umgebenden normalen Stroma produziert werden können (94).

In einigen Studien wurde dokumentiert, dass Angiogenesefaktoren wie Fibroblast Growth Factor (FGF) oder Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) bei Patienten mit malignen Erkrankungen erhöht sein können (96, 111). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass diese Faktoren ebenfalls während postoperativer Perioden oder während der Heilung erhöht sind (94).

Weitere Untergruppen der zirkulierenden Tumormarker sind Antikörper, die gegen die Tumor-assoziierten Antigene gebildet werden, wobei hier noch viele Fragen offen stehen, und im Blut zirkulierende maligne Zellen oder freie DNA.

Ein Überblick über die zirkulierenden Tumormarker stellt sich folgendermaßen dar:

- **Tumor-assoziierte Antigene** (= tumor-associated antigens = TAAs):
  - Carcinoembryonic antigen (CEA)
  - Produkte oder verwandte Produkte des MUC-1 Gens:
    - Cancer / Carbohydrate Antigen (CA) 15-3
    - CA 27.29
    - CA 549
    - Breast cancer mucin (BCM)
    - Mammary serum antigen (MSA)
    - Mucinous carcinoma antigen (MCA)
  - Tissue polypeptide antigen (TPA)
  - Tissue polypeptide-specific antigen (TPS)

- Gross cystic disease protein (GCDP)
- Prostate-specific antigen (PSA)
- **Marker der Tumorbiologie:**
  - Extrazelluläre Domäne (= extra-cellular domain = ECD) von HER2/neu (c-erbB-2)
  - Moleküle der Adhäsion und Invasion
    - E-selectin
    - Soluble urokinase plasminogen activator receptor (SuPAR)
    - Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)
  - Mit der Angiogenese assoziierte Moleküle
    - Vascular endothelial growth factor (VEGF)
    - Basic fibroblast growth factor (bFGF)
    - Hepatocyte growth factor (HGF)
    - HUVEC assay
- **Antikörperantwort gegen TAAs**
  - Anti-HER2/neu/c-erbB-2
  - Anti-p53
- **Maligne Zellen oder freie DNA**

Wie den vorausgehenden Ausführungen zu entnehmen, existiert eine sehr große Anzahl an Tumormarkern im Bereich des Mammakarzinoms. Im Folgenden soll nun genauer auf diejenigen Tumormarker eingegangen werden, die von der American Society of Clinical Onkology (ASCO) im Update des Jahres 2000 der Empfehlungen für den Einsatz von Tumormarkern beim Mammakarzinom und kolorektalen Karzinom genauer untersucht und auf ihren Einsatz für die Routine geprüft wurden (6).

### 1.1.2 CA 15-3 und CA 27.29

Das zur Milchfettkügelchen-Muzin-Familie gehörende CA 15-3 ist ein hochmolekulares Kohlenhydrat-Antigen mit einem Molekulargewicht von 300000 Da

(48). Das MAM-6-Antigen des CA 15-3 wurde sowohl auf dem apikalen Pol epithelialer normaler duktaler und alveolärer Strukturen als auch homogen verteilt im Zytoplasma von Mammakarzinomzellen gefunden (35), ebenso in Biopsaten des Kolons, v.a. in kolorektalen Karzinomen (115). Das Glykoprotein wird von Tumorzellen in den Blutstrom abgegeben (2).

Nach dem Update 2000 der ASCO sind die gegenwärtig vorhandenen Daten sowohl von CA 15-3 als auch von CA 27.29 nicht ausreichend, um sie beim Mammakarzinom für Screening, Diagnose, Staging oder Überwachung nach Primärbehandlung einzusetzen. Obwohl ein Anstieg der beiden Tumormarker ein Wiederaufflammen der Krankheit nach Primärbehandlung anzeigen kann, ist der klinische Nutzen nicht etabliert und aus diesem Grund kann keine Empfehlung ausgesprochen werden.

Zwar hat eine gut angelegte Studie gezeigt, dass ein Anstieg von CA 27.29 durchschnittlich 5,3 Monate vor anderen Symptomen oder Tests ein Rezidiv vorhersagen kann (19), wobei jedoch die Therapieoptionen dieselben bleiben. Auch konnte kein Einfluss auf die signifikantesten Outcomes wie verbessertes krankheitsfreies Überleben oder Gesamtüberleben, bessere Lebensqualität, geringere Toxizität oder verbesserte Kosteneffektivität bewiesen werden (1).

### **1.1.3 CEA**

Das carcinoembryonale Antigen ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 180000 Da (107). Es ist eines der mindestens 19 verwandten Moleküle, die zur Immunglobulin-Gen Superfamilie gehören. CEA ist ein normales Zellprodukt, das durch Adenokarzinome vor allem von Kolon, Rektum, Mamma und Lunge überexprimiert wird (2). Es fungiert als ein homotypisches interzelluläres Adhäsionsmolekül, das die Aggregation von humanen kolorektalen Karzinomzellen fördert (7) und möglicherweise die Metastasierung von kolorektalen Krebszellen zu Leber und Lunge bewirkt (2).

Die CEA-Synthese in der kolorektalen Schleimhaut nimmt zwischen der achten und sechzehnten Schwangerschaftswoche zu und bleibt anschließend annä-

hernd konstant. Die höchsten CEA-Gewebkonzentrationen werden in primären kolorektalen Karzinomen und deren Lebermetastasen gefunden. Die Gewebkonzentrationen in Tumoren anderer Lokalisation liegen jedoch deutlich niedriger, daher deuten relativ schwache Erhöhungen der CEA-Serumkonzentrationen bei Bronchial-, Magen- und Mammakarzinomen auf fortgeschrittene Tumorstadien hin (107).

Ein wichtiger Punkt bezüglich der diagnostischen Spezifität ist, dass der Median der CEA-Serumkonzentrationen bei Rauchern höher als bei Nichtrauchern und bei Älteren höher als bei Jüngeren liegt (107), wobei ein Einfluss des Alters an anderer Stelle verneint wird (2). Falsch-positive Erhöhungen des CEA-Werts sind unter den nicht-malignen Erkrankungen vor allem durch Hepatitiden (der größte Anteil der Clearance des CEA erfolgt in der Leber [2]), insbesondere alkoholisch-bedingte Leberzirrhosen, Pankreatitiden, entzündlichen gastrointestinalen Erkrankungen und entzündlichen Lungenerkrankungen bedingt (36). Des Weiteren wurden große Mengen an CEA u.a. in der Flüssigkeit benigner Mammazysten, in der Synovialflüssigkeit von an rheumatischer Arthritis leidenden Patienten, im Urin bei bakterieller Blaseninfektion und in der Waschflüssigkeit von normalem Kolon gefunden. Dies weist auf eine Bildung von CEA unabhängig von neoplastischen oder malignen Prozessen hin (107).

Im Update 2000 empfiehlt die ASCO CEA nicht für Screening, Diagnose, Staging oder Routineüberwachung von Brustkrebspatienten. Ebenso wenig wird dieser Marker empfohlen, um ein Ansprechen eines metastasierten Mammakarzinoms auf entsprechende Therapien zu kontrollieren, wobei ein Anstieg von CEA bei Fehlen einer bereits messbaren Erkrankung oder eines erhöhten MUC-1 Markers (CA 15-3 und/oder CA 27.29) ein Therapieversagen bedeuten kann.

### **1.1.4 Östrogen- und Progesteronrezeptoren**

Für die Wirkung von Hormonen sind intrazelluläre spezifische steroidbindende Proteine, die Steroidrezeptoren, unabdingbar. Östradiol gelangt durch passive

Diffusion in die Zelle und dockt an den Östrogenrezeptor an. Es wird eine Reaktionskaskade in Gang gesetzt, wobei letztendlich die Transkription spezifischer Gene in der RNA und dadurch die Bildung spezifischer Proteine erfolgt. Bei diesen Proteinen handelt es sich einerseits um den Progesteronrezeptor und andererseits um Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor (TGF), Epidermal Growth Factor (EGF) und Insulin like Growth Factor (IGF 1), welche wiederum über membranständige Rezeptoren die Zellproliferation anregen (39). Die zur Therapie eingesetzten Antiöstrogene wie Tamoxifen wirken antiproliferativ, indem einerseits die Östrogenrezeptoren kompetitiv gehemmt werden und andererseits die Freisetzung des antiproliferativ wirkenden und durch Östrogen gehemmten Transforming Growth Factor (TGF  $\beta$ ) gefördert werden soll (93).

In mehreren Studien (55, 63, 114) konnte gezeigt werden, dass unter endokrinen Therapiemaßnahmen die Remissionsrate positiv mit dem Hormonrezeptorstatus korreliert, eine positive Beziehung zwischen Remissionsrate und Rezeptorgehalt besteht (73), bei positivem Rezeptorstatus die rezidivfreie Zeit länger ist (100) und ein Zusammenhang zwischen positivem Progesteronrezeptorstatus und Überlebenszeit besteht (43), welcher sich dadurch ausdrückt, dass beispielsweise ein negativer Progesteronrezeptorstatus und negativer axillärer Lymphknotenstatus eine ähnliche Fünf-Jahres-Überlebensrate wie ein positiver Rezeptorstatus mit axillärem Lymphknotenbefall mit sich bringt (61).

Ein positiver Östrogenrezeptorstatus ist sowohl ein schwach günstiger prognostischer Faktor (= Abschätzung des Outcomes unabhängig von spezifischen Therapien), d.h. auch ohne systemischer Behandlung bedeutet er eine etwas bessere Prognose, als auch ein starker prädiktiver Faktor (= relative Sensitivität oder Resistenz gegenüber spezifischen Behandlungsmethoden oder Stoffen), da ein deutlich stärkeres Ansprechen auf Tamoxifen als bei negativem Östrogenrezeptorstatus erfolgt und so die Prognose erheblich verbessert wird (112, Abbildung 2).

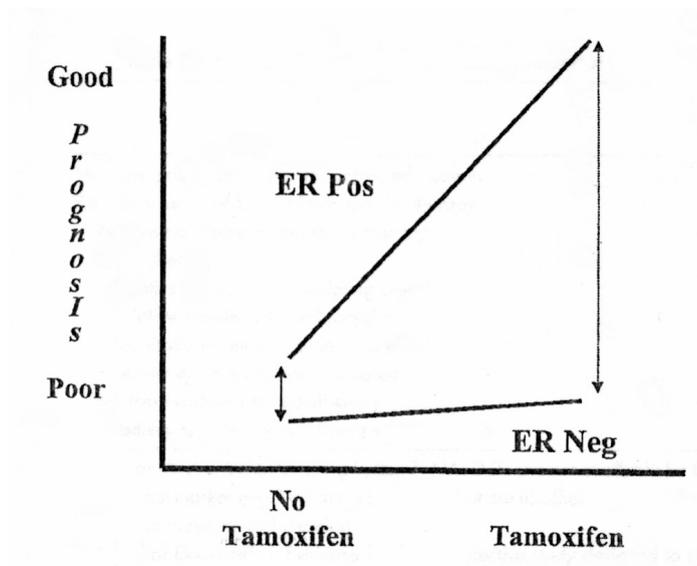


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines sowohl prognostischen als auch prädiktiven Faktors: Das Verhältnis zwischen Östrogenrezeptor (ER) und Tamoxifen (112).

Im Update des Jahres 2000 für den Gebrauch von Tumormarkern bei Brustkrebs empfiehlt die ASCO, bei jedem neu auftretenden Mammakarzinom den Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (direkt im Tumorgewebe) zu prüfen. Bei metastatischen Läsionen kann der Status geprüft werden, falls das Ergebnis die Behandlung beeinflusst.

Sowohl bei prä- als auch bei postmenopausalen Patienten kann der Steroidrezeptorstatus genutzt werden, um diejenigen Patienten zu identifizieren, die höchstwahrscheinlich von endokrinen Formen einer adjuvanten Therapie und der Therapie eines Rezidivs oder einer metastasierenden Erkrankung profitieren.

### 1.1.5 DNA-Durchflusszytometrie

Mittels der Durchflusszytometrie ist es möglich, beim (Mamma-)Karzinom mehrere Parameter zu erhalten: So können die Tumoren auf eventuelle Aneuploidie untersucht werden, was sich durch zusätzliche Peaks im DNA-Histogramm zeigt. Des Weiteren kann die Zellproliferationsrate bestimmt werden, welche als

Prozentzahl der Zellen, die sich in den Proliferationsphasen S oder S + G<sub>2</sub>M des Zellzyklus befinden, definiert ist (2).

Der Beschluss der ASCO im Update des Jahres 2000 lautet, dass aufgrund mangelnder Datenlage die Bestimmung des DNA-Gehalts und/oder der S-Phase-Fraktion mittels durchflusszytometrischen oder immunhistochemischen Messungen in Brustgewebe nicht für Prognose oder Behandlung sowohl im adjuvanten oder metastasierenden Setting als auch bei Carcinoma-in-situ der Mamma empfohlen wird. Die durch Durchflusszytometrie erhaltene Ploidie und der S-Phase-Anteil werden nicht für die Zuordnung von Patienten zu prognostischen Gruppierungen empfohlen.

### **1.1.6 HER-2/neu (c-erbB-2)**

Das HER-2/neu - Gen enkodiert für ein 185 kDa schweres Transmembran-Glykoprotein, welches intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität besitzt und molekulare Homologie zum epidermal growth factor receptor zeigt (46). Tatsächlich gehört HER-2 (für human epidermal growth factor receptor) oder neu (für neuroglioblastoma) oder c-erbB-2 (wobei c für complementary DNA und erb für erythroblastoma steht) zur epidermal growth factor receptor Familie, zu welcher vier Mitglieder gezählt werden (erbB-1, 2, 3, 4). Nach Ligandenaktivierung durch bisher noch nicht identifizierte Wachstumsfaktoren (103) führt eine Hetero- oder Homodimerbildung zu einer Aktivierung von verschiedenen subzellulären Signaltransduktionswegen (112).

Es scheint, dass diese Rezeptorenfamilie bei der Kontrolle von Wachstum, Differenzierung und Mobilität von vielen normalen als auch transformierten epithelialen Zelltypen eine Rolle spielt und daher auch die Amplifikation des HER-2/neu - Gens oder die Überexpression dessen Proteinprodukts sehr bedeutend beim Mammakarzinom ist (112).

Bei 20% bis 40% aller Mammakarzinome wird diese Amplifikation bzw. Überexpression beobachtet (46, 89, 90). Wahrscheinlich ist HER-2/neu sowohl prognostisch als auch prädiktiv bezüglich des Mammakarzinoms: In der Literatur

wird angedeutet, dass eine HER-2/neu - Amplifikation und/oder Überexpression mit einer schlechten Prognose und/oder mit einer relativen Sensitivität oder Resistenz bezüglich verschiedener Therapien wie endokrine Therapie, Chemotherapie, Radiotherapie und Trastuzumab (Herceptin) verbunden sein kann (112). Zur Messung von HER-2/neu und dessen Genprodukt wurden verschiedene Methoden eingesetzt, darunter die direkte Messung der Genamplifikation, die Messung der mRNA-Level und der Proteinexpression, wobei die immunhistochemische Färbung die am weitesten verbreitete ist (2).

In ihrem Update von 2000 lauten die Empfehlungen der ASCO bezüglich

- HER-2/neu als Marker für das Mammakarzinom, die HER-2/neu - Überexpression bei jedem primären Mammakarzinom entweder zum Diagnosezeitpunkt oder zur Zeit eines Rezidivs zu evaluieren. Auch Messungen der HER-2/neu - Amplifizierung können von Wert sein.
- der Sensitivität gegenüber Trastuzumab, dass hohe Level einer HER-2/neu - Expression oder Amplifizierung genutzt werden können, um Patienten zu identifizieren, die von Trastuzumab für die Behandlung von metastasierenden, wiederkehrenden und/oder behandlungsrefraktären unresektablen lokal fortgeschrittenen Mammakarzinomen eventuell profitieren.
- der Reaktion auf Cyclophosphamid/Methotrexat/Fluorouracil (CMF) oder einer nicht auf Anthracyclin basierenden adjuvanten Chemotherapie, dass aufgrund offener Fragen in Bezug auf den relativen Benefit einer CMF-Therapie bei HER-2/neu - Überexpression im Moment keine definitiven Empfehlungen gegeben werden können.
- der Reaktion auf eine auf Anthracyclin basierende adjuvante Chemotherapie, dass einerseits eine immunhistochemisch fest-gestellte HER-2/neu - Überexpression dazu dienen kann, Patienten herauszufiltern, die von dieser Therapieform besonders profitieren, aber andererseits die Level der HER-2/neu - Expression nicht verwendet werden sollten, um Patienten von dieser Behandlung auszuschließen.

- der Sensitivität auf eine endokrine Therapie, dass die HER-2/neu - Level nicht benutzt werden sollten bezüglich der Entscheidung, diese Therapie entweder in adjuvanter Form oder bei metastasierender Erkrankung anzuwenden.
- der Sensitivität oder Resistenz gegenüber einer Taxantherapie, dass auch hier die HER-2/neu - Daten nicht zur Therapieentscheidung sowohl bei adjuvanter als auch metastasierendem Setting herangezogen werden sollten.
- der Vorhersage der Patientenprognose mittels routinemäßiger Messung der HER-2/neu - Überexpression, dass aufgrund mangelnder Datenlage nicht empfohlen wird, unter Patienten mit frühem Mammakarzinom diejenigen mit höherem Rezidivrisiko zu identifizieren.
- der Nützlichkeit der Messung der extrazellulären Domäne von HER-2/neu, dass diese Methode momentan für kein klinisches Setting empfohlen wird.

### **1.1.7 p53**

Das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 sitzende Tumorsuppressorgen kodiert ein für die Regulation der Zellteilung wichtiges Protein. Dieses Protein scheint die Transkription verschiedener anderer Gene zu regulieren. Es gibt Nachweise, dass das Genprodukt von p53 eine bedeutende Rolle in der Verhinderung der Teilung von Zellen spielt, die beschädigte DNA enthalten (2).

Deletionen und Mutationen im p53-Gen können die Funktion des Genprodukts stören. Die Veränderung des Gens können entweder direkt durch DNA-Analyse oder indirekt durch immunhistochemische Techniken detektiert werden, wobei dabei auf abnormale zytoplasmatische oder nukleäre Akkumulationen des (mutierten) p53-Genprodukts geachtet wird (2).

Nach dem Update des Jahres 2000 der ASCO ist die gegenwärtige Datenlage jedoch nicht ausreichend, um Messungen von p53 für das Management beim Mammakarzinom einzusetzen.

### **1.1.8 Cathepsin D**

Der durch tumorassoziierte Proteasen bedingte proteolytische Abbau von extrazellulärer Matrix wird – neben der Angiogenese – als bedeutender Prozess der Tumorinvasion und Bildung von Metastasen angesehen. Auch die in mehreren Studien untersuchte lysosomale Aspartatprotease Cathepsin D kann die Krebszellmigration und –invasion durch Verdauung der Basalmembran und extrazellulären Matrix fördern (49). Studien haben gezeigt, dass Cathepsin D, das sowohl in fixiertem als auch im Zytosol von frischem Gewebe gemessen wird, in ruhenden Mammazellen relativ niedrig und in malignem und benignem proliferativem Mammagewebe erhöht war (2).

Dem Update des Jahres 2000 des ASCO ist bezüglich Cathepsin D zu entnehmen, dass auch in diesem Fall die momentane Datenlage nicht ausreicht, um Messungen von Cathepsin D für das Management von Mammakarzinompatienten einzusetzen.

## **1.2 Modifizierte und nichtmodifizierte Nucleoside**

In diesem Abschnitt folgt die Beschreibung einer weiteren Gruppe von Tumormarkern, auf welche die Urine von Probanden in der durchgeführten Studie untersucht wurden: Die modifizierten Nucleoside. Bevor einige maligne Erkrankungen aufgeführt werden, bei denen das Vorkommen dieser Tumormarker evaluiert wurde, soll zunächst auf die Biochemie der modifizierten sowie nicht-modifizierten Nucleoside genauer eingegangen werden.

### 1.2.1 Aufbau der Nucleoside

Die Verbindung zwischen einer Nucleinsäurebase und einer Pentose bezeichnet man als Nucleosid, wobei je nach Eigenart des Zuckers von einem Ribonucleosid oder einem Desoxyribonucleosid gesprochen wird. Die Basen sind über eine N-glykosidische Bindung (Purine: N(9)-Atom, Pyrimidine: N(1)-Atom) mit dem C(1')-Atom der Pentose verbunden.

Adenin und Guanin sind die wichtigsten Purinbasen der Nucleinsäuren, Cytosin, Thymin (hauptsächlich in DNA) und Uracil (in RNA) die wichtigsten Pyrimidinbasen.

Ist der Zuckerrest eines Nucleosids am C(5')-Atom mit einem Phosphatrest verestert, wie in RNA und DNA der Fall, spricht man von einem Nucleotid.

In der durchgeführten Studie wurden Urine von Probanden auf folgende 15 Nucleoside untersucht, welche in Haupt- oder Majorribonucleoside und modifizierte oder Minorribonucleoside unterschieden werden:

Die Purinnucleoside Adenosin und Guanosin (Abb. 3) sowie die Pyrimidinnucleoside Cytidin und Uridin (Abb. 4) sind den Hauptnucleosiden zuzurechnen. Die Minorribonucleoside entstehen meist durch Modifikationen dieser vier Majorribonucleoside. So entstehen durch Methylierungen der Basen Nucleoside wie 1-Methyladenosin (M1A), 6-Methyladenosin (M6A), 1-Methylguanosen (M1G), 2-Methylguanosen (M2G), 1-Methylinosin (M1I), 3-Methyluridin (M3U) und 5-Methyluridin (M5U) (Abb. 5).

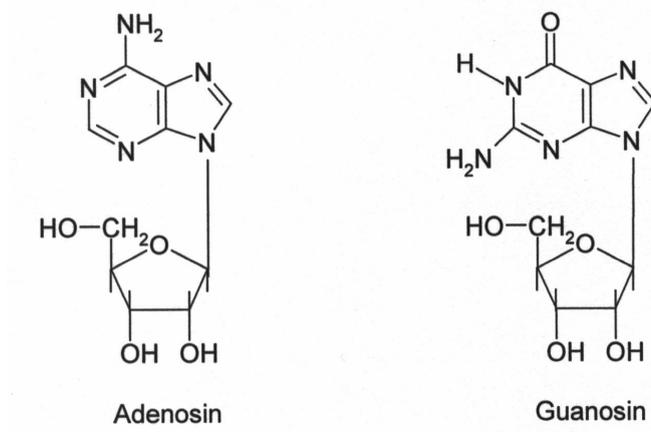


Abbildung 3: Strukturformeln der Purinnucleoside Adenosin und Guanosin

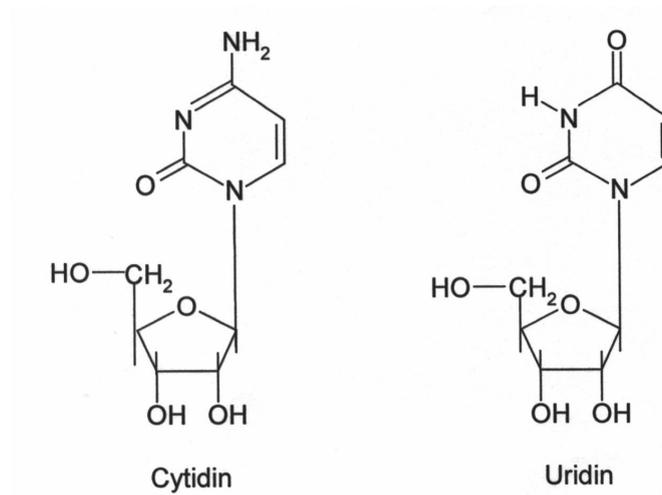
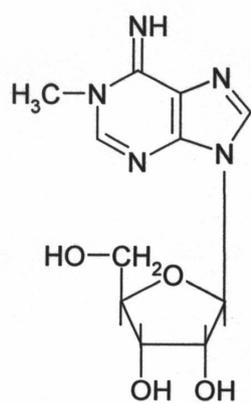
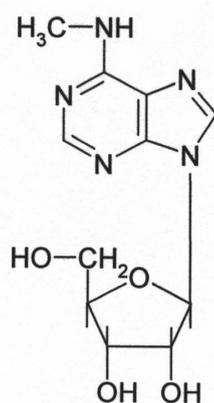


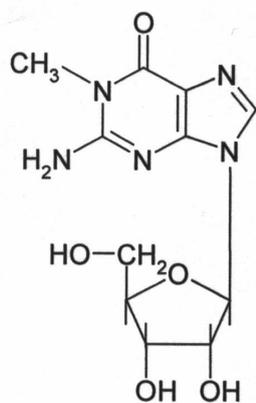
Abbildung 4: Strukturformeln der Pyrimidinnucleoside Cytidin und Uridin



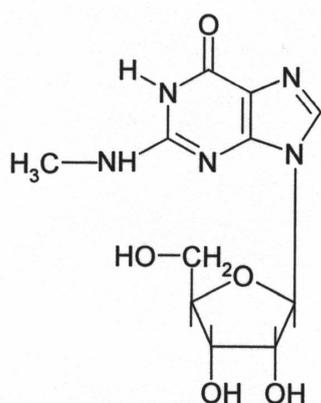
1-Methyladenosin



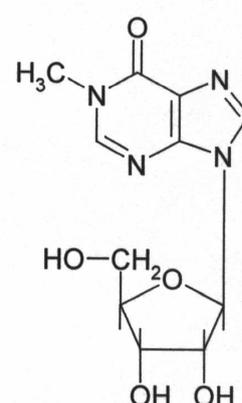
6-Methyladenosin



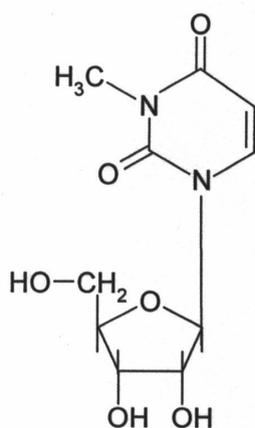
1-Methylguanosin



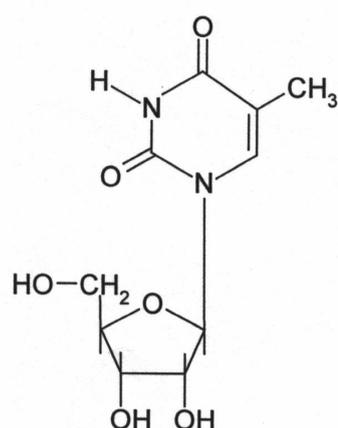
2-Methylguanosin



1-Methylinosin



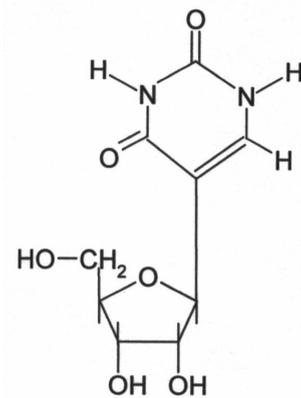
3-Methyluridin



5-Methyluridin

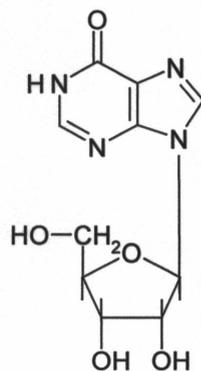
Abbildung 5: Strukturformeln der methylierten Nucleoside

Wie bei Pseudouridin (Pseu) (Abb. 6) zu beobachten, entstehen modifizierte Nucleoside auch durch Basenumlagerung oder, wie im Falle von Inosin (I) und Xanthosin (X) (Abb. 7), durch Desaminierungen; ferner durch Schwefelsubstitution wie bei 5`-Deoxy-5`-methylthioadenosin (MTA) (Abb. 8).

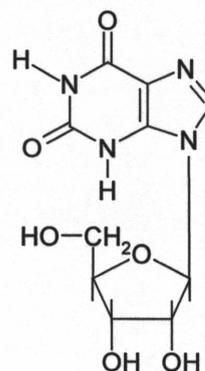


Pseudouridin

Abbildung 6: Strukturformel von Pseudouridin



Inosin



Xanthosin

Abbildung 7: Strukturformeln von Inosin und Xanthosin

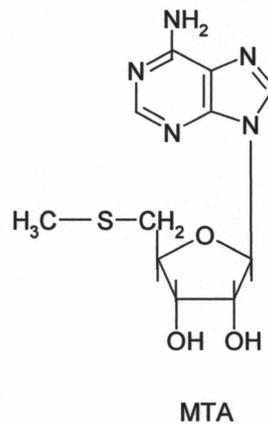


Abbildung 8: Strukturformel von 5`-Deoxy-5`-methylthioadenosin

### 1.2.2 Modifizierte Nucleoside und deren Vorkommen in der RNA

Die modifizierten Nucleoside spielen eine bedeutende Rolle in der tRNA, da sie dort in relativ großer Anzahl enthalten sind, wobei die Minornucleoside auch in anderen Vertretern der RNA wie mRNA, rRNA und snRNA sowie der DNA in niedrigerer Konzentration nachgewiesen wurden (92).

Die Aufgabe der tRNA ist zum einen, bei der Translation als Adapter zwischen Aminosäuren und Triplet-Code der mRNA zu fungieren, zum anderen soll sie eine Regulatorfunktion bei der Proteinbiosynthese ausüben, welche wohl durch modifizierte Nucleoside vermittelt wird (8).

Reife tRNA entsteht durch Bearbeitung der Vorläufer-tRNA, wobei dies in mehreren Schritten vor sich geht, darunter Schneiden an den 3´- und 5´-Enden durch die RNasen D und P, Einfügen eines 3´-terminalen CCA-Restes durch eine tRNA-Nucleotidyltransferase sowie Entfernung von Introns. Diese Prozessierungen, welche immer posttranskriptionell ablaufen, sollen durch einen hochmolekularen Enzymkomplex katalysiert werden (3). Ein Teil dieser Prozessierungen stellt auch die Modifikation mancher Basen dar, was zur Entstehung der modifizierten Nucleoside führt: Häufig sind Methylierungen, Basenumlagerungen, Sättigung von Doppelbindungen, Desaminierungen, Schwefelsubstituti-

onen sowie die Anheftung komplexer Gruppen, welche beispielsweise bei der Umwandlung von Guanosin in Queuosin vorkommt (18).

Die tRNA interagiert bei der Translation mit Ribosomen, der rRNA, den Aminoacyl-tRNA-Ligasen, den Aminosäuren sowie den Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren. Björk (8, 9) vermutet, dass die große Anzahl an modifizierten Basen, deren Positionen in der tRNA keineswegs zufällig sind, für diese Vorgänge von entscheidender Bedeutung ist.

Bisher konnten in der RNA über 90 modifizierte Nucleoside gefunden werden (53), wobei alle Derivate der vier Hauptnucleoside sind. Die modifizierten Nucleoside können wiederum in einfach-, komplex- und hypermodifizierte Nucleoside unterteilt werden (21).

Die einfachmodifizierten Nucleoside sind beispielsweise durch Anheftung gerader Seitenketten oder Einfügen eines S-Atoms gekennzeichnet, die komplexmodifizierten zeichnen sich durch verzweigte Seitenketten aus und die hypermodifizierten enthalten darüber hinaus zyklische Strukturen.

### **1.2.3 Synthese der modifizierten Nucleoside in der tRNA**

Die Einordnung und Beschreibung der für die Synthese der Minornucleoside notwendigen Enzyme – Methyltransferasen und Ligasen – erwies sich als kompliziert, da sie in sehr niedrigen Konzentrationen in den Zellen vorliegen. Beim Bakterium *E. coli* kommen so auf 80 Moleküle einer spezifischen Methyltransferase 800 Moleküle einer Aminoacyl-tRNA-Ligase (37).

Die unterschiedlichen, die tRNA modifizierenden Enzyme weisen eine Ortsspezifität auf, wie sie zum Beispiel für die Umwandlung von Uridin in Pseudouridin an verschiedenen Stellen der tRNA beschrieben wurde (30, 88). Die hochspezifischen Enzyme erkennen die zu verändernden Nucleoside in der tRNA in unterschiedlicher Weise: Die eine Gruppe wird durch die jeweiligen benachbarten Nucleotidsequenzen geleitet, die andere Gruppe durch die dreidimensionale Struktur des tRNA-Moleküls (8, 9).

Bis auf die Positionen 34 und 37 erfolgen die Modifizierungen an der Vorläufer-tRNA bereits im Zellkern, erst im Anschluss findet das Splicen statt (60, 70), wobei die Modifizierung keine notwendige Bedingung für das Splicen der tRNA darstellt (40).

#### **1.2.4 Funktionen der modifizierten Nucleoside in der tRNA**

Die unterschiedlichen Modifizierungen im tRNA-Molekül, welche zum Entstehen von unüblichen Wasserstoffbrückenbindungen führen, sollen zur Ausbildung der endgültigen dreidimensionalen Struktur der tRNA beitragen (45).

Björk vermutet, dass die Modifizierungen eine bedeutende Rolle bei der Feinregulierung der tRNA-Funktion spielen und zur Stabilisierung der rRNA beitragen, jedoch für das Zellwachstum nicht unbedingt nötig sind (9). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die modifizierten Basen zu einer optimalen Interaktion zwischen Komponenten der Proteinbiosynthese und der tRNA beitragen und deren Fehlen zu verschiedenartigen Störungen der Zellphysiologie führt (8).

Änderungen der Art und Menge an Modifizierungen von Nucleosiden in der tRNA könnten zu kleinen Veränderungen bei der Translation führen, was zu einem leicht veränderten Protein mit Änderung der Faltung führen und infolgedessen eine Alteration seiner Funktion bewirken könnte (9).

Des Weiteren spricht für die Beeinflussung der Zellphysiologie durch modifizierte Nucleoside in der tRNA, dass die modifizierten Nucleoside ein Verschieben des Leserasters bei der Transkription verhindern und somit Einfluss auf die Exprimierung von Genen besitzen (10).

Eine veränderte Anzahl von Modifizierungen in der tRNA von Eukaryonten, d.h. die Entstehung von hypo- oder hypermodifizierter tRNA, konnte in sich differenzierenden Zellen, während des Alterns, bei Mangelzuständen, als Antwort auf Hormonveränderung, Medikamentenverabreichung sowie Karzinogenaussetzung, nach viralen Infektionen und in malignen Zellen nachgewiesen werden (21).

So wurden beispielsweise Veränderungen am Gehalt der modifizierten Base Queuosin in der tRNA während der Differenzierung erythroleukämischer Zellen festgestellt (86) oder es wurde beschrieben, dass Wachstumsfaktoren die verschiedenen die tRNA modifizierenden Enzyme stimulieren können (54). Am Beispiel ovariectomierter Schweine konnte gezeigt werden, dass diese eine weniger methylierte tRNA aufwiesen als Schweine mit Ovarien (85).

### **1.2.5 Modifizierte Nucleoside beim Abbau der RNA**

Durch hydrolytische Funktion von Ribonucleasen und Phosphatasen werden beim RNA-Umsatz normale und modifizierte Nucleoside frei, wobei die normalen Nucleoside zum einen reutilisiert werden, um Nucleotid-Triphosphate zu bilden, welche in Nucleinsäuren eingebaut werden, zum anderen, um zu Harnsäure und  $\beta$ -Alanin abgebaut zu werden (87). Die modifizierten Nucleoside können jedoch nicht rephosphoryliert werden, weswegen sie bei der de novo-RNA-Synthese nicht wieder eingebaut werden (14, 15). Sie zirkulieren im Blut und werden zusammen mit kleinen Mengen normaler Nucleoside in den Urin ausgeschieden. Daher sind die Konzentrationen der modifizierten Nucleoside im Urin ein Maßstab für den Umsatz der RNA im Organismus (69, 80, 101).

Der RNA-Umsatz hängt bei gesunden Individuen von verschiedenen Faktoren ab: Während zwischen Frauen und Männern (50, 64, 75) sowie zwischen verschiedenen Altersstufen bei Erwachsenen (64) kein Unterschied gefunden wurde, beobachtete man höhere Umsatzraten bei Kindern, wobei die Umsatzraten mit zunehmendem Alter sanken (75, 80).

Der Umsatz der RNA des gesamten Körpers soll ziemlich gut mit dem Protein-Umsatz des gesamten Körpers korrelieren (81). Des Weiteren wurde ein Effekt der Nahrung auf die modifizierten Nucleoside sowie den RNA-Umsatz kontrovers diskutiert (42, 75), da der metabolische Zustand der Proteine einen definitiven Einfluss auf die Level der modifizierten Nucleoside zu haben scheint.

Eine detaillierte Darstellung über die Biochemie der Nucleoside, genaue Synthesewege und Funktionen beinhaltend, findet sich in einer Arbeit des Jahres 2002 (66).

### **1.2.6 Modifizierte Nucleoside als Tumormarker**

Krankheiten, insbesondere maligne Erkrankungen, sollen die Rate des RNA-Umsatzes beeinflussen und sich in der Höhe der Ausscheidung von modifizierten Nucleosiden zeigen (110). So wurde von Borek und Mitarbeitern postuliert, dass bei den von ihnen untersuchten, an Tumoren leidenden Tieren die erhöhte Rate der Ausscheidung an modifizierten Nucleosiden durch den erhöhten tRNA-Umsatz bedingt war und weniger allein durch Zelltod verursacht wurde (13). In Extrakten von Tumorgewebe wurden aberrierende tRNA-Methyltransferasen (12) sowie erhöhte tRNA-Methyltransferase-Aktivitäten (11) gefunden, welche zu der abnormalen tRNA im Tumorgewebe führen sollen (14). Der schnelle Abbau der aberrierend modifizierten tRNA wird als Ursache für den hohen Umsatz an tRNA angenommen (12, 13).

Bei verschiedenen malignen Erkrankungen wurde ein diagnostischer Nutzen bezüglich der Untersuchung auf modifizierte Nucleoside postuliert, darunter Leukämien (29, 33, 34, 41, 72), maligne Lymphome (65, 77), Gehirntumore (29, 56), Nasopharynxkarzinome (102), kleinzellige Lungenkarzinome (59, 97, 106), Ösophaguskarzinome (58), kolorektale Karzinome (25, 38, 67, 68), Mesotheliome (24), hepatocelluläre Karzinome (4), Nierenzellkarzinome (76), Tumoren im Kindes- und Jugendalter (66) und Mammakarzinome (82, 105).

## **1.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Unter dem Begriff Chromatographie wird die Stofftrennung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase verstanden. Die mobile Phase leitet Stoffe durch die stationäre Phase, welche je nach unterschiedlich starker Wechselwirkung mit der stationären Phase voneinander getrennt werden und anschließend durch die mobile Phase wieder aus der Säule eluiert werden. Dies stellt den

Grund für die unterschiedlichen Verweil- oder Retentionszeiten dar. Der Trennungsvorgang wird in Form einer Elutionskurve, eines Chromatogramms, dargestellt. Solch ein Chromatogramm stellt die Abhängigkeit für die Konzentrationen der getrennten Stoffe von der Zeit dar, wobei sich die einzelnen Substanzen als Peaks darstellen (84).

Eine Form der Chromatographie ist die Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie, welche sich wiederum in die klassische Niederdruck- und die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC) aufteilt. Eine HPLC-Anlage, welche zur Erfassung der Nucleosidkonzentrationen in den Urinproben verwendet wurde, ist aus den Hauptkomponenten 1. Pumpen, 2. Einspritzsystem, 3. Trennsäule und 4. Detektor mit Auswertesystem aufgebaut (84):

1. Die HPLC kann sowohl mit isokratischer als auch mit Gradienten-Anlage betrieben werden: Bei der isokratischen Anlage kann lediglich ein Eluent als mobile Phase verwendet werden, beim Gradientensystem können mehrere Lösungsmittel eingesetzt werden, die während der Trennung kontinuierlich in unterschiedlicher Zusammensetzung zusammen gemischt werden. Des Weiteren kann bei der Gradienten-Anlage zwischen Hoch- und Niederdruckgradient unterschieden werden: Erfolgt die Mischung der Komponenten mittels eines Proportionierventils vor der Pumpe, wird von einem Niederdruckgradienten gesprochen; entsteht das Gemisch in einer Mischkammer nach den Pumpen auf der Hochdruckseite, wird solch eine Anlage als Hochdruckgradient bezeichnet.
2. Das Einspritzsystem oder Probenaufgabesystem kann entweder ein Handinjektor, ein manuelles Ventil oder ein Autosampler (= automatischer Probengeber) sein.
3. Aufgrund des Einsatzes von relativ dünnen Säulen (Durchmesser 2 bis 4 mm), welche mit lediglich 3 bis 10  $\mu\text{m}$  kleinen, als stationäre Phase fun-

gierenden Teilchen (meist ein C18-modifiziertes Kieselgel) gefüllt sind, können mittels HPLC relativ hohe Trennleistungen vollbracht werden. Dies erfordert jedoch beim Durchlauf der mobilen Phase durch die Säule die Überwindung eines relativ hohen Gegendrucks, welcher bis 300 bar bzw. 30 MPa reichen kann, und setzt den Einsatz druckstabiler Teile voraus. Um möglichst wenig Totraum zu erzeugen, müssen Kapillarverbindungen zwischen den einzelnen Systemkomponenten verwendet werden.

Üblicherweise ist bei der Chromatographie die stationäre Phase polar und die mobile Phase unpolar. In einem Umkehr-Phasen- oder Reversed-Phase (= RP)-System ist dies jedoch genau umgekehrt. Wird dieses Verfahren bei der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie angewandt, spricht man von der RP-HPLC (84).

4. Meist werden UV-Detektoren zur Messung von Stoffkonzentrationen eingesetzt, teilweise in Form von Diodenarray-Detektoren (DAD), mit welchen gleichzeitig bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden kann; es kommen jedoch auch andere Analysegeräte wie Fluoreszenzdetektoren zum Einsatz.

Zum Auswerten der gemessenen Daten werden meist mit entsprechender Software ausgestattete Rechner eingesetzt, welche oft die gesamte HPLC-Anlage mit ihren verschiedenen Komponenten wie Pumpen, Probengeber und Detektor steuern. Wird eine quantitative Analyse eines Stoffgemischs durchgeführt, was das Ziel bei der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie ist, werden mit Hilfe eines Standards die Konzentrationen der einzelnen Substanzen ermittelt, was meist durch Bestimmung der jeweiligen Flächen erfolgt.

## 1.4 Neuronale Netze (Artificial Neural Networks = ANN)

Neuronale Netze sind durch Modelle lebender Neuronen sowie Netzwerke solcher Neuronen inspiriert. Die artifiziellen Neuronen sind Knoten in einem Artifi-ziellen Neuronalen Netz oder Artificial Neural Network (ANN) und diese Knoten stellen Prozeptionseinheiten dar, die eine nichtlineare Summationsfunktion aus-führen (20).

Neuronale Netzwerke können abhängig von der Trainingsstrategie in zwei Hauptklassen eingeteilt werden: Überwachte und unüberwachte Netze. In jeder Klasse können wiederum verschiedene Typen unterschieden werden. Für über-wachtes Lernen wird dem ANN ein Datensatz bestehend aus Input- und Output-Daten präsentiert. Da während des Trainings in Abhängigkeit jedes In-put-Datensatzes der gewünschte Output des Netzes präspezifiziert ist, spricht man von einem überwachten Prozess. Die Mehrzahl der Anwendungen auf medizinischem Gebiet folgt dieser Strategie und benutzt Multilayer-feed-forward (MLFF)-Netzwerke. Unter den verschiedenen Trainingsalgorithmen wird haupt-sächlich die Error Backpropagation Technik eingesetzt (95).

Im Folgenden soll nun genauer auf Multilayer-feed-forward-Netze und die Error Backpropagation Technik eingegangen werden:

Die artifiziellen Neuronen, die Knoten, sind typischerweise in Schichten (layers) organisiert, beginnend mit einer Input-Layer, dann einer Hidden-Layer und schließlich einer Output-Layer. Die Mehrheit der Studien benutzt diese drei-schichtigen Netzwerke, wobei jedes Neuron einer Schicht mit allen Neuronen der nächsten Schicht verbunden ist (Abbildung 9). Jede dieser Verbindungen hat ein „Gewicht“, wobei diesen Gewichten in „untrainierten“ Netzwerken zu Beginn kleine Zufallszahlen zugewiesen werden. Dann wird dem ANN ein Trai-ningsdatensatz präsentiert, der Inputs und gewünschte Outputs zur Verfügung stellt. Die Gewichte werden in der Art angepasst, dass jede Anpassung die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass das Netzwerk den gewünschten Output in sei-ner Output-Layer errechnet. Da das Training schwierig sein kann, wurde eine

immense Anzahl von Berechnungsoptionen und Qualitätssteigerungen entwickelt, um den Trainingsprozess und seine Ergebnisse zu verbessern (20).

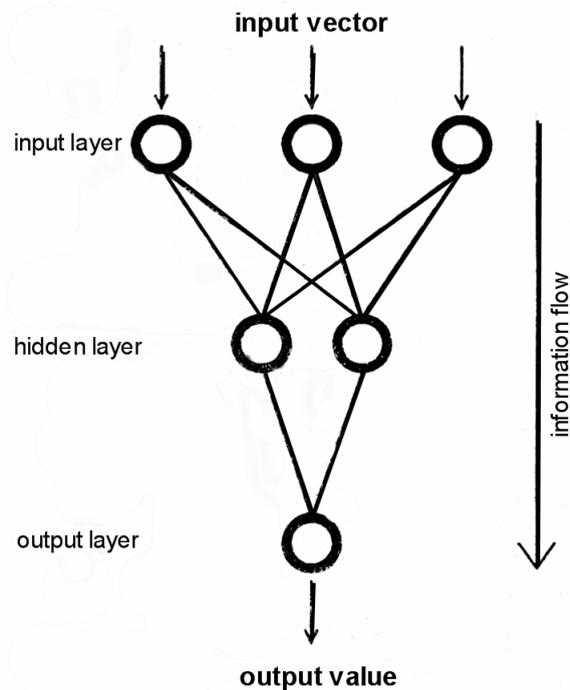


Abbildung 9: Architektur eines multi-layered feed-forward (MLFF) Netzes mit drei Schichten (Input-, Hidden- und Output-Layer), bestehend aus drei Input-, zwei Hidden- und einem Output-Neuron (3-2-1 Netz), die durch Gewichte verbunden sind (95).

Die Architektur des weit verbreiteten Backpropagation Neuronalen Netzwerks ist durch eine Hidden-Layer-Neuronenschicht gekennzeichnet und benutzt eine nichtlineare Aktivierungsfunktion, welche die Flexibilität des Netzes erhöht. Der Begriff Backpropagation rührt daher, dass beim Training des Netzes ein Fehler in der Vorhersage durch das Netzwerk „backpropagated“, also zurückgesandt wird und die Gewichte angepasst werden (44). Während des Trainings benutzt das Neuronale Netz einen wirksamen Algorithmus, bekannt als „Backpropagation of errors“, um seine internen Verbindungen kontinuierlich zu modifizieren, damit die Vorhersage der Klasse oder das Outcome optimiert wird (78).

Es sollte in Betracht gezogen werden, dass ein Neuronales Netzwerk einfach ein Set von Gleichungen ist, die durch Variable verbunden sind. Beim Training dieses Systems müssen drei nichtüberlappende Datensätze verwendet werden: Die Daten werden zufällig einem Trainings-Set, einem Validierungs- oder Test-Set und einem Verifizierungs-Set zugeteilt. Das Trainings-Set wird für die Anpassung der Gewichte eingesetzt, das Validierungs- oder Test-Set wird benutzt, um zu entscheiden, wann das Training zu stoppen ist. Durch „Overtraining“ verliert das ANN mehr und mehr die Fähigkeit zu einer guten Generalisierungsleistung, was dadurch erklärt werden kann, dass das Netz die Kalibrierungsdaten auswendig lernt. Um dies zu verhindern, wird das Training gestoppt, wenn der Fehler des Test-Sets auf einem Minimum ist. Schließlich wird zur Darstellung der Performance des Netzwerks das Verifizierungs-Set eingesetzt, um mit diesen Daten die Validität der Ergebnisse des Neuronalen Netzwerks zu bestimmen. Da das Validierungs-Set nicht während der Trainings- oder Testphase eingesetzt wird, können die durch die Validierung erhaltenen Ergebnisse als wahre (unbiased) Vorhersage für die Performance des Neuronalen Netzes bezüglich neuer Daten angesehen werden (20).

Biologisch inspirierte Neuronale Netze sind hochrobuste multifaktorielle mathematische Modelle, die mit Erfolg in der Vorhersage, Klassifizierung, Funktionsabschätzung, Mustererkennung und Komplettierung von Problemen in vielen Disziplinen eingesetzt wurden. Erfolgreiche Anwendungen beinhalten militärische Zielerkennung, Unterstützung bei finanziellen Entscheidungen, Aufdeckung von Fabrikationsdefekten, maschinelle Überwachung und Diagnose, Einsatz in der Robotik und in Kontrollsystemen. Im medizinischen Bereich wurden Neuronale Netzwerke in den letzten Jahren in zahlreichen Gebieten angewandt und die Ergebnisse publiziert, darunter die Bereiche Diagnose, Histologie, Bildgebung, Outcome-Vorhersagen, Wellenform-Analyse, Instrumentenüberwachung, Medikamentenentdeckung und Bioinformatik. Die beiden Autoren des Artikels über Artificial Neural Networks, J.E. Dayhoff und J.M. DeLeo, schlagen fünf Kriterien als Indikatoren für den Einsatz von Neuronalen Netzen im medizinischen Anwendungsbereich vor (20):

1. Das Outcome wird von multiplen Faktoren beeinflusst.
2. Es besteht der Wunsch, zusammengesetzte Indices von zahlreichen Tests miteinander zu verarbeiten.
3. Die Tatsache, dass frühere mathematische Modelle nicht existieren oder ernsthaft limitiert sind.
4. Ein Bedarf an Ergebnissen, die auf jedes Individuum anstatt auf Populationen angewandt werden.
5. Robuste nichtlineare Modelle werden benötigt.

Neuronale Netzwerke haben in bestimmten Studien bessere Ergebnisse als menschliche Experten erzielt. Auch wurde gezeigt, dass sie in der Lage sind, neue medizinische Informationen aus Rohdaten zu extrahieren (20). Oft sind die Resultate besser als bei herkömmlichen statistischen Techniken oder klinischer Beurteilung. Auch das Problem des Overtraining kann durch den Einsatz moderner Software leicht gelöst werden (95).

Nachteilig an Neuronalen Netzen ist die Tatsache, dass der iterative Trainingsprozess Minuten, Stunden oder sogar Tage bis zu seiner Vollendung dauern kann. Ein weiterer Nachteil ist das augenscheinliche Mysterium, wie ein ANN seine Vorhersagen macht. Bei den Netzen ist nicht klar, wie eine Vorhersagevariable benutzt wird oder ob sie überhaupt benutzt wird (44). Dieser Punkt ist jedoch nur bedingt richtig: Es existieren sehr wohl Methoden um zu bestimmen, wie das Netzwerk die Informationen benutzt. So können selektiv Input Units des Neuronalen Netzes inaktiviert oder als alleiniger Input eingesetzt werden, um danach die Performance zu untersuchen. Auch können Interaktionen zwischen Variablen geprüft werden, indem beispielsweise Paare von Variablen eingeschlossen oder weggelassen werden (79).

Ein Problem jedoch ist, dass es keinen Königsweg gibt, um für eine bestimmte Aufgabe die passendste Netzwerkarchitektur und -struktur zu finden. Durch Experimentieren und den Einsatz von Versuch und Irrtum müssen möglichst gute Lösungen gefunden werden (95).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Anhand der Analyse von modifizierten und nichtmodifizierten Nucleosiden im Urin von 101 gesunden Probandinnen und 68 Mammakarzinompatientinnen mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie soll festgestellt werden, inwiefern sich die Nucleosidlevel in beiden Gruppen unterscheiden bzw. ob statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Konzentrationen der einzelnen Nucleoside festgestellt werden können. Für die letzteren sollen die Spezifitäten und Sensitivitäten bestimmt werden.

Des Weiteren soll durch den Einsatz eines Neuronalen Netzes überprüft werden, ob anstelle der Betrachtung der einzelnen Nucleoside allein die Berücksichtigung des gesamten Nucleosidprofils weitere Vorteile zur Differenzierung von Gesunden und Mammakarzinompatientinnen bringt, was sich in besseren Werten bezüglich der Spezifität und Sensitivität äußern würde.

Da bisher keine befriedigenden Tumormarker für das Mammakarzinom, ähnlich den meisten anderen malignen Erkrankungen, existieren, soll letztendlich der Frage nachgegangen werden, inwiefern sich modifizierte bzw. nichtmodifizierte Nucleoside als potenzielle Tumormarker eignen. Hierzu sollen die erhaltenen Daten auch mit Werten der konventionellen Tumormarker beim Mammakarzinom CA 15-3 und CEA verglichen werden, welche beide in der Gruppe der Brustkrebspatientinnen erhoben wurden.

## **2. Material und Methoden**

In diesem Kapitel wird zum einen die Gruppe der Mammakarzinompatientinnen sowie die Kontrollgruppe der gesunden Frauen dargestellt, deren Urinproben zur Bestimmung der Nucleosidkonzentrationen herangezogen wurden, zum anderen wird die Methode zur Bestimmung dieser Nucleosidkonzentrationen beschrieben sowie die Validierung dieser Methode.

### **2.1 Probanden und Gewinnung der Urinproben**

Im Folgenden werden die beiden Probandengruppen vorgestellt: Das Kollektiv der gesunden Frauen sowie das Kollektiv der Mammakarzinompatientinnen. Des Weiteren wird die Gewinnung des Probenmaterials erläutert.

#### **2.1.1 Kollektiv der gesunden Probandinnen**

Die Kontrollgruppe bestand aus 101 Probandinnen im Alter von 15 bis 78 Jahren. Bedingung für die Aufnahme in diese Gruppe waren die folgenden Punkte:

- keine malignen Erkrankungen weder in Vorgeschichte noch zur Zeit der Probenabgabe
- keine aktuellen Infektionen/Erkrankungen
- keine kürzlich durchgeführten Operationen
- keine schwerwiegenden chronischen Erkrankungen, insbesondere Niereninsuffizienz
- keine derzeitige Schwangerschaft

Gesammelt wurde Spontanurin, welcher direkt nach Probenabgabe für maximal 24 Stunden bei 4 bis 7 °C gekühlt und anschließend bei -20 °C tiefgefroren wurde. Zuvor wurde noch mittels eines Urinteststreifens (Aution Sticks, Menarini diagnostics, Florenz, Italien) Protein-, Nitrit- und Leukozytengehalt gemessen. Verwendet wurden nur Urinproben, bei denen der Proteingehalt maximal 30

mg/dl betrug, kein Nitrit nachgewiesen wurde und höchstens 25 Leukozyten pro  $\mu\text{l}$  Urin gemessen wurden.

### 2.1.2 Kollektiv der Mammakarzinompatientinnen

Die Studie erstreckte sich auf 68 Mammakarzinompatientinnen im Alter von 34 bis 83 Jahren, welche in der Frauenklinik der Universität Tübingen in Behandlung waren. Die gesammelten Spontanurine wurden präoperativ gewonnen und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Patientinnen litten an Tumoren der Stadien Carcinoma in situ (Cis, Basalmembran intakt; 8 Fälle), T 1 (Tumorausdehnung bis 2 cm; 32 Fälle) und T 2 (Tumorausdehnung 2 bis 5 cm; 22 Fälle), wobei in sechs Fällen keine Zahlen zur Stadieneinteilung vorlagen (Abbildung 10); die Differenzierungsgrade der zu den T1- und T2-Tumoren zugehörigen Fällen waren zwischen den drei Stadien G 1 (hochdifferenziert), G 2 (mäßig differenziert) und G 3 (schlecht/un-differenziert) verteilt, die in-situ-Carcinome zwischen den Stadien low, intermediate und high grade.

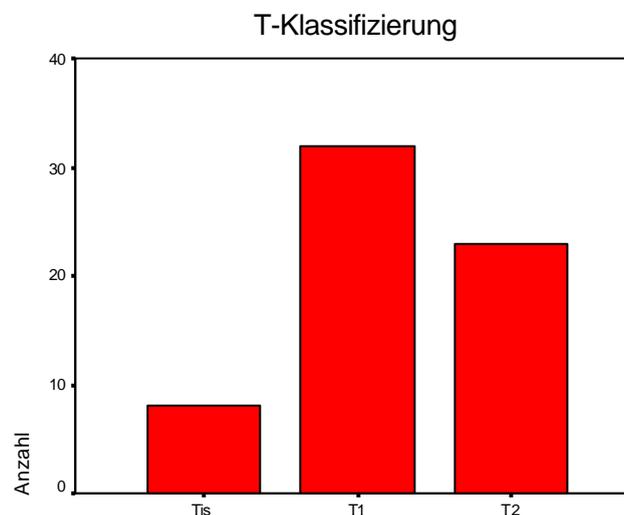


Abbildung 10: T-Klassifizierung der Tumoren der Mammakarzinompatientinnen

## 2.2 Methode zur Bestimmung der Nucleosidkonzentrationen

Zunächst soll eine Übersicht über die verwendeten Chemikalien bzw. Substanzen gegeben werden:

- Wasser für die Chromatographie, LiChrosolv, Merck, Darmstadt
- Methanol für die Flüssigkeitschromatographie, LiChrosolv, gradient grade, Merck
- Kaliumdihydrogenphosphat p.A., Merck
- Natriumchlorid p.A., Merck
- Ameisensäure p.A., Merck
- Ammoniumacetat p.A., Merck
- Ammoniak p.A., Merck
- Phenylboronsäure: Affi-Gel 601, Bio Rad Laboratories, München
- verwendete Nucleoside (außer Isoguanosin): Sigma Chemicals, Perth, Australien
- interner Standard Isoguanosin von Prof. Dr. Kim, Universität Seoul, Südkorea

In der durchgeführten Studie wurden mittels Reversed-Phase-High-Performance-Liquid-Chromatography 15 Nucleoside bzw. deren Konzentrationen im Urin bestimmt, darunter die vier Hauptnucleoside Adenosin (A), Cytidin (C), Guanosin (G), Uridin (U), des Weiteren die elf verschiedenartig modifizierten Nucleoside Inosin (I), Xanthosin (X), Pseudouridin (Pseu), inklusive der unterschiedlich methylierten Nucleoside 1-Methyladenosin (M1A), 5-Methyluridin (M5U), 3-Methyluridin (M3U), 1-Methylinosin (M1I), 1-Methylguanosin (M1G), 2-Methylguanosin (M2G), 6-Methyladenosin (M6A) sowie 5-Deoxy-5-Methylthioadenosin (MTA).

Die zur Bestimmung der Nucleosidkonzentrationen eingesetzte HPLC-Anlage der Firma Merck-Hitachi setzte sich zusammen aus der Pumpe L-6200, dem Autosampler L-7200, der Säule LiChrospher 100, RP-18e, 5 µm, Dimension

250 mm x 4 mm (Merck), welche im Ofen CTO-10AVP der Firma Shimadzu (Duisburg) auf 30°C temperiert wurde, dem UV-Detektor L-4000 und dem Interfacemodul D-6000, welches eine Verbindung zum Auswertesystem, dem D-6000 HPLC-Manager (Version 2, Revision 3), herstellte.

In chronologischer Reihenfolge werden nachfolgend das Erstellen der Absorptionsspektren der Nucleoside, die Aufarbeitung der Urinproben unter Einsatz der Affinitätschromatographie sowie die eingesetzte Methode zur Kreatininbestimmung, die Messbedingungen an der HPLC-Anlage, die Bestimmung der Retentionszeiten und die Kalibrierung der Anlage dargestellt.

### **2.2.1 Erstellen der Absorptionsspektren der Nucleoside**

Zunächst wurden von den 15 Nucleosiden sowie dem als internen Standard verwendeten Nucleosid Isoguanosin (IsoG) in mit ultrareinem Wasser angesetzter 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung Einzellösungen mit Konzentrationen im nM-Bereich hergestellt, um so die jeweiligen Absorptionsspektren zu erhalten. Zur Messung wurden ein Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS Spektrophotometer und QS-Küvetten verwendet, der Wellenlängenbereich zwischen 190 nm und 300 nm wurde gescannt.

Vor der Aufnahme der Absorptionsspektren der Nucleoside sowie des internen Standards gegenüber einer Küvette mit 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  als Referenzlösung wurde zunächst das Absorptionsspektrum der Kaliumdihydrogenphosphatlösung, in der zum einen die Proben gelöst waren und die zum anderen als mobile Phase B diente, aufgenommen, um so auszuschließen, dass deren Absorptionsspektrum im Messbereich zwischen 190 nm und 300 nm lag. Hierbei wurde als Referenzsubstanz für die Flüssigkeitschromatographie geeignetes, ultrareines Wasser verwendet. Darüber hinaus wurde das Absorptionsspektrum der anderen mobilen Phase A, Methanol in für die Chromatographie geeignetem Wasser im Verhältnis 3:2 (V/V), bestimmt, wobei der ermittelte Wert bei 210 nm lag. In Abbildung 11 sind exemplarisch die Absorptionsspektren von 1-

Methylguanosin und Isoguanosin dargestellt, in Tabelle 1 sind die Absorptionsspektren der untersuchten Nucleoside aufgeführt.

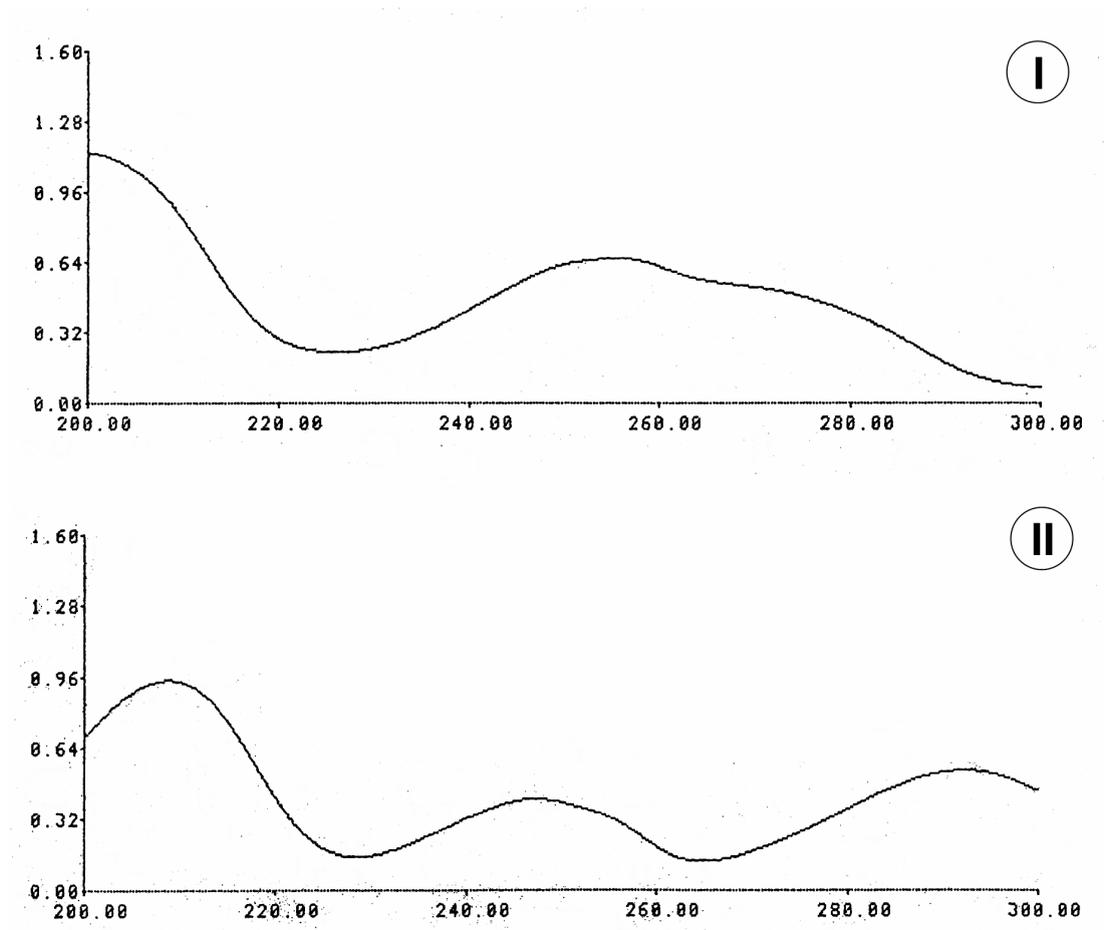


Abbildung 11: Absorptionsspektren von M1G (I) und IsoG (II)

Tabelle 1: Absorptionsmaxima der 15 Nucleoside

Nucleosid	Wellenlänge des Absorptionsmaximums [nm]
A	260
C	255
G	270
U	260
I	250
X	260
Pseu	260
M1A	260
M5U	265
M3U	260
M1I	250
M1G	255
M2G	255
M6A	265
MTA	260
IsoG	210/250/290

Da das Lambert-Beersche-Gesetz (Extinktion entspricht dem Produkt aus Schichtdicke der Lösung, Extinktionskoeffizient und Konzentration der gelösten Substanz) nur (nahe) am Absorptionsmaximum gilt und, wie aus Tabelle 1 ersichtlich, die Absorptionsmaxima aller im Urin zu untersuchenden Nucleoside sowie eines der drei gefundenen Maxima von Isoguanosin im Bereich um die Wellenlänge von 260 nm lagen, konnte diese Wellenlänge für die Detektion eingesetzt werden. Auch die Tatsache, dass das ermittelte Absorptionsmaximum von Methanol/Wasser (3:2, V/V) bei 210 nm lag, sprach in keiner Weise gegen die Messung mit einer Wellenlänge von 260 nm.

### 2.2.2 Aufbereitung der Urinproben

Um die Nucleoside aus dem Urin zu extrahieren, wurde die Methode der Affinitätschromatographie angewandt, wobei hierzu Phenylboronsäure eingesetzt wurde, da diese eine besondere Affinität zu den cis-diol-Gruppen des Riboseanteils der Nucleoside besitzt. Im alkalischen Bereich erfolgt eine Komplexbildung zwischen der Phenylboronsäure und den cis-diol-Gruppen des Zuckeranteils der Nucleoside. Nicht-gebundene, nicht mit cis-diol-Gruppen ausgestattete Substanzen werden durch den Einsatz von Ammoniumacetat (pH 8,5 bis pH 8,8) aus den mit Phenylboronsäure gefüllten Säulen ausgewaschen. Anschließend erfolgt durch Absenken des pH-Werts die Eluierung der Nucleoside. In Abbildung 12 sind die Vorgänge zwischen der Boronsäure und einer cis-diol-Gruppe schematisch dargestellt.

Diese Art der Affinitätschromatographie unter Einsatz von Boronatgel zur Extraktion von Nucleosiden aus biologischen Flüssigkeiten wurde erstmals von Uziel beschrieben und validiert (104).

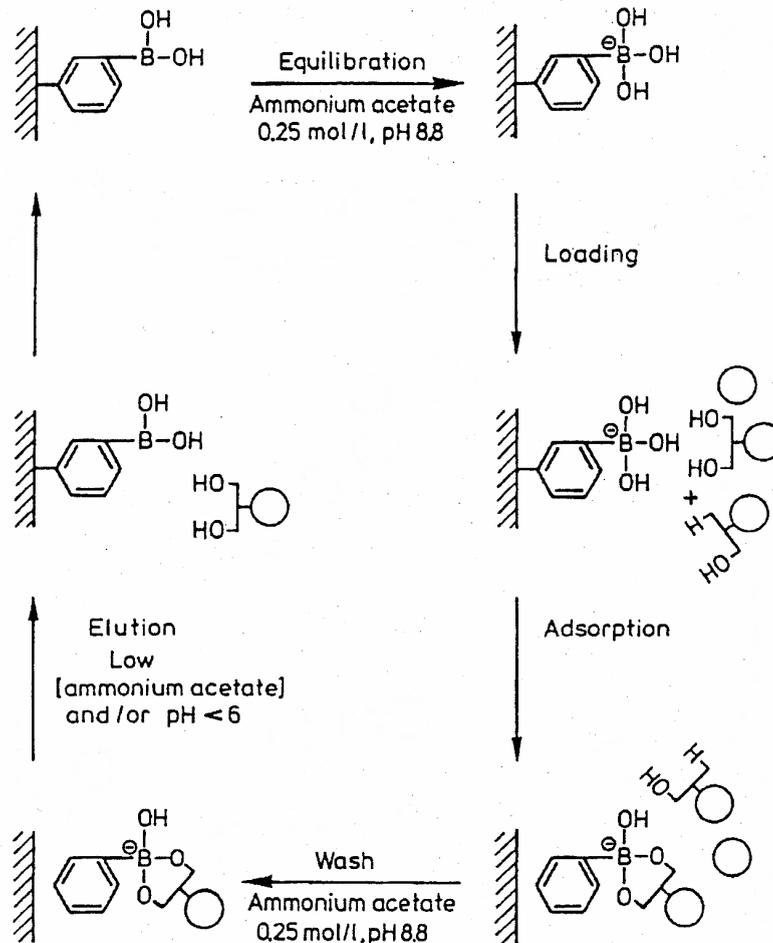


Abbildung 12: Schema der Interaktion zwischen cis-diol-Gruppen und Phenylboronsäure (31)

Nach der Erläuterung der theoretischen Grundlagen folgt nun die Darstellung der Aufarbeitung der Urinproben in vier Einzelschritten:

### 1. Packen der Säulen

Zuerst erfolgte das Abwiegen von je 500 mg Affi-Gel pro zur Chromatographie eingesetzten Säule, danach wurden die Gele in jeweils 10 ml destilliertem Wasser in einem Becherglas für 30 Minuten quellen gelassen. Anschließend wurden die Boronatgele in gläserne Chromatographiesäulen mit einer Höhe von 100 mm, einem Innendurchmesser von 10 mm und einer eingeschmolzenen Glas-

fritte der Porosität 0 gegeben. Die im Becherglas verbliebenen Gele wurden jeweils fünf Mal mit 10 ml destilliertem Wasser und 10 ml Methanol im Wechsel übergossen und erneut auf die Säule gegeben.

Dann wurden die Gele in den Säulen nach folgendem Schema gewaschen, damit zum einen die volle Aktivität der Gele erreicht wurde und zum anderen eventuell vorhandene Verunreinigungen entfernt wurden:

- 2 x 10 ml 0,1 M Natriumchlorid-Lösung
- 3 x 10 ml 0,1 N Ameisensäure in Methanol/dest. Wasser (1:1, V/V)
- 3 x 10 ml 0,25 M Ammoniumacetat-Lösung bei pH 8,5 bis pH 8,8
- 3 x 10 ml Methanol/dest. Wasser (1:1, V/V)
- 3 x 10 ml 0,1 N Ameisensäure in Methanol/dest. Wasser (1:1, V/V)
- 3 x 10 ml 0,1 M Natriumchlorid-Lösung

Beim Durchlauf der Lösungen durch die Gele war darauf zu achten, dass die Waschlösungen nicht zu schnell flossen und die Affi-Gele nicht trocken liefen. Nach Durchführung der beschriebenen Waschschriffe waren die Gele bereit für die Extraktion der Nucleoside aus dem Urin. Zur Lagerung der Phenylboronatgele zwischen den Extraktionen wurden sie in jeweils 25 ml 0,1 M NaCl-Lösung gelöst (Methode modifiziert nach [47]).

## **2. Vorbereitung der Urinproben und Bestimmung des Kreatininwerts**

Die bei -20°C eingefrorenen Urinproben wurden bei 4-7°C über Nacht aufgetaut und vor der Verarbeitung wurde die Annahme der Raumtemperatur abgewartet. Anschließend wurden die Proben durchmischt und jeweils ca. 12 ml in ein Kunststoffröhrchen gegeben. Falls dann der mittels eines Universal-pH-Indikatorpapiers (Merck) festgestellte pH-Wert unter pH 6 lag, wurde durch Zugabe von ein bis zwei Tropfen 25%iger Ammoniaklösung der Wert auf ca. pH 7 angehoben. Dann wurden die Proben für 10 Minuten bei 3219 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 10 ml abpipettiert und in einem weiteren Kunststoffröhrchen mit 500 µl interner Standardlösung (0,25 mM Isoguanosinlösung)

vermischt. Die interne Standardlösung wurde nach der Methode von Divakar (22) synthetisiert und freundlicherweise von Prof. Dr. Kim, Universität Seoul, Süd-Korea, zur Verwendung zur Verfügung gestellt. Die Zugabe des internen Standards dient zur Quantifizierung der Nucleoside durch die HPLC-Anlage, da durch dessen Einsatz die Auswirkungen möglicher Fehlerquellen oder Ungenauigkeiten bei der Aufarbeitung der Proben ausgeglichen werden: Geht beispielsweise ein Teil des Urin-Isoguanosin-Gemisches verloren, so ändert sich die für die Messung entscheidende Konzentration nicht. Genaueres über die Interne-Standard-Methode findet sich in Abschnitt 2.2.5.

Parallel dazu wurden von jeder aufgetauten Urinprobe 1 ml für die Bestimmung des jeweiligen Kreatininwerts genommen, welcher nach einer modifizierten Jaffé Methode (5) automatisiert an einem Hitachi 917 Automatic Analyzer (Boehringer Mannheim) im Zentrallabor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen gemessen wurde.

### **3. Extraktion der Nucleoside mittels Affinitätschromatographie**

Nachdem die Gele durch Waschen mit den verschiedenen Lösungen ihre volle Aktivität erreichten, wurden die folgenden Punkte durchlaufen, um die Nucleoside inklusive des internen Standards Isoguanosin aus den Urinproben zu extrahieren:

1. Äquilibrieren der Boronatgele mit 45 ml einer 0,25 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 8,5 bis pH 8,8).
2. Befüllen der Säulen mit den mit Isoguanosin versetzten Urinen unter Einsatz einer Eppendorf-Pipette, wobei das Durchsickern nicht zu schnell erfolgen durfte.
3. Waschen der Säulen mit 20 ml einer 0,25 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 8,5 bis pH 8,8) und anschließend mit
4. 2 x 3 ml Methanol/dest. Wasser (1:1, V/V).
5. Eluieren der Nucleoside mittels 25 ml einer 0,1 N Ameisensäure in Methanol/dest. Wasser (1:1, V/V).

6. Regenerieren der Gele durch Waschen mit 25 ml einer 0,1 N Ameisensäure in Methanol/dest. Wasser (1:1, V/V) und
7. 25 ml Methanol/dest. Wasser (1:1, V/V).
8. Nach erneutem Äquilibrieren wie unter 1. beschrieben waren die Gele bereit für eine neue Extraktion von Nucleosiden aus weiteren Urinproben. War keine unmittelbare erneute Extraktion erwünscht, wurden die Gele in 25 ml einer 0,1 M NaCl-Lösung suspendiert.

Unter Einhaltung dieser Bedingungen waren die Boronatgele jeweils für 15 Extraktionen von Nucleosiden aus Urinen verwendbar (47).

#### **4. Aufkonzentrierung der Nucleoside enthaltenden Eluate**

Nach dem Erhalt der 25 ml umfassenden, die Nucleoside enthaltenden Eluate wurden diese jeweils in einen Spitzkolben gegeben und unter Einsatz eines Rotationsverdampfers mit Wasserbad (Rotavapor RE 111 bzw. Büchi 461 Water Bath der Firma Büchi, Essen) bei einer Temperatur des Wassers von 40 °C vollständig eingedampft. Im Anschluss wurden die so gewonnenen Residuen in 0,5 ml der mobilen Phase B, 25 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung, eingestellt auf pH 5,0, aufgelöst und bis zur Messung an der HPLC-Anlage bei -20°C eingefroren.

#### **2.2.3 Apparative Bedingungen an der HPLC-Anlage**

Im Folgenden werden die Charakteristika der eingesetzten HPLC-Anlage wie Gradientensystem, Injektionsvolumen, Wellenlänge und Äquilibrieren des Geräts erläutert:

##### **1. Das Gradientensystem**

Zur Trennung der Nucleoside wurde ein sogenanntes binäres Niederdruckgradientensystem verwendet, welches sich dadurch auszeichnete,

dass es neben einem Konzentrationsgradienten – unterschiedliche E-luentenzusammensetzung zu verschiedenen Zeitpunkten – auch aus einem Flussgradienten – unterschiedliche Flussraten zu verschiedenen Zeitpunkten – bestand.

Der Konzentrationsgradient wurde durch das Zusammenmischen der zwei folgenden Laufmittel bestimmt:

- Die mobile Phase A setzte sich aus Methanol und ultrareinem Wasser im Verhältnis 3:2 zusammen, wobei die Abmessung der Volumina aufgrund der Volumenkontraktion separat erfolgte. Zum Entfernen von Luftblasen wurde das Gemisch 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt.
- Die mobile Phase B bestand aus einer 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung, eingestellt auf den pH-Wert 5,0. Zum Ansetzen der Lösung wurde ebenfalls das ultrareine Wasser der Firma Merck verwendet. Um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen, wurde die Lösung mit einem Filter der Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$  der Firma Millipore (Schwalbach) gefiltert und zur Entfernung von Luftblasen wurde die Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung für 15 Minuten mit Helium begast (aufgrund der jeweils benötigten Menge war eine Behandlung im verfügbaren Ultraschallbad aus Platzgründen nicht möglich).

In der folgenden Tabelle 2 ist der gesamte Gradientenverlauf dargestellt:

Tabelle 2 : Gradientenverlauf

Schritt	Zeit [min]	Eluent A [%]		Eluent B [%]		Fluss [ml]
		Methanol/Wasser 3/2		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		
1	0	0		100		1,50
2	1	1		99		1,50
3	5	1		99		1,50
4	15	10		90		1,50
5	40	60		40		1,35
6	42	60		40		1,30
7	45	0		100		1,40
8	50	0		100		1,50
9	70	0		100		1,50

## 2. Das Injektionsvolumen

Das jeweils durch den Autosampler in das System injizierte Probenvolumen betrug 20 µl, wodurch ein Überladen der Säulen vermieden wurde.

## 3. Die Wellenlänge

Aufgrund der oben erläuterten Gründe (2.2.1) wurde eine Wellenlänge von 260 nm gewählt.

## 4. Äquilibrieren der HPLC-Anlage

Um das System zu äquilibrieren, wurde zunächst für einige Minuten mit der 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (Eluent B) gespült und anschließend ein vollständiger Gradientenlauf gefahren, wobei destilliertes Wasser als Probe verwendet wurde.

#### 2.2.4 Bestimmung der Retentionszeiten der Nucleoside

Von den Reinsubstanzen der Nucleoside A, C, G, U, I, X, Pseu, M1A, M5U, M3U, M1I, M1G, M2G, M6A, MTA sowie des internen Standards IsoG wurden Einzellösungen mit Konzentrationen im Nanomolbereich hergestellt, um dadurch die Retentionszeiten der einzelnen Nucleoside bestimmen zu können. Hierfür wurden die Reinsubstanzen in der mobilen Phase B (25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung, pH 5) in einem Eppendorf-Cup des Volumens 1,5 ml gelöst und nach gutem Durchmischen in einer Eppendorf-Zentrifuge für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände der Lösungen in die Vials des Autosamplers der HPLC-Anlage überführt und unter Einspritzen jeweils einer Nucleosidlösung wurden nach dem Äquilibrieren der Anlage 16 Gradienten gefahren. Aufgrund der identischen Retentionszeiten der Paarungen I und M5U sowie X und M3U wurde der ursprünglich in der Originalmethode nach Liebich et al. (50) verwendete pH-Wert von 4,65 bis 4,7 der Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (Eluent B) auf einen Wert von 5,0 angehoben, um dadurch eine Trennung der Substanzen zu erreichen: Der pH-Wert der mobilen Phase beeinflusst die Retentionszeiten der verschiedenen Nucleoside (26).

Auf diese Weise konnte in einer nur die Nucleoside I, M5U, X und M3U enthaltenden Lösung für I und M5U eine akzeptable und für X und M3U eine Basisli-  
nientrennung erzielt werden, wodurch sowohl die Elutionsreihenfolge der Nucleoside als auch deren Retentionszeiten bekannt waren.

Um die bestimmten Retentionszeiten der einzelnen Nucleoside zu verifizieren, wurde eine alle 15 Nucleoside enthaltende Stammlösung folgender Konzentrationen erstellt (Tabelle 3):

Tabelle 3: Konzentrationen der einzelnen Nucleoside in 1 ml Stammlösung

<b>Nucleosid</b>	<b>Konzentration in 1 ml der Stammlösung [nmol]</b>
A	34,2
C	8,1
G	8,1
U	16,4
I	32,6
X	32,3
Pseu	1277,6
M1A	167,4
M5U	31,9
M3U	16,6
M1I	8,1
M1G	32,0
M2G	8,7
M6A	32,9
MTA	18,2

Anschließend wurden 2,5 ml dieser Stammlösung mit 7,5 ml ultrareinem Wasser sowie 0,5 ml des internen Standards Isoguanosin (0,25 mM) vermischt, wodurch die Probe E1 erhalten wurde. Nach Aufbereitung dieser Probe analog zu mit internem Standard versetzten Urin (Abschnitt 2.2.2) bekam man die Eichlösung E1 und nach Messung dieser Eichlösung mittels HPLC-Anlage ergaben sich unter ausreichender Trennung der 15 Nucleoside sowie des internen Standards die in Tabelle 4 aufgeführten Retentionszeiten (Chromatogramm einer Eichlösung E1 siehe Kapitel 3.1 im Ergebnisteil):

Tabelle 4: Retentionszeiten der einzelnen Nucleoside sowie des internen Standards der Eichlösung E1

Nucleosid	Retentionszeit [min]
Pseu	3,33
C	4,55
U	6,89
M1A	8,61
IsoG	12,77
I	14,77
M5U	15,01
G	15,71
X	16,67
M3U	18,24
M1I	20,43
M1G	21,15
M2G	22,05
A	23,09
M6A	29,47
MTA	34,21

### 2.2.5 Kalibrierung der HPLC-Anlage

Um das HPLC-Gerät zu kalibrieren, wurden unter Verwendung der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Stammlösung, welche alle 15 Nucleoside enthielt, folgende Proben hergestellt (Tabelle 5):

Tabelle 5: Zusammensetzung der Kalibrierlösungen

	Zusammensetzung [ml] von			
	K 0,25	K 0,5	K 0,75	K 1
<b>Stammlösung</b>	0,625	1,25	1,875	2,5
<b>Wasser</b>	9,375	8,75	8,125	7,5
<b>0,25 mM Isoguanosin</b>	0,500	0,50	0,500	0,5

Zur Herstellung wurde jeweils ein definiertes Volumen der Stammlösung mit ultrareinem Wasser auf jeweils 10 ml aufgefüllt und mit 0,5 ml des internen Standards gemischt. Anschließend wurden diese Proben gleich aufbereitet wie die zu untersuchenden Urine (Kapitel 2.2.2). Dadurch erhielt man die vier Eichlösungen E 0,25, E 0,5, E 0,75 und E 1, mit welchen eine Kalibrierung der HPLC-Anlage im gesamten Messbereich durchgeführt werden konnte.

Dann wurde mit jeweils 20 µl dieser Eichlösungen an der HPLC-Anlage ein Durchlauf gefahren. Bei der Kalibrierung des Systems wurde für jede der vier Konzentrationen der 15 Nucleoside das Verhältnis der Peakfläche des jeweiligen Nucleosids zum internen Standard bestimmt, wobei dem Auswertesystem die theoretisch berechneten Konzentrationen der Nucleoside in den verschiedenen Eichlösungen vorgegeben wurden. Zum Erhalt der Kalibriergeraden wurden zunächst nach der Internen-Standard-Methode auf der x-Achse die theoretisch ermittelten Nucleosidkonzentrationen gegen die durch den Detektor und die HPLC-Software integrierten und auf den internen Standard bezogenen Peakflächen der einzelnen Nucleoside auf der y-Achse aufgetragen. Zur weiteren Bestimmung der Kalibriergeraden wurde eine lineare Regression durchgeführt, wobei sich im quadrierten Korrelationskoeffizienten  $R^2$  (= Bestimmtheitsmaß B) die Stärke des Zusammenhangs beider Variablen ausdrückt. Die Werte der jeweiligen Bestimmtheitsmaße der Nucleoside sowie eine exemplarische Regressionsgerade sind im Kapitel 3.2.3 aufgeführt.

### **2.2.6 Anwendung der Methode auf Urinproben und Formulierung des Endergebnisses**

Um die problemlose Übertragung der Methode auf biologisches Probenmaterial, d.h. auf Urinproben, aufzuzeigen, wurde die Urinprobe einer gesunden Probandin nach dem oben aufgeführten Verfahren aufbereitet und in der HPLC-Anlage eine Messung derselbigen durchgeführt. Dabei ergaben sich ein Chromatogramm, wie es in Kapitel 3.1 dargestellt ist, sowie die zugehörigen Konzentrationen in nmol Nucleosid pro 10 ml Urin.

Damit die ermittelten Nucleosidkonzentrationen zwischen den verschiedenen Individuen verglichen werden konnten, wurden die Messergebnisse auf die jeweiligen Kreatininkonzentrationen der Proben bezogen. Dadurch erhielt man für jede Probe das Messergebnis nmol Nucleosid pro  $\mu\text{mol}$  Kreatinin.

### **2.3 Validierung der Methode**

Um die Validität der Methode zur Bestimmung der 15 Nucleoside zu überprüfen, wurden folgende Stufen durchlaufen:

- Überprüfung auf apparative Reproduzierbarkeit
- Überprüfung auf Reproduzierbarkeit des gesamten Probenansatzes
- Bestimmung der Linearität des Messbereichs
- Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen

Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind alle im Ergebnisteil (Abschnitt 3.2) zu finden.

#### **2.3.1 Apparative Reproduzierbarkeit**

Zur Prüfung auf apparative Reproduzierbarkeit wurde eine Urinprobe einer gesunden Probandin nach dem in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Verfahren einmalig aufbereitet und zehn Mal in die kalibrierte HPLC-Anlage injiziert und gemessen. Anschließend erfolgte die Auswertung der sich ergebenden Konzentrationen, welche hier nicht auf die Kreatinin-Konzentration der Probe bezogen wurden, da eine interindividuelle Vergleichbarkeit nicht notwendig war, sowie der Retentionszeiten der einzelnen Nucleoside. Dazu wurden jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen und die sich daraus ergebenden Variationskoeffizienten bestimmt.

### **2.3.2 Reproduzierbarkeit des gesamten Probenansatzes**

Hierzu wurde die Urinprobe einer gesunden Probandin acht Mal – aufgrund der parallelen Aufarbeitung der untersuchten Urine – nach dem beschriebenen Verfahren aufbereitet und die acht die Nucleoside enthaltenden Eluate wurden durch jeweiliges Einspritzen in die HPLC-Anlage auf ihre Nucleosidkonzentrationen, welche wiederum nicht auf die Kreatininkonzentration der Urinprobe bezogen waren, untersucht. Anschließend erfolgte die Auswertung durch Betrachtung der einzelnen Variationskoeffizienten.

### **2.3.3 Linearitätskontrolle des Messbereichs**

Der in der HPLC-Anlage eingesetzte UV-Detektor soll bei der quantitativen Bestimmung der Nucleosidkonzentrationen Signale produzieren, deren Fläche proportional zur jeweiligen Nucleosidmenge ist. Jenseits des kalibrierten Bereichs jedoch ist diese Linearität nicht mehr gegeben, die Signalhöhe stimmt dort nicht mehr mit der tatsächlichen Konzentration überein.

Da die Linearität in demjenigen Bereich von Bedeutung ist, in welchem sich die Konzentration der Nucleoside in den Urinen von gesunden Probandinnen und Mammakarzinompatientinnen bewegen, wurde eine Linearitätskontrolle mit den vier unterschiedlich konzentrierten Eichlösungen E 0,25, E 0,5, E 0,75 und E 1 durchgeführt. Dabei sind die Werte der quadrierten Korrelationskoeffizienten  $R^2$  bzw. der Bestimmtheitsmaße  $B$  der einzelnen Kalibriergeraden von Interesse, welche sich durch lineare Regression ergaben (genauerer Procedere in Abschnitt 2.2.5): Je näher die Werte gegen die Zahl 1 gehen, desto besser stimmen gemessene und tatsächliche Konzentration der Nucleoside überein.

### **2.3.4 Untere Nachweisgrenzen**

Eine Substanz kann durch die HPLC-Anlage, insbesondere durch den Detektor, nur nachgewiesen werden, wenn deren Signal nicht im Grundrauschen verschwindet. Die untere Messgrenze oder Nachweisgrenze ist so definiert, dass

das Signal einer zu detektierenden Substanz die Höhe des Grundrauschens um das Dreifache überschreiten muss und wird als Konzentration angegeben.

Um die unteren Nachweisgrenzen der einzelnen Nucleoside zu bestimmen, wurde eine Blindprobe angesetzt, welche 10 ml ultrareines Wasser sowie 0,5 ml des internen Standards Isoguanosin enthielt. Dann wurde diese Probe ebenso wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben aufbereitet und mittels HPLC gemessen.

Das entstehende Chromatogramm stellte sich in der Form dar, dass neben der Basislinie ein Peak erkennbar war, welcher dem internen Standard entspricht. Die Basislinie wurde unter Einsatz der HPLC-Software angezoomt, bis die Flächen des Hintergrundrauschens integrierbar wurden. Eine der Flächen wurde dann exemplarisch ausgewählt, bestimmt und aufgrund der Definition mit dem Faktor drei multipliziert. Indem die so bestimmte Fläche auf die Fläche des internen Standards bezogen und mit den Steigungen der jeweiligen Kalibriergeraden der Nucleoside multipliziert wurde, erhielt man die unteren Nachweisgrenzen für die einzelnen Nucleoside. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass diese unteren Messgrenzen nur annähernd richtig sind, da sich zum einen die einzelnen Flächen des Grundrauschens in ihrer Größe leicht unterscheiden und zum anderen die Kalibriergeraden nicht aus dem kalibrierten Bereich extrapoliert werden sollten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Chromatogramme

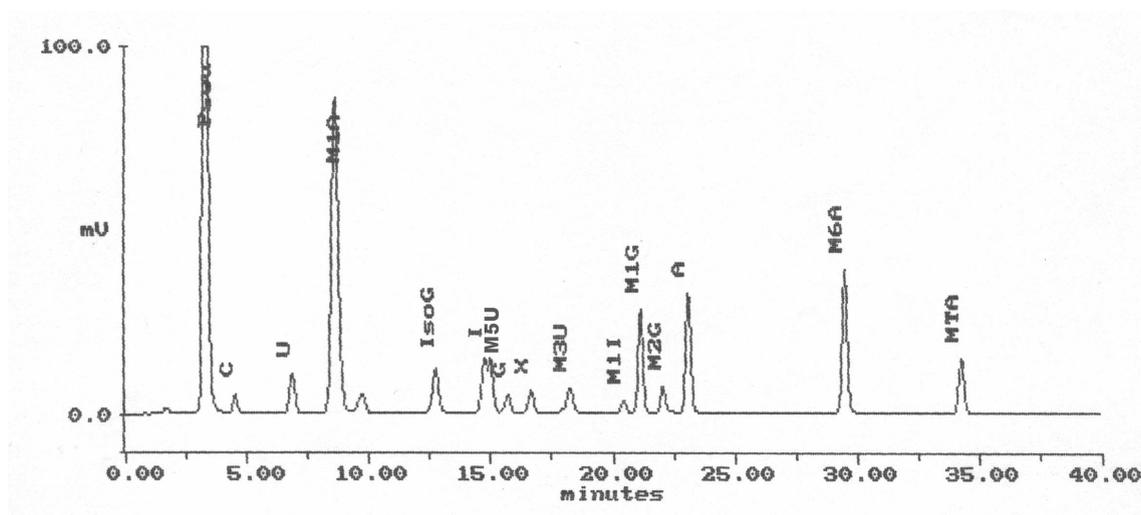


Abbildung 13: Chromatogramm der Eichlösung E 1

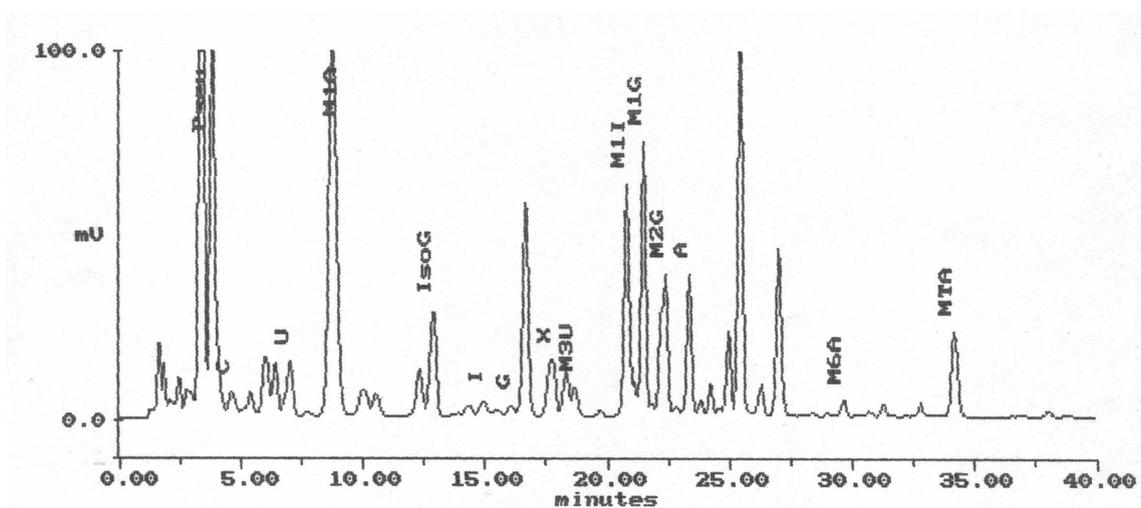


Abbildung 14: Chromatogramm einer Probandin der Kontrollgruppe

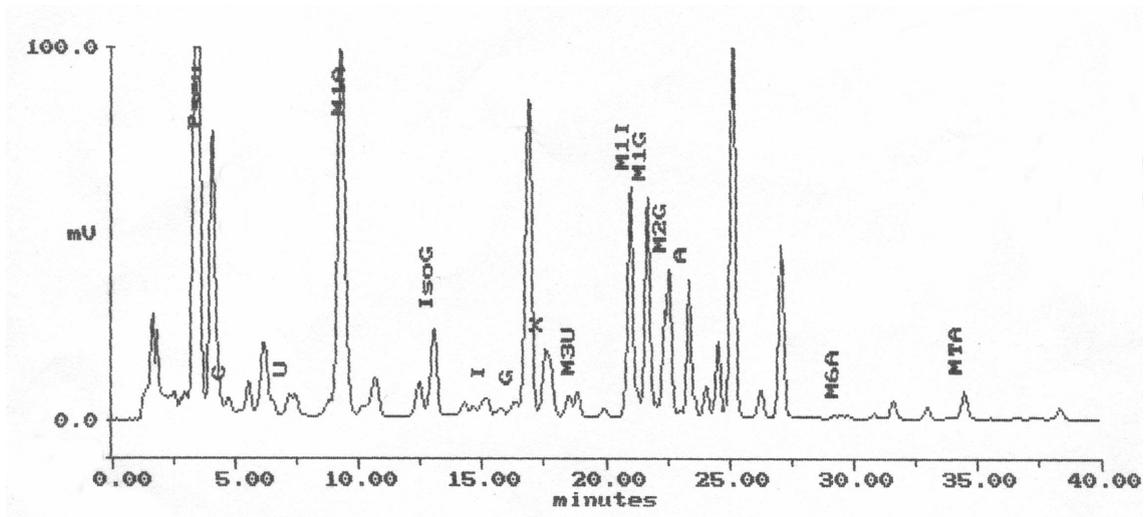


Abbildung 15: Chromatogramm einer Mammakarzinompatientin

Bei dem durch Messung an der HPLC-Anlage erhaltenen Chromatogramm der Eichlösung E 1 (Abbildung 13) stellte sich das Nucleosidprofil in folgender Reihenfolge dar: Pseudouridin, Cytidin, Uridin, 1-Methyladenosin, Isoguanosin, Inosin, 5-Methyluridin, Guanosin, Xanthosin, 3-Methyluridin, 1-Methylinosin, 1-Methylguanosin, 2-Methylguanosin, Adenosin, 6-Methyladenosin, 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin.

In den Chromatogrammen der Probandinnen der Kontrollgruppe sowie der Mammakarzinompatientinnen (exemplarisch Abbildung 14 und 15) war in keinem Fall das sich an Inosin anschließende 5-Methyluridin zu finden. Zusätzlich waren einige nichtidentifizierte Peaks vorhanden, welche jedoch bei der Auswertung nicht störten.

Die Größe der Peaks, welche letztendlich für die Konzentration der Nucleoside im Urin steht, variierte von Chromatogramm zu Chromatogramm: Bei sehr stark konzentrierten Urinproben (hoher Kreatininwert) waren die Peaks im Vergleich zum in immer gleicher Menge zugegebenen Internen Standard Isoguanosin relativ groß und dementsprechend vice versa bei schwach konzentrierten Proben. Da sich also die Konzentration der Urine bzw. der Kreatiningehalt sehr stark auf die Peakgröße auswirkten, war es allein durch Betrachtung eines Chromatogramms nicht möglich, ein solches der Kontroll- oder Mammakarzinomgruppe zuzuordnen.

### **3.2 Validierung der Methode**

Nachfolgend werden die Ergebnisse vorgestellt, welche sich bei Überprüfung auf apparative Reproduzierbarkeit, Reproduzierbarkeit des gesamten Probenansatzes, Linearität des Messbereichs und bei der Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen ergaben. Da 5-Methyluridin aufgrund dessen zu geringer Konzentration in den untersuchten Urinen in den Chromatogrammen nicht dargestellt wurde bzw. im Grundrauschen unterging, wird es in den Ausführungen zu den einzelnen Schritten der Reproduzierbarkeit nicht berücksichtigt.

### 3.2.1 Apparative Reproduzierbarkeit

Das zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der HPLC-Anlage zehnmalige Einspritzen derselben, einmalig aufgearbeiteten Urinprobe stellte sich für die 14 Nucleoside bezüglich der Konzentrationen (Tabelle 6) und Retentionszeiten (Tabelle 7) in folgender Form dar:

Tabelle 6: Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Konzentrationen der jeweiligen Nucleoside nach zehnmaligem Einspritzen derselben, einmalig aufgearbeiteten Urinprobe

	<b>Mittelwert</b> [nmol Nucleosid/ 10 ml Urin]	<b>Standard- abweichung</b> [nmol Nucleosid/ 10 ml Urin]	<b>Variations- koeffizient</b> [%]
<b>Pseu</b>	1379,40	4,86	0,35
<b>C</b>	4,56	0,06	1,42
<b>U</b>	22,13	0,21	0,94
<b>M1A</b>	154,79	2,15	1,39
<b>I</b>	26,12	0,63	2,40
<b>G</b>	1,95	0,19	9,97
<b>X</b>	18,62	0,88	4,73
<b>M3U</b>	17,43	0,40	2,31
<b>M1I</b>	118,20	1,70	1,44
<b>M1G</b>	62,84	0,65	1,03
<b>M2G</b>	18,39	0,53	2,90
<b>A</b>	13,41	0,34	2,55
<b>M6A</b>	1,11	0,06	5,76
<b>MTA</b>	4,74	0,38	8,03

Tabelle 7: Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Retentionszeiten der jeweiligen Nucleoside nach zehnmalem Einspritzen derselben, einmalig aufgearbeiteten Urinprobe

	<b>Mittelwert</b> [min]	<b>Standard- abweichung</b> [min]	<b>Variations- koeffizient</b> [%]
<b>Pseu</b>	3,43	0,02	0,48
<b>C</b>	4,72	0,03	0,55
<b>U</b>	7,18	0,07	0,91
<b>M1A</b>	9,23	0,17	1,79
<b>I</b>	15,26	0,15	0,96
<b>G</b>	16,65	0,12	0,72
<b>X</b>	17,28	0,12	0,67
<b>M3U</b>	18,82	0,13	0,70
<b>M1I</b>	20,86	0,27	1,31
<b>M1G</b>	21,54	0,27	1,24
<b>M2G</b>	22,42	0,25	1,13
<b>A</b>	23,47	0,22	0,95
<b>M6A</b>	29,81	0,10	0,34
<b>MTA</b>	34,52	0,12	0,35

Die ermittelten Variationskoeffizienten erlauben es, die Standardabweichungen der einzelnen Nucleoside unabhängig von der Lage der Mittelwerte zu vergleichen.

### 3.2.2 Reproduzierbarkeit des gesamten Probenansatzes

Die Ergebnisse der Überprüfung der Reproduzierbarkeit von Aufarbeitung der Urinproben und Analyse durch die HPLC-Anlage, die mittels achtmaligem Aufarbeiten derselben Urinprobe und nachfolgender Messung der acht erhaltenen Eluate durch das HPLC-Gerät durchgeführt wurde, sind in Tabelle 8 dargestellt. Anders als bei Testung auf Reproduzierbarkeit der HPLC-Messung allein sind hier nur die Ergebnisse von Mittelwerten, Standardabweichungen und Variati-

onskoeffizienten der einzelnen Nucleoside bezüglich der Konzentrationen dargestellt.

Tabelle 8: Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Konzentrationen der jeweiligen Nucleoside nach achtmaligem Aufarbeiten derselben Urinprobe durch Affinitätschromatographie und Messung der acht erhaltenen Eluate mittels HPLC

	<b>Mittelwert</b> [nmol Nucleosid/ 10 ml Urin]	<b>Standard- abweichung</b> [nmol Nucleosid/ 10 ml Urin]	<b>Variations- koeffizient</b> [%]
<b>Pseu</b>	1424,50	100,32	7,04
<b>C</b>	4,87	0,31	6,28
<b>U</b>	22,24	0,58	2,62
<b>M1A</b>	146,00	4,35	2,98
<b>I</b>	26,53	1,22	4,60
<b>G</b>	1,35	0,21	15,47
<b>X</b>	27,25	2,70	9,92
<b>M3U</b>	15,90	0,84	5,30
<b>M1I</b>	119,40	1,79	1,50
<b>M1G</b>	62,33	0,70	1,12
<b>M2G</b>	18,02	1,36	7,54
<b>A</b>	13,37	0,93	6,95
<b>M6A</b>	1,01	0,13	12,68
<b>MTA</b>	4,51	1,14	25,34

### 3.2.3 Linearitätskontrolle des Messbereichs

Die für die Linearitätskontrolle des Messbereichs herangezogenen quadrierten Korrelationskoeffizienten  $R^2$  oder Bestimmtheitsmaße B der Kalibriergeraden betragen für die einzelnen Nucleoside wie folgt (Tabelle 9):

Tabelle 9: Quadrierte Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden der einzelnen Nucleoside

<b>Pseu:</b>	$R^2 = 0,9971$
<b>C:</b>	$R^2 = 0,9992$
<b>U:</b>	$R^2 = 0,9989$
<b>M1A:</b>	$R^2 = 0,9988$
<b>I:</b>	$R^2 = 0,9973$
<b>G:</b>	$R^2 = 0,9991$
<b>X:</b>	$R^2 = 0,8959$
<b>M3U:</b>	$R^2 = 0,9667$
<b>M1I:</b>	$R^2 = 0,9985$
<b>M1G:</b>	$R^2 = 0,9996$
<b>M2G:</b>	$R^2 = 0,9993$
<b>A:</b>	$R^2 = 0,9994$
<b>M6A:</b>	$R^2 = 0,9992$
<b>MTA:</b>	$R^2 = 0,9997$

Exemplarisch ist in Abbildung 16 die Kalibriergerade von Pseudouridin dargestellt.

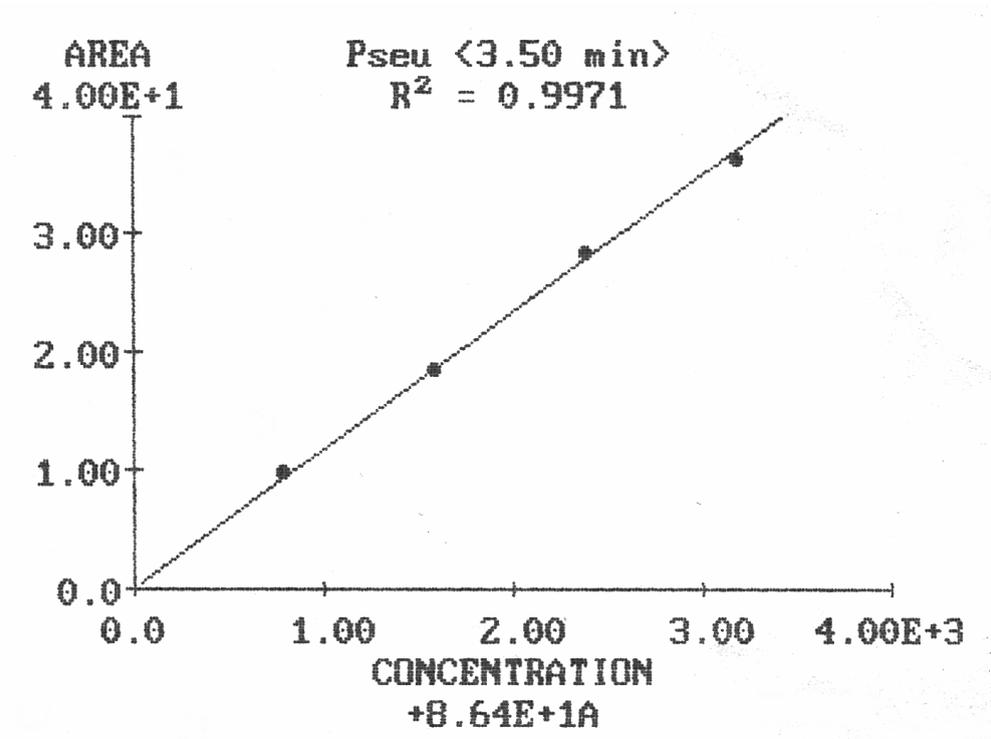


Abbildung 16: Kalibriergerade von Pseudouridin (x-Achse: theoretische Konzentration, y-Achse: gemessene/berechnete Fläche)

### 3.2.4 Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen

Für die 14 Nucleoside sind die Konzentrationen der jeweiligen unteren Nachweisgrenzen in Tabelle 10 dargestellt. Diese ergaben sich durch Einsetzen der folgenden Werte in die in Kapitel 2, Abschnitt 2.3.4 erläuterte Formel:

$3 \cdot \text{Fläche eines Peaks im Grundrauschen} / \text{Fläche des Peaks des Internen Standards} \cdot \text{Steigung } b \text{ der jeweiligen Kalibriergeraden}$

mit: Fläche des Peaks im Grundrauschen: 23

Fläche des Peaks des Internen Standards: 152307

Tabelle 10: Konzentrationen [nmol Nucleosid / ml Urin] der unteren Nachweisgrenzen der jeweiligen Nucleoside mit den Steigungen  $b$  der Kalibriergeraden

<b>Pseu:</b>	$b =$	86,41	?	0,039 nmol/ml
<b>C:</b>	$b =$	83,83	?	0,038 nmol/ml
<b>U:</b>	$b =$	61,40	?	0,028 nmol/ml
<b>M1A:</b>	$b =$	54,68	?	0,025 nmol/ml
<b>I:</b>	$b =$	127,00	?	0,058 nmol/ml
<b>G:</b>	$b =$	57,26	?	0,026 nmol/ml
<b>X:</b>	$b =$	177,90	?	0,081 nmol/ml
<b>M3U:</b>	$b =$	78,94	?	0,036 nmol/ml
<b>M1I:</b>	$b =$	95,51	?	0,043 nmol/ml
<b>M1G:</b>	$b =$	45,99	?	0,021 nmol/ml
<b>M2G:</b>	$b =$	44,44	?	0,020 nmol/ml
<b>A:</b>	$b =$	40,40	?	0,018 nmol/ml
<b>M6A:</b>	$b =$	31,53	?	0,014 nmol/ml
<b>MTA:</b>	$b =$	37,19	?	0,017 nmol/ml

### 3.3 Auswertung der Daten mittels klassischer Statistik und ANN

#### 3.3.1 Klassische statistische Auswertung der erhaltenen Daten

Für die Auswertung unter Einsatz des Statistikprogramms SPSS wurden die Daten von 169 Probanden verwendet, darunter 101 gesunde Frauen und 68 an einem Mammakarzinom leidende. Von den 15 am HPLC-Gerät gemessenen Nucleosidkonzentrationen wurden 5-Methyluridin aufgrund der für die Messung zu geringen Konzentration in den Urinen sowie 6-Methyladenosin und 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin wegen oft nicht eindeutig möglicher Identifizierung der Peaks in den Chromatogrammen und zudem schlechter Ergebnisse bei der Validierung nicht berücksichtigt, was somit die Betrachtung von 12 Nucleosiden zur Folge hatte.

Um auszuschließen, dass das Alter eine Rolle bei der Höhe der Nucleosidkonzentrationen spielte – der Median des Alters betrug in der Kontrollgruppe 38 Jahre, in der Mammakarzinomgruppe 63 Jahre – ,wurde das Kontrollkollektiv in zwei Klassen eingeteilt: Die eine Klasse umfasste Probanden im Alter von 15 bis 44 Jahren, in der anderen reichte das Alter von 45 bis 78 Jahren. Die Anwendung eines Mann-Whitney-U-Tests zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Höhe der Nucleosidkonzentrationen und der Zugehörigkeit zu einer der beiden Altersklassen vorliegt; auch kann kein Trend in der Form beobachtet werden, dass alle Nucleosidkonzentrationen einer Altersklasse tendenziell höher als die der anderen sind: Vergleicht man Mediane und arithmetische Mittelwerte der einzelnen Nucleosidkonzentrationen, so liegen sie zum Teil in der einen, zum Teil in der anderen Klasse höher.

Bei den fünf Nucleosiden Pseudouridin, Inosin, 3-Methyluridin, 1-Methylinosin sowie Guanosin, also vier modifizierten und einem nichtmodifizierten Nucleosid, liegt eine statistisch signifikante Erhöhung der Konzentrationen in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zur Gruppe der gesunden Probandinnen vor. Der jeweilige Wert  $p$ , welcher unter Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests ermittelt wurde, beträgt bei diesen Nucleosiden wie folgt (Rundung auf die dritte Kommastelle):

- Pseudouridin:  $p = 0,030$
- Inosin:  $p = 0,000$
- 3-Methyluridin:  $p = 0,000$
- 1-Methylinosin:  $p = 0,000$
- Guanosin:  $p = 0,001$

In den Abbildungen 17 bis 21 sind von diesen fünf Nucleosiden die jeweiligen Konzentrationen beider Gruppen in Boxplot-Form gegenübergestellt.

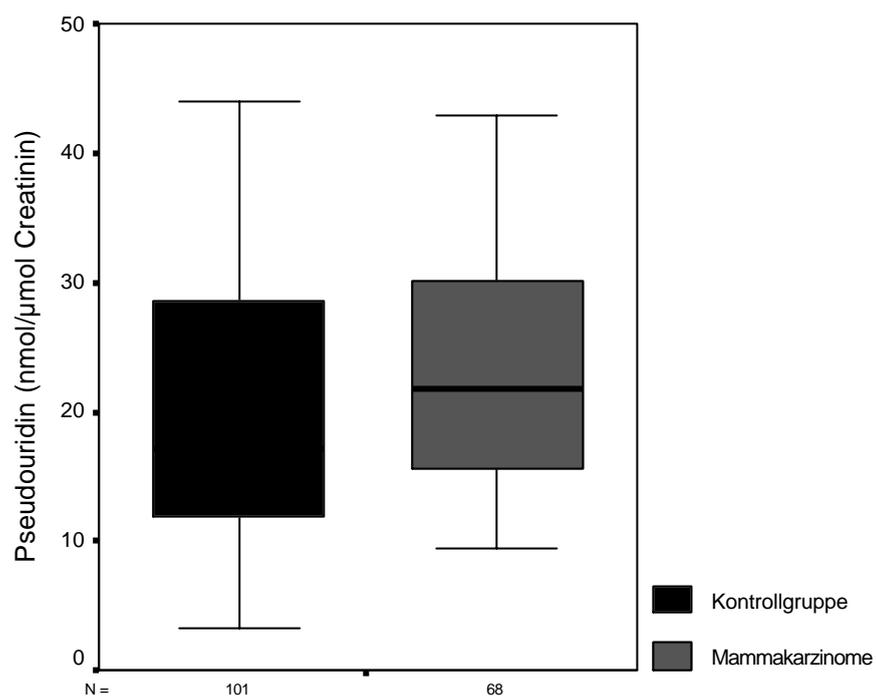


Abbildung 17: Nucleosidkonzentration von Pseudouridin in der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe

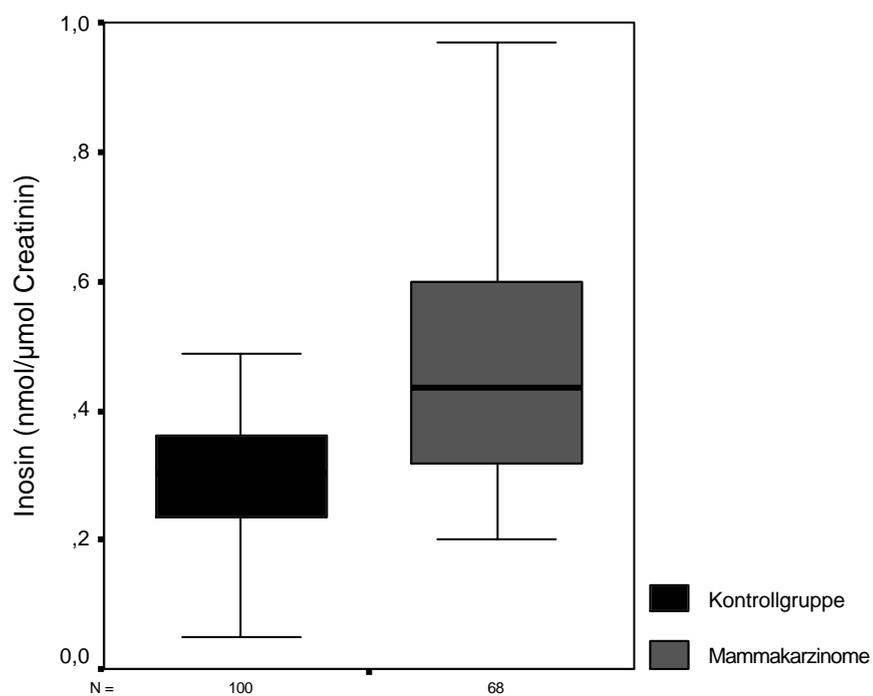


Abbildung 18: Nucleosidkonzentration von Inosin in der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe

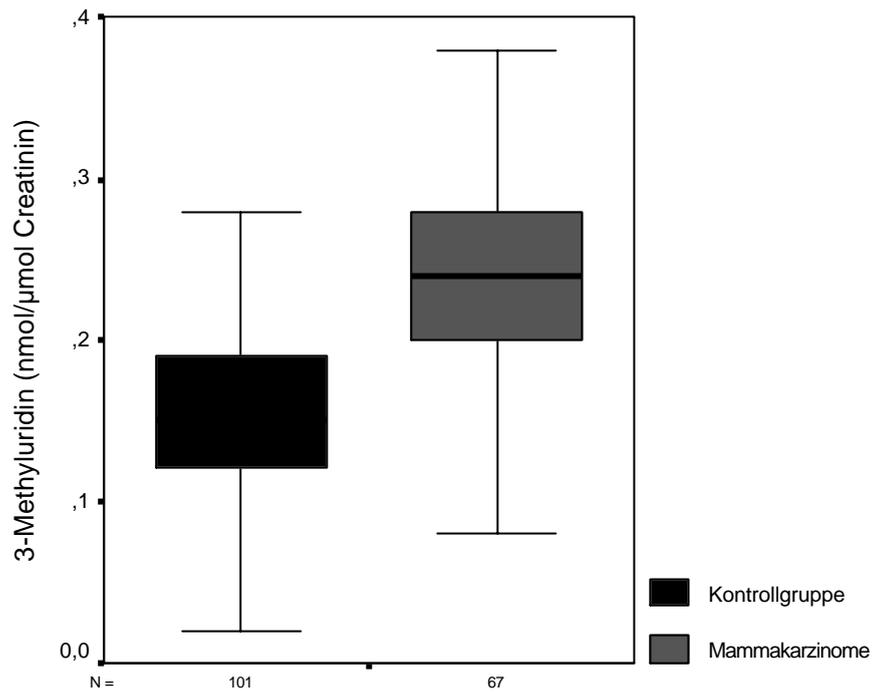


Abbildung 19: Nucleosidkonzentration von 3-Methyluridin in der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe

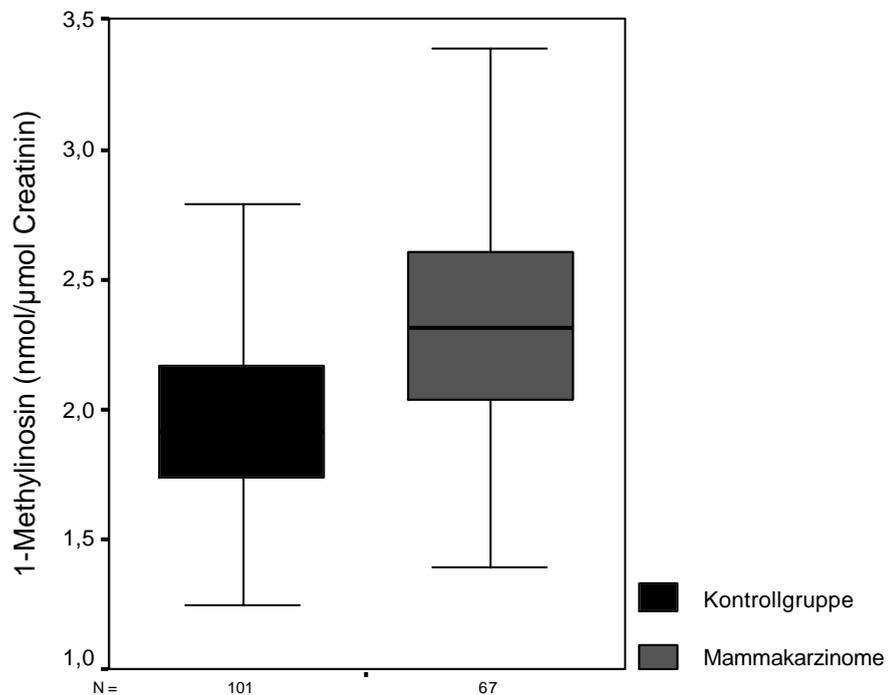


Abbildung 20: Nucleosidkonzentration von 1-Methylinosin in der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe

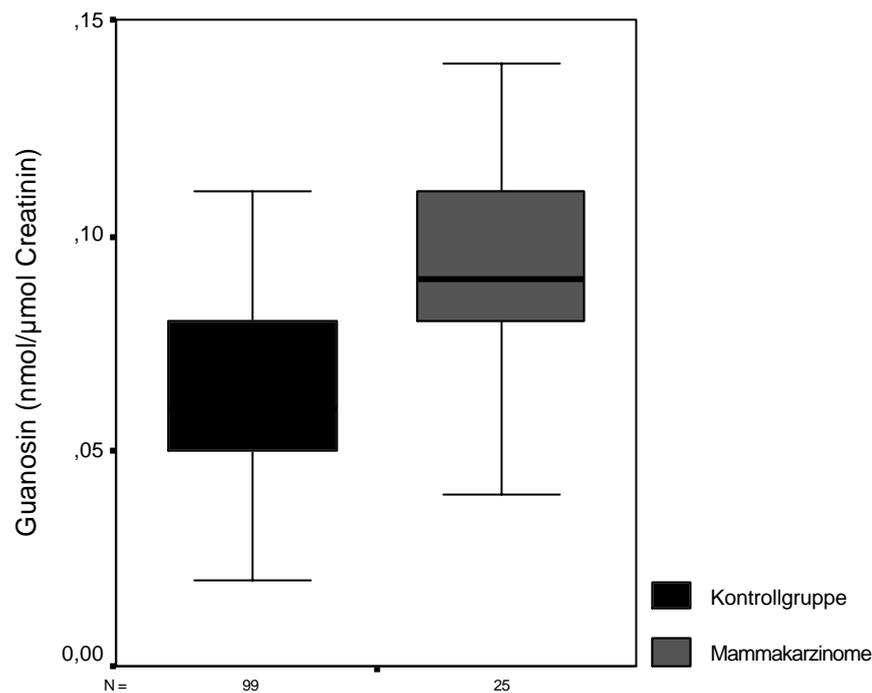


Abbildung 21: Nucleosidkonzentration von Guanosin in der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe

Bei den 7 anderen zur statistischen Auswertung herangezogenen Nucleosiden Cytidin, Uridin, 1-Methyadenosin, Xanthosin, 1-Methylguanosin, 2-Methylguanosin und Adenosin konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Nucleosidkonzentrationen beider Gruppen ermittelt werden. Meist liegen die jeweiligen Nucleosidkonzentrationen in beiden Gruppen eng beieinander, wobei im Falle von Adenosin eher eine gegenteilige Tendenz in der Form zu erkennen ist, dass die Konzentrationen in der Kontrollgruppe höher als in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen sind.

Um die beiden voneinander abhängigen Größen Spezifität und Sensitivität bei den genannten fünf statistisch relevanten Nucleosiden zu veranschaulichen, sind die jeweiligen ROC-Kurven (ROC = Receiver Operator Characteristic) in einem Schaubild dargestellt (Abbildung 22). Je näher die Kurven im linken oberen Abschnitt verlaufen, umso besser ist die Aussagekraft des entsprechenden Nucleosids: Einer hoch gewählten Spezifität ist eine hohe Sensitivität zugeord-

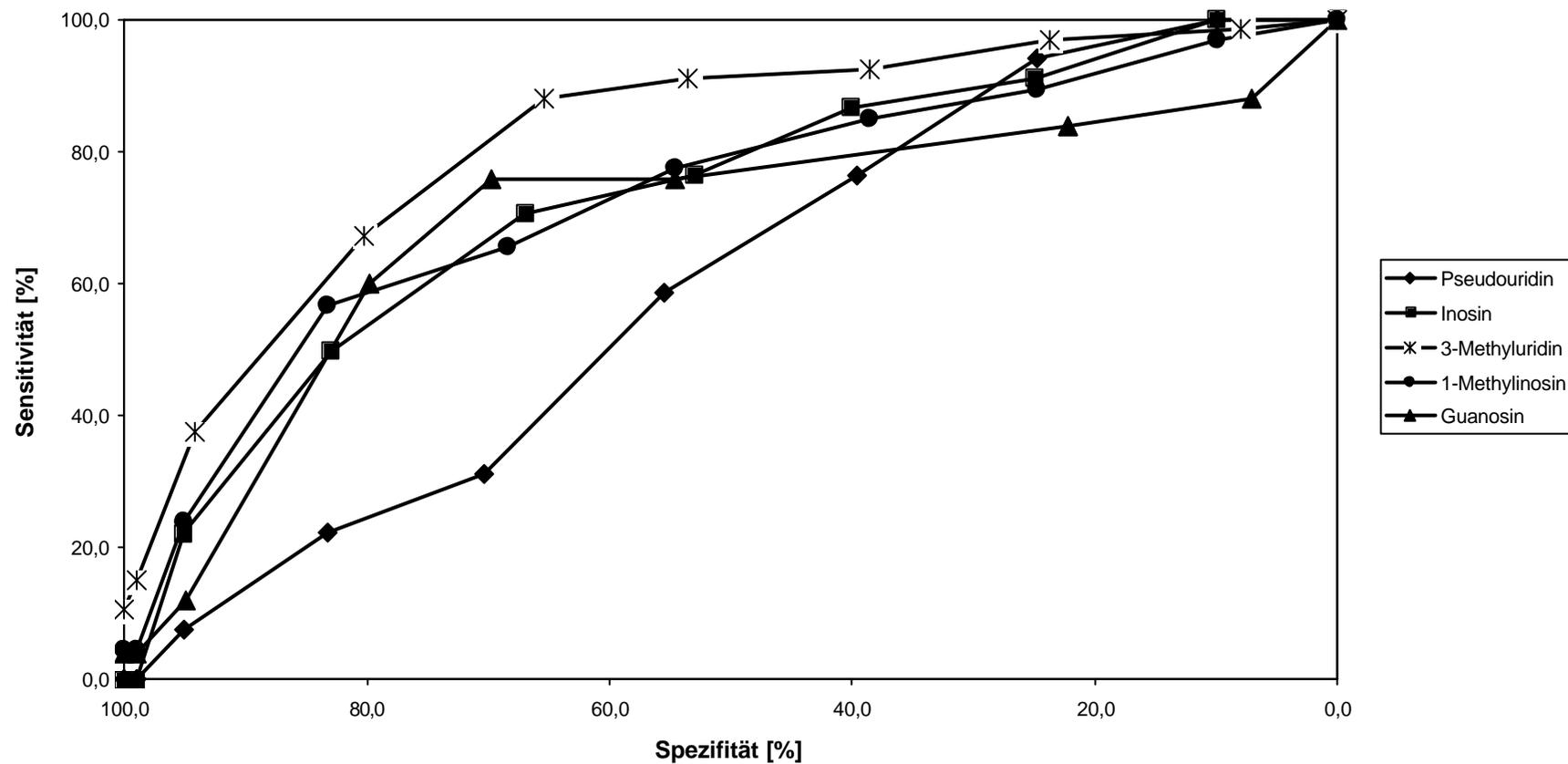


Abbildung 22: ROC-Kurven der einzelnen Nucleoside

---

net und entsprechend gut kann ein Messwert als normal oder pathologisch klassifiziert werden.

Wählt man bei den fünf statistisch relevanten Nucleosiden eine Spezifität im Bereich von 95%, so ergeben sich folgende Paarungen:

- Pseudouridin: Spezifität 95,0% ? Sensitivität 7,4%
- Inosin: Spezifität 95,0% ? Sensitivität 22,1%
- 3-Methyluridin: Spezifität 94,1% ? Sensitivität 37,3%
- 1-Methylinosin: Spezifität 95,0% ? Sensitivität 23,9%
- Guanosin: Spezifität 94,9% ? Sensitivität 12,0%

Errechnet man in der Kontrollgruppe bei allen der 12 betrachteten Nucleoside die Werte der jeweiligen Konzentrationen für die 50., 75., 83. und 95. Perzentile und bestimmt anhand derer in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen die Verteilung der Werte der Nucleosidkonzentrationen, so ergibt sich folgendes Bild (Tabelle 20):

Tabelle 20: Anzahl der Fälle in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen in den jeweiligen Perzentilenbereichen, aufgeschlüsselt nach Nucleosiden. Die für die Einteilung ausschlaggebenden Nucleosidkonzentrationen wurden mittels der Kontrollgruppe bestimmt.

	Anzahl der Fälle in der Gruppe der Mamma-Ca-Patientinnen mit Konzentrationen im jeweiligen Perzentilenbereich:					gesamt
	<50%	>50%	>75%	>83%	>95%	
<b>Pseu</b>	23	45	19	15	5	68
<b>C</b>	26	38	27	14	6	64
<b>U</b>	31	36	10	7	1	67
<b>M1A</b>	31	37	12	5	4	68
<b>I</b>	15	53	48	34	15	68
<b>G</b>	4	21	19	15	3	25
<b>X</b>	37	30	13	6	4	67
<b>M3U</b>	6	61	56	45	25	67
<b>M1I</b>	14	53	41	38	16	67
<b>M1G</b>	26	41	26	16	6	67
<b>M2G</b>	27	40	26	14	8	67
<b>A</b>	41	27	16	16	5	68

Anhand dieser Tabelle kann so für jedes Nucleosid abgelesen werden, wie sich die Fälle aus der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe verteilen. Umso größer die Fallzahlen im Bereich oberhalb der 95. Perzentile (relativ zur Gesamtzahl), desto stärker ist die Aussagekraft des jeweiligen Nucleosids. Den Werten ist anzumerken, dass die geringe Fallzahl bei Guanosin durch eine mangelhafte Abtrennung des Guanosin-Peaks in den Chromatogrammen der Patientinnengruppe in mehreren Fällen bedingt ist.

Bezüglich der Korrelation der Nucleoside untereinander, d.h. welche Nucleosidpaare in ihrer Konzentration in gleicher Richtung statistisch (hoch-) signifikant verändert sind, stellt man beim Vergleich der Kontroll- und der Mammakarzinomgruppe fest, dass manche Paarungen wie beispielsweise Pseudouridin mit 3-Methyluridin, 1-Methylinosin mit 1-Methylguanosen oder 1-Methylguanosen mit

2-Methylguanosen sowohl bei der Kontroll- auch bei der Mammakarzinomgruppe hochsignifikant miteinander korrelieren, dass jedoch andererseits zum Beispiel 1-Methylinosin und 2-Methylguanosen nur in der Kontrollgruppe oder Guanosen mit 1-Methylguanosen nur in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen hochsignifikant korrelieren.

Insgesamt sind 32 hochsignifikante Korrelationen zwischen Nucleosidkonzentrationen bei denselben Paarungen in beiden Gruppen zu beobachten, 24 hochsignifikante Korrelationen lediglich in der Kontrollgruppe und 8 hochsignifikante Korrelationen nur in der Mammakarzinomgruppe.

### **3.3.2 Auswertung der Daten durch das Neuronale Netz**

Die Auswertung der Daten mittels ANN erfolgte am Institut für physikalische Chemie der Universität Tübingen durch Herrn Dr. Frank Dieterle. In das Neuronale Netz gingen ebenfalls die Daten von 169 Probanden ein, wobei hier von den 15 Nucleosiden nur 11 berücksichtigt wurden, da neben dem Wegfall von 5-Methyluridin, 6-Methyladenosin und Methylthioadenosin aufgrund oben genannter Gründe auch Guanosen, das in den Urinproben der Mammakarzinompatientinnen wegen fehlender Abtrennung in den Chromatogrammen nur in 25 von 68 Fällen bestimmt werden konnte, durch die zu geringe Fallzahl nicht mit aufgenommen werden konnte.

Im Gegensatz zur Auswertung mittels des Statistikprogramms SPSS, bei dem die einzelnen Nucleoside isoliert beurteilt wurden, evaluierte das eingesetzte Neuronale Netz das gesamte Nucleosidprofil.

Unter Verwendung der jeweils 11 Nucleosidkonzentrationen von 101 gesunden Probanden und 68 Mammakarzinompatientinnen wurden so mittels ANN eine Spezifität von 83,4% und eine Sensitivität von 73,5% errechnet.

### **3.3.3 Vergleich der Spezifitäten und Sensitivitäten der einzelnen Nucleoside und der ANN-Auswertung sowie der Tumormarker CA 15-3 und CEA**

Um zu zeigen, dass sich die Spezifität und Sensitivität der einzelnen Nucleoside verglichen mit der Spezifität und Sensitivität des gesamten Nucleosidprofils, welche unter Einsatz des Neuronalen Netzwerks ermittelt wurde, deutlich unterscheiden, obwohl beinahe identische Datensätze verwendet wurden (Ausnahme: Wegfall der Guanosinkonzentration beim ANN), sollen diese Zahlen einander gegenübergestellt werden. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurde bei den einzelnen Nucleosiden zusätzlich zur Spezifität im Bereich von 95% eine Spezifität um 83% mit entsprechender Sensitivität gewählt, da bei Einsatz des Neuronalen Netzes eine Spezifität von 83,4% errechnet wurde. Darüber hinaus sind die Sensitivitäten der beiden Tumormarker CA 15-3 und CEA, welche bei den an der Studie teilnehmenden Mammakarzinompatientinnen erfasst wurden, aufgeführt, wobei hier nur 62 Fälle eingingen, da in sechs Fällen keine Werte für diese beiden Marker vorlagen. Eine Aussage bezüglich der Spezifität kann nicht gemacht werden, da diese Marker beim gesunden Kollektiv nicht bestimmt wurden. Des Weiteren sind die Literaturwerte (48) der Spezifität und Sensitivität für CA 15-3 in Tumorstadium T1 und T2, zu welchen ein Großteil der Tumoren aus der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen zählen, in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Spezifitäten und Sensitivitäten der einzelnen Nucleoside, des durch das ANN ausgewerteten Nucleosidprofils und von CA 15-3 und CEA

	<b>Spezifität</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Sensitivität</b>
<b>Pseu</b>	95,0%	7,4%	83,2%	22,1%
<b>I</b>	95,0%	22,1%	83,0%	50,0%
<b>M3U</b>	94,1%	37,3%	80,2%	67,2%
<b>M1I</b>	95,0%	23,9%	83,2%	56,7%
<b>G</b>	94,9%	12,0%	79,8%	60,0%
<b>ANN</b>			83,4%	73,5%
<b>CA 15-3</b> <i>(Literatur [48] / T1-T2)</i>	95,0%	14-23%		
<b>CA 15-3</b> <i>(eigene Studie)</i>	nicht be- kannt	8,1%		
<b>CEA</b> <i>(eigene Studie)</i>	nicht be- kannt	9,7%		
<b>CA 15-3 und/oder CEA</b> <i>(eigene Studie)</i>	nicht be- kannt	14,5%		

## **4. Diskussion**

In diesem Kapitel soll zum einen auf die Qualität der Methode, überprüft anhand der verschiedenen Bestandteile der Validierung, eingegangen werden und zum anderen werden die Ergebnisse von Spezifität und Sensitivität der einzelnen Nucleoside sowie des gesamten Nucleosidmusters, wofür das ANN eingesetzt wurde, diskutiert. Abschließend wird die Relevanz der Nucleoside als Tumormarker hinterfragt.

### **4.1 Validierung der Methode**

In diesem Abschnitt wird zunächst die anhand der Punkte apparative Reproduzierbarkeit, Reproduzierbarkeit des gesamten Ansatzes, Linearität des Messbereichs und untere Nachweisgrenzen Validität und analytische Präzision beurteilt. Als wichtige Anmerkung soll vorausgeschickt werden, dass in keinem Fall eine Beurteilung des modifizierten Nucleosids 5-Methyluridin erfolgte, da die Substanz in keiner der untersuchten Urinproben nachgewiesen werden konnte und lediglich in den Chromatogrammen der Eichlösungen – hier artifiziell zugegeben – dargestellt werden konnte. Berücksichtigt wurden daher nur die 14 Nucleoside Pseudouridin, Cytidin, Uridin, 1-Methyladenosin, Adenosin, Guanosin, Xanthosin, 3-Methyluridin, 1-Methylinosin, 1-Methylguanosin, 2-Methylguanosin, Adenosin, 6-Methyladenosin, 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin, wobei die beiden zuletzt genannten Substanzen von untergeordnetem Interesse sind, da eine eindeutige Identifikation in den meisten erhaltenen Chromatogrammen nicht möglich ist und sie daher bei der Auswertung letztendlich nicht berücksichtigt wurden.

#### **4.1.1 Apparative Reproduzierbarkeit**

Zur Beurteilung der apparativen Reproduzierbarkeit, welche durch zehnmalsiges Einspritzen derselben, einmalig aufgearbeiteten Urinprobe getestet wurde, wer-

den zum einen die Variationskoeffizienten der Konzentrationen der einzelnen Nucleoside, zum anderen die Variationskoeffizienten der jeweiligen Retentionszeiten begutachtet.

Die Variationskoeffizienten der Nucleosidkonzentrationen (siehe Tabelle 6 in Kapitel 3.2.1) liegen bis auf G (9,97%), X (4,73%), M6A (5,76%) und MTA (8,03%) alle im unteren einstelligen Prozentbereich (< 3%). Den etwas höheren Werten von Xanthosin und vor allem von Guanosin ist jedoch anzumerken, dass in den zehn Chromatogrammen, welche zur Testung auf apparative Reproduzierbarkeit herangezogen wurden, der Peak einer unbekannt Substanz, zwischen den Peaks von Guanosin und Xanthosin liegend, von relativ großer Fläche ist und dadurch die genaue Abtrennung der beiden Substanzen stört, was sich letztendlich in etwas schlechteren Werten bezüglich beider Variationskoeffizienten ausdrückt. Die leicht erhöhten Werte der Variationskoeffizienten von 6-Methyladenosin und 5'-Deoxy'-5-methylthioadenosin sind von untergeordneter Bedeutung, da sie aufgrund oben genannter Gründe bei der Auswertung letztendlich nicht berücksichtigt wurden.

Die erhaltenen Werte der Variationskoeffizienten der Retentionszeiten (siehe Tabelle 7 in Kapitel 3.2.1) liegen bei allen Nucleosiden unter 2 Prozent und sind daher deutlich von ausreichender Qualität.

Insgesamt fällt die Beurteilung der apparativen Reproduzierbarkeit unter Berücksichtigung der genannten Punkte sehr zufriedenstellend aus.

#### **4.1.2 Reproduzierbarkeit des gesamten Probenansatzes**

Erwartungsgemäß fallen die Ergebnisse bei der Testung auf die Reproduzierbarkeit des gesamten Ansatzes, welche durch achtmaliges Aufarbeiten derselben Urinprobe und anschließendes Messen der acht erhaltenen Eluate am HPLC-Gerät durchgeführt wurde, etwas schlechter aus als bei der Testung der HPLC-Messung allein (apparative Reproduzierbarkeit), da hier zwei aufeinander

derfolgende Schritte das Ergebnis beeinflussen. Ebenfalls sind die Variationskoeffizienten von Guanosin (15,47%) und Xanthosin (9,92%) aufgrund eines relativ großen unbekanntes Peaks zwischen beiden Substanzen und infolgedessen schlechterer Abtrennung von etwas geringerer Qualität. Des Weiteren sind die Variationskoeffizienten von 6-Methyladenosin (12,68%) und 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin (25,34%) relativ hoch, wobei die Werte beider Substanzen aufgrund des Wegfalls bei der Auswertung von geringem Interesse sind.

Ansonsten liegen die Variationskoeffizienten der übrigen Nucleoside (siehe Tabelle 8 in Kapitel 3.2.2) alle unter der Acht-Prozent-Marke und somit sind insgesamt die Ergebnisse bei der Prüfung auf Reproduzierbarkeit des gesamten Ansatzes von zufriedenstellender Qualität.

### **4.1.3 Linearitätskontrolle des Messbereichs**

Die Ergebnisse der Linearitätskontrolle des Messbereichs, für deren Beurteilung die quadrierten Korrelationskoeffizienten  $R^2$  oder die Bestimmtheitsmaße B der Kalibriergeraden der einzelnen Nucleoside herangezogen werden, liegen bis auf die etwas niedrigeren Werte von Xanthosin ( $R^2 = 0,8959$ ) und 3-Methyluridin ( $R^2=0,9667$ ) alle knapp unterhalb des Idealwertes von 1 (siehe Tabelle 9 in Kapitel 3.2.3). Da die für die Kalibrierung der Anlage verwendeten vier Eichlösungen in ihren Konzentrationen so gewählt sind, dass sie den für die Bestimmung der Nucleoside in den Urinproben benötigten Messbereich abdecken, kann – mit gewisser Einschränkung für Xanthosin – von einer in jedem Fall ausreichenden Linearität des Messbereichs ausgegangen werden.

### **4.1.4 Untere Nachweisgrenzen**

Die Werte der unteren Nachweisgrenzen, welche durch Einsatz des Rechengangs „dreimal die Fläche eines Peaks im Grundrauschen, dividiert durch die Fläche des Peaks des Internen Standards, multipliziert mit der Steigung der jeweiligen Kalibriergeraden“ erhalten wurden, ergaben für alle Nucleoside Wer-

te  $< 0,09$  nmol Nucleosid / ml Urin (Tabelle 10 in Kapitel 3.2.4). Diese Empfindlichkeit reicht bei weitem für die durchgeführten Messungen aus.

Insgesamt kann die Güte der anhand der Kriterien apparative Reproduzierbarkeit, Reproduzierbarkeit des gesamten Probenansatzes, Linearität des Messbereichs und untere Nachweisgrenzen beurteilten Validität der Methode als deutlich den Ansprüchen genügend beurteilt werden sowie von einer zufriedenstellenden analytischen Präzision ausgegangen werden.

## 4.2 Auswertung der Daten mittels klassischer Statistik und ANN

Im zweiten Teil dieses Kapitels werden die Ergebnisse beurteilt, welche einerseits durch herkömmliche statistische Methoden und andererseits durch Einsatz eines Neuronalen Netzes erhalten wurden.

Zuvor soll noch auf die Art der Probensammlung eingegangen werden, welche sich dadurch auszeichnete, dass Spontanurin gesammelt wurde und nicht 24-Stunden-Urin. Es wurde gezeigt, dass der Einsatz von 24-Stunden-Urin, dessen Sammlung für Probanden recht aufwendig und zudem fehlerbehaftet ist, nicht notwendig ist, wenn bei der Verwendung von Spontanurin die gemessenen Nucleosidlevel auf die jeweiligen Konzentrationen an Kreatinin, welches normalerweise in relativ konstanter Weise während einer Zeitspanne von 24 Stunden in den Urin ausgeschieden wird, bezogen werden. Sowohl in 24-Stunden-Urinen als auch in Spontanurinen wurden die Kreatinin-normalisierten Nucleosidlevel für identisch befunden (25).

Auch die Bestimmung der Nucleoside im Serum, wie bereits in einigen Studien durchgeführt, wäre möglich gewesen, wobei natürlich die Abgabe lediglich einer Urin- anstelle einer Blutprobe für Probanden deutlich angenehmer ist. Darüber hinaus geben die Urinexkretionswerte einen besseren Überblick über die metabolische Situation, verglichen mit den Serumwerten. Da normalerweise zudem höhere Konzentrationen an modifizierten Nucleosiden im Urin gefunden werden, kann eine bessere analytische Präzision erwartet werden. Aus diesen

Gründen werden die meisten Studien über modifizierte Nucleoside unter Einsatz von Urin durchgeführt (110).

Bei der durchgeführten Studie wurde darauf geachtet, dass die gesunden Probanden zur Zeit der Urinabgabe – neben dem Fehlen maligner Erkrankungen, auch in der Vorgeschichte – weder an aktuellen Infektionen oder (chronischen) Erkrankungen litten und dass keine Schwangerschaft vorlag. Dadurch sollte eine eventuelle Einflussnahme auf den RNA-Metabolismus und infolgedessen auf die Konzentrationen der Nucleoside im Urin verhindert werden, da der RNA-Umsatz relativ gut mit dem Proteinmetabolismus des gesamten Körpers korrelieren soll (81), was auch erklärt, warum bei zahlreichen katabolen, nicht durch maligne Geschehnisse bedingten Zuständen auf Änderungen der Spiegel der modifizierten Nucleoside geachtet werden sollte, wie beispielsweise bei Mangelernährung, kardialer Kachexie, endokrine Anomalien, Alkoholismus und Stress.

Auch sollten in einem gewissen Zeitraum vor der Probensammlung keine Operationen – egal welcher Kausalität – durchgeführt worden sein, da beispielsweise in einer Studie von Marway et al. die Pseudouridinexkretion bei Patienten erhöht war, die sich aufgrund verschiedener nichtmaligner Erkrankungen größeren Operationen unterzogen hatten (57). Die Erhöhung resultiert aus einem angestiegenen RNA-Umsatz des gesamten Körpers in Zusammenhang mit durch die Operation bedingten Stress und weiter fortlaufendem Katabolismus (52).

Des Weiteren war eine einwandfreie Funktion der Nieren eine Bedingung für die Aufnahme in die Kontrollgruppe, um so eine Beeinflussung der Nucleosidlevel im Urin zu vermeiden.

### **4.2.1 Klassische statistische Auswertung der erhaltenen Daten**

Für die klassische Auswertung – womit v.a. die Betrachtung bzw. Gegenüberstellung der einzelnen Nucleosidgruppen (gesunde Probanden vs. Mammakarzinompatientinnen) mittels des Statistikprogramms SPSS gemeint ist – wurden von den ursprünglich 15 Nucleosiden 12 herangezogen. 5-Methyluridin, 6-Methyladenosin und 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin wurden aufgrund bereits

erläuterter Gründe nicht in die Auswertung mit einbezogen. Insgesamt wurden die Daten von 169 Personen – 101 gesunde und 68 kranke Probandinnen – verwendet. So ging eine recht große Anzahl von Daten in die Untersuchung ein, wobei eine etwas größere Fallzahl der Mammakarzinompatientinnen, ähnlich der Probandenzahl der Kontrollgruppe, wünschenswert gewesen wäre, was jedoch im Zeitraum der Probensammlung leider nicht möglich war.

Um einen Einfluss des Alters auf die Nucleosidekonzentrationen zu prüfen, wurde die Kontrollgruppe in zwei Klassen – 15 bis 44 und 45 bis 78 Jahre – eingeteilt und durch einen Mann-Whitney-U-Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Altersgruppen gefunden. Somit kann bei den Untersuchten ein Einfluss der unterschiedlichen Altersverteilung in der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe auf die Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden.

Bei der Untersuchung auf Unterschiede bezüglich der Konzentrationen der 12 in die Auswertung eingegangenen Nucleoside in der Kontroll- gegenüber der Mammakarzinompatientinnengruppe sind die Konzentrationen von Pseudouridin, Inosin, 3-Methyluridin, 1-Methylinosin und Guanosin statistisch signifikant in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen erhöht. Auch in einer anderen Studie, in welcher Urine von an Brustkrebs erkrankten Frauen auf modifizierte und nichtmodifizierte Nucleoside untersucht wurden, waren u.a. diese Nucleosidkonzentrationen signifikant erhöht (signifikante Erhöhung: Werte größer als der jeweilige Durchschnitt plus zwei Standardabweichungen, bestimmt in Urin von gesunden Kontrollpersonen) (109). Darüber hinaus fanden sich in weiteren Studien, in welchen Urin von an unterschiedlichen malignen Erkrankungen leidenden Patienten auf Nucleoside untersucht wurde, signifikante Erhöhungen verschiedener Nucleoside, darunter ebenfalls Pseudouridin, Inosin, 1-Methylinosin und Guanosin (108) sowie Pseudouridin und 1-Methylinosin (51, 52).

Vor allem das modifizierte Nucleosid Pseudouridin wurde in zahlreichen Studien bei verschiedenen Krebserkrankungen im Urin als erhöht beschrieben, darunter

Leukämien (29, 33, 34, 41), maligne Lymphome (65, 77), Nasopharynxkarzinome (102), kleinzellige Lungenkarzinome (97, 106), Ösophaguskarzinome (58), kolorektale Karzinome (25, 38) und Brustkrebs (82, 109). In einigen dieser eben genannten Studien wurde die Erhöhung auch anderer modifizierter Nucleoside beschrieben, darunter das auch in der vorliegenden Arbeit erhöhte Nucleosid 1-Methylinosin (25, 33, 34, 38, 82, 102, 106, 109).

In der vorliegenden Studie können bei den anderen sieben Nucleosiden, welche in die Auswertung eingingen, keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Mammakarziomgruppe festgestellt werden. Interessant ist zudem die Tatsache, dass beim nichtmodifizierten Nucleosid Adenosin tendenziell höhere Konzentrationen in der Kontrollgruppe als in der Patientengruppe zu beobachten sind, wobei dieser Unterschied nicht signifikant ist.

Bei der Darstellung der gegenseitig voneinander abhängigen Sensitivitäten und Spezifitäten der fünf genannten Nucleoside mittels ROC-Kurven (Abbildung 22 in Kapitel 3.3) zeigt die Kurve von 3-Methyluridin den besten Verlauf – von den dargestellten Kurven liegt sie dem oberen linken Quadranten am nächsten – und die von Pseudouridin den ungünstigsten. Die Kurven der übrigen Nucleoside – Inosin, 1-Methylinosin und Guanosin – verlaufen relativ nahe beieinander. So erschließt sich aus diesem Schaubild, dass bei der Einzelbetrachtung der Nucleoside 3-Methyluridin von den fünf signifikanten Nucleosiden die besten Voraussetzungen für den Einsatz als Tumormarker mit sich bringt. Dies spiegelt sich auch in den Zahlenwerten wider: Bei einer gesetzten Spezifität im Bereich von 95% – wobei dieser Schwellenwert recht sinnvoll ist, da ein wichtiger Anspruch an einen Tumormarker ist, die Anzahl der falsch positiven Fälle möglichst gering zu halten – ergibt sich bei 3-Methyluridin eine Sensitivität von 37,3% (bei einer Spezifität von 94,1%) und beim Pseudouridin bei einer Spezifität von 95,0% lediglich 7,4%, während sich die Werte der drei anderen Nucleoside dazwischen bewegen.

Bei einer anderen Form der Veranschaulichung der Güte der Nucleoside als Tumormarker mittels Absolutzahlen (Tabelle 20 in Kapitel 3.3), wobei anhand der Kontrollgruppe die Werte der Konzentrationen der jeweiligen Nucleoside für

die 50, 75, 83 und 95 Prozent-Perzentile berechnet (die 83 Prozent-Perzentile wurde aufgrund der sich im Neuronalen Netz ergebenden Spezifität von 83,4% zur besseren Vergleichbarkeit einbezogen) und in der Gruppe der Brustkrebspatientinnen die Fälle entsprechend den jeweiligen Bereichen zugeordnet wurden und ein möglichst großer Anteil der Fälle im Bereich über der 95. Perzentile liegen sollte, liefert ebenfalls das modifizierte Nucleosid 3-Methyluridin die besten Ergebnisse: Von 67 erfassten Fällen liegen 25 im Bereich oberhalb der 95 Prozent-Grenze, wohingegen bei Pseudouridin von 68 Fällen lediglich fünf in diesem Bereich liegen. Betrachtet man die sich ergebenden Werte anderer in die Auswertung eingegangener Nucleoside, bei welchen sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Konzentrationen zwischen beiden Gruppen ergab, so zeigt sich beispielsweise beim nichtmodifizierten Nucleosid Uridin, dass lediglich einer von 67 Fällen im Bereich oberhalb der 95. Perzentile liegt. So kann anhand dieser Tabelle in manchen Fällen recht gut nachvollzogen werden, warum sich beim Vergleich der Nucleosidkonzentrationen teilweise keine signifikante Erhöhung in der Mammakarzinomgruppe ergab. Des Weiteren ist bei Adenosin die oben beschriebene Tendenz, dass die Konzentrationen eher in der Kontrollgruppe höher liegen, in der Form zu erkennen, dass von 68 Fällen 41 unterhalb der 50. Perzentile und entsprechend 27 Fälle darüber liegen. Auch bei Xanthosin liegen 37 gegenüber 30 Fällen unterhalb dieser Grenze. Bei den anderen zehn in die Auswertung eingegangenen Nucleosiden stellt sich dieser Sachverhalt jedoch umgekehrt dar, d.h. eine größere Anzahl von Fällen liegt oberhalb der 50. Perzentile. Zwar kommt den statistisch signifikanten Ergebnissen die größte Bedeutung zu, wobei auch ein zu beobachtender Trend von gewisser Relevanz ist.

Beim Vergleich der Korrelationen der Nucleoside untereinander, also der Testung, bei welchen der Nucleosidpaarungen die jeweiligen Konzentrationen statistisch signifikant in gleicher Richtung verändert sind, ist zu erkennen, dass es Paarungen gibt, welche in beiden Gruppen hochsignifikant miteinander korrelieren (32 Paarungen), dass jedoch auch einige Korrelationen nur in der Kontrollgruppe (24 Paarungen) bzw. andere nur in der Mammakarzinomgruppe (8 Paa-

rungen) hochsignifikant miteinander korrelieren. Diese Tatsache kann als Hinweis darauf betrachtet werden, dass weniger die einzelnen Nucleosidkonzentrationen als vielmehr das gesamte Muster ausschlaggebend für die Entscheidung ist, welcher Gruppe – gesunde Probandinnen oder Mammakarzinompatientinnen – der untersuchte Urin zuzuordnen ist. Diesem Betrachten des kompletten Nucleosidmusters wird bei der Auswertung der Daten durch das ANN letztendlich Rechnung getragen.

### **4.2.2 Auswertung der Daten durch das Neuronale Netz**

Im Unterschied zur Auswertung der Daten mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS, bei welchem die Nucleoside einzeln betrachtet wurden, ging in das ANN jeweils das gesamte Nucleosidmuster einer Messung ein und wurde so in seiner Gesamtheit betrachtet. In das Artificial Neural Network gingen ebenfalls die Daten von 169 Probanden ein, wobei statt der 12 bei der Einzelauswertung eingesetzten Nucleoside nur 11 eingingen, da neben 5-Methyluridin, 6-Methyladenosin und 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin aus bereits genannten Ursachen auch Guanosin aufgrund einer Abtrennung der Peaks in nur 25 von 68 Chromatogrammen der Mammakarzinomgruppe und dadurch zu geringer Fallzahl für den Einsatz im Neuronalen Netz wegfiel.

Die errechnete Spezifität von 83,4% und Sensitivität von 73,5% zeigen, von welcher Bedeutung die Betrachtung des gesamten Nucleosidprofils und nicht nur der einzelnen Nucleoside zu sein scheint: Der Einsatz von Methoden, welche die Gesamtheit des Nucleosidmusters berücksichtigen, kann offensichtlich mehr Informationen über die Unterschiede zwischen Gesunden und Krebspatienten aufdecken als lediglich die Betrachtung der einzelnen Substanzen.

Neben dem Einsatz Neuronaler Netze für derartige Fragestellungen, angewandt beispielsweise in einer Studie von Zhao et al. (112), bei welcher die Urine von 24 gesunden Probanden und 25 Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen bezüglich der Nucleoside als potenzielle Tumormarker untersucht wurden und sich eine Wiedererkennungsrate von 85% ergab, kann auch die

Faktorenanalyse angewandt werden, um das gesamte Nucleosidprofil für die Entscheidung zu nutzen, ob der Urin eines gesunden oder an einem malignen Geschehen leidenden Individuums vorliegt. So wurde die Methode der Faktorenanalyse in einer Studie von Xu et al. zur Unterscheidung zwischen 17 Mammakarzinompatientinnen sowie 18 gesunden Probanden eingesetzt, bei welcher eine klare Cut-Differenzierung der Brustkrebs- von der Kontrollgruppe in zwei Cluster ohne Überlappung erhalten wurde (109).

#### **4.2.3 Vergleich der Spezifitäten und Sensitivitäten der einzelnen Nucleoside und der ANN-Auswertung sowie der Tumormarker CA 15-3 und CEA**

Bei der Gegenüberstellung der Spezifitäten und Sensitivitäten von einerseits dem Neuronalen Netz und andererseits der fünf statistisch signifikanten Nucleoside Pseudouridin, Inosin, Guanosin, 3-Methyluridin und 1-Methylinosin zeigt sich bei einer Spezifität um 83%, dass das ANN den besten Wert für die Sensitivität – 73,5% bei einer Spezifität von 83,4% – liefert. Die Werte der Einzelnucleoside schwanken zwischen der Sensitivität von 22,1% (Pseudouridin, Spezifität: 83,2%) und 67,2% (3-Methyluridin, Spezifität: 80,2%). Ein Vergleich ist jedoch nur bei diesem Wert der Spezifität – und nicht bei dem üblichen Wert von 95% – möglich, da das Neuronale Netz diese beide Werte unabhängig voneinander liefert: Sowohl von den gesunden Probandinnen als auch von den Mammakarzinompatientinnen wird jeweils ein gewisser Anteil der Urinproben korrekt klassifiziert, was dann die entsprechenden Ergebnisse für Spezifität und Sensitivität liefert.

Dennoch zeigt die direkte Gegenüberstellung dieser Daten die Bedeutung des kompletten Nucleosidmusters und es wird deutlich, welcher Informationsgehalt bezüglich der Unterscheidung von Gesunden und Krebspatienten darin enthalten zu sein scheint, was bereits von anderen Autoren postuliert wurde (52, 108, 109, 110).

Bezüglich des konventionellen, beim Mammakarzinom eingesetzten Tumormarkers CEA ist in der Literatur (48) eine Sensitivität von 14-23% bei einer Spezifität von 95,0% im Tumorstadium T1/T2 angegeben. Beim Kollektiv der Mammakarzinompatientinnen der Stadien T1 und T2 der durchgeführten Studie ergab sich für CEA eine Sensitivität von 9,7%, für CA 15-3 von 8,1% sowie für CEA und/oder CA 15-3 von 14,5%. Die Werte für die Spezifität sind hierbei jedoch nicht bekannt, da vom Kollektiv der gesunden Probandinnen keine Werte beider Tumormarker bekannt sind.

Die Sensitivitäten der einzelnen Nucleoside bei einer Spezifität um 95% reichen von 7,4% (Pseu), 12,0% (G), 22,1% (I), 23,9% (M1I) bis zu 37,3% (M3U) und zeichnen sich daher bei dieser Studie durch insgesamt bessere Werte bezüglich der Unterscheidung zwischen beiden Gruppen aus. Die besten Werte bezüglich der Spezifität und Sensitivität erhält man im vorliegenden Fall somit aus dem gesamten Nucleosidprofil durch Einsatz des Artificial Neural Network.

### **4.3 Bedeutung der Nucleoside als Tumormarker**

Es gibt sechs Gebiete klinischer Fragestellungen und Probleme, auf welchen Tumormarker Informationen beisteuern können (110):

1. Therapiekontrolle
2. Prognose
3. Differentialdiagnose von Tumorerkrankungen
4. Screening auf Tumorerkrankungen
5. Initiale Diagnose von Tumorerkrankungen
6. Tumorlokalisation

Bisher existieren im Grunde keine Tumormarker, welche auf all diesen Gebieten von Wert sind; meist liefern sie lediglich Informationen bezüglich Therapiekontrolle und Prognose. Daher besteht Interesse an zusätzlichen Tumormarkern mit diagnostischer Relevanz.

Auch die modifizierten Nucleoside zeigen unter Therapie bei Remissionen oder Rezidiven Änderungen ihrer Spiegel (33, 34, 41, 58, 106) und sehr hohe Spiegel der Nucleoside sind Anzeichen für eine schlechte Prognose (82).

Da die modifizierten Nucleoside bei vielen verschiedenen Krebsarten erhöhte Spiegel aufweisen und dadurch den erhöhten RNA-Metabolismus dieser Erkrankungen widerspiegeln, kann keine definitive Antwort darauf gegeben werden, von welcher zusätzlichen Relevanz diese Marker für spezifische Diagnosen sind: Sie haben kaum Tumor- oder Organspezifität oder Zellautonomie und können daher sicherlich nicht für die Tumorlokalisation eingesetzt werden (110).

In der durchgeführten Studie ergaben sich recht vielversprechende Ergebnisse bezüglich des Einsatzes von modifizierten als auch nichtmodifizierten Nucleosiden beim Mammakarzinom, verglichen mit der Spezifität und Sensitivität der herkömmlichen Tumormarker CA 15-3 und CEA. Vor allem der Betrachtung des gesamten Nucleosidprofils unter Einsatz des Neuronalen Netzes scheint eine größere Bedeutung zuzukommen, was durch weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet zu verifizieren ist.

## **5. Zusammenfassung**

Modifizierte Nucleoside, welche in der RNA posttranskriptionell durch zahlreiche Modifikationsenzyme entstehen, zirkulieren frei im Blut, werden in den Urin ausgeschieden und können dort nachgewiesen werden. Bei verschiedenen malignen Tumorerkrankungen wurden sie in abnorm hohen Konzentrationen im Urin nachgewiesen und daher als potenzielle Tumormarker vorgeschlagen.

Um zu untersuchen, inwiefern durch Bestimmung der Nucleosidlevel zwischen gesunden und an einem Mammakarzinom erkrankten Individuen unterschieden werden kann, wurden in der vorliegenden Arbeit die Urine (Spontanurin) von 101 gesunden Probandinnen im Alter zwischen 15 und 78 Jahren sowie von 68 präoperativen Mammakarzinompatientinnen der Tumorstadien Cis (8 Fälle), T1 (32 Fälle) und T2 (22 Fälle) sowie 6 Fällen unbekannter Stadien und der Gradingstadien G1, G2 und G3 bei den T1- und T2-Tumoren im Alter zwischen 34 und 83 Jahren auf ihre Nucleosidkonzentrationen untersucht.

Die Nucleoside wurden aus den Proben mittels Affinitätschromatographie unter Einsatz von Phenylboronsäure extrahiert und die Konzentrationen durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (reversed-phase high-performance liquid chromatography [RP-HPLC]) nach der Internen-Standard-Methode analysiert. Die auf die Kreatininkonzentrationen bezogenen Nucleosidlevel wurden zwischen der Kontroll- und der Mammakarzinomgruppe sowohl durch klassische statistische Verfahren als auch durch den Einsatz eines Neuronalen Netzes (Artificial Neural Network [ANN]) verglichen, wobei in erstgenannten auf statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Nucleoside überprüft wurde und mittels des ANN das gesamte Nucleosidprofil betrachtet wurde. Des Weiteren wurden die Werte der konventionellen Tumormarker beim Mammakarzinom CA 15-3 und CEA in der Gruppe der Brustkrebspatientinnen erfasst und mit den erhaltenen Daten bezüglich der Nucleoside verglichen.

Von den 12 in die klassische Auswertung eingegangenen Nucleosiden, darunter vier nichtmodifizierte (Adenosin [A], Cytidin [C], Guanosin [G], Uridin [U])

und acht verschiedenartig modifizierte (1-Methyladenosin [M1A], 3-Methyluridin [M3U], 1-Methylinosin [M1I], 1-Methylguanosen [M1G], 2-Methylguanosen [M2G], Pseudouridin [Pseu], Inosin [I] und Xanthosin [X]), war eine statistisch signifikante Erhöhung in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen bei Pseudouridin, Inosin, 3-Methyluridin, 1-Methylinosin sowie Guanosen – also vier modifizierten und einem nichtmodifizierten Nucleosid – zu beobachten. Bezüglich der Spezifität und Sensitivität ergaben sich für Pseudouridin bei einer Spezifität von 95,0% eine Sensitivität von 7,4%, für Inosin von 95,0% / 22,1%, für 3-Methyluridin von 94,1% / 37,3%, für 1-Methylinosin von 95,0% / 23,9% und für Guanosen von 94,9% / 12,0%.

In die Auswertung durch das Neuronale Netz, bei der die Nucleoside nicht nur einzeln betrachtet wurden, sondern in welcher das gesamte Muster Berücksichtigung fand, gingen bis auf Guanosen dieselben Nucleoside ein. Hierbei ergaben sich eine Spezifität von 83,4% sowie eine Sensitivität von 73,5%.

Für die herkömmlichen Tumormarker beim Mammakarzinom CA 15-3 und CEA ergab sich anhand der Werte aus der Gruppe der Brustkrebspatientinnen für die Tumorstadien T1 und T2 eine Sensitivität von 8,1% für CA 15-3, von 9,7% für CEA sowie von 14,5% für CA 15-3 und/oder CEA bei unbekannter Spezifität, da keine Werte der Tumormarker für das Kontrollkollektiv vorlagen.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls in die Richtung, dass bei malignen Erkrankungen, in diesem Fall beim Mammakarzinom, die Nucleosidspiegel, speziell die der modifizierten Nucleoside, im Urin erhöht sind. Vor allem scheinen nicht nur die einzelnen Nucleoside für sich, sondern deren gesamtes Muster von Bedeutung zu sein, was für den Einsatz eines ANN spricht. Ob der Einsatz von Nucleosiden als Tumormarker zukünftig bei Screening, Therapiekontrolle und Prognose des Mammakarzinoms sowie bei weiteren malignen Erkrankungen eine sinnvolle Option darstellt, ist durch weitere Studien zu untersuchen.

## **Literaturverzeichnis**

1. Outcomes of cancer treatment for technology assessment and cancer treatment guidelines. American Society of Clinical Oncology. (1996a)  
J. Clin. Oncol., 14, 671-679
2. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. (1996b)  
J. Clin. Oncol., 14, 2843-2877
3. Agris, P.F., Playl, T., Goldman, L., Horton, E., Woolverton, D., Setzer, D., Rodi, C. (1983)  
Processing of tRNA is accomplished by a high-molecular-weight enzyme complex.  
Recent Results Cancer Res., 84, 237-254
4. Amuro, Y., Nakaoka, H., Shimomura, S., Fujikura, M., Yamamoto, T., Tamura, S., Hada, T., Higashino, K. (1988)  
Serum pseudouridine as a biochemical marker in patients with hepatocellular carcinoma.  
Clin. Chim. Acta, 178, 151-158
5. Bartels, H., Böhmer, M., Heierli, C. (1972)  
Serum Kreatininbestimmung ohne Enteiweissen.  
Clin. Chim. Acta, 37, 193-197
6. Bast, R.C.Jr., Ravdin, P., Hayes, D.F., Bates, S., Fritsche, H.Jr., Jessup, J.M., Kemeny, N., Locker, G.Y., Mennel, R.G., Somerfield, M.R. (2001)  
2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology.  
J. Clin. Oncol., 19, 1865-1878
7. Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., Stanners, C.P. (1989)  
Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule.  
Cell, 57, 327-334
8. Björk, G.R., Ericson, J.U., Gustafsson, C.E., Hagervall, T.G., Jönsson, Y.H., Wikström, P.M., (1987)  
Transfer RNA modification.  
Ann. Rev. Biochem., 56, 263-287

9. Björk, G.R., Kohli, J. (1990)  
Synthesis and function of modified nucleosides, B13-B67  
in: Gehrke, C.W., Kuo, K.C.T.: Journal of Chromatography Library – volume 45B, Chromatography and Modification of Nucleosides, part B: biological roles and function of modification.  
1. Auflage, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo
10. Björk, G.R., Durand, J.M., Hagervall, T.G., Leipuviene, R., Lundgren, H.K., Nilsson, K., Chen, P., Qian, Q., Urbonavicius, J. (1999)  
Transfer RNA modification: influence on translational frameshifting and metabolism.  
FEBS Lett, 452, 47-51
11. Borek, E. (1971)  
Transfer RNA and transfer RNA modification in differentiation and neoplasia. Introduction.  
Cancer Res., 31, 596-597
12. Borek, E., Kerr, S.J. (1972)  
Atypical transfer RNAs and their origin in neoplastic cells.  
Adv. Cancer Res., 15, 163-190
13. Borek, E., Baliga, B.S., Gehrke, C.W., Kuo, C.W., Belman, S., Troll, W., Waalkes, T.P. (1977)  
High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue.  
Cancer Res., 37, 3362-3366
14. Borek, E., Sharma, O.K., Waalkes, T.P. (1983)  
New applications of urinary nucleoside markers.  
Recent Results Cancer Res., 84, 301-316
15. Borek, E. (1985)  
The morass of tumor markers.  
Trends Biochim. Sci., 10, 182-184
16. Braun, S., Kiechle, M., Harbeck, N. (2002)  
Mammakarzinom: Biologische Grundlagen, Klassifikation und prognostische Faktoren.  
Internist, 43, 329-339
17. Brewster, A., Helzlsouer, K. (2001)  
Breast cancer epidemiology, prevention and early detection.  
Curr. Opin. Oncol., 13, 420-425
18. Brown, T.A. (1999)  
Moderne Genetik.  
2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

19. Chan, D.W., Beveridge, R.A., Muss, H., Fritsche, H.A., Hortobagyi, G., Theriault, R., Kiang, D., Kennedy, B.J., Eveleigh, M. (1997)  
Use of Truquant BR radioimmunoassay for early detection of breast cancer recurrence in patients with stage II and stage III disease.  
*J. Clin. Oncol.*, 15, 2322-2328
20. Dayhoff, J.E., DeLeo, J.M. (2001)  
Artificial neural networks: opening the black box.  
*Cancer*, 91, 1615-1635
21. Dirheimer, G. (1983)  
Chemical nature, properties, location and physiological and pathological variations of modified nucleosides in tRNAs.  
*Recent Results Cancer Res.*, 84, 15-46
22. Divakar, K.J., Mottahedeh, M., Reese, C.B., Sanghvi, Y.S., Swift, K.A.D. (1991)  
Conversion of guanosine into isoguanosine and derivatives.  
*J. Chem. Soc. Perkin Trans*, 1, 771-774
23. Engel, J., Schubert-Fritschle, G., Hölzel, D. (2001)  
Epidemiologie, 1-8  
in: *Manual Mammakarzinome*  
Tumorzentrum München
24. Fischbein, A., Sharma, O.K., Selikoff, I.J., Borek, E. (1983)  
Urinary excretion of modified nucleosides in patients with malignant mesothelioma.  
*Cancer Res.*, 43, 2971-2974
25. Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Waalkes, T.P., Borek, E. (1979)  
Patterns of urinary excretion of modified nucleosides.  
*Cancer Res.*, 39, 1150-1153
26. Gehrke, C.W., Kuo, K.C. (1990)  
Chromatography and modification of nucleosides, Part C.  
Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo
27. Goldhirsch, A., Glick, J.H., Gelber, R.D., Coates, A.S., Senn, H.J. (2001)  
Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. Seventh international conference on adjuvant therapy of primary breast cancer.  
*J. Clin. Oncol.*, 19, 3817-3827

28. Goldman, L. (1987)  
Quantitative Aspekte der klinischen Problemlösung, 6-13  
in: Straub, P.W.: Harrison – Prinzipien der Inneren Medizin, Band 1;  
Übersetzung der 11. Auflage von „Harrison´s principles of internal  
medicine“  
Schwabe & Co.AG, Basel
29. Graf, N., Bach, K., Frisch, B., Haas, H.J., Sitzmann, F.C. (1989)  
Die klinische Bedeutung der Pseudouridinbestimmung im Urin von Kin-  
dern und Jugendlichen.  
Klin. Pädiatr., 201, 154-162
30. Green, C.J., Kammen, H.O., Penhoet, E.E. (1982)  
Purification and properties of mammalian tRNA pseudouridine synthase.  
J. Biol. Chem., 257, 3045-3052
31. Hagemeyer, E., Kemper, K., Boos, K.-S., Schlimme, E. (1984)  
Development of a chromatographic method for the quantitative determi-  
nation of minor ribonucleosides in physiological fluids.  
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22, 175-184
32. Heinemann, V. (2002)  
Chemotherapie und Immuntherapie des metastasierten Mammakarzi-  
noms.  
Internist, 43, 354-363
33. Heldman, D.A., Grever, M.R., Trewyn, R.W. (1983a)  
Differential excretion of modified nucleosides in adult acute leukemia.  
Blood, 61, 291-296
34. Heldman, D.A., Grever, M.R., Speicher, C.E., Trewyn, R.W. (1983b)  
Urinary excretion of modified nucleosides in chronic myelogenous leu-  
kemia.  
J. Lab. Clin. Med., 101, 783-792
35. Hilkens, J., Buijs, F., Hilgers, J., Hageman, P., Calafat, J., Sonnenberg,  
A., van der Valk, M. (1984)  
Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes de-  
tecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors.  
Int. J. Cancer., 34, 197-206
36. Hirai, H. (1977)  
A collaborative clinical study of carcinoembryonic antigen in Japan.  
Cancer Res., 37, 2267-2274

37. Hjalmarsson, K.J., Byström, A.S., Björk, G.R. (1983)  
Purification and characterization of transfer RNA (guanine-1) methyltransferase from *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem.*, 258, 1343-1351
38. Holstege, A., Pauw, M., Häring, R., Kirchner, R., Pausch, J., Gerok, W. (1986)  
Die Wertigkeit einer erhöhten Urinausscheidung modifizierter Nucleoside als Tumormarker beim Kolonkarzinom.  
*Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.*, 92, 114-120
39. Holtkamp, W. (1990)  
Klinische Bedeutung der Steroidhormonrezeptor-Bestimmung in Mammakarzinomgeweben.  
*Dtsch. Med. Wochenschr.*, 115, 1442-1447
40. Hopper, A.K., Furukawa, A.H., Pham, H.D., Martin, N.C. (1982)  
Defects in modification of cytoplasmic and mitochondrial transfer RNAs are caused by single nuclear mutations.  
*Cell*, 28, 543-550
41. Itoh, K., Konno, T., Sasaki, T., Ishiwata, S., Ishida, N., Misugaki, M. (1992)  
Relationship of urinary pseudouridine and 1-methyladenosine to activity of leukemia and lymphoma.  
*Clin. Chim. Acta*, 206, 181-189
42. Itoh, K., Aida, S., Ishiwata, S., Sasaki, S., Ishida, N., Mizugaki, M. (1993)  
Urinary excretion patterns of modified nucleosides, pseudouridine and 1-methyladenosine, in healthy individuals.  
*Clin. Chim. Acta*, 217, 221-223
43. Jakesz, R., Reiner, G., Schemper, M., Reiner, A., Blijham, G., Rainer, H., Dittrich, D., Spona, J., Schutte, B., Reynders, M., van Assche, C., Waldhör, T. (1989)  
Significant survival benefit of node-negative breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy: seven-year results.  
*Recent Results Cancer Res.*, 115, 180-185
44. Kattan, M.W., Beck, J.R. (1995)  
Artificial neural networks for medical classification decisions.  
*Arch. Pathol. Lab. Med.*, 119, 672-677

45. Kim, S.H. (1979)  
Crystal structure of yeast tRNA (Phe) and general structure features of other tRNAs, 83-100  
in: Schimmel, P.R., Söll, D., Abelson, J.N.: Transfer RNA: Structure, properties and recognition.  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbour, NY
46. King, C.R., Kraus, M.H., Aaronson, S.A. (1985)  
Amplification of a novel *verbB*-related gene in a human mammary carcinoma.  
*Science*, 229, 974-976
47. Kuo, K.C., Phan, D.T., Williams, N., Gehrke, C.W. (1990)  
Ribonucleosides in biological fluids by a high-resolution quantitative RPLC-UV method, C41-C113  
in: Gehrke, C.W., Kuo, K.C.: Chromatography and Modification of Nucleosides;  
Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo
48. Lamerz, R. (1992)  
CA 15-3, 1188-1193  
in: Thomas, L.: Labor und Diagnose;  
4. erweiterte Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Marburg
49. Liebert, A., Quietzsch, D., Beier, L. (1999)  
Comparison of the tumor associated proteases cathepsin D (CATH D) and urokinase-type plasminogen activator (uPA) in cytosols of human breast cancer patients.  
*Anticancer Res.*, 19, 2571-2576
50. Liebich, H.M., Di Stefano, C., Wixforth, A., Schmid, H.R. (1997a)  
Quantitation of urinary nucleosides by high-performance liquid chromatography.  
*J. Chromatogr. A*, 763, 193-197
51. Liebich, H.M., Lehmann, R., Di Stefano, C., Xu, G., Voelter, W. (1997b)  
Analysis of modified nucleosides in urine as potential tumour markers by HPLC and CE.  
*GIT Labor-Fachzeitschrift*, 92-93
52. Liebich, H.M., Lehmann, R., Xu, G., Wahl, H.G., Häring, H.-U. (2000)  
Application of capillary electrophoresis in clinical chemistry: the clinical value of urinary modified nucleosides.  
*J. Chromatogr. B*, 745, 189-196

53. Limbach, P.A., Crain, P.F., McCloskey, J.A. (1994)  
Summary: the modified nucleosides of RNA.  
*Nucleic Acids Res.*, 22, 2183-2196
54. Lin, V.K., Ortwerh, B.J. (1983)  
Competence and progression growth factors stimulate different tRNAlys modification reactions in BALB/C 3T3 cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115, 598-605
55. Maass, H., Jonat, W. (1979)  
Hormonrezeptoren und Mammakarzinom.  
*Dtsch. Med. Wochenschr.*, 104, 893-894
56. Marvel, C.C., Del Rowe, J., Bremer, E.G., Moskal, J.R. (1994)  
Altered RNA turnover in carcinogenesis. The diagnostic potential of modified base excretion.  
*Mol. Chem. Neuropathol.*, 21, 353-368
57. Marway, J.S., Anderson, G.J., Miell, J.P., Ross, R., Grimble, G.K., Bonner, A.B., Gibbons, W.A., Peters, T.J., Preedy, V.R. (1996)  
Application of proton NMR spectroscopy to measurement of whole-body RNA degradation rates: effects of surgical stress in human patients.  
*Clin. Chim. Acta*, 252, 123-135
58. Masuda, M., Nishihira, T., Itoh, K., Mizugaki, M., Ishida, N., Mori, S. (1993)  
An immunohistochemical analysis for cancer of the esophagus using monoclonal antibodies specific for modified nucleosides.  
*Cancer*, 72, 3571-3578
59. McEntire, J.E., Kuo, K.C., Smith, M.E., Stalling, D.L., Richens, J.W., Zumwalt, R.W., Gehrke, C.W., Papermaster, B.W. (1989)  
Classification of lung cancer patients and controls by chromatography of modified nucleosides in serum.  
*Cancer Res.*, 49, 1057-1062
60. Melton, D.A., De Robertis, E.M., Cortese, R. (1980)  
Order and intracellular location of the events involved in the maturation of a spliced tRNA.  
*Nature*, 284, 143-148
61. Merkle, E., Seidl, I., Bahr, I., Tulusan, A.H., von Maillot, K., Sauerbrei, K.W., Wirtz, P.M. (1990)  
Langzeituntersuchung zur Bedeutung von Hormonrezeptoren als Prognosefaktoren beim Mammakarzinom.  
*Geburtshilfe Frauenheilkd.*, 50, 528-532

62. Mettlin, C. (1999)  
Global breast cancer mortality statistics.  
CA Cancer J. Clin., 49, 138-144
63. Mikl, J., Aiginger, P., Czerwenka, K., Kubista, E., Salzer, H., Sevelde, P., Spona, J., Staffen, A., Zielinski, C.C. (1990)  
Adjuvant tamoxifen in postmenopausal stage II breast cancer five years on.  
Lancet, 335, 541
64. Mitchel, E.P., Evans, L., Schultz, P., Madsen, R., Yarbrow, J.W., Gehrke, C.W., Kuo, K. (1992)  
Modified nucleosides in human serum.  
J. Chromatogr. A, 581, 31-40
65. Motyl, T., Traczyk, Z., Holska, W., Daniewska- Michalska, D., Ciesluk, S., Kukulska, W., Kaluzny, Z., Podgurniak, M. (1993)  
Comparison of urinary neopterin and pseudouridine in patients with malignant proliferative diseases.  
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 31, 205-209
66. Müller-Hagedorn, S. (2002)  
Modifizierte Nucleoside als potentielle Tumormarker in der pädiatrischen Onkologie.  
Med. Dissertation, Universität Tübingen
67. Nakano, K., Shindo, K., Yasaka, T., Yamamoto, H. (1985a)  
Reversed-phase liquid chromatographic investigation of nucleosides and bases in mucosa and modified nucleosides in urines from patients with gastrointestinal cancer.  
J. Chromatogr., 332, 127-137
68. Nakano, K., Shindo, K., Yasaka, T., Yamamoto, H. (1985b)  
Reversed-phase high-performance liquid chromatographic investigation of mucosal nucleosides and bases and urinary modified nucleosides of gastrointestinal cancer patients.  
J. Chromatogr., 343, 21-33
69. Nakano, K., Nakao, T., Schram, K.H., Hammargren, W.M., McClure, T.D, Katz, M., Petersen, E. (1993)  
Urinary excretion of modified nucleosides as biological marker of RNA turnover in patients with cancer and AIDS.  
Clin. Chim. Acta, 218, 169-183
70. Nishikura, K., De Robertis, E.M. (1981)  
RNA processing in microinjected *Xenopus* oocytes. Sequential addition of base modifications in the spliced transfer RNA.  
J. Mol. Biol., 145, 405-420

71. Nitz, U., Dall, P. (2002)  
Neue Therapieansätze: stammzellgestützte Hochdosischemotherapie und molekulare Strategien beim Mammakarzinom.  
*Internist*, 43, 364-372
72. Pane, F., Savoia, M., Fortunato, G., Camera, A., Rotoli, B., Salvatore, F., Sacchetti, L. (1993)  
Serum pseudouridine in the diagnosis of acute leukaemias and as a novel prognostic indicator in acute lymphoblastic leukaemia.  
*Clin. Biochem.*, 26, 513-520
73. Paridaens, R., Sylvester, R.J., Ferrazzi, E., Legros, N., Leclercq, G., Heuson, J.C. (1980)  
Clinical significance of the quantitative assessment of estrogen receptors in advanced breast cancer.  
*Cancer*, 46, 2889-2895
74. Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. (1999)  
Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990.  
*Int. J. Cancer*, 80, 827-841
75. Prankel, B.H., Clemens, P.C., Burmester, J.G. (1995)  
Urinary excretion of nucleosides varies with age and protein metabolism.  
*Clin. Chim. Acta*, 234, 181-183
76. Rasmuson, T., Björk, G.R., Hietala, S.O., Stenling, R., Ljungberg, B. (1991)  
Excretion of pseudouridine as an independent prognostic factor in renal cell carcinoma.  
*Acta Oncol.*, 30, 11-15
77. Rasmuson, T., Björk, G.R. (1995)  
Urinary excretion of pseudouridine and prognosis of patients with malignant lymphoma.  
*Acta Oncol.*, 34, 61-67
78. Ravdin, P.M., Clark, G.M., Hilsenbeck, S.G., Owens, M.A., Vendely, P., Pandian, M.R., McGuire, W.L. (1992)  
A demonstration that breast cancer recurrence can be predicted by neural network analysis.  
*Breast Cancer Res. Treat.*, 21, 47-53
79. Ravdin, P.M., Clark, G.M. (1992)  
A practical application of neural network analysis for predicting outcome of individual breast cancer patients.  
*Breast Cancer Res. Treat.*, 22, 285-293

80. Sander, G., Topp, H., Heller-Schöch, G., Wieland, J., Schöch, G. (1986a)  
Ribonucleic acid turnover in man: RNA catabolites in urine as measure for the metabolism of each of the three major species of RNA.  
Clin. Sci. (Lond.), 71, 367-374
81. Sander, G., Hülsemann, J., Topp, H., Heller-Schöch, G., Schöch, G. (1986b)  
Protein and RNA turnover in preterm infants and adults: a comparison based on urinary excretion of 3-methylhistidine and of modified one-way RNA catabolites.  
Ann. Nutr. Metab., 30, 137-142
82. Sasco, A.J., Rey, F., Reynaud, C., Bobin, J.Y., Clavel, M., Niveleau, A. (1996)  
Breast cancer prognostic significance of some modified urinary nucleosides.  
Cancer Lett., 108, 157-162
83. Schmid, P., Possinger, K. (2002)  
Adjuvante und neoadjuvante systemische Therapie des Mammakarzinoms.  
Internist, 43, 341-353
84. Schwedt, G. (1996)  
Taschenatlas der Analytik  
Thieme, Stuttgart, New York
85. Sharma, O.K., Borek, E. (1970)  
Hormonal effect on transfer ribonucleic acid methylases and on serine transfer ribonucleic acid.  
Biochemistry, 9, 2507-2513
86. Shindo-Okada, N., Terada, M., Nishimura, S. (1981)  
Changes in amount of hypo-modified tRNA having guanine in place of queuine during erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells.  
Eur. J. Biochem., 115, 423-428
87. Simmonds, H.A., Fairbanks, L.D., Morris, G.S., Webster, D.R., Harley, E.H. (1988)  
Altered erythrocyte nucleotide patterns are characteristic of inherited disorders of purine or pyrimidine metabolism.  
Clin. Chim. Acta, 171, 197-210
88. Singer, C.E., Smith, G.R., Cortese, R., Ames, B.N. (1972)  
Mutant tRNA His ineffective in repression and lacking two pseudouridine modifications.  
Nat. New. Biol., 238, 72-74

89. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. (1987)  
Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.  
*Science*, 235, 177-182
90. Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., Press, M.F. (1989)  
Studies of HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.  
*Science*, 244, 707-712
91. Smith, T.M., Lee, M.K., Szabo, C.I., Jerome, N., McEuen, M., Taylor, M., Hood, L., King, M.C. (1996)  
Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1.  
*Genome Res.*, 6, 1029-1049
92. Söll, D.G. (1990)  
Introduction and Overview, B1-B11  
in: Gehrke, C.W., Kuo, K.C.T.: *Journal of Chromatography Library – volume 45B, Chromatography and Modification of Nucleosides, part B: biological roles and function of modification.*  
1. Auflage, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo
93. Spona, J., Thomas, L. (1992)  
Steroidhormon-Rezeptoren, 1246-1251  
in: Thomas, L.: *Labor und Diagnose;*  
4. erweiterte Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Marburg
94. Stearns, V., Yamauchi, H., Hayes, D.F. (1998)  
Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects.  
*Breast Cancer Res. Treat.*, 52, 239-259
95. Tafeit, E., Reibnegger, G. (1999)  
Artificial neural networks in laboratory medicine and medical outcome prediction.  
*Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, 845-853
96. Takei, Y., Kurobe, M., Uchida, A., Hayashi, K. (1994)  
Serum concentrations of basic fibroblast growth factor in breast cancer.  
*Clin. Chem.*, 40, 1980-1981

97. Tamura, S., Fujii, J., Nakano, T., Hada, T., Higashino, K. (1986)  
Urinary pseudouridine as a tumor marker in patients with small cell lung cancer.  
*Clin. Chim. Acta*, 154, 125-132
98. Tavtigian, S.V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacios, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D., Belanger, C., Bell, R., Berry, S., Bodgen, R., Chen, Q., Davis, T., Dumont, M., Frye, C., Hattier, T., Jammulapati, S., Janecki, T., Jiang, P., Kehrer, R., Leblanc, J.F., Mitchell, J.T., McArthur-Morrison, J., Nguyen, K., Peng, Y., Samson, C., Schroeder, M., Snyder, S.C., Steele, L., Stringfellow, M., Stroup, C., Swedlund, B., Swensen, J., Teng, D., Thomas, A., Tran, T., Tran, T., Tranchant, M., Weaver-Feldhaus, J., Wong, A.K.C., Shizuya, H., Eyfjord, J.E., Cannon-Albright, L., Labrie, F., Skolnick, M.H., Weber, B., Kamb, A., Goldgar, D.E., (1996)  
The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds.  
*Nat. Genet.*, 12, 333-337
99. Thomas, L. (1992)  
Maligne Erkrankungen, 1134-1142  
in: Thomas, L.: Labor und Diagnose;  
4. erweiterte Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Marburg
100. Thorpe, S.M., Rose, C. (1986)  
Oestrogen and progesteron receptor determinations in breast cancer. technology and biology.  
*Cancer Surv.*, 5, 505-525
101. Topp, H., Duden, R., Schöch, G. (1993)  
5,6-Dihydrouridine: a marker ribonucleoside for determining whole body degradation rates of transfer RNA in man and rats.  
*Clin. Chim. Acta*, 218, 73-82
102. Trewyn, R.W., Glaser, R., Kelly, D.R., Jackson, D.G., Graham, W.P., Speicher, C.E. (1982)  
Elevated nucleoside excretion by patients with nasopharyngeal carcinoma. Preliminary diagnostic/prognostic evaluations.  
*Cancer*, 49, 2513-2517
103. Tzahar, E., Yarden, Y. (1998)  
The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1377, M25-37

104. Uziel, M., Smith, L.H., Taylor, S.A. (1976)  
Modified nucleosides in urine: selective removal and analysis.  
*Clin Chem.*, 22, 1451-1455
105. Vold, B.S., Kraus, L.E., Rimer, V.G., Coombes, R.C. (1986)  
Use of monoclonal antibody to detect elevated levels of a modified nucleoside, N[9-(beta-D-ribofuranosyl)purin-6-ylcarbamoyl]-L-threonine, in the urine of breast cancer patients.  
*Cancer Res.*, 46, 3164-3167
106. Waalkes, T.P., Abeloff, M.D., Ettinger, D.S., Woo, K.B., Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Borek, E. (1982)  
Modified ribonucleosides as biological markers for patients with small cell carcinoma of the lung.  
*Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 18, 1267-1274
107. Wagener, C. (1992)  
CEA (Carcinoembryonales Antigen), 1146-1153  
in: Thomas, L.: Labor und Diagnose;  
4. erweiterte Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Marburg
108. Xu, G., Di Stefano, C., Liebich, H.M., Zhang, Y., Lu, P. (1999)  
Reversed-phase high-performance liquid chromatographic investigation of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients.  
*J. Chromatogr. B*, 732, 307-313
109. Xu, G., Schmid, H.R., Lu, X., Liebich, H.M., Lu, P. (2000)  
Excretion pattern investigation of urinary normal and modified nucleosides of breast cancer patients by RP-HPLC and factor analysis method.  
*Biomed. Chromatogr.*, 14, 459-463
110. Xu, G., Liebich, H.M., Lehmann, R., Müller-Hagedorn, S. (2001)  
Capillary electrophoresis of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients.  
*Methods. Mol. Biol.*, 162, 459-474
111. Yamamoto, Y., Toi, M., Kondo, S., Matsumoto, T., Suzuki, H., Kitamura, M., Tsuruta, K., Taniguchi, T., Okamoto, A., Mori, T., Yoshida, M., Ikeda, T., Tominaga, T. (1996)  
Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients.  
*Clin. Cancer Res.*, 2, 821-826

112. Yamauchi, H., Stearns, V., Hayes, D.F. (2001)  
When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer.  
J. Clin. Oncol., 19, 2334-2356
113. Zhao, R., Xu, G., Yue, B., Liebich, H.M., Zhang, Y. (1998)  
Artificial neural network classification based on capillary electrophoresis of urinary nucleosides for the clinical diagnosis of tumors.  
J. Chromatogr. A, 828, 489-496
114. Zielinski, C.C., Kuzmits, R., Kubista, E., Salzer, H., Staffen, A., Aiginger, P., Spona, J. (1985)  
Die Bedeutung der Hormonrezeptoren von Mammakarzinomzellen für die Dauer des erkrankungsfreien Intervalls.  
Wien. Klin. Wochenschr., 97, 493-497
115. Zotter, S., Lossnitzer, A., Hageman, P.C., Delemarre, J.F., Hilkens, J., Hilgers, J. (1987)  
Immunohistochemical localization of the epithelial marker MAM-6 in invasive malignancies and highly dysplastic adenomas of the large intestine.  
Lab. Invest., 57, 193-199



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle:

**Herrn Prof. Dr. H.M. Liebich** für die Überlassung des sehr interessanten Themas und für die zu jeder Zeit ausgezeichnete Betreuung sowohl in fachlicher als auch menschlicher Hinsicht.

**Herrn Dr. M. Zwirner** und **Herrn PD Dr. H. Seeger** aus der Frauenklinik der Universität Tübingen für die Bereitstellung der Urinproben der Mammakarzinompatientinnen.

**Herrn Dr. F. Dieterle** vom Institut Physikalische Chemie der Universität Tübingen für die Auswertung der Daten durch das Neuronale Netz.

**Frau Dr. S. Müller-Hagedorn** für die sehr engagierte Einarbeitung in das Thema sowie große Hilfestellung bei der Durchführung der Studie.

**Herrn J. Woell** für die sehr hilfreiche Unterstützung und wertvollen Hinweise bei der Durchführung der praktischen Tätigkeiten im Labor.

Allen **Probandinnen**, die Urin für die Studie bereitgestellt haben.

Meinen **Eltern**, die sehr viele Urinproben organisierten und mir zahlreiche Anregungen beim Schreiben der Arbeit gaben.



**Lebenslauf**

**Name** Klaus  
**Vorname** Fabian  
**Geburtsdatum und -ort** 03.09.1977 in Stuttgart-Bad Cannstatt  
**Universität**  
WS 98/99 bis 04/05 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

**Zertifikate**

2005, 18. Mai Approbation als Arzt  
2005, 11. Mai 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/Ärztliche Prüfung (Note 2,0)  
2004 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)  
2002 Förderpreis der Wilhelm und Else Heraeus-Stiftung, verliehen im Rahmen der Dissertation  
2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)  
2000 Ärztliche Vorprüfung (Note 2,0)  
1997 Abitur (Note 1,1)

**Praktische Tätigkeiten****Praktisches Jahr 04/05**

3. Tertial Neurologie am Bürgerhospital des Klinikums Stuttgart  
2. Tertial Innere Medizin am Stadtspital Triemli Zürich, Schweiz  
1. Tertial Chirurgie am Krankenhaus Bad Cannstatt des Klinikums Stuttgart und am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York City, USA

### **Famulaturen**

- |      |  |
|------|--|
| 2003 | 1 Monat Neurologie an der McMaster University in Hamilton, Kanada                      |
| 2002 | 1 Monat Accident and Emergency am Eastbourne District General Hospital, Großbritannien |
| 2001 | 1 Monat Chirurgie an den Städtischen Kliniken Esslingen                                |
| 2000 | 1 Monat Innere Medizin am Paracelsus-Krankenhaus Ruit                                  |

### **Krankenpflegepraktikum**

- |      |  |
|------|--|
| 1998 | 2 Monate Krankenpflegepraktikum an der Filderklinik in Filderstadt |
|------|--|

### **Zivildienst**

- |         |   |
|---------|---|
| 1997-98 | Zivildienst im Kinder- und Jugendheim Neuhausen |
|---------|---|

### **Schulbildung**

- |         |   |
|---------|---|
| 1988-97 | Otto-Hahn-Gymnasium, Ostfildern           |
| 1984-88 | Friedrich-Schiller-Grundschule, Neuhausen |